**参考文献：**

[1] 史哲新，杨文华，汤毅，等. 六神丸逆转白血病多药耐药作用及相关机制研究[J]. 天津中医药大学学报，2007，26(1)：11-13.

[2] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京：人民卫生出版社，1994：206.

[3] 严永清. 中药现代研究的思路与方法[M]. 北京：化学工业出版社，2006：341.

[4] 李玉莹，马武开. 中医药逆转白血病多药耐药细胞的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志，2010，10(5)：906.

[5] Bustamante J，Caldas LE，Garcia M，et al. Disruption of mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by PSC 833 and CsA in multidrug-resistant lymphoid leukemia [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2004，199(1)：44-51.

[6] Thomas H，Coley HM. Overcoming. the clinical strategy of inhibiting P-glycopmtein[J]. Cancer Control，2003，10(2)：159-169.

[7] 王玮，岑建农，李建勇. 急性白血病中 MDRI MRP Bcl-2 基因表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床，2003，30(7)：470-473.

[8] 马晓军，任红波，叶蕾. Bcl-2、Bax 在急性白血病表达中的研究进展[J]. 中国临床医学，2005，12(5)：955-957.

[9] 戴锡孟，徐芳. 六神丸诱导白血病细胞凋亡及调控凋亡相关基因的实验研究[J]. 辽宁中医杂志，2003，(6)：431.

[10] 戴锡孟，徐芳. 六神丸诱导白血病细胞凋亡及 BCL-2 相关基因的实验研究[J]. 陕西中医杂志，2004，30(7)：41-44.

（编辑：宋威）

# 鼠尾草酸对人结肠癌细胞增殖抑制作用及增强其对 5- 氟脲嘧啶敏感性的研究

江红娟[1]，金闺秀[2]，叶　强[1]（1. 浙江省人民医院，浙江 杭州 310014；2. 宁波大学医学院，浙江 宁波 315211）

**摘要：目的**　研究鼠尾草酸（carnosic acid，CA）抑制人结肠癌细胞 SW480 增殖和增强化疗药物 5- 氟脲嘧啶（5-Fluorouracil，5-FU）敏感性的作用及机制。**方法**　结晶紫染色法检测 CA 对 SW480 增殖的抑制作用，流式细胞技术分析和 MTT 法检测 CA 和 5-FU 联合使用对人结肠癌细胞 SW480 凋亡和细胞活力的影响。采用 β-catenin 荧光素酶报告基因（TOP-Flash）检测 CA 作用后 SW480 细胞内 β-catenin 活性改变。不同浓度 CA 处理 SW480 后，Western blot 检测 β-catenin 蛋白质表达水平变化，RT-PCR 法检测其下游基因 Cyclin D1 和 P-gp（P-glycoprotein）的 mRNA 表达水平变化。**结果**　CA 对人结肠癌 SW480 细胞增殖有抑制作用，且 CA 能够增强 5-FU 对结肠癌细胞凋亡和细胞活力的影响。CA 处理后细胞内 β-catenin 转录活性明显降低，Western blot 法和 RT-PCR 法结果显示 CA 下调了 β-catenin 的蛋白水平及下游基因 Cyclin D1 和 P-gp mRNA 表达。**结论**　CA 能够抑制人结肠癌 SW480 细胞增殖和增强 5-FU 的抗肿瘤效果，其机制可能与抑制 β-catenin 活性并下调其下游基因 Cyclin D1 和 P-gp 表达有关。

**关键词：**鼠尾草酸；结肠癌；5- 氟脲嘧啶；细胞增殖；细胞凋亡；β-catenin

**中图分类号：**R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1003-9783(2014)03-0283-05

**doi：**10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.011

## Studies on Carnosic Acid in Suppressing Proliferation of Human Colon Cancer Cells and Enhancing Their Chemosensitivity to 5-Fluorouracil

JIANG Hongjuan[1]，JIN Guixiu[2]，YE Qiang[1]（1. Zhejiang Provincial People's Hospital，Hangzhou 310014 Zhejiang，China；2. Ningbo University School of Medicine，Ningbo 315211 Zhejiang，China）

**Abstract：Objective**　To investigate the antitumor effects and underlying mechanism of carnosic acid（CA）on the proliferation of human colon cancer SW480 cells and their chemosensitivity to 5-fluorouracil（5-FU）. **Methods**　The anti-proliferation effect of CA on SW480 cells was determined by crystal violet staining. Fluorescence activated cell

