论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0396-03

ω-3 多不饱和脂肪酸抑制人前列腺癌细胞黏附和侵袭的体外实验研究

易 龙,张乾勇,糜漫天,韦 娜,郎海滨 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察两种 ω-3 多不饱和脂肪酸(ω-3 polyunsaturated fatty acid, ω-3 PUFA)二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)对高转移性人前列腺癌细胞 PC-3 体外黏附和侵袭能力的影响,并探讨其相关分子机制。**方法** MTT 法观察 EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞增殖的影响;以体外黏附和侵袭实验观察 EPA 和 DHA 对肿瘤细胞黏附和侵袭能力的影响;RT-PCR 法观察 EPA 和 DHA 对与细胞骨架相关的 RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42 基因 mRNA 表达的影响。**结果** EPA 及 DHA 均能抑制 PC-3 细胞的增殖,并呈剂量效应关系;PC-3 细胞以 60 μmol/L EPA 和 DHA 分别处理后,体外黏附和侵袭能力均降低,在 matrigel 基质胶上黏附 30、60、90 min 和 120 min 的黏附率均低于对照组($P<0.05$,$P<0.01$),侵袭 18 h 后的抑制率分别为(35.65±7.76)% 和(41.32±5.86)%($P<0.01$),RhoA、Rac2 和 Cdc42 基因 mRNA 表达均不同程度下降。**结论** ω-3 PUFA 可能通过下调 Rho GTP 酶 mRNA 的表达,抑制 PC-3 细胞体外黏附和侵袭能力。

关键词:PC-3 细胞;黏附;侵袭;ω-3 多不饱和脂肪酸;转移

中图法分类号:R73-37;R737.25;R977.6 **文献标识码**:A

Effects of ω-3 polyunsaturated fatty acid on adhesion and invasion of human prostate cancer PC-3 cells *in vitro*

YI Long, ZHANG Qian-yong, MI Man-tian, WEI-Na, LANG Hai-bin (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of 2 kinds of ω-3 polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), on the adhesion and invasion of PC-3, a high metastatic human prostate tumor cell line, and explore the possible mechanism. **Methods** MTT assay was used to determine the effects of EPA or DHA on the proliferation of PC-3 cells. Adhesion assay and invasion assay were used to observe the anti-adhesion and anti-invasion effects of EPA or DHA on PC-3 cells, respectively. RT-PCR analysis was conducted to detect the expression of RhoA, Rac1, Rac2 and Cdc42 mRNAs. **Results** Both EPA and DHA inhibited the growth of PC-3 cells in a dose-dependent manner. After treated with EPA or DHA of 60 μmol/L, the adhesion and invasion abilities of the cells were decreased. The adhesion rate were lesser than that of the control when adhered for 30, 60, 90 and 120 min on matrigel, and the invasion inhibitory rate were (35.65±7.76)% in EPA treated group and (41.32±5.86)% in DHA treated group ($P<0.01$). The expressions of RhoA, Rac2 and Cdc42 in PC-3 cells were all decreased in compare with those of the control. **Conclusion** These results suggest that ω-3 PUFA can inhibit the adhesion and invasion of PC-3 cells by down-regulating the expression of the Rho GTPase.

Key words: PC-3 cells; adhesion; invasion; ω-3 polyunsaturated fatty acid; metastasis

膳食中的 ω-3 多不饱和脂肪酸(ω-3 Polyunsaturated fatty acid, ω-3 PUFA)是一类具有多种生物学功能的重要营养素,主要包括二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)。实验研究表明,ω-3 PUFA 能够抑制乳腺癌、前列腺癌、直肠癌等多种肿瘤的增殖,诱导细胞凋亡[1]。近年来也发现 ω-3 PUFA 对多种肿瘤的转移有抑制作用,其分子机制还不十分明确。肿瘤转移是一个复杂的过程,本实验选用高转移性的人前列腺癌细胞株 PC-3 为研究对象,旨在从黏附和侵袭两方面探讨 EPA 和 DHA 对肿瘤转移的抑制作用,揭示 ω-3 PUFA 抗肿瘤转移的可能分子机制,为 ω-3 PUFA 应用于肿

基金项目:国家自然科学基金(30471465)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471465)

作者简介:易 龙(1981-),男,四川省隆昌县人,硕士研究生,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291

通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期:2006-10-30;**修回日期**:2006-11-17

