

# DHA联合5-FU通过Rho/ROCK调控胃癌SGC7901 细胞增殖、凋亡的体外实验

王柯柯<sup>1</sup> 蒋亦燕<sup>2</sup> 洪丹<sup>1</sup> 楼哲丰<sup>1</sup> 金龙金<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>温州医科大学检验医学院, 生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035;

<sup>2</sup>温州医科大学附属第一医院, 温州 325000)

**摘要** 该文研究了二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)联合5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对胃癌SGC7901细胞增殖、凋亡及其Rho家族基因表达的影响。实验分为对照组、DHA组、5-FU组和DHA联合5-FU组, 用CCK-8法分别检测药物作用24、48、72 h后对人胃癌细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, Real-time PCR和Western blot分别检测细胞RhoA、RhoC和ROCK1的mRNA水平和蛋白质水平。结果显示, 5-FU单独作用时, 随着作用时间延长和剂量加大, 对胃癌细胞的增殖抑制作用增强, DHA单独作用时, 低浓度抑制作用不明显, 较高浓度时有显著抑制作用, 40 μg/mL DHA与4 μg/mL 5-FU联合时有明显的增效作用。与对照组相比, 40 μg/mL DHA对细胞凋亡作用不明显, 60 μg/mL DHA主要引起细胞晚期凋亡, 16 μg/mL 5-FU主要引起细胞早期凋亡, 两者联合时对细胞晚期凋亡有显著的增强作用。与对照组相比, DHA组及5-FU组RhoA mRNA水平下降, 5-FU及联合组RhoC mRNA水平升高。与对照组相比, DHA组RhoA、RhoC蛋白质水平下降, 5-FU组RhoA、ROCK1蛋白质水平下降, 而联合组RhoA蛋白质水平下降显著。综上所述, DHA联合5-FU可增强对胃癌SGC7901细胞增殖的抑制作用, 两者作用于细胞凋亡的不同时期且联合用药对晚期凋亡有增强作用。DHA与5-FU联合应用对细胞增殖和凋亡作用机制可能通过抑制RhoA蛋白表达起作用。

**关键词** 二十二碳六烯酸; 5-氟尿嘧啶; Rho; 细胞凋亡

## The Effect of DHA Combined with 5-FU on the Proliferation and Apoptosis in Gastric SGC7901 Cells by Rho/ROCK

Wang Keke<sup>1</sup>, Jiang Yiyan<sup>2</sup>, Hong Dan<sup>1</sup>, Lou Zhefeng<sup>1</sup>, Jin Longjin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Laboratory Medicine and Life Science, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; <sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

**Abstract** The objective of the present study is to explore the synergistic effect of docosahexaenoic acid (DHA) and 5-fluorouracil (5-FU) on the human gastric cancer cell line SGC7901 and its underlying mechanism. The experiments were divided into four groups: control group, DHA group, 5-FU group and combination treatment group. The inhibition of gastric cancer cell proliferation was determined by CCK-8 assay after stimulated 24, 48 and 72 h. Flow cytometric analysis was used to assess cell apoptosis. Real-time PCR and Western blot were

收稿日期: 2017-04-26

接受日期: 2017-10-30

浙江省自然科学基金(批准号: LQ14H160019)资助的课题

\*通讯作者. Tel: 0577-866899359, E-mail: 1304071636@qq.com

Received: April 26, 2017

Accepted: October 30, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LQ14H160019)

\*Corresponding author. Tel: +86-577-866899359, E-mail: 1304071636@qq.com

网络出版时间: 2018-01-08 12:45:08

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180108.1245.002.html>

used to detect the mRNA and protein levels of RhoA, RhoC and ROCK1 genes, respectively. The results showed 5-FU could increasingly suppress the proliferation of SGC7901 cells with higher doses and longer response time. However, the inhibitory effect, which is not significant with lower doses, appeared significantly in higher doses treated with DHA alone. The inhibitory effect increased when combining 40  $\mu\text{g/mL}$  DHA and 16  $\mu\text{g/mL}$  5-FU. Compared with the control group, the pro-apoptotic effect with 40  $\mu\text{g/mL}$  DHA was not obvious, 60  $\mu\text{g/mL}$  DHA mainly increased the late apoptosis cells and 16  $\mu\text{g/mL}$  5-FU induced early apoptosis effect respectively. Co-treatment with DHA and 5-FU enhanced the post-apoptotic effects. The levels of *RhoA* mRNA decreased in DHA group and 5-FU group while the levels of *RhoC* mRNA increased in 5-FU group and combination treatment group compared with control group. Meanwhile, the levels of RhoA and RhoC proteins declined with DHA treatment and 5-FU decreased the levels of RhoA and ROCK1 proteins. Combination treatment group resulted in a significantly decrease of RhoA protein level. These results showed that DHA and 5-FU synergetic inhibited the proliferation of gastric SGC7901 cells and affected the cell apoptosis in different periods. Mechanism of synergistically affecting cell proliferation and apoptosis might work through reducing the level of RhoA protein in SGC7901 cells.

**Keywords** docosahexaenoic acid; 5-fluorouracil; Rho; cell apoptosis

据研究显示,胃癌是造成癌症相关性死亡的主要原因之一,在全世界范围内每年约有70万人因胃癌死亡<sup>[1]</sup>。 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids,  $\omega$ -3PUFAs)是指从脂肪酸碳链甲基端算起,第一个双键出现在第三位碳原子的多不饱和脂肪酸,主要成分为二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)<sup>[2]</sup>。流行病学研究显示,饮食中富含 $\omega$ -3PUFAs可能与降低患癌风险相关<sup>[3]</sup>。越来越多的证据表明, $\omega$ -3PUFAs可能有抗癌作用及提高传统抗癌疗法的疗效,然而其作用的机制尚不清楚<sup>[4]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是一种重要的用于胃癌治疗的化疗药物。多项临床研究证实,基于5-FU的单药和联合治疗为胃癌患者的生存带来益处<sup>[5]</sup>。

Rho家族蛋白质具有三磷酸鸟苷酶(guanosine triphosphatases, GTP)活性,在细胞的信号转导通路中作为信号转换器或分子,主要参与应力纤维装配和黏着斑形成的调控,并与细胞黏附、迁移运动和增殖凋亡等功能相关<sup>[6]</sup>。因此,本研究选择胃癌SGC7901细胞株作为研究对象,探讨DHA联合5-FU通过Rho/ROCK通路对体外培养胃癌SGC7901细胞增殖、凋亡的调控作用,从而为胃癌患者的治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

