



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.012  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.012  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):522-526.

• 基础研究 •

## n-3 PUFAs 对 MNU 诱发大鼠结直肠癌形成的影响及机制

刘春安<sup>1,2</sup>, 李明意<sup>2</sup>, 姜海平<sup>1</sup>, 蔡春<sup>2</sup>, 许庆文<sup>2</sup>

(1. 暨南大学第一临床医学院 胃肠外科, 广东 广州 510630; 2. 广东医学院附属医院 胃肠外科, 广东 湛江 524001)

### 摘要

**目的:** 探讨 n-3 多不饱和脂肪酸 (n-3 PUFAs) 对 N-甲基-N-亚硝基脲 (MNU) 诱发大鼠结直肠癌形成的影响及机制。

**方法:** 将 60 只 SD 大鼠随机均分为实验组和对照组。两组均用 MNU 进行灌肠诱导结直肠癌, 实验组同时行 n-3 PUFAs 灌胃, 而对照组以等量生理盐水灌胃。16 周后, 比较两组大鼠的一般情况; 处死大鼠, 观察肿瘤发生情况及肿瘤病理特征, 气相色谱测定红细胞膜 n-3 PUFAs 浓度, 液相色谱串联质谱检测外周血细胞总 DNA 甲基化水平。

**结果:** 实验组大鼠便血发生率低于对照组、进食量及体质量大于对照组 (均  $P < 0.05$ )。两组大鼠均有结直肠肿瘤形成, 肿瘤均为腺癌, 但与对照组比较, 实验组结直肠肿瘤形成率明显降低 (63.33% vs. 86.67%,  $P < 0.05$ ), 且肿瘤最大径小、多发肿瘤少。实验组大鼠红细胞膜 n-3 PUFAs 浓度、外周血细胞总 DNA 甲基化水平明显高于对照组 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** n-3 PUFAs 能有效抑制 MNU 诱发的大鼠结直肠癌发生, 可能与其提高 DNA 甲基化水平有关。

### 关键词

结直肠肿瘤; 脂肪酸类,  $\omega 3$ ; DNA 甲基化

中图分类号: R735.3

## Influence of n-3 PUFAs on colorectal tumor formation induced by MNU in rats and the mechanism

LIU Chun'an<sup>1,2</sup>, LI Mingyi<sup>2</sup>, JIANG Haiping<sup>1</sup>, CAI Chun<sup>2</sup>, XU Qingwen<sup>2</sup>

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Clinical Medical College, Ji'nan University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the influence of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) on colorectal tumor formation induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in rats and the mechanism.

**Methods:** Sixty SD rats were equally randomized into experimental group and control group. Rats in both groups underwent administration of MNU by enema to induce colorectal cancer, and simultaneously, those in experimental group were gavaged with n-3 PUFAs, while those in control group were administered the same volume of saline in the same fashion. Sixteen weeks later, the general conditions between the two groups of rats were compared, after that, rats were sacrificed, the tumor occurrence and pathological features of the tumors were

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (粤科规财字 [2014]116 号)。

收稿日期: 2014-10-23; 修订日期: 2015-03-09。

作者简介: 刘春安, 暨南大学第一临床医学院博士研究生 (广东医学院附属医院主任医师), 主要从事胃肠肿瘤临床与基础研究方面的研究。

通信作者: 李明意, Email: limingyi63@163.com; 姜海平, Email: tjhp@tom.com

observed, the concentration of n-3 PUFAs in erythrocyte membrane was measured by gas chromatography, and global methylation level in peripheral blood cells was determined by liquid chromatography-mass spectrometry.

**Results:** The incidence of hematochezia was lower, and food-intake as well as body weight gain were greater in experimental group than those in control group (all  $P<0.05$ ). Colorectal tumor formation was found in both group of rats and all tumors were identified as adenocarcinoma, but the tumor formation rate in experimental group was significantly lower than that in control group (63.33% vs. 86.67%,  $P<0.05$ ), with reduced tumor size and multiple lesions. The concentration of n-3 PUFAs in erythrocyte membrane and global methylation level in peripheral blood cells in experimental group were significantly higher than those in control group (both  $P<0.05$ ).

**Conclusion:** n-3 PUFAs can effectively inhibit the occurrence of colorectal cancer induced by MNU in rats, which may probably be associated with their promotion of DNA methylation.

