文章编号:1000-5404(2008)03-0195-04

论著

n-6/n-3 多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞胰岛素样生长因子受体表达的影响

顾艳艳,韦 娜,张乾勇,王 斌,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,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 n-6/n-3 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFA)不同比例对乳腺癌细胞株 MCF-7(ER^+)及 MDA-MB-231(ER^-)胰岛素样生长因子受体-1(insulin-like growth factor receptor -1, IGF-1R)表达的影响。**方法** 用不同比例的 n-6/n-3 PUFA(1~10)处理细胞,MTT 法检测细胞增殖能力变化;RT-PCR 检测细胞 IGF-1R mRNA 表达变化;Western blot 检测 IGF-1R 蛋白在细胞膜的表达变化。**结果** 单纯 n-6 PUFA 和 10:1 n-6/n-3 PUFA 能够明显促进 MCF-7细胞和 MDA-MB-231 细胞增殖,诱导细胞 IGF-1R mRNA 及蛋白表达上调($P<0.01$);单纯 n-3 PUFA 和 1:1 n-6/n-3 PUFA 则显著抑制细胞增殖,并降低细胞 IGF-1R mRNA 及蛋白表达水平($P<0.01$);但 5:1 n-6/n-3 PUFA 效果不明显($P>0.05$)。**结论** 不同 n-6/n-3 PUFA 构成能差异性调节乳腺癌细胞 IGF-1R 表达,其中单纯 n-3 PUFA 和 1:1 n-6/n-3 PUFA 能明显降低其表达并抑制乳腺癌细胞增殖。

关键词: n-6/n-3 PUFA;乳腺癌细胞;胰岛素生长因子受体-1
中图法分类号: R151.2;R730.23;R737.9 **文献标识码:** A

Effects of different n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on insulin-like growth factor receptor-1 expression in human breast cancer cells

GU Yan-yan, WEI Na, ZHANG Qian-yong, WANG Bin, MI Man-tian (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of different n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) ratio on the expression of insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-1R) in breast cancer cells. **Methods** MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with n-6 PUFA, or n-3 PUFA, or the mixture of n-6/n-3 PUFA at ratio of 1:1, 5:1, 10:1. The cell proliferation capacity was detected by MTT, and the expressions of IGF-1R mRNA and protein were assayed by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** n-6 PUFA and 10:1 n-6/n-3 PUFA obviously promoted cell proliferation and up-regulated the expression of IGF-1R mRNA and protein. n-3 PUFA and 1:1 n-6/n-3 PUFA greatly repressed cell proliferation and down-regulated IGF-1R mRNA and protein expression. However, 5:1 n-6/n-3 PUFA had no obvious influence both on the cell growth and IGF-1R expression. **Conclusion** n-6/n-3 PUFA of different ratio has diverse effects on IGF-1R gene expression in breast cancer cells. n-3 PUFA and 1:1 n-6/n-3 PUFA significantly inhibit the proliferation and IGF-1R gene expression.

Key words: n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio; breast cancer cell lines; insulin-like growth factor receptor-1

乳腺癌是与膳食脂肪关系极为密切的一类肿瘤。大量研究证实,不同脂肪酸特别是多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)对于乳腺癌的发生、发展具有不同影响,其中 n-6 PUFA 能够促进乳腺癌的发生、发展,n-3 PUFA 则具有抑制作用[1]。进一步的研究显示,脂肪组织中 n-6/n-3 PUFA 的比例而非这些脂肪酸的单一浓度,与乳腺癌的发病更为密切[2]。胰岛素样生长因子受体-1(insulin-like growth factor receptor-1, IGF-1R)作为酪氨酸激酶受体家族成员之一,在乳腺癌的发生、发展中起重要的调控作用[3]。本研究以不同比例的 n-6/n-3 PUFA 分别作用于雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性(ER^+)和阴性(ER^-)乳腺癌细胞株,观察 n-6/n-3 PUFA 不同比例对乳腺癌细胞增殖及 IGF-1R 表达的影响,以探讨何种 n-6/n-3 PUFA 构成具有较好的抗肿瘤效应。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞系 MCF-7(ER^+)和 MDA-MB-231(ER^-)由