细胞株人胃腺癌SGC7901细胞购自中山大学实

验动物中心。

主要试剂包括以下。DHA纯品(Sigma公司,美国)、5-FU注射液(天津金耀药业有限公司)、RPMI Medium 1640培养基(Gibco公司,美国)、胎牛血清(杭州沃森生物技术有限公司)、胰蛋白酶细胞消化液(Beyotime公司)、兔抗人RhoA抗体/RhoC抗体/ROCK1抗体(Proteintech公司,美国)、兔抗人caspase-3抗体/caspase-9抗体(Cell Signaling Technology公司,美国)、鼠抗人caspase-8抗体(Cell Signaling Technology公司,美国)、PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time)(TaKaRa公司,日本)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa公司,日本)、Trizol(Ambion公司,美国)、 $\beta$ -actin鼠抗人抗体(Beyotime公司)、HRP标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔IgG(Beyotime公司)、BCA蛋白质浓度测定试剂盒(Beyotime公司)、CCK-8试剂盒(Beyotime公司)、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(BD公司,美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI Medium 1640培养液中,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内进行常规传代培养。待细胞铺满皿底后,用2.5 mg/L胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 药物配制 DHA纯品用无水乙醇稀释为10 mg/mL, -80 °C避光保存。5-FU用培养液稀释为160 mg/mL, 4 °C避光保存。实验时用培养液将两种药物稀释到所需浓度。

**1.2.3 CCK-8法测定细胞增殖** CCK-8(cell counting kit-8)法原理如下。CCK-8试剂盒是一种基于WST-8而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测的试剂盒。WST-8是一种类似于MTT的化合物,在电子耦合试剂存在的情况下,可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的formazan。细胞增殖越快生成橙黄色formazan越多,则颜色越深;细胞增殖越慢,则颜色越浅。对于同样的细胞,颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。操作步骤如下。将对数生长期的SGC7901细胞用胰蛋白酶消化收集,接种于96孔板,每孔5 000个细胞,设空白调零组(blank group)、对照组(control group)、DHA单药组(DHA group)、5-FU单药组(5-FU group)、DHA联合5-FU组(DHA+5-FU group),每组设3个复孔。细胞培养24 h后加药物处理,继续培养24、48、72 h后,吸去培养基,每孔加入100  $\mu$ L培养基和10  $\mu$ L CCK-8,37  $^{\circ}$ C避光培养2 h后,用酶标仪于450 nm波长测吸光度( $D$ )值,以对照组为参照组,计算增殖抑制率(proliferation inhibition rate),增殖抑制率=[1-(实验组平均 $D$ 值/对照组平均 $D$ 值)] $\times$ 100%,实验重复3次,取平均值。

**1.2.4 流式细胞术测定细胞调亡** 将SGC7901细胞接种于6孔板,分为对照组、DHA单药组、5-FU单药组、DHA联合5-FU组。经药物处理48 h后,用胰蛋白酶消化收集上述各组细胞,制成单细胞悬液,离心弃上清液用预冷的PBS重悬细胞,并计数 $1\times 10^5$ 个细胞。按照Annexin V-FITC调亡试剂盒说明书,对细胞进行Annexin V-FITC和碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色。避光15 min后使用流式细胞仪进行检测,每份样本计数 $2\times 10^4$ 个细胞,Annexin V-FITC单阳性为早期调亡细胞,PI单阳性为晚期调亡细胞,用软件Flow Jo Ver.10计算细胞调亡率。实验重复3次。

**1.2.5 Real-time PCR检测Rho家族基因mRNA水平** 同上法设各处理组处理细胞48 h,提取RNA,提取方法如下。用胰蛋白酶消化收集细胞,冷PBS洗涤2遍,加入1 mL Trizol,冰上置5 min,加入200  $\mu$ L氯仿,混匀,冰上置10 min,4  $^{\circ}$ C、12 500 r/min离心15 min。小心吸取上清至新的去酶管的1.5 mL离心管中,加入等体积的异丙醇,混匀后冰上置10 min,4  $^{\circ}$ C、12 500 r/min离心15 min。弃上清,加入1 mL 75%乙醇洗涤沉淀2遍,弃上清。室温待沉淀干燥至半透明,加入20  $\mu$ L焦碳

酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)溶解RNA,检测RNA浓度和纯度( $D_{260/280}$ )。 $D_{260/280}\geq 1.80$ 表示RNA纯度较高,无DNA和蛋白质污染,可用于后续实验,置-80  $^{\circ}$ C冰箱保存。逆转录PCR方法如下。反应体系为(30  $\mu$ L): 5 $\times$ Primer Script Buffer 6  $\mu$ L、逆转录酶1.5  $\mu$ L、寡核苷酸(50  $\mu$ mol/L)1.5  $\mu$ L、随机的六核苷酸引物(100  $\mu$ mol/L)1.5  $\mu$ L、RNA 1  $\mu$ g、RNase free dH<sub>2</sub>O加至30  $\mu$ L。反应条件为:37  $^{\circ}$ C 15 min,85  $^{\circ}$ C 5 s,反应产物为cDNA。将反应产物直接用于Real-time PCR或置于-20  $^{\circ}$ C冰箱保存。

通过Primer Bank搜索目的基因序列,用Primer Premier 5.0软件自行设计目的基因的引物,NCBI数据库进行比对后,交由北京六合华大基因公司进行合成,引物序列(5' $\rightarrow$ 3')如下。*RhoA* F: GAT TGG CGC TTT TGG GTA CAT, R: AGC AGC TCT CGT AGC CAT TTC; *RhoC* F: GGA GGT CTA CGT CCC TAC TGT, R: CGC AGT CGA TCA TAG TCT TCC; *ROCK1* F: AAC ATG CTG CTG GAT AAA TCT GG, R: TGT ATC ACA TCG TAC CAT GCC T; *GADPH*(内参)F: GCC AGT GGA CTC CAC GAC, R: CAA CTA CAT GGT TTA CAT GTT C。

Real-time PCR反应体系为(20  $\mu$ L): Forward Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L、Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L、SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L、cDNA 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L。反应程序为:95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环。结果使用以下公式分析: $\Delta Cq$ =样品目的基因 $Cq$ 值-样品GAPDH  $Cq$ 值,  $-\Delta\Delta Cq$ =对照组 $\Delta Cq$ 平均值-各样品 $\Delta Cq$ 值,  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 反映的是各样品相对于对照组目的基因的相对表达水平(即相对表达量), Real-time PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳检验引物的特异性。

**1.2.6 Western blot检测蛋白质水平** 同上法设各处理组处理细胞48 h,提取细胞总蛋白,方法如下。经胰蛋白酶消化收集细胞,离心弃上清,冷PBS漂洗2遍。用含1% PMSF的RIPA细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白,BCA法测定样品总蛋白浓度,调整蛋白质浓度,95  $^{\circ}$ C煮沸变性5 min。每组各取25  $\mu$ g总蛋白样品以12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。将分离的蛋白质转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭。分别用兔抗人RhoA抗体(1:400稀释)、兔抗人RhoC抗体(1:500稀释)、兔抗人ROCK1抗体(1:1 000稀释)、兔抗人caspase-3抗体(1:1 000

