文章编号:1000-5404(2007)23-2257-04

论著

低氧对人结肠癌细胞HT-29体外侵袭转移潜能的影响

杨庆强,张才全,唐 华 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要: 目的 探讨低氧与人结肠癌细胞HT-29恶性转化的关系,检测骨桥蛋白(osteopontin,OPN)、细胞核内核转录因子(NF-κB/p65)表达和MMP-2、MMP-9活性变化,以探索其恶性转化的潜在机制。**方法** 参照体内肿瘤的氧分压,建立低氧模型。MTT比色试验测定HT-29细胞的异质性黏附能力,Transwell侵袭试验判定其侵袭游走能力;将HT-29细胞低氧处理0、6、12、24、48 h,明胶酶谱分析检测分泌的MMP-2、MMP-9活性变化,RT-PCR和Western blot检测OPN mRNA和蛋白表达,提取细胞核蛋白,Western blot检测细胞核内NF-κB/p65蛋白表达。**结果** 低氧诱导24 h后,HT-29细胞的异质性黏附能力、侵袭游走能力显著增加。低氧下6 h,MMP-2、MMP-9活性无明显变化,随着低氧时间的延长,其活性逐渐显著上调,24 h达顶峰,48 h与24 h无显著性差异。HT-29细胞在低氧的诱导下,其OPN mRNA和蛋白以及细胞核内NF-κB/p65蛋白的表达趋势与MMP-2、MMP-9活性变化趋势类同。**结论** 低氧能诱导HT-29细胞异质性黏附能力、侵袭游走能力显著增加,MMP-2、MMP-9活性上调而促使其向恶性表型转化。OPN- NF-κB可能是低氧下继HIF-1之外的另一重要调节途径,该途径与低氧诱导的恶性表型有密切关系。

关键词: 低氧;骨桥蛋白;核转录因子;恶性转化
中图法分类号: R364.4; R73-37; R735.35 **文献标识码**: A

Effects of moderate hypoxia on invasion and metastasis of colon carcinoma cell line HT-29 *in vitro*

YANG Qing-qiang, ZHANG Cai-quan, TANG Hua (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between moderate hypoxia and maliglant transformation of colon carcinoma cell line HT-29. **Methods** Hypoxic conditions were produced according to $p(O_2)$ of tumor *in vivo*. The heterotypic adhesiveness of HT-29 cells was detected by MTT assay. Their reaction to the hypoxic environment was determined *via* invasion across a Matrigel-coated Transwell filter. At 0, 6, 12, 24 and 48 h after hypoxia, MMP-2/9 activities were assessed by gelatin zymography, and osteopontin mRNA and protein levels by RT-PCR and Western blot respectively. NF-κB/p65 levels in nucleus was measured by Western blot after extraction of nucleic protein. **Results** After 24-hour moderate hypoxia, the heterotypic adhesiveness and invasive capacity of HT-29 cells were significantly enchanced. MMP-2, MMP-9 activities under moderate hypoxia for 6 h showed no significant change as compared with that under normoxia, then gradually up-regulated and reached the peak at 24 h. They showed no significant difference between 24 h and 48 h after hypoxia. The expression trend of osteopontin mRNA, protein and NF-κB/p65 protein in nucleus was similar to that of MMP-2, MMP-9 under moderate hypoxia. **Conclusion** Moderate hypoxia could induce maliglant transformation in HT-29 cells through enhancing heterotypic adhesiveness and invasive capacity and upregulating MMP-2, MMP-9 activities. OPN-NF-κB may be an important regulatory pathway besides HIF-1 under hypoxic condition, which involves maliglant phenotype induced by moderate hypoxia.

