DOI:10.16016/j.1000-5404.201901095

缺氧微环境下晚期糖基化终末产物对结肠癌 HCT116 细胞侵袭、迁移的影响

万 林[1,2],程 勇[1],王五艺[1],隆姝孜[3],刘洪良[3],周 丽[3] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:胃肠外科[1],肿瘤科[3];638001 四川 广安,广安市人民医院胃肠外科[2]

[摘要] **目的** 研究在缺氧微环境下,晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)对结肠癌 HCT116 细胞的增殖、侵袭、迁移及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的影响。**方法** 用 CCK-8 法筛选出促进 HCT116 细胞增殖的最佳 AGEs 浓度(200 μg/mL),最佳作用时间为 48 h。然后将 HCT116 细胞分为空白对照组、AGEs(200 μg/mL)组、缺氧组、缺氧+ AGEs(200 μg/mL)组。用流式细胞术检测细胞周期,用 Transwell 侵袭及迁移实验检测 HCT116 细胞体外侵袭及迁移能力。最后用 Western blot 方法检测 HIF-1α、RAGE,EMT 相关蛋白 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 以及侵袭相关蛋白 MMP2 的表达水平。**结果** 与空白对照组相比,缺氧微环境可促进 HCT116 细胞的增殖,但 AGEs 对 HCT116 细胞增殖的影响较小。体外侵袭迁移实验结果显示:与空白对照组相比,其余 3 组中细胞的侵袭及迁移能力逐渐增强。Western blot 结果显示:HIF-1α 在常氧环境下表达水平较低,在缺氧状态下表达水平显著升高;与此同时,在缺氧状态下,加入 AGEs 后,HIF-1α 表达进一步升高。在常氧和缺氧环境中,AGEs 均能增加 RAGE 的表达量,但缺氧环境下更明显。与空白对照组相比,其余 3 组中 MMP2、N-cadherin、Vimentin 表达逐渐升高,E-cadherin 表达逐渐降低。**结论** 在缺氧环境下 AGEs 能够进一步增强 HCT116 细胞的侵袭、迁移能力,但对 HCT116 细胞增殖的影响较小。

[关键词] 晚期糖基化终末产物;缺氧微环境;结直肠癌;HCT116 细胞;侵袭;迁移;上皮间质转化
[中图法分类号] R343; R737.023; R735.35 [文献标志码] A

Advanced glycation end products enhance invasion and migration of colon cancer HCT116 cells in hypoxic microenvironment

WAN Lin[1,2], CHENG Yong[1], WANG Wuyi[1], LONG Shuzi[3], LIU Hongliang[3], ZHOU Li[3] [1]Department of Gastrointestinal Surgery, [3]Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Gastrointestinal Surgery, Guang'an People's Hospital, Guang'an, Sichuan Province, 638001, China, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of advanced glycation end products (AGEs) on the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colon cancer HCT116 cells in hypoxic microenvironment. **Methods** The optimal AGEs concentration (200 μg/mL) and treatment time (48 h) for promoting the proliferation of HCT116 cells were determined through a screening test with CCK-8 assay and used in subsequent experiment. HCT116 cells were treated with AGEs, hypoxia, or their combination, and the cell cycle changes were detected using flow cytometry; the changes in the invasive and migration abilities of the cells *in vitro* were assessed using Transwell chamber invasion and migration assays. The expressions of HIF-1α, RAGE, E-cadherin, N-cadherin, vimentin and MMP2 proteins in the treated cells were determined with Western blotting. **Results** Compared with the blank control cells, HCT116 cells exposed to a hypoxic microenvironment showed an increased proliferative activity, but AGEs alone did not significantly affect the cell proliferation. The cells treated with AGEs, hypoxia, and their combination all exhibited enhanced invasion and migration abilities compared with the blank control cells. The results of

[通信作者] 程 勇,E-mail:chengyongcq@aliyun.com
[网络首发] http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1126.R.20190520.0901.001.html

Western blotting showed that the expression level of HIF-1α, which was low in HCT116 cells in normoxic condition, was increased significantly in a hypoxic condition, and increased further after exposure of the cells to both AGEs and hypoxia. The expression of RAGE was increased after AGEs exposure of the cells in both normal and hypoxic environments, and the increase was more prominent in a hypoxic condition. Exposure to AGEs, hypoxia, and both all resulted in increased expressions of MMP2, N-cadherin and vimentin but lowered expression of E-cadherin in the cells. **Conclusion** AGEs can further enhance the invasive and migration abilities but has little effect on the proliferation of HCT116 cells exposed to a hypoxic environment.

[**Key words**] advanced glycation end products; hypoxic microenvironment; colorectal neoplasms; invasion; migration; epithelial-mesenchymal transition

Corresponding author: CHENG Yong, E-mail: chengyongcq@aliyun.com

全球范围内,2 型糖尿病患者逐渐增多[1]。糖尿病患者体内过多的葡萄糖与体内的蛋白质、脂质或核酸的自由氨基经过一系列复杂的非酶触反应,大量形成一种被叫作晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)的物质[2]。晚期糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycation end products, RAGE)作为 AGEs 的受体,其数量随着 AGEs 的升高而升高。在合并糖尿病的肿瘤患者体内,AGEs 与 RAGE 的相互作用导致氧化应激,增强炎症反应,进而促进肿瘤的生长、新生血管形成及肿瘤转移[3]。