**Key words** Colorectal Neoplasms; Fatty Acids,  $\omega$ -3; DNA Methylation

**CLC number:** R735.3

结直肠癌是主要的恶性肿瘤, 诊断时往往处于中晚期, 虽然当今诊疗技术取得了很大进展, 但5年生存率仍低于30%<sup>[1]</sup>。本研究观察n-3多不饱和脂肪酸(n-3 PUFAs)灌胃对N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)灌肠诱导大鼠结直肠癌形成的影响, 并检测血液DNA甲基化水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及材料

选取6周龄健康SPF级别SD大鼠共60只(广东医学院实验动物中心提供), 体质量150~180 g, 实验组和对照组各30只, 雌雄各半, 分笼饲养于普通环境, 实验前适应2周。MNU购买于美国Sigma公司, n-3 PUFAs购买于北京百慧生化制药责任有限公司, 16种脂肪酸甲酯类(FAME)混标购买于美国Supelco公司。

### 1.2 实验方法及观察指标

**1.2.1 SD大鼠结直肠癌模型的建立** 参照唐茂盛等<sup>[2]</sup>方法建立SD大鼠结直肠癌模型, 两组均以4 mg/mL浓度MNU溶液进行灌肠, 每次灌注剂量2 mg/100 g, 插入深度6 cm, 灌肠频率开始3次/周持续4周, 以后持续以1次/周至16周。实验组同时n-3 PUFAs灌胃[0.1 g/100 (g·d), 稀释成1.5 mL], 对照组等量的0.9%氯化钠溶液灌胃, 均用灌胃针进行灌胃, 灌胃深度约5 cm, 两组均喂养大小鼠生长用饲料(80 g/d), 自由饮水。

**1.2.2 观察大鼠一般情况** 包括第16周大鼠大便、体质量、饮食等。

**1.2.3 标本收集** 处死大鼠前禁食12 h, 先经心

脏抽取血液3 mL, 离心后保存备用。解剖大鼠结直肠, 寻找隆起组织, 观察淋巴结及远处转移情况。

**1.2.4 n-3 PUFAs测定** 取离心分离出的红细胞1 mL, 气相色谱进行测定。

**1.2.5 组织病理学检查** 可疑组织进行HE染色, 常规病理学检查。

**1.2.6 外周血细胞总DNA甲基化率检测** 参照Zhang等<sup>[3]</sup>组织DNA甲基化的检测方法, 取100  $\mu$ L血液, 经DNA提取、纯化及水化, 取上清供LC-MS/MS分析。Aglient 1200-6430A液相色谱-串联质谱仪为美国安捷伦公司产品, 胞嘧啶(Cyt)和5-甲基胞嘧啶(5mCyt)购于Sigma公司。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 采用独立样本 $t$ 检验, 计数资料的比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组大鼠一般情况

**2.1.1 大便改变** 至第16周时, 两组大鼠均有大便改变(大便变细或不成形), 实验组5只(5/30)出现便血, 对照组13只(13/30)出现便血, 组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.1.2 饮食量变化** 实验开始前, 研究组饮食量为(37.56 $\pm$ 8.97)g, 对照组为(35.86 $\pm$ 6.78)g, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。至第16周两组大鼠每日食物消耗量均较造模前下降, 实验组饮食量(66.6 $\pm$ 9.2)g, 对照组(58.0 $\pm$ 12.5)g, 两组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.1.3 体质量变化** 灌肠前对照组体质量为(167.31±9.61)g, 实验组为(163.44±8.83)g, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。灌肠至16周时对照组大鼠体质量为(295.85±42.92)g和实验组(345.75±35.11)g, 两组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 2.2 两组大鼠红细胞 n-3 PUFAs 的浓度

对照组大鼠红细胞膜 n-3 PUFAs 浓度为(3.38±0.81)μg/mL, 实验组为(8.39±1.79)μg/mL, 两组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。气相色谱图见图1。

