

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0037-04

fat-1 基因对乳腺癌细胞的增殖抑制作用

李馨, 王秀丽, 田润华, 刘颖, 侯琳, 耿芳宋, 葛银林 (青岛大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 青岛 266021)

[摘要] 目的: 研究 fat-1 基因在人乳腺癌细胞内的表达、功能及其对乳腺癌细胞增殖的影响。方法: 把 fat-1 基因插入到腺病毒的穿梭载体中, 与骨架载体同源重组, 构建腺病毒重组载体 (Ad. GFP. fat1), 将通过包装细胞系 (293) 产生的腺病毒感染人乳腺癌株 QMR2 细胞。提取细胞的总 RNA, 以 fat-1 的反义 mRNA 作探针, 用 Northern Blot 检测 fat-1 基因在人乳腺癌株 QMR2 细胞内的表达。流式细胞仪分析 n-3 脂肪酸脱氢酶对人乳腺癌株 QMR2 细胞增殖的影响。气象色谱仪分析 n-3 脂肪酸脱氢酶对人乳腺癌株 QMR2 细胞的 n-6 PUFAs/n-3 PUFAs 含量影响。结果: fat-1 基因在人乳腺癌株 QMR2 细胞中能有效异源表达, 2 d 后检测到 fat-1 mRNA 的条带。fat-1 基因抑制了人乳腺癌株 QMR2 细胞的增殖, 降低了 20% ($P < 0.05$); 同时降低了人乳腺癌株 QMR2 细胞 n-6 PUFAs/n-3 PUFAs 含量降低。结论: 腺病毒介导的 fat-1 基因能在人乳腺癌株 QMR2 细胞内有效异源表达, 且抑制人乳腺癌株 QMR2 细胞的增殖。

[关键词] 多不饱和脂肪酸; 乳腺癌; 基因治疗

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Inhibition of fat-1 Gene on Proliferation of Breast Cancer Cells

LI Xin, WANG Xiu-li, TIAN Run-hua, LIU Ying, HOU Lin, GENG Fang-song, GE Yin-lin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, University of Qingdao, Qingdao 266021, China)

[Abstract] **Objective:** To transfer the gene of n-3 fatty acid desaturase fat-1 into human breast cancer cell QMR2 by adenovirus vector and study the effect of the gene on proliferation of QMR2 cells. **Methods:** The gene fat-1 was cloned into the shuttle vector of adenovirus, and homologously recombined with an adenoviral backbone vector (pAdEasy 1) to generate the recombinant adenovirus Ad. GFP. fat1; the virus was packaged in 293 cells, inoculated on the breast cancer cells QMR2; total RNA of the cells was hybridized with antisense RNA of fat-1 mRNA by Northern to analyze the expression of fat-1; the effect of fat-1 on the proliferation of QMR2 cells was analyzed by Flow Cytometry; the content of n-6 PUFAs/n-3 PUFAs was analyzed by Gas Chromatography. **Results:** The high titer recombinant virus was got through DNA recombinant; the fat-1 mRNA appeared in breast cancer cell QMR2 after virus Ad. GFP. fat1 infected the cells for 2 days; compared with the control cells (Ad. GFP), proliferation of QMR2 cells was inhibited by the gene fat-1, decreased by 31% ($P < 0.05$); moreover, fat-1 gene decreased content of n-6 PUFAs/n-3 PUFAs. **Conclusion:** The gene fat-1 was heterologously expressed in human breast cancer cell QMR2 via adenovirus, and the expression produced an inhibitory effect on proliferation of the cells.