由于肿瘤生长速度较快,肿瘤内部异常的血管不能满足肿瘤生长对氧气的需求,所以 50%~60%的实体肿瘤都存在缺氧区域[4-5]。缺氧激活 HIF-1α 信号通路,导致下游数以百计的基因被激活[6-8],这些被激活的基因使得肿瘤细胞在缺氧环境下得以存活,并通过直接激活上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关基因如 Twist、Snail、ZEB1[9-11],或通过 Notch[12]、TGF-β[13]、Wnt[14] 等信号通路诱导肿瘤细胞侵袭和 EMT,以促进肿瘤细胞的侵袭、转移。

已有针对结直肠癌的研究结果提示,AGEs 通过 RAGE 及其下游 MAPK/ERK[15-16]、JAK2/STAT3[17-18] 等信号通路促进结直肠癌的 EMT 及侵袭迁移。缺氧激活 HIF-1α,进而直接激活 EMT 相关基因或下游 EMT 相关信号通路,促进结直肠癌的侵袭、迁移[9-14]。有研究表明:缺氧状态下,HIF-1α 表达增加可使肿瘤细胞表面的 RAGE 表达增加[19]。但 AGEs 在缺氧微环境下对结肠癌细胞的增殖、侵袭、迁移、EMT 等生物学行为的研究较少。本研究旨在研究 AGEs 在缺氧微环境下对结肠癌细胞的增殖、侵袭、迁移、EMT 等生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

RPMI1640 细胞培养基购自美国 HyClone 公司,胎牛血清购自德国 PAN-Biotech GmbH 公司,牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和 D-glucose 购自德国 Sigma 公司,兔抗人 E-cadherin、Vimentin 单克隆抗体由美国 Abcam 公司购得,兔抗人 N-cadherin、RAGE 单克隆抗体购于中国沈阳万类生物科技有限公司,GAPDH 单克隆抗体购自北京博奥森公司,MMP2 鼠抗人单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,兔抗人 HIF-1α 单克隆抗体、辣根过氧化物标记的山羊抗兔及山羊抗鼠 IgG(二抗)均购于美国 CST 公司,CCK-8 试剂盒购于美国 Bimake 公司,ECL 发光液、全蛋白提取试剂盒、BCA 全蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所,8 μm 孔径 Transwell 小室、Martrigel 基质胶购自美国 BD 公司。

1.2 AGEs 的制备

参考 HORIUCHI 等[20] 的方法配制 AGEs:取 50 mL 灭菌离心管,加入 4.8 g BSA 第 5 片段和 9 g 葡萄糖,pH 值为 7.4 的 PBS 溶解,定容至 30 mL。用 0.22 μm 细菌滤器过滤该溶液后装入另一 50 mL 灭菌离心管中,将氮气充入该离心管内隔绝氧气,旋紧离心管盖并用封口胶密封后放入 37 ℃细胞培养箱中避光孵育 90 d。对照组中不加葡萄糖,其余条件一致。用 pH 值为 7.4 的 PBS 透析除去没有结合的葡萄糖。AGEs 的浓度用特异的荧光即激发波长 360 nm,发射波长 440 nm 进行检测。对照组的荧光值作为基础值。荧光值达到基础值的 70 倍以上者才可用于实验[21]。鉴定后的 AGEs 溶液用细菌滤器过滤除菌后分装,并保存于-30 ℃冰箱中备用。

1.3 CCK-8 法筛选出促进 HCT116 细胞增殖的最佳 AGEs 浓度

人结肠癌 HCT116 细胞株由重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室惠赠。收集未经处理的对数生长期的 HCT116 细胞,接种于 96 孔板中,5 000 个/孔,于普通细胞培养箱培养。分别加入 0、50、100、200、400 μg/mL 的 AGEs,于加药后 6、24、48 和 72 h 更换新鲜培养液后加入 CCK-8 试

剂,10 μL/孔,继续于普通细胞培养箱培养细胞 1 h,酶标仪测 450 nm 波长各组细胞的光密度值[D(450)]。以时间为横坐标,[D(450)]值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.4 细胞培养与分组

CCK-8 实验确定最佳 AGEs 浓度为 200 μg/mL,最佳作用时间为 48 h。后将细胞分为:空白对照组(常氧、无 AGEs)、AGEs(200 μg/mL)组(常氧)、缺氧组(O_2 1%,无 AGEs)及缺氧(O_2 1%)+ AGEs(200 μg/mL)组。所有 HCT116 细胞均用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养,空白对照组及 AGEs(200 μg/mL)组于 37 ℃、CO_2 5%的普通细胞培养箱中培养;缺氧组及缺氧 + AGEs(200 μg/mL)组 HCT116 细胞放入 37 ℃、O_2 1%,CO_2 5%、N2 94%的三气细胞培养箱中缺氧培养。待细胞融合度达 70%~90%时,收集此时对数期 HCT116 细胞进行后续实验。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

将空白对照组、AGEs(200μg/mL)组、缺氧组及缺氧+AGEs(200μg/mL)组细胞按分组情况加药处理 48 h。然后用胰酶消化各组细胞后,1 200 r/min 离心 5 min;弃上清,加 3 mL PBS 重悬细胞,然后离心;再弃上清,加入 3 mL 70% 4 ℃乙醇重悬,4 ℃固定 24 h 以上;2 000 r/min 离心 5 min;弃上清,加入 5~7 mL PBS 重悬细胞,2 000 r/min 离心 5 min;弃上清后加入 1 200 μL PBS 重悬细胞;将细胞悬液分装至 3 个 EP 管中,每管 400 μL;每个 EP 管加入 2.5 μL RNA 酶抑制剂,37 ℃孵育 30 min;后再向每个 EP 管中加入 5 μL PI(碘化丙啶),常温避光孵育 15~30 min,流式细胞术检测细胞周期。