基金项目:国家自然科学基金(30500408)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500408)
作者简介:顾艳艳,女,江苏省盐城市人,硕士研究生,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68772799,E-mail:gyy_gxy@163.com
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt@sina.com
收稿日期:2007-07-17 修回日期:2007-09-18

中国科学院上海细胞所提供。细胞在含10%热灭活小牛血清的DMEM/F12高糖培养基中常规传代培养。

1.2 主要试剂及实验分组

亚油酸(LA,n-6 PUFA)和二十碳五烯酸(EPA,n-3 PUFA)购自Sigma公司,溶于无水乙醇,终浓度为0.5 mol/L,分装充氮后-80 ℃保存。每次均使用未开启的储备液,以保证脂肪酸效应。实验设计分为对照组(阴性对照)、单纯n-6 PUFA组、单纯n-3 PUFA组、1∶1 n-6/n-3 PUFA组、5∶1 n-6/n-3 PUFA组、10∶1 n-6/n-3 PUFA组,共6组。n-6和n-3 PUFA处理细胞剂量参照预实验结果,单独使用时剂量均为1.5×10^{-4} mol/L。Tripure™分离试剂、RT-PCR试剂购自Promega公司。RT-PCR引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 MTT检测细胞增殖状况

MCF-7和MDA-MB-231细胞以5×10^{4} ml^{-1}的细胞数接种于96孔培养板,每孔200 μl,加入处理因素培养12~48 h,收获细胞前4 h,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二甲基亚砜。室温放置30 min,用酶标仪在490 nm测定吸光度值[D(490)]。

1.4 RT-PCR检测IGF-1R mRNA的表达

1.4.1 总RNA的提取 将MCF-7和MDA-MB-231细胞处理48 h后,用1 ml Tripure™分离试剂提取细胞总RNA,详细步骤参见试剂盒说明书。以紫外分光光度计检测RNA含量及D(260)/D(280)值,并保存于-80 ℃备用。

1.4.2 逆转录 取3 μg总RNA,65 ℃孵育5 min后加入RNA酶抑制剂、dNTP、Oligod(T)$_{15}$及逆转录酶,反应体积为20 μl,37 ℃、1 h进行逆转录,70 ℃、10 min灭活逆转录酶。

1.4.3 PCR扩增 根据GenBank设计的引物序列,IGF-1R上游:5′-TAGCAACAGAGCACTTGAGAACCA-3′,下游:5′-TTGGCAAAATTAGGCAGCGTTA-3′,长度328 bp,退火温度57.5 ℃;GAPDH上游:5′-TGGCTACAGCAACAGGGTG-3′;下游:5′-ATGGCAACTGTGAGGAGGG-3′,长度176 bp,退火温度58.0 ℃。反应总体积50 μl,加入模板DNA 0.75 μg,扩增片段上游和下游引物终浓度为0.3 μmol/L,待95℃变性5 min后,加入5.0 U *Taq* DNA聚合酶,共40个循环。取4 μl扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad成像分析仪观察并照相。

1.5 Western blot检测IGF-1R蛋白表达

1.5.1 细胞膜蛋白的提取 将MCF-7和MDA-MB-231细胞处理48 h后,用细胞刮棒刮取细胞,离心沉淀细胞后,用冰的PBS洗涤2次,向沉淀的细胞中缓慢添加1 ml低渗溶液(0.2 mmol/L EDTA与1 mmol/L KH_2PO_4等体积混合),反复冻融细胞6次,以破细胞膜,4 ℃、2 000×g离心10 min,去掉沉淀的细胞核,收集的上清4 ℃、20 000×g离心45 min去掉沉淀的细胞器,收集上清,并在4 ℃、25 000×g高速离心2 h后收集底层细胞膜,并保存于-80 ℃备用。

