基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0873-04

间歇性缺氧对 SW480 细胞生长及 HIF-1α 表达的影响

李明洋[1],傅仲学[1],吴星烨[2],李尚坤[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究间歇性缺氧(Intermittent hypoxia,IH)对 SW480 细胞生长及缺氧诱导因子 -1α(Hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)表达的影响,探讨肿瘤的间歇性缺氧现象及与 HIF-1α 的关系。方法:采用氯化钴($CoCl_2$)模拟缺氧环境,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察间歇性缺氧对 SW480 细胞生长的影响,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及 Western blot 检测间歇性缺氧对 HIF-1α 表达的影响。细胞分组:A 组:常氧组;B 组:间歇性缺氧 2 h 组;C 组:间歇性缺氧 3 h 组;D 组:持续性缺氧 3 h 组。结果:MTT 结果显示 3 个缺氧组与常氧组相比,SW480 细胞增殖活性均受到抑制,C 组和 D 组较 B 组增殖活性亦降低,而 C 组和 D 组之间无差异。RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 发现 C 组高于 A 组、B 组及 D 组。而其余各组之间无差异。Western blot 检测 HIF-1α 蛋白发现 C 组高于其余各组,D 组高于 B 组及 A 组,而 B 组与 A 组无差异。结论:相同缺氧时间,不同缺氧方式使 SW480 细胞生长受到同等程度抑制。一定程度的间歇性缺氧可以上调 HIF-1α mRNA 及蛋白水平。

【关键词】间歇性缺氧;结肠肿瘤;缺氧诱导因子

【中国图书分类法分类号】R735.35 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-01

作者介绍:李明洋(1983-),男,硕士,
研究方向:胃肠肿瘤。

通讯作者:傅仲学,男,教授,E-mail:fzx990521@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金(30772547)。

本实验通过对膀胱移行细胞癌中心体异常与膀胱癌的 p53 基因突变关系的统计学分析表明:在 76 例膀胱移行细胞癌中,中心体异常与 P53 蛋白阳性表达,之间没有显著的差异($P>0.05$)。对两者行相关性分析也表明:两者之间存在着显著的相关性($\chi^2=37.961$,$r=0.707$,$P<0.01$)。结果表明:膀胱移行细胞癌中中心体异常与 p53 基因突变密切相关。这与Kawamura K 等[7-9]的报道相一致。因此可以假定:中心体异常可能是 p53 基因突变导致膀胱移行细胞癌发生发展中重要中间环节。p53 基因突变后,可能通过调控中心体复制异常,使细胞发生多极分裂,从而引起异常数目的染色体而形成非整倍体,即 CIN 表型,致使受累染色体区域基因改变,从而打破多个细胞正常生长平衡系统,导致细胞恶变。因此,研究中心体异常可能把原癌基因的激活、抑癌基因的失活和细胞周期检测点失调节和肿瘤染色体基因不稳定联系起来,进一步揭示肿瘤的发生和发展过程。

参 考 文 献

[1] Yamamoto Y, Matsuyama H, Furuya T, et al. Centrosome hyperamplification predicts progression and tumor recurrence in bladder Cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(19): 6449-6455.

[2] Doxsey S. The centrosome – a tiny organele with big potentia1[J]. Nat Genet, 1998, 20(2): 104-106.

[3] Pihan GA, Purohit A, Wallace J, et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant rumors[J]. Cancer Research, 1998, 58(17): 3974-3985

[4] Kawamura K, Moriyama M, Shiba N, et al. Centrosome hyperamplification and chromosomal instability in bladder cancer[J]. Eur Urol, 2003, 43(5): 505-515.

[5] 何卫阳,苟 欣,祝海洲,等.凋亡抑制基因 survivin 在膀胱移行细胞癌中表达的初步研究[J].重庆医科大学学报,2004,29(1):41-44.

[6] Kramer A, Neben K, Ho AD. Centrosome replication, genomic instability and cancer[J]. Leukemia, 2002, 16(5): 767-775.

[7] Kawamura K, Ikeda R, Suzuki K. The relationships among ploidy type determined by laser scanning cytometry, the overexpression of p53 protein and the numerical aberrations of chromosome 7 in bladder cancer [J]. Hinyokika Kiko, 2000, 46(6): 377-383.