[Key words] polyunsaturated fatty acids; breast cancer; gene therapy

基因治疗为许多疑难病症的治疗带来了希望, 用腺病毒 (Adenovirus, Ad) 作为基因转移的载体进行乳腺癌的基因治疗, 已取得良好进展^[1,2]。

含两个以上双键的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是机体生长发育、构成细胞膜必不可少的成分。细胞膜中脂肪酸成分直接影响细胞膜的结构、流动性和通透性, 影响着膜上功能蛋白的构象和功能发挥^[3]。n-3 PUFAs 和 n-6 PUFAs 的合成

是分别通过对亚油酸 (LA, 18:2 n-6) 或 α -亚麻酸 (ALA, 18:3 n-3) 进行一系列脱氢和延长来完成的。

[基金项目] 国家自然科学基金 (No. 30271217); 青岛市科技局科技计划项目 (No. 03-1-YN-14)

[作者简介] 李馨 (1970-), 女, 讲师, 山东人, 主要从事医学生物化学研究

[通讯作者] 葛银林, E-mail: gyinlin@yahoo.com.cn

动物细胞缺乏脱氢酶活性, n-6 和 n-3 PUFAs 也是不可相互转化的^[2]。所以, ALA 及对应的延长产物(n-3 PUFAs)就成为人类的必需脂肪酸。而一些植物和微生物能合成 n-3 脂肪酸 ALA。1997 年美国华盛顿大学 Spsychalla JP 首次将一个编码 n-3 脂肪酸脱氢酶的基因(fat-1)克隆出来^[5]。该基因来源于 *Caenorhabditis elegans*, mRNA 全长 1.4 kb, 其功能可将 n-6 PUFAs 转化成为 n-3 PUFAs。当把该基因在植物 *Arabidopsis* 中表达时, 通过把 n-3 双键引入到 n-6 PUFAs 碳氢链中, 能催化 n-6 PUFAs 转化成为 n-3 PUFAs。

本研究检查 fat-1 基因能否在人乳腺癌细胞中表达、发挥功能, 并研究 fat-1 基因能否对乳腺癌细胞的增殖产生影响, 继而为乳腺癌的临床预防和治疗提供参考。

1 材料与方 法

1.1 重组腺病毒(Ad)的构建

携带 fat-1 基因的重组腺病毒按照类似于 He 等^[6]所叙述的过程构建。fat-1 基因的 cDNA 经 EcoRI/KpnI 双酶消化从克隆载体 pCE8 中释放出来, 插入到穿梭载体中, 然后参照 He 等的方法与腺病毒骨架载体进行同源重组, 得到 2 株重组病毒: Ad. GFP(对照病毒), 携带在 CMV 启动子控制下的绿荧光蛋白基因(GFP, 作为报告基因), 和 Ad. GFP. fat-1, 携带 2 个基因 fat-1 和 GFP, 每一基因都在 CMV 启动子的独立控制下。重组病毒通过酶切消化和 DNA 测序确证。通过 293 细胞的繁殖, 制备高滴度的重组病毒储液。

1.2 细胞培养和病毒感染

人乳腺癌株 QMR2 细胞培养在 1:1 (v/v) 的 DMEM 和 Ham's F12, 含 5% FBS 混合液中(penicillin, 50 U/ml; streptomycin, 50 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 和 98% 的相对湿度。当细胞覆盖率在 70% 时, 进行病毒感染。24 h 后换正常的培养液。48 h 后, 进行紫外显微拍照, 流式细胞仪, 基因表达功能分析等。

1.3 RNA 分析

fat-1 基因的信使 mRNA 用 Northern blot 测定。从培养人乳腺癌株 QMR2 细胞中提取总 RNA (TRIzol, GIBco, BRL), 甲醛变性凝胶分离后转至尼龙杂交膜上。含有 fat-1 基因的质粒 pCE8 用适当的酶线性化并用作转录模板。反义 RNA 探针通过体外转录标记 ([³²P]-UTP)、T7 聚合酶合成 (Riboprobea System T7 kit, Promega), 纯化后与膜上的人乳腺癌株 QMR2 细胞 RNA 在杂交袋内杂交过夜, 洗膜除去非特异性吸附, 然后 X 光片放射自显影, 1 d 后冲片。人类 β -actin 基因用作内部参照基因。

