论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1776-03

低氧对宫颈癌 HeLa 细胞黏附及侵袭能力的影响

林 爽,李 力,易 萍 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

提 要: 目的 研究低氧对宫颈癌 HeLa 细胞的黏附、运动以及侵袭行为的影响。**方法** 宫颈癌 HeLa 细胞放置于常氧、5% O_2、3% O_2、1% O_2培养,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测低氧诱导因子 HIF-1α、E-钙黏蛋白(E-cadherin)mRNA 表达,Transwell 小室进行细胞侵袭分析。**结果** 常氧、5% O_2、3% O_2、1% O_2条件下 HIF-1α mRNA/β-actin 光密度比值为(0.423±0.116)、(0.764±0.111)、(1.687±0.126)、(0.215±0.099),随氧分压降低呈现升高后降低的趋势。E-钙黏蛋白/β-actin 光密度比值为(1.045±0.171)、(0.719±0.114)、(0.386±0.105)、(0.157±0.063),随氧分压降低而降低。不同氧浓度下细胞侵袭力分别为(112.5±20.7)、(254.3±27.5)、(333.6±45.2)、(124.5±24.6),随氧分压降低呈现升高后降低的趋势。**结论** 适度缺氧可以升高 HeLa 细胞中 HIF-1α 的表达,降低肿瘤细胞间黏附力,并增强肿瘤细胞侵袭能力,HIF-1α 表达的改变可能是导致肿瘤细胞黏附能力下降、侵袭能力增加的原因之一。

关键词: 低氧;低氧诱导因子(HIF-α);肿瘤;侵袭

中图法分类号: R364.4;R73-37;R737.33 **文献标识码**: A

Effect of hypoxia on adhesion and invasion of human cervical cancer cell HeLa

LIN Shuang, LI Li, YI Ping (Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the potential effect of hypoxia on adhersion and invasion of human cervical carcinoma cells HeLa. Methods Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to investigate the level of HIF-1α mRNA and E-cadherin mRNA of HeLa cells cultured under normoxia, 5% O_2, 3% O_2, 1% O_2. The invasiveness of HeLa cells was investigated by transwell chamber assay. Results Under the condition of normoxia, 5% O_2, 3% O_2 and 1% O_2, the optical density ratio of HIF-1α mRNA/β-actin was (0.423±0.116), (0.764±0.111), (1.687±0.126) and (0.215±0.099), showing that the level of HIF-1α mRNA had a tendency of first inceasing and then decreasing with the decreasing oxygen content. The optical density ratio of E-cadherin/β-actin was (1.045±0.171), (0.719±0.114), (0.386±0.105) and (0.157±0.063), showing a decreasing tendency with the decreasing of oxygen content. The invasiveness of HeLa cells was (112.5±20.7), (254.3±27.5), (333.6±45.2) and (124.5±24.6), showing that the invasiveness of HeLa cells had a tendency of first inceasing and then decreasing with the decreasing oxygen content. Conclusion Moderate hypoxia up-regulates the mRNA levels of HIF-1α, and down-regulates the mRNA levels of E-cadherin, and enhances the tumor invasiveness. The possible mechanism is the increasing mRNA levels of HIF-1α.

Key words: hypoxia; hypoxia inducible factor-1α; cancer; invasion

在影响肿瘤发生、发展的多种因素中,肿瘤细胞内部缺氧问题越来越受到重视。低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)是直接受低氧调控的核转录因子[1],它可通过调节多种靶基因如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等的表达[2,3],参与促进肿瘤的增殖和转移。E-钙黏蛋白(E-cadherin)是最重要的细胞间黏附分子之一,与肿瘤的侵袭和转移能力密切相关[4]。相邻 E-钙黏蛋白的胞外域可相互结合形成拉链样结构,细胞间的黏附功能有赖于其完整性,其组成成员质和量的改变都可能引起复合体的功能异常,导致细胞的脱离、侵袭和转移。已有研究证实,随着实体肿瘤的生长,其组织内部普遍缺氧,

作者简介:林 爽(1977-),女,河北省唐山市人,博士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。电话:13110221225,E-mail: cqls2002@126.com

