基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0725-03

CAPE 对神经胶质瘤生长抑制作用研究

郭 川[1],唐文渊[1],钟 东[1],晏 怡[1],姚声涛[1],刘子杰[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科;2. 重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨咖啡酸苯乙酯(Caffeic acid phenethyl ester,CAPE)在人神经胶质瘤中的治疗作用。方法:建立裸鼠胶质瘤模型,观察 CAPE 在体内对肿瘤的影响。运用实时荧光定量 PCR、Western blotting 检测 CAPE 对胶质瘤细胞株 U251 异常 Wnt/β-catenin 通路及靶基因 c-myc 的影响。结果:通过对荷瘤鼠模型的观察,发现口服 CAPE 可以抑制神经胶质瘤的生长。CAPE 可以抑制 β-catenin 基因 mRNA 及蛋白的表达,下游靶基因 c-myc 的 mRNA 及蛋白表达也相应降低。结论:CAPE 可以抑制神经胶质瘤异常 Wnt/β-catenin 通路中 β-catenin 基因及 c-myc 基因的表达,对神经胶质瘤的生长有抑制作用。

【关键词】β-catenin;咖啡酸苯乙酯;神经胶质瘤

【中国图书分类法分类号】R730.53 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-18

Effects of caffeic acid phenethyl ester in wnt/β-catenin signaling pathway on human neuroglioma

GUO Chuan, et al

(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The therapic effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in neuroglioma was to be investigated in this article. *Methods*: Athymic mouse model was constructed for therapic observation when tumor was treated by CAPE in vivo. Then Real-time PCR was employed to detected the expressing level of c-myc and β-catenin genes in Wnt/β-catenin signaling pathway when U251 cells were treated by CAPE. *Results*: CAPE could inhibit the growth of neuroglioma in athymic mouse through drug oral application. The mRNA and protein expression of β-catenin were inhibited. Furthermore, c-myc gene, which was the downstream of β-catenin gene, was also down-regulated after the drug treatment. *Conclusion*: The expressing level of β-catenin and c-myc genes were down-regulated after CAPE treatment, by which the growth of neuroglioma could be inhibited.

【key words】β-catenin; Caffeic acid phenethyl ester(CAPE); Neuroglioma

神经胶质瘤是最常见的神经恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势,目前的多种治疗方法效果都不尽理想。神经胶质瘤治疗的关键在于寻找触发其发生发展的始动因素,从而采取针对性的靶向治疗。近年发现异常 Wnt/β-catenin 通路在神经胶质瘤的发生发展中起着重要作用,此通路改变可能是肿瘤发生的机制之一。

许多植物多酚化合物,抗氧化剂,ω-3 脂肪酸等对神经胶质瘤有明显的预防和治疗作用,并能提高放化疗敏感性,减轻放化疗对正常组织的毒性反应[1,2]。咖啡酸苯乙酯是一种酚类抗氧化剂,对肿瘤细胞具有选择性的抑制作用,而对正常细胞几乎没有毒性作用。有研究发现咖啡酸苯乙酯(Caffeic acid phenethyl ester,CAPE)抑制大肠癌增殖,并呈时间及剂量依赖性[3],且体内 CAPE 明显抑制大肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤的生长,但其确切机制尚不清楚。本课题旨在分析 CAPE 在神经胶质瘤细胞株中是否抑制了异常 Wnt/β-catenin 通路。并通过建立裸鼠胶质瘤模型,探索 CAPE 对神经胶质瘤是否有治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

U251 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会上海细胞库;裸鼠由重庆医科大学动物实验中心提供;胎牛血

作者介绍:郭 川(1974-),男,博士,研究方向:脑肿瘤的治疗。

通讯作者:唐文渊,男,教授,E-mail: twywym@cta.cq.cn。

清(杭州 赛乐公司);RPMI-1640 培养基,TRIZOL(美国 Invitrogen 公司);引物合成,RT-PCR 试剂盒,SYBR green qPCR Master Mix,连接试剂盒(美国 fermentas 公司);T 载体,DNA 凝胶回收试剂盒,DNA 产物纯化试剂盒,质粒小量抽提试剂盒(美国 Biomed 公司);RIPA(北京 BIOMED 公司);β-catenin、c-myc 蛋白抗体(美国 santa cruz 公司),化学发光试剂(杭州联科公司);CAPE(德国,merck 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人神经胶质瘤细胞株 U251 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,5% CO_2、37℃培养。

