DOI:10.16016/j.1000-5404.201510122

结直肠癌及缺氧的结直肠癌细胞中 HIF-1α 与 miRNA-200b 表达的相关性

郭 靖,尚杨杨,汪荣泉 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 探讨缺氧诱导因子 HIF-1α 与 miRNA-200b 在结直肠癌及缺氧的结直肠癌细胞中的表达以及两者的相关性。**方法** 采用实时定量 PCR 检测 50 例结直肠癌患者的结直肠癌组织及其癌旁组织中 HIF-1α 与 miRNA-200b 的表达。利用 $CoCl_2$ 构建结肠癌细胞系的缺氧诱导模型,通过实时定量 PCR 和 Western blot 分别测定 缺氧的 Caco-2 细胞中 HIF-1α 和 miRNA-200b 基因表达并确立两者相关性。**结果** HIF-1α 在癌组织中的表达显著高于癌旁组织 ($P<0.01$),miRNA-200b 在癌组织中的表达显著低于癌旁组织($P<0.01$),且 HIF-1α 和 miRNA-200b 在癌组织中的表达呈负相关 ($r=-0.324$, $P<0.05$)。缺氧处理 2 h 后, HIF-1α 表达升高,miRNA-200b 表达降低;随着缺氧时间延长(4 ~ 12 h) HIF-1α 表达逐渐降低,miRNA-200b 的表达缓慢上升;缺氧 16 h,HIF-1α 的表达回升且达到另一个高峰,miRNA-200b 的表达降至最低。Real-time PCR 和 Western blot 联合检测发现,HIF-1α 和 miRNA-200b 表达呈相反的趋势。**结论** HIF-1α 可能通过抑制 miRNA-200b 的表达从而参与结直肠癌上皮细胞 EMT 的过程。

[关键词] 结肠癌;HIF-1α;MiRNA-200b; EMT
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R735.35 [文献标志码] A

Correlation of HIF-1α and miRNA-200b expression in human colorectal cancer tissues and hypoxia-induced colorectal cancer cells

Guo Jing, Shang Yangyang, Wang Rongquan (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of HIF-1α and miRNA-200b in human colorectal cancer tissues and hypoxia-induced colorectal cancer cells and determine their correlation. **Methods** The expression of HIF-1α mRNA and miRNA-200b in 50 colorectal cancer samples and their pericancerous mucosa were detected by quantitative real-time PCR. The cell hypoxia model was established by use of cobalt chloride ($CoCl_2$) in the culture medium. Quantitative real-time PCR and Western blotting were used to detect HIF-1α protein and miRNA-200b level in $CoCl_2$-induced Caco-2 cells. The correlations between HIF-1α mRNA level and miRNA-200b level in human colorectal cancer tissues and between HIF-1α protein level and miRNA-200b level in $CoCl_2$-induced Caco-2 cells were analyzed by Spearman's rank correlation test. **Results** HIF-1α mRNA level in colorectal cancer samples was significantly higher than that in the pericancerous mucosa ($P<0.01$), whereas, miRNA-200b level was significantly lower ($P<0.01$). HIF-1α mRNA level in colorectal cancer samples was negatively correlated with miRNA-200b level ($r=-0.324$, $P<0.05$). HIF-1α protein level in $CoCl_2$-induced Caco-2 cells was increased after exposure to $CoCl_2$ for 2 h, and miRNA-200b level was decreased in 2-h hypoxia. In hypoxia for 4 to 12 h, HIF-1α protein was decreased slowly, whereas miRNA-200b level was increased. Finally, HIF-1α was rapidly increased to the peak after 16-h hypoxia, and on the contrary, miRNA-200b level was decreased rapidly to the lowest level. HIF-1α protein level in $CoCl_2$-induced Caco-2 cells was negatively correlated with miRNA-200b level ($r=-0.7422$, $P<0.05$). **Conclusion** HIF-1α

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81372557)
[通信作者] 汪荣泉,电话:(023):68754124, E-mail: rongquanw@ hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160119.1704.011.html(2016-01-19)

takes part in epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells probably through suppressing the expression of miRNA-200b.

