论著

文章编号:1000-5404(2006)13-1380-04

ω-3脂肪酸联合跨膜型TNF-α对MCF-7细胞凋亡的影响及机制研究

承 海,张乾勇,糜漫天 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨半胱氨酸蛋白酶(caspase)在ω-3脂肪酸联合细胞外源性跨膜型TNF-α诱导MCF-7细胞凋亡过程中的作用。**方法** 带有脂肪酸受体反应元件的跨膜型TNF-α表达载体转染MCF-7细胞,经ω-3脂肪酸处理后,MTT比色法检测细胞增殖能力,DNA梯形带分析ω-3脂肪酸对细胞凋亡的影响,RT-PCR和Western blot方法检测细胞caspase-1、8和9基因的表达变化,应用caspase特异性底物检测肿瘤细胞caspase-8活性变化,观察caspase特异性抑制剂Ac-IETD-CHO对ω-3脂肪酸联合细胞外源性跨膜型TNF-α抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡的拮抗作用。**结果** 与MCF-7细胞相比,MCF-7转染细胞经ω-3脂肪酸处理后,细胞增殖能力减弱,检测到明显的DNA梯形带,caspase-1、8、9基因表达增加,caspase-8活性增高,caspase抑制剂可以部分拮抗ω-3脂肪酸联合跨膜型TNF-α抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的发生。**结论** ω-3脂肪酸联合跨膜型TNF-α可以更有效地诱导MCF-7细胞凋亡,而上调caspase的表达和/或活性可能在此过程中发挥重要作用。

关键词:ω-3脂肪酸;跨膜型TNF-α;凋亡;半胱氨酸蛋白酶;乳腺癌

中图法分类号:R151.2;R329.28;R73-354 **文献标识码**:A

Effect of ω-3 PUFA and exogenous transmembrane TNF-α on MCF-7 cell apoptosis

CHENG Hai, ZHANG Qian-yong, MI Man-tian (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the apoptosis and its molecular mechanism of MCF-7 cells induced by ω-3 polyunsaturated fatty acid (ω-3 PUFA) combined with the product of exogenous transmembrane TNF-α (tmTNF-α) gene. **Methods** The tmTNF-α eukaryotic expression vector containing the PPRE-tk promoter was transfected into the human breast cancer MCF-7 cells. The effects of ω-3 PUFA and/or exogenous tmTNF-α on the cell proliferation and apoptosis were measured by MTT and DNA ladder assay. The activity of caspase-8 was examined by using special fluorescence substrate, and the expression of caspases (1, 8 and 9) were analyzed by RT-PCR and Western blotting. The inhibitor of caspases was used to confirm the function of caspase. **Results** In 6.0×10^{-5} mol/L ω-3 PUFA-treated MCF-7 cells, only the growth suppression was found. In transfected MCF-7 cells after treated with ω-3 PUFA, not only the proliferation capacity was decreased but the DNA ladder was detectable. The expression changes of caspases (1, 8 and 9) and caspase-8 activity were obvious in MCF-7 transfected cells treated with ω-3 PUFA. Growth inhibition and apoptosis induced by ω-3 PUFA and tmTNF-α were partly prevented by the special caspase inhibitor. **Conclusion** These results suggested that up-regulated expression and activity of caspase might promote MCF-7 cells apoptosis induced by ω-3 PUFA and exogenous tmTNF-α, indicating that ω-3 PUFA and exogenous tmTNF-α could cooperate in inhibition of the MCF-7 cell growth and induction of apoptosis. caspase network pathway may play a key role in these processes.

Key words: ω-3 polyunsaturated fatty acid; transmembrane TNF-α; apoptosis; cysteine proteinase; MCF-7

营养素与肿瘤的关系及其在肿瘤防治方面的应用是当今肿瘤研究的热点之一。ω-3脂肪酸(ω-3 polyunsaturated fatty acid,ω-3 PUFA)是一类人体必需的重要营养素,主要存在于海洋鱼类,包括二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA,20:5n-3)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA,22:6n-3)。流行病

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100150)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30100150)