**收稿日期：**2013-10-19

**作者简介：**江红娟，女，硕士，药师，研究方向：肿瘤药理。Email：tigergirl@126.com。通讯作者：叶强，主管药师，研究方向：临床药理学。Email：yht20020517@qq.com。

sorting and MTT assay were utilized to detect the cell apoptosis and cell viability of SW480 cells treated by the combination of CA and 5-FU. The effect of CA on Wnt/β-catenin signaling activity was evaluated by the β-catenin sensitive TOP-Flash luciferase reporter assay. Western blot was applied to detect the expression of β-catenin protein, and RT-PCR was applied to examine Cyclin D1 and P-gp (P-glycoprotein) mRNA expression in SW480 cells after treated with different concentrations of CA. **Results** CA exhibited the proliferation activity of SW480 colon cancer cells. When used together, CA could enhance the effect of 5-FU on inducing cell apoptosis and reducing cell viability. β-catenin transcription activity and protein level as well as its target genes Cyclin D1 and P-gp mRNA expression were significantly reduced by CA in a concentration-dependent manner. **Conclusion** CA can inhibit cell proliferation and enhance the antitumor effect of 5-FU on human colon cancer SW480 cells, and its mechanism may be related with the down-regulation of β-catenin activity and its downstream genes expression(Cyclin D1 and P-gp).

**Keywords**: Carnosic acid; Colon cancer; 5-Fluorouracil; Cell proliferation; Cell apoptosis; β-catenin

结肠癌是世界范围内一种常见的恶性肿瘤，一些西方国家得益于其预防和早期诊断的策略，结肠癌造成的死亡率有所下降，但在许多发展中国家却在持续上升[1]。目前结肠癌的化疗主要依赖于抗代谢药物5-氟脲嘧啶(5-Fluorouracil，5-FU)，但只有10%~15%的晚期结肠癌病人在接受5-FU单独治疗后有效[2]。因此，研发一种新型的高效低毒的治疗方案，特别是能够克服传统化疗药物耐药性的新策略具有极为重要的意义。

有流行病学研究发现结肠癌的发病和饮食密切相关，其中大约60%~75%的结肠癌病人直接受到了饮食的影响[3]。化学预防作为控制结肠癌的一种主要策略受到越来越多的关注，许多能够抑制结肠癌的天然化合物及其衍生物正处于研发之中，而且有些已经成为重要的化疗药物[4]。植物来源的多元酚类物质是一大类天然的抗氧化剂，研究[5]表明摄取富含多元酚的水果和蔬菜能够明显降低包括癌症在内的多种疾病发生风险。

鼠尾草酸(carnosic acid，CA)是迷迭香提取物中的主要多元酚成分之一，具有抗氧化、抗感染等多种药理学活性[6]。最近有报道[7]显示CA在乳腺癌、肝癌、前列腺癌和肺癌等多种癌细胞中表现出了明显的抗增殖效果。在此基础上，本研究进一步探讨CA在人结肠癌细胞中的抗肿瘤活性和其增强5-FU药物敏感性的效应，以及CA抑制细胞内Wnt/β-catenin信号转导的可能作用机制，为将CA开发成一种新型的高效低毒的人结肠癌治疗药物或辅助治疗药物提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、细胞培养基及试剂**　人结肠癌细胞SW480，批号：CCL-228，ATCC (American Type Culture Collection)；细胞培养使用Gibco公司RPMI-1640培养基(含有10%胎牛血清，2 mM的L-谷氨酰胺和1%青、链霉素)，标准条件培养细胞(37 ℃室温，95%湿度，5% $CO_2$)；鼠尾草酸(CA)、5-氟脲嘧啶(5-FU)、二甲基亚砜(DMSO)、二苯基四氮唑溴盐(MTT)和结晶紫试剂，美国Sigma公司；TOP-Flash(β-catenin报告基因)质粒，批号：12456，Addgene；双荧光素酶检测试剂盒，Promega公司；Annexin Ⅴ-FITC/PI双染试剂盒，碧云天生物技术研究所；实验所用抗体，Santa Cruz公司；Lipofectamine 2000、Trizol和RT-PCR试剂盒，Invitrogen公司。