[**Key words**] colorectal cancer; HIF-1α; miRNA-200b; epithelial mesenchymal transition

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81372557). Corresponding author: Wang Rongquan, Tel: 86-23-68754124, E-mail: rongquanw@hotmail.com

低氧是实体肿瘤组织内部普遍存在的现象,且肿瘤细胞的缺氧可能是恶性肿瘤进展的启动因子之一[1-2],低氧使癌细胞更具侵袭性,而上皮-间充质化(epithelial mesenchymal transition,EMT)在肿瘤的侵袭与转移过程中发挥了关键的作用,在这个过程中原发灶的癌细胞由静止的上皮细胞转变成具有迁移能力的间充质细胞从而具有了极强的侵袭性[3-6],近年研究表明 EMT 的发生与肿瘤所处的微环境密切相关[7]。缺氧是结直肠癌最重要的微环境特点之一,HIF-1α 是缺氧反应最关键的转录因子。大量的研究表明 HIF-1α 存在异常表达和患者的术后生存率有关[8]。HIF-1α 作为有效的肿瘤预后标记物[9],在肿瘤的发生、发展中可能起关键作用。同时,在肿瘤中非编码小 RNA 即 MicroRNAs (miRNAs)也参与了 EMT 的过程,并且在 EMT 中发挥了关键的作用,尤其是 MicroRNA-200 家族,MicroRNA-200 家族在侵袭性肿瘤中表达下调,成为 EMT、肿瘤细胞黏附、迁移、侵袭和转移的抑制物,是一种典型的肿瘤抑制基因[10]。关于 MicroRNA-200 家族调控转录因子及靶蛋白的研究有大量文献报道,但其本身在转录水平如何被调控缺乏深入研究。故本研究探讨结肠癌中 HIF-1α 和 miR-200b 之间的联系,为确立 HIF-1α-miR-200b 肿瘤调节通路提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶(购于 HyClone 公司);总 RNA 提取试剂 TRIzol、逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 和实时定量 PCR 试剂 SYBR Ⅱ(购于 TaKaRa 公司),氯化钴 CoCl2 · 6H2O (购于 Sigma 公司);兔抗人 HIF-1α (proteintech,20960-1-AP)、小鼠抗人 β-actin (proteintech,60008-1-lg)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (中杉金桥,ZB-2301)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (碧云天,A0216)。

1.2 组织标本

结直肠癌标本的采集及处理详见文献[11]报道的方法。

1.3 细胞培养及缺氧处理

结肠癌细胞株 Caco-2 购自美国 ATCC 公司,培养于 DMEM 高糖培养液中,每 100 mL 培养基加入 20 mL 胎牛血清,100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱进行培养。细胞生长至 80%,加入 300 μmol/L 浓度的 $CoCl_2$,分别缺氧处理 0、2、4、8、12 h 和 16 h。

1.4 实时定量 PCR 检测 HIF-1α 和 miR-200b 的表达

实时定量 PCR 检测方法、miRNA-200b 的逆转录引物及定量 PCR 引物详见文献[11]。内参 18 s 上游引物:5′-CGGACAGGATTGACAGATTGATAGC-3′,下游引物:5′-TGCCAGAGTCTCGTTCGTTATCG-3′; HIF-1α 上游引物:5′-TGATTGCATCTCCATCTCCTACC-3′,下游引物:5′-GACTCAAAGCGACAGATAACACG-3′; U6 上游引物:5′-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3′,下游引物:5′-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3′; miRNA-200b 上游引物:5′-GGGGTAATACTGCCTGGT-3′,下游引物:5′-TGCGTGTCGTGGCGTC-3′。实验结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行分析处理。

1.5 Western blot 分析

经不同时间点 (0、2、4、8、12、16 h) $CoCl_2$ 缺氧诱导后,加入 2×SDS 裂解液,收集裂解后的细胞于100 ℃变性 5 min,再用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。经半干转膜、封闭后,加入一抗 HIF-1α (1∶1 000)、β-actin (1∶4 000),4 ℃孵育过夜。加 HRP 标记的二抗 IgG,37 ℃孵育 70 min 后,加 ECL 显色液进行显色反应。利用 Quantity one 软件进行灰度值分析。

1.6 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 13.0 处理数据。配对 t 检验分析 HIF-1α 和 miRNA-200b 在结肠癌和癌旁组织中的表达差异,Pearson 相关性分析方法分析癌组织中 HIF-1α 和 miRNA-200b 表达的相关性。