瘤临床治疗提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　化学试剂　　EPA 和 DHA 均为美国 Sigma 公司产品。人工重构基底膜(Matrigel)购自美国 BD 公司。纤维连接蛋白(fibronetin)购自 Roche 公司。EPA 和 DHA 以无水乙醇配置成浓度 5×10^5 μmol/L 的贮存液，-70 ℃避光保存。

1.1.2　细胞株　　人前列腺癌细胞株 PC-3 和小鼠成纤维细胞株 NIH3T3 购自中国生命科学院上海细胞库，用 RPMI1640(含 10% 胎牛血清)培养基在 37 ℃、100% 饱和湿度、5% CO_2 条件下培养。

1.2　方法

1.2.1　MTT 法分析 EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞的增殖作用

PC-3 细胞以 4×10^4/ml 接种于 96 孔板，24 h后分别加入含不同浓度 EPA 和 DHA 的培养基，每孔 200 μl，并设溶剂对照组，加入等体积无水乙醇，每组设 4 个平行孔。继续培养 48 h，每孔加入 MTT(5 mg/ml)试剂 20 μl，37 ℃孵育 4 h，弃去培养液，每孔加 DMSO 150 μl 溶解结晶颗粒，在 490 nm 处测定吸光度值[D(490)]。增殖抑制率(%) = [对照组 D(490) - 实验组 D(490)]/对照组 D(490) ×100 %。

1.2.2　细胞黏附实验　　参照文献[2]所用方法。用2 mg/ml 的 Matrigel 按每孔 50 μl 包被 96 孔培养板，37 ℃孵育 2 h，2 mg/ml 的 BSA 37 ℃封闭 30 min。取 60 μmol/L EPA 及 DHA 分别作用 48 h 及对照组 PC-3 细胞，调整细胞密度为 1×10^5/ml，以每孔 100 μl 接种至处理后的 96 孔板中，每组设 5 个平行孔。37 ℃培养 30、60、90、120 min 后，每孔加 150 μl PBS 轻柔冲洗两遍以去除未黏附的细胞，再加入 MTT(1 mg/ml)试剂每孔 50 μl，37 ℃孵育 3 h，每孔加入 DMSO 150 μl 溶解结晶颗粒，在 490 nm 处测定吸光度值。细胞黏附率 = [实验组 D(490)/对照组 D(490)] ×100%。

1.2.3　细胞侵袭实验　　采用 Millicell 小室法，参照文献[3]进行。①NIH3T3 细胞条件培养液的制备：NIH3T3 细胞 90% 融合时，换无血清 1640 培养液继续培养 24 h 后收集培养液，过滤除菌，-70℃保存备用。②Millicell 小室的包被：在置有聚碳酸滤膜(12 μm 孔径)的 Millicell 小室的外表面均匀铺5 μg fibronectin(20 μl)，干燥后再于膜的内表面均匀铺 150 μg Matrigel(50 μl)，4 ℃风干。③接种细胞：取 60 μmol/L EPA 及 DHA 作用 48 h 及对照组 PC-3 细胞消化、离心后，调整浓度为 1×10^6/ml，于每个 Millicell 上室内加入 100 μl，并放入含 500 μl 条件培养液的 24 孔板内，置 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养，每组作 3 个平行样。④固定，染色和镜检：培养 18 h 后，用棉签仔细擦掉 Millicell 小室内表面未穿过膜的细胞，4% 多聚甲醛固定，瑞氏染液染色，400 × 倒置显微镜下计数移至微孔膜下层的细胞，每膜计数 5 个视野，计算平均值。侵袭抑制率(%) = [(对照组侵袭穿膜细胞数 - 实验组侵袭穿膜细胞数)/对照组侵袭穿膜细胞数] ×100%。

1.2.4　RT-PCR 检测 mRNA 的表达　　收集各组 PC-3 细胞，用 Trizol 试剂提取总 RNA 并计算其浓度，按说明书进行逆转录反应，产物 -20 ℃保存。引物参照文献[4]合成，引物序列及退火温度见表 1。PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳，Bio-Rad 凝胶图像分析仪扫描各条带，软件 Quantity One 对条带进行灰度值分析，以目的条带与内参照条带的灰度比值代表目的基因 mRNA 的表达水平。