[8] Kawamura K, Moriyama M, Suga K, et al. Centrosome isolation from cultured bladder cancer cells-p53 mutation and centrosome hyperamplification[J]. Hinyokika Kiko, 2003, 49(2): 69-74.

[9] Kawamura K, Izumi H, Ma Z, et al. Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression[J]. Cancer Research, 2004, 64(14): 4800-4809.

(责任编辑:关蕴良)

Effects of intermittent hypoxia on the growth of SW480 cell lines and the expression of HIF-1 α

LI Ming-yang, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the effects of intermittent hypoxia (IH) on the growth of SW480 cell lines and the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α, the phenomenon of IH in tumors and the relation between IH and HIF-1 α were discussed. *Methods*: The hypoxia condition was simulated by $CoCl_2$. Effect of IH on the growth of SW480 cell lines was observed by MTT assay. Effects of IH on the expression of HIF-1 α were analyzed by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Western blot assay. Cells were divided into four groups: group A: normoxia group, group B: IH for 2 hours group, group C: IH for 3 hours group, and group D: continuous hypoxia (CH) for 3 hours group. *Results*: MTT assay indicated that in the 3 hypoxia groups, the growth of SW480 cell lines was inhibited, when compared with normoxia group. The growth of SW480 cell lines was also inhibited in group C and group D when compared with group B. No significant differences were observed between group C and group D.RT-PCR showed that the level of HIF-1 α mRNA in group C was higher than that in group A, group B and group D. No significant differences were observed among the other 3 groups. Western blot found that the level of HIF-1 α protein in group C was higher than that in the other 3 groups.The level of HIF-1 α protein in group D was higher than that in group B and group A. No significant differences were observed between group B and group A. *Conclusion*: Same hypoxia time but different hypoxia manner inhibit the growth of SW480 cell lines to the same degree. A certain degree of IH can up-regulate the mRNA and protein level of HIF-1 α.

【Key words】Intermittent hypoxia; Colonic neoplasms; Hypoxia-inducible factor

肿瘤性缺氧的一个重要特征是其不稳定性。肿瘤的这种病理生理学特征被称为“间歇性缺氧”(Intermittent hypoxia, IH)或周期性缺氧[1]。目前对肿瘤缺氧的研究主要集中在单纯持续性缺氧对肿瘤的影响。然而,IH 在对肿瘤生物学特性的影响方面与单纯持续性缺氧(Continuous hypoxia, CH)有所不同。结肠癌作为易发生缺氧性变化的恶性肿瘤之一,间歇性缺氧现象依然存在。因此,本研究通过观察间歇性缺氧条件下结肠癌细胞 SW480 的生长情况及 HIF-1α 的变化,以探讨肿瘤的间歇性缺氧现象及与 HIF-1α 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株,药物与试剂:结肠癌细胞株 SW480 由中科院上海细胞所提供。培养基购自 Gibco 公司。小牛血清购自杭州四季青公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、$CoCl_2$ 及 MTT 购自 Sigma 公司。RNAiso Reagent(总 RNA 提取试剂),Marker 及 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver 2.0 试剂盒购自 TaKara 公司,HIF-1 α 引物由 Takara 公司合成。免抗人 HIF-1 α 多克隆抗体,HRP 标记羊抗兔二抗及 ECL 化学发光试剂盒购自武汉博士德公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 结肠癌细胞株 SW480 培养于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基中,在 5%CO_2、37℃条件下常规培养、传代。

1.2.2 间歇性缺氧体外模型的建立 本实验采用 $CoCl_2$ 形成化学性缺氧环境,取对数生长期的 SW480 细胞,以每孔 200 μl(1×10^4 个)接种于 96 孔培养板内,细胞贴壁后加入不同浓度的 $CoCl_2$(终浓度分别为 0、50、100、200、400、800 μmol/L),培养 1 h 后,加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,继续培养 4 h,弃去各孔内液体,每孔加入 200 μl 二甲基亚砜,混匀,测定 570 nm 处各孔吸光度值(A 值),细胞存活率 =[用药组 A 值 / 对照组 A 值]×100%。选择细胞存活率 >90%的最大药物浓度为作用浓度。复氧时以 PBS 清洗细胞并换以不含 $CoCl_2$ 的培养液。间歇性缺氧时间参照 Martinive 等[2]的方法进行,即 1 h 缺氧过程之间间隔以 30 min 复氧过程。细胞分为以下 4 组:A 组:常氧组;B 组:间歇性缺氧 2 h 组;C 组:间歇性缺氧 3 h 组;D 组:持续性缺氧 3 h 组。