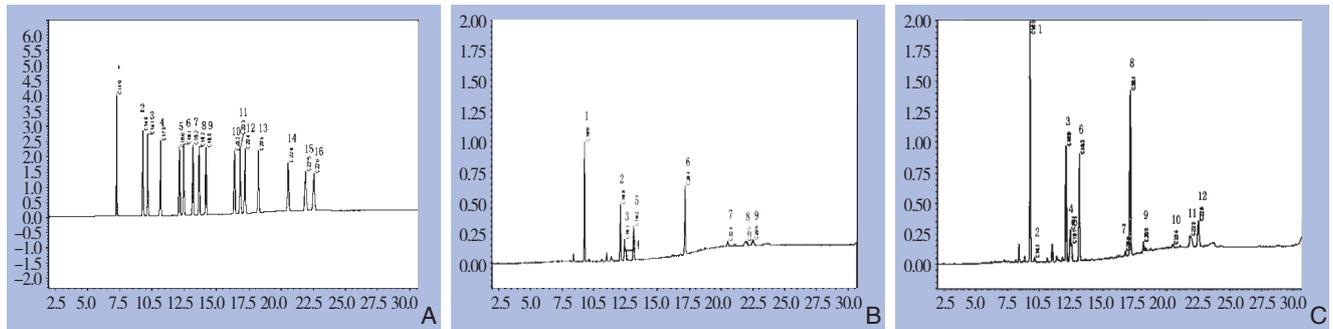


图1 气相色谱测定红细胞膜 n-3 PUFAs 的浓度 A: 16种脂肪酸标准品色谱图; B: 对照组脂肪酸分布色谱图; C: 实验组脂肪酸色谱图

**Figure 1 Determination of the concentration of n-3 PUFAs in erythrocyte membrane by gas chromatography** A: chromatogram of 16 standard fatty acids; B: Chromatogram of fatty acids in control group; C: Chromatogram of fatty acids in experimental group

## 2.3 两组大鼠肿瘤形成情况

对照组大鼠26只距肛门2~9 cm处可见局部隆起肿物, 其余4只未见肿瘤, 癌变大鼠中17例为单发、9例为多发, 最大直径10 mm, 多发肿瘤的大鼠中仅1例侵犯肠系膜, 均未见明显远处转移。实验组大鼠19只距肛门4~9 cm处可见到隆起的肿物, 其余11只未见肿瘤, 恶变大鼠中15例为单发、4例为多发, 肿物的最大直径5 mm, 未见与周围组织粘连及远处转移(图2)。对照组肿瘤发生率为86.67%(26/30), 实验组的肿瘤发生率为63.33%(19/30), 两组的肿瘤发生率差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 2.4 两组大鼠组织病理学检查

两组大鼠肿瘤采用HE染色行病理学观察, 结果均为腺癌(图3)。

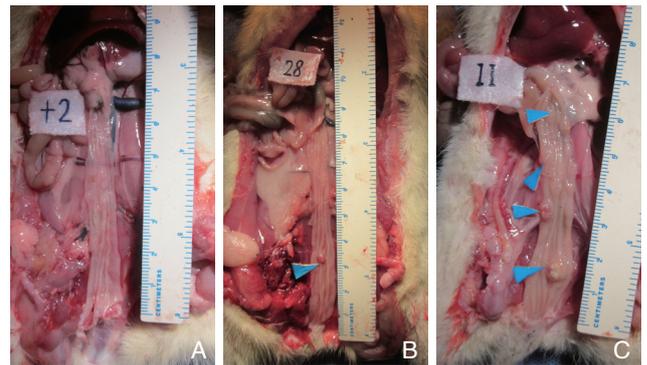


图2 大体病理学观察 A: 正常结肠黏膜; B: 单发结肠肿瘤; C: 多发结肠肿瘤

**Figure 2 Gross pathological examination** A: Normal colonic mucosa; B: Solitary colonic tumor; C: Multiple colonic tumor

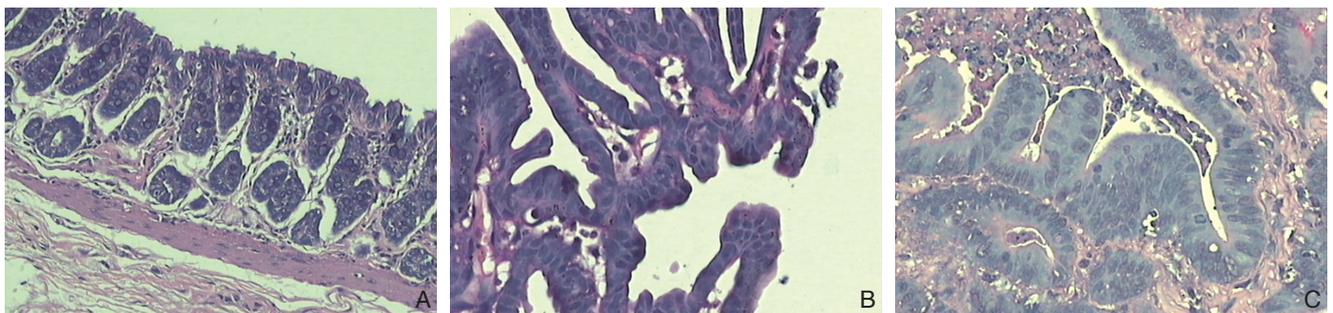


图3 组织病理学观察 A: 正常结肠黏膜(HE×40); B: 结肠非典型增生(HE×200); C: 结肠腺癌(HE×200)

