

Omega-3 多不饱和脂肪酸衍生物 18-HEPE 对 人子宫内膜癌细胞株侵袭的抑制作用研究

李杰萍^{1a}, 邹建平², 江絮萍^{1b}, 杨琳², 刘桐宇², 谢榕²

(1. 武警福建总队医院 a. 检验科; b. 妇产科, 福州 350003; 2. 福建省肿瘤医院妇科肿瘤外科, 福州 350014)

摘要:目的 探讨 Omega-3 多不饱和脂肪酸衍生物 18-HEPE 对子宫内膜癌细胞株侵袭的影响。方法 采用 Transwell 小室侵袭实验观察 18-HEPE 对子宫内膜癌细胞 HEC-1B 和 RL 95-2 侵袭的影响。用 Western blot 和实时定量 PCR 分析 18-HEPE 处理后子宫内膜癌细胞侵袭相关基因 MMP-2, MMP-9 以及炎症因子 IL-6 的表达变化。进一步采用 Western blot 观察 18-HEPE 对子宫内膜癌细胞 PTEN 表达的影响。结果 18-HEPE 能剂量依赖性地抑制子宫内膜癌细胞 HEC-1B 和 RL 95-2 的侵袭, 100 pg/ml 18-HEPE 能明显抑制子宫内膜癌细胞 MMP-2, MMP-9 以及 IL-6 的表达。同时, 100 pg/ml 18-HEPE 能显著升高子宫内膜癌细胞 PTEN 的表达。结论 18-HEPE 可以通过多种环节抑制子宫内膜癌细胞的侵袭, 有广阔的临床应用前景。

关键词: Omega-3 多不饱和脂肪酸; 子宫内膜癌; 细胞侵袭

中图分类号: R737.33; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2020)01-016-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.005

Suppression of Omega-3 PUFAs Derivative 18-HEPE on the Invasion of Endometrial Cancer Cell Lines

LI Jie-ping^{1a}, ZOU Jian-ping², JIANG Xu-ping^{1b}, YANG Lin², LIU Tong-yu², XIE Rong²

(1a. Department of Clinical Laboratory; 1b. Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of Fujian Corps of CAPF, Fuzhou 350003, China; 2. Department of Gynecologic Oncology, Fujian Provincial Cancer Hospital, Fuzhou 350014, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of Omega-3 PUFAs derivative 18-HEPE on the invasion of endometrial cancer (EC) cell lines. **Methods** Transwell chamber was used to observe the effects of 18-HEPE on the invasion of EC HEC-1B and RL 95-2 cells. The expressions of invasion-related genes MMP-2, MMP-9 and inflammatory factor IL-6 in HEC-1B and RL 95-2 cells after treated with 100 pg/ml of 18-HEPE were detected by western blot and real-time PCR. Furthermore, PTEN expressions in these two cell lines treated with 100pg/ml of 18-HEPE were also analyzed by western blot. **Results** 18-HEPE inhibited the invasion of EC cells HEC-1B and RL 95-2 in dose-dependent manner. Invasion-related gene MMP-2, MMP-9 and IL-6 expressions in HEC-1B and RL 95-2 cells treated with 100 pg/ml of 18-HEPE were obviously inhibited. Moreover, PTEN expressions in these two kinds of cells were obviously up-regulated by 100 pg/ml of 18-HEPE. **Conclusion** 18-HEPE could suppress the invasion of EC cells by several aspects, and may have a widely clinic application prospects.

Keywords: Omega-3 PUFAs; endometrial cancer; cell invasion

多不饱和脂肪酸 (poly unsaturated fatty acids, PUFAs) 作为一类独特的生物活性物质对人体有重要的生理功能, 主要包含 omega-3 PUFAs 和 omega-6 PUFAs 两大类, 它们都是合成类二十烷酸化合物的前体, 具有稳定细胞膜功能、调控基因表达、维持细胞因子和脂蛋白平衡、抗癌、抗炎和抗心血管病等生

理功能, 是目前营养生化研究热点之一^[1]。随着时间的推移和社会经济的发展变化, 特别是近 100 ~ 150 年以来, 人类的膳食结构发生巨大变化。人类食物中 omega-3 PUFAs 含量明显减少, 而 omega-6 PUFAs 含量明显增多, 造成人类摄入的 omega-3 PUFAs 与 omega-6 PUFAs 比值严重失调。高 omega-6/omega-