1.2.3 RT-PCR 法检测 HIF-1 α mRNA 水平 HIF-1 α PCR 引物序列如下,上游:5'-AGAAACCACCTATGACCTGC-3',下游:5'-TGAGTTTCAACCCAGACATA-3',目标片段长度为 320 bp。GAPDH 上游:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',目标片段长度为 450 bp。取对数生长期的 SW480 细胞以每孔 2 ml (4×10^5 个),接种于 6 孔培养板内,按上述方法缺氧处理后,按 RNAiso reagent 说明书提取总 RNA,取总 RNA 0.5 μg,按 Takara 说明书配置 25 μl 反应体系,反应条件:50℃ 30 min,94℃ 2 min,27 个循环(94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s),最后 72℃延伸 10 min。取 PCR 产物 2.5 μl 在 3%琼脂糖凝胶上

电泳（100 V，20 min）。计算 HIF-1α mRNA 相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 HIF-1α 蛋白水平 取对数生长期的 SW480 细胞，每 10^6 个细胞加入 500 μl 细胞裂解液，冰上放置 30 min 裂解细胞，12 000 r/min 离心 20 min，收集上清，测定提取的总蛋白浓度，取等量蛋白样品 50 μg 进行 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），然后将蛋白转移至 PVDF 膜上，经 5%脱脂奶粉封闭，分别与兔抗人 HIF-1α、β-actin 多克隆抗体 4℃反应过夜及相应的羊抗兔二抗反应 1 h，加入化学发光剂 ECL 反应，显色，计算 HIF-1α 蛋白相对表达量。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。多组间的均数差异性比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

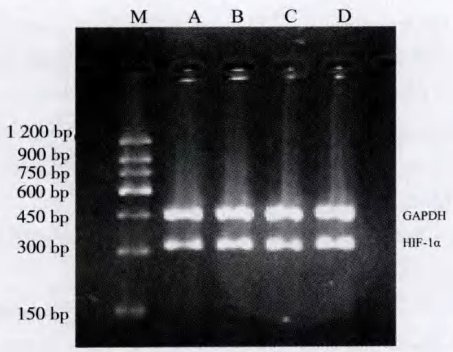
2 结 果

2.1 MTT 结果

不同浓度的 $CoCl_2$ 作用 1 h 后 SW480 细胞的增殖活性见表 1，选择细胞存活率>90%的最大药物浓度（即 100 μmol/L）为作用浓度。间歇性缺氧（100 μmol/L $CoCl_2$）对 SW480 细胞增殖活性的影响见表 2。MTT 法检测各孔 A 值，B、C、D 3 组与 A 组相比均降低，差异有统计学意义（$P<0.01$），C 组和 D 组较 B 组 A 值亦降低，差异有统计学意义（$P<0.01$），而 C 组和 D 组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 1 不同浓度的 $CoCl_2$ 作用 1 h 后 SW480 细胞的增殖活性

药物剂量（μmol/L）	A 值（$\bar{x}\pm s$）	存活率（%）
对照组	1.36 ± 0.04	100
50	1.28 ± 0.02	94.12
100	1.23 ± 0.03	90.44
200	1.04 ± 0.06	76.47
400	0.84 ± 0.06	61.76
800	0.57 ± 0.05	41.91



M. Marker；A. 常氧组；B. 间歇性缺氧 2 h 组；C. 间歇性缺氧 3 h 组；D. 持续性缺氧 3 h 组

图 1 各组 HIF-1α mRNA 的 RT-PCR 检测

2.2 HIF-1α mRNA 的表达

各组 RT-PCR 产物的电泳结果见图 1。C 组 HIF-1α mRNA（0.87±0.04）高于 A 组（0.75±0.03）、B 组（0.78±0.04）及 D 组（0.76±0.05），差异有统计学意义（$P<0.05$）。而其余各组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。

