

ω -3 多不饱和脂肪酸对肿瘤细胞 Rho GTP 酶翻译后修饰的影响 *

张乾勇 易 龙 冉 莉

(第三军医大学营养与食品卫生学教研室 重庆 400038)

摘要 目的 观察 ω -3 多不饱和脂肪酸(ω -3 Polyunsaturated fatty acid, ω -3 PUFA)对人前列腺癌 PC-3 细胞和乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Rho 蛋白翻译后修饰的影响。方法 60 μ mol/L 的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)处理 PC-3 和 MDA-MB-231 细胞 24h 后 检测 EPA 和 DHA 对法尼基蛋白转移酶活性的影响 对 Rho 蛋白的法尼基化修饰的影响 对 Rho 蛋白与 GTP 结合能力的影响。结果 EPA 及 DHA 均能显著下调 PC-3 和 MDA-MB-231 细胞法尼基蛋白转移酶活性($P<0.01$) 抑制 Rho 蛋白(RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42)的法尼基化修饰($P<0.01$) 并降低 PC-3 细胞 Rho 蛋白(RhoA、Rac1 和 Cdc42)与 GTP 的结合能力($P<0.05$)。结论 ω -3 PUFA 可能通过抑制肿瘤细胞 Rho 蛋白翻译后修饰 而影响肿瘤细胞的生物学特性。

关键词 前列腺癌 ;乳腺癌 ;Rho 蛋白 ; ω -3 PUFA ;翻译后修饰

中图分类号 :R730.231 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)01-9-03

Effect of ω -3 Polyunsaturated Fatty acid on Posttranslational Modifications of Rho GTPase in Tumor Cells*

ZHANG Qian-yong, YI Long, RAN Li

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of ω -3 Polyunsaturated fatty acid on the posttranslational modifications of Rho GTPases in human prostate cancer cell line PC-3 and human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods:** After a 24h pretreatment with 60 μ mol/L DHA or EPA, farnesyl protein transferase activity was assayed as the ability of cytosolic protein extracts to catalyze the prenylation of Ras. The pretreatment cells were metabolically labeled with 1mCi/flask of [3 H]farnesylpyrophosphate for 1h or with 2mCi/flask [32 P]orthophosphoric acid for 4 h. Cell lysates were immunoprecipitated by incubating with RhoA, Rac1, Rac2 and Cdc42 antibody. Transfer of [3 H]farnesylpyrophosphate onto Rho GTPases was quantitated by scintillation counting. GTP- and GDP-bound Rho GTPases were determined. **Results:** After treated with EPA or DHA of 60 μ mol/L, the farnesyl protein transferase activity in PC-3 and MDA-MB-231 cells was decreased ($P<0.01$). The posttranslational processing of Rho GTPases was inhibited by EPA and DHA ($P<0.01$). A significant reduction ($P<0.05$) was observed in the percentage of GTP bound RhoA, Rac1 and Cdc42 in EPA- and DHA-treated cells compared with untreated cells. **Conclusion:** These results suggest that ω -3 PUFA could inhibit the posttranslational modifications of Rho GTPases.

Key words: Prostate cancer; Breast cancer; Rho GTPase; Polyunsaturated fatty acid; Posttranslational modifications

Chinese Library Classification(CLC): R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-9-03

前言

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 能够抑制白血病、乳腺癌、前列腺癌、直肠癌等多种肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡^[1,2]。近年来也发现 ω -3 PUFA 对多种肿瘤的转移有抑制作用。本实验室发现 ω -3 PUFA 通过下调 Rho 蛋白的表达而抑制肿瘤细胞的转移^[3,4], 本实验进一步探讨 ω -3 PUFA 对 Rho 蛋白翻译后修饰的影响,揭示 ω -3 PUFA 抑制转移的可能分子机制,为 ω -3 PUFA 应用于肿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。EPA 和 DHA 以无水乙醇配置成浓度 $5 \times 10^5 \mu$ mol/L 的贮存液,充氮气 -70℃ 避光保存。 [3 H]标记的法尼基焦磷酸盐和 [32 P]标记的正磷酸均为美国 PerkinElmer 产品,野生型人 Ras 蛋白为美国 Cytoskeleton 公司产品, Protein-A agarose 为美国 Upstate 公司产品。小鼠抗 RhoA 和 Cdc42 及兔抗 Rac2 购自 Santa Cruz 公司,兔抗 Rac1 购自 BD 公司。