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2016J01405)。

作者简介: 李杰萍 (1975 -), 男, 博士, 副主任技师, 从事脂类代谢与肿瘤研究, E-mail: liejieping@hotmail.com。

邹建平, 共同第一作者。

3 PUFA 比值的膳食引发一系列慢性疾病如肿瘤、心血管疾病、糖尿病和自身免疫性疾病等,增加摄入 omega-3 PUFA 对于保持身体健康和预防多种慢性疾病有着极为重要的意义^[2,5]。Omega-3 PUFA 除了通过结合其受体发挥生物学功能外,还通过其衍生物或代谢产物发挥作用^[2,6]。我们以前的研究表明,omega-3 PUFA 衍生物(5Z,8Z,11Z,14Z,16E)-18-羟基-5,8,11,14,16-二十碳五烯酸[(5Z,8Z,11Z,14Z,16E)-18-Hydroxy-5,8,11,14,16icosapentaenoic acid, 18-HEPE]能有效抑制黑色素瘤细胞的肺转移^[7]。本研究我们探讨 18-HEPE 对子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人 EC 细胞株 HEC-1B 和 RL952 细胞购自中国科学院典型培养保藏委员会细胞库。HEC-1B 细胞用含有 10 g/dl 灭活小牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基;RL95-2 细胞采用含 10 g/dl 灭活小牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、NaHCO₃ 及胰岛素的 DMEM/F12 培养基,置 37 ℃、5 ml/dl CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养。

1.2 主要试剂和仪器 Trizol 试剂盒购自美国 Ambion 公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;18-HEPE 购自美国 Cayman 公司;抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体和抗 PTEN 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;GAPDH 抗体购自北京中山公司。实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;低温高速离心机购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 侵袭实验:肿瘤细胞的侵袭潜力通过体外 Transwell 小室实验来评估,实验按照说明书进行。首先,用 Matrigel 覆盖 Transwell 板上室,将含不同浓度的 18-HEPE 处理的细胞(5×10^5)于无血清培养基中加入上室,500 μl 含 FBS 的培养基加入下室,培养 24 h 后,将 Transwell 小室取出,小心擦去上层细胞,晾干后,固定、染色,于显微镜下随机选取 5 个视野,计算穿膜细胞数。实验重复 3 次,取其平均值。

1.3.2 实时定量 PCR 分析:收集细胞后,加入 Trizol 试剂提取 RNA,逆转录为 cDNA 后进行实时定量 PCR。IL-6 上游引物:5'-TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC-3',下游引物:5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG-3';GAPDH 上游引物:5'-CGACTTCAACAGCAACTCCCACTCTTCC-3',下游引物:5'-TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT-3'。反应条件为 93 ℃ 变性 2 min,然后按 93 ℃ 30s,55 ℃ 1min,

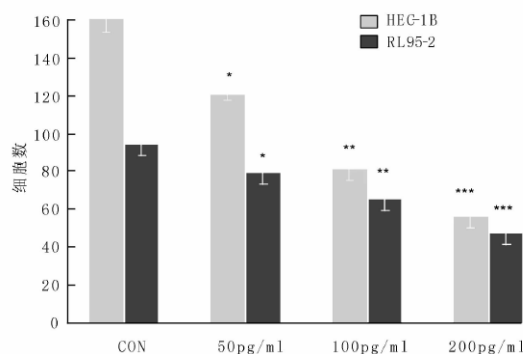
72 ℃ 30s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。样本结果均用 GAPDH 标化,每个样本设 3 个复孔,采用 2^{-ΔΔCt} 计算相对表达量。

1.3.3 Western blot 分析:样品进行 SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜,然后用 50 g/L 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜,弃溶液,加入用 50 g/L 脱脂奶粉稀释的一抗,室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后,加入用 50 g/L 脱脂奶粉稀释的二抗(辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔/羊抗鼠 IgG),室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后,用化学发光法显色 5 min,压片显影。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 18-HEPE 明显抑制 EC 细胞的侵袭 Transwell 小室侵袭实验结果见图 1。18-HEPE 在 50 ~ 200 pg/ml 的浓度范围内以剂量依赖性抑制 EC 细胞 HEC-1B 和 RL95-2 的侵袭。



* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001

图1 18-HEPE 抑制 EC 细胞侵袭

2.2 18-HEPE 抑制 EC 细胞侵袭相关基因的表达 见图 2。本研究采用 Western Blot 实验进一步观察 18-HEPE 对 EC 细胞侵袭相关基因的影响,结果发现 100 pg/ml 18-HEPE 明显抑制 HEC-1B 和 RL 95-2 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达。

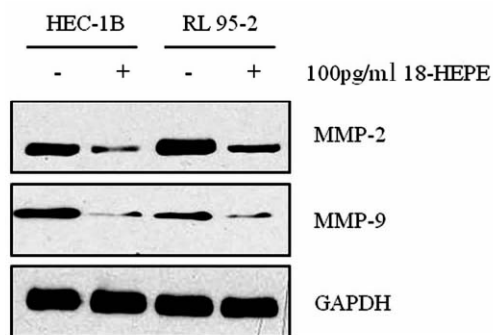


图2 18-HEPE 明显抑制 EC 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达

2.3 18-HEPE 抑制 EC 细胞 IL-6 的表达 见图3。由于炎症因子在肿瘤侵袭过程中起重要的作用,本研究探讨了 18-HEPE 对 EC 细胞 IL-6 表达的影响。实时定量 PCR 实验结果显示,100 $\mu\text{g/ml}$ 18-HEPE 能明显抑制 HEC-1B 和 RL 95-2 细胞的 IL-6 表达。

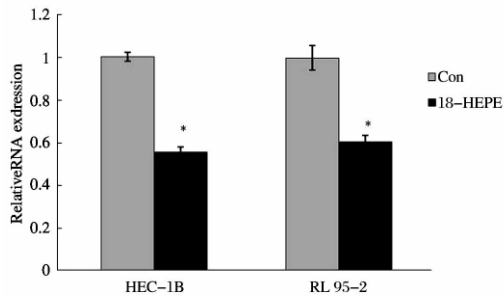


图3 18-HEPE 抑制 EC 细胞 IL-6 表达 (* $P < 0.05$)

2.4 18-HEPE 升高 EC 细胞中 PTEN 的表达 见图4。由于抑癌基因 PTEN 缺失或突变在 EC 的发生发展中是极为重要的分子事件,为了进一步探讨 18-HEPE 抑制 EC 细胞侵袭的相关机制,本研究观察了 18-HEPE 对 EC 细胞 PTEN 表达的影响。结果发现,100 $\mu\text{g/ml}$ 18-HEPE 处理细胞后能明显上调 EC 细胞中 PTEN 的表达。

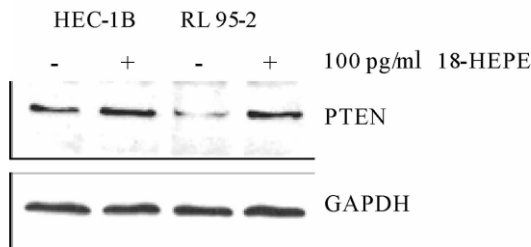


图4 18-HEPE 上调 EC 细胞中 PTEN 表达

3 讨论

脂类代谢参与调节细胞的生长、增殖、分化等多种生命活动,细胞膜中脂肪酸代谢的改变(尤其是 PUFAs)影响细胞的结构、功能、细胞的氧化状态以及信号通路,从而改变细胞的特性,与肿瘤、心血管疾病和糖尿病等慢性疾病的发生发展密切相关^[3,8]。Omega-3 PUFAs 主要包括 α -亚麻酸(α -Linolenic acid, ALA)、二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA),ALA 主要来源于核桃、亚麻子和菜籽等植物油,而 EPA 和 DHA 主要来源于深海鱼油;omega-6 PUFAs 主要包括亚油酸和花生四烯酸,主要存在于玉米油、葵花子油和红花油中^[9]。Omega-3 PUFAs 和 omega-6 PUFAs 在生物体内的代谢是一个复杂的过程,在体内有各自的代谢途径,但在相同的代谢步骤中所需的酶为同一酶系,存在着代谢竞争抑制,omega-3 PUFAs 和 omega-6 PUFAs 相互影响机体合成类廿碳烷酸化合物的速度;omega-6 PUFAs 的代谢产物