1.6 Tranwell 体外迁移、侵袭实验

Transwell 小室及细胞准备:Transwell 小室放置于 24 孔板中,正反面均在紫外线下照射 30~60 min 灭菌。

取常氧及缺氧培养 48 h,对数期生长的 HCT116 细胞。对照组及缺氧组细胞用 1640,AGEs(200 μg/mL)组及缺氧 + AGEs(200 μg/mL)组用含 200 μg/mL AGEs 的 1640 培养基稀释成 1×10^6/mL(侵袭实验用),2.5×10^5/mL(迁移实验用)两种浓度细胞悬液。

体外侵袭实验:提前将基质胶置于 4 ℃冰箱融解,然后用冰 1640 以 7∶1的比例稀释基质胶并混匀。吸取稀释并混匀的基质胶加入小室上室面,每个小室 100 μL,37 ℃孵育 4 h 待其凝固。吸取各组用于侵袭实验的细胞悬液 100 μL 加于基质胶面上。下室加 700 μL 含 10% 胎牛血清的培养基。空白对照、AGEs(200 μg/mL)组细胞置于普通细胞培养箱中培养;缺氧及缺氧+AGEs(200 μg/mL)组细胞置于三气培养箱中缺氧培养;48 h 后,取出小室。用棉签蘸净上室面的基质胶、培养基及未穿出的细胞,5%甲醛固定 30 min 并风干,吸取 1 mL 结晶紫加入 24 孔板孔内,放入小室染色 10 min,染色结束后 PBS 清洗并风干。

体外迁移实验:吸取各组用于侵袭实验的细胞悬液 200 μL 加入小室上室面。下室加 700 μL 含 10% 胎牛血清的培养基。空白对照及 AGEs(200 μg/mL)组细胞置于普通细胞培养箱中培养;缺氧及缺氧+AGEs(200 μg/mL)组细胞置于三气培养箱中培养;36 h 后,取出小室,此后操作步骤同 Transwell 体外侵袭实验。

将小室风干后,于显微镜下随机选取 5 个视野(×200)拍照,ImageJ 软件计数穿出的细胞数目。

1.7 Western blot 实验

空白对照组及 AGEs(200μg/mL)组细胞置于普通细胞培养箱中培养 48 h;缺氧及缺氧 + AGEs(200 μg/mL)组细胞置于三气培养箱中缺氧培养 48 h。按照说明书进行总蛋白提取,蛋白提取后用 BCA 试剂盒测蛋白浓度。蛋白样品加入 Loading Buffer 并热变性后进行 SDS-PAGE 电泳,每孔蛋白上样量为 40 μg;250 mA 恒流转膜;用 5%脱脂奶粉室温封闭 2~4 h;孵育一抗,4 ℃过夜。次晨复温,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。摇床上常温孵育二抗 1~2 h(稀释比例均为 1∶3 000)。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 化学发光液显影并保存结果。

1.8 统计学分析

各项实验均独立重复 3 次。应用 SPSS 20.0 软件对各项试验数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 独立样本间的比较采用 t 检验,多组间的均数比较采用方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

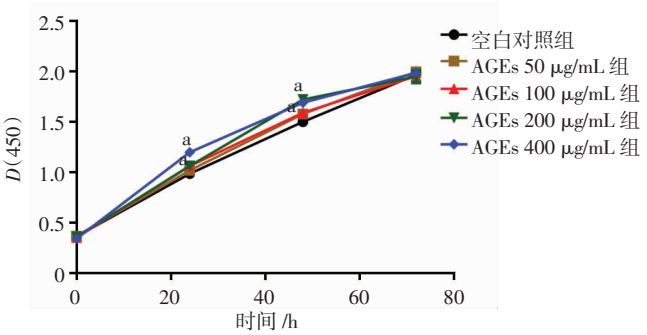
2 结果

2.1 CCK-8 法筛选出最佳 AGEs 浓度为 200 μg/mL

用 0、50、100、200 μg/mL 和 400 μg/mL 的 AGEs 处理 HCT116 细胞 6、24、48 h 和 72 h 后,应用 CCK-8 法检测各组细胞的增殖情况。不同时间点各组光密度值[D(450)]依次为:24 h(0.985 0±0.026 40)、(1.017 9±0.010 8)、(1.060 5±0.038 7)、(1.060 8±0.03)、(1.197 9±0.029 1);48 h(1.499 1±0.094 2)、(1.575 3±0.033 7)、(1.588 7±0.042 3)、(1.720 8±0.016 2)、(1.688 9±0.033)。

结果显示:在 24~48 h 内,当 AGEs 浓度在 100 μg/mL 以上时,均可促进 HCT116 细胞的增殖,且有时间及浓度依赖性($P<0.05$)。在 24 h,400 μg/mL 的 AGEs 促进细胞增殖的作用最明显($P<0.05$)。在 48 h,200 μg/mL 的 AGEs 促进细胞增殖的作用最明显($P<0.05$),48 h 后 AGEs 对细胞增殖作用逐渐减弱(图 1)。由此确定最佳 AGEs 浓度为 200 μg/mL,最佳