2 结果

2.1 结肠癌组织中 HIF-1α 的 mRNA 与 miRNA-200b 的表达及相关性

实验选取 50 例结肠癌患者标本,包括癌组织及正常组织,利用实时定量 PCR 的方法检测结肠癌及癌旁组织中 HIF-1α 的表达,分别为(0.620 8 ± 0.580 9)和(0.291 9 ± 0.187 3),癌组织中 HIF-1α 的表达明显高于正常癌旁组织($P < 0.01$); miRNA-200b 在结肠癌及癌旁组织的表达分别为(0.812 6 ± 0.409 0)和

(1.277 0±0.806 5),miRNA-200b 在癌组织中的表达明显低于正常癌旁组织($P<0.01$)。利用 SPSS 软件分析 50 例结肠癌组织的实时定量 PCR 检测结果,Pearson 相关性分析 HIF-1α 与 miRNA-200b 的表达,如图 1 所示,两者在结肠癌组织中的表达存在明显的负相关($r=-0.32$,$P<0.05$)。

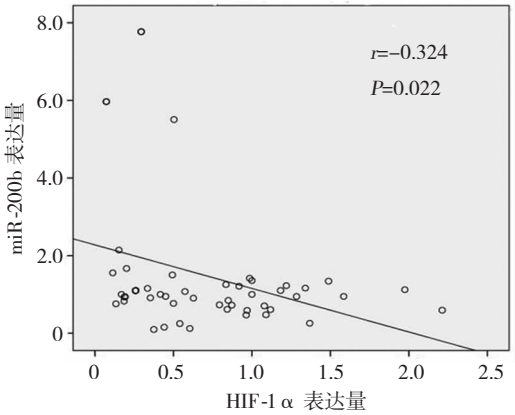
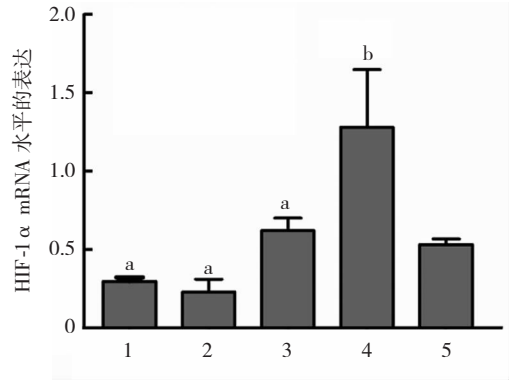


图 1 HIF-1α 和 miRNA-200b 在结肠癌组织中的表达

2.2 常氧环境下不同结肠癌细胞中 HIF-1α 的表达

通过 RT-PCR 检测常氧环境下 5 种结肠癌细胞系(Ls174t、HT-29、Caco-2、Lovo 和 SW480)HIF-1α mRNA 水平的表达。如图 2 所示,5 种结肠癌细胞中 HIF-1α mRNA 均有表达,且在 Caco-2 及 Lovo 细胞中表达相对较高,在 Ls174t、HT-29 及 SW480 细胞中表达较低。利用 Western blot 检测常氧环境下 5 种结肠癌细胞系中 HIF-1α 蛋白情况,其蛋白水平的表达在所有的细胞系几乎检测不到。由于缺氧环境能稳定 HIF-1α 的蛋白水平,为了检测 HIF-1α 蛋白在结肠癌细胞系中的表达,利用 $CoCl_2$ 模拟缺氧环境,在不同缺氧时间下观察细胞中 HIF-1α 的表达情况。

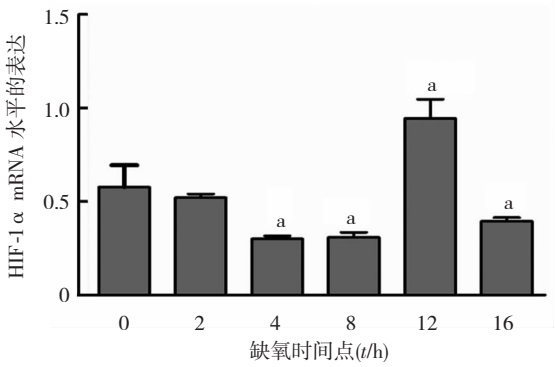


1:Ls174t 细胞;2:HT-29 细胞;3 :Caco-2 细胞;4:Lovo 细胞;5:SW480 细胞 a:$P<0.05$;b:$P<0.01$,5 种不同细胞系中 HIF-1α mRNA 表达水平的比较