通讯作者:李 力,电话:(023)68757249

收稿日期:2006-11-14;修回日期:2007-05-06

肿瘤中心缺氧后，肿瘤细胞代谢失衡，导致细胞间黏附力下降，细胞脱落并黏附于血供丰富地区是低氧导致肿瘤侵袭、转移的重要依据。

本研究通过对不同氧浓度下宫颈癌 HeLa 细胞侵袭、转移能力的研究，以探讨低氧对肿瘤细胞侵袭转移能力的影响及其可能机制。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

宫颈癌 HeLa 细胞由本室培养，Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司，反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。HIF-1α 引物为 5′-CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT-3′，5′-CTCAAAGTCGGACAGCCTCA-3′(390 bp)；β-actin 引物为 5′-CACGGCTGCTTCCAGCTCCT-3′，5′-CTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3′(650 bp)；E-钙黏蛋白引物为 5′-TAATGGCTTCCCTCTTTCATCTCCT-3′，5′-TGTTGAGA-CTCCTCCATTCCTTCCA-3′(441 bp)，均由上海生物工程有限公司合成。

1.2　细胞准备

细胞复苏后用 DMEM 加 10% FCS 培养，3 d 传 1 代，取对数生长期细胞，0.25% Trypsin 消化后，完全培养基制成单细胞悬液，标准 CO_2 孵箱培养，待细胞贴壁后，取出放入低氧培养箱进行实验，氧浓度分别控制在 5%、3%、1%。

1.3　RT-PCR 法检测 HIF-1α、E-钙黏蛋白 mRNA 表达

低氧箱中的培养 6 h 后 RT-PCR 法检测 HIF-1α mRNA，培养 12 h 后 RT-PCR 法检测 E-钙黏蛋白 mRNA，作半定量分析，每一浓度组检测 6 瓶细胞。取(0.5～1)×10^7细胞，按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA，按反转录试剂盒说明进行逆转录反应，HIF-1α、E-钙黏蛋白 mRNA 的 PCR 反应条件为 94 ℃变性 30 s，(56 ℃ HIF-1α、58 ℃ E-钙黏蛋白)退火 30 s，72 ℃ 2 min，最后 72 ℃延伸 10 min。琼脂糖电泳测定 HIF-1α、E-钙黏蛋白 mRNA 表达，并拍照。

1.4　HeLa 细胞体外侵袭力测定

取对数生长期细胞在无血清培养基中培养 24 h，0.25% Trypsin 消化后，制成 2×10^5/ml 单细胞悬液，加入侵袭小室上层，下室加入 DMEM + 20% FCS，分别在常氧、5% O_2、3% O_2、1% O_2的条件下 37 ℃孵育 24 h。无菌下取出侵袭小室，棉签擦净上室面的人工基质胶和细胞，PBS 漂洗 5 min×2 次，福尔马林固定 30 min 后，苏木精轻度染色约 10 min，自来水浸泡冲洗 15 min，无水酒精脱水，环割取下侵袭小室膜，细胞面朝上浸于二甲苯中透明 2 min，细胞面朝上置于树脂中，盖玻片封片，400 倍光镜下取 5 个视野，计数滤膜下室面的细胞数，取均数。各实验重复 6 次。

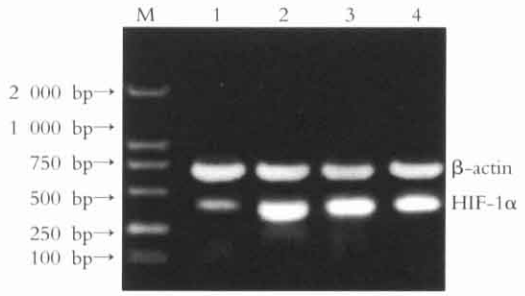
1.5　统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验和相关性分析。

