

0920056071

Caffeic acid phenethyl ester 抑制 C6 神經膠質瘤

細胞增長之作用及其分子機制之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91 -2320 -B -040 -049 -

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：曾翠華

共同主持人：

計畫參與人員：李衍彰 郭星君 林婉琪

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 92 年 10 月 日

中文摘要

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) 是蜂膠的組成分之一。蜂膠具多功用的生物與藥理作用:有抗菌、抗發炎、抗黴菌、抗病毒、抗腫瘤等性質。目前蜂膠中抑制癌症細胞的成分部分已被鑑定出來,主要是 Caffeic acid (CA)類的衍生物。過去我們發現 CAPE and ethyl caffeate (EC)對於口腔癌化細胞具有毒殺能力,所以我們針對 C6 glioma cells 先以 CAPE 與其相關衍生物 CA 及 EC 作處理,發現 CAPE 投以 C6 glioma cells 之毒殺能力最強。當處理 CAPE (50 μ M) 36 小時可觀察到細胞核濃染和 DNA 片段化現象;接著同一時間利用流式細胞儀分析細胞週期,得知有 24 % 細胞 DNA 呈現凋亡片段,55 % 的細胞停滯在 G0/G1 期,而且只有 8 % 細胞處於 S 期,G2/M 期消逝為 0 %。以 CAPE 為化學治療劑所導致 C6 glioma cells 的細胞凋亡路徑之研究,發現處理 CAPE 3 小時後,p53 與 Fas/Apo 旋即上昇,Cytochrome C 自粒腺體釋出至細胞質,且伴隨 p53 的磷酸化而致使活化下游相關基因表達,而 anti-apoptotic Bcl-2 表現減少和 pro-apoptotic Bax、Bak、Bcl-Xs 表現增加。在藉由 MEK 抑制劑 (PD98059) 與 p38 抑制劑 (SB203580)交叉作用,得知 p38 和 ERK 參與 C6 glioma cells 的凋亡訊息路徑。另外,之前細胞週期分析 CAPE (50 μ M) 處理 24 小時,細胞週期停滯在 G0/G1 期;利用 IB 分析相關細胞週期蛋白:RB, cyclins, cdks, and CDKIs,發現 Rb phosphorylation, cyclin D, cyclin E 蛋白表現減少,且 CDKI p16, p21, p27 表現大增。經由以上實驗推論,當 C6 glioma cells 處理 CAPE 之下,ERK 與 p38 分別調控著細胞生長停滯與凋謝死亡不同路徑;除此 p38 kinase 調控著因 CAPE 所誘發的細胞凋亡路徑是由於影響 p53 及 caspase 3 的作用。在裸鼠皮下移植神經膠質瘤細胞的動物實驗方面,發現 CAPE 能有效抑制轉殖腫瘤裸鼠之急性生長,更提供抗癌、防癌天然物領域更進一步之開拓與機制之了解。

關鍵詞: 蜂膠,神經膠質瘤細胞,凋亡,細胞週期,轉殖腫瘤

英文摘要

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis, has many biological and pharmacological activities including antioxidant, anti-inflammation, antiviral action and anticancer effect. Our previous studies showed that CAPE exhibited significant cytotoxicity in oral cancer cells. Herein we further investigated the cytotoxicity potential of CAPE and the mechanism of its action in C6 glioma cells. The data exhibited that C6 glioma cells underwent internucleosomal DNA fragmentation 24 h after the treatment of CAPE (50 μ M). The proportion of C6 glioma cells with hypodiploid nuclei was increased to 24 % at 36 h after the exposure. Further results showed that CAPE induced the release of cytochrome C from mitochondria into cytosol, and the activation of CPP32. CAPE application also enhanced the expression of p53, Bax, and Bak. Finally, the potential signaling components underlying CAPE induction of apoptosis were elucidated. We found that CAPE activated extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in C6 glioma cells. More importantly, p38 kinase formed a complex with p53 after the treatment of CAPE for 0.5 h. The expression of p53, phospho-serine 15 of p53, and Bax, and inactivate form of CPP32 was suppressed by a pretreatment of a specific p38 MAPK inhibitor, SB203580. In addition, we found that CAPE decreased the expression of hyperphosphorylation form of RB, increased the expression of CDKI p16, p21, p27, and decreased the association of CDK2 and cyclin E that resulted in cell cycle arrest in G1 phase. Furthermore, *in vivo study*, we found that CAPE 1-10 mg/kg significantly decreased the volume and weight of C6 transplanted tumor as compared with the positive control group.

Key words: CAPE, C6 glioma cell, apoptosis, cell cycle , transplantation

目錄

緒論 (前言及研究目的)	p.4
材料與方法	p.4
結果與討論	p.7
參考文獻	p.10
成果自評	p.12
圖與說明	p.13

一、緒論

前言

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) 是蜂膠及蜂蜜的主成份，過去文獻指出其具有抗發炎、抗氧化、抗病毒等作用，又於皮膚癌化動物模式中其具抗癌促進活性，另外又可抑制 azoxymethane 所導致結腸癌，且對被誘發轉型之細胞有誘發凋亡之作用，但對正常細胞只會造成生長遲緩作用，因此 Caffeic acid phenethyl ester 被認為是一種防癌物質(chemoprevention agent); 近年來亦發現其具有抗腫瘤活性，如誘發 HL-60 凋亡、選擇性毒殺口腔癌細胞及抑制大腸癌細胞之侵略作用(invasion and migration)，然其機制及體內作用有待深入探討

Mammalian cells 細胞週期是由不同的 check points 來調控，其中抑癌基因常扮演守門員的角色，如 p53 能活化 p21 執行抑制 cell cycle 之進行，失去抑癌基因則細胞會失控的增長，p53 除調控 cell cycle 之進行外，亦參與 apoptosis 之過程，缺乏 p53 之細胞將對 DNA-damaging agents 及 γ -irradiation 產生 resistance，當細胞受 stress 時 p53 如同控制閘道之人員使細胞可能走向 growth arrest, DNA repair or apoptosis，其可能透過 up regulation Bax or Fas 或直接作用於 mitochondria 導致 apoptosis.，因此我們也想由上述分子探討 CAPE 誘發 C6 glioma cells apoptosis 之機制。

研究目的

CAPE 對上述癌細胞有毒殺作用，然對其他癌細胞之作用及誘發癌細胞凋亡之分子機制仍不清楚，值得

探討。本研究於預試驗中發現 CAPE 對 C6 glioma cell 有明顯毒殺作用，故擬進一步研究其作用方式及作用機制，並以腫瘤轉植方式觀測 CAPE 之體內抗癌活性。

二、研究方法

2.1 細胞培養

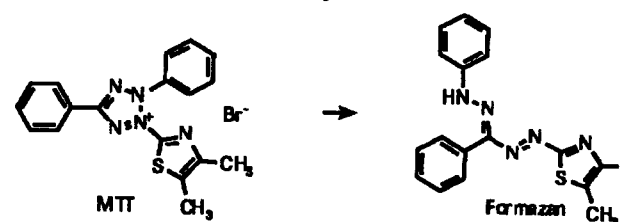
老鼠神經膠質瘤細胞株 Glioma C6 培養於 Minimum Essential Medium(MEM)，內含有 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL)、1% PS (Gibco)。

將以上兩種細胞株，培養於培養箱，設定 5% CO₂，37°C 恆溫的環境，細胞密度維持在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml，每週更換培養基 2~3 次。

2.2 Caffeic acid phenethyl ester(CAPE)的合成由彰師大化學系李衍彰老師提供。

2.3 細胞存活分析(MTT assay)

根據 Alley 等人的方法，其原理是唯有存活的細胞能經由粒腺體 dehydrogenase 的作用，能將(3-[4,5 - Dimethylthiazol



-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)(MTT)代謝還原成紫色的 formazan crystal.，而在波長 563nm 有特殊吸收光。

實驗方法：將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，依 2×10^4 cell/ml 濃度注入

24 well 的培養皿中 1 ml, 在培養箱 5% CO₂, 37°C 恆溫的環境。待 10~12 小時細胞貼壁, 更換新的培養液, 同時添加不同濃度的實驗用藥, 作用一定時間後除去培養液, 分別更換新的培養液, 同時加入 100µl MTT (5mg/ml) 至 1 ml。反應 4 小時後, 除去培養液以 1ml 的 isopropanol 將紫色的 formazan 結晶溶解, 並於波長 563nm 下測其吸光值(O.D.), 以控制組 (0.2% DMSO) 和實驗組作比較, 觀察當加入實驗用藥時, 癌細胞存活率。

2.4 細胞週期分析

利用特殊染劑 PI 嵌入 DNA 的特性, 以分析細胞 DNA 含量, 在 FL2-A 二維點圖裡, 可以顯示 Diploid (2n) 細胞在 G0/G1 期, 積極複製 DNA 的 S 期, 和帶有 46 對染色體 (4n) 的 G2/M 期, 以瞭解腫瘤細胞的生物行為。