Key words: moderate hypoxia; osteopontin; nuclear factor kappa B; malignant transformation

在实体肿瘤的恶性演进中,细胞外间质微环境起着重要的调控作用。肿瘤组织的氧分压[$p(O_2)$]为0~20 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),而正常组织则为40 mmHg以上,低氧乃实体肿瘤物理微环境的基本特

作者简介:杨庆强(1974-),男,四川省宝兴县人,博士研究生,主治医师,主要从事胃肠肿瘤方面的研究。电话:13206141259
通讯作者:张才全,电话:(023)89013259,E-mail:zhangyu0323@21cn.com
收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-04-18

征[1]。严重缺氧时氧分压[即 $p(O_2)$ =0.08 mm Hg]细胞膜 Na^+-K^+ 泵功能低下,溶酶体破裂,并激活核酸内切酶,引发细胞坏死、凋亡[2]。我们在前期的研究中,以培养液的氧分压为标准,参照体内肿瘤的氧分压分布,予以轻微缺氧刺激,比较了常氧、培养液 $p(O_2)$ 为20 mmHg 和 $p(O_2)$ 为5 mmHg 条件下 HT-29 细胞的生长活力。结果显示:培养液 $p(O_2)$ 为 20 mmHg 组 HT-29 细胞生长活力最强,$p(O_2)$ 为 5 mmHg 组最弱。低氧可能经某种机制促进肿瘤发生恶性转化,其中研究较多的当数缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)。低氧时是否还存在另外一条非 HIF-1 调节途径,学者们众说纷纭。Le 等[3]报道骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是另一重要的缺氧诱导基因。作为内源性肿瘤缺氧标志物,血清中 OPN 水平与微电极测定的肿瘤内氧分压及预后密切相关。本实验中进一步探究在培养液 $p(O_2)$ 为 20 mmHg 条件下 HT-29 细胞的侵袭能力,检测其 OPN 和 NF-κB 的表达水平,初步探讨低氧与肿瘤恶性转化的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞株 HT-29、小鼠成纤维细胞株 NIH3T3 由重庆医科大学病理生理学教研室提供;羊抗人 OPN(Santa Cruz 公司);兔抗人 NF-κB/p65 多克隆抗体(Neomarkers 公司);RT-PCR 试剂盒(杭州博日公司);明胶(Sigma 公司);侵袭小室(Costar 公司);matrigel 基底膜基质(BD 公司);含 4.8% O_2、90.2% N_2 和 5% CO_2 三元混合气体;自行设计低氧培养装置:粗输血针在 4side-locked 密闭盒转注 4 个孔,502 胶封闭其周,输血针尾接输液管,三通阀。4 个孔分别用作入气口、出气口、接真空泵、抽吸培养液留作血气分析。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HT-29 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中贴壁生长。分为对照组和低氧组。对照组置于常氧下、37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。在前期的实验中,我们用溶解氧测定仪实时监测,已摸索出持续低流量灌注 4.8% O_2,培养液氧分压恒定于 20 mmHg 的方法。低氧条件参照文献[4]并稍作改进,将密闭培养装置置于 37 ℃恒温水浴箱内,真空泵反复 3 次抽尽密闭培养装置内空气,打开出气口阀门,从入气口输入含 4.8% O_2、90.2% N_2 和 5% CO_2 的混合气体 20 min(流速 3 L/min),气体达到平衡后降低混合气流速至0.1 L/min,维持装置内低氧状态,低氧组细胞置于此装置内培养。

1.2.2 细胞黏附力检测 用无血清 RPMI1640 1∶3稀释 matrigel,以 20 μl/孔加入到 96 孔培养板。对数生长期 HT-29 细胞分别在常氧、低氧下培养 48 h 后,调整细胞密度为 5×10^5/ml,200 μl/孔接种于 96 孔培养板常规培养。对照组和低氧组细胞均设对照和 30、60、90、120 min 时段组。于各时段点吸弃培养液及悬浮细胞,PBS 冲洗,加入 200 μl 无血清 RPMI1640、20 μl MTT 培养 4 h,加入二甲亚砜(DMSO)200 μl,酶联免疫检测仪于波长 570 nm 处测定各孔吸光度值[$D(570)$]。