2　结果

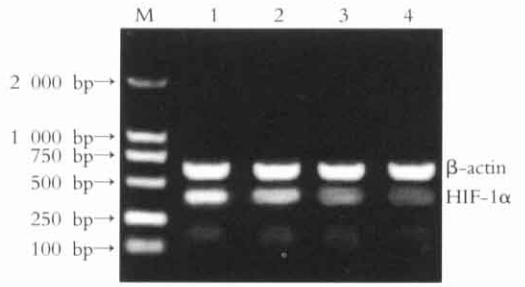
2.1　不同氧浓度条件下 HIF-1α、E-钙黏蛋白表达的情况

常氧、5% O_2、3% O_2、1% O_2条件下 HIF-1α mRNA/β-actin 光密度比值为(0.423 ± 0.116)、(0.764 ± 0.111)、(1.687 ± 0.126)、(0.215 ± 0.099)，随氧分压降低呈现升高后降低的趋势(图 1)。E-钙黏蛋白/β-actin 光密度比值为(1.045 ± 0.171)、(0.719 ± 0.114)、(0.386 ± 0.105)、(0.157 ± 0.063)，随氧分压降低而降低(图 2)。



M：标准；1：1% O_2；2：3% O_2；3：5% O_2；4：常氧

图 1　不同氧浓度下的 HIF-1α RT-PCR 电泳图



M：标准；1：常氧；2：5% O_2；3：3% O_2；4：1% O_2

图 2　不同氧浓度下的 E-钙黏蛋白 mRNA RT-PCR 电泳图

2.2　不同氧浓度条件下肿瘤细胞侵袭力测定结果

常氧、5% O_2、3% O_2、1% O_2条件下细胞侵袭力分别为(112.5 ± 20.7)、(254.3 ± 27.5)、(333.6 ± 45.2)、(124.5 ± 24.6)，随氧分压降低呈现升高后降低的趋势(表 1)。

表 1　不同氧浓度下 E-钙黏蛋白/β-actin mRNA 与细胞侵袭力测定结果(n = 6，$\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1α/β-actin	E-钙黏蛋白/β-actin	细胞侵袭力
常氧组	0.423 ± 0.116	1.045 ± 0.171	112.5 ± 20.7
5% O_2组	0.764 ± 0.111[a]	0.719 ± 0.114[a]	254.3 ± 27.5[a]
3% O_2组	1.068 ± 0.126[ab]	0.386 ± 0.105[ab]	333.7 ± 45.2[ab]
1% O_2组	0.215 ± 0.099[abc]	0.157 ± 0.063[abc]	124.5 ± 24.6b[c]

a：$P < 0.01$，与常氧组相比；b：$P < 0.01$，与 5% O_2 相比；c：$P < 0.01$，与 3% O_2组相比

2.3　相关性分析

经相关分析，E-钙黏蛋白与 HIF-1α 呈负相关(r = −0.432，$P < 0.01$)，细胞侵袭力与 HIF-1α 呈正相关(r = 0.969，$P < 0.01$)。

3　讨论

肿瘤细胞的侵袭、转移主要取决于侵袭启动因素

与抑制因素的平衡。E-钙黏蛋白是由连结素与细胞骨架连接形成的重要的侵袭、抑制复合物。E-钙黏蛋白通过E-钙黏蛋白复合体发挥作用,因此无论是E-钙黏蛋白本身或其他组分的改变均可能影响其功能的发挥,导致其失活而影响细胞间黏附和细胞生长周期。HIF-1α作为细胞氧平衡和缺氧诱导基因表达的中心调节子,能调节多个酶和生长因子,进而促进肿瘤的生长、浸润和转移,并增加肿瘤的放、化疗抵抗性[5]。在影响E-钙黏蛋白复合体功能发挥的多种因素中,肿瘤内部的缺氧问题越来越多地被科学界所重视。Imai等[6]对76例卵巢癌患者进行E-钙黏蛋白及HIF-1α检测表明低氧时HIF-1α能通过其下游因子SNAIL对E-钙黏蛋白复合体的表达进行下调,从而引起卵巢癌的侵袭和转移。也有相关研究表明在缺氧和组织坏死的情况下细胞可以释放EGF和TNF-α增加E-钙黏蛋白复合体的解体,导致细胞侵袭能力增加和β-catenin在细胞内积聚[7]。