1.1.2 细胞株 人前列腺癌细胞株 PC-3 和人乳腺癌 MDA-MB-231 购自中国生命科学院上海细胞库,用含 10%胎

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30471465)

作者简介 张乾勇 男 (1969-)博士 副教授 主要研究方向:营养与疾病。电话 (023)68752643 E-mail zqianrong@yahoo.com

(收稿日期 2011-06-21 接受日期 2011-07-15)

牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37℃、100%饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 法尼基蛋白转移酶活性分析 60 μmol/L 的 EPA 或 DHA 处理 PC-3 和 MDA-MB-231 细胞 24h 后，提取胞浆蛋白，取 40μg 蛋白，加入 5μg 重组的野生型人 Ras 蛋白和 1μCi^[3H]标记的法尼基焦磷酸盐，再加反应缓冲液(50 mM Tris · HCl pH 7.5, 10 μM ZnCl₂, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 0.2% 辛基 -D- 葡萄糖甙酶, 1% DMSO)至 200μL, 37℃孵育 1h。样品经 5%三氯醋酸沉淀后，测 dpm 值，以每小时每μg 蛋白转移的^[3H]标记的法尼基的 dpm 值表示法尼基蛋白转移酶活性。空白对照不加胞浆提取蛋白。

1.2.2 Rho 蛋白的法尼基化修饰分析 对照组和经ω-3 PUFA 处理 24h 的细胞，换成不含胎牛血清的培养基后，每瓶加入 1 mCi^[3H]标记的法尼基焦磷酸盐，继续培养 12h，提取蛋白，取 200μg 蛋白，分别用抗 RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42 的抗体进行免疫沉淀，测 dpm 值。

1.2.3 Rho 蛋白与 GTP 结合能力分析 参照 Collett 等^[5]的方法，对照组、EPA 或 DHA 处理后的 PC-3 细胞，换成低磷酸盐的培养基，每瓶加入 2 mCi^[32P]标记的正磷酸，继续培养 4h。分别提取胞浆蛋白和膜蛋白，再分别用抗 RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42

的抗体进行免疫沉淀，结合到 Protein-A agarose 上的免疫复合物经过洗涤缓冲液 (50mM Tris · HCl, pH 7.5, 0.2% Triton X-100, 5mM MgCl₂, 500mM NaCl, 0.005% SDS)洗涤后，重悬于反应缓冲液 (2mM EDTA, 2mM DTT, 0.2% SDS, 10mM GTP, 10mM GDP)中，68℃孵育 2h，用聚乙烯亚胺纤维素膜进行薄层层析分离 GTP 和 GDP，分别收集，测 dpm 值，按公式计算 Rho 蛋白 GTP 结合百分比，GTP 结合百分比 =dpm GTP/1.5(dpm GTP + dpm GDP) × 100。

1.3 统计学处理

计量数据以表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 ω-3 PUFA 对肿瘤细胞法尼基蛋白转移酶活性的影响

以每小时每μg 蛋白转移的^[3H]标记的法尼基的 dpm 值表示法尼基蛋白转移酶活性。发现 MDA-MB-231 细胞经过 60 μmol/L 的 EPA 和 DHA 处理后，法尼基蛋白转移酶活性显著降低(P<0.01)，分别只有对照组的 66%和 72%，而 60 μmol/L 的 EPA 和 DHA 同样显著抑制 PC3 细胞法尼基蛋白转移酶活性(P<0.01)，分别为对照组的 78%和 63%(表 1)。

