

辣椒碱对结肠癌细胞自噬抑制作用的研究

朱剑梅, 金科

(四川省医学科学院·四川省人民医院, 四川 成都 610110)

摘要: [目的] 研究辣椒碱对人结肠癌细胞 SW480 自噬的抑制作用。[方法] 通过 MTT 法和克隆形成实验检测不同浓度辣椒碱处理的细胞增殖率, 免疫荧光检测细胞自噬体的形成, Western Blot 检测自噬标志物和信号通路蛋白的表达。通过蛋白组实验方法获取辣椒碱药物的相互作用蛋白, 质谱技术进行蛋白鉴定及 STRING 数据库进行生物信息学分析。[结果] MTT 结果表明 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的辣椒碱能促进细胞增殖, 该浓度的辣椒碱抑制了细胞自噬体的形成, 抑制了 LC3 的活化, 促进了 p62 的表达, 提高了 Akt 和 mTOR 的磷酸化。质谱分析和 STRING 数据库查询发现了 7 个辣椒碱的相互作用蛋白, 其中 ATG2B 与自噬存在重要联系。[结论] 低浓度辣椒碱通过激活 PI3K-Akt 信号通路及与 ATG2B 相互作用来抑制细胞自噬。

关键词: 结肠肿瘤; 细胞自噬; 辣椒碱; 信号通路

中图分类号: R735.3+5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)06-0477-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.06.B009

The Inhibition Effect of Capsaicin on Autophagy in Colon Cancer Cell

ZHU Jian-mei, JIN Ke

(Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610110, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the inhibition effect of capsaicin on autophagy in human colon cancer cell line SW480. [Methods] MTT and colony formation assays were used to examine the effect of cell proliferation under treatment with various concentrations of capsaicin. The formation of autophagosomes was performed by immunofluorescent staining. Western Blot was conducted to measure the altered levels of autophagy-related proteins and signaling pathways. Furthermore, proteomic approach was used to investigate the intracellular proteins that can interact with capsaicin. These proteins were identified by mass spectrometry and the bioinformatic analysis was further performed by String. [Results] Capsaicin (100 $\mu\text{mol/L}$) was capable to induce cell proliferation of SW480. Moreover, capsaicin at the concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ could inhibit the formation of autophagosomes, suppress the activation of LC3, enhance the levels of p62, and induce the phosphorylation of Akt and mTOR. Proteomics analysis identified 7 proteins that directly interact with capsaicin, among which ATG2B was significantly involved in autophagic event. [Conclusion] Capsaicin could inhibit autophagy by activating PI3K-Akt signaling pathway and binding to ATG2B.

Subject words: colon neoplasms; autophagy; capsaicin; signaling pathways

结肠癌是我国常见的恶性肿瘤^[1], 研究表明, 日常膳食结构与结肠癌之间存在着紧密联系, 尤其是长期辛辣饮食与结肠癌的发生发展密切相关^[2]。辣椒是辛辣饮食的重要组成, 而辣椒碱是辣椒中的主要活性成分^[3], 具有多种生物学活性。最新报道证明, 低浓度辣椒碱能促进结肠癌细胞增殖和转移^[4],

但其作用机制尚不明确。本研究以人结肠癌细胞作为研究对象, 旨在通过对辣椒碱与结肠癌细胞自噬关系的研究, 来阐明辣椒碱的生物学活性, 为其将来的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠癌细胞株 SW480 购于美国标准生物保

通讯作者: 金科, 主治医师, 博士; 四川省医学科学院四川省人民医院城东病区, 四川省成都市龙泉驿区洪河北路 585 号 (610110); E-mail: 332022537@qq.com

收稿日期: 2013-09-17; **修回日期:** 2013-11-06

藏中心(ATCC);辣椒碱购于四川金辉生物;噻唑蓝(MTT)购买于 Sigma 公司;Akt 和 mTOR 抗体及其磷酸化抗体购于 Cell Signal Technology 公司,其余抗体购自 Santa Cruz;细胞培养基和胎牛血清购于 Gibco 公司;PVDF 膜和 ECL 显影液购于 Millipore 公司;X 光胶片购于 Kodak 公司;离心脱盐柱购于 Thermo 公司,其余化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SW480 在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基(100U/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素)于培养条件为 37 $^{\circ}$ C、95%空气、5%CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 四唑盐比色实验(MTT)