细胞黏附率 = 实验组 $D(570)$/对照组 $D(570)\times100\%$

1.2.3 细胞体外侵袭能力检测 将 matrigel 100 μg/小室均匀的铺在 Transwell chamber 膜上,37 ℃包被聚合后,每孔上室准确加入细胞 6×10^4 个(RPMI1640 液 200 μl),下室加入 600 μl 趋化因子(预先制备的 NIH3T3 细胞无血清培养上清液),对照组和低氧组分别在常氧、低氧下培养 24 h。培养结束后将 Transwell 上室的附着细胞用湿棉签擦去,苏木精染色,封片后 200 倍显微镜下计数穿过微孔膜的细胞数。

1.2.4 明胶酶谱分析 待测细胞以 10^6/孔、10% FBS/RPMI1640 接种到 6 孔板内过夜培养。次日用 0.01 mmol/L PBS(pH 7.4)洗涤后,用无血清 RPMI1640 分别在常氧、低氧下培养,各组均分为 0、6、12、24、48 h 时段组。于各时段点收集上清液,明胶酶谱检测参照文献[5]进行,用 Bio-Rad 的图像处理系统对负染条带进行扫描并定量分析,负染条带的大小、亮度反映 MMP-2、MMP-9 的活性。

1.2.5 半定量 RT-PCR 分析 分成低氧 0、6、12、24、48 h 5 个时段组。在 GenBank 序列数据库中查询 OPN 基因序列 NM_000582,用 Primer 5.0 软件自行设计引物序列,上游引物:5′-ACCCTTCCAAGTAAGTCCAAC-3′,下游引物:5′-GGTGATGTCCTCGTCTGTAGC-3′,预计扩增片段为 354 bp。内参 β-actin 的上游引物:5′-TTGTAACAAACTGGGACGATATGG-3′,下游引物:5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAG-3′,预计扩增片段为 764 bp。反应条件:94 ℃变性 3 min;94 ℃变性 45 s,53 ℃退火复性45 s,72 ℃延伸 45 s,共 32 个循环后再 72 ℃延伸 5 min。凝胶内 PCR 产物在 Bio-Rad 的 UVI图像处理系统上分析、计算。

1.2.6 Western blot 分析 分组同 1.2.5。不同时间低氧后,分别收集约 1×10^7 个细胞,参照细胞核蛋白/细胞质蛋白抽提试细胞质剂盒说明书,提取细胞质蛋白、核蛋白分别用于检测 OPN、NF-κB/p65。蛋白样品加入 1/5 体积的 5×上样缓冲液,进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4 ℃孵育过夜,β-actin 作内参照。二抗 37 ℃孵育 1 h,膜上均匀滴加 ECL 发光试剂,在 Bio-Rad 图像处理系统 Hi sensitivity 模式下连续曝光显影,对蛋白条带进行灰度相对强度测定。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SAS 9.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 低氧对 HT-29 细胞黏附能力的影响

随着时间的延长,HT-29 细胞的黏附率逐渐提高。低氧处理后的细胞在各时段的黏附率均明显高于对照组。低氧能诱导 HT-29 细胞与基质的异质性黏附能力增加。见表 1。

