文章编号:1000-5404(2008)08-0721-03

论著

缺氧应激对人肝癌细胞黏附、侵袭和迁移能力的影响

卢根林[1],邓 勇[2],樊海宁[2],秦 伟[2],曹 越[1],张永健[1],格日力[1],任 利[2] (青海大学:[1]医学院,[2]附属医院普通外二科,西宁 810001)

摘 要:目的 探讨缺氧应激对人肝癌细胞HepG2黏附、侵袭和迁移能力的影响。**方法** 缺氧(5% O_2、5% CO_2、90% N_2)和常氧培养HepG2细胞。细胞-基质黏附实验测定常氧组和缺氧4、12、24h组HepG2细胞黏附能力;细胞侵袭和迁移实验测定缺氧和常氧24 h组HepG2细胞侵袭和迁移能力;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定常氧组和缺氧4、12、24 h组HepG2细胞缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor,HIF)-1α mRNA的表达量。**结果** 随着缺氧时间的延长HepG2细胞的黏附能力明显增强($P<0.01$),缺氧24 h组HepG2细胞侵袭和迁移能力明显高于常氧组($P<0.01$)。常氧下HepG2细胞不表达HIF-1α mRNA,缺氧4 h时HIF-1α mRNA表达量最高,随后下降($P<0.01$),但仍高于常氧组。**结论** 缺氧应激上调HepG2细胞HIF-1α mRNA的表达,促进HepG2细胞黏附、侵袭和迁移。

关键词: 缺氧应激;肝脏癌细胞;黏附;侵袭;迁移
中图法分类号: R364.4;R73-37;R735.7 **文献标识码:** A

Effects of hypoxia stress on adhesion, invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cell HepG2

LU Gen-lin[1], DENG Yong[2], FAN Hai-ning[2], QIN Wei[2], CAO Yue[1], ZHANG Yong-jian[1], GE Ri-li[1], REN Li[2] ([1]Medical College of Qinghai University, [2]The Second Department of General Surgery, The Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

Abstract: Objective To investigate whether hypoxia stress enhances adhesion, invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cell HepG2 or not. **Methods** HepG2 cells were cultured under hypoxia (5% O_2, 5% CO_2 and 90% N_2) for 4, 12, 24 h or normoxia. The adhesion of HepG2 cells was studied by cell-matrix adhesion assay. Cell invasion and migration assay was used to determine the changes in invasion and migration of HepG2 cells respectively. The expression of HIF-1α mRNA in HepG2 cells was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The adhesion of HepG2 cells was gradually enhanced with the increasing hypoxia time ($P<0.01$). The invasion and migration of HepG2 cells after 24-hour hypoxia was significantly higher than that after 24-hour normoxia ($P<0.01$). The expression of HIF-1α mRNA reached the highest level when the cells were exposed to hypoxia for 4 h, then decreased, but still higher than that in normoxia ($P<0.01$). **Conclusion** Hypoxia stress upregulates the expression of HIF-1α mRNA, and enhances the adhesion, invasion and migration of HepG2 cells.

Key words: hypoxia stress; hepatocellular carcinoma cell; adhesion; invasion; migration

缺氧是实体瘤局部微环境的基本特征之一[1]。肿瘤侵袭、转移是多因素、多步骤的生物学过程,其发生有赖于肿瘤细胞运动侵袭能力增强、不同时相细胞黏附与解黏附、降解并穿过细胞外基质进入血液和淋巴循环。本实验探讨缺氧应激(5% O_2)对HepG2细胞黏附、侵袭和迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株HepG2引自兰州军区总医院实验科(来源于美国国立肿瘤研究所),胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品,MTT、DMSO、牛清白蛋白(BSA)和胰蛋白酶均为美国Sigma产品,基质胶(Matrigel)购于北京大学医学部药物研究所,纤维黏连蛋白(Fibronectin)为美国Chemicon公司产品,Transwell小室购于Costar公司,RT-PCR Kit购于TaKaRa公司,Trizol为Invitrogen公司产品。人HIF-1α[2]和β-肌动蛋白

基金项目:青海省卫生厅2006年指导性科研项目(200601)
Supported by the Scientific Research Project of Public Health Department of Qinghai (200601)
作者简介:卢根林,男,浙江省衢州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事普外疾病的临床和基础方面的研究。电话:(0971)6102714, E-mail: lugenlin007@163.com
通信作者:邓 勇,电话:(0971)6162560
樊海宁,电话:(0971)6162560, E-mail: fanhaining@medmail.com.cn
收稿日期:2007-09-21;修回日期:2007-11-10