参考文献方法^[5],测定不同浓度(12.5、25、50、100、200、400 μ mol/L)辣椒碱处理 SW480 细胞 48h 后的细胞活力。

1.2.3 克隆形成实验

参考文献方法^[6],不同浓度(25、50、100、200 μ mol/L)辣椒碱处理 SW480 细胞 48h 后,将处理后细胞以 300 个/孔的量接种至另一个 6 孔板中。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下培养细胞两周。弃去培养基,甲醇固定 5min,结晶紫染色 15min,以流水缓慢冲洗,洗去染液后观察并计数克隆数(细胞团的细胞数多于 50 个算一个克隆)。

1.2.4 LC3 免疫荧光标记检测自噬体的形成

参考文献方法^[7],将细胞铺在经多聚赖氨酸处理过的盖玻片,带细胞贴壁后,用无糖培养基饥饿状态下培养 12h。用无糖培养基配制的辣椒碱分别处理细胞不同时间,通过 LC3 抗体免疫荧光检测细胞体内自噬体的形成。

1.2.5 免疫印迹

参考文献方法^[6],收集处理后细胞,细胞裂解后提取蛋白。样品经过 SDS-PAGE 电泳分离后,转移 PVDF 膜上。分别加入一抗(各种一抗稀释比例均为 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗膜后,辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000)37 $^{\circ}$ C 温育 2h, TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,加入 ECL 显影剂后,通过 X 光胶片曝光。

1.2.6 辣椒碱相互蛋白的分离鉴定

参考文献方法^[8],将辣椒碱偶联在树脂上,加入 SW480 细胞裂解液 4 $^{\circ}$ C 下孵育 4h,孵育结束后,用 2mol/L 的 NaCl 溶液洗脱结合蛋白,将洗脱液脱