1.4 细胞增殖和存活分析

细胞生长和存活能力用流式细胞仪分析。人乳腺癌株 QMR2 细胞生长在 12 孔板中, 病毒感染 2 d 后, 收集培养液置于离心管中, 贴壁细胞用胰酶消化后, 与培养液合并一起, 3 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 保留细胞。细胞用 Live/Dead cell 染色试剂盒 (L-2302, #3, Molecular Probes) 染色, 定量 PBS 悬浮后用流式细胞仪分析每 10 000 个细胞中的死活细胞百分数。对照和 Ad. GFP. fat-1 感染的细胞各 6 孔为一组。

1.5 酯类分析

细胞总酯类的脂肪酸组成按文献 [7-8] 的方法分析。脂类提取用含有 0.005% butylated hydroxytoluene (作为抗氧化剂) 的氯仿/甲醇 (2:1, vol/vol), 脂肪酸的甲基酯化用 14% (wt/vol) BF₃/甲醇试剂完成。脂肪酸甲酯用 GC/MS 定量, 使用 HP-5890 Series II 气相色谱仪, 配备 Supelcowax SP-10 毛细管柱 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), 同 HP-5971 质谱仪连接, 进样器和监测器分别维持在 260 $^{\circ}$ C 和 280 $^{\circ}$ C 脂肪酸的含量通过比较各种被分析脂肪酸的面积与固定浓度的内部标准物的面积而得出。

1.6 数据分析

数据都以平均数 \pm SE 表示, Student's T test 用于评估两个数值之间的差别 ($P < 0.05$)。

2 结 果

2.1 携带 fat-1 基因的重组腺病毒载体的构建

质粒-fat-1 cDNA 经 EcoRV/KpnI 切割后, 插入到 pAdTrack-CMV 载体中, 并与腺病毒骨架载体 pAdEasy 1 进行同源重组, 得到重组的腺病毒 Ad. GFP. fat-1, 携带 2 个基因 fat-1 和 GFP (图 1 所示为其图谱)。另外还得到克隆 Ad. GFP (只携带绿荧光蛋白基因 GFP, 作为报告基因), 用作对照病毒。重组腺病毒载体 DNA 用 PacI 和 BamH I 消化, 序列测定进行鉴定, 结果都表明该重组载体的结构是正确的 (结果未显示)。

2.2 fat-1 基因在人乳腺癌株 QMR2 细胞中的表达

感染了 Ad. GFP. fat1 并表达了转基因的细胞, 可以很容易地在荧光显微镜下鉴定出来, 因为他们同时表达了 GFP (它表现为亮的绿色荧光)。在感染后 2 d, 可以看到约 60% ~ 70% 的细胞受到感染 (表达了转基因 GFP, 图 2)。使用 Northern blot 分析 mRNA 显示, fat-1 mRNA 在 Ad. GFP. fat-1 感染的细胞中含量丰富, 但在 Ad. GFP (对照) 感染的细胞中却检测不到 fat-1 mRNA (图 3)。这说明, Ad 介导的基因转移能使 fat-1 基因在人乳腺癌株 QMR2 细胞中高效异源表达, 而该细胞在正常情况下是缺乏该基因的。

2.3 fat-1 基因对细胞生长的影响

在 Ad. GFP. fat1 感染 2 d 后,用流式细胞仪测量了活细胞的百分数。如图(4A)所示,表达 fat-1 基因的细胞与对照细胞(Ad. GFP 感染)比较,活细胞明显减少。将对照细胞的活细胞平均值作 100% 处理,表达 fat-1 基因的细胞与之作相应比较,活细胞为 69%,减少了 31%(图 4B)。这说明 fat-1 基因抑制了人乳腺癌株 QMR2 细胞增殖。