1.2.2 CAPE 体内实验 U251 胶质瘤细胞用含10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液在 5%CO_2、37℃培养箱中常规培养传代。取 4 周龄裸鼠共 20 只,随机分为两组各 10 只,接种 U251 胶质瘤细胞 2×10^6 个于背部,饲养于无特定病原体(Specific pathogen free,SPF)级实验动物房。待成瘤 1 月时给予实验组荷瘤鼠口服 CAPE 5 mg/d,共 3 周,对照组荷瘤鼠常规饲养。观察植入瘤大小变化,测量肿瘤最终体积,计算抑瘤率。抑瘤率=(对照组相对体积 - 实验组相对体积)/ 对照组相对体积 × 100%。取瘤组织待测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(Real-Time Quantitative PCR)检测 β-catenin 前准备 Trizol 提取 U251 细胞总 RNA,取 0.5 μg 总 RNA 用于 RT-PCR,按试剂盒说明书进行操作。β-catenin 基因用上游引物 5'TCATGCCATCTGTGCTCTTC 3';下游引物 5' TTGGGATGGTGGGTGTAAG 3' 进行扩增,扩增产物为 124 bp;β - actin 扩增引物为:上游引物 5'TACCAACTGGGACGACAT3',下游引物 5'ACAGCCTGGATGGCTACG 3',扩增片段长度 189 bp。RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收,T 载体按 1:10 的比例进行连接,16℃过夜。将连接产物转化 DH5α 菌,挑取菌落进行 PCR 鉴定,PCR 鉴定阳性的克隆提取质粒测序。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 β-catenin 在体内瘤的表达情况 匀浆器研磨瘤体,提取总 RNA。根据实时荧光定量 PCR 的 OD 值确定 β-catenin 浓度,将标准品梯度稀释(10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3 coples/μl)作为模板进行 Real-Time PCR 反应,制作标准曲线。20 μl 反应体系中包括:2 × SYBR green qPCR Master Mix 10 μl,上下游引物各 0.5 μl,双蒸水 8μl,重组质粒 DNA 1 μl,每个样品均做 3 个平行管,由电脑自动分析并计算结果。

1.2.5 Western blotting 检测 β-catenin 蛋白及 c-myc 蛋白匀浆器研磨后收集实验组及对照组瘤体细胞,按 RIPA 裂解液说明书提取总蛋白。经 100 g/L SDS-PAGE 电泳,分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜,0.5%脱脂奶粉 /PBS 封闭 2 h,加入 1:200 稀释的 β-catenin、c-myc 鼠单克隆抗体,4℃过夜。TBS 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000),37℃孵育 1 h,TBS 洗膜 3 次后 ECL 显色反应 3 min,用化学发光成像系统成像。

1.2.6 统计学分析 所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用统计学软件为 SPSS12.0 进行分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CAPE 对裸鼠体内瘤作用

以胶质瘤细胞株 U251 植入裸鼠,1 个月后可见3组小鼠背部均有胶质瘤形成,口服 CAPE 3 周后取瘤。对照组瘤体可达(2.31 ± 0.31)×(2.01 ± 0.23)cm,瘤重(311.68 ± 4.43) mg。实验组瘤体可达(1.81 ± 0.26)×(1.66 ± 0.19) cm,瘤重(207.52 ± 5.39) mg。根据单向方差分析,可得两组瘤体大小具有统计学差异,实验组瘤体明显小于对照组的瘤体($P<0.01$),抑瘤率为 48.39%。

2.2 β-catenin 基因标准品扩增 RT-PCR 结果

以 U251 细胞总 RNA 为模板,用特异 β-catenin 引物扩增出大小约为 124 bp 的条带,扩增产物与预期片段大小相似(图 1)。

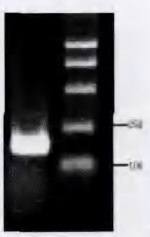


图 1 β-catenin 基因扩增

2.3 实时荧光定量 PCR 分析 CAPE 作用移植瘤细胞后 β-catenin 基因表达水平

β-catenin 标准品的标准曲线相关系数是 0.996(>99%),说明该标准品能很好的用于实验。实时荧光定量 PCR 结果显示,β-catenin 与 β-actin 的相对比值在 U251 细胞中为 0.193 ± 0.03,CAPE 作用移植瘤中为 0.089 ± 0.04。经统计学分析二者表达差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 Western blotting 分析 CAPE 作用移植瘤细胞后 β-catenin 蛋白表达水平

Western blotting 分析显示 β-catenin 蛋白及 c-myc 蛋白在 CAPE 作用后 U251 移植瘤细胞表达均较无 CAPE 作用 U251 移植瘤细胞低(图 2),二者