1.5.2 上样与电泳 用Lowy法测蛋白含量后,取各组蛋白16 μl(含蛋白量50 μg),加4 μl 5×SDS上样缓冲液,混匀后放置100 ℃沸水中煮沸5 min,上样。20 mA恒流电泳约40 min,至溴酚蓝距离底线1 cm左右。

1.5.3 电转移 电泳后取下凝胶,切去积层胶和含溴酚蓝部分,制"三明治"夹心,放入盛有转移缓冲液的转移槽,用70 V转移4 h。

1.5.4 免疫印迹与DAB显色 将含1%牛血清蛋白(BSA)的TBST于37 ℃振摇封闭1 h,应用IGF-1R抗体,生物素化二抗及辣根过氧化物酶(HRP)标记的链酶卵白素三抗孵育后DAB显色。

1.5.5 Bio-Rad成像分析系统扫描及分析 PCR和Western blot的特异条带以相对吸光度(intensity)×面积(mm^2)表示,用各组校正吸光度与GAPDH校正吸光度的比值表示其表达强弱。

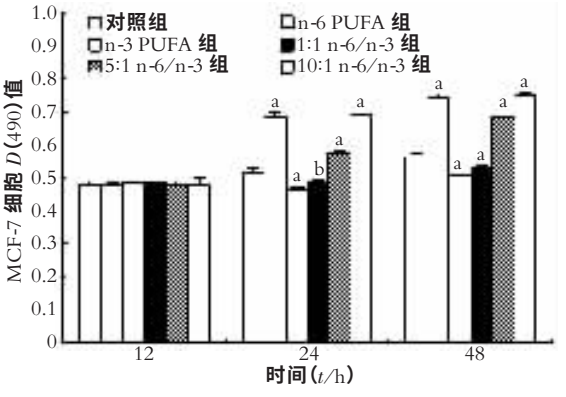
1.6 统计学处理

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

2 结果

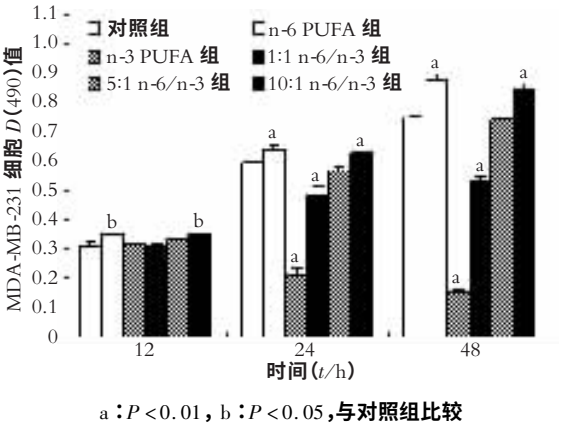
2.1 n-6/n-3 PUFA不同比例对MCF-7、MDA-MB-231乳腺癌细胞增殖能力的影响

n-6/n-3 PUFA不同比例处理两种细胞12 h,未见明显效应。但作用于MCF-7细胞24~48 h后,与对照组比较,单纯n-6 PUFA、5∶1 n-6/n-3 PUFA和10∶1 n-6/n-3 PUFA有明显的促细胞增殖作用($P<0.01$),而单纯n-3 PUFA和1∶1 n-6/n-3 PUFA则显著抑制MCF-7细胞的生长($P<0.01$)。MDA-MB-231细胞经n-6/n-3 PUFA不同比例处理24~48 h后具有与MCF-7细胞相同趋势,但5∶1 n-6/n-3 PUFA组与对照组比较,则差异不显著($P>0.05$),见图1、2。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