盐,经 12%SDS-PAGE 分离,切取蛋白条带,参考文献方法^[9],胶内酶解后进行质谱鉴定。

1.2.7 蛋白生物信息分类

利用 STRING 数据库查询与辣椒碱结合蛋白的相互作用蛋白。

2 结果

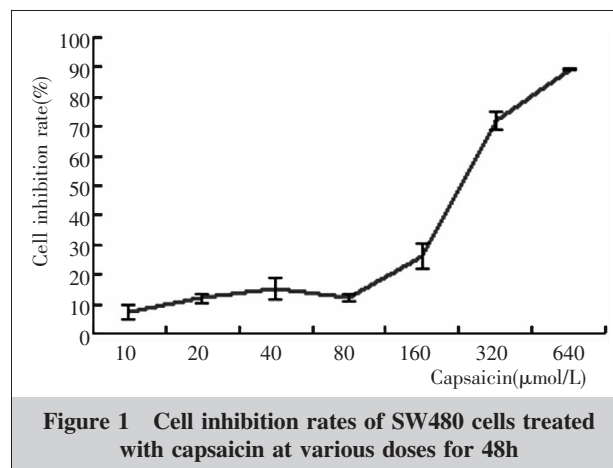
2.1 低浓度辣椒碱促进结肠癌细胞增殖

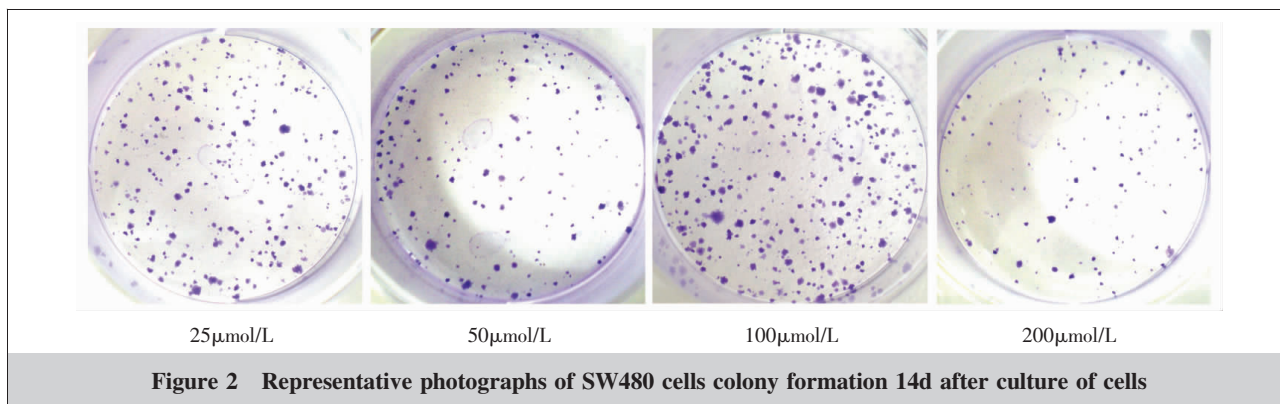
使用不同浓度的辣椒碱分别处理 SW480 细胞 48h 后,MTT 法测定结果表明,200~1 600 μ mol/L 的辣椒碱能够抑制 SW480 的增殖,但是在低浓度辣椒碱(100 μ mol/L)处理时,细胞出现增殖现象(Figure 1)。

为确定低浓度辣椒碱对 SW480 的作用,我们使用克隆形成实验进一步验证。结果表明,不同浓度(25、50、100、200 μ mol/L)辣椒碱处理细胞 48h 后克隆数分别为 118 ± 2.49 、 87 ± 3.14 、 329 ± 2.81 和 49 ± 2.32 ,说明 100 μ mol/L 辣椒碱较其他浓度明显促进了 SW480 细胞的增殖(Figure 2)。这一现象提示在低浓度辣椒碱处理时,细胞内可能发生了抑制细胞死亡的生物现象,例如细胞自噬的抑制。

2.2 低浓度辣椒碱抑制结肠癌细胞自噬

为确定低浓度辣椒碱与细胞自噬的关系,我们使用 100 μ mol/L 浓度的辣椒碱处理 SW480 细胞 0、6、12、24h,以未加药物处理细胞为对照,采用 LC3 免疫荧光检测细胞内自噬体的形成。实验结果表明,经过低浓度辣椒碱处理后的细胞,相对于对照组,自噬小体明显减少,且在处理 12h 时,自噬抑制效果最明显(Figure 3)。证明辣椒碱能抑制细胞内的自噬体





的形成。

为了进一步证明辣椒碱抑制结肠癌细胞自噬,将经过 100μmol/L 浓度的辣椒碱分别处理细胞 0、6、12、24h,通过 Western Blot 分析细胞自噬标志性蛋白 p62、Beclin-1 和 LC3 的表达,结果表明,辣椒碱抑制了 LC3 的活化,同时促进了 p62 在细胞内的累积,而对 Beclin-1 的表达影响不大(Figure 4)。实验结果表明低浓度辣椒碱能抑制 SW480 自噬,且在 12h 时,LC3 活化程度最低,与免疫荧光实验结果一致。

2.3 辣椒碱抑制 SW480 细胞内 Akt-mTOR 信号通路

Akt-mTOR 途径是自噬上游最重要的信号通路之一,当 Akt-mTOR 通路受到抑制时,下游自噬途径被激活。因此,为分析辣椒碱抑制 SW480 细胞自噬的过程是否受到 Akt-mTOR 通路调节,我们通过 Western Blot 分析证明,辣椒碱的处理显著激活 Akt 和 mTOR 的磷酸化水平,并且抑制程度在 12h 时最强(Figure 5)。

2.4 辣椒碱相互蛋白的分离鉴定

为进一步阐明辣椒碱抑制细胞自噬的分子机制,我们采用 pull-down 的方法,使用辣椒碱结合树脂上结合细胞裂解液,用高浓度氯化钠洗脱相互作用蛋白后,脱盐、电泳分离出辣椒碱的相互作用蛋白(Figure 6)。进一步通过蛋白质组学的方法,将分离得到的辣椒碱的相互作用蛋白进行质谱鉴定。结果鉴定出了 ANXA2、CCR3、USP2、ATG2B、TFRC、FER1L5、STOML2 这 7 个辣椒碱的相互作用