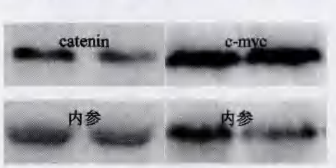


图 2 β-catenin 蛋白及 c-myc 蛋白在 CAPE 作用后移植瘤中的表达情况

差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

Wnt/β-catenin 信号传导通路是近年来发育生物学及肿瘤生物学研究的热点。越来越多的证据表明,Wnt/β-catenin 信号传导通路不仅在胚胎发育调控中起至关重要的作用,而且它与肿瘤的发生也有密切相关。目前已经发现 c-myc 的激活与神经胶质瘤、Burkitt's 淋巴瘤、肺癌、结肠癌等多种人类肿瘤相关。随着对 Wnt/β-catenin 信号通路的深入研究,发现原癌基因 c-myc 和 cyclinD1 是该通路的两个下游靶基因,β-catenin 与 Tcf-4 结合成复合物并发生核转位,通过转录激活癌基因 c-myc 和 cyclinD1 等[4,5]。有研究表明,此通路在卵巢上皮肿瘤的发生、发展起重要作用,β-Catenin 异常表达可能激活原癌基因 c-my、cyclinD1 的表达[6]。而这些下游基因都与细胞的增殖、分化有着密切的联系。

蜂胶作为一种民间药物,已证明其具有抗病原微生物、抗炎、免疫调节和抗肿瘤作用。目前,蜂胶中抑制肿瘤细胞生长的有效成分已被鉴定出来,主要是咖啡酸类的衍生物和黄酮类化合物,其中CAPE 是其抗肿瘤作用的主要活性成分。1988 年 Grunberger 等人就从以色列的蜂胶中首次分离出 CAPE,并发现 CAPE 对肿瘤细胞具有特定的细胞毒性作用,2μg/ml 浓度的 CAPE 就可以有效抑制肿瘤细胞的生长,但是对于正常的细胞,即使 CAPE 的浓度提高 5 倍(10 μg/ml)仍不具有毒性作用,同时发现天然的与合成的 CAPE 的性质完全相同。Nagaoka 等[6]研究发现 CAPE 可选择性诱导肿瘤细胞株的 DNA 断裂,从而发挥抑制细胞增殖作用。

本试验在动物体内构建神经胶质瘤模型,成瘤后给荷瘤鼠口服 CAPE,较好地模拟了临床上药物的给予方式。通过计算抑瘤率,并使用实时荧光定量 PCR,Western blotting 技术检测动物口服 CAPE 后体内神经胶质瘤 β-catenin 基因及靶基因 c-myc 的变化。结果显示,荷瘤鼠在口服 CAPE 后移植瘤 β-catenin mRNA 及蛋白表达较对照组有所降低($P<0.05$),而受 β-catenin 调控的下游靶基因 c-myc 的mRNA 及蛋白的表达对照组亦较对照组相应降低($P<0.05$)。一般认为,抑瘤率达到 40%即为有效,结果显示荷瘤鼠在口服 CAPE 后抑瘤率为 48.39%($P<0.01$)。因此我们认为,CAPE 在体内可以抑制 β-catenin mRNA 及蛋白表达,同时也降低了下游靶基因 c-myc mRNA 及蛋白的表达。本实验首次将非细胞毒性化合物 CAPE 用于治疗神经胶质瘤,并验证了其靶点为 Wnt/β-catenin 信号传导通路。但是否对其他信号通路或基因也有作用,以及 CAPE 作用于 Wnt/β-catenin 信号传导通路的具体机制有待我们进一步研究。

肿瘤的发生生长极为复杂,治疗也极为困难,本研究仅从抑制 Wnt/β-Catenin 信号传导通路进行探索。CAPE 抑制 Wnt/β-catenin 信号传导通路来作为一个新的治疗靶点,为神经胶质瘤的基因治疗开辟新的道路。有关神经胶质瘤的治疗,抑制 Wnt/β-catenin 信号传导通路也只是其中的一个可能的治疗靶点,具体方法仍有待更为深入地研究。

参 考 文 献

[1] Garg A K, Buchholz T A, Aggarwal B B, et al. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols[J]. Antioxid Redox Signal, 2005,7(11-12): 1630-1647.

[2] Wang D, Xiang D B, He Y J, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2005,11(26): 4008-4012.

[3] Xiang D, Wang D, He Y, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling[J]. Anticancer Drugs, 2006,17(7):753-762.

[4] Brabletz T, Herrmann K, Jung A, et al. Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas[J]. Am J Pathol, 2000,156:865-870.

[5] He T C, Chan T A, Vogelstein B, et al. PPAR is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. Cell, 1999,99:335 - 345.

[6] 林 晓,李 昱,张 雄,等.Beta-catenin,APC 蛋白,c-myc 及 cyclinD1 在卵巢上皮肿瘤中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报,2006,31(1):50-54.

[7] Nagaoka T, Banskota A H, Tezuka Y, et al. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line[J]. Bioorg Med Chem, 2002,10(10): 3351-3359.

(责任编辑:冉明会)