實驗方法: 將細胞培養後, 以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下, 以 300g 離心 5 分鐘, 除去培養液, 加培養液將細胞濃度調整成 2×10^5 cell/ml, 培養於 10 公分的培養皿中。待 10~12 小時細胞貼壁, 更換新的培養液, 同時給予 50 µM 的 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), 作用不同時間後, 將細胞由培養皿打下, 調整細胞濃度成 2×10^6 /ml, 以 300g 離心, 除去上層液, 加入絕對酒精 (80%) 置入 -20°C 冰箱固定細胞至少 30 分鐘以上。接著以 300g 離心 5 分鐘, 倒除上層液, PBS 沖洗後, 並加 0.1% tritonX-100 0.5ml 於暗室中反應 30 分鐘。再次離心, 倒除上層液, 加 1m PI solution (10µg/ml), Rnase A (40µg/ml), 於 37°C 水浴槽中避光

反應 30 分鐘, 最後置於冰上, 以流式細胞儀 (Flow cytometry) 測定。

2.5 細胞增生分析

實驗原理是將 DNA 合成原料(A, T, C, G)以放射線物質標定, 並經細胞培養吸收後偵測細胞中放射線強度, 以反映出該細胞新合成 DNA 的速率。

方法: 將細胞培養後, 以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下, 以 300g 離心 5 分鐘, 除去培養液, 將細胞濃度調整成 2×10^5 cell/ml, 培養於 24 well 的培養皿中, 待 10~12 小時後更換不含血清的培養液培養 24 小時。再更換新的培養液(含 10% FBS), 同時添加不同濃度的實驗用藥, 以及 [³H]-methyl-thymidine 0.5µCi/well, 作用 24、48 小時後除去培養液, 並以 PBS 洗三次後, 每一個 well 加入 0.4ml (0.4M) NaOH 溶出細胞內含物。取溶出液, 加 2-3ml 閃爍液, 以閃爍偵檢器偵測 [³H]-之放射強度。

2.6 CPP32 活性分析

原理: 多數真核細胞在受到損傷或環境因子刺激時, 皆可能進行細胞凋亡, 且伴隨著 CPP32 活性的增高, 隨後細胞會皺縮, 細胞質濃縮而最終裂解。CPP32/Caspase-3 Colorimetric kit 利用活化態的 CPP32 具有切割 ρNA -DEVD 蛋白 (substrate) 的能力, 產生特定的吸光值, 可得知 CPP32 的活性。方法: 將細胞培養後, 以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下, 以 300g 離心 5 分鐘, 除去培養液, 將細胞濃度調整成 2×10^5 cell/ml 培養於 10 公分的培養皿中。待細胞貼壁, 待 10~12 小時細胞貼壁, 更換新的培養液, 同時給予 50 µM 的 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), 作用不同時間後, 後以 trypsin - EDTA 將細胞由培養皿打下, PBS 沖洗後以 300g 離心

5 分鐘，取沉澱細胞，加冰的 lysis buffer 於冰上震盪 10 分鐘後，以 10000g 離心 1 分鐘。除去上層液，定量蛋白濃度，調整濃度至 1 mg/ml；取 12.5 μ l 蛋白再加上相同體積的 reaction buffer (10mM DTT)，與 1.25 μ l 之 4mM DEVD- ρ NA substrate，37°C 下避光反應 1.5 - 2 小時，於波長 405 nm 測定吸收光值。

2.7 DNA 片段化分析

原理：除了利用複雜的 PI 或 TUNEL 細胞染色，流式細胞儀上機外，藉著 NP-40 來溶解細胞膜，取得萃取液再外加 Rnase A 與 Proteinase K，以分離因為程序性細胞死亡所產生的 DNA 小片段。

方法：將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，以 300g 離心 5 分鐘，除去培養液，加培養液將細胞濃度調整成 2×10^5 cell/ml，培養於 10 公分的培養皿中。待 10~12 小時細胞貼壁，更換新的培養液，同時給予 50 μ M 的 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)，作用不同時間 0、12、24、36、48 小時後，經 PBS 沖洗將細胞由培養皿打下，以 300g 離心除去上層液，加入 Lysis buffer 50 μ l/ 10^6 cells (1% NP-40、20 mM EDTA、50 mM Tris-HCL (PH 7.5))，離心 12000 rpm 5 分鐘。加入 20% SDS 2.5 μ l (1%)，加入 10 mg/ml Rnase A 25 μ l (5 μ g/ μ l)，56°C 避光水浴反應 2 小時。再加入 25 mg/ml Proteinase K 8 μ l (2.5 μ g/ μ l)，37°C 避光水浴反應 10~12 小時；加入 3M Sodium acetate 1/2 Vol. 40 μ l (以 Acetic acid 調整至 PH 5.2)，再加入絕對酒精 2.5 Vol. 300 μ l，15000 rpm 4°C 離心後，除去上清液而自然乾燥，加入滅菌 ddH₂O 8 μ l (適量)，取 4 μ l dye，1.8 % DNA agarose 50V 跑膠。染以 Ethidium Bromide 使用數位影像儀

定量。

2.8 西方點墨法

實驗原理：利用 SDS-polyacrylamide gel 以電流將帶有負電荷的不同分子量的蛋白質分離，並將專一性抗體與標的蛋白質鍵結，再與帶有 peroxidase 的二次抗體反應後，再 ECL substrate 的作用之下，底片感光顯示該蛋白表現的變化情形。

方法：將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，以 300g 離心 5 分鐘，除去培養液，加培養液將細胞濃度調整成

2×10^5 cell/ml，培養於 10 公分的培養皿中。待 10~12 小時細胞貼壁，更換新的培養液，同時給予 50 μ M 的 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)。培養 0、3、6、12、24、36、48 小時後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗離心後，去除上清液，加入 RIPA buffer ((150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50mM Tris- base, PH 7.5))，內含蛋白酶抑制劑 (1mM sodium orthovanadate, 100 μ g/ml PMSF, 170 μ g/ml leupeptin)，於冰上震盪 30 分鐘後以 10000 g 4°C 離心 10 分鐘，即得 Total cell lysate，取上層液定量蛋白濃度；將定量後之蛋白質取 60 μ g，加入等量的 Sample Buffer (2ml 0.5M Tris-HCl (PH6.8), 1.6ml Glycerol, 3.2ml 10% SDS, 0.8ml 2- β -mercaptoethanol, 0.4ml 0.5% bromophenol blue)，以 95°C 加熱 5 分鐘，再置入冰上冷卻。以小型離心機將 Sample spin down 後再 loading 至每個 well 中。上層膠以 70v，下層 130v 跑電泳。電泳結束後跟著進行蛋白質的轉漬，也就是將膠上已分層的蛋白

質轉漬到 Nitrocellular paper 上。以 5% 脫脂牛奶【PBS-non-fat milk powder】於室溫下進行 blocking 1 小時，washing buffer 洗淨後，將 NC paper 置於 4°C 冰箱中與一次抗體反應 overnight，之後用 washing buffer (PBS with 0.5% tween-20) 多次沖洗 NC-paper 後，再以 Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse/rabbit antibody 二次抗體反應後 60~90 分鐘，以相同的方式 wash NC-paper，最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應 1 分鐘，並於暗房中以 KODAK FILM 曝光 1-10 分鐘，以顯影劑及定影劑沖片觀察。

2.9 免疫沉降法

原理：專一抗體與標的蛋白經免疫鍵結，再利用 SDS-polyacrylamide gel 通以電流將蛋白質分離，看蛋白質間的作用情形。

方法：將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，以 300g 離心 5 分鐘，除去培養液，加培養液將細胞濃度調整成

2×10^5 cell/ml，培養於 10 公分的培養皿中。待 10~12 小時細胞貼壁，更換新的培養液，同時給予 50 μ M 的 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)。培養 0、0.5、1、3、6、12 小時後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗離心後，倒除上層液，加入 RIPA buffer 震盪即得 Total cell lysate，定量後之蛋白質取 0.5mg，加入 1 μ g 一次抗體在 4°C 冰箱中反應 overnight。隔日將 sample 和 15 μ l protein A-agarose beads 在 4°C 繼續作用 2-6 小時。之後以 1000g

4°C 離心 5 分鐘，移除上層液再以冰的 PBS 洗重複三次，最後離心

取沉澱物，加 10 μ l sample buffer 使之懸浮，95°C 加熱 5 分鐘，跑 SDS-PAGE，並以不同抗體作用看結果。

2.10 細胞質與粒腺體的萃取

1. 將細胞加入 500 μ l ice-cold lysis buffer (20mM HEPES, PH7.5; 10mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 0.1mM EDTA; 1mM Sodium EGTA; 1mM Sodium EGTA; 1mM DTT; 0.5mM PMSF)；內含 proteinase inhibitor: (2 μ g/ml leupeptin、2 μ g/ml apoptinin、0.03mM sodium orthovanadate)