作用时间为 48 h。



a: $P<0.05$,与空白对照组比较

图 1　CCK-8 法筛选最佳 AGEs 浓度

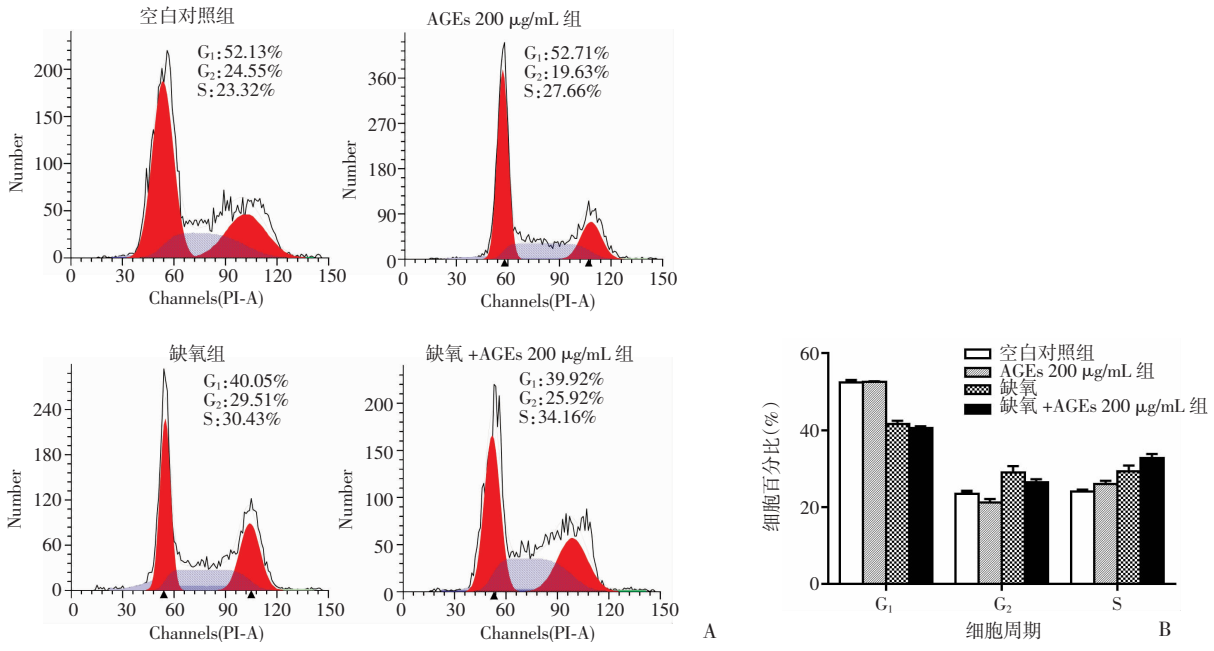
2.2　缺氧促进 HCT116 细胞增殖,AGEs 仅增加 S 期细胞比例

细胞周期的结果显示,G_1 期各组细胞比例分别为空白对照组(52.47±0.82)%、AGEs 组(200 μg/mL)(52.62±0.14)%、缺氧组(41.60±1.47)%、缺氧+AGEs 组(200 μg/mL)(40.65±0.66)%;S 期各组细胞比例分别为空白对照组(24.05±0.65)%、AGEs 组(200 μg/mL)(26.09±1.38)%、缺氧组(29.40±2.45)%、缺氧+AGEs 组(200 μg/mL)(32.80±1.77);G_2 期各组细胞比例分别为空白对照组(23.48±1.11)%、AGEs 组(200 μg/mL)(21.29±1.44)%、缺氧组(29.00±2.91)%、缺氧+AGEs 组(200 μg/mL)(26.55±1.25)%。与空白对照组比较,其余 3 组 S 期细胞比例逐渐增加($P<0.05$,图 2)。与常氧组比较,缺氧组 G_0/G_1 期细胞比例明显降低,S 期及 G_2 期细胞比例明显升高($P<0.05$,图 2)。但同时也发现 AGEs(200 μg/mL)仅增加 S 期细胞比例($P<0.05$,图 2),对 G_0/G_1 期及 G_2 期没有明显影响($P>0.05$,图 2)。