图 1 重组 Ad. GFP. fat1 的结构示意图

Fig.1 Structural conceptual diagram of plasmid Ad. GFP. fat-1

图 2 表达 GFP 的两组乳腺癌细胞照片

Fig.2 Expression of GFP in two groups of human breast cancer cells QMR2

A: Infected by Ad. GFP (control); B: Infected by Ad. GFP. fat1

2.4 酯类分析

fat-1 基因的功能是可将 n-6 PUFAs 转化为 n-3 PUFAs。因此,测定人乳腺癌株 QMR2 细胞膜的 n-6 PUFAs/n-3 PUFAs 含量,即可证明 fat-1 基因是否正常发挥功能。提取人乳腺癌株 QMR2 细胞的总脂类,用气相色谱仪分析 n-6 PUFAs/n-3 PUFAs 的含量,重复 3 次,然后进行统计学分析。结果发现,与未感染的正常人乳腺癌株 QMR2 细胞相比,Ad. GFP. fat-1 感染的细胞中 n-6 PUFAs 含量降低,n-3 PUFAs 含量升高,而 Ad. GFP 感染的对照细胞中 n-6 PUFAs/n-3 PUFAs 含量没有变化(表 1)。这说明,fat-1 基因在人乳腺癌株 QMR2 细胞中能有效表达,且功能发挥正常。

3 讨论

本研究证明了 fat-1 基因能在人类细胞内有效表达、发挥功能,这种表达使得 n-6 PUFAs 降低、n-3 PUFAs 升高,n-6 PUFAs/n-3 PUFAs 比率在一个适宜的平衡点,使乳腺癌细胞的增殖受到抑制。

图 3 Ad. GFP 感染(对照)和 Ad. GFP. fat-1 感染的乳腺癌细胞株 QMR2 fat-1 mRNA 的 Northern 分析

Fig.3 Northern analysis of fat-1 mRNA in QMR2 cells infected with Ad. GFP (control) and with Ad. GFP. fat-1.

1: Control cell infected by Ad. GFP;

2: Cell infected with Ad. GFP. fat-1

图 4 表达 fat-1 基因的细胞组与对照组的流式细胞仪分析图

Fig. 4 Analysis of flow cytometry

A: Cells infected by Ad. GFP, most cells were alive,

M1 = 6513; B: Cells infected by Ad. GFP. fat1,

alive cells notably decreased, M1 = 4519

表1 表达 fat-1 基因的人乳腺癌株 QMR2 与对照细胞总脂类中各种多不饱和脂肪酸含量

Tab. 1 Content of each n-6/n-3 PUFAs in total lipid of control cells and QMR2 cells expressing fat-1 gene

Mol % of total fatty acids	Normal	Control	fat-1
n-6 Polyunsaturates			
18:2n-6	3.08 ^a	3.13 ^a	1.51 ^b
20:2n-6	0.26 ^a	0.23 ^a	0.22 ^a
20:3n-6	0.30 ^a	0.34 ^a	0.16 ^b
20:4n-6	6.25 ^a	6.30 ^a	2.26 ^b
22:4n-6	0.55 ^a	0.53 ^a	0.33 ^b
22:5n-6	0.29 ^a	0.27 ^a	0.11 ^b
Total	10.73 ^a	10.80 ^a	4.59 ^b
n-3 Polyunsaturates			
18:3n-3	0.0 ^a	0.0 ^a	1.00 ^b
20:4n-3	0.0 ^a	0.0 ^a	0.10 ^b
20:5n-3	0.0 ^a	0.0 ^a	2.87 ^b
22:5n-3	0.35 ^a	0.33 ^a	1.47 ^b
22:6n-3	0.59 ^a	0.60 ^a	0.73 ^a
Total	0.94 ^a	0.93 ^a	6.17 ^b
n-6/n-3 Ratio	11.41 ^a	11.61 ^a	0.74 ^b

The data in the table is the average value of 3 experiment data. Each fatty acid with same letter, there is no significant difference between the data of control cells and QMR2 cells expressing fat-1 gene, different letter, significant difference ($P < 0.01$)