图1 n-6/n-3 PUFA不同比例对MCF-7细胞增殖能力的影响

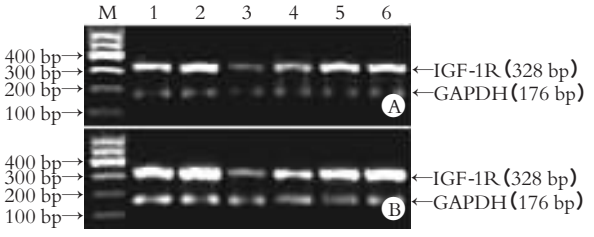


a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

图2 n-6/n-3 PUFA不同比例对MDA-MB-231细胞增殖能力的影响

2.2　n-6/n-3 PUFA 不同比例对 ER^+ 和 ER^- 乳腺癌细胞 IGF-1R mRNA 表达的影响

n-6/n-3 PUFA 不同比例处理 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 48 h，与对照组比较，单纯 n-6 PUFA 和 10∶1 n-6/n-3 PUFA 能明显促进 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 IGF-1R mRNA 表达（$P<0.01$）。单纯 n-3 PUFA 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 显著降低 IGF-1R mRNA 表达（$P<0.01$）。而 5∶1 n-6/n-3 PUFA 组 IGF-1R 的 mRNA 表达无明显影响（$P>0.05$）。见图 3。



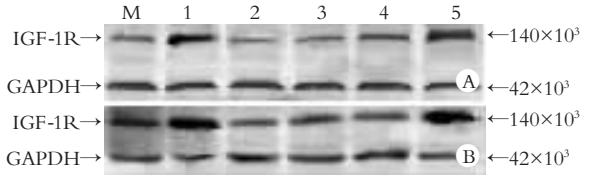
A∶MCF-7 细胞；B∶MDA-MB-231 细胞

M∶PCR 标准；1∶对照组；2∶单纯 n-6 PUFA 组；3∶单纯 n-3 PUFA 组；4∶1∶1 n-6/n-3 PUFA 组；5∶5∶1 n-6/n-3 PUFA 组；6∶10∶1 n-6/n-3 PUFA 组

图 3　n-6/n-3 PUFA 不同比例对细胞 IGF-1R 的 mRNA 表达的影响

2.3　n-6/n-3 PUFA 不同比例对 ER^+ 和 ER^- 乳腺癌细胞膜上 IGF-1R 蛋白表达的影响

n-6/n-3 PUFA 不同比例处理 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 48 h，与对照组比较，单纯 n-6 PUFA 和 10∶1 n-6/n-3 PUFA 能明显促进 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞膜 IGF-1R 蛋白的表达（$P<0.01$）。单纯 n-3 PUFA 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 组显著降低 IGF-1R 蛋白表达（$P<0.01$）。而 5∶1 n-6/n-3 PUFA 组对 IGF-1R 的蛋白表达无明显影响（$P>0.05$）。见图 4。



A∶MCF-7 细胞；B∶MDA-MB-231 细胞

M∶对照组；1∶单纯 n-6 PUFA 组；2∶单纯 n-3 PUFA 组；3∶1∶1 n-6/n-3 PUFA 组；4∶5∶1 n-6/n-3 PUFA 组；5∶10∶1 n-6/n-3 PUFA 组

图 4　n-6/n-3 不同比例对细胞膜 IGF-1R 蛋白表达的影响

3　讨论

大量研究表明不同种类的脂肪酸，特别是 PUFAs，对于乳腺癌的发生、发展具有不同影响[4,5]。研究证实，n-3 PUFA（如鱼油）具有抗肿瘤作用[6]，而 n-6 PUFA（如豆油、玉米油）则具有促肿瘤作用[7]，而其机制尚不明了。多项研究显示[8,9]，脂肪组织中适当的 n-6/n-3 PUFA 比例而非这些脂肪酸的单一浓度，对乳腺癌的发生、发展具有更为重要的影响。本研究利用不同比例构成的 n-6/n-3 PUFA 作用于两种乳腺癌细胞，结果表明，不同比例的 n-6/n-3 PUFA 对于 MCF-7 和 MDA-MB-231 两种乳腺癌细胞的增殖均具有不同影响，其中单纯 n-6 PUFA 和 10∶1 n-6/n-3 PUFA 能显著促进这两种乳腺癌细胞的增殖，而单纯 n-3 PUFA 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 则显著抑制细胞增殖，5∶1 n-6/n-3 PUFA 作用不明显。