**1.2 方法**

**1.2.1** 结晶紫染色　取对数生长期的SW480细胞，$2\times10^4$个/孔接种于24孔板内，不同浓度CA处理24，48，72 h后，结晶紫染色检测细胞增殖情况。实验操作参照文献方法[8]：磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞后，结晶紫染液(2%结晶紫溶于20%甲醇溶液)室温染色15 min，蒸馏水洗去多余染料，晾干后拍照。33%醋酸溶解染料，在595 nm波长下检测吸光值。每组实验重复3次，结果取平均值。

**1.2.2** 细胞凋亡检测　将指数生长的细胞种于6孔板，按实验设计用CA和5-FU处理细胞。于处理第48 h后收集细胞并用PBS清洗；然后用annexin Ⅴ-FITC和PI进行孵育，通过流式细胞仪分析凋亡情况(按试剂

盒说明进行操作)。每组实验重复 3 次。

**1.2.3** MTT 法检测　取对数生长期的 SW480 细胞，按 $4\times10^3$ 个 / 孔接种于 96 孔板内。待细胞贴壁后，按实验设计加入不同浓度(1 ~ 100 μmol·L$^{-1}$) 的 CA 和 5-FU 进行分别处理或联合处理，每组设 6 个复孔。细胞培养 72 h 后，每孔加入 20 μL MTT(5g·L$^{-1}$)，孵育 4 h 后弃上清液，再加 150 μL 的 DMSO 振荡混匀。在酶标仪上检测 490 nm 处吸光度(OD)，实验重复 3 次。细胞存活率 =(实验组 OD 值 / 对照组 OD 值)× 100 %，绘制细胞活力曲线并计算半数致死浓度($IC_{50}$)。

**1.2.4** 荧光素酶报告基因实验　对数生长 SW480 细胞铺在 24 孔板内，贴壁后采用 Lipofectamine 2000 转染试剂，在细胞内同时转入 TOP-Flash 报告质粒和内参报告质粒 pRL-TK，不同浓度 CA 处理 24 h，按照试剂盒说明书检测细胞裂解液内荧光素酶活性，每组实验重复 3 次，结果取平均值。

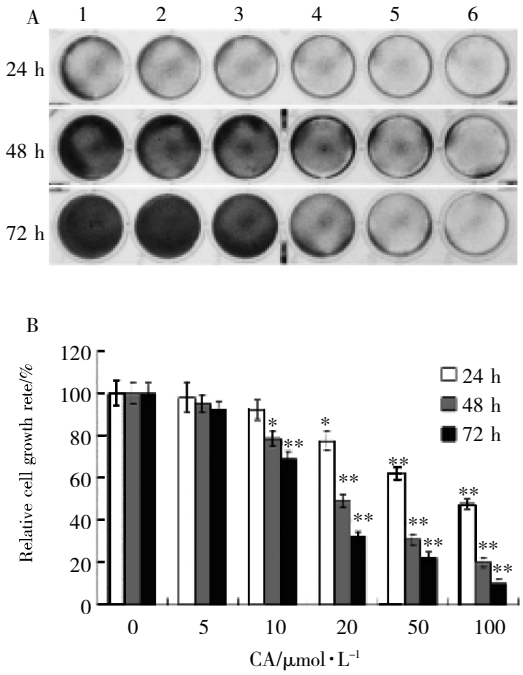
**1.2.5** Western blot 检测　人结肠癌 SW480 细胞在不同浓度 CA 处理 24 h 后，冰预冷的 RIPA 裂解液收集细胞全蛋白，加入适量蛋白上样缓冲液，沸水煮 10 min 使蛋白充分变性，进行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转至 PVDF 膜，再按常规方法进行 Western blot 一抗二抗检测。

**1.2.6** RT-PCR 实验　将细胞铺于培养皿中，采用含胎牛血清的完全培养基培养细胞，不同浓度 CA 处理 24h 后，TRIzol 法提取总 RNA；通过 RT-PCR 检测 Cyclin D1 和 P-gp(P-glycoprotein)的表达，每组实验重复 3 次。所用引物如下：18S rRNA 上游 5'-CAGCCACCCGAGAT TGAGCA-3'，下游 5'-TAGTA GCGACGGGCGGTGTG -3'；Cyclin D1 上游 5'-TGTT CGTGGCCTCTAAGAT GAAG-3'，下游 5'-AGGTTCC ACTTGAGCTTGTTCAC -3'，P-gp 上游 5'-TTCGCAA CCCCAAGATCCTC-3'，下游 5'-ACAATGGTGGTCC GACCTTT-3'。