2. 以 type B pestle (590~600 rpm) 研磨 40 下

3. 於 4°C，1000 \times g 離心 10 分鐘

4. 取 supernatants，再以 10000 \times g 於 4°C 離心 20 分鐘

pellet \rightarrow mitochondria，加入 TNC buffer (10mM tris-acetate, PH8.0，內含 0.5% NP-40 及 5mM CaCl₂)。

4. supernatants (cytosols) 再以 100000 \times g 於 4°C 離心 1 小時

2.11 動物皮下移植神經膠質

瘤細胞，測試

其在皮下之急

性生長。

1. 將 C6 神經膠質瘤細胞轉殖至 BALB/c-nu 品係裸鼠背側右翼。

2. 再連續五日給予腹腔注射不同濃度 CAPE。

3. 每 4 天測量一次各組裸鼠之背側右翼部腫瘤直徑及重量，待 4 週後分別將裸鼠斷頸，取其血液、脾臟及腫瘤組織。將白鼠斷頸後，取裸鼠背側右翼腫瘤，在有腹腔注射不同濃度 CAPE 的裸鼠

背側右翼部腫瘤組織體積與重量
是否有差異性。

三、結果與討論

(1) Caffeic acid 衍生物：CAPE 對於 C6 glioma 神經膠質瘤細胞及 H3B 肝癌細胞之毒殺作用

Figure 1 為兩種 Caffeic acid 的衍生物：3-(3,4-Dimethoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester (EC)，3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylic acid phenethyl ester (CAPE)。

利用 MTT assay (一種黃色 Tetrazolium，經由存活細胞粒腺體中的 Dehydrogenase 的作用下，還原形可溶性的紫色結晶物)，經比色後與細胞的存活呈線性關係，除此之外這個方法可取代以放射線(Radioactive assay)來篩選化學藥物對細胞的毒殺能力。由(Figure 2)可知，三種 Caffeic acid 相似物及五種劑量 10, 50, 100, 200, 400 μ M，兩個時間點 24, 48 小時所繪 2D 曲線圖，處理 C6 glioma 神經膠質瘤，發現唯有 CAPE 最具毒殺效果，且在 24 小時的 IC 50 劑量為 50 μ M。

(2) CAPE 對 C6 glioma cells 能有效抑制其生長效率

利用另一種細胞增生分析 ($[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assays)，先使得 C6 glioma cells 吸收帶有 $[^3\text{H}]$ thymidine 的培養液，再投以不同劑量 25, 50, 100, 150 μ M，分別處理 24, 48 小時，結果得知 (Figure 3)，24 小時，50 μ M 劑量處理的 C6 glioma 神經膠質瘤 DNA 合成效率有 65%；48 小時 DNA 合成效率只有 50%。CAPE 處理後 DNA 合成效率明顯趨緩，那麼對於細胞 DNA 含量變化又如何呢？

(3) 細胞週期分析發現 C6 glioma cells 停滯在 G0/G1 期

以 50 μ M 劑量的 CAPE 投以 C6 glioma cells，分別處理 0, 6, 12, 24, 36 小時後收取細胞，以絕對酒精固定，染以 Propidium iodine 經由 Flow cytometry 上機分析細胞 DNA 含量。由定量結果顯示 (Figure 4)，G0/G1 期比率在處理 24 小時與對照組 (DMSO) 相比增加 20%；而 G2/M 期卻減少了 20%。由此可知 CAPE 造成 C6 glioma cells 的細胞週期呈現生長停滯 G0/G1 期，且 CAPE 處理 36 小時，在 sub-G0/G1 期有明顯 apoptotic 波峰。

(4) CAPE 誘發 C6 glioma cells 凋謝死亡的證據

DNA 片段化分析：除了 PI 染色流式細胞儀分析、Hematoxylin 細胞核染色、ELISA 定量 DNA 片段外，利用分離出凋謝所產生的 DNA 片段，跑 DNA agarose gel 觀察 DNA 片段現象。在 CAPE 50 μ M 劑量分別處理 0, 12, 24, 36, 48 小時 (Figure 5)，結果顯示 24 小時以後，DNA 片段呈現 180-200 bp 倍數之梯狀排列。

CPP32 活性分析：細胞凋謝過程中 CPP32 的活化，也伴隨著細胞皺縮、細胞質空洞而 DNA 逐漸裂解，所以當 CPP32 (caspase 3) 的活性升高會造成 DNA 切割。CPP32 colorimetric kit 利用活化態 caspase 3 具切 ρ NA-DEVD (substrate) 的能力，產生 ρ NA 具特定吸收波長 (Figure 6A)，結果 CPP32 活性在 50 μ M CAPE 劑量處理 3 小時後倍增，至 24 小時達到高峰。

Protein level 層次：以 IB anti-CPP32 antibody 偵測 CPP32 蛋白的表現情形 (1~2)。結果也發現處理 CAPE 3 小時後，全長的 CPP32 有一 20kD 的切割片段，且至 24 小時達到

高峰 (Figure 6B)。活化態 CPP32 的切割受質 (substrate) 之一是 PARP 蛋白 (Poly-ADP Ribose Polymerase)，利用 IB anti-PARP antibody 偵測細胞 PARP 蛋白的表現。(Figure 6B) 得知 3 小時的 PARP 蛋白明顯減少，據推測被 caspase 3 所裂解的結果。根據過去文獻 Effector caspase 3 的活化，其中之一是藉由粒腺體的釋放出 cytochrome C，在與 Apaf-1 蛋白 (Apoptotic Protease activating Factor 1) 共同活化 caspase 3 (3~4)。由 (Figure 6C) 結果得知，投以 CAPE 3 小時後細胞質 cytochrome C 的釋出遞增且在 24 小時達到高峰。由這些證據顯示：CAPE 的確誘導 C6 glioma cells 程式性細胞死亡。

(5) CAPE 誘導 p53 (tumor suppressor gene) 的活化及其下游基因之表達

Bcl-2 family 蛋白表現情形：在處理 CAPE 0, 3, 6, 12 小時後取其 total cell lysate，以 IB 來偵測 Bcl-2 family 蛋白在 CAPE 處理後表現情形 (5~7)。

1. Anti-apoptotic Bcl-2 中，12 小時後至 36 小時降至低點。
2. Pro-apoptotic Bcl-Xs，自 3 小時後持續增加表現。

Pro-apoptotic Bak，自 3 小時後持續表現飆高。(Figure 7)

利用 IB anti-p53 antibody 偵測細胞 p53 蛋白的表現，發現早在 3 小時 (Figure 8) 或者更早 (Data not show)，就已看到 p53 磷酸化大量表達。p53 所主導的細胞凋亡路徑，調控的下游基因有 BAX；結果顯示 BAX 表現增加數倍 (Figure 7) (8~10)。

(6) CAPE 對於細胞週期蛋白的影響

1. Rb-hyper、Rb-hypo：

hyperphosphorylated form Rb 蛋白調控著轉錄進行，當失去功能時會導致抑制癌化細胞的生長 (11~12)。CAPE 處理 C6 glioma cells 0, 3, 6, 12, 24 小時，結果顯示 (Figure 9)，3 小時後 hyper-Rb 逐漸遞減而 hypo-Rb (unphosphorylated form Rb) 也呈遞減情形。

2. CDKI (p21、p27、p16) : Cyclin Dependent Kinase Inhibitors 會與 cyclin/CDK 競爭抑制，而使得無法磷酸 Rb 蛋白，細胞週期因此停滯在 G0/G1 期。C6 glioma cells 經 CAPE 處理後利用 Anti-p21、p27、p16 antibody 來偵測蛋白表現情形在 3 小時遞增，且持續表現至 24 小時至 36 小時才減弱 (Figure 10) (15~16)。
3. cyclinD1、cyclinE：偵測 cyclin D1、cyclin E 蛋白表現情形，所有 cyclin 皆有遞減趨勢，自 3 小時起有不等程度下降現象 (Figure 11A)。
4. CDK2、CDK4：控制細胞週期進行除了 Cyclin A、D、E 外，與其相關的 cdk2、cdk4 亦參與其中，一些癌化細胞發現會過度表現。C6 glioma cells 經 CAPE 處理後利用 Anti-cdk2、cdk4 antibody 來偵測蛋白表現情形，結果顯示 CDK2、CDK4 並無明顯減少變化 (Figure 11B)。
5. CDK2 與 Cyclin E association：經 CAPE 處理後利用免疫沉澱法分析 CDK2 與 Cyclin E 的相互作用，可

以得知這些 kinase 在細胞週期的活性，實驗結果顯示 CDK2 與 Cyclin E 的相互作用隨著 CAPE 處理三小時後而遞減。相反的，CDK4 與 Cyclin D1 的相互作用並不隨著 CAPE 處理而有改變 (Figure 11C) (13~14)。