IGF-1R 是介导胰岛素生长信号转导的关键性受体蛋白，与细胞的增殖、分化以及凋亡密切相关，研究表明，IGF-1R 与乳腺癌的发生、发展也关系密切，并指出乳腺癌细胞与正常上皮细胞不同的是 IGF-1R 表达普遍增高，而 IGF-1R 的过表达能够增加 IGF 的生物效应，促进乳腺癌细胞的增殖[10]，反之 IGF-1R 的激活，特别是 IGF-1R/IRS-1/PI-3K 通路的持续激活能够显著拮抗各种抗癌药物治疗的效果。因此，抑制 IGF-1R 的活性和/或降低 IGF-1R 的表达可通过阻止 IRS-1/PI-3K 信号转导，达到显著抑制乳腺癌细胞的增殖的目的[11,12]。本研究利用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测了不同比例 n-6/n-3 PUFA 作用于两种乳腺癌细胞后 IGF-1R 表达的变化，结果表明，不同比例 n-6/n-3 PUFA 对 MCF-7 及 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 IGF-1R 的表达具有不同影响，其中 n-6 和 10∶1 n-6/n-3PUFA 能够显著增强 IGF-1R mRNA 及蛋白表达水平，而 n-3 PUFA 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 则显著降低 IGF-1R 的表达，5∶1 n-6/n-3 PUFA 无明显效应，这与其对乳腺癌细胞增殖影响的结果一致，可见，不同比例 n-6/n-3 PUFA可能是通过调节 IGF-1R 的表达而影响乳腺癌细胞的增殖。

此外，PUFA 作为人体重要的脂肪酸，对于维护生物膜结构与功能的稳定很重要。n-3 及 n-6 PUFA 对细胞膜脂均具有极高的亲和性，并直接参与膜脂的构成。细胞膜上存在着一些较为独立的由胆固醇与鞘磷脂紧密结合形成的膜脂微区（microdomain），这些膜脂微区被称为脂筏（lipid rafts），脂筏结构中连接着许多关键性的信号蛋白，如胰岛素受体、G 蛋白家族、Src 激酶等，这些蛋白与细胞的跨膜信号转导密切相关，而脂筏对于这些信号蛋白的活性及功能的发挥具有重要调节作用。Schley 等[13]研究发现，n-3 或 n-6 PUFA 的摄入能够影响脂筏的结构，调节脂筏中胆固醇和鞘磷脂的含量以及连接蛋白的组成和分布。且 Fan 等[14]发现，与 n-6 PUFA 不同的是，n-3 PUFA 整合入 T 细胞细胞膜，选择性的修饰脂筏并明显改变脂筏中酰化结构及鞘脂类含量，从而阻止 Src 家族激酶（Lck、Fyn 和 LAT）活化及 PKCθ 移位入脂筏，抑制 T 细胞细胞膜上的信号转导，最终阻止 T 细胞活化。IGF-1R 作为脂筏

结构中的一个重要信号蛋白，有研究显示，脂筏对于IGF-1R介导的信号转导具有调节作用[15]。由此我们推测，n-6和n-3 PUFA可能通过影响脂筏的结构差异性调节IGF-1R的功能及其表达，进而影响细胞内增殖信号的转导，对乳腺癌细胞的增殖产生不同影响，但其具体机制还待进一步的研究和探讨。

参考文献：

[1] Ip C. Controversial issues of dietary fat and experimental mammary carcinogenesis[J]. Prev Med, 1993, 22(5): 728-737.