稀释)、兔抗人caspase-9抗体(1:1 000稀释)、鼠抗人caspase-8抗体(1:1 000稀释)、鼠抗人 $\beta$ -actin抗体(1:800稀释)4 °C孵育过夜,二抗用加HRP标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠IgG(1:10 000稀释),常温孵育1 h。用ECL Plus显色, Bio-Rad ChemiDoc MP成像系统曝光拍照,以 $\beta$ -actin为内参,蛋白相对表达量=目的条带的灰度值/内参灰度值,用Image J软件进行半定量分析。实验重复3次。

### 1.3 统计学处理方法

计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,应用SPSS 21.0软件进行统计分析,组间平均值比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。先检验方差齐性,如果齐性,则选用LSD-*t*检验计算*P*值,否则选用Dunnett's T3检验。*P*<0.05为差异显著,*P*<0.01为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 Real-time PCR引物特异性验证结果

将Real-time PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测,各对引物进行扩增后的产物为单一条带,无非特异性扩增出现,条带大小与预测的产物大小相符合[GAPDH(180 bp)、*RhoC*(117 bp)、*ROCK1*(93 bp)、*RhoA*(85 bp)],说明设计的引物特异性好(图1)。

### 2.2 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞增殖的影响

DHA单独作用于SGC7901胃癌细胞时,低浓度对细胞增殖作用不明显,甚至在低浓度短时间内有促增殖作用,这可能与DHA性质有关。40  $\mu$ g/mL DHA有轻微抑制增殖作用,50  $\mu$ g/mL时有显著性的

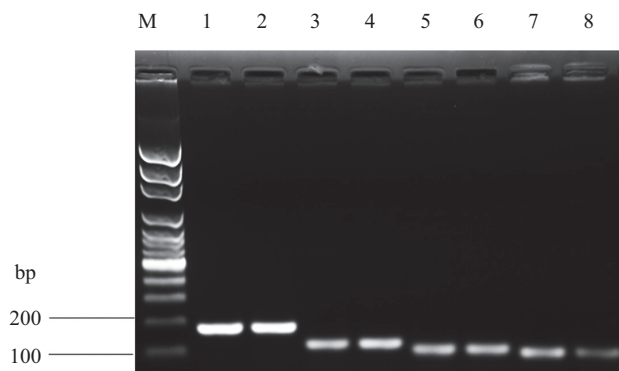
抑制增殖作用(图2A)。1~16  $\mu$ g/mL 5-FU浓度单独作用时对细胞增殖有稳定的抑制作用且随浓度增加作用加强(图2B)。40  $\mu$ g/mL DHA与4  $\mu$ g/mL 5-FU联合用药48 h或72 h,对胃癌细胞增殖的抑制作用具有叠加效应,而高浓度60  $\mu$ g/mL DHA用药时,抑癌作用主要取决于DHA的作用(图2C和图2D)。

### 2.3 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞凋亡的影响

研究结果显示,与对照组比较,40  $\mu$ g/mL DHA作用48 h对SGC7901细胞凋亡无明显作用(图3A和图3C),60  $\mu$ g/mL DHA作用48 h主要引起SGC7901细胞晚期凋亡,16  $\mu$ g/mL 5-FU主要引起SGC7901细胞早期凋亡(表1)。4  $\mu$ g/mL 5-FU和16  $\mu$ g/mL 5-FU及两种药物联合作用48 h均能诱导SGC7901细胞的凋亡(图3C和图3D)。与单药组相比,联合组凋亡率显著高于DHA单药组,但与5-FU单药组比无显著性差异(图3C和图3D)。16  $\mu$ g/mL 5-FU与60  $\mu$ g/mL DHA联合用药对细胞晚期凋亡有显著的增强作用(表1)。通过Western blot检测细胞凋亡蛋白caspase-8、caspase-9和caspase-3蛋白质水平,与对照组相比,5-FU单药组和联合组的caspase-9蛋白质水平有所下降,但无显著性差异(*P*>0.05,图4和图5)。

### 2.4 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞Rho家族基因mRNA水平的影响

研究结果显示,与对照组比较,40  $\mu$ g/mL DHA单独作用48 h降低SGC7901细胞*RhoA*的mRNA相对水平(图6A),60  $\mu$ g/mL DHA作用48 h对SGC7901细胞的*RhoA*、*RhoC*、*ROCK1*的mRNA相对水平无明显作用(图6B、图7B和图8B),4  $\mu$ g/mL和16  $\mu$ g/mL



M: DNA marker; 1、2: GAPDH 产物; 3、4: *RhoC*产物; 5、6: *ROCK1*产物; 7、8: *RhoA*产物。

M: DNA marker; 1,2: GAPDH product; 3,4: *RhoC* product; 5,6: *ROCK1* product; 7,8: *RhoA* product.

图1 Real-time PCR产物电泳结果

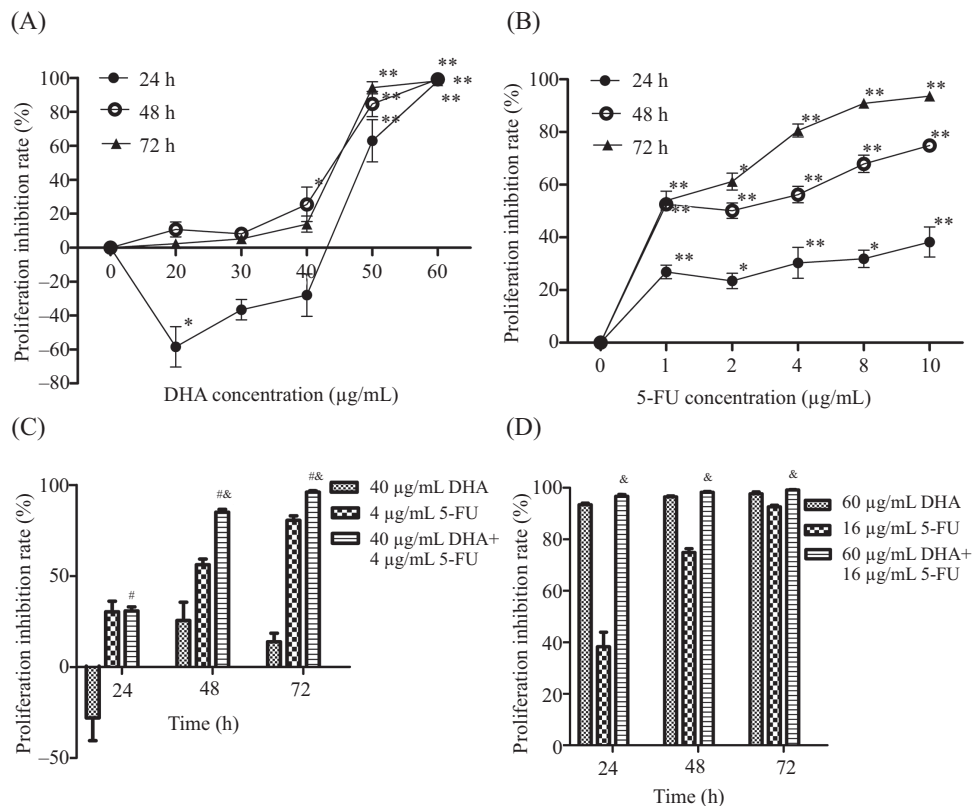
Fig.1 The electrophoretogram of Real-time PCR products