**1.3　统计学处理方法**　采用 SPSS17.0 软件，所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用两样本均数的 $t$ 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1　CA 抑制 SW480 细胞的增殖**　见图 1。在 10~100 μmol·L$^{-1}$ 浓度范围内，CA 对结肠癌 SW480 细胞的增殖具有明显的抑制作用，而且这种抑制作用呈现出对药物浓度和作用时间的依赖性。




注：与同时间点的空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

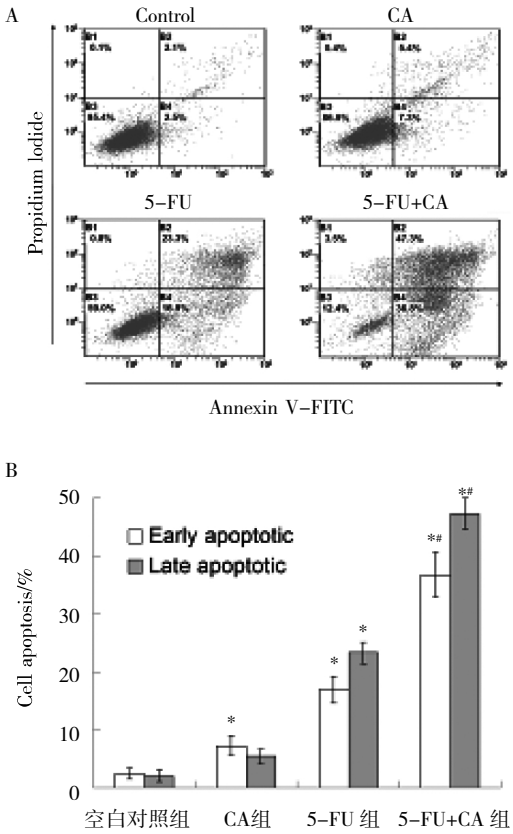
**图 1　CA 对 SW480 细胞增殖抑制的影响**

Figure 1　Proliferation -inhibitory effect of CA on SW480 cells

**2.2　CA 增强 5-FU 诱导的 SW480 细胞凋亡**　见图 2。SW480 细胞分别经 CA、5-FU 以及 5-FU+CA 联合用药处理 48 h 后，结果显示 CA 组、5-FU 组以及 5FU+CA 联合用药组诱导的细胞凋亡率与空白对照组比较，差异有统计学意义($P < 0.05$，$P < 0.01$)，而 5FU+CA 联合用药组与单独给药组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明 CA 能够促进 5-FU 诱导人结肠癌细胞凋亡的作用。

**2.3　CA 增强 5-FU 对 SW480 细胞活力的抑制作用**　见图 3。CA 与 5-FU 单独用药均呈现剂量依赖效应，CA、5-FU 及 5-FU+CA 联合用药的 $IC_{50}$ 分别为 (41.25 ± 2.43)μmol·L$^{-1}$、(19.62 ± 3.62)μmol·L$^{-1}$ 以及 (6.17 ± 1.29)μmol·L$^{-1}$，其中联合用药组的 $IC_{50}$ 小于 5-FU 单独用药组($P < 0.05$)，表明 CA 可以增强 5-FU 杀伤 SW480 细胞的作用。

**2.4　CA 降低 SW480 细胞 β-catenin 的活性**　见图 4。TOP-Flash 荧光素酶质粒含有多个 β-catenin 结合元件，所以能够反映细胞内 β-catenin 的转录活性。图 4A 显示 Wnt3a 能够明显提高 β-catenin 的活性，而 CA 可以有效抑制 β-catenin 的活性。Western blot 检测结果(图 4B)显示，CA 作用于 SW480 细胞导致 β-catenin 蛋白水平的下调，并且随药物浓度增




注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$；与 5-FU 组比较，$^{\#}P < 0.05$。