作者简介:承 海(1976-),男,安徽省淮南市人,硕士,医师,主要从事营养、免疫与肿瘤方面的研究。E-mail:echenghai@sina.com

通讯作者:糜漫天,电话:68752292,E-mail:mimt@sina.com

收稿日期:2005-03-11;**修回日期**:2005-05-27

学调查显示长期摄入鱼油对预防肿瘤发生具有一定的保护作用[1]，众多研究表明 ω-3 PUFA 具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡和分化等多种抗瘤功能[2]，还可以明显改善肿瘤恶病质患者的体制，提高肿瘤患者的存活率[3,4]，因此在临床肿瘤治疗中具有一定的应用价值。本研究通过将 ω-3 PUFA 可调控的跨膜型 TNF-α（transmembrane TNF-α，tmTNF-α）真核表达载体导入人乳腺癌 MCF-7 细胞，以 ω-3 PUFA 启动配体依赖的细胞凋亡程序，探讨其对肿瘤细胞凋亡的影响及 caspase 相关机制，为 ω-3 PUFA 在肿瘤防治方面的应用提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　细胞株和质粒　　MCF-7 细胞（人乳腺癌细胞）由中科院上海细胞所提供，常规培养传代。pPPRE-tmTNF-α 真核表达载体由本室构建[5]，稳定转染此表达载体的 MCF-7 细胞命名 MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$，ω-3 脂肪酸可以激活细胞内过氧化物酶体增殖物激活受体（peroxisome proliferator-activated receptors，PPAR），诱导 MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$高效表达外源性 tmTNF-α。

1.1.2　主要试剂　　DMEM/F12 高糖培养液为 Gibco 公司产品；ω-3 PUFA（EPA 和 DHA）为 Sigma 公司产品，处理细胞浓度为 6.0×10^{-5} mol/L；四甲基偶氮唑盐（MTT）为 Sigma 公司产品；Trizol 试剂、M-MuLV 逆转录酶、*Taq* DNA 聚合酶为北京鼎国生物技术发展中心产品；小鼠抗人 caspase-1、8、9 单抗分别为 Santa cruz 公司和 NeoMarker 公司产品，羊抗鼠 S-P 试剂盒为中山公司产品；Ac-IETD-AMC 和 Ac-IETD-CHO 为 ALEXIS 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　MTT 比色法检测细胞增殖能力　　MCF-7 和 MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$细胞以 5×10^4/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板，每孔 200 μl，加入 6.0×10^{-5} mol/L ω-3 PUFA（EPA 或 DHA）培养 1～3 d，收获细胞 4 h 前每孔加入 15 μl MTT（5 mg/ml），继续培养 4 h，弃去培养液，加入 200 μl 异丙醇-二甲基亚砜混合液（1∶1，体积分数）。室温放置 30 min 左右，酶标仪在 492 nm 处测定光密度值[D(492)]。

1.2.2　DNA 梯形带检测　　EPA 或 DHA 处理 2 d 后收获约 10^6 个细胞，PBS 洗涤细胞 2 次，加 150 μl NP-40 裂解液（1% NP-40，20 mmol/L EDTA，50 mmol/L Tris · Cl，pH 7.5）裂解细胞 5 h，离心收集上清，用 150 μl NP-40 细胞裂解液重复抽提沉淀 1 次，上清置于等体积 1% SDS 溶液中，混匀，加入 RNase A（终浓度为 2 μg/ml），56 ℃孵育 2 h，加蛋白酶 K 至终浓度为 2 μg/ml，37 ℃水浴 2 h，加 1/2 体积的 10 mol/L 醋酸铵和 2 倍体积的冰冷无水乙醇，－20 ℃过夜，4 ℃高速离心 30 s，弃上清，75% 冰冷乙醇漂洗沉淀（此时可在－20℃放置较长时间），20 μl TE 缓冲液溶解 DNA，取 3 μl DNA 上样进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3　RT-PCR 检测 caspase mRNA 表达　　细胞经 6.0×10^{-5} mol/L ω-3 PUFA 处理 2 d 后收获，Trizol 试剂按使用说明提取细胞总 RNA，逆转录制成 cDNA。PCR 引物设计为，caspase-1 引物 P1：5′- GAAGAGAAAGCTGTTTATCCG -3′，P2：5′- AATCGAACCTTGCGGAAA -3′，扩增长度为 1 102 bp；caspase-8 引物 P1：5′- GCATTAGGGACAGGAATGGA -3′，P2：5′- TTATTCACAGTG GCCATCCC -3′，扩增长度为 463 bp；caspase-9 引物 P1：5′- CACAAAGCCAAGGGTGTTTT -3′，P2：5′- GAACG-GTCCAGTCTGCATCT -3′，扩增长度为 262 bp；以人微球蛋白（β_2-MG）为内参照，设计引物为 P1：5′-ACCCCCACT-GAAAAAGATGA -3′，P2：5′-ATCTTCAAACCT CCATGATG-3′，扩增片段长度为 127 bp，根据不同引物 Tm 值适当调整退火温度。扩增条件为：94 ℃，5 min→94 ℃，30 s；58～62 ℃，50 s；72 ℃，1 min；30 个循环→72 ℃，10 min。取 5 μl 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4　细胞总蛋白的提取　　6.0×10^{-5} mol/Lω-3 PUFA 处理 2 d 后收获约 10^7 个细胞，100 μl 冰预冷的 NP-40 细胞裂解液（50 mmol/L、pH 8.0、Tris · Cl，150 mmol/L NaCl，25 mmol/L NaF，5 mmol/L $Na_4P_2O_7$，0.1% SDS，1 mmol/L PMSF，10 μg/ml Aprotinin，10 μg/ml Leupeptin，1% NP-40）冰上静置裂解 30 min，4 ℃、12 000 × g 离心 15 min，收集上清，Lowry 法测定蛋白含量。