表1 DHA、5-FU单独及联合作用SGC7901细胞后流式细胞术分析细胞凋亡  
Table 1 Apoptosis analysis of SGC-7901 cells after DHA and 5-FU alone and in combination detected by flow cytometry

组别 Group	早期凋亡细胞量(%) Early apoptosis cells (%)	晚期凋亡细胞量(%) Late apoptosis cells (%)
Control	0.82±0.41	1.39±0.53
60 µg/mL DHA	1.17±0.06	2.93±0.65*
16 µg/mL 5-FU	6.40±0.49**	2.15±0.28
60 µg/mL DHA+16 µg/mL 5-FU	4.80±0.98**#	5.99±0.79***#&

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较; # $P<0.05$ , 与DHA组比较; & $P<0.05$ , 与5-FU组比较。

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group; # $P<0.05$  vs DHA group; & $P<0.05$  vs 5-FU group.



SGC7901细胞分别以不同浓度的DHA(A)、5-FU(B)、40 µg/mL DHA+4 µg/mL 5-FU(C)、60 µg/mL DHA+16 µg/mL 5-FU(D)作用24、48、72 h后细胞的增殖抑制率。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 分别与对照组(0 µg/mL DHA或0 µg/mL 5-FU)比较; # $P<0.05$ , 与DHA组比较; & $P<0.05$ , 与5-FU组比较。

The proliferation inhibition rate of SGC7901 cells treated with DHA (A), 5-FU (B), 40 µg/mL DHA+4 µg/mL 5-FU (C) and 60 µg/mL DHA+16 µg/mL 5-FU (D) at 24, 48 and 72 h. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group (0 µg/mL DHA or 0 µg/mL 5-FU); # $P<0.05$  vs DHA group; & $P<0.05$  vs 5-FU group.

图2 DHA、5-FU单独及联合对SGC7901细胞增殖的影响

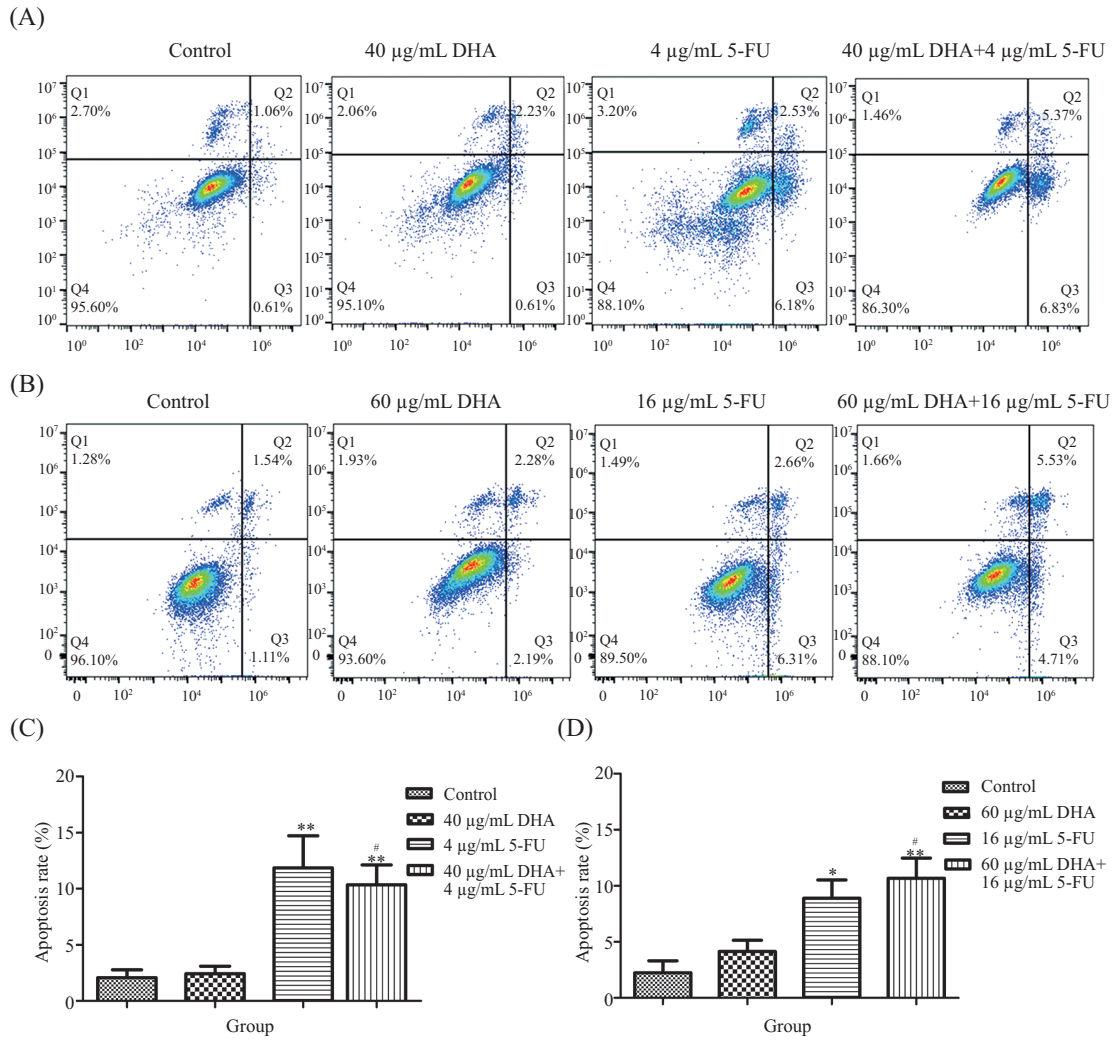
Fig.2 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the growth of SGC7901 cells

的5-FU单独作用均降低了*RhoA* mRNA相对水平, 而对*RhoC*的mRNA相对水平有促进作用(图6A和图6B, 图7A和图7B), 两药联合与DHA单药组比较, 联合组对*RhoC*的mRNA相对水平有促进作用(图7A和图7B)。

## 2.5 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞Rho家族蛋白质水平的影响

研究结果显示, 与对照组比较, DHA、5-FU单

药组及联合组作用48 h均降低了SGC7901细胞RhoA蛋白质水平。与DHA单药组相比, 联合组对RhoA的蛋白质水平下降更明显(图9和图10)。40 µg/mL DHA对RhoC蛋白质水平无明显作用(图11A), 而60 µg/mL DHA对RhoC蛋白质水平降低作用显著(图11B)。5-FU单药组及联合组均降低了ROCK1蛋白质水平(图12), 且导致ROCK1蛋白质发生剪切(图9A和图9B)。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与DHA组比较。  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs DHA group.