(β-actin[2])基因聚合酶链反应引物序列如下:HIF-1α 上游引物 5′-GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC-3′,下引物 5′-GTTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG-3′,目的片段长度为 487 bp;β-actin 上游引物 5′-GTACCACTGGCATCGTGATGGACT-3′,下游引物 5′-ATCCACACGGAGTACTTGCGCTCA-3′,目的片段长度为 600 bp,由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞培养及实验分组 人 HepG2 细胞置灭活 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,每 3 ~ 5 天传代 1 次。缺氧 4、12、24 h 组 HepG2 细胞置 37 ℃、5% O_2、5% CO_2、90% N_2 三气培养箱中分别培养 4、12、24 h。

1.2.2 RT-PCR Trizol 一步法提取细胞总 RNA,电泳见 28S、18S 条带,以 2.5 μg 总 RNA 为模板,以 TaKaRa 公司的 Random Premier 为引物进行逆转录反应合成 cDNA。HIF-1α 和 β-actin PCR 的反应条件为:95 ℃ 预变性 3 min 后,95 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 50 s 共 28 个循环,72 ℃ 延伸 7 min。行 2% 琼脂糖凝胶电泳,以 HIF-1α/β-actin 值表示 HIF-1α mRNA 含量。

1.2.3 细胞-基质黏附实验[3] 将 Fibronectin 或 Matrigel (5.0 μg/孔)包被于 96 孔板孵育(37 ℃) 24 h,加入 1% BSA RPMI1640(50 μl/孔)孵育(37 ℃)1 h,PBS 洗 3 次。消化缺氧 4、12、24 h 和常氧组 HepG2 细胞、计数并以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中,37 ℃ 孵育 1 h,每组设平行 6 个孔。PBS 轻洗 3 次,每孔加 100 μg MTT 孵育(37 ℃)4 h,弃取 MTT,加 100 μl DMSO 震荡 10 min,置 ELx800 酶标仪上选择 490 nm 波长读吸光度[D(490)]。

1.2.4 细胞侵袭实验[4] Matrigel(30 μg/孔)铺于 Transwell 小室 8 μm 聚碳酸酯微孔滤膜上、过夜干燥并水化 Matrigel。Transwell 上室为 2×10^5 个 HepG2 细胞(细胞活力 > 95%),下室为含 10 μg/ml Fibronectin 完全培养基 600 μl,每组设 6 个平行孔,37 ℃ 常氧或缺氧孵育 24 h。取出 Transwell 小室,PBS 洗 2 次,用灭菌棉签擦去滤膜上表面未穿膜的细胞和 Matrigel,95% 酒精固定 15 min,HE 染色,选择 10 个视野(×100)并计数。

1.2.5 细胞迁移实验[5] Transwell 上室为 2×10^5 个 HepG2 细胞(细胞活力 > 95%),下室为含 10 μg/ml FN 完全培养基 600 μl,每组设 6 个平行孔,37 ℃ 常氧或缺氧孵育 24 h。取出 Transwell 小室, PBS 洗 2 次, 用灭菌棉签擦去滤膜上表面未穿膜的细胞,95% 酒精固定 15 min,HE 染色,选择 10 个视野(×100)并计数。

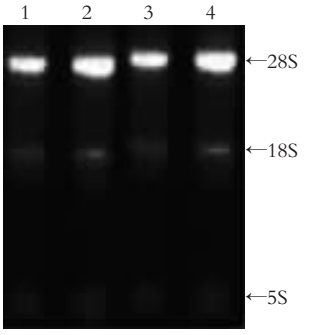
1.3 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较用 t 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析,多样本均数间两两比较用 q 检验。

2 结果

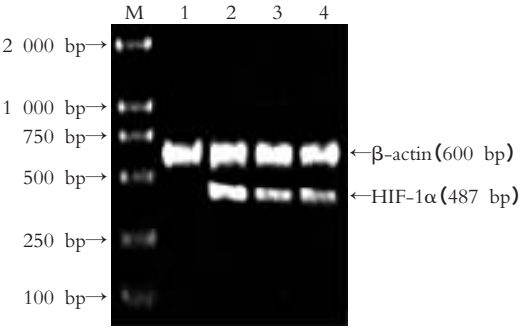
2.1 HepG2 细胞 HIF-1α mRNA 表达

图 1 示:常氧组和缺氧 4、12、24 h 组总 RNA 的 28S/18S = 2:1,表明所提取的总 RNA 完整性好,可用于 RT-PCR 实验。图 2 和表 1 示:常氧下 HepG2 细胞不表达 HIF-1α mRNA,缺氧 4 h 时 HIF-1α mRNA 表达量最高,随后下降($P < 0.01$)但仍高于常氧组。提示缺氧应激上调 HepG2 细胞 HIF-1α mRNA 表达。