1.2.5　caspase 蛋白表达的检测　　取 20 μg 蛋白，用细胞裂解液稀释至 20 μl，加 20 μl 2 × SDS 凝胶加样缓冲液，煮沸 5～10 min，10% SDS-PAGE，电转移至 PVDF 膜，1% BSA 封闭，小鼠抗人 caspase 单抗（参考说明书适当稀释）37 ℃孵育 1 h，再与羊抗鼠 S-P 试剂盒反应，DAB 显色。

1.2.6　caspase-8 酶活性检测　　参考文献[6]的方法。细胞处理 2 d 后收获，提取活性蛋白，取 100 μl 蛋白提取液与 20 μmol/L Ac-IETD-AMC 37 ℃避光孵育 30～60 min，紫外分光光度计在狭缝 2、激发光 380 nm、发射光 460 nm 条件下，测量荧光值。

1.2.7　caspase 抑制剂对细胞的影响　　加 20 μmol/L caspase-3、8 抑制剂 Ac-IETD-CHO（临用时用 DMSO 配成 10 mmol/L）于细胞培养液中，观察 Ac-IETD-CHO 对转染细胞增殖能力（MTT 比色法）、caspase-8 活性和细胞凋亡（DNA 梯形带检测）的影响。

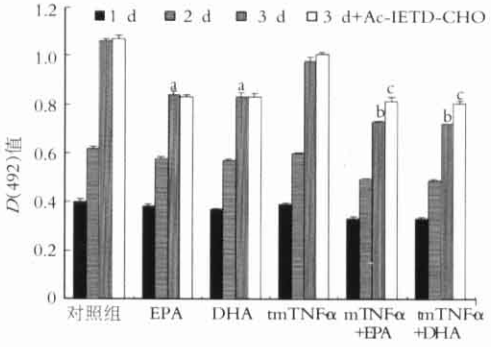
1.3　统计学处理

实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　ω-3 PUFA 对 pPPRE-tmTNF-α 转染细胞增殖能力的影响

MTT 比色实验结果显示，MCF-7 细胞经 6.0×10^{-5} mol/Lω-3 PUFA（EPA 或 DHA）处理 1～3 d 后，D(492) 明显降低（$P<0.05$），而转染细胞经 ω-3 PUFA 处理后增殖抑制作用更为显著（$P<0.01$），其第 3 天 D(492) 分别降低 31.5% 和 32.4%（图 1）。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较; c: $P<0.05$, 与 3 d 比较

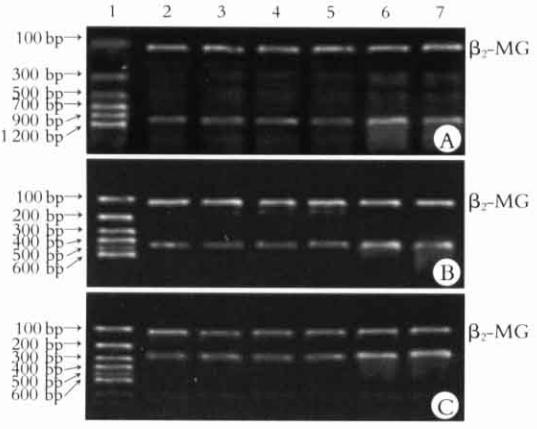
图1 ω-3 PUFA 对 MCF-7 和 MCF-7 $^{tmTNF-\alpha}$细胞增殖功能的影响

2.2 ω-3 PUFA 对 pPPRE-tmTNF-α 转染细胞凋亡的影响

MCF-7 细胞经 ω-3 PUFA 处理后未见明显的 DNA 梯形带，MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$细胞已经可以检测到 DNA 梯形带生成，经 ω-3 PUFA 处理后，梯形带更加明显。