图3 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞凋亡的影响  
 Fig.3 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on apoptosis of SGC7901 cells

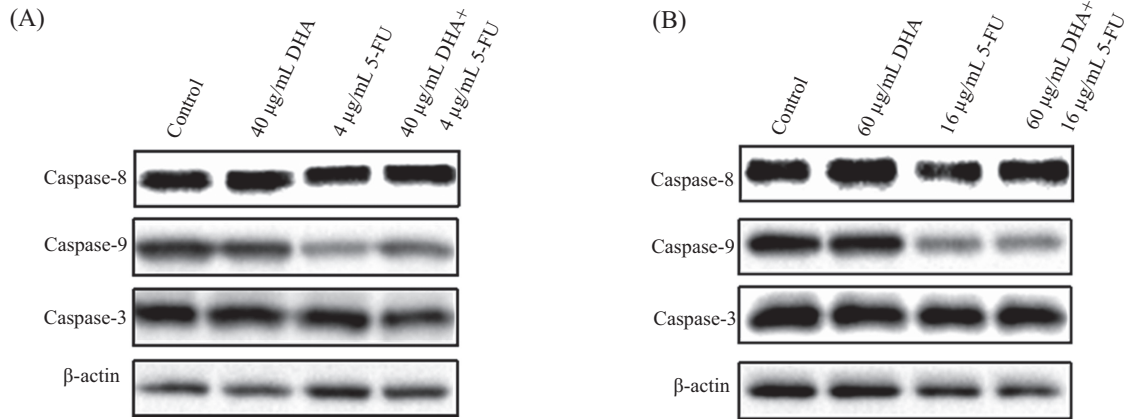


图4 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901凋亡蛋白caspase-8、caspase-9和caspase-3水平的影响  
 Fig.4 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the levels of caspase-8, caspase-9 and caspase-3 proteins in SGC7901 cells

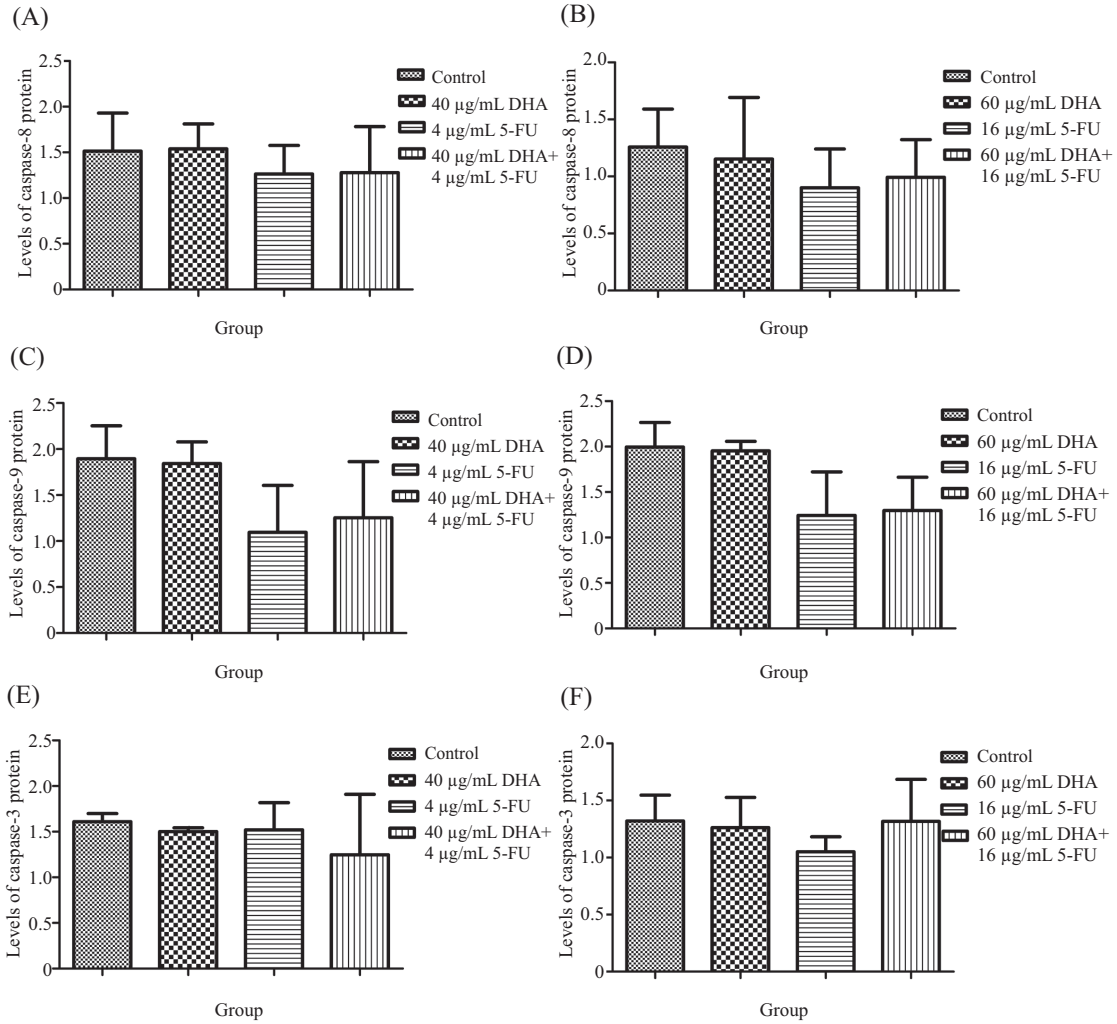
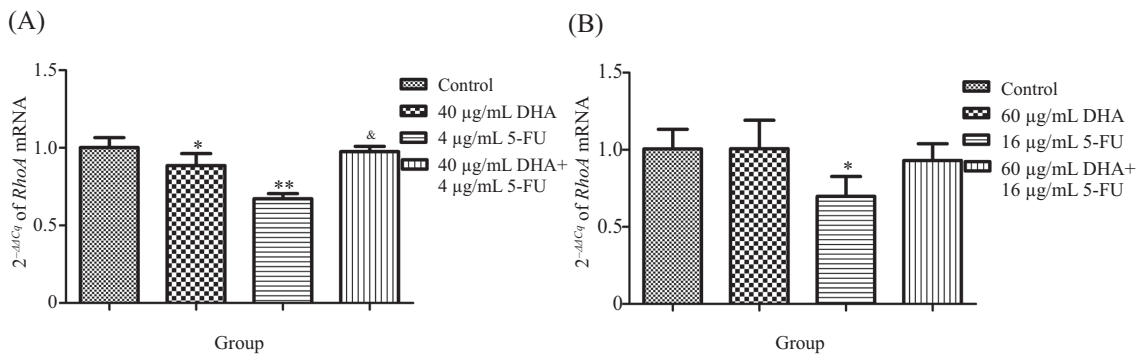