具有强炎性作用,而 omega-3 PUFAs 的代谢产物具有低炎性作用或者具有强抗炎作用;在机体内,omega-3 PUFAs 拮抗 omega-6 PUFAs 的生理功能,以维持其体内平衡^[1]。Omega-3 PUFAs 可以通过直接结合其机体细胞中的受体或者通过其衍生物、代谢产物影响机体细胞的特性,还可以通过降低机体局部组织的炎性水平改变肿瘤发生发展的微环境,从而影响肿瘤的发生发展、侵袭转移等多个环节,对肿瘤的防治具有重要意义^[6,10-11]。

EC 是一种常见的女性生殖系统肿瘤,近年来,我国的 EC 发病率逐年升高,居女性生殖系统肿瘤第二位^[12]。流行病学研究表明,多摄入鱼或 EPA/DHA 明显降低 EC 发生率^[13-16]。Omega-3 与 omega-6 PUFAs 比值也与 EC 风险负相关^[13]。小鼠接种 EC 细胞后,与用低 omega-3/omega-6 PUFAs 比值饮食喂养的小鼠相比,用高 omega-3/omega-6 PUFAs 比值饮食喂养的小鼠的癌细胞中 mTOR 和 AKT 表达明显降低^[17]。细胞实验结果表明,DHA 可以通过抑制 mTORC1/2 信号通路抑制 EC 细胞的增殖、迁移及诱导 EC 细胞凋亡,还可以抑制他莫西芬诱导的子宫内膜生长^[18]。这些研究都显示,omega-3 PUFAs 可以抑制 EC 的发生发展。但是目前还没有有关 omega-3 PUFAs 与 EC 侵袭的研究报道。

本研究表明,EPA 衍生物 18-HEPE 能抑制 EC 细胞的侵袭相关基因 MMP-2, MMP-9 的表达以及炎症因子 IL-6 分泌,从而抑制其侵袭。肿瘤组织局部微环境中的炎性反应对肿瘤的侵袭有着重要作用。研究表明,IL-6 可以诱导其下游基因(如:Cyclin D1 和 MMP-2 等)表达,参与雌激素介导的 EC 生长与侵袭^[19]。雌激素能促进 EC 细胞合成分泌 IL-6,分泌的 IL-6 上调局部组织中基质细胞芳香化酶的表达,进而增强局部组织的雌激素生物合成,这种正反馈机制在 EC 的发生发展中起到至关重要的作用^[20]。这些结果表明,18-HEPE 可以通过多种环节影响 EC 细胞的侵袭。在 EC 的发生发展机制中,PTEN 的突变或者缺失是常见和非常重要的分子事件,PTEN 可以通过 PIP3-AKT 信号通路抑制细胞的生长增殖、黏附侵袭和转移;PTEN 还可以通过 AKT 信号通路抑制 NF κ B 活性,进一步抑制下游炎性基因的表达,从而影响局部组织的炎性反应^[21-22]。我们的研究表明,18-HEPE 可以上调 EC 细胞中 PTEN 的表达。EC 细胞中 PTEN 表达升高可能抑制肿瘤侵袭相关基因 MMP-2 和 MMP-9 的表达以及炎症因子 IL-6 的表达。至于 18-HEPE 如何上调 EC 细胞中 PTEN 的表达需要进一步研究。

采用 fat-1 转基因小鼠模型研究表明,18-HEPE 可以下调肝组织 TNF- α 水平,抑制肝脏的炎症,从而抑制肝脏肿瘤的发生^[23]。我们以前的研究表明,18-HEPE 可以直接抑制黑色素瘤细胞 CXCR4 的表达和炎性反应水平,从而抑制其肺转移^[5]。这些研究都

表明,18-HEPE在预防肿瘤的发生发展中具有重要作用,是一种重要的 ω -3 PUFAs衍生物,将有广阔的临床应用前景。

参考文献:

- [1] 孙翔宇,高贵田,段爱莉,等. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(7):418-423.
SUN Xiangyu, GAO Guitian, DUAN Aili, et al. Research progress in polyunsaturated fatty acids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 418-423.
- [2] CALDER P C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance[J]. Biochimica et Biophysica acta, 2015, 1851(4): 469-484.
- [3] SANDERS T A. Protective effects of dietary PUFA against chronic disease: evidence from epidemiological studies and intervention trials[J]. The Proceedings of the Nutrition Society, 2014, 73(1): 73-79.
- [4] VON SCHACKY C. Omega-3 index and cardiovascular health[J]. Nutrients, 2014, 6(2): 799-814.
- [5] KALIANNAN K, LI Xiangyong, WANG Bin, et al. Multi-omic analysis in transgenic mice implicates omega-6/omega-3 fatty acid imbalance as a risk factor for chronic disease[J]. Commun Biol, 2019, 2: 276.
- [6] DY O Y, TALUKDAR S, BAE E J, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects[J]. Cell, 2010, 142(5): 687-698.
- [7] LI Jieping, CHEN C Y, ARITA M, et al. An omega-3 polyunsaturated fatty acid derivative, 18-HEPE, protects against CXCR4-associated melanoma metastasis[J]. Carcinogenesis, 2018, 39(11): 1380-1388.
- [8] ABEL S, RIEDEL S, GELDERBLOM W C. Dietary PUFA and cancer[J]. The Proceedings of the Nutrition Society, 2014, 73(3): 361-367.
- [9] BRADERRY J C, HILLEMANN D E. Overview of omega-3 fatty acid therapies[J]. P & T: a Peer-reviewed Journal for Formulary Management, 2013, 38(11): 681-691.
- [10] STEPHENSON J A, AL-TAAN O, ARSHAD A, et al. The multifaceted effects of omega-3 polyunsaturated Fatty acids on the hallmarks of cancer. [J]. J Lipids, 2013, 2013: 261247.
- [11] COMBA A, LIN Yihui, RENATO EYNARD A, et al. Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2011, 30(3/4): 325-342.
- [12] 李淑敏, 韩瑛. 年轻子宫内膜癌患者保留生育、生理功能治疗的现状及进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 9(5): 715-719.
LI Shumin, HAN Ying. Status and progress of retaining the fertility treatment, physiological function in young patients with endometrial cancer[J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2015, 9(5): 715-719.
- [13] AREM H, NEUHOUSER M L, IRWIN M L, et al. Omega-3 and omega-6 fatty acid intakes and endometrial cancer risk in a population-based case-control study[J]. European Journal of Nutrition, 2013, 52(3): 1251-1260.
- [14] BRASKY T M, NEUHOUSER M L, COHN D E, et al. Associations of long-chain ω -3 fatty acids and fish intake with endometrial cancer risk in the Vitamins and lifestyle cohort[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2014, 99(3): 599-608.
- [15] BRASKY T M, RODABOUGH R J, LIU J, et al. Long-chain ω -3 fatty acid intake and endometrial cancer risk in the Women's Health Initiative[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2015, 101(4): 824-834.
- [16] BRASKY T M, SPONHOLTZ T R, PALMER J R, et al. Associations of dietary Long-Chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish consumption with endometrial cancer risk in the black women's health study[J]. American Journal of Epidemiology, 2016, 183(3): 199-209.
- [17] LU Xiaoyuan, DING Xuan, JING Li. Effect of mechanism of action of different omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acids ratio on the growth of endometrial carcinoma mice[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2015, 71(3): 1671-1676.
- [18] ZHENG Hang, TANG Hongjun, LIU Miao, et al. Inhibition of endometrial cancer by n-3 polyunsaturated fatty acids in preclinical models[J]. Cancer Prevention Research, 2014, 7(8): 824-834.
- [19] CHE Qi, XIAO Xirong, XU Jun, et al. 17 beta-Estradiol promotes endometrial cancer proliferation and invasion through IL-6 pathway[J]. Endocrine Connections, 2019, 8(7): 961-968.
- [20] CHE Qi, LIU Binya, LIAO Yun, et al. Activation of a positive feedback loop involving IL-6 and aromatase promotes intratumoral 17 β -estradiol biosynthesis in endometrial carcinoma microenvironment[J]. International Journal of Cancer, 2014, 135(2): 282-294.
- [21] MARKOWSKA A, PAWALOWSKA M, LUBIN J, et al. Signalling pathways in endometrial cancer[J]. Contemporary Oncology (Poznan, Poland), 2014, 18(3): 143-148.
- [22] WALLACE A E, GIBSON D A, SAUNDERS P T, et al. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma[J]. Journal of Endocrinology, 2010, 206(2): 141-157.
- [23] WEYLANDT K H, KRAUSE L F, GOMOLKA B, et al. Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(6): 897-903.

收稿日期:2019-10-21

修回日期:2019-11-31