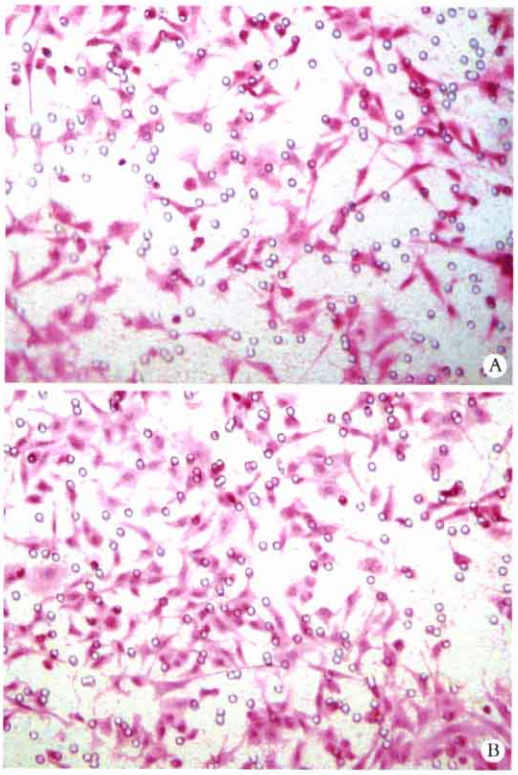
表 1 HT-29 细胞在不同氧环境的黏附率[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	29.36±0.78	53.28±0.64	62.85±0.93	75.42±0.87
低氧组	40.21±0.69[a]	66.57±0.86[a]	78.39±0.76[a]	89.25±0.36[a]

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.2　低氧对 HT-29 细胞侵袭游走能力的影响

低氧下 24 h HT-29 细胞穿过微孔膜的细胞数为(185.6 ± 8.4)，对照组为(103.7 ± 6.2)。低氧能显著促进对 HT-29 细胞的侵袭游走能力，其差异具有统计学意义($P<0.01$)。见图 1。



A：对照组；B：低氧组

图 1　低氧对 HT-29 细胞侵袭游走能力的影响　(HE × 200)

2.3　低氧下基质金属蛋白酶活性的变化

明胶酶谱分析呈现相对分子质量为 66×10^3 和 72×10^3 的 MMP-2 及其前体、92×10^3 的 MMP-9 溶解明胶后的负染条带，尤以前者为著。常氧下，HT-29 细胞无血清培养液中具有一定水平活性的 MMP-2 及其前体和 MMP-9，低氧 6 h，其活性无明显变化。尔后随着低氧时间的延长，其活性逐渐上调，24 h 达顶峰，48 h 与 24 h 相比无显著差异($P>0.05$)，低氧各时段组除 6 h 外，其活性均较对照组显著增加($P<0.05$)(图 2)。在短暂适应低氧后，HT-29 细胞在低氧的诱导下能明显上调其分泌的明胶酶活性。

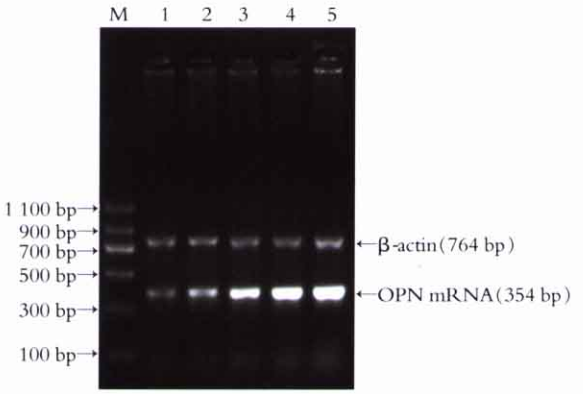


M：标准；1：常氧 0 h；2：常氧 6 h；3：常氧 12 h；4：常氧 24 h；5：常氧 48 h；6：低氧 6 h；7：低氧 12 h；8：低氧 24 h；9：低氧 48 h

图 2　低氧及对照组各不同时段 HT-29 细胞分泌的明胶酶谱

2.4　低氧下 HT-29 细胞 OPN mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示：对照组及低氧各时段组均分别在 354、764 bp 出现特异性的 OPN 基因条带和内参照 β-actin 条带。对照组 HT-29 细胞在常氧下呈低水平表达 OPN，其表达趋势与 MMP-2、MMP-9 活性变化趋势类似(图 3)。HT-29 细胞在低氧的诱导下可明显上调其 OPN mRNA 的表达水平。