2.2 ω-3 PUFA 对肿瘤细胞 Rho 蛋白的法尼基化修饰的影响

表 1 EPA 和 DHA 对肿瘤细胞法尼基蛋白转移酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)			
Table 1 The effect of EPA and DHA on the activity of farnesyl protein transferase in PC-3 and MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s$, n=3)			
Group	Control	EPA	DHA
PC-3	685.3± 64.1	534.6± 58.6 [▲]	432.8± 42.3 [▲]
MDA-MB-231	468.4± 42.5	308.9± 23.8 [▲]	337.1± 32.7 [▲]

Note : [▲]P<0.01,compared with control group

EPA 和 DHA 处理后，肿瘤细胞 ^[3H] 标记的法尼基化 RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42 蛋白的 dpm 值显著降低(P<0.01)(表 2)。说明 EPA 和 DHA 能显著降低 PC-3 和 MDA-MB-231

细胞 RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42 蛋白的法尼基化修饰。

2.3 ω-3 PUFA 对 PC-3 细胞 Rho 蛋白与 GTP 结合能力的影响

表 2 EPA 和 DHA 对肿瘤细胞 Rho 蛋白的法尼基化修饰的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)				
Table 2 The effect of EPA and DHA on the posttranslational farnesyl modifications of Rho GTPases in PC-3 and MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s$, n=3)				
Group		Control	EPA	DHA
PC-3	RhoA	4362± 346	2237± 254 [▲]	2730± 261 [▲]
	Rac1	2354± 286	1693± 198 [▲]	1526± 197 [▲]
	Rac2	3946± 257	3017± 345 [▲]	3156± 148 [▲]
	Cdc42	1864± 231	1098± 154 [▲]	1176± 192 [▲]
MDA-MB-231	RhoA	6534± 498	4008± 391 [▲]	3824± 264 [▲]
	Rac1	4867± 412	3469± 425 [▲]	3123± 316 [▲]
	Rac2	3264± 129	2959± 131 [▲]	2631± 167 [▲]
	Cdc42	2965± 264	1891± 246 [▲]	2057± 238 [▲]

Note : [▲]P<0.01,compared with control group

按公式计算 Rho 蛋白 GTP 结合百分比，GTP 结合百分比 =dpm GTP/1.5(dpm GTP + dpm GDP) × 100，结果见表 3，发现 EPA、DHA 能显著降低 PC-3 细胞胞浆和膜上与 GTP 结合的

RhoA、Rac1 和 Cdc42 蛋白百分比(P<0.05)，而对 Rac2 与 GTP 的结合能力无明显影响。

表 3 EPA 和 DHA 对 PC-3 细胞 Rho 蛋白与 GTP 结合能力的影响($\bar{x} \pm s$ n=3)

Table 3 The effect of EPA and DHA on the percentage of GTP bound Rho GTPases in PC-3 cells($\bar{x} \pm s$,n=3)

Group		Control	EPA	DHA
Cell membrane	RhoA	31.5± 1.9	24.4± 1.2 [▲]	25.3± 1.7 [▲]
	Rac1	35.8± 2.1	25.1± 1.6 [▲]	26.9± 1.8 [▲]
	Rac2	24.3± 1.5	23.8± 1.7	23.4± 1.8
	Cdc42	26.7± 1.3	23.5± 1.5 [▲]	23.1± 1.3 [▲]
Cytoplasm	RhoA	29.1± 1.9	24.6± 1.6 [▲]	23.2± 1.7 [▲]
	Rac1	28.6± 1.3	23.1± 1.2 [▲]	24.6± 1.0 [▲]
	Rac2	22.4± 1.2	21.6± 1.3	22.8± 1.6
	Cdc42	25.8± 1.6	19.8± 1.8 [▲]	21.5± 1.7 [▲]