(7) CAPE對於訊息傳導路徑protein kinase的影響

一些生長因子、cytokine、Irradiation、化學藥劑等會活化訊息傳導路徑，大致來說MAPKs的下游包括三種不同的路徑：ERK-MAPKK-MAPK、JNK/SAPK、MKK3/MKK6-p38 pathway (17~18)。這些訊息傳導成員，彼此影響又導致不同細胞反應：生長、分化發育、或者細胞凋謝死亡。當予以CAPE處理是否有幾個 protein kinase會參與之前所證明的細胞凋亡及細胞週期停滯？利用 Anti-ERK-MAPK antibody、Anti-p38 MAPK antibody、JNK/SAPK kinase antibody來偵測CAPE處理後p38 MAPK和ERK-MAPK的表現情形。結果顯示 (Figure 12) p38 MAPK 30分鐘即快速磷酸化至3小時達高峰，9小時後趨緩。另外ERK-MAPK 30分鐘即快速磷酸化達高峰，同樣9小時後趨緩。相反的JNK/SAPK kinase並不因為外加CAPE刺激而磷酸化有顯著改變。據最近文獻得知 ERK-MAPKK-MAPK、MKK3/MKK6-p38 pathway 似乎參與著 p53 的活化 (19~20)；所以當處理 PD98059 (MEK 抑制劑 50 μ M)

與 SB203580 (p38 KAPK 抑制劑 5 μ M) 分別處理 CAPE 12 小時看 p53 表達情形；由結果得知：CAPE 再經處理 PD98059 及 SB203580 後，p53 蛋白表達減少，且尤以處理 SB203580 後為最 (Figure 13A)；再利用 Anti-caspase 3 antibody 作 IB 分析 caspase 3 的活化，也發現以處理 SB203580 後，caspase 3 的活化情形最低 (Figure 13B)。蜂膠中部分抑制癌細胞的成分已被鑑定出來，主要是 caffeic acid 類的衍生物，caffeic acid phenethyl ester (CAPE) 的處理的確造成 C6 神經膠質瘤細胞的凋謝死亡，p53、bax、Caspase 3 的快速表現與細胞質 cytochrome C 的釋放，與 p53 蛋白大量轉移至粒腺體有關。p53 移行到粒腺體被認為會放大並且加速 caspase 3 的活化，即使當 Bcl-2 過度表現的情形，亦會促成細胞凋亡的現象。p53 必須經過 post-translation modification p53 的磷酸化，穩定形成活化態 tetramer 而促進轉錄進行，誘導下游基因表現。處理 CAPE 後果然導致 p53 的磷酸化，而更早 30 分鐘時間也發現一些 signal 會活化 protein kinases 使 p53-phosphorylation，這些 protein kinases 有：ERK-MAPKK-MAPK、MKK3/MKK6-p38 pathway。利用 PD98059 與 SB203580 更發現會抑制因 CAPE 處理所導致的 p53 與 caspase 3 的活化，而值得我們注意的是 p38 kinase 似乎主導著 CAPE 造成 C6 神經膠質瘤細胞的凋謝死亡 (Figure 14)。

另外，CAPE (50 μ M) 處理 24 小時，細胞週期停滯在 G0/G1 期；相關細胞週期蛋白：RB, cyclins, cdks,

and CDKIs，發現果然 Rb phosphorylation, cyclin D, cyclin E 蛋白表現減少，且 CDKIs p16, p21, p27 表現大增。除此之外，再利用 MEK 抑制劑(PD98059)、p38 kinase 抑制劑 (SB203580) 作用下，發現這些 kinases 主導 CAPE 對於 C6 glioma cells 的細胞週期停滯路徑，其分子機制仍待進一步釐清。

早再 1998 年就已提出 MAPK kinase 家族成員皆會磷酸化 p53；成員中 Jun N terminal kinase (JNK) 會藉由 MEKK1 活化後，導致 p53 的活化而抑制了 MDM2，增加了 p53 的半衰期 (half-life)；且 p38 kinase 會經由 ultraviolet (UV) irradiation 照射下使得 p53 ser 磷酸化 (24~26)；另外，再依些 in vitro 實驗中 extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) 也能造成 p53 蛋白質的磷酸化。這些 Ser/Thr kinase 更透過 p53 的活化，參與了一些抗癌藥物所誘發傳統的腫瘤細胞凋亡路徑，如 Cisplatin 與 Resveratrol 是透過短暫 ERK1/2 活性誘發細胞程式性死亡。一般而言，ERK1/2 的活化是由於 mitogen 和 growth factor 的刺激，而在遭受 stress 和 damage 情況才會啟動 JNK 及 p38 kinase 的活化；這些同為 Ser/Thr MAPK kinases 的作用是決定著細胞存活或是死亡仍有爭議，不過 p38 kinase 的活化被認為與 apoptosis 有關，而 ERK1/2 與細胞存活相關，那麼彼此協調與作用在透過不同 genotoxic 與 survival factors 的反應，而整合出影響下游基因及蛋白質的表現，造成不同細胞生理現象。CAPE 處理的 C6-glioma cells 導致 ERK1/2 與 p38 kinase 的活化，會相對地造成細胞週

期抑制及凋謝死亡現象；p38 kinase 調控著因 CAPE 所誘發的細胞凋亡路徑是由於影響 p53、Bax 及 caspase 3 的活化作用，而 ERK 1/2 如何調控細胞生長停滯的分子機制仍待進一步釐清。

(8) 咖啡酸苯乙酯抑制在皮下轉殖的裸鼠之急性生長

將 C6 神經膠質瘤細胞轉殖至 BALB/c-nu 品係裸鼠背側右翼。再連續五日給予腹腔注射不同濃度 CAPE (1 mg/kg/day、5 mg/kg/day、10mg/kg/day)。

每 4 天測量一次各組腫瘤直徑，待 24 天後分別將裸鼠斷頸，取其血液、脾臟及腫瘤組織。將白鼠斷頸後，取裸鼠背側右翼腫瘤，發現在有腹腔注射不同濃度 CAPE 的裸鼠，背側右翼部腫瘤組織體積與重量皆比轉殖腫瘤的控制組，能有效抑制轉殖腫瘤裸鼠之急性生長 (Figure 15A、B、C) (19~22)。

四、參考文獻

1. Kluck RM. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275: 1132-1136.
2. Vander Heiden, Matthew G. (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 91: 627-637.
3. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, and Shore GC. (1998) Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol.* 143:207-15.
4. Desagher S. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial

- cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, 144: 891–901.
5. Hsu YT, Wolter KG, and Youle RJ. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3668–3672.
 6. Gross A, Jockel J, Wei MC, and Korsmeyer SJ. (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*, 17: 3878–3885.
 7. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, and Strasser A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*, 3: 287–296.
 8. Levine AJ. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323–331.
 9. Prives C. (1998) Signaling to p53: breaking the MDM2– p53 circuit. *Cell*, 95 5–8.
 - 10 Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, and Prives C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91: 325–334.
 - 11 Ukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, and Bartek J. (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375: 503-6.
 - 12 Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, and Harlow E. (1995) Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*, 375: 506-10.
 - 13 Martin-Castellanos C. and Moreno S. (1997) Recent advances on cyclins, cdk and cdk inhibitors. *Trends Cell Biol*, 7: 95–98.
 - 14 Morgan DO. (1995) Principles of cdk regulation. *Nature*, 374: 131–134.
 - 15 Sherr CJ and Roberts JM. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 9: 1149-63.
 - 16 Harper JW and Elledge SJ. (1996) Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 6: 56-64.
 - 17 Hall M and Peters G. (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*, 68: 67-108.
 - 18 Faragher RG and Kipling D. (1998) How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays*, 20: 985-91.
 - 19 Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, and Lowe SW. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, 12: 3008-3019.
 - 20 Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, and Lowe SW. (1997) Oncogenic ras provokes premature

cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell, 88: 593-602.

- 21 Mao XW, Green LM, and Gridley DS. (2001) Evaluation of polysaccharopeptide effects against C6 glioma in combination with radiation. Oncology, 61: 243-53.
- 22 Feyzi R, Hassan ZM, and Mostafaie A. Modulation of CD(4)(+) and CD(8)(+) tumor infiltrating lymphocytes by a fraction isolated from shark cartilage: shark cartilage modulates anti-tumor immunity. Int Immunopharmacol, 3: 921-6, 2003.

