文章编号:1000-5404(2006)02-0101-03

论著

咖啡酸苯乙酯对大肠癌细胞 β-catenin 蛋白表达的影响

向德兵[1,2],何渝军[3],牟江洪[2],王 东[1,2],李增鹏[2],肖华亮[2],张沁宏[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,[3]普通外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)对体外培养的人大肠癌 HCT116 和 SW480 细胞 β-catenin 蛋白表达的影响。**方法** 以大肠癌细胞株 HCT116 和 SW480 为研究对象,应用间接免疫荧光、Western blotting 检测 2.5、5.0、10 mg/L CAPE 处理 24、48 h 后细胞 β-catenin 表达变化。**结果** Western blotting 检测结果显示 2.5、5.0、10 mg/L CAPE 处理 HCT116 和 SW480 细胞 24、48 h 后 β-catenin 总蛋白表达降低,呈剂量和时间依赖性,间接免疫荧光检测结果显示细胞 β-catenin 蛋白胞核及胞浆表达下调,细胞连接处胞膜表达上调。**结论** CAPE 能明显下调 β-catenin 蛋白表达并阻止其核转位,这可能是其抗癌作用的重要分子机制。

关键词: 咖啡酸苯乙酯;β-catenin;Wnt 通路;大肠癌
中图法分类号: R730.23;R735.3;R916.4 **文献标识码:** A

Effect of caffeic acid phenethyl ester on the expression of β-catenin in the cultured human colorectal cancer cell lines

XIANG De-bing[1,2], HE Yu-jun[3], MOU Jiang-hong[2], WANG Dong[1,2], LI Zeng-peng[2], XIAO Hua-liang[2], ZHANG Qin-hong[2] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, [3]Department of General Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the expression of β-catenin in the cultured colorectal cancer cell lines. **Methods** HCT116 and W480 cells were treated with CAPE at serial concentrations of 2.5, 5, and 10 mg/L. β-catenin protein expression was assayed by Western blot analysis. β-catenin localization was detected by indirect immunofluorescence. **Results** CAPE treatment was associated with decreased total β-catenin protein expression. The expression of β-catenin at the cell nucleus and cytoplasm was downregulated, but at the cell-cell linked site the β-catenin protein expression was upregulated. **Conclusion** CAPE can downregulate the expression of β-catenin and inhibit the translocation of β-catenin to nucleus, which may play an important role in the anticancer activity of CAPE.

Key words: colorectal cancer; β-catenin; caffeic acid phenethyl ester

β-catenin 作为 Wnt 信号通路的关键分子,在大肠癌的发生和发展中具有重要作用。腺瘤性结肠息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)基因的失活突变或癌基因 CTNNB1(编码 β-catenin 蛋白)激活突变等因素导致 Wnt 信号通路异常激活,使细胞浆内游离的 β-catenin 积聚并发生核转位,进一步与 T 细胞因子-4(Tcf-4)结合形成复合物,激活下游靶基因转录,而这些靶基因在大肠癌发生发展过程中都起着非常重要作用[1]。咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)作为蜂胶抗肿瘤作用的主要活性成分,对人白血病和多种实体瘤细胞有抑制增殖和诱导凋亡作用,且发现 CAPE 可显著降低转基因小鼠(转染突变型 APC 基因)和致癌剂诱发的大鼠大肠肿瘤的发生率[2,3]。我们研究发现 CAPE 能明显抑制大肠癌细胞增殖、诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞[4,5],其作用机制

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100228),重庆市科委应用基础基金资助项目(20016824)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30100228) and the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Scientific Commiffec of Chongqing(20016824)

作者简介: 向德兵(1972-),男,四川省广安市人,博士研究生,主治医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究,发表论文 9 篇。电话:(023)68757354,E-mail: xdb86@hotmail.com
通讯作者: 王 东,电话:(023)68757706,E-mail:dongwang64@hotmail.com