表 1　RT-PCR 反应引物序列及退火温度

基因	引物序列	退火温度(℃)	循环次数	产物长度(bp)
RhoA	5′-CATCCGGAAGAAACTGGT-3′ 5′-TCCCACAAAGCCAACTC-3′	57.5	35	168
Rac1	5′-AGACGGAGCTGTAGGTAAAA-3′ 5′-ATGCAGGACTCACAAGGGA-3′	59.5	35	236
Rac2	5′-CAGCCTCTTATGAGAACGTC-3′ 5′-CGAACACGGTTTTCAGGC-3′	57.5	35	249
Cdc42	5′-CGATGGTGCTGTTGGT-3′ 5′-CCAACAAGCAAGAAAGGA-3′	57.8	35	312
GAPDH	5′-AGCCACATCGCTCAGACAC -3′ 5′-CCATCACGCCACAGTTTCC-3′	57.5	35	616

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用

MTT 实验结果表明，EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞增殖均有抑制作用，并呈剂量效应关系(图 1)。

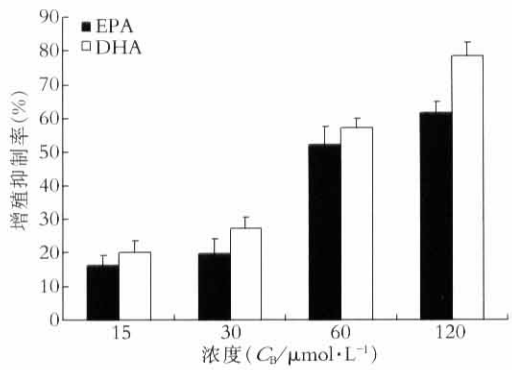


图 1　EPA 及 DHA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用(n =4)

2.2　EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞黏附能力的影响

如表 2 所示，60 μmol/L EPA 和 DHA 分别作用于 PC-3 细胞 48 h，与各时相点对照组比较，PC-3 细胞在 Matrigel 人工重构基底膜上的黏附能力明显下降，并且这种黏附抑制随时间延长更为明显，表明 EPA 和 DHA 能够抑制 PC-3 细胞的体外黏附能力。

表 2　EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞体外黏附率的影响[n =5，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	黏附时间			
	30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	22.21 ±3.01	33.93 ±2.56	65.53 ±5.94	75.26 ±4.48
EPA	18.23 ±3.73	26.36 ±1.60[b]	39.59 ±4.93[b]	56.16 ±4.62[b]
DHA	16.21 ±3.55[a]	22.09 ±2.08[b]	35.49 ±4.52[b]	46.49 ±4.65[b]

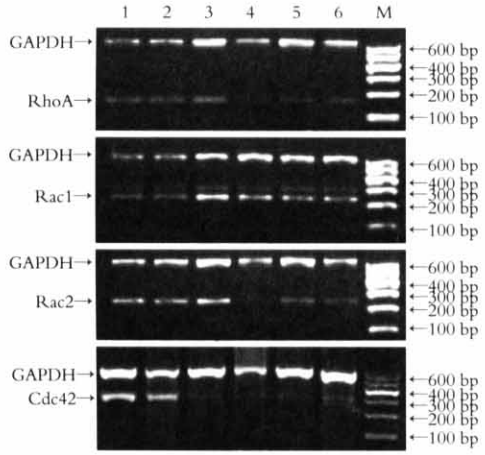
a：P <0.05，b：P <0.01，与对照组比较

2.3 EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞侵袭能力的影响

60 μmol/L EPA 和 DHA 分别作用于 PC-3 细胞 48 h，PC-3 细胞在 Matrigel 人工重构基底膜上侵袭 18 h 的穿膜细胞数明显低于对照组（$P<0.01$），侵袭抑制率分别为（35.65 ± 7.76）%和（41.32 ± 5.86）%，表明 EPA 及 DHA 能显著抑制 PC-3 细胞的体外侵袭能力。

2.4 EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞 RhoA、Rac1、Rac2、Cdc42 基因 mRNA 表达的影响

半定量分析结果显示，60 μmol/L EPA 作用于 PC-3 细胞 24 h 和 48 h，RhoA 和 Rac2 基因 mRNA 的表达均明显低于对照组（$P<0.01$），Cdc42 基因 mRNA 于作用 48 h 表达低于对照组（$P<0.05$）。60 μmol/L DHA 作用于 PC-3 细胞 24 h 和 48 h，Cdc42 基因 mRNA 表达低于对照组（$P<0.05$），RhoA 和 Rac2 基因 mRNA 于作用 24 h 表达均低于对照组（$P<0.05$），作用 48 h 明显低于对照组（$P<0.01$）（图 2）。