**Figure 3 Histopathological examination** A: Normal colonic mucosa (HE×40); B: Colonic atypical hyperplasia (HE×200); C: Colonic adenocarcinoma (HE×200)

## 2.5 两组大鼠外周血细胞总DNA甲基化率的检测

对照组大鼠外周血细胞总DNA甲基化率为 $(1.213 \pm 0.005)\%$ , 实验组为 $(2.271 \pm 0.111)\%$ , 两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。DNA甲基化色谱图见图4。

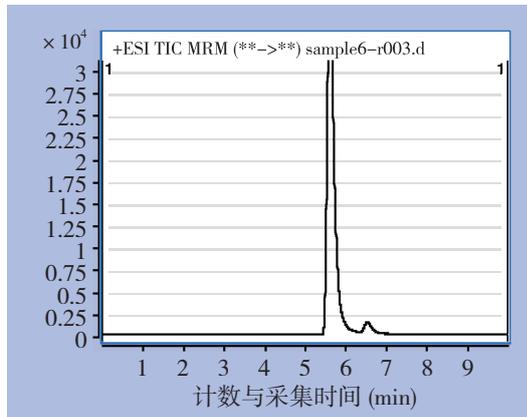


图4 大鼠外周血细胞DNA甲基化色谱图

Figure 4 Chromatogram of blood DNA Methylation in peripheral blood cells of the rats

## 3 讨论

成熟红细胞缺乏合成脂肪酸的能力, 红细胞膜脂肪酸组成的变化与血浆或其他组织长期进行脂肪酸交换结果, 反映其他组织脂肪酸代谢的情况。本实验通过气相色谱测定大鼠红细胞膜内n-3 PUFAs浓度评估大鼠n-3 PUFAs灌胃后效果, 结果两组大鼠n-3 PUFAs差异显著, 认为口服n-3 PUFAs能够提高大鼠n-3 PUFAs浓度。

本研究应用MNU对SD大鼠进行灌肠, 肿瘤发生率高(86.67%), 贴近结肠癌自然发生、发展过程, 为研究结直肠癌等提供理想的动物模型。结直肠癌早期多表现为: 腹泻、大便次数增多、血便、黏液便等。本实验结果: 灌肠至第16周时两组大鼠均发生大便性状的变化, 对照组出现便血多于研究组(13 vs. 5,  $P=0.024$ )。大便性状改变可能与MNU灌肠导致肠黏膜发生病理性改变或与灌肠刺激作用有关, 血便可能为肿瘤破溃出血所致。

灌肠至第16周时, 对照组大鼠进食少于实验组, 对照组体质量明显低于实验组, 差异有统计学意义, 笔者认为两组体质量的差异可能与饮

食、吸收功能和肿瘤慢性消耗等的差异有关。

本实验对照组大鼠肿瘤发生率为86.67%, 而实验组为66.67%, 差异有统计学意义, 提示n-3 PUFAs具有抑制结直肠肿瘤的发生。

对照组的结直肠肿瘤发生率和有关文献<sup>[2]</sup>报道相近, 但对照组只有1例大鼠肿瘤侵犯肠系膜, 无淋巴结及远处转移, 低于文献<sup>[2]</sup>报道的淋巴结及全身转移率, 具体原因尚不清楚, 但作者认为本实验结果更贴近大鼠结直肠癌缓慢发生、发展特点。

n-3 PUFAs如何抑制结直肠癌? Rogers等<sup>[4]</sup>认为n-3 PUFAs是通过增加肿瘤细胞膜流动性, 诱导细胞凋亡。Hull<sup>[5]</sup>认为n-3 PUFAs通过抗炎作用预防结直肠肿瘤形成。Vecchio等<sup>[6]</sup>认为n-3 PUFAs通过抑制COX-2活性抑制结直肠癌。Yang等<sup>[7]</sup>认为n-3 PUFAs通过抑制结直肠肿瘤干细胞样细胞的增殖, 促进肿瘤干细胞样细胞的凋亡。关于n-3 PUFAs抗结直肠肿瘤作用机理众多, 但到目前为止还不十分清楚。