收稿日期: 2005-07-21;**修回日期:** 2005-11-04

目前尚不清楚。本研究以 Wnt 通路异常的大肠癌细胞 HCT116（mutant CTNNB1，wild-type APC）和 SW480（mutant APC，wild-type CTNNB1）为研究对象，探讨 CAPE 对 Wnt 通路关键分子 β-catenin 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠癌细胞 HCT116 和 SW480 购自美国 ATCC。CAPE、二甲基亚砜（DMSO）、小鼠 β-catenin 单克隆抗体为 Sigma 公司产品。HRP 及 FITC 标记的羊抗小鼠二抗购自美国 Pierce 公司，RPMI1640 培养基、胎牛血清为 Hyclone 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 HCT116、SW480 细胞置于 37 ℃，饱和湿度，含 50 ml/L CO_2 的孵箱中培养，培养液 RPMI1640 含有 100 ml/L 胎牛血清，1.0×10^5 U/L 青霉素和链霉素。根据细胞生长状况每 2～3 天换液 1 次，当细胞生长状态稳定，呈对数生长期时，用于实验。CAPE 临用前以 DMSO 溶解，用 RPMI 1640 液稀释（RPMI1640 液中 DMSO 浓度小于 1 ml/L）。

1.2.2 β-catenin Western blot 分析 将 HCT116、SW480 细胞经浓度分别为 2.5、5.0、10 mg/L 的 CAPE 处理后，继续培养 24 h 和 48 h 后收集细胞，常规提取细胞总蛋白。取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳（分离胶浓度为 10%，积层胶浓度为 5%）。电泳后转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉封闭后，加入 β-catenin 一抗，4 ℃孵育 1 h 后室温下摇床孵育 1 h，加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗，室温下摇床孵育 1 h。以 ECL 试剂盒显色。用 Bio-Rad 公司 Quantity one 凝胶扫描分析系统扫描 X 线片，Labwork 3.0 图像分析软件进行图像分析，测定各条带光密度值，结果以积分光密度值（IOD）表示。

1.2.3 β-catenin 免疫荧光染色 取出经不同浓度 CAPE 作用 24、48 h 后细胞盖玻片，经 PBS 浸泡后浸入预冷的甲醇液中固定 10 min。用 1% 牛血清白蛋白封闭 10 min，吸掉封闭液，加入 β-catenin 一抗，4 ℃过夜。吸掉一抗溶液，PBS 浸泡 3 次，每次 5 min，加入 FITC 标记的羊抗小鼠二抗溶液，室温下孵育 30 min，PBS 浸泡 3 次，每次 5 min。缓冲甘油封片后，在荧光显微镜下观察。结果在共聚焦显微镜下扫描并摄像。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和均数间多重比较。

2 结果

2.1 CAPE 对大肠癌 HCT116 和 SW480 细胞 β-catenin 蛋白含量的影响

不同剂量 CAPE 作用 HCT116 和 SW480 细胞 24、48 h 后，细胞 β-catenin 蛋白含量均有不同程度的下降，与对照组（0 mg/L）比较有显著性差异（$P<0.05$、$P<0.01$）。随着 CAPE 浓度的增高，β-catenin 蛋白含量逐渐下降，随着作用时间的延长，β-catenin 蛋白含量也逐渐下降。提示 CAPE 的作用呈剂量和时间依赖性（表 1、2，图 1）。

表 1 不同剂量 CAPE 对 HCT116 细胞 β-catenin 蛋白含量的影响

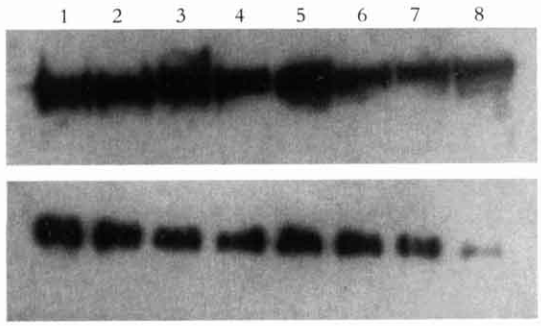
CAPE 浓度（mg/L）	β-catenin 蛋白含量（IOD）	
	24 h	48 h
0	325.35 ± 33.49	283.07 ± 14.52
2.5	315.57 ± 39.14	114.37 ± 30.15[bd]
5.0	280.55 ± 22.55[a]	72.18 ± 26.47[bd]
10	203.93 ± 13.42[bc]	61.63 ± 5.65[bcd]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 0 mg/L CAPE 比较；c：$P<0.01$，与 2.5 mg/L比较；d：$P<0.01$，与 24 h 比较