成果自評

本研究計劃進度正常，各研究項目與計劃90%相似，部份成果已投稿 Biochemical Pharmacology 且已被接授，其它結果亦整理投稿中，本研究發現 CAPE 在 1mg/kg 投與下有抑制轉植腫瘤之增長且發現其可誘發腦瘤細胞之凋亡及細胞週期停滯，相信可提供臨床發展之資料。

五、圖與說明

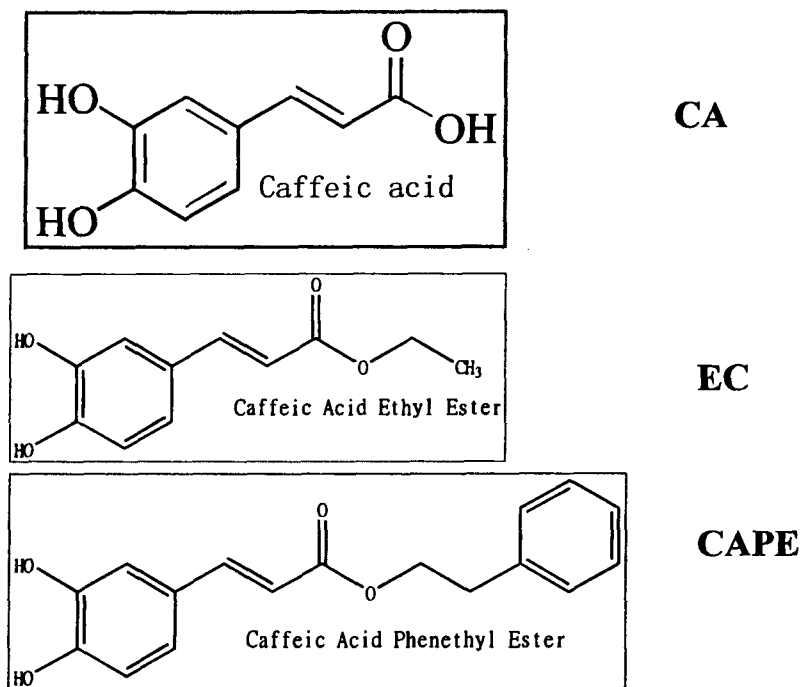


Figure 1. The structure of caffeic acid derivatives .

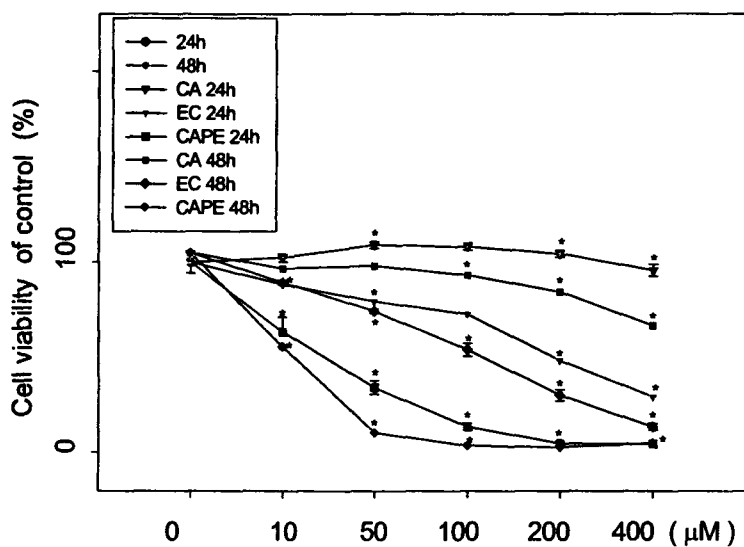


Figure 2. Effect of CAPE, CA and EC on the Cell viability of C6-glioma cells .

Cell proliferation assay

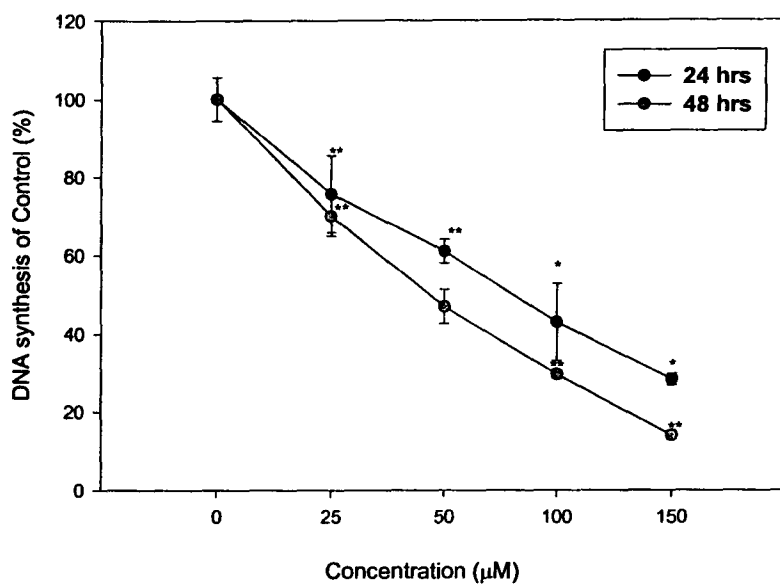


Figure 3. Anti-proliferation effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in C6-glioma cells. 2×10^4 /ml Cells seeded in 24 well plates were treated with various concentration (10-400 µM) of CAPE or 0.2 % DMSO (as control) and 1.0 mCi/well of [3 H]-methyl-thymidine for 24 or 48 hrs. The experiments were performed in triplicate. Data presented as means \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.05$, compared with control group (0.2% DMSO).

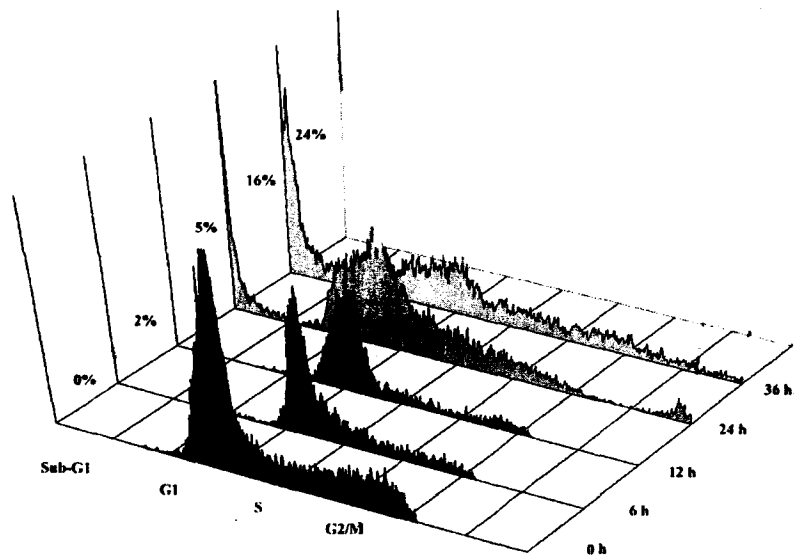


Figure 4 Apoptosis induction by CAPE on C6 glioma cells. The cells were fixed and stained with propidium iodide, and the DNA content was analyzed by flow cytometry (FACS). The percentage of hypodiploid cell numbers G0/G1, was calculated and expressed.

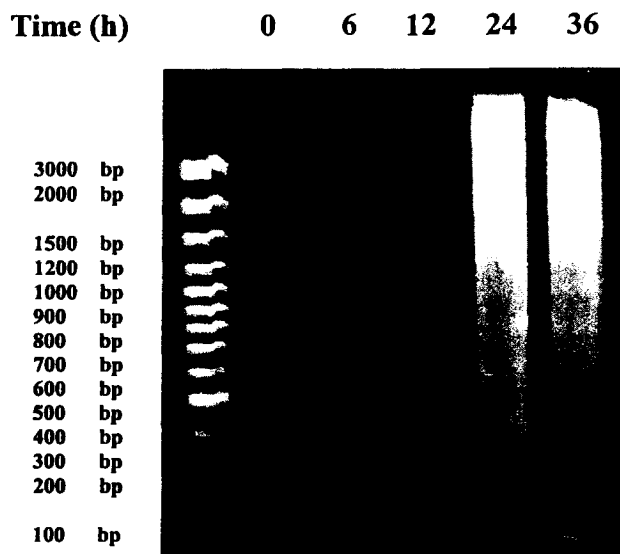
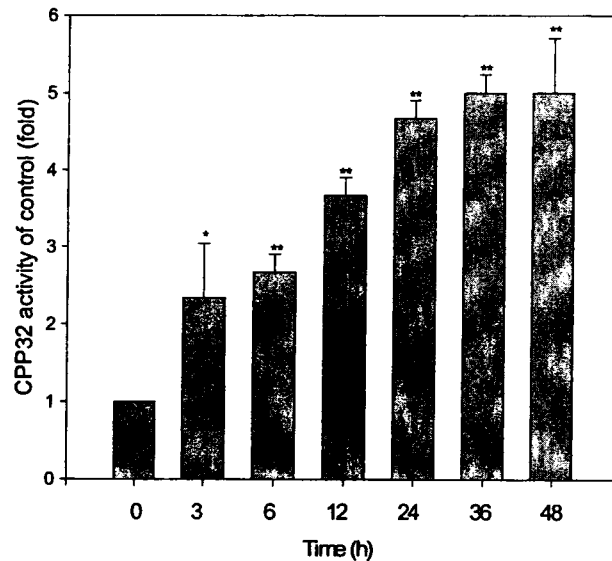
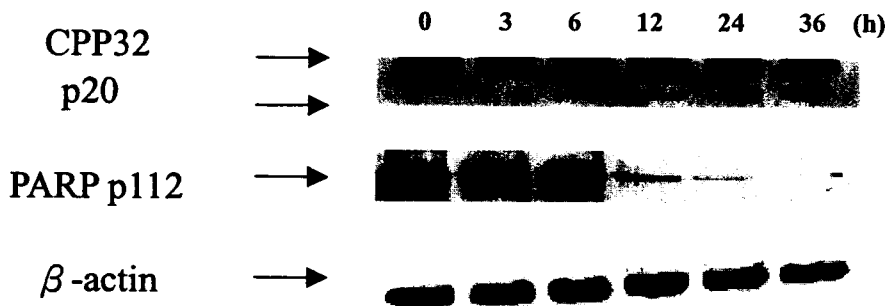