DNA甲基化是指在不改变基因组中碱基排序情况下影响基因转录和表达。基因组DNA的低甲基化是癌细胞表观遗传的重大改变之一<sup>[8]</sup>。Zhang等<sup>[3]</sup>报道大肠癌组织DNA甲基化水平低于癌旁组织。同样, Bae和Suzuki等<sup>[9-10]</sup>也证明LINE-1、ALU等在多种癌症中存在低甲基化的现象。最近研究发现LINE-1的低甲基化将会导致原癌基因的激活, 从而会促进结直肠癌的转移<sup>[11]</sup>。DNA低甲基化一方面可能通过影响染色体的稳定性, 造成癌细胞中常见的染色体异常<sup>[12]</sup>; 另一方面通过激活原癌基因的表达, 从而促进肿瘤的发生<sup>[13]</sup>。研究发现, 在癌细胞中某些抑癌基因的启动子区的CpG岛通常发生甲基化, 引起抑癌基因的表现沉默, 促进肿瘤发生发展<sup>[14-15]</sup>。

虞德才等<sup>[16]</sup>报道5-Aza-dC能逆转TFPI-2基因(抑癌基因)的高甲基化状态, 使该基因重新表达。但本实验中研究组血液DNA甲基化水平高于对照组。作者推测作为预防结直肠癌发生, n-3 PUFAs可能是通过促癌基因甲基化来达到抑制结直肠肿瘤的发生。

因此, n-3 PUFAs具有抑制大鼠结直肠癌的发生、发展, 可能与其提高血液DNA甲基化机理有关, 具体机制仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Stillwell AP, Buettner PG, Sin SK, et al. Predictors of postoperative mortality, morbidity, and long-term survival after palliative resection in patients with colorectal cancer[J]. *Dis Colon Rectum*, 2011, 54(5):535-544.
- [2] 唐茂盛, 胡志前, 王伟军, 等. MNU灌肠诱导大鼠原位结肠癌及远处转移的模型建立[J]. *实验动物与比较医学*, 2010, 30(1):12-16.
- [3] Zhang JJ, Zhang L, Zhou K, et al. Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2011, 413(2):164-70.
- [4] Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, et al. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(9):1523-1530.
- [5] Hull MA. Nutritional agents with anti-inflammatory properties in chemoprevention of colorectal neoplasia[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2013, 191:143-56.
- [6] Vecchio AJ, Simmons DM, Malkowski MG. Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29): 22152-22163.
- [7] Yang T, Fang S, Zhang H X, et al. N-3 PUFAs have antiproliferative and apoptotic effects on human colorectal cancer stem-like cells in vitro[J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(5):744-753.
- [8] Ehrlich M, Lacey M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 754:31-56.
- [9] Bae JM, Shin SH, Kwon HJ, et al. ALU and LINE-1 hypomethylations in multistep gastric carcinogenesis and their prognostic implications[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(6): 1323-1331.
- [10] Suzuki M, Shiraiishi K, Eguchi A, et al. Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Rep* 2013, 29(4): 1308-1314.
- [11] Hur K, Cejas P, Feliu J, et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis[J]. *Gut*, 2014, 63(4):635-646.
- [12] Raddatz G, Gao Q, Bender S, et al. Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(12):e1003146. doi: 10.1371/journal.pgen.1003146.
- [13] Luo J, Li YN, Wang F, et al. S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer[J]. *Int J Biol Sci* 2010, 6(7):784-795.
- [14] Sinčić N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes[J]. *Curr Opin Oncol*, 2011, 23(1):69-76.
- [15] 彭星宇, 曾庆黎. 抑癌基因CpG岛甲基化与结直肠癌关系的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(10):1279-1282.
- [16] 虞德才, 郑浩, 黄强, 等. 5-Aza-dC和TSA对胰腺癌Panc-1细胞TFPI-2基因甲基化水平及表达的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(9):931-934.

( 本文编辑 宋涛 )

**本文引用格式:** 刘春安, 李明意, 姜海平, 等. n-3 PUFAs对MNU诱发大鼠结直肠癌形成的影响及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(4):522-526. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.012

**Cite this article as:** LIU CA, LI MY, JIANG HP, et al. Influence of n-3 PUFAs on colorectal tumor formation induced by MNU in rats and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(4):522-526. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.012