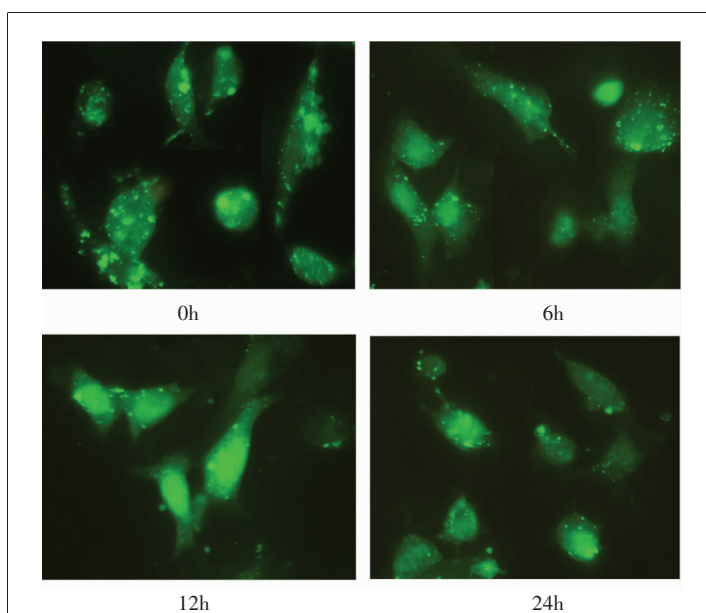


Figure 3 Immunofluorescence analysis of LC3

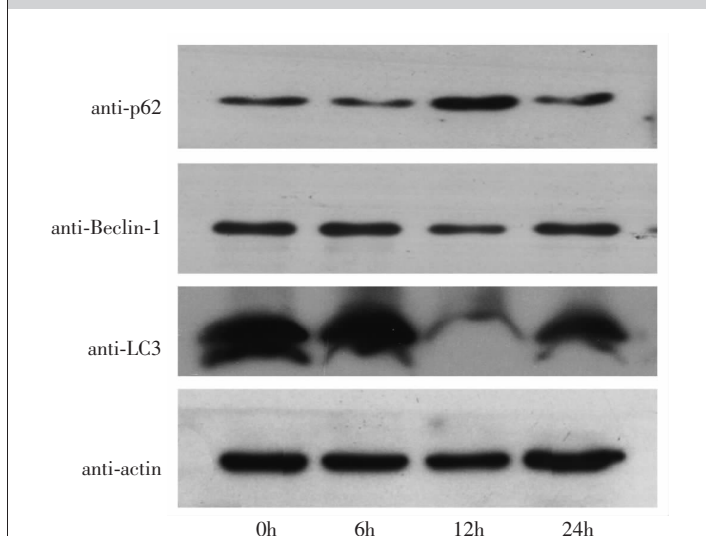


Figure 4 Western Blot analysis of autophagy biomarkers

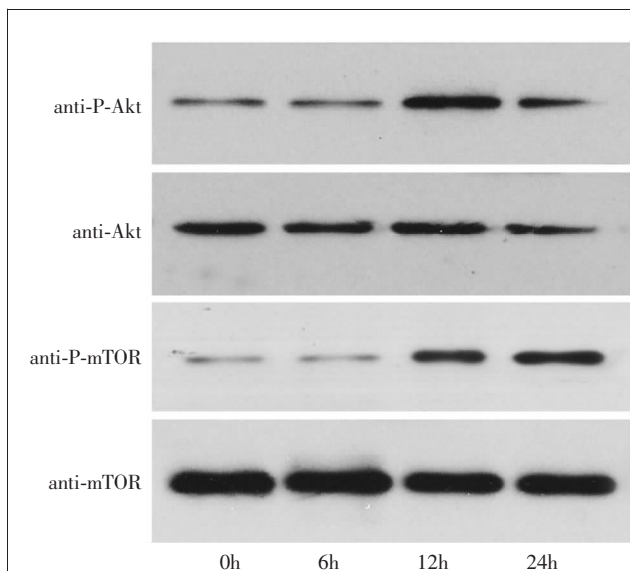


Figure 5 Western Blot analysis of Akt, mTOR expression

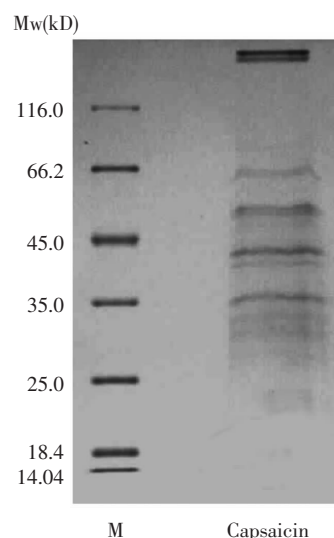


Figure 6 SDS-PAGE of capsaicin interactive proteins

蛋白。

2.5 辣椒碱相互作用蛋白生物信息学分析

利用 STRING 数据库查询这 7 种蛋白的相互作用蛋白, 分析各个蛋白在蛋白质相互作用网络中的位置。结果表明, 辣椒碱的相互作用蛋白与细胞内炎症因子、囊泡分泌等信号网络密切相关, 与已有报道的辣椒碱多种生物学功能一致。其中 ATG2B 与细胞自噬中的关键调控分子 ATG5 和 ATG12 存在相互作用, 提示辣椒碱可能通过与 ATG2B 的相互作用影响 ATG5 和 ATG12, 从而对细胞自噬进行调节 (Figure 7)。

3 讨论

自噬 (autophagy) 是受到自噬相关基因严格调控的一种细胞程序性死亡模式, 可以清除细胞质内受损、老化和机能障碍的细胞器和错误折叠的蛋白质等大分子以及蛋白质聚集物, 对于维持细胞稳态和基因组的完整性发挥着至关重要的作用^[10]。研究证明, 自噬与肿瘤发生发展有着密切关系^[11]。自噬可以通过参与修复与凋亡途径相互作用等机制抑制肿瘤发生; 自噬活性增强也可促进肿瘤细胞适应缺氧环境, 维持肿瘤细胞的代谢及生长, 逃离药物诱导的凋亡^[12,13]。因此, 明确药物与肿瘤细胞自噬之间的关系, 有助于研究解析药物作用机制和阐明肿瘤病理进程。