2.3　Transwell 实验检测缺氧环境下 AGEs 促进结肠癌 HCT116 细胞的体外侵袭、迁移

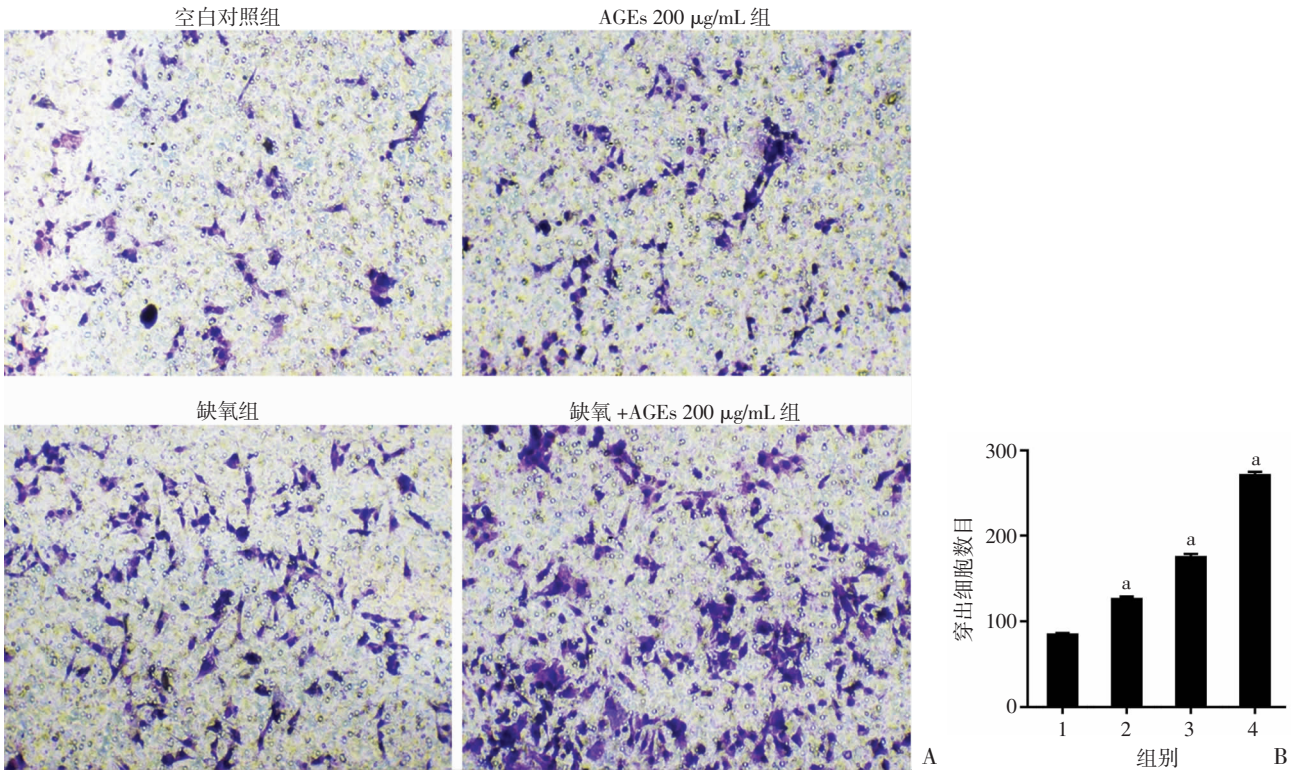
Transwell 体外侵袭实验检测结果显示,各组穿出基质胶的细胞数目分别为空白对照组(84.8±3.96)个、AGEs 组(200 μg/mL)(126±6.75)个、缺氧组(175±8.75)个、缺氧+ AGEs 组(200 μg/mL)(270.8±8.93)个。与空比对照组比较,AGEs 组(200 μg/mL),缺氧组和缺氧+ AGEs 组(200 μg/mL),穿出基质胶细胞数逐渐增加($P<0.05$,图 3)。说明缺氧和 AGEs(200 μg/mL)均可促进 HCT116 细胞的侵袭($P<0.05$);同时,缺氧环境下,AGEs(200 μg/mL)进一步增强 HCT116 细胞侵袭能力($P<0.05$)。

Transwell 体外迁移实验检测结果显示,各组穿出的细胞数目分别为:空白对照组(131.4±7.5)个、AGEs 组(200 μg/mL)(205.4±15.09)个、缺氧组(318±12.6)个、缺氧+ AGEs 组(200 μg/mL)(425.4±17.34)个。与空折对照组比较,其余 3 组穿膜细胞数逐渐增加($P<0.05$,图 4)。说明缺氧和 AGEs(200 μg/mL)均可促进 HCT116 细胞的迁移($P<0.05$);同时,缺氧环境下,AGEs(200 μg/mL)可进一步增强 HCT116 细胞的迁移($P<0.05$)。



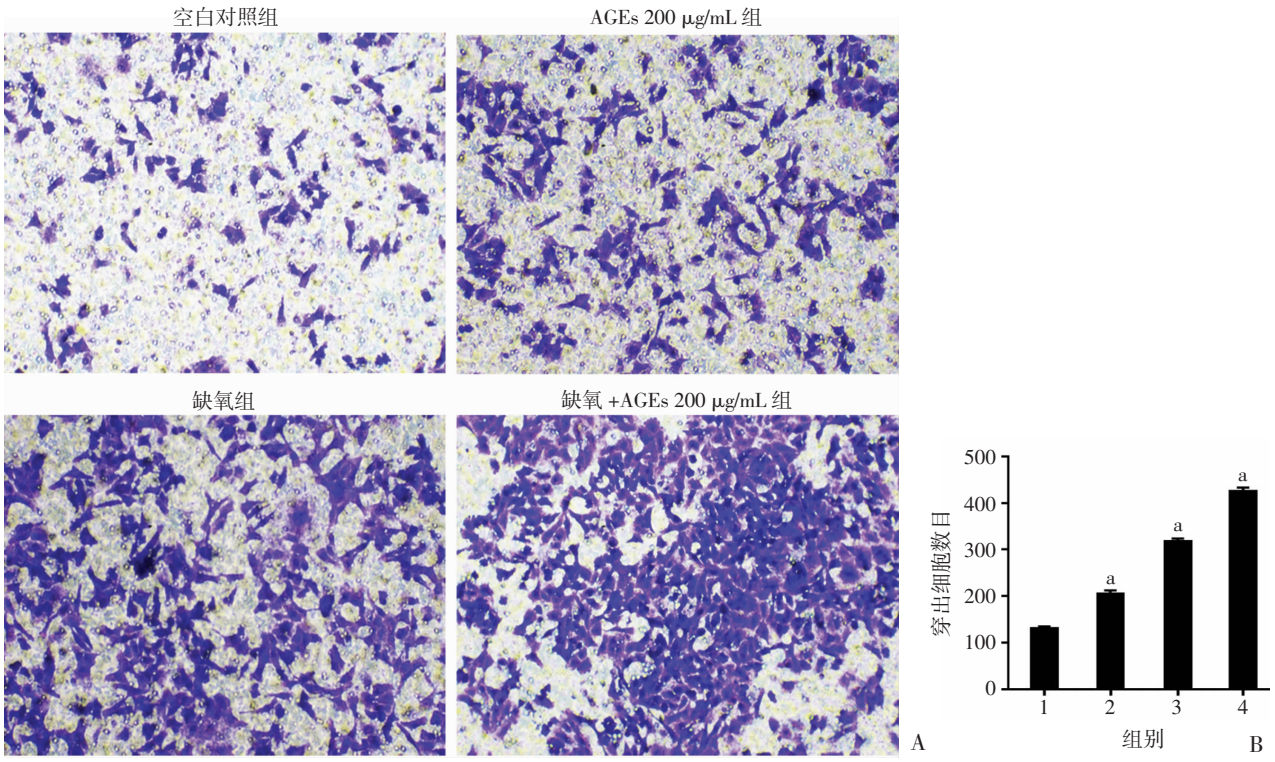
A: 流式细胞术检测各组 HCT116 细胞周期变化;B:各组 HCT116 细胞周期分布统计分析, a:$P<0.05$,与空白对照组或 AGE 200 μg/mL(常氧)组比较