表 2 不同剂量 CAPE 对 SW480 细胞 β-catenin 蛋白含量的影响

CAPE 浓度（mg/L）	β-catenin 蛋白含量（IOD）	
	24 h	48 h
0	270.94 ± 30.87	210.33 ± 31.69
2.5	204.44 ± 51.87	139.31 ± 5.53[a]
5.0	122.38 ± 32.11[b]	67.13 ± 27.49[bc]
10	105.16 ± 18.11[ac]	52.14 ± 15.58[acd]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 0 mg/L CAPE 比较；c：$P<0.01$，与2.5 mg/L CAPE 比较；d：$P<0.05$，与 24 h 比较



A：HCT116；B：SW480

1-4(24 h)：对照组，2.5 mg/L CAPE，5.0 mg/L CAPE，10 mg/L CAPE；5-8(48 h)：对照组，2.5 mg/L CAPE，5.0 mg/L CAPE，10 mg/L CAPE

图 1 CAPE 对大肠癌细胞 β-catenin 蛋白表达的影响

2.2 CAPE 对大肠癌 HCT116 和 SW480 细胞 β-catenin 蛋白定位的影响

免疫荧光检测显示经不同剂量的 CAPE 作用后，HCT116 和 SW480 细胞细胞核内的 β-catenin 表达均有不同程度的减少，细胞浆内的 β-catenin 表达也有所减少，但细胞膜和细胞间连接处 β-catenin 表达明显增强。

3 讨论

CAPE 是一种酚类抗氧化剂，对人白血病和多种实体瘤细胞有抑制增殖和诱导凋亡作用，CAPE 及其衍生物对不同细胞具有选择性的毒性作用，CAPE 呈剂量依赖方式抑制结肠癌细胞 CT26 的生长，但对人脐血管上皮细胞却没有作用[6]。动物实验也显示，

CAPE 治疗后可减少由致癌物导致的小鼠结肠畸形腺窝灶（aberrant crypt foci，ACF）形成和结肠肿瘤的产生[3]，而目前认为结肠 ACF 的形成是导致大肠癌发生的关键阶段。研究报道口服和腹腔注射 CAPE 后还可明显减少鼠结肠癌肺转移灶的形成[6,7]。我们研究发现 CAPE 能明显抑制大肠癌细胞增殖、诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞，其作用机制目前尚不清楚。

大肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一[8]。据统计，约 90% 大肠癌的发生与 Wnt 信号通路的异常激活有关。正常成熟细胞质内的 β-catenin 大部分与细胞膜上的钙粘蛋白（cadherin）胞内肽段结合，参与细胞粘连、生长，增殖等过程；少部分与细胞质内 APC 蛋白、糖原合成酶激酶-3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）及轴蛋白（axin）结合成多蛋白复合体，其中 APC 蛋白作为载体将 β-catenin 与 GSK-3β 联系起来，GSK-3β 通过磷酸化可降解 β-catenin，因而细胞质内游离 β-catenin 水平极低，不能进入细胞核调控相应基因表达。异常 Wnt 通路致癌的关键是细胞质内游离的 β-catenin 积累，与 Tcf-4 结合形成复合物，然后穿梭入核内，启动靶基因转录。免疫组织化学显示正常大肠黏膜上皮 β-catenin 的阳性着色主要定位于细胞膜，而大肠腺瘤及大肠癌中普遍存在 β-catenin 表达异常，即在细胞质及细胞核内异常积聚[9,10]。Bissonnette 等在实验性毒物诱导的大肠癌研究中也得到了类似的研究结果。提示 β-catenin 异常与大肠癌发生发展密切相关。因此本研究探讨 CAPE 对大肠癌细胞 Wnt 信号通路关键信号分子 β-catenin 表达的影响。