在自噬发生过程中, 自噬相关基因在起始、延伸、自噬体降解等各阶段发挥着重要的功能。PI3K-Akt-mTOR 通路是自噬最重要的上游负调控因子^[14]。Beclin-1/Class III PI3K 复合物的形成, 参与自噬体膜的形成, 在介导自噬起始阶段发挥着关键作用^[15]。自噬体膜的形成是自噬的重要标志, 吞噬体膜延伸由两个泛素样结合系统介导: 分别是 Atg12 结合系统和 Atg8/LC3 结合系统^[16]。细胞自噬发生时, LC3-I 转换成自噬体膜型 LC3-II, 而 LC3-II 可以与自噬体膜牢固地结合形成自噬体。p62 作为泛素结合支架蛋白, 当与 LC3 结合后, 可以作为一种转接器将泛素化蛋白以及线粒体与自噬体系联系起来, 在自噬正常进程中被降解。因此, 可以通过检测 LC3 的理化性质和 p62 的积累程度判断细胞的自噬水平^[17]。

已有文献报道, 辣椒碱对不同肿瘤有着不同的生物活性, 如对于肺癌、前列腺癌和胰腺癌, 辣椒碱能抑制其增殖^[18]; 而对于皮肤癌, 辣椒碱则能促进其癌变^[19]; 辣椒碱还能诱导乳腺癌细胞凋亡^[20]。我们发现低浓度辣椒碱处理结肠癌细胞 SW480 能导致一系列抑制自噬标志事件出现, 包括细胞内双层膜结构的自噬体的减少以及蛋白 LC3-I 向 LC3-II 的转化减弱, p62 蛋白积累增多, 提示辣椒碱对 SW480 细胞自噬的抑制作用。进一步研究证明, 低浓度辣椒碱促进了 AKT 和 mTOR 的磷酸化, 证明辣椒碱通过激活 AKT-mTOR 信号通路抑制细胞自噬。但是有趣