2.3 ω-3 PUFA 对转染细胞 caspase 表达的影响

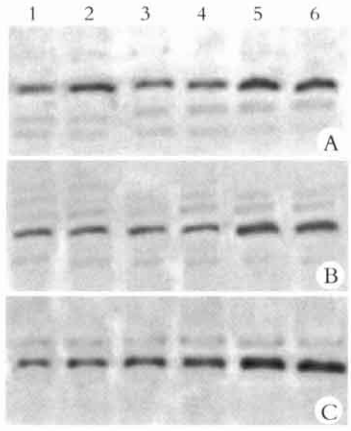
RT-PCR 分析结果显示，转染和未转染 pPPRE-tmTNF-α 的肿瘤细胞表达低水平的 caspase-1、caspase-8 和 caspase-9 mRNA，之间未见明显差异。经 ω-3 PUFA 处理后的 MCF-7 细胞 caspase mRNA 的也未见明显改变，但是转染细胞经 ω-3 PUFA 处理后 caspase mRNA 表达增加(图 2)。与 caspase mRNA 变化趋势相似，Western blotting 分析结果显示，转染有 pPPRE-tmTNF-α 的 MCF-7 细胞经 ω-3 PUFA 处理后 caspase1、8、9 蛋白表达增加(图 3)。



A: caspase-1; B: caspase-8; C: caspase-9

1: 标准; 2: MCF-7; 3: MCF-7 + EPA; 4: MCF-7 + DHA; 5: MCF-7^{tmTNF}; 6: MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ + EPA; 7: MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ + DHA

图2 ω-3 PUFA 对 MCF-7 和 MCF-7 $^{tmTNF-\alpha}$细胞 caspase mRNA 表达的影响



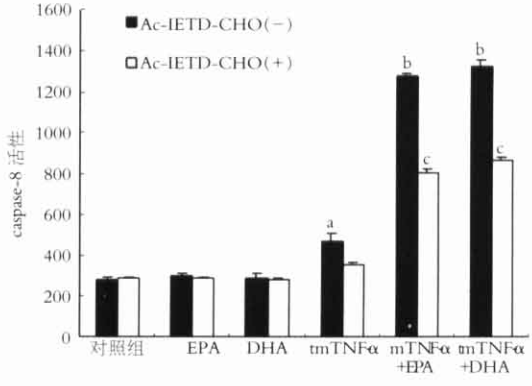
A: caspase-1; B: caspase-8; C: caspase-9

1: MCF-7; 2: MCF-7 + EPA; 3: MCF-7 + DHA; 4: MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$; 5: MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ + EPA; 6: MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ + DHA

图3 ω-3 PUFA 对 MCF-7 和 MCF-7 $^{tmTNF-\alpha}$细胞 caspase 蛋白表达的影响

2.4 ω-3 PUFA 对肿瘤细胞 caspase-8 酶活性的影响

以特异性荧光底物 Ac-IETD-AMC 分析 caspase-8 活性(以平均荧光强度表示)，结果表明，ω-3 PUFA 对 MCF-7 细胞的 caspase 活性未见明显影响，转染细胞 caspase-8 活性高于未转染细胞($P<0.05$)，经 ω-3 PUFA(EPA 或 DHA)处理后 caspase-8 活性均显著增高($P<0.01$)(图 4)。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组相比; c: $P<0.05$, 与 Ac-IETD-CHO(−)相比

图4 ω-3 PUFA 对 MCF-7 和 MCF-7 $^{tmTNF-\alpha}$细胞 caspase-8 活性的影响

2.5 caspase 抑制剂对细胞的影响

Ac-IETD-CHO 是 caspase-3 和 caspase-8 的特异性人工抑制剂，与 ω-3 PUFA 共处理肿瘤细胞后发现 MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ 细胞 caspase-8 活性明显低于 ω-3 PUFA 单处理组($P<0.05$)(图 4)，DNA 梯形带生成减弱，并可以部分拮抗 ω-3 PUFA 对 MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$细胞的增殖抑制作用($P<0.05$)。