Figure 5. Induction of apoptosis by Caffeic Acid Phenethyl Ester in C6-glioma cells. C6 cells (at 80% confluence) were treated with different concentration ($50 \mu M$) of CAPE for various time (12, 24, 36, 48 hrs). Both detached and attached cells were harvested for the DNA fragmentation assay by electrophoresis. The DNA were separated on a 1.8 % agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under ultraviolet light illumination.

(A)



(B)



(C)



Figure 6. Effect of CAPE on CPP32, PARP and cytochrome c. (A) activation of caspase-3(like) protease /CPP32 by CAPE. Cells were treated with 50 μ M of CAPE for 0- 48 h and determined photometrically (400 nm) by a colorimetric protease assay kit. The results were presented as means \pm SD of three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, when compared with DMSO. (B) effect of CAPE on CPP32 and PARP. Equal protein of total cell lyses of C6 glioma cells treated with 50 μ M CAPE for the indicated times were analyzed by 12 % SDS-PAGE for CPP32 or 10% for PARP and subsequently with antibody against CPP32 or PARP and β -actin, which served as internal control. (C) CAPE-induced translocation of cytochrome C. Euqual amounts of protein from cytosolic fraction of C6 glioma cells, which has been treated with 50 μ M of CAPE for 0-48 h were analyzed by 15 % SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotting with antibody against cytochrome C and anti- β -actin.

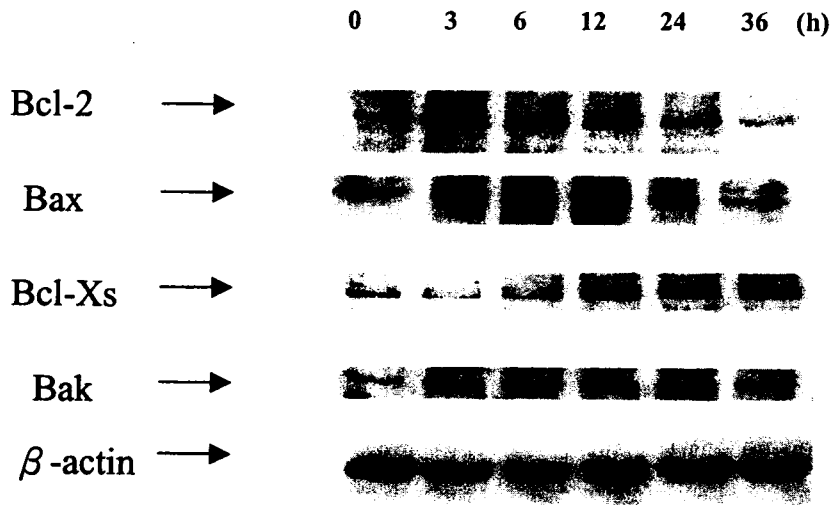


Figure.7 Effect of CAPE on Bcl-2 family. Total cell lysates of C6 glioma cells treated with 50 μ M of CAPE for indicated time were analyzed by 12 % SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against Bcl-2, Bax, Bcl-x_s, Bak and β -actin, which served as an internal control.

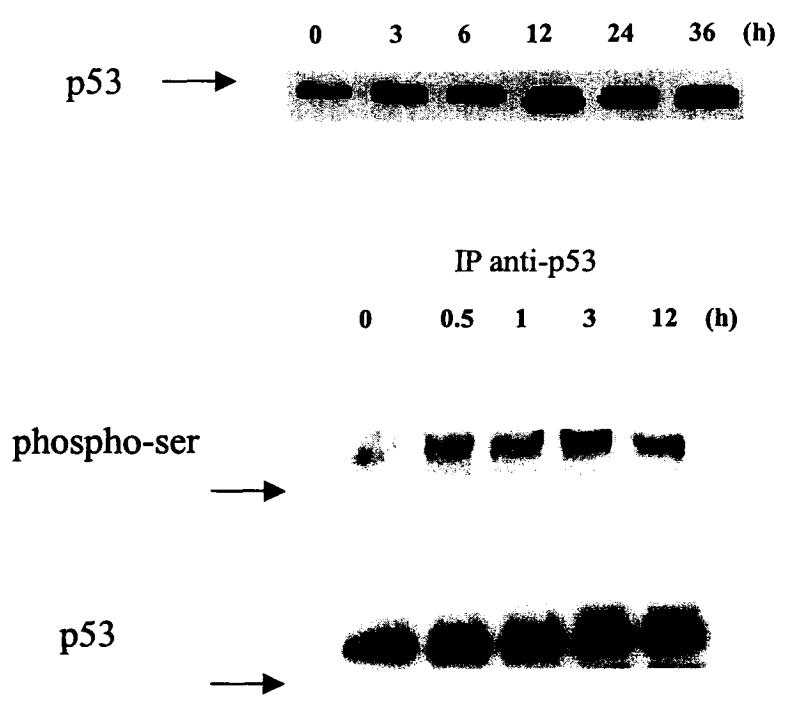


Figure.8 Effect of CAPE on the expression and serine phosphorylation of p53. Total cell lysates of C6 glioma cells treated with 50μM of CAPE for indicated time were analyzed by 10 % SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against p53 and β -actin, which served as an internal control. In addition, lysates were immunoprecipitated using monoclonal antibody against p53 and phosphorylation at serine was measured.

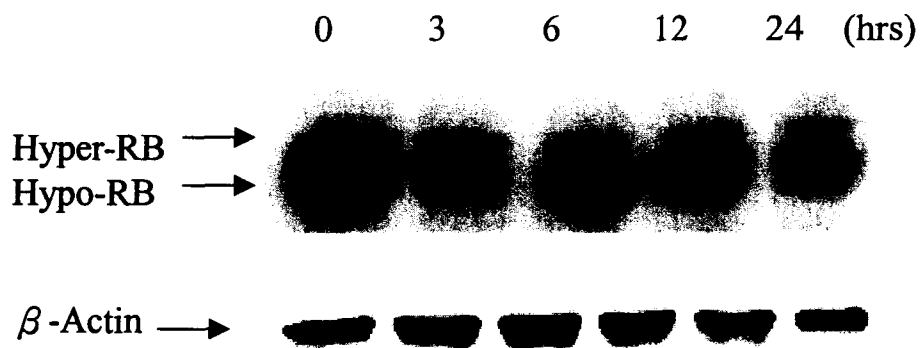


Figure 9. Western blotting analysis of the expression of RB in medium treated with CAPE 50 μ M for indicated time in C6-glioma cells. The total cell lysate were detected by anti RB or Actin antibody. following blotted onto NC paper. After a peroxidase-conjugated secondary antibody hybridizing, the bands were visualized by ECL reagent and quantitative assay.

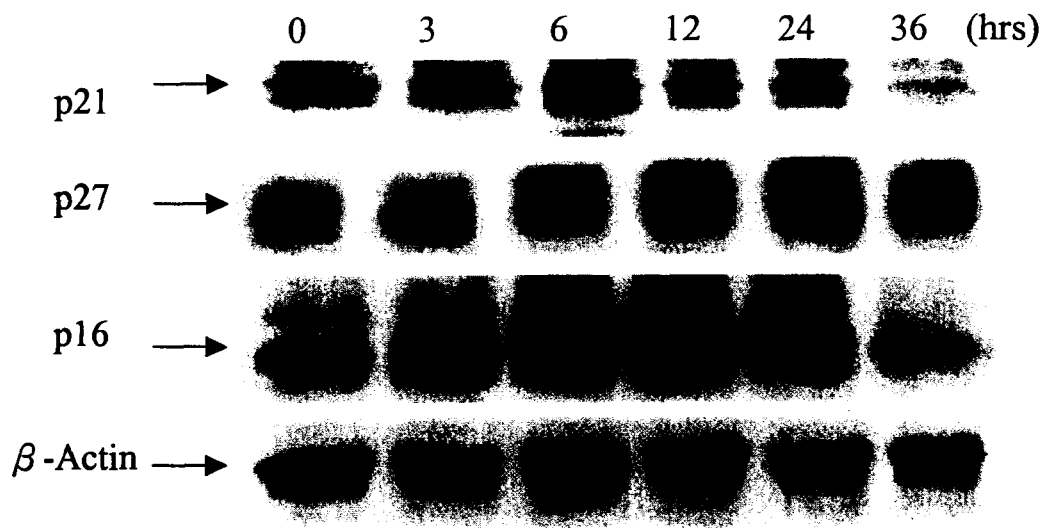


Figure 10. Western blotting analysis of the expression of CDKI (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors) in medium treated with CAPE 50 μ M for indicated time in C6-glioma cells.