我们应用 Western blot 方法检测不同浓度的 CAPE 作用两株大肠癌细胞后 β-catenin 蛋白含量的变化，其中 HCT116 细胞表达野生型 APC 基因和突变型 β-catenin 基因，而 SW480 细胞表达突变型 APC 基因和野生型 β-catenin 基因。因为这两株细胞被认为最能反应大多数非整倍体大肠肿瘤细胞的基因表型，同时这些基因表型也是推测的大肠癌化疗的作用靶点。结果显示 CAPE 作用后，细胞 β-catenin 蛋白含量均有不同程度的下降，与对照组比较有显著性差异（$P<0.05$、$P<0.01$）。随着 CAPE 剂量的增高和作用时间的延长，β-catenin 蛋白含量逐渐下降，提示 CAPE 的作用呈剂量和时间依赖性。同时我们应用免疫荧光方法检测了 CAPE 作用后细胞 β-catenin 蛋白表达定位的变化，发现作用后细胞核和细胞浆内的 β-catenin 表达均有不同程度的减少，而细胞膜和细胞间连接处 β-catenin 表达明显增强。因为 HCT116 和 SW480 细胞分别存在 β-catenin 基因或 APC 基因的突变，所以会导致细胞内 β-catenin 蛋白积累，而细胞内 β-catenin 蛋白积累正是异常 β-catenin 相关信号通路的关键环节。我们的结果表明 CAPE 作用大肠癌细胞后，可下调 β-catenin 蛋白表达水平并阻止其核转位。

Wnt 通路异常在多种肿瘤的发生发展中起重要作用，该通路抑制剂的研究成了新的热点[11,12]。我们研究发现 CAPE 可能是 Wnt 通路的较好抑制剂，可促进该通路关键信号分子 β-catenin 从细胞核向细胞膜易位，下调 β-catenin 蛋白表达，从而引起大肠癌细胞生长抑制，细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡。CAPE 对 Wnt 通路靶基因和转录因子 Tcf 活性的影响仍有待进一步研究。

参考文献：

[1] GILES R H, VAN ES J H, CLEVERS H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1653(1): 1-24.

[2] MAHMOUD N N, CAROTHERS A M, GRUNBERGER D, *et al*. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(5): 921-927.

[3] BORRELLI F, IZZO A A, DI CARLO G, *et al*. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon[J]. Fitoterapia, 2002, 73(Suppl 1): S38-S43.

[4] 向德兵，何渝军，王　东，等. 咖啡酸苯乙酯诱导人大肠癌细胞凋亡的研究[J]. 肿瘤防治杂志，2004，11(3)：229-232.

[5] 向德兵，何渝军，吴晓华，等. 咖啡酸苯乙酯对大肠癌 HCT116 细胞增生的抑制作用[J]. 世界华人消化杂志，2004，12(5)：1053-1056.

[6] LIAO H F, CHEN Y Y, LIU J J, *et al*. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(27): 7907-7912.

[7] NAGAOKA T, BANSKOTA A H, TEZUKA Y, *et al*. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester analogues on experimental lung metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(5): 638-641.

[8] 牟江洪，李增鹏，王　东，等. 大肠癌多种肿瘤标志物蛋白芯片联合检测及其在诊断中的意义[J]. 消化外科，2005，4(4)：268-270.

[9] 向德兵，吴晓华，李增鹏，等. 大肠癌 β-连环素和上皮钙黏附素表达及其意义[J]. 肿瘤防治杂志，2002，9(1)：39-42.

[10] 何渝军，刘宝华，向德兵. β-catenin 蛋白表达与大肠腺瘤癌变的关系[J]. 第三军医大学学报，2004，26(1)：78-80.

[11] DIHLMANN S, VON KNEBEL DOEBERITZ M. Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics[J]. Int J Cancer, 2005, 113(4): 515-524.

[12] LUU H H, ZHANG R, HAYDON R C, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2004, 4(8): 653-671.

（编辑　薛国文）