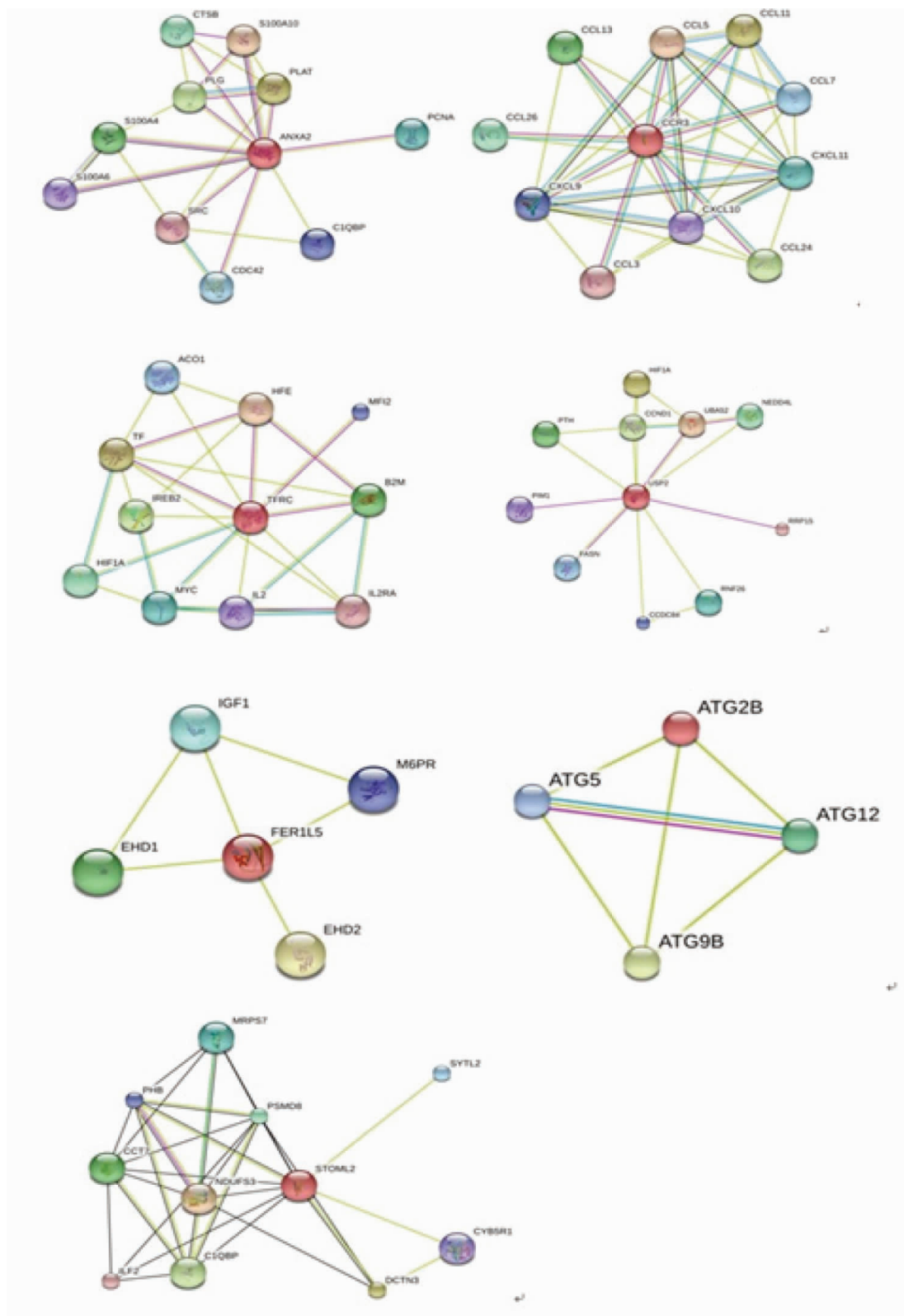


Figure 7 Bioinformatics analysis of capsaicin interacting proteins

的是,辣椒碱处理并不影响 Beclin-1 的表达,说明辣椒碱对细胞自噬的抑制存在其他分子机制。

为了进一步阐明辣椒碱对细胞自噬的调控机制,我们通过蛋白质组学的方法分离并鉴定出 7 个辣椒碱相互作用蛋白。通过生物信息学分析,我们发现,辣椒碱相互作用蛋白——ATG2B 具有重要的生物学功能。已有文献证明,ATG2B 参与调控 ATG12 与 ATG5 的结合,而 ATG12 与 ATG5 结合系统是吞噬泡延伸的重要调节步骤^[21]。因此,我们认为辣椒碱有可能通过与 ATG2B 的相互作用,调控 ATG12 与 ATG5 结合系统,进而影响自噬体的形成。但是辣椒碱与 ATG2B 的相互作用关系及调节信号通路还需要进一步验证。

综上所述,本实验证明了低浓度辣椒碱能抑制结肠癌细胞的自噬,同时提出了辣椒碱生物作用的一个新的假说:即辣椒碱可能通过与 ATG2B 蛋白的相互作用而影响 ATG12-ATG5 系统,进而抑制自噬体的形成,从而达到抑制结肠癌细胞的作用。这为研究辣椒碱的生物学活性,阐明肿瘤与细胞自噬机制提供了新的参考依据。

参考文献:

- [1] Saif MW. Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2006, 6(1): 46–51.
- [2] Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer [J]. Cell, 1996, 87(2): 159–170.
- [3] Surh YJ, Lee SS. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen [J]. Food Chem Toxicol, 1996, 34(3): 313–316.
- [4] Yang J, Li TZ, Xu GH, et al. Low-concentration capsaicin promotes colorectal cancer metastasis by triggering ROS production and modulating Akt/mTOR and STAT-3 pathways [J]. Neoplasia, 2013, 60(4): 364–372.
- [5] Ren F, Wu H, Lei Y, et al. Quantitative proteomics identification of phosphoglycerate mutase 1 as a novel therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 81.
- [6] Lei Y, Huang K, Gao C, et al. Proteomics identification of ITGB3 as a key regulator in reactive oxygen species-induced migration and invasion of colorectal cancer cells[J]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10(10): M110.005397.
- [7] Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, et al. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*[J]. Science, 2003, 301(5638): 1387–1391.
- [8] Takeshi Yamauchi, Tomoya Saitoh, Kumi Shirai, et al. Immobilization of capsaicin onto silica nanoparticle surface and stimulus properties of the capsaicin-immobilized silica [J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2010, 48(8): 1800–1805.