图5 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901凋亡蛋白caspase-8、caspase-9和caspase-3水平的影响  
 Fig.5 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the levels of caspase-8, caspase-9 and caspase-3 proteins in SGC7901 cell



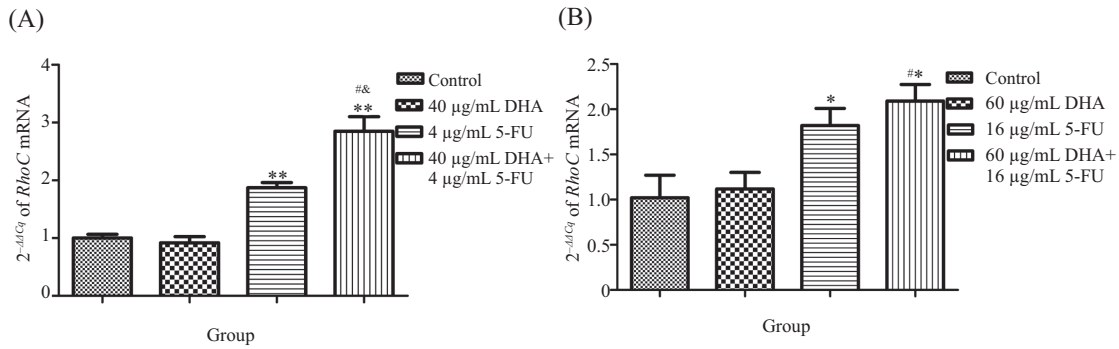
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; \* $P < 0.05$ , 与5-FU组比较。  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs 5-FU group.

图6 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞的RhoA mRNA水平的影响  
 Fig.6 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the level of RhoA mRNA in SGC7901 cell

### 3 讨论

流行病学研究显示, 饮食中富含 $\omega$ -3PUFAs能降低患癌风险, 而且 $\omega$ -3PUFAs能通过多种机制影响肿

瘤的发生、发展及转移的过程。最近的研究显示,  $\omega$ -3PUFAs与化疗药物联合可以促进肿瘤细胞死亡和降低患者的毒副作用, 并且能够减弱患者因癌症



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与DHA组比较; \* $P < 0.05$ , 与5-FU组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs DHA group; \* $P < 0.05$  vs 5-FU group.

图7 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞*RhoC* mRNA水平的影响

Fig.7 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the level of *RhoC* mRNA in SGC7901 cell

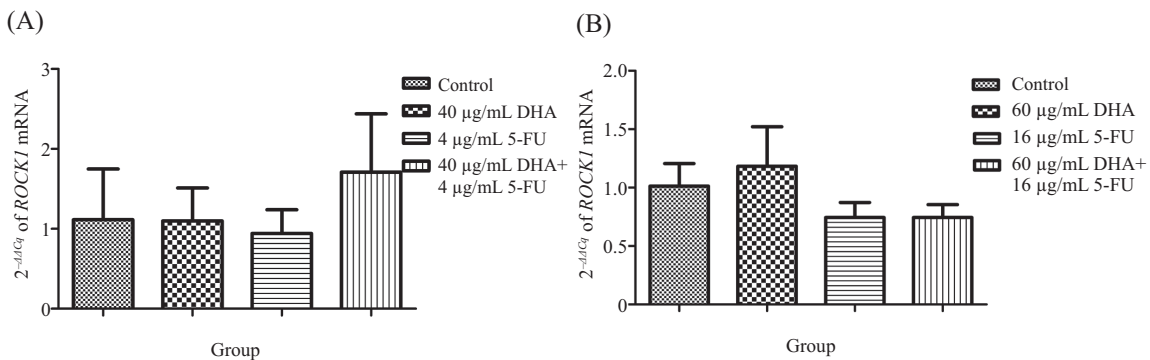


图8 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞的*ROCK1* mRNA水平的影响

Fig.8 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the level of *ROCK1* mRNA in SGC7901 cell

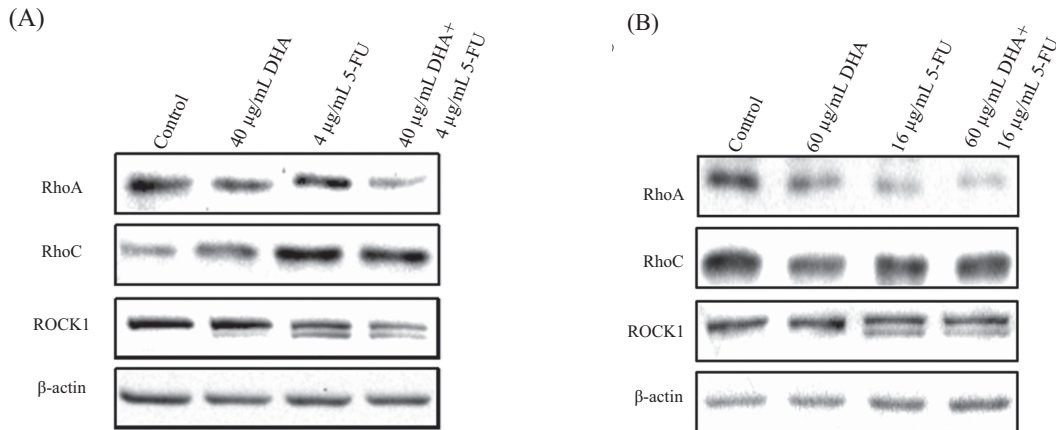


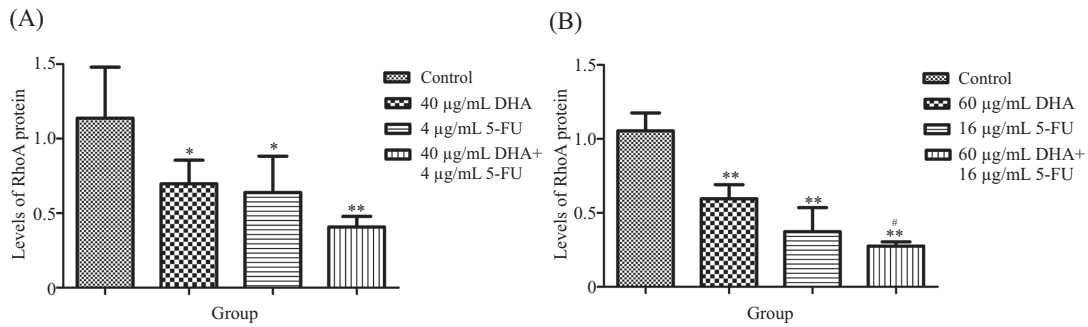
图9 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞RhoA、RhoC、ROCK1蛋白质水平的影响