1: 常氧组; 2:缺氧 4 h 组; 3: 缺氧 12 h 组; 4: 缺氧 24 h 组

图 1 实验各组 HepG2 细胞总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图



M: DNA 标准(DL 2000); 1: 常氧组; 2: 缺氧 4 h 组; 3: 缺氧 12 h 组; 4: 缺氧 24 h 组

图 2 HepG2 细胞 HIF-1α mRNA 表达

表 1 缺氧应激对 HepG2 细胞 HIF-1α mRNA 表达、HepG2 细胞与 Fibronectin 和 Matrigel 黏附力的影响($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1α mRNA 表达	与 Fibronectin 的黏附力[D(490)]	与 Matrigel 的黏附力[D(490)]
常氧组	0	0.65 ± 0.08	0.47 ± 0.07
缺氧 4 h 组	0.84 ± 0.03	1.05 ± 0.09[c]	0.98 ± 0.08[c]
缺氧 12 h 组	0.68 ± 0.03[a]	1.86 ± 0.16[ca]	1.55 ± 0.11[ca]
缺氧 24 h 组	0.51 ± 0.02[ab]	2.83 ± 0.12[abc]	2.64 ± 0.14[abc]

a: $P < 0.01$,与缺氧 4 h 组比较; b: $P < 0.01$,与缺氧 12 h 组比较; c: $P < 0.01$,与常氧组比较

2.2 细胞-基质黏附实验

缺氧应激使人肝癌细胞 HepG2 对 Fibronectin 和 Matrigel 的黏附能力随缺氧时间的延长而增强($P < 0.01$)。见表 1。

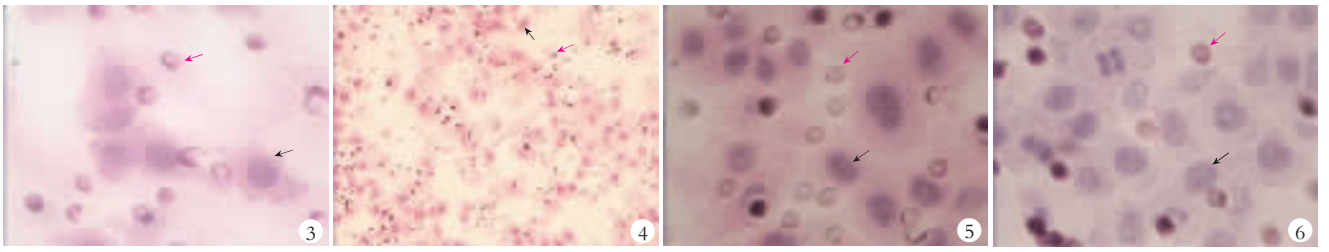
2.3 细胞侵袭和迁移实验

图 3、5、6 示: HE 染色下 HepG2 细胞核浆比例增大,核深染、大小、形态和染色不一,核分裂像增多并可见病理性核分裂像:巨核、双核、多核。图 3 ~ 6 和表 2 示:缺氧 24 h 组侵袭和迁移能力明显强于常氧 24 h 组($P < 0.01$)。

表 2 缺氧应激对 HepG2 细胞侵袭和迁移能力的影响($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	侵袭细胞数	迁移细胞数
常氧 24 h 组	55 ± 5	134 ± 12
缺氧 24 h 组	91 ± 3[a]	230 ± 14[a]

a: $P < 0.01$,与常氧 24 h 组比较



红箭头表示 Transwell 小室聚碳酸酯膜上的微孔,黑箭头表示Transwell 小室聚碳酸酯膜背面的 HepG2 细胞

图 3　常氧 24 h 组穿过 Matrigel 和 Transwell 小室微孔并附于聚碳酸酯膜背面的 HepG2 细胞　(HE ×400)

图 4　缺氧 24 h 组穿过 Matrigel 和 Transwell 小室微孔并附于聚碳酸酯膜背面的 HepG2 细胞　(HE ×100)

图 5　常氧 24 h 组穿过 Transwell 小室微孔并附于聚碳酸酯膜背面的 HepG2 细胞　(HE ×400)