- [9] Zhang T, Xie N, He WF, et al. An integrated proteomics and bioinformatics analyses of hepatitis B virus X interacting proteins and identification of a novel interactor apoA- I [J]. J Proteomics, 2013, 84: 92–105.
- [10] Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, et al. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells [J]. J Cell Biol, 2008, 181(7): 1065–1072.
- [11] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. Science, 2004, 306(5698): 990–995.
- [12] Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period[J]. Nature, 2004, 432(7020): 1032–1036.
- [13] Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes[J]. Cell Death Diff, 2009, 16(1): 87–93.
- [14] Bergmann A. Autophagy and cell death: no longer at odds [J]. Cell, 2007, 131(6): 1032–1034.
- [15] Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, et al. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells [J]. J Cell Biol, 2008, 181(7): 1065–1072.
- [16] Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, et al. Mammalian Atg18(WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation[J]. Autophagy, 2010, 6(4): 506–522.
- [17] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell, 2010, 140(3): 313–326.
- [18] Brown KC, Witte TR, Hardman WE, et al. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway [J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10243.
- [19] Park KK, Surh YJ. Effects of capsaicin on chemically-induced two-stage mouse skin carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 1997, 114(1–2): 183–184.
- [20] Chou CC, Wu YC, Wang YF, et al. Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway [J]. Oncol Rep, 2009, 21(3): 665–671.
- [21] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124–131.