图 2　流式细胞术检测各组 HCT116 细胞周期分布



A：Transwell 侵袭实验检测各组 HCT116 细胞体外侵袭结果；B：各组 HCT116 细胞体外侵袭统计分析　1：空白对照组；2：AGEs 200 μg/mL 组；3：缺氧组；4：缺氧+AGEs 200μg/mL 组　a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图 3　Transwell 侵袭实验检测各组细胞的体外侵袭能力　（结晶紫 ×200）

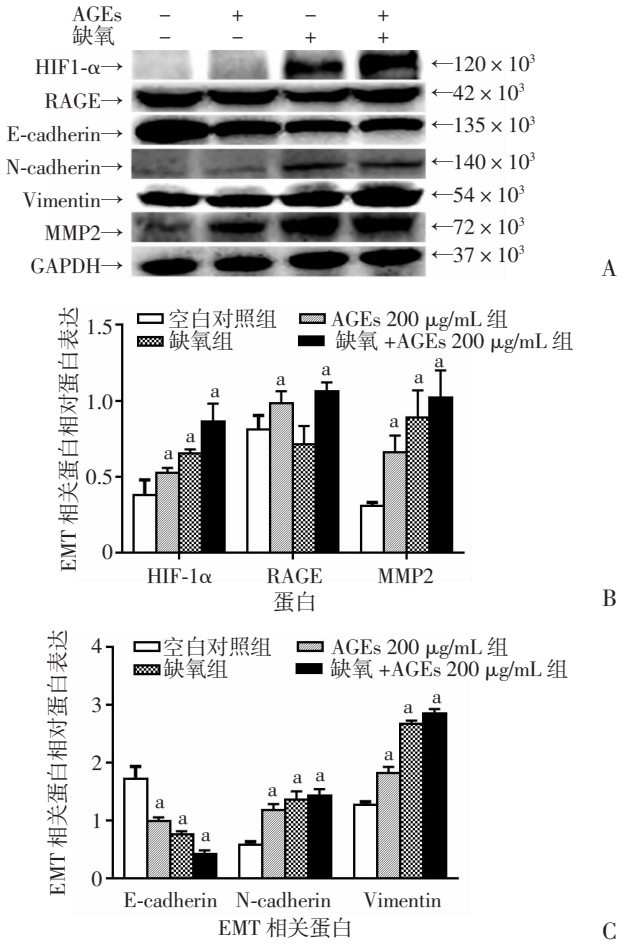


A：Transwell 迁移实验检测各组 HCT116 细胞体外迁移；B：各组 HCT116 细胞体外迁移统计分析　1：空白对照组；2：AGEs 200μg/mL 组；3：缺氧组；4：缺氧+AGEs 200 μg/mL 组　a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图 4　Transwell 迁移实验检测各组 HCT116 细胞的体外迁移能力　（结晶紫×200）

2.4 Western blot 检测缺氧环境下 AGEs 增强结肠癌 HCT116 细胞的侵袭及 EMT

本实验采用 GAPDH 作为内参,通过 ImageJ 软件定量分析各目的蛋白条带的灰度值,计算各目的蛋白相对表达量:目的蛋白/GAPDH 灰度值。Western blot 检测结果显示:HIF-1α 在常氧环境下表达水平较低,在缺氧状态下表达水平显著升高;与此同时,在缺氧状态下加入 AGEs(200 μg/mL)后,HIF-1α 表达量进一步升高。在常氧及缺氧环境下加入 AGEs 后 RAGE 表达均升高;但缺氧环境下升高更明显。与空白对照组相比,其余 3 组上皮相关标志物 E-cadherin 依次降低,而间质相关标志物 N-cadherin、Vimentin 及侵袭相关蛋白 MMP2 依次升高($P<0.05$,图 5)。提示:AGEs(200 μg/mL)和缺氧均可促进 HCT116 细胞的侵袭及 EMT($P<0.05$);同时,在缺氧环境下,AGEs(200 μg/mL)可进一步增强 HCT116 细胞的侵袭及 EMT($P<0.05$)。



A:Western blot 检测结果;B:HIF-1α、RAGE、MMP2 蛋白相对表达分析;C:EMT 相关蛋白相对表达分析 a:$P<0.05$,与空白对照组或缺氧组比较

图 5 Western blot 检测 HIF-1α、RAGE 、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 MMP2 在各组中的表达

3 讨论

糖尿病及结直肠癌发病率高,均已成为全球较为严峻的公共卫生问题[1,22]。伴随糖尿病的结直肠肿瘤,恶性程度更高,更容易发生淋巴结及远处转移,直接导致患者的生存期明显缩短,治疗难度加大,使得原本棘手的问题更加复杂[23-24]。