**图 2　CA 和 5-FU 对 SW480 细胞凋亡的影响**（$n$=3）

Figure 2　Cell apoptosis induced by 5-FU and CA in SW480 cells

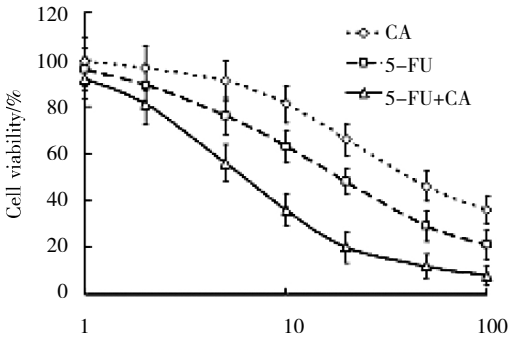
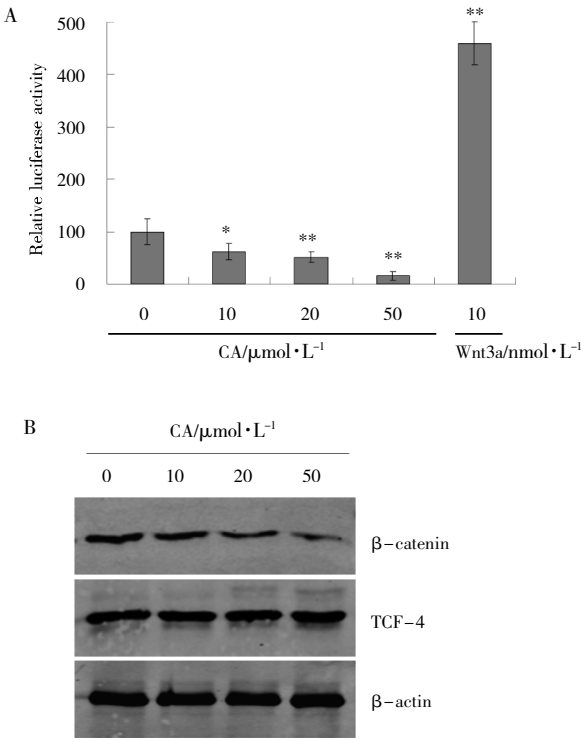



**图 3　CA 和 5-FU 对 SW480 细胞活力的影响**（$n$=3）

Figure 3　Cell viability reduced by 5-FU and CA in SW480 cells

加而作用增强，而同时其共转录因子 TCF-4 的蛋白表达并没有发生明显变化。这提示 CA 能够通过降低 β-catenin 蛋白水平而下调其转录活性。

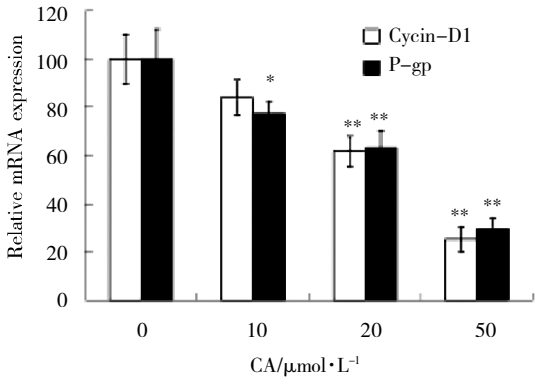
**2.5　CA 抑制 SW480 细胞 Cyclin D1 和 P-gp 的 mRNA 表达**　见图 5。RT-PCR 检测结果显示，CA 能够抑制 SW480 细胞内 Cyclin-D1 和 P-gp 的 mRNA 表达，表达水平随药物浓度增加而明显降低。




注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

**图 4　CA 对 SW480 细胞内 β-catenin 活性的影响**（$n$=3）

Figure 4　β-catenin activity decreased by CA in SW480 cells




注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

**图 5　CA 对 SW480 细胞内 β-catenin 靶基因表达的影响**

Figure 5　Target genes of β-catenin modulated by CA in SW480 cells

Cyclin-D1 和 P-gp 作为 β-catenin 的下游靶基因，其表达水平下调应该与 CA 抑制细胞内 β-catenin 的活性有关。

## 3 讨论

迷迭香提取物及活性成分有明显的抗细胞增殖和抗肿瘤的作用，其中约占到迷迭香叶干重 4 %的鼠尾草酸(CA)在抗肿瘤效果中起到了关键的作用[9]。本研究中，采用不同浓度的 CA 体外作用可以抑制人

结肠癌 SW480 细胞的增殖，而且这种抑制效应呈浓度和时间依赖性的。通过对其机制的研究发现 CA 下调了 Cyclin D1 的表达水平。Cyclin D1 属于细胞周期调控蛋白，表达具有细胞周期特异性，在 G1/S 交界处表达量最高，其总含量能够反映处于不同周期的细胞群体的增殖活跃程度[10]。所以，提示 CA 能够通过下调 Cyclin D1 的表达从而抑制结肠癌细胞的增殖。