Fig.9 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the levels of RhoA, RhoC and ROCK1 proteins in SGC7901 cell

引起的瘦弱<sup>[3]</sup>。5-FU广泛应用于癌症治疗,在过去20年间,随着对5-FU作用机制的了解增加,治疗策略也随之改进,增强了抗癌疗效。尽管如此,药物耐受仍然是5-FU临床应用的限制。据体内外实验结果显示,ω-3PUFAs能够增强多种化疗药物的细胞毒性,在结肠癌不同细胞系中,ω-3PUFAs联合

化疗药物能增强对肿瘤细胞的生长抑制作用<sup>[7]</sup>。研究显示,DHA能增强结肠癌细胞对5-FU的易感性,并协同抑制细胞生长,增强5-FU对肿瘤细胞的促凋亡作用,显著增强5-FU对抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-XL表达的抑制作用,并介导促凋亡蛋白c-Myc的过表达<sup>[8]</sup>。在结肠癌细胞系LoVo、RKO中,ω-3PUFAs



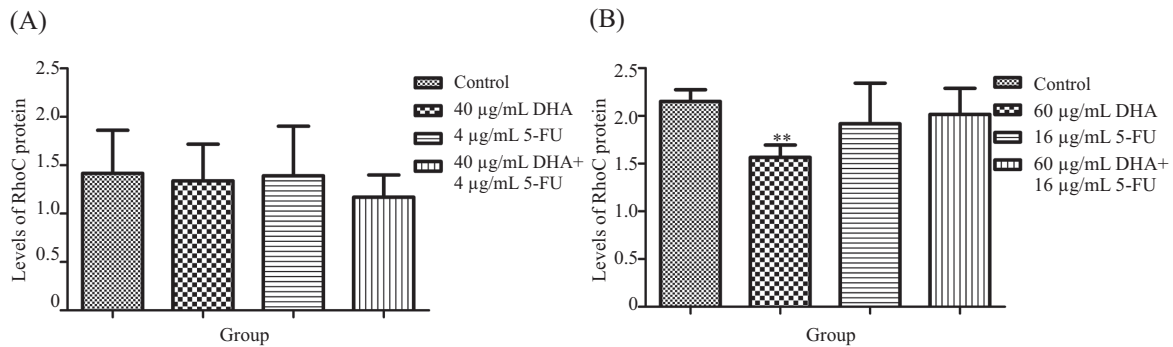


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与DHA组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs DHA group.

图10 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞RhoA蛋白质水平的影响

Fig.10 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the level of RhoA protein in SGC7901 cell

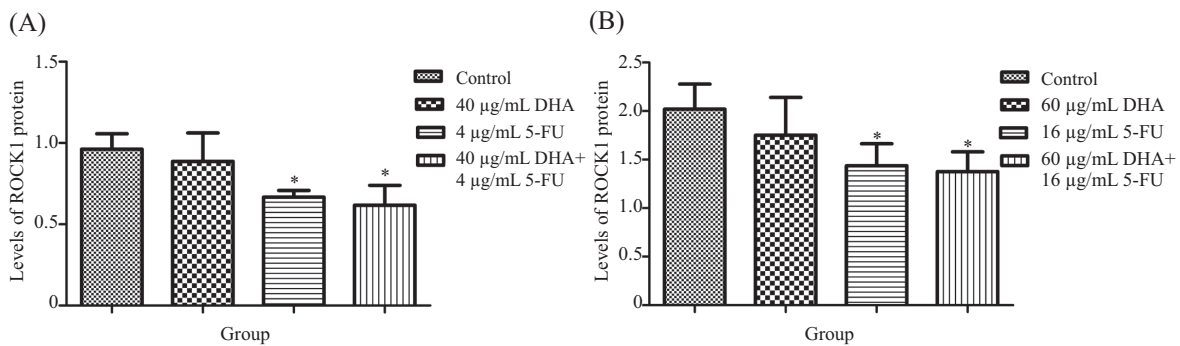


\*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

\*\* $P < 0.01$  vs control group.

图11 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞RhoC蛋白质水平的影响

Fig.11 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the level of RhoC protein in SGC7901 cell



\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

\* $P < 0.05$  vs control group.

图12 DHA、5-FU单独及联合作用对SGC7901细胞 ROCK1蛋白质水平的影响

Fig.12 Effects of DHA and 5-FU alone and in combination on the level of ROCK1 protein in SGC7901 cell

和5-FU能以同等剂量抑制细胞生长,  $\omega$ -3PUFAs主要通过提高脂氧素A4(lipoxin A4, LXA4)的生成量, 减少前列腺素E和白三烯B4的合成, 并抑制COX-2、ALOX5、mPGES的表达来发挥抑癌作用, 而5-FU的作用与之相反<sup>[9]</sup>。另有研究显示, DHA和5-FU能

协同抑制胃癌AGS细胞系的增殖, 可通过将细胞周期阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 并显著下调线粒体电子传递链复合体I、II和V的表达来发挥作用<sup>[10]</sup>。在体内实验中, DHA能增强埃博霉素对荷瘤鼠肿瘤生长的抑制作用, 而EPA与5-FU、环磷酰胺联用, 可以加强化疗

药物的疗效并改善肿瘤恶病质<sup>[11]</sup>。本研究通过使用DHA与化疗药物5-FU联合作用于胃癌SGC7901细胞,发现DHA与5-FU单独使用时对胃癌细胞的增殖有不同程度的抑制,而两者联合作用增强了化疗药物的抑癌效果,因此推测在胃癌治疗中, $\omega$ -3PUFAs对5-FU的疗效有增进作用。DHA单独作用时对肿瘤细胞的生长表现出低浓度抑制不明显,较高浓度且随浓度增加抑制作用增强,说明DHA发挥抗癌作用可能有一定的剂量依赖性。 $\omega$ -3PUFAs作为免疫营养药物,对癌细胞的杀伤作用在较低浓度时不明显,不如传统的化疗药物,甚至在低剂量短时间内有促增殖作用,这可能与DHA性质有关。在较高剂量的DHA与5-FU联合作用于胃癌细胞时,抑癌效果增强,与文献报道在其他肿瘤中的作用相类似<sup>[8,10]</sup>。