糖尿病患者体内大量累积的 AGEs 与 RAGE 结合,促进肿瘤的增殖。本研究用 CCK-8 法筛选出促进 HCT116 细胞增殖的最佳 AGEs 浓度为 200 μg/mL,最佳作用时间为 48 h,这与文献[16]报道的结果一致。合并糖尿病的结直肠癌患者,肿瘤内部存在缺氧、高浓度 AGEs 蓄积的病理微环境。缺氧环境下,细胞代谢由糖的有氧氧化转向无氧糖酵解。HIF-1α 与 HIF-1β 结合呈稳定态 HIF-1,稳定态 HIF-1 与靶基因中的缺氧反应元件(HREs)结合,介导适应缺氧环境的相关蛋白质表达[25]。HIF-1 增加葡萄糖转运蛋白和糖酵解酶以及乳酸脱氢酶 A(LDHA)和丙酮酸脱氢酶激酶 1(PDK1)的转录,使丙酮酸转化为乳酸[26]。同时,HIF-2α 通过诱导关键干细胞基因(如 OCT4、NANOG 和 MYC)等的表达,使细胞获得干细胞样表型,使得肿瘤细胞成瘤能力增强[27]。同时 HIF-2α 促使肠道铁转运相关基因过表达,引起局部铁稳态失衡,提高细胞存活和增殖能力,最终促进肿瘤进展[28]。本研究的细胞周期实验证实:缺氧环境(O_2 1%)能明显减少 HCT116 细胞 G_1 期细胞比例,增加 S 期及 G_2 期细胞比例($P<0.05$),促进结肠癌 HCT116 细胞的分裂增殖。而 AGEs(200 μg/mL)只增加了 S 期细胞的比例($P<0.05$),提示 AGEs(200 μg/mL)促进结肠癌 HCT116 细胞的增殖作用较弱。这可能与 AGEs/RAGE 对细胞选择性作用有关[29-30]。故未进一步就 AGEs(200 μg/mL)在缺氧环境下促进结直肠癌细胞增殖的具体机制做深入研究。

AGEs 能通过 RAGE-ERK[15-16]、JAK2/STAT3[17-18]等通路促进结直肠肿瘤的 EMT,导致肿瘤的侵袭、转移。结直肠肿瘤内部的缺氧微环境可激活 HIF-1α 基因的表达,HIF-1α 基因的激活不仅可直接导致肿瘤细胞的 EMT 及侵袭力的增加[9-11],而且可以通过增加 RAGE 的表达,激活其下游相关信号通路,促进肿瘤的增殖,侵袭,迁移[19]。本研究发现,缺氧环境下代表肿瘤侵袭能力的指标 MMP2 较常氧环境下明显升高,上皮相关标志物 E-cadherin 较常氧环境下明显降低,而间质相关标志物 N-cadherin、Vimentin 较常氧环境下明显升高。与此同时,缺氧环境下,于结肠癌 HCT116 细胞中加入 AGEs(200 μg/mL)后,侵袭力指标 MMP2,

间质相关标志物 N-cadherin、Vimentin 较单纯缺氧进一步升高;而上皮相关标志物 E-cadherin 较常氧环境下进一步降低。上述结果提示:缺氧微环境及 AGEs 在促进结肠癌 HCT116 细胞的侵袭力上可能有叠加效应。因此推测合并糖尿病的结直肠癌患者,肿瘤中的缺氧微环境,引起 HIF-1α 表达增加,除可直接激活下游信号通路,促进肿瘤的 EMT 及侵袭外;还可以刺激细胞表达更多的 RAGE,患者体内的高浓度 AGEs 与数量庞大的 RAGE 充分结合,激活下游与细胞侵袭相关的信号通路,如 JAK2/STAT3、ERK 等信号通路促进肿瘤细胞的侵袭、扩散及转移。

本研究初步探索了缺氧环境下 AGEs 对结肠癌 HCT116 细胞增殖、侵袭、迁移、EMT 等生物学行为的影响。结果显示:缺氧与 AGEs 可共同促进结肠癌 HCT116 细胞的侵袭与迁移。缺氧可促进结肠癌 HCT116 细胞的增殖,但 AGEs 促进结肠癌 HCT116 细胞的增殖作用较弱。本研究与之前单独 AGEs 或单独缺氧对结肠癌细胞生物学行为的相关研究相比,能够更真实的模拟合并糖尿病的结肠癌患者体内结肠癌细胞所处的缺氧合并高浓度 AGEs 的独特微环境。但缺氧环境与高浓度 AGEs 是通过各自的信号通路,还是共同信号通路作用于结直肠癌细胞,并最终导致结直肠癌细胞侵袭能力增强的具体机制仍不清楚,需进一步研究。

参考文献:

[1] ZIMMET P, ALBERTI K G, MAGLIANO D J, *et al*. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies[J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(10): 616-622. DOI: 10.1038/nrendo.2016.105.

[2] BUCALA R. Diabetes, aging, and their tissue complications [J]. J Clin Invest, 2014, 124(5): 1887-1888. DOI: 10.1172/JCI75224.

[3] ALEXANDER K L, MEJIA C A, JORDAN C, *et al*. Differential receptor for advanced glycation end products expression in preeclamptic, intrauterine growth restricted, and gestational diabetic placentas[J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 75(2): 172-180. DOI: 10.1111/aji.12462.

[4] DHANI N, FYLES A, HEDLEY D, *et al*. The clinical significance of hypoxia in human cancers[J]. Semin Nucl Med, 2015, 45(2): 110-121. DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2014.11.002.

[6] GREENALD D, JEYAKANI J, PELSTER B, *et al*. Genome-wide mapping of Hif-1α binding sites in zebrafish[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 923. DOI: 10.1186/ s12864-015-2169-x.

[7] CHOUDHRY H, HARRIS A L. Advances in hypoxia-inducible factor biology[J]. Cell Metab, 2018, 27(2): 281-298. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.10.005.