[2] Terry P D, Rohan T E, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence[J]. Am J Clin Nutr, 2003, 77(3): 532-543.

[3] Wood T L, Yee D. Introduction: IGFs and IGFBPs in the normal mammary gland and in breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000, 5(1): 1-5.

[4] 韦 娜，糜漫天. n-6/n-3多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞脂代谢调控基因的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 652-655.

[5] 韦 娜，糜漫天. n-6/n-3多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞缝隙连接细胞通讯的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 338-341.

[6] Chong Y M, Colston K, Jiang W G, *et al*. The relationship between the insulin-like growth factor-1 system and the oestrogen metabolising enzymes in breast cancer tissue and its adjacent non-cancerous tissue [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(3): 275-288.

[7] Gago-Dominguez M, Yuan J M, Sun C L, *et al*. Opposing effects of dietary n-3 and n-6 fatty acids on mammary carcinogenesis: The Singapore Chinese Health Study[J]. Br J Cancer, 2003, 89(9): 1686-1692.

[8] Escrich E, Solanas M, Soler M, *et al*. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors[J]. J Nutr Biochem, 2001, 12(9): 536-549.

[9] Larsson S C, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, *et al*. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(6): 935-945.

[10] Jude S, Roger S, Martel E, *et al*. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2006, 90(1-3): 299-325.

[11] Chong Y M, Williams S L, Elkak A, *et al*. Insulin-like growth factor 1 (IGF-31) and its receptor mRNA levels in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue[J]. Anticancer Res, 2006, 26(1A): 167-173.

[12] Chernicky C L, Yi L, Tan H, *et al*. Treatment of human breast cancer cells with antisense RNA to the type Ⅰ insulin-like growth factor receptor inhibits cell growth, suppresses tumorigenesis, alters the metastatic potential, and prolongs survival *in vivo*[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(3): 384-395.

[13] Schley P D, Brindley D N, Field C J. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells[J]. J Nutr, 2007, 137(3): 548-553.

[14] Fan Y Y, McMurray D N, Ly L H, *et al*. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts [J]. J Nutr, 2003, 133(6): 1913-1920.

[15] Remacle-Bonnet M, Garrouste F, Baillat G, *et al*. Membrane rafts segregate pro-from anti-apoptotic insulin-like growth factor-Ⅰ receptor signaling in colon carcinoma cells stimulated by members of the tumor necrosis factor superfamily[J]. Am J Pathol, 2005, 167(3): 761-773.

（编辑 薛国文）

欢迎订阅《第三军医大学学报》

《第三军医大学学报》为国内外公开发行的综合性医药卫生类学术刊物。1979年创刊以来，先后被确定为《中国科技论文统计源期刊》和“中国临床医学类核心期刊”、“中国特种医学类核心期刊”、“中国综合性医药卫生类核心期刊”、“中国生物医学核心期刊”；并被《中国科学技术期刊文摘》、《中国生物学文摘》、《中国医学文摘》、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科学引文数据库》、《万方数据库》、《中国科技论文在线》、《俄罗斯文摘杂志(PЖ)》、《美国化学文摘(CA)》和《波兰哥白尼索引(IC)》等国内外20余家重要数据库和权威性文摘期刊所收录。本刊为半月刊，版本采用国际标准大16开本(210 mm×297 mm)，国内统一刊号：CN51-1095/R，国际标准刊号：ISSN 1000-5404，国内邮发代号：78-91，国外邮发代号：M6529。

本刊登载国内外广大医疗、教学、科研工作者在医药科研领域中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法。主要栏目设有：专家述评、专题报道、论著(军事医学、基础医学、临床医学、药学、预防医学、检验医学、生物医学工程等)、技术方法、研究快报、短篇论著、经验交流、疑难病例、个案与短篇、学术之窗等。

欢迎校内外广大医药卫生科研工作者投稿和订阅。