一些研究发现,不同种类的多不饱和脂肪酸对乳腺癌和直肠癌的影响不同^[7-8]。omega-6 多不饱和脂肪酸(n-6 PUFAs)可促进动物肿瘤和癌的生长,而 omega-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFAs)则能抑制动物肿瘤和癌的生长。临床研究说明给乳腺癌和直肠癌病人的饮食中添加 omega-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFAs),可减轻或抑制肿瘤的发展^[9-11]。补充 n-3 PUFAs 显示对炎症和自身免疫病,例如关节炎,具有治疗效果^[12,14-15]。因此,n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFAs)已日益成为研究的热点,人们更加注意到它作为药物和营养类化合物的价值。

我们目前的结果与上述研究是吻合的,并说明腺病毒介导的 fat-1 基因转移有可能是一个理想的干预方法,它能迅速和有效地提供 n-3 脂肪酸的治疗和预防疾病的效果,而又无须添加 n-3 PUFAs 或改变饮食习惯。与饮食干预相比,这种方法在平衡 n-6/n-3 比率方面更加有效,因为它不仅提高了组织中 n-3 PUFAs 的浓度,而且也减少了过量的内源性 n-6 PUFAs 水平。

本研究证明了一个有效的方法改变动物细胞脂肪酸组成,并提供了在实验和临床实践中进一步利用这种基因转移的基础。经过动物实验后,采用通用的注射法,即注射携带有 fat-1 基因的腺病毒到人乳腺癌肿瘤

中,进行初步临床实验。这是利用外源基因(非人源基因)进行基因治疗的尝试。因该基因并不直接杀伤肿瘤细胞,但它可改变细胞膜的脂肪酸成分,提高细胞抗乳腺癌的能力。这些结果在直接食用 n-3 脂肪酸的大量研究中得到证实。现在的研究只是用 fat-1 基因的导入替代了外用 n-3 脂肪酸的作用,其机理与外用 n-3 脂肪酸的机理相同。因此具有重要理论意义,一旦成功也具有重要实际意义,对癌症的基因治疗方面也是一个支持,当然,在该领域还有待于做更进一步的工作。

[参考文献]

- [1] 罗春霞,邹卫国,邱松波,等. 腺病毒介导人血管抑素抑制乳腺癌生长的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(1): 9-12.
- [2] 曾赵军,胡维新,陈迁,等. 可调控自杀基因的 SCID 小鼠乳腺癌基因治疗的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(1): 30-33.
- [3] 周爱儒,查锡良,编. 生物化学[M],第6版. 北京:人民卫生出版社, 2004, 106-122.
- [4] Goodnight SH Jr, Harris WS, Connor WE. The effects of dietary omega 3 fatty acids on platelet composition and function in man: A prospective, controlled study[J]. Blood, 1981, 58(5): 880-885.
- [5] Spathchalla JP, Kinney AJ, Browse J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in arabis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(4): 1142-1147.
- [6] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [7] Kang JX, Man SF, Brown NE, et al. Essential fatty acid metabolism in cultured human airway epithelial cells[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1128(2-3): 267-274.
- [8] Weylandt KH, Kang JX, Leaf A. Polyunsaturated fatty acids exert antiarrhythmic actions as free acids rather than in phospholipids[J]. Lipids, 1996, 31(9): 977-982.
- [9] 陈爱军,杨振华,杨国梁. 多不饱和脂肪酸在乳腺癌中的作用[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(5): 348-349.
- [10] Rose DP. Dietary fat, fatty acids and breast cancer[J]. Breast Cancer, 1997, 4(1): 7-16.
- [11] Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: Emerging evidence for their role as risk modifiers[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(12): 2209-2218.
- [12] Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents[J]. Pharmacol Ther, 1999, 83(3): 217-244.
- [13] Cave WT Jr. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1997, 46(2-3): 239-246.
- [14] James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(1 Suppl): 343S-348S.
- [15] Kremer JM. n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(1 Suppl): 349S-351S.

[收稿日期] 2004-12-10 [修回日期] 2005-02-18

[本文编辑] 韩丹,王莹