3　讨论

诱导细胞凋亡一直以来是抗肿瘤研究的重点之一，目前认为半胱氨酸蛋白酶（caspase）家族是细胞凋亡过程中起中心作用的一类蛋白水解酶[7]。它们以酶原的形式存在，一旦被凋亡信号激活，就能通过从天冬氨酸残基处特异地水解某些蛋白而协同地引起细胞凋亡。根据 caspase 的作用的不同将它们大致分为三大类[8]：凋亡启动者（initiator）、凋亡执行者（executioner）和细胞因子加工者（cytokine processor）。凋亡启动性 caspase（2、8、9、10）有长原结构域（long prodomain），在短原结构域的凋亡执行性 caspase（3、6、7）的上游发挥作用，其中 caspase-8 主要在以 TNF-α 受体（TNF receptor，TNFR）为代表的死亡受体（death receptor，DR）介导的细胞凋亡过程中被激活，而 caspase-9 可以在细胞线粒体释放的细胞色素 C 介导下，与凋亡蛋白酶激活因子-1（Apoptotic protease activating factor-1，APAF-1）结合而激活，继而启动 caspase 依赖的细胞凋亡过程。研究表明 ω-3 脂肪酸可以通过线粒体途径和/或 caspase 途径诱导多种肿瘤细胞凋亡[9]，但对 MCF-7 细胞少见相关报道。肿瘤坏死因子受体（TNFR）是启动 caspase 凋亡信号的主要受体之一，通过与三聚化的配体结合而激活。活化的 TNFR Ⅰ通过聚集的胞内区死亡结构域（death domain，DD）结构域招募下游的肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域蛋白（TNF receptor-associated death domain protein，TRADD），TRADD 可以通过其 C 端 DD 域与 Fas 相关死亡结构域蛋白（Fas-associated death domain protein，FADD）结合，由此活化的受体通过 FADD 募集 FLICE/MACH/caspase-8 蛋白，启动 caspase 级联活化反应促进细胞凋亡，而 tmTNF-α 与 TNFR Ⅰ结合后具有更强的致凋亡能力[10]。

本研究以 caspase-3 基因缺失的 MCF-7 细胞为研究对象，通过转染带有过氧化物酶体增殖物反应元件（peroxisome proliferator responsive element，PPRE）调控序列的 tmTNF-α 表达载体[5]，使转染此载体的 MCF-7 细胞在 ω-3 脂肪酸诱导下高效定位表达 tmTNF-α。结果表明，经 ω-3 PUFA 处理的 MCF-7 细胞未观察到 caspase 表达显著性变化，与此相比，MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ 细胞 caspase 表达未见明显变化，但 caspase-8 活性增强，并可以诱导凋亡的发生，抑制细胞增殖。已知在 caspase 级联调控网络中 caspase-3 仅是 1 条分支，MCF-7 细胞缺失的 caspase-3 可由其他分子替代，这提示死亡受体介导的 caspase 途径可能在 tmTNF-α 诱导肿瘤细胞凋亡过程中发挥重要作用。与未转染 pPPRE-tmTNF-α 的肿瘤细胞相比，经 ω-3 PUFA 处理的转染细胞 caspase 表达显著增加，caspase-8 活性显著增强，细胞凋亡效应更为明显，同时细胞增殖能力进一步减弱，而 caspase 特异性抑制剂可以部分抑拮抗细胞凋亡的发生。这些结果提示 ω-3 PUFA 及其诱导的外源性 tmTNF-α 可以通过上调细胞内 caspase 表达和/或活性，诱导细胞凋亡，更为有效的抑制肿瘤细胞增殖，并可能存在一定的协同作用，但其具体机制仍有待于进一步研究。

参考文献：

[1] GOGOS C A, GINOPOULOS P, SALSA B, *et al*. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy: a randomized control trial[J]. Cancer, 1998, 82(2): 395 - 402.

[2] 承　海，糜漫天. n-3 脂肪酸对肿瘤细胞凋亡的影响及作用机制[J]. 国外医学：卫生学分册, 2003, 30(4): 212 - 216.

[3] BARBER M D, ROSS J A, VOSS A C, *et al*. The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer[J]. Br J Cancer, 1999, 81(1): 80 - 86.

[4] SIDDIQUI R A, SHAIKH S R, SECH L A, *et al*. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action[J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4(8): 859 - 871.

[5] 承　海，糜漫天，张乾勇，等. n-3 PUFA 依赖的跨膜型肿瘤坏死因子-α 真核表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(1): 28 - 30.

[6] REINERS J J Jr., CLIFT R E. Aryl hydrocarbon receptor regulation of ceramide-induced apoptosis in murine hepatoma 1c1c7 cells. A function independent of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator[J]. J Biol Chem, 1999, 274(4): 2502 - 2510.

[7] YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, *et al*. The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme[J]. Cell, 1993, 75(4): 641 - 652.

[8] PHILCHENKOV A. Caspases: potential targets for regulating cell death[J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(4): 432 - 444.

[9] ARITA K, KOBUCHI H, UTSUMI T, *et al*. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 62(7): 821 - 828.

[10] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社, 2001: 671 - 674.

（编辑　周　芳）