M：标准；1：低氧 0 h；2：低氧 6 h；3：低氧 12 h；4：低氧 24 h；5：低氧 48 h

图 3　半定量 RT-PCR 检测低氧不同时段 HT-29 细胞 OPN mRNA 表达

2.5　低氧下 HT-29 细胞 OPN、NF-κB 蛋白的表达

Western blot 结果显示：HT-29 细胞细胞质内的 OPN、细胞核内的 NF-κB/p65 在常氧下呈低水平表达，其表达趋势也与 MMP-2、MMP-9 活性变化趋势类同。低氧在诱导细胞质内 OPN 表达的同时，也增加了细胞核内 NF-κB/p65 的表达。

3　讨论

肿瘤发生缺氧是一个长期、循序渐进的过程，缺氧对肿瘤的影响是多方面的。严重的缺氧会导致细胞膜 Na^+-K^+ 泵功能低下，溶酶体破裂，引发细胞坏死。在适度缺氧的应激反应下，肿瘤细胞的起始因子-2α 被磷酸化，大多数蛋白质的翻译被抑制；另一方面，特定的缺氧诱导蛋白合成增加，由此基因表达和表型出现转变，致肿瘤细胞的生物学行为发生改变，该反应受缺氧程度及时间的影响[6,7]。

我们以常氧作为对照，发现低氧能诱导 HT-29 细胞与基质金属蛋白酶的异质性黏附能力增加、侵袭游走能力增强。肿瘤瘤体内 $p(O_2)$ 20 mmHg 位于瘤体边缘，这就提示，位于瘤体边缘的肿瘤细胞在低氧的诱导下更富有侵袭性，低氧参与了肿瘤的恶性转化。

在肿瘤的侵袭、转移中，MMP-2、MMP-9 的作用往往取决于其活性，其次才是量的增加。Ridgway 等[5]将结肠癌细胞 SW1222、乳腺癌细胞 MDA-MB231、胰腺癌细胞 PSN-1 置于 1% O_2、94% N_2 和 5% CO_2 的环境中低氧培养 24 h，癌细胞穿过 matrigel 的能力增强，同

时伴随 MMP-2、MMP-9 活性上调，该低氧诱导的侵袭力可被明胶酶抑制剂阻抑。我们将 HT-29 细胞置于培养液 $p(O_2)$ 为 20 mmHg 的环境中培养，进一步探讨 MMP-2、MMP-9 活性与低氧之间的时效关系，明胶酶谱分析检测出：在低氧 6 h，HT-29 细胞分泌的 MMP-2、MMP-9 活性无明显变化，经历短暂适应后，12 h 时其活性才逐渐上调，在低氧 24 h 时达到顶峰。在 24 h 的 Transwell 试验中，低氧组 HT-29 细胞侵袭游走能力强于对照组，此即低氧组细胞分泌高活性的 MMP-2、MMP-9，降解Ⅳ型胶原所致。

与尿激酶型胞浆素原活化物（uPA）不同，基质金属蛋白酶（MMPs）因缺乏 HRE 而不受 HIF-1α 的调控，鉴于此，缺氧时可能存在另外一条非 HIF-1α 的途径调控肿瘤细胞的侵袭能力。Le 等[3]报道 OPN 是另一重要的缺氧诱导基因，并缺乏 HRE。Zhu 等[8]将头颈鳞癌细胞 SSC4、SCC22B 低氧培养 24 h，检测到其 OPN mRNA 和蛋白表达量与低氧时间呈现较好的时间依赖性，并发现低氧下 OPN 表达上调并非增加了 mRNA 的稳定性，而是诱导了 OPN 的转录。本实验氧浓度较之稍高，低氧时间更长，用 RT-PCR 和 Western blot 半定量检测 HT-29 细胞在低氧不同时段 OPN mRNA 和蛋白表达水平，其表达在低氧 6 h 后无明显变化，可能是 HT-29 细胞对低氧的短暂适应，尔后逐渐升高，24 h 达最高点，延长低氧至 48 h，OPN 并未再增加，表明低氧同样能诱导 HT-29 细胞 OPN 的表达上调，但也存在一定的限度。OPN 是一种起多重作用的磷酸化糖蛋白，介导肿瘤细胞的黏附、迁移，诱导分泌蛋白水解酶，参与血管生成。Agrawal 等[9]利用基因芯片技术，在各种临床分期的大肠癌标本上对 12 000 种基因进行筛查，发现 OPN 是与大肠癌发生、发展和侵袭相关的居第 1 位的肿瘤分子标记物。因此，我们有理由推测：低氧下表达增高的 OPN 与肿瘤细胞的高侵袭性有关，参与了肿瘤的恶性转化。