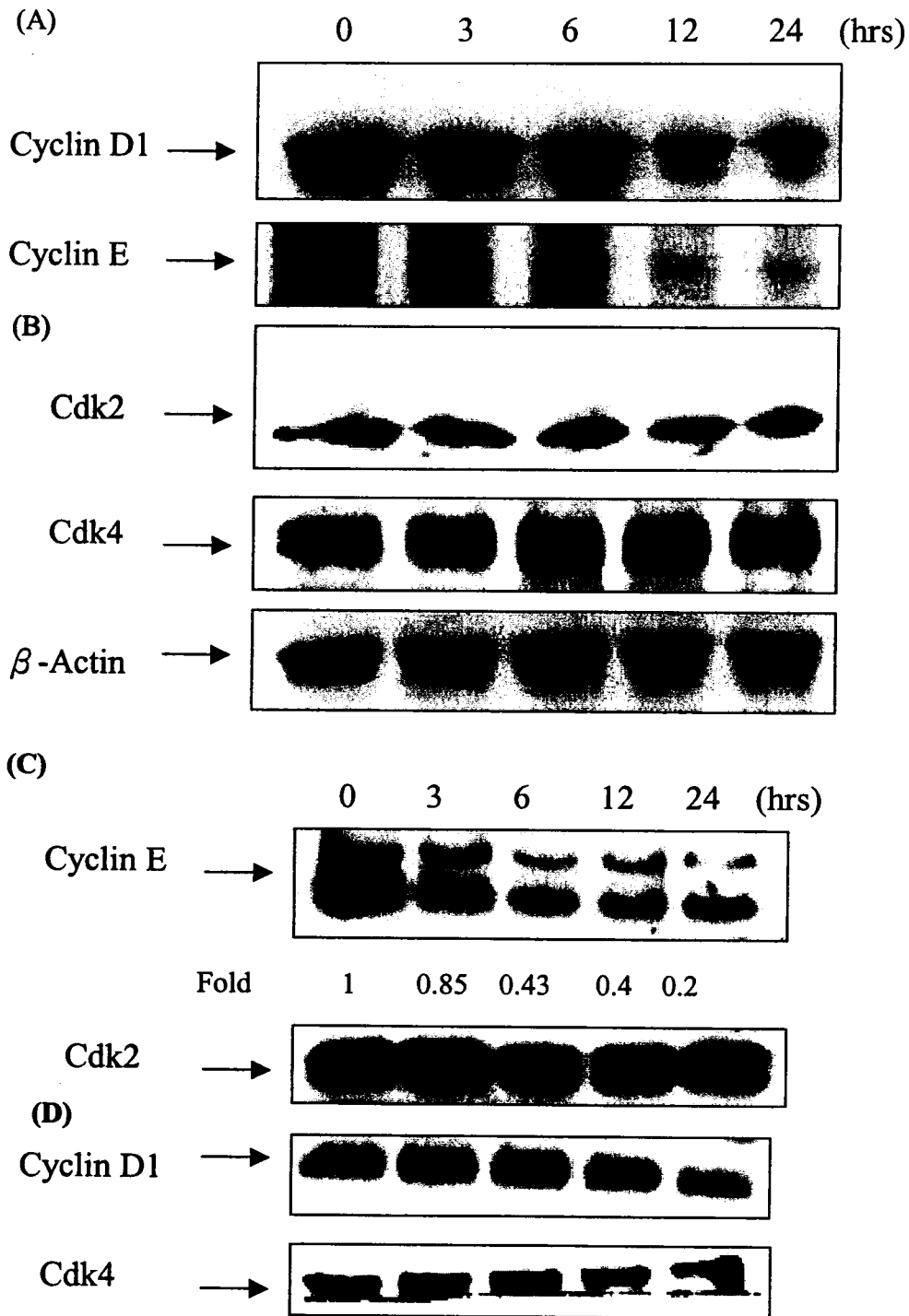


Figure 11. (A) (B) Western blotting analysis of the expression of Cdk (Cyclin dependent kinases) and Cyclin in medium treated with CAPE 50 μ M for indicated time in C6-glioma cells. (C) Co-immunoprecipitation of cdk2 Protein with cyclin E. (D) Co-immunoprecipitation of cdk4 Protein with cyclin D1.

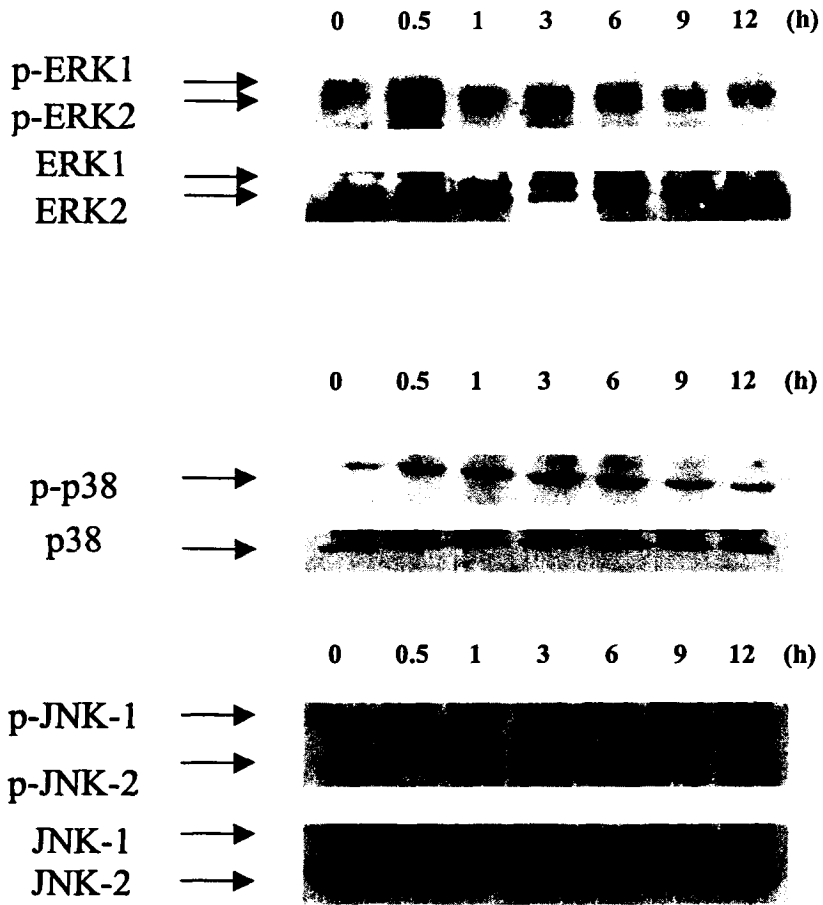


Figure. 12 Activation MAPKs by CAPE in C6 glioma cells. Total cell lysates of C6 glioma cells treated with 50 μ M of CAPE for indicated time were extracted and phosphorylated, and total proteins of ERKs, p38 MAPK, and JNKs were immunodetected as described previously.