图 2 不同结肠癌细胞系中 HIF-1α mRNA 的表达水平

2.3 缺氧处理结肠癌细胞中 HIF-1α 与 miRNA-200b 的表达

Caco-2 细胞用 300 μmol/L $CoCl_2$ 处理不同的时间(0、2、4、8、12 h 和 16 h),诱导细胞缺氧。用实时定量 PCR 方法检测不同缺氧时间(0、2、4、8、12 h 和16 h)Caco-2 细胞内 HIF-1α mRNA 的表达水平。如图 3 所示,缺氧 2~8 h HIF-1α 的 mRNA 表达下降,8 h 后其表达量增加,12 h 达到高峰,随后于 16 h 下降恢复至 8 h 表达水平。Western blot 检测结果显示,HIF-1α 蛋白在缺氧各时间点(2、4、8、12 h 和 16 h)的表达均高于常氧(0 h);缺氧 2 h,HIF-1α 蛋白表达迅速升高,随后缓慢下降,至 12 h 表达降至最低;缺氧延长至 16 h,HIF-1α 蛋白表达恢复且达到高峰(图 4),表明 HIF-1α mRNA 和蛋白随着缺氧时间延长均呈现先降低后升高的趋势。之后我们利用实时定量 PCR 方法检测 Caco-2 细胞中 miRNA-200b 的表达。如图 5 所示,缺氧处理后(2~16 h),miRNA-200b 的表达较常氧环境下(0 h),均有所降低;缺氧 2 h 后,随着缺氧时间的延长,miRNA-200b 表达缓慢升高,至 12 h 恢复至常氧的表达量;缺氧 16 h,表达量减少至与 2 h 相当。处于缺氧环境下的 Caco-2 细胞,miRNA-200b 在 12 h 表达量最高,2 h 和 16 h 最低;而 HIF-1α 在 12 h 表达量降至最低,16 h 达到顶峰,提示 HIF-1a 和 miRNA-200b 在缺氧 Caco-2 细胞中的表达呈现相反的趋势。



a:$P<0.05$,与常氧 0 h 细胞中 HIF-1α mRNA 表达水平的比较

图 3 Caco-2 细胞在不同缺氧时间点其 HIF-1α mRNA 的表达水平

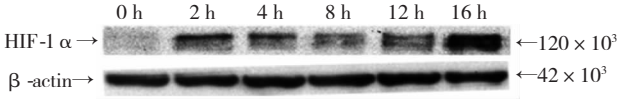
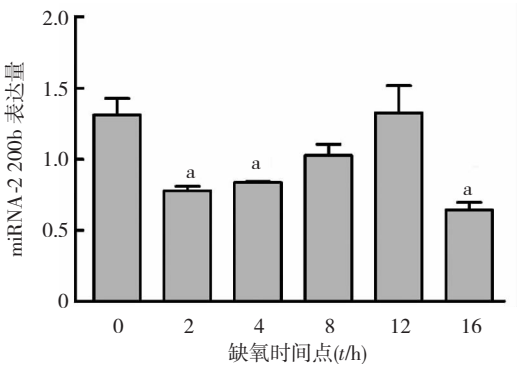


图 4 Western blot 检测 Caco-2 细胞在不同缺氧时间点其 HIF-1α 蛋白的表达水平

2.4 缺氧处理的 Caco-2 细胞中 HIF-1α 与 miRNA-200b 的表达相关性

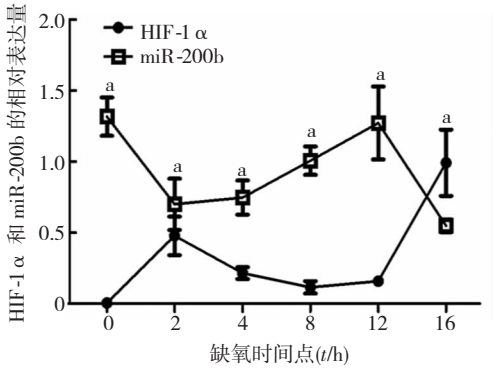
已证明结肠癌组织中 HIF-1α 与 miRNA-200b 的

表达存在负相关($r = -0.32$, $P < 0.05$),为探讨缺氧处理的结肠癌细胞中 HIF-1α 与 miRNA-200b 的相关性,利用 Pearson 相关性分析方法检验 HIF-1α 与 miRNA-200b 在不同缺氧时间点的表达呈负相关($r = -0.8166$, $P < 0.05$,图 6)。