OPN 还可与其整合素受体 α1β3 结合，激活核转录因子（NF-κB）。NF-κB 已被证实是缺氧激活的转录因子，可抑制凋亡，促进肿瘤的浸润和转移[10]。我们参照文献[11]提取细胞核蛋白，应用 Western blot 检测到低氧不同时段细胞核的 NF-κB/p65 存在差异表达，提示 HT-29 细胞细胞质中的 NF-κB/p65 在低氧刺激下，可能经某些因子的介导，由细胞质向细胞核转移，位于细胞核、具有转移活化特性的 NF-κB/p65 进而诱导下游基因的表达。OPN 可与整合素受体 α1β3 结合，进而激活 NF-κB，后者与 MMP-9 启动子结合，借此，MMP-9 的分泌得以完成，NF-κB 还诱导产生 MT1-MMP，从而使 MMP-2 的活性增强[12,13]。本实验检测到在低氧下 OPN，细胞核中 NF-κB/p65 和 MMP-2、MMP-9 的活性普遍上调，且时限同步。因此，我们推测：OPN-NF-κB 有可能是低氧下继 HIF-1 之外的另一重要调节途径，鉴于其多重作用性，该途径在对低氧下肿瘤生物学行为，尤其是侵袭能力的调控中可能扮演关键角色。

参考文献：

[1] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.

[2] Nagarajah N S, Vigneswaran N, Zacharias W. Hypoxia-mediated apoptosis in oral carcinoma cells occurs *via* two independent pathways[J]. Mol Cancer, 2004, 3(1): 38.

[3] Le Q T, Sutphin P D, Raychaudhuri S, *et al*. Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 59-67.

[4] Fukuda R, Hirota K, Fan F, *et al*. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(41): 38205-38211.

[5] Ridgway P F, Ziprin P, Alkhamesi N, *et al*. Hypoxia augments gelatinase activity in a variety of adenocarcinomas *in vitro*[J]. J Surg Res, 2005, 124(2): 180-186.

[6] Koumenis C, Wouters B G. "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways [J]. Mol Caner Res, 2006, 4(7): 423-436.

[7] 李俊生，汤文浩，嵇振岭. 结直肠癌发生的基因机制[J]. 实用临床医药杂志, 2004, 8(6): 10-12.

[8] Zhu Y, Denhardt D T, Cao H, *et al*. Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells *via* a Ras-activated enhancer[J]. Oncogene, 2005, 24(43): 6555-6563.

[9] Agrawal D, Chen T, Irby R, *et al*. Osteopontin identified as lead marker colon cancer progression, using pooled sample expression profiling [J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(7): 513-521.

[10] Dragowska W H, Warburton C, Yapp D T, *et al*. HER-2/neu overexpression increases the viable hypoxic cell population within solid tumors without causing changes in tumor vascularization [J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(11): 606-619.

[11] Maihofner C, Charalambous M P, Bhambra U, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(4): 665-671.

[12] Zhang H, Ma G, Dong M, *et al*. Epidermal growth factor promotes invasiveness of pancreatic cancer cells through NF-kappaB-mediated proteinase productions[J]. Pancreas, 2006, 32(1): 101-109.

[13] Park J M, Kim A, Oh J H, *et al*. Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(4): 837-847.

（编辑 王小寒）