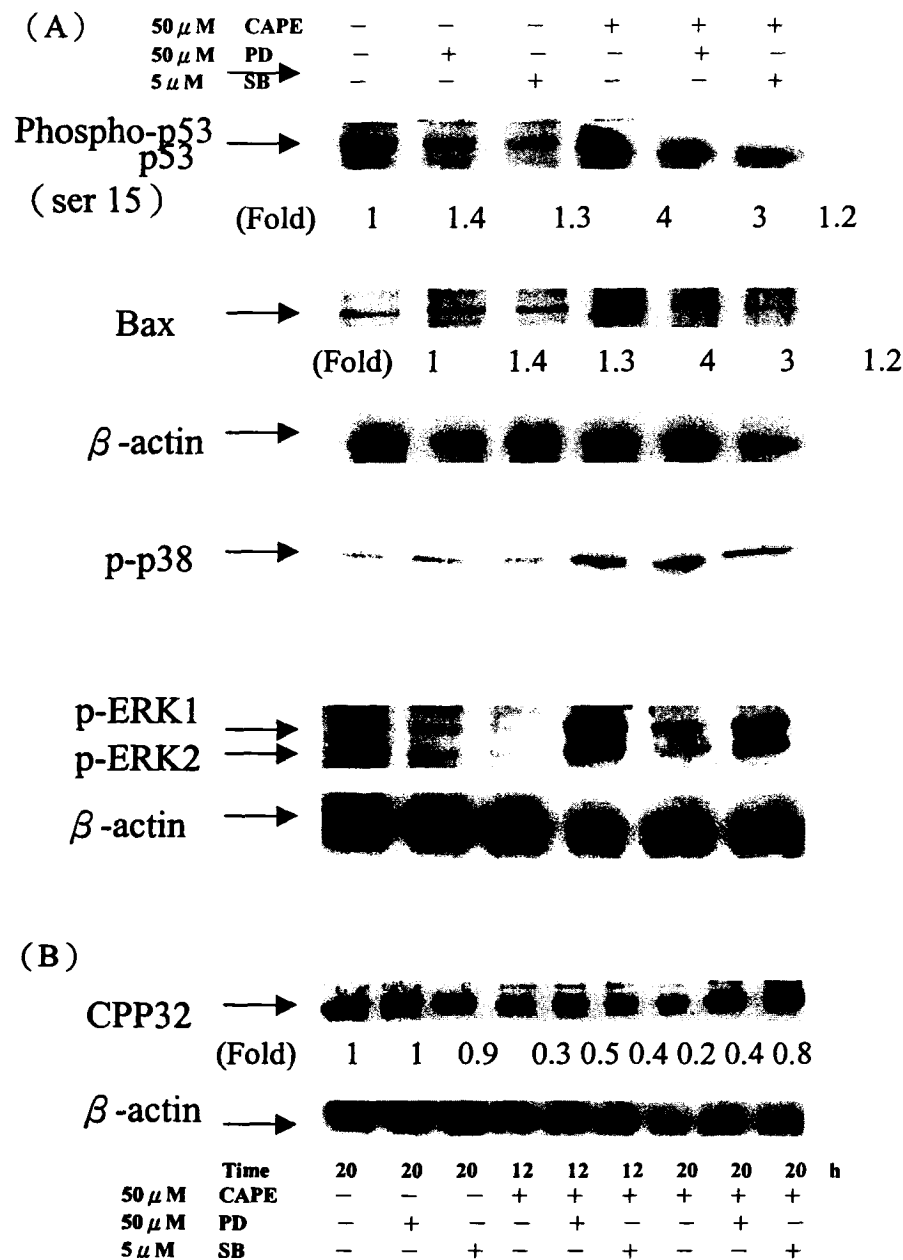


Figure.13. Involvement of p38 MAPK in CAPE-induced activation of p53 and CPP32. (A) inhibition of p53 accumulation and phosphorylation and Bax expression by p38 MAPK inhibitor, SB203580 and MEK inhibitor, PD98059. C6 glioma cells were pre-treated with or without 5 μ M of SB203580 or 50 μ M of PD98059 for 1 h, treated with or without 50 μ M of CAPE for 12 h, then analyzed by 10 % SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against p53, phospho-serine 15 p53, Bax, phospho-p38 MAPK, phospho-ERKs, and β -actin, which served as an internal control. (B) inhibition of CPP32 activation by p38 MAPK inhibitor, SB203580 and MEK inhibitor, PD98059. C6 glioma cells were pre-treated with or without 5 μ M of SB203580 or 50 μ M of PD98059 for 1 h, treated with or without 50 μ M of CAPE for 12 h and 20 h, then analyzed by 12 % SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against p32 and β -actin, which served as an internal control.

50 μ M	CAPE	+	-	-	+
5 μ M	SB	+	+	-	-

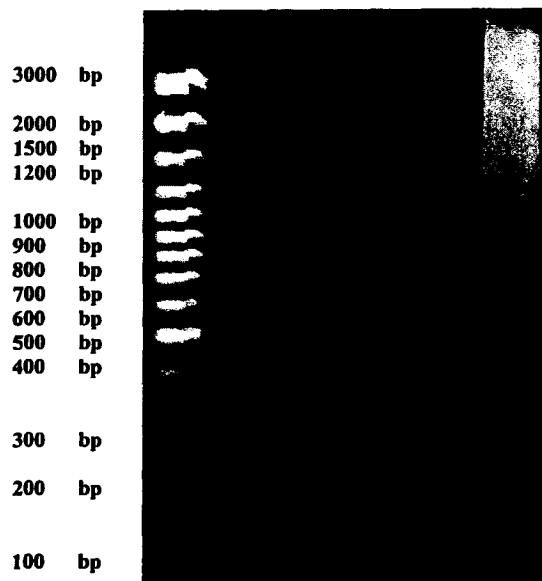
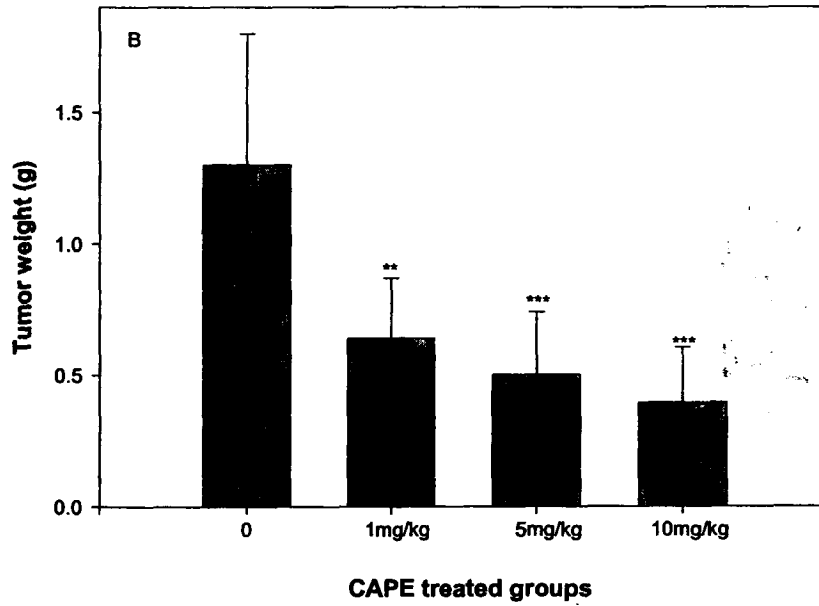
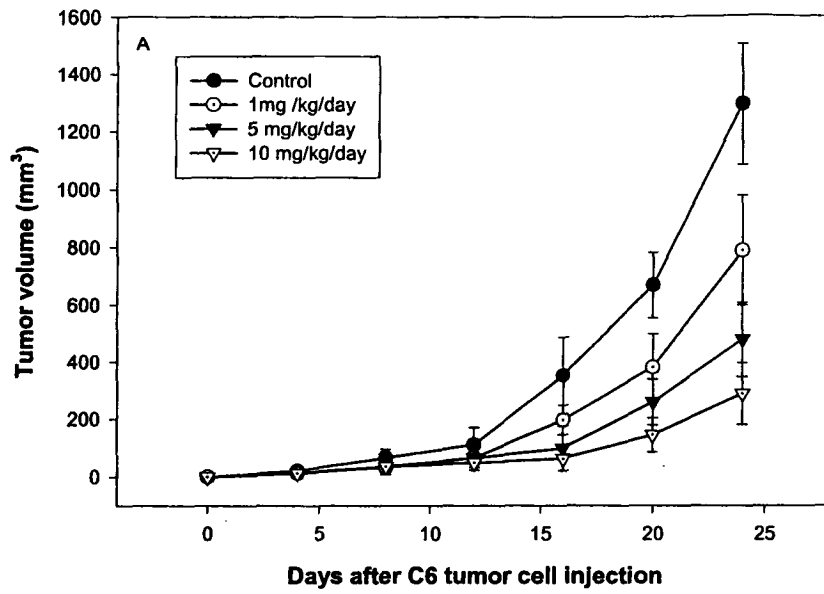


Figure 14. Effects of the p38 kinase inhibitors in CAPE-induced cell. C6 glioma cells were pretreated with 5 μ M SB203580(or with the solvent Me2SO (DMSO)) for 1 h, followed by treatment with or without 50 μ M CAPE for 24 h for the DNA fragmentation assay by electrophoresis.



(C)



Non-treated tumor Control



CAPE treated tumor group

Figure 15. In vivo growth inhibition of implanted C6 glioma cells by CAPE. Nude mice were implanted subcutaneously with C6 glioma cells (2×10^6 /ml) on day 0. Mice were divided randomly into 4 groups of 8-10 mice each. After 24 hours, mice were treated daily with 0.25% by i.p. as controls, or treated with CAPE (1, 5, 10 mg/kg/day). The tumor volume was monitored from 4th day, every four days (A). Tumors were excised and weighted on day 24 (B). The average body weights for each group are measured (C). typical photographs of tumors in nude mice. The cells were treated with or without CAPE and injected subcutaneously into the flanks of nude mice. (D). Significance was determined by Student's *t*-test (***) $p < 0.001$.