图 6　缺氧 24 h 组穿过 Transwell 小室微孔并附于聚碳酸酯膜背面的 HepG2 细胞　(HE ×400)

3　讨论

HIF-1 是由 Semenze 在缺氧诱导的细胞核提取物中发现的一种转录因子,缺氧时细胞高表达 HIF-1α,转位到细胞核内与 HIF-1β 形成异二聚体 HIF-1。HIF-1 与靶基因的启动子或增强子上的缺氧反应元件(HRE)5′-ACGTGC-3′结合,上调靶基因的表达并介导一系列细胞对缺氧的反应,对维持肿瘤细胞的能量代谢、新血管生成、促进肿瘤增殖和转移起重要作用[1]。本研究结果提示:常氧时 HepG2 细胞不表达 HIF-1α mRNA,缺氧 4 h 时 HIF-1α mRNA 表达量最高,随后下降但仍高于常氧组,与刘凯歌等[6]研究结果相一致。刘凯歌等[6]实验结果示,常氧时 HepG2 细胞几乎不表达 HIF-1α 蛋白,缺氧 1 h 时 HIF-1α 蛋白表达量开始上升,缺氧 8 h 时最高,缺氧 16 h 时开始下降。

肿瘤侵袭、转移是多因素、多步骤的生物学过程,其发生有赖于肿瘤细胞运动侵袭能力增强、不同时相细胞黏附与解黏附、降解并穿过细胞外基质进入血液和淋巴循环[7]。原发性肝癌肝癌组织中存在着缺氧微环境,HIF-1α 表达对肝癌的发生、发展起着重要作用[8]。本研究表明:5% O_2 缺氧应激使 HepG2 细胞对细胞外基质组分 Fibronectin 和 Matrigel 黏附能力较常氧组明显增强,并随缺氧时间延长黏附力而增强;缺氧 24 h 组 HepG2 细胞侵袭和迁移能力明显高于常氧组。缺氧促进肿瘤侵袭和转移的可能机制:①缺氧时肿瘤细胞不表达或低表达 E-钙黏蛋白基因,细胞黏附分子介导的肿瘤细胞间的黏附力减少,肿瘤细胞彼此分散、更易与基底膜和细胞外基质黏附,有利于肿瘤细胞发生侵袭[9]。②缺氧时肿瘤细胞高表达磷酸葡萄糖异构酶/自分泌运动因子、转化生长因子-α、c-Met 等基因,肿瘤细胞与基底膜的黏附更紧密[8]。③缺氧时肿瘤细胞表达组织蛋白酶 D,尿激酶型纤溶酶原激活物受体、基质金属蛋白酶-2 等基因,降解细胞外基质和基底膜,有利于肿瘤细胞移出基底膜层、进入血液和淋巴循环,发生转移[9]。临床上可通过逆转原发性肝癌组织中缺氧微环境以抑制肝癌细胞的黏附、迁移、运动和侵袭能力,从而达到治疗肝癌的目的[10]。

参考文献:

[1] Carmeliet P, Dor Y, Herbert J M, *et al*. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. Nature, 1998, 394(6692): 485 - 490.

[2] Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion[J]. Lab Invest, 2006, 86(12): 1221 - 1232.

[3] Wang T, Ward Y, Tian L, *et al*. CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells[J]. Blood, 2005, 105(7): 2836 - 2844.

[4] Tian B, Li Y, Ji X N, *et al*. Basement membrane proteins play an active role in the invasive process of human hepatocellular carcinoma cells with high metastasis potential[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(2): 80 - 86.

[5] Qiang Y W, Walsh K, Yao L, *et al*. Wnts induce migration and invasion of myeloma plasma cells[J]. Blood, 2005, 106(5): 1786 - 1793.

[6] 刘凯歌, 谢华红, 刘　杰. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与缺氧诱导因子-1α 在肝癌中的表达及可能的调节机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(2): 122 - 126.

[7] 杨　波, 脱朝伟, 张　宁, 等. 靶向端粒酶催化亚单位基因 hEST2 反义寡核苷酸对人肝癌细胞生长的抑制作用[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(5): 369 - 372.

[8] 徐　静, 陈孝平, 秦　诚. Twist、HIF-1α 及 HBx 在原发性肝癌表达及相关性研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2007, 10(1): 37 - 39, 44.

[9] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure N M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression[J]. Nature, 2006, 441(7092): 437 - 443.

[10] Wu X Z, Xie G R, Chen D. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(8): 1178 - 1182.

(编辑　邓强庭)