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤，目前临床治疗的主要手段之一是以 5-FU 为基础的化学药物治疗，而癌细胞产生耐药性是化疗失败的主要原因。研究表明其主要机制包括表达 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)把化疗药物输出细胞外，修复化疗药物造成的 DNA 损伤和阻止细胞进入凋亡程序等[11]。P-gp 作为 ABC 转运蛋白系统的主要跨膜成分，能够通过降低细胞内药物浓度或者改变药物在细胞内的分布来限制药物作用的效果，从而导致了癌细胞的药物耐受[12]。本研究表明 CA 能够增强 5-FU 的抗肿瘤活性，而其主要机制是通过降低 P-gp 的表达水平从而促进 5-FU 诱导的细胞凋亡，提示两药联合的化疗方案具有潜在的临床应用价值。

Wnt/β-catenin 信号通路在发育和组织内稳态中起着重要的作用，而 β-catenin 的持续激活则能够导致肿瘤特别是结肠癌的发生。实际上超过 90 %的结肠癌都伴随有 Wnt/β-catenin 信号通路的基因突变，主要是 APC 和 β-catenin 的突变导致了该信号通路的持续激活[13]。β-catenin 被激活后能够进入细胞核并与 TCF/LEF 形成转录复合物，诱导其下游基因的表达进而促进肿瘤的发生发展，而且多项研究表明 β- catenin 的核聚集与肿瘤的分期、转移和不良预后密切相关[14]。因此 β-catenin 成为结肠癌药物治疗的重要靶点，目前针对该信号通路已经成功研发出多种小分子抑制剂，但它们大多是通过靶向 β-catenin 的调节蛋白而间接抑制其活性[15]。我们的研究表明，CA 能够通过下调 β-catenin 自身及其下游基因 Cyclin D1 和 P-gp 的表达水平，从而抑制结肠癌细胞内过度活化的 Wnt/β-catenin 信号，进一步表现出显著的抗肿瘤效果。但关于 CA 抑制 β-catenin 信号通路活性与其抗肿瘤效果的相关机制还有待深入研究。

**参考文献：**


[1] Jemal A，Bray F，Center MM，et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin，2011，61(2)：69-90.

[2] Zhang N，Yin Y，Xu SJ，et al. 5-Fluorouracil：mechanisms of resistance and reversal strategies[J]. Molecules，2008，13(8)：1551-1569.

[3] Bruce WR，Giacca A，Medline A. Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev，2000，9(12)：1271-1279.

[4] Lee KW，Bode AM，Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention[J]. Nat Rev Cancer，2011，11(3)：211-218.

[5] Fiander H，Schneider H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms：the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics[J]. Cancer Lett，2000，156(2)：117-124.

[6] Moreno S，Scheyer T，Romano CS，et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition [J]. Free Radic Res，2006，40(2)：223-231.

[7] Yesil-Celiktas O，Sevimli C，Bedir E，et al. Inhibitory effects of rosemary extracts，carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines[J]. Plant Foods Hum Nutr，2010，65(2)：158-163.

[8] 潘国凤，高建莉，张奇，等. 雷公藤甲素通过抗 ER 磷酸化抑制小鼠 4T1 乳腺癌增殖作用研究[J]. 中国中药杂志，2013，38 (23)：4129-4133.

[9] Cheung S，Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary Rosmarinus officinalis[J]. Oncol Rep，2007，17(6)：1525-1531.

[10] Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation：roles in cancer development and the potential for therapeutic invention [J]. Mol Cancer，2007，6：24.

[11] Szakacs G，Paterson JK，Ludwig JA，et al. Targeting multidrug resistance in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov，2006，5(3)：219-234.

[12] Cheng SC，Zhou J，Xie Y. P-glycoprotein expression induced by glucose depletion enhanced the chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cell-lines[J]. Cell Biol Int，2005，29(4)：269-275.

[13] Najdi R，Holcombe RF，Waterman ML. Wnt signaling and colon carcinogenesis：beyond APC[J]. J Carcinog，2011，10：5.

[14] Wong SC，Lo ES，Lee KC，et al. Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res，2004，10(4)：1401-1408.

[15] Chen B，Dodge ME，Tang W，et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer[J]. Nat Chem Biol，2009，5(2)：100-107.


(编辑：邓响潮)