[8] ASAI H, HIRATA J, WATANABE-AKANUMA M. Indoxyl glucuronide, a protein-bound uremic toxin, inhibits hypoxia-inducible factor-dependent erythropoietin expression through activation of aryl hydrocarbon receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504(2): 538-544. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.018.

[9] CHEN Z, ZHU Y D, DONG Y F, *et al*. Overexpression of TrpC5 promotes tumor metastasis *via* the HIF-1α-Twist signaling pathway in colon cancer[J]. Clin Sci, 2017, 131(19): 2439-2450. DOI: 10.1042/CS20171069.

[10] CHOI B J, PARK S A, LEE S Y, *et al*. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through ubiquitin-specific protease 47-mediated stabilization of Snail: A potential role of Sox9[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15918. DOI: 10.1038/s41598-017-15139-5.

[11] ZHANG W J, SHI X P, PENG Y, *et al*. HIF-1α promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through direct regulation of ZEB1 in colorectal cancer[J]. PLoS ONE, 2015, 10(6): e0129603. DOI: 10.1371/journal.pone.0129603.

[12] SONOSHITA M, ITATANI Y, KAKIZAKI F, *et al*. Promotion of colorectal cancer invasion and metastasis through activation of NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF protein TRIO[J]. Cancer Discov, 2015, 5(2): 198-211. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0595.

[13] RANKIN E B, GIACCIA A J. Hypoxic control of metastasis [J]. Science, 2016, 352(6282): 175-180. DOI: 10.1126/science.aaf4405.

[14] BAHRAMI A, AMERIZADEH F, SHAHIDSALES S, *et al*. Therapeutic potential of targeting wnt/β-catenin pathway in treatment of colorectal cancer: rational and progress[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(8): 1979-1983. DOI: 10.1002/jcb.25903.

[15] ZHAO J K, OU B C, HAN D P, *et al*. Tumor-derived CXCL5 promotes human colorectal cancer metastasis through activation of the ERK/Elk-1/Snail and AKT/GSK3β/β-catenin pathways[J]. Mol Cancer, 2017, 16: 70. DOI: 10.1186/s12943-017-0629-4.

[16] 伍鑫, 程勇, 庞云, 等. 终末糖基化产物对结肠癌 SW620 细胞 EMT 及肿瘤干细胞标志物的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(3): 355-359. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.010.
WU X, CHENG Y, PANG Y, *et al*. Effects of advanced glycation end products on epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell associated markers in human colon cancer cell line SW620[J]. Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 355-359. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.

2016.03.010.

[17] ZHANG X C, HU F Y, LI G, *et al*. Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 25. DOI: 10.1038/s41419-017-0176-3.

[18] 王五艺, 程勇, 万林, 等. AGEs 通过 JAK2/STAT3 信号通路诱导结肠癌 SW480 细胞增殖、侵袭及上皮间质转化[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(24): 2390-2395. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201708199.
WANG W Y, CHENG Y, WAN L, *et al*. Advanced glycation end products enhance proliferation and invasion of human colon cancer SW480 cells through JAK2/STAT3 pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2017, 39(24): 2390-2395. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201708199.

[19] BAI W, ZHOU J, ZHOU N, *et al*. Hypoxia-increased RAGE expression regulates chemotaxis and pro-inflammatory cytokines release through nuclear translocation of NF-κB and HIF1α in THP-1 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(3): 2282-2288. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.084.

[20] HORIUCHI S, ARAKI N, MORINO Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the maillard reaction. Evidence for the presence of a common structure[J]. J Biol Chem, 1991, 266(12): 7329-7332.

[21] 韩晓群. 晚期糖基化终末产物促进初始 CD4~+T 细胞向促炎症反应方向分化及机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
HAN X Q. The research of advanced glycation end products promoting Cd4~+T helper cells differentiation toward pro-inflammatory response and the mechanism[D]. Wuhan: Wuhan University, 2014.

[22] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.

[23] KOYASU S, KOBAYASHI M, GOTO Y, *et al*. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge[J]. Cancer Sci, 2018, 109(3): 560-571. DOI: 10.1111/cas.13483.

[24] LOO J M, SCHERL A, NGUYEN A, *et al*. Extracellular metabolic energetics can promote cancer progression[J]. Cell, 2015, 160(3): 393-406. DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.018.

[25] BALAMURUGAN K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer[J]. Int J Cancer, 2016, 138(5): 1058-1066. DOI: 10.1002/ijc.29519.

[26] MACKLIN P S, MCAULIFFE J, PUGH C W, *et al*. Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta[J]. Placenta, 2017, 56: 8-13. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.03.010.

[27] ALHAWARAT F M, HAMMAD H M, HIJJAWI M S, *et al*. The effect of cycling hypoxia on MCF-7 cancer stem cells and the impact of their microenvironment on angiogenesis using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as a model[J]. Peer J, 2019, 7: e5990. DOI: 10.7717/peerj.5990.

[28] RAMAKRISHNAN S K, SHAH Y M. Role of intestinal HIF-2α in health and disease[J]. Annu Rev Physiol, 2016, 78: 301-325. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105202.

[29] RAMASAMY R, SHEKHTMAN A, SCHMIDT A M. The multiple faces of RAGE: opportunities for therapeutic intervention in aging and chronic disease[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(4): 431-446. DOI: 10.1517/14728222.2016.1111873.

[30] CHEN H B, WU L F, LI Y K, *et al*. Advanced glycation end products increase carbohydrate responsive element binding protein expression and promote cancer cell proliferation [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 395(1/2): 69-78. DOI: 10.1016/j.mce.2014.07.021.

(**收稿**:2019-01-11;**修回**:2019-03-11)

(编辑 黄 超)