有报道称, $\omega$ -3PUFAs在多种肿瘤细胞系中能促进细胞凋亡,如结肠癌、胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌。在结肠癌中,DHA可进入到线粒体磷脂膜内部,增强氧化应激,促进凋亡相关通路的激活<sup>[12]</sup>。在结肠癌HT-29细胞系中,鱼油乳剂可增强5-FU的促凋亡作用,主要通过Bax依赖的线粒体通路增强线粒体膜的去极化,从而提高化疗的效果<sup>[13]</sup>。在人胃癌细胞系MGC803中,DHA能提高5-FU的促凋亡作用,促进剪切型caspase-3蛋白质水平<sup>[11]</sup>。然而在不同肿瘤细胞系中,其作用并不完全一致。虽然许多研究在探索可能的作用机制,目前尚无定论。我们的研究发现,60  $\mu$ g/mL DHA主要引起细胞早期凋亡,而5-FU主要引起细胞晚期凋亡,两者联合可增强细胞的早期凋亡。实验中,通过检测凋亡蛋白caspase-8、caspase-9和caspase-3的表达量,我们发现,与对照组相比,除了5-FU和联合用药组的caspase-9蛋白质水平略有下降(但无显著性, $P>0.05$ )外,其余均没有明显的变化。由于细胞凋亡是涉及到一系列基因的激活、表达与调控的过程,推测单药或联合用药引起的凋亡或许与caspase-3、caspase-8、caspase-9关系并不密切,有待于进一步深入研究。

Rho蛋白质在多种肿瘤中被激活,而Rho的过表达促成了胃癌的恶性表型,在晚期胃癌中,Rho/ROCK存在高度表达<sup>[14]</sup>。研究显示,RhoA在胃癌细胞增殖、凋亡中都发挥了重要的作用。抑制RhoA的表达可引起下游效应蛋白ROCK1的表达降低,并抑制细胞的生存率,促进胃癌AGS细胞系的凋亡,凋亡相关蛋白caspase-3/cleaved-caspase-8表达增加,提

示RhoA在胃癌细胞的凋亡过程起到了调节作用<sup>[15]</sup>。本研究发现,DHA联合5-FU对RhoA蛋白质水平有不同程度的降低,而RhoA mRNA水平无显著降低,提示DHA联合5-FU可能作用于RhoA蛋白质翻译或之后阶段,而不是作用于基因转录阶段。RhoA蛋白质水平降低,同时下游效应蛋白ROCK1蛋白质水平也有不同程度的降低,因此推测,DHA联合5-FU可能通过抑制RhoA、ROCK1蛋白质水平来促进细胞的凋亡。有文献报道,ROCK1作为Rho家族下游的效应分子,在凋亡细胞中可被caspase-3在一段保守序列DETD1113/G处发生剪切,C-端抑制结构域被移除,调节下游MLC磷酸化,促进胞膜泡形成<sup>[16]</sup>。这提示,DHA联合5-FU可能通过Rho/ROCK通路介导凋亡的发生。另外也有报道称, $\omega$ -3PUFAs的摄入可引起细胞骨架相关基因的下调,包括RhoA和ROCK1,提示调节细胞骨架的动态可能是 $\omega$ -3PUFAs发挥分子效应的另一种方式<sup>[17]</sup>。此外,有研究显示,DHA联合5-FU能使胃癌SGC7901细胞Bax mRNA水平增加,而Fas、Bcl-2、BCL2L12和caspase-9 mRNA水平下降,从而提高5-FU的抗癌效果<sup>[18]</sup>。

综上所述, $\omega$ -3PUFAs主要成分DHA联合5-FU通过抑制Rho/ROCK通路相关蛋白的表达,显著抑制胃癌SGC7901细胞的增殖,并对细胞凋亡起到一定的促进效果,但其作用的分子机制仍需进一步的研究证实。该研究为临床应用 $\omega$ -3PUFAs联合化疗药物来提高胃癌的治疗效果提供了一定的实验数据。

### 参考文献 (References)

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 2 Spencer L, Mann C, Metcalfe M, Webb M, Pollard C, Spencer D, *et al.* The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur J Cancer* 2009; 45(12): 2077-86.
- 3 Baracos VE, Mazurak VC, Ma DW. n-3 polyunsaturated fatty acids throughout the cancer trajectory: influence on disease incidence, progression, response to therapy and cancer-associated cachexia. *Nutr Res Rev* 2004; 17(2): 177-92.
- 4 Pettersen K, Monsen VT, Hakvag Pettersen CH, Overland HB, Pettersen G, Samdal H, *et al.* DHA-induced stress response in human colon cancer cells focus on oxidative stress and autophagy. *Free Radical Bio Med* 2016; 90: 158-72.
- 5 Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5): 330-8.
- 6 Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279(5350): 509-14.

- 7 Dupertuis YM, Meguid MM, Pichard C. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr* 2007; 10(4): 427-32.
- 8 Calviello G, Di Nicuolo F, Serini S, Piccioni E, Boninsegna A, Maggiano N, *et al.* Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemotherpharm Pharm* 2005; 55(1): 12-20.
- 9 Zhang C, Yu H, Ni X, Shen S, Das UN. Growth inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on colon cancer cells via their growth inhibitory metabolites and fatty acid composition changes. *PLoS One* 2015; 10(4): e0123256.
- 10 Gao K, Liang Q, Zhao ZH, Li YF, Wang SF. Synergistic anticancer properties of docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil through interference with energy metabolism and cell cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS cells. *World J Gastroenterol* 2016; 22(10): 2971-80.
- 11 Wynter MP, Russell ST, Tisdale MJ. Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *In Vivo* 2004; 18(5): 543-7.
- 12 Wendel M, Heller AR. Anticancer actions of omega-3 fatty acids-current state and future perspectives. *Anti-Cancer Agent Me* 2009; 9(4): 457-70.
- 13 Granci V, Cai F, Lecumberri E, Clerc A, Dupertuis YM, Pichard C. Colon cancer cell chemosensitisation by fish oil emulsion involves apoptotic mitochondria pathway. *Brit J Nutr* 2013; 109(7): 1188-95.
- 14 吴全, 于健春, 刘玉琴, 康维明, 郭卫东. 二十二碳六烯酸与氟尿嘧啶联合应用对人胃癌细胞株 MGC803的影响. *中国医学科学院学报(Wu Quan, Yu Jianchun, Liu Yuqin, Kang Weiming, Guo Weidong. Effect of combination of docosahexaenoic acid and fluorouracil on human gastric carcinoma cell strain MGC803. Acta Academiae Medicinae Sinicae)* 2010; 32(1): 65-70.
- 15 Matsuoka T, Yashiro M. Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(38): 13756-66.
- 16 Xu XT, Song QB, Yao Y, Ruan P, Tao ZZ. Inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway promotes the apoptosis of gastric cancer cells. *Hepato-Gastroenterol* 2011; 59(120): 2523-6.
- 17 Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breardn J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4): 346-52.
- 18 Zhuo Z, Zhang L, Mu Q, Lou Y, Gong Z, Shi Y, *et al.* The effect of combination treatment with docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil on the mRNA expression of apoptosis-related genes, including the novel gene BCL2L12, in gastric cancer cells. *In Vitro Cell Dev* 2009; 45(1/2): 69-74.