1：对照组 48 h；2：对照组 24 h；3：DHA 24 h；4：DHA 48 h；5：EPA 48 h；6：EPA 24 h；M：标准

图 2 EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞 RhoA、Rac1、Rac2、Cdc42 基因 mRNA 表达的影响

3 讨论

近年来发现，膳食中摄入 EPA 和 DHA 等 ω-3 PUFA 不仅对肿瘤的增殖有抑制作用，而且较低浓度的 EPA 和 DHA 就能抑制乳腺癌、肾细胞癌等多种肿瘤细胞的迁移[5,6]。本实验选择高转移性的 PC-3 前列腺癌细胞株为实验对象，体外模拟其黏附和侵袭的过程，观察 EPA 和 DHA 对肿瘤细胞黏附和侵袭的抑制作用，结果表明，60 μmol/L EPA 和 DHA 处理后的 PC-3 细胞，体外黏附和侵袭能力均不同程度的下降，提示 EPA 和 DHA 对肿瘤的转移有抑制作用。

近年来研究表明，肿瘤的黏附、侵袭和迁移过程与细胞骨架的重要调节子 Rho GTP 酶密切相关[7]。Rho GTP 酶在多种肿瘤细胞中高表达，发挥“分子开关（molecular switch）”的作用，通过多条信号转导通路调控细胞骨架的重组，调节肿瘤的细胞的侵袭和迁移。目前已发现 Rho GTP 酶超家族包括约 20 个成员，根据结构和功能的不同，大致分为 Rho、Rac、Cdc42、Rnd 和 Rho BTB 5 个亚家族，其中，Rho、Rac 和 Cdc42 是研究较多的成员。Rac 和 Cdc42 可分别诱导肿瘤细胞膜突起形成层状伪足（lamellipodia）和丝状伪足（filopodia），有助于细胞与胞外基质的黏附[8]。RhoA 可调节肌动蛋白细胞骨架的组装和肌动-肌球蛋白的收缩，诱导细胞的侵袭和迁移[9]。本实验对 Rho GTP 酶中研究较多的 RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42 基因 mRNA 表达的检测结果显示，经 EPA 和 DHA 处理后的 PC-3 细胞，RhoA、Rac2 和 Cdc42 基因 mRNA 的表达下调。在肿瘤侵袭和转移过程中，Rho GTP 酶表达常常升高，通过阻断 Rho 信号通路，肿瘤细胞体外黏附和侵袭能力均显著下降[7,10]。综上所述，本实验结果显示 EPA 和 DHA 两种 ω-3 PUFA 能够抑制 PC-3 细胞体外黏附和侵袭能力，推测 ω-3 PUFA 可能通过下调 Rho GTP 酶基因 mRNA 的表达，抑制其对细胞骨架的重组的调控，从而抑制肿瘤细胞的黏附和侵袭。

参考文献：

[1] Rose D P, Connolly J M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents[J]. Pharmacol Ther, 1999, 83(3): 217 - 244.

[2] 朱 峰，刘新光，梁念慈. 大黄素、芹菜素抑制人卵巢癌细胞侵袭的体外实验研究[J]. 癌症，2003，22(4)：358 - 362.

[3] Attiga F A, Fernandez P M, Weeraratna A T, *et al*. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases [J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4629 - 4637.

[4] Pan Y, Bi F, Liu N, *et al*. Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(3): 686 - 691.

[5] Mccabe A J, Wallace J M, Gilmore W S, *et al*. Docosahexaenoic acid reduces *in vitro* invasion of renal cell carcinoma by elevated levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1[J]. J Nutr Biochem, 2005, 16(1): 17 - 22.

[6] Senzaki H, Iwamoto S, Ogura E, *et al*. Dietary effects of fatty acids on growth and metastasis of KPL-1 human breast cancer cells *in vivo* and *in vitro*[J]. Anticancer Res, 1998, 18(3A): 1621 - 1627.

[7] Faried A, Faried L S, Kimura H, *et al*. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(10): 1455 - 1465.

[8] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. Science, 1998, 279(5350): 509 - 514.

[9] Yoshioka K, Nakamori S, Itoh K. Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(8): 2004 - 2010.

[10] Wang D S, Dou K F, Li K Z, *et al*. Enhancement of migration and invasion of hepatoma cells *via* a Rho GTPase signaling pathway[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2): 299 - 302.

（编辑 薛国文）