a: $P < 0.01$,与常氧 0 h 细胞中 miRNA-200b 水平的比较

图 5 Caco-2 细胞在不同缺氧时间点其 miRNA-200b 的表达水平



a: $P < 0.05$,与常氧 0 h 细胞中 miRNA-200b 水平的比较

图 6 不同缺氧时间点 Caco-2 细胞中 HIF-1α 与 miRNA-200b 的表达

3 讨论

结直肠癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤,预后差,且肿瘤血供丰富,易发生远处转移及复发,致使患者死亡。研究表明[12-14],缺氧可以促进肿瘤细胞侵袭、转移及肿瘤细胞 EMT 过程。其中缺氧诱导因子 HIF-1 为缺氧主要的应答因子,活性基团为 HIF-1α[15]。HIF-1α 能够影响肿瘤细胞 EMT 指标蛋白的转录,促使肿瘤 EMT 转化,从而参与肿瘤转移过程。肿瘤细胞为了适应缺氧微环境,使得 HIF-1α 表达异常,进而调控如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF);促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等基因的转录和表达,从而使肿瘤细胞耐受缺氧环境并促进其生长、侵袭和远处转移。上述基因的启动子、增强子或者其他调控区域均含有低氧反应元件(hypoxia response element, HRE),其保守序列为:5-RCGTG-3[16],HIF-1α 转录因子可与 HRE 元件结合从而调控基因的表达。

关于 miRNAs 与肿瘤相关性的研究有大量的报道,其中 miR-200 家族主要参与肿瘤 EMT 的调控过程,miR-200 家族由 miR-200a、miR-200b、miR-429、miR-200c、miR-141 五个成员构成。其中 miRNA-200b 可以抑制肿瘤的形成与转移[17]维持肿瘤细胞的上皮特性[18],通过作用于 EMT 转录因子 ZEB1 和 ZEB2 阻滞细胞的侵袭转移。目前,对于常氧条件下 MicroRNA-200 家族的肿瘤抑制功能及调节机制研究较多,而缺氧条件下对 MicroRNA-200 家族调控及其功能的研究则较少。

本实验通过研究 HIF-1α 与 miRNA-200b 在 50 例结肠癌组织及缺氧条件下结直肠癌细胞中的表达,发现 HIF-1α 与 miRNA-200b 在结肠癌组织中的表达存在明显的负相关($r = -0.32$, $P < 0.05$)。利用 $CoCl_2$ 模拟化学缺氧并检测结直肠癌细胞 Caco-2 中 HIF-1α 及 miRNA-200b 的表达,发现 缺氧 2 h 的 HIF-1α 蛋白水平升高,而后随缺氧时间的延长蛋白表达缓慢下降(2~12 h),最后在 16 h 表达量最高;之前的研究表明,miRNA-200b 的表达可受到缺氧的影响,缺氧处理微血管内皮细胞 24 h 或转染携带 HIF-1α 的过表达病毒质粒,均导致 miRNA-200b 的表达受到抑制[19],我们检测到 miRNA-200b 在缺氧 2 h 的 Caco-2 细胞中表达量最低,2~12 h 表达逐渐上升,16 h 的表达量下降至 2 h 水平,这与 HIF-1α 蛋白水平的表达趋势恰恰相反,因此推测,在结直肠癌中 HIF-1α 可能抑制 miRNA-200b 的表达。并且我们发现在缺氧早期 2~8 h,HIF-1α mRNA 的表达逐渐下降而 miRNA-200b 表达水平的逐渐上升,缺氧 8~16 h,miRNA-200b 与 HIF-1α mRNA 水平表达一致,均呈上升趋势。表明缺氧早期和后期,HIF-1α mRNA 水平和 miRNA-200b 之间可能存在不同的调控机制。相关研究表明,miRNA-200 家族能结合至 HIF-1α 和脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase, PHD)的 mRNA 3′端非编码区(3′-untranslational region, 3′UTR)从而降解 mRNA[20-21],因此推测结肠癌细胞内可能存在以下 3 种调节机制:(1)miRNA-200b 能结合至 HIF-1α mRNA 3′端非编码区,导致 HIF-1α mRNA 的降解进而影响结肠癌组织的血管的新生;(2)miRNA-200b 可能结合至 PHD mRNA 3′端非编码区,阻碍 PHD 蛋白的翻译,从而遏制 PHD 对 HIF-1α