Note : [▲]P<0.05,compared with control group

3 讨论

60 μmol/L EPA 及 DHA 均能显著下调 PC-3 和 MDA-MB-231 细胞法尼基蛋白转移酶活性(P<0.01) ,抑制 Rho 蛋白(RhoA、Rac1、Rac2 和 Cdc42)的法尼基化修饰(P<0.01) ,并降低 PC-3 细胞 Rho 蛋白(RhoA、Rac1 和 Cdc42)与 GTP 的结合能力(P<0.05)。结合本实验室早期发现 ω-3 PUFA 通过下调 Rho 蛋白的表达而抑制肿瘤细胞的转移,说明 ω-3 PUFA 不仅抑制肿瘤细胞 Rho 蛋白的表达 ,还能通过抑制肿瘤细胞法尼基蛋白转移酶的活性而抑制 Rho 蛋白的翻译后修饰,使 Rho 蛋白与 GTP 的结合能力下降 ,进而影响 Rho 蛋白的功能。

Rho 蛋白对肿瘤细胞的生物学特性,如肿瘤细胞的迁移性、粘附性、侵袭性、细胞骨架重建等有显著影响 ,有研究发现肿瘤细胞过量表达 Rho 蛋白后其侵袭能力明显增加 ,而抑制 Rho GTP 酶的活性就能抑制肿瘤的侵袭和转移^[6,7]。Rho 蛋白是 Ras 超家族成员 ,具有 GTP 酶的活性 ,又名 Rho GTP 酶。当 GTP 酶的活性部位被 GTP 占据后 ,其构象改变并暴露出结构上的靶点 ,从而介导 GTP 酶和靶蛋白或效应物的相互作用。这样 Rho GTP 酶可在活性型 /GTP 限制型和失活型 /GDP 限制型构象之间进行循环 ,而这一循环过程起着多条信号转导通路的分子开关作用^[8]。Rho 蛋白的翻译后棕榈酰化和法尼基化修饰是 Rho 蛋白是否具有与 GTP 结合能力的必要条件^[9]。

综上所述 ,ω-3 PUFA 可通过抑制 PC-3 和 MDA-MB-231 细胞法尼基蛋白转移酶的活性 ,减少 Rho 蛋白的翻译后修饰 ,使 Rho 蛋白与 GTP 的结合能力下降 ,进而影响 Rho 蛋白的功能 ,抑制肿瘤细胞的侵袭性 ,降低肿瘤细胞的转移能力。

参考文献(References)

[1] Dupertuis Y M, Meguid M M, Pichard C. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty

acids [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007;10(4):427-432

[2] Roynette C E, Calder P C, Dupertuis Y M,et al. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention [J]. Clin Nutr, 2004;23 (2): 139-151

[3] 易龙,张乾勇,糜漫天.Rho GTP 酶在 ω-3 多不饱和脂肪酸抑制 PC-3 细胞转移中的作用 [J]. 癌症,2007,26(12):1281-1286

Yi Long, Zhang Qian-yong, Mi Man-tian. Role of Rho GTPase in the inhibiting metastatic ability of human prostate cancer cell line PC-3 by ω-3 polyunsaturated fatty acid [J]. Chinese Journal of Cancer, 2007,26(12):1281-1286(In Chinese)

[4] 易龙,张乾勇,糜漫天,等.ω-3 多不饱和脂肪酸抑制人前列腺癌细胞粘附和侵袭的体外实验研究 [J]. 第三军医大学学报,2007,29(5): 396-398

Yi Long, Zhang Qian-yong, Mi Man-tian, et al. Effects of ω-3 polyunsaturated fatty acid on the adhesion and invasion of human prostate cancer PC-3 cells in vitro. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2007,29(5):396-398(In Chinese)

[5] Collett E D,Davidson L A,Yifan Y, et al. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol,2001,280(5): 1066-1075

[6] Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J,et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement [J]. Cell, 2008,135 (3): 510-523

[7] Iiizumi M, Bandyopadhyay S, Pai S K, et al. RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2008,68(18):7613-7620

[8] Vega F M, Ridley A J. Rho GTPases in cancer cell biology [J]. FEBS Lett, 2008,582(14):2093-2101

[9] Heasman S J, Ridley A J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008,9(9):690-701