本实验采用RT-PCR法检测不同氧分压(常氧、5% O_2、3% O_2、1% O_2)下宫颈癌HeLa细胞中的HIF-1α mRNA的表达水平,由于HIF-1α表达有很强的时间依赖性[8,9],我们选择低氧后6 h作为观察点,实验结果表明,不同的氧浓度对HIF-1α的表达有影响,HIF-1α mRNA的表达随氧分压降低呈现升高后降低的趋势。在1%的氧浓度下反而出现表达的降低。分析其原因可能在严重缺氧时,细胞内能量代谢发生障碍,肿瘤细胞的活性受到了抑制所致。12 h后我们对不同氧分压条件下E-钙黏蛋白mRNA的表达水平,E-钙黏蛋白的表达随氧分压降低而降低,HIF-1α表达的升高和E-钙黏蛋白表达的下降,降低了肿瘤细胞间黏附力,增强了肿瘤细胞侵袭、转移能力。这种变化在侵袭实验中得到证实,5% O_2及3% O_2条件下肿瘤细胞侵袭力均较常氧条件下有明显升高,但是在1% O_2浓度下肿瘤细胞侵袭力反而下降,推测可能在严重缺氧时,细胞内能量代谢发生障碍,甚至细胞的结构也受到较严重的破坏,E-钙黏蛋白、整合素等黏附分子的表达机制受损,由钙黏蛋白及整合素介导的信号通路受损,细胞赖以运动的细胞骨架的成分及功能也可能受到严重损伤,最后导致癌细胞生长增殖能力、迁移浸润能力等随之下降。

本研究还显示,在氧分压为常氧、5% O_2、3% O_2时其表达水平与HIF-1α的表达水平呈负相关,并且E-钙黏蛋白表达的改变与HIF-1α呈现一定的时间依赖性,提示在低氧条件下,HIF-1α可能对E-钙黏蛋白起一定的调控作用。最近研究表明活化的HIF-1α可与缺氧反应元件结合,促进许多相关基因的转录,也可调节细胞外基质(ECM)和VEGF诱导的内皮细胞的趋触和趋化作用[10]。也有研究表明在缺氧和组织坏死的情况下细胞可以释放EGF和TNF-α[11]增加E-钙黏蛋白复合体的解体,导致细胞侵袭能力增加和β-catenin在细胞内积聚,并且E-钙黏蛋白的负性调控元件SNAIL因子恰好是HIF-1α的低氧反应元件,推测低氧情况下HIF-1α可能是通过提高SNAIL的表达水平来影响E-钙黏蛋白功能的发挥,进而导致肿瘤发生侵袭/转移。目前对低氧条件下HIF-1α促进肿瘤细胞侵袭和转移的信号传导通路尚不清楚,有待进一步研究,针对HIF-1α的深入研究将为宫颈癌的诊治提供重要线索。

参考文献:

[1] 蒋春华, 高钰琪, 黄庆愿, 等. 人HIF-1α基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(20): 2040-2043.

[2] Sanchez-Puig N, Veprintsev D B, Fersht A R. Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53[J]. Mol Cell, 2005, 17(1): 11-21.

[3] 林 爽, 李 力, 王 云. 缺氧诱导因子-1α及E-钙黏蛋白在宫颈癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 1026-1029.

[4] Koksal T, Ozcan F, Kilicaslan I, *et al*. Expression of E-cadherin in prostate cancer in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with pathological features[J]. Pathology, 2002, 34(3): 233-238.

[5] 赵 铃, 杜晓兰, 苏 楠, 等. HIF-1α条件性基因敲除嵌合体小鼠的获得[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(14): 1361-1363.

[6] Imai T, Horiuchi A, Wang C, *et al*. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells [J]. Am J Pathol, 2003, 163(4): 1437-1447.

[7] Awaya H, Takeshima Y, Amatya V J, *et al*. Loss of expression of E-cadherin and beta-catenin is associated with progression of pulmonary adenocarcinoma[J]. Pathol Int, 2005, 55(1): 14-18.

[8] Haugland H K, Vukovic V, Pintilie M, *et al*. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 53(4): 854-861.

[9] 孙丽君, 张 梅, 郑 英. 氯丙嗪对体外培养人宫颈癌HeLa细胞株的生长抑制作用[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(2): 344-345.

[10] Kelly B D, Hackett S F, Hirota K, *et al*. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1[J]. Circ Res, 2003, 93(11): 1074-1081.

[11] Furbert-Harris P M, Parish-Gause D, Hunter K A, *et al*. Activated eosinophils upregulate the metastasis suppressor molecule E-cadherin on prostate tumor cells[J]. Cell Mol Biol (Noisy le grand), 2003, 49(7): 1009-1101.

(编辑 邓强庭)