的降解作用;(3)HIF-1α 通过直接或间接的机制转录遏制 miRNA-200b 的表达,从而影响 miRNA-200b-Zeb1/2 的负性调节环而达到影响结肠癌细胞的上皮-间充质化转化的可塑性。上述研究为我们通过 HIF-1α-miRNA-200b-EMT 途径实现对肿瘤的调节提供依据,这将可能为肿瘤的耐药性以及靶向性治疗提供可行的方案。而在结肠癌中,HIF-1α 通过何种机制调控 miRNA-200b 进而影响 EMT 发生,需要做进一步的研究。

参考文献:

[1] Wouters B G, Weppler S A, Koritzinsky M, *et al*. Hypoxia as a target for combined modality treatments[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(2): 240 – 257.

[2] Xu R H, Pelicano H, Zhou Y, *et al*. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia [J]. Cancer Res, 2005, 65(2): 613 – 621.

[3] Fidler I J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 453 – 458.

[4] Christiansen J J, Rajasekaran A K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis[J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8319 – 8326.

[5] Gao D, Vahdat L T, Wong S, *et al*. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(19): 4883 – 4889.

[6] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 740 – 746.

[7] Yan W, Fu Y, Tian D, *et al*. PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382(3): 631 – 636. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.03.088

[8] Semenza G L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(4 Suppl): S62 – S67.

[9] 郭小毛, 梅欣, 朱国培, 等. 食管癌常规放疗与三维适形放疗比较及4种不同设野技术的剂量学研究[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(5): 462 – 465.

[10] Zhu R, Yang Y, Tian Y, *et al*. Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32170.

[11] 李姗姗, 钟小莉, 尚阳阳, 等. Ascl2 和 microRNA-200 家族在结肠癌组织和癌旁组织中的定量表达及二者的相关性分析[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(23): 2377 – 2379.

[12] Le QT, Denko NC, Giaccia AJ. Hypoxic gene expression and metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev. 2004; 23(3-4): 293 – 310.

[13] Guo J, Wang B, Fu Z, *et al*. Hypoxic Microenvironment Induces EMT and Upgrades Stem-Like Properties of Gastric Cancer Cells[J]. Technol Cancer Res Treat, 2015. [Epub ahead of print].

[14] Harten S K, Shukla D, Barod R, *et al*. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(3): 1089 – 1101. DOI:10.1091/mbc.E08 – 06 – 0566

[15] Kaelin W G Jr. How oxygen makes its presence felt[J]. Genes Dev, 2002, 16(12): 1441 – 1445.

[16] Semenza G L, Jiang B H, Leung S W, *et al*. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1[J]. J Biol Chem, 1996, 271(51): 32529 – 32537. DOI: 10.1371/journal.pone.0083991

[17] Williams L V, Veliceasa D, Vinokour E, *et al*. miR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83991.

[18] Tian Y, Pan Q, Shang Y, *et al*. MicroRNA-200 (miR-200) cluster regulation by achaete scute-like 2 (Ascl2): impact on the epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells [J]. J Biol Chem, 2014, 289(52): 36101 – 36115. DOI: 10.1074/jbc.M114.598383

[19] Chan Y C, Khanna S, Roy S, *et al*. miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(3): 2047 – 2056.

[20] Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, *et al*. The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human endothelial cells through a negative feedback loop[J]. FASEB J, 2015, 29(4): 1467 – 1479. DOI:10.1096/fj.14 – 267054

[21] Lee S T, Chu K, Jung K H, *et al*. MicroRNAs induced during ischemic preconditioning[J]. Stroke, 2010, 41(8): 1646 – 1651. DOI:10.1161/STROKEAHA.110.579649

(**收稿**:2015-10-21;**修回**:2015-11-24)

(编辑 王 红)