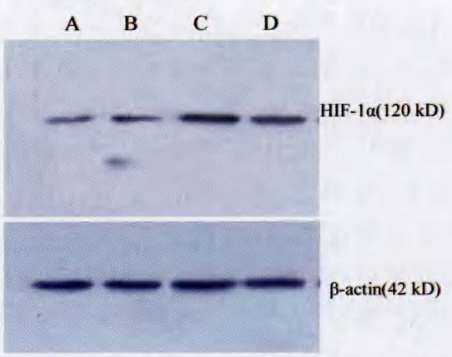
2.3 HIF-1α 蛋白的表达

各组 Western blot 结果见图 2。C 组 HIF-1α 蛋白（0.39±0.04）高于其余各组（$P<0.05$），D 组（0.31±0.03）高于 B 组（0.21±0.02）及 A 组（0.19±0.04）（$P<0.01$），而 B 与 A 组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 2 间歇性缺氧（100 μmol/L $CoCl_2$）对 SW480 细胞增殖活性的影响

组别	A 值（$\bar{x}\pm s$）	存活率（%）
常氧组	1.34 ± 0.05[a]	100
间歇性缺氧 2 h 组	1.20 ± 0.04[b]	89.55
间歇性缺氧 3 h 组	1.05 ± 0.06	78.36
持续性缺氧 3 h 组	1.01 ± 0.05	75.37

a：与其余各组比较，$P<0.01$；b：与间歇性缺氧 3 h 组及持续性缺氧 3 h 组比较，$P<0.01$



A. 常氧组；B. 间歇性缺氧 2 h 组；C. 间歇性缺氧 3 h 组；D. 持续性缺氧 3 h 组

图 2 各组 HIF-1α 蛋白的 Western blot 检测

3 讨 论

IH 现象已通过多种途径加以了证实，包括染色标记、氧传感微电极、活检、核磁共振等。肿瘤的不规则生长和异常的微环境导致暂时的红细胞流量不稳定，短暂的血管阻塞[3]均可能是造成 IH 的原因。

本实验采用 $CoCl_2$ 模拟缺氧环境的机制为 Co^{2+} 可替代氧感受器血红素中的 Fe^{2+}，阻断氧感受器与氧结合，使细胞感受缺氧。MTT 结果表明，随着缺氧

时间的延长,SW480 细胞增殖活性受抑制的程度增加,而相同缺氧时间,不同缺氧方式对 SW480 细胞增殖活性的影响是相同的。然而,IH 与 CH 可能存在的不同分子反应不一定能反映在细胞增殖活性方面,鉴于在缺氧诱导肿瘤基因表达的信息通路上 HIF-1 的中枢纽带作用,有学者在分子反应上探讨了不同缺氧方式及其与 HIF-1 的关系。

HIF-1 由 HIF-1α 和 HIF-1β 2 个亚单位构成,其中 HIF-1α 是氧调节亚单位,在肿瘤细胞代谢、血管新生及肿瘤转移中起重要作用。在许多实体肿瘤的研究中,发现 HIF-1 呈高度表达,并且其表达增强发生于肿瘤早期,先于侵袭和肿瘤血管的形成。

Martinive 等[2]发现 IH 而不是 CH 能减少放射线诱导的细胞死亡,同时他们发现将 HIF-1α 阻断后,IH 预处理对血清饥饿和放疗下内皮细胞及肿瘤细胞的保护作用随之消失。Toffli 等[4]发现随着缺氧/复氧循环的增加,HIF-1α 的磷酸化形式增加,蛋白激酶 A(PKA)可在 IH 条件下参与 HIF-1α 的磷酸化,而 CH 却不然,且 IH 对 HIF-1α 的上调不需要 MAPKs 及 PI3K/Akt 途径参与,这又与 CH 有所不同。

宋炯等[5]的研究提示 HIF-1α 在直肠癌中高表达,与直肠癌血管新生、浸润、转移有重要关系。本实验在此基础上进一步研究了不同缺氧方式对结肠癌细胞 SW480 HIF-1α 表达的影响。HIF-1α mRNA 的 RT-PCR 结果提示间歇性缺氧可能存在某种机制参与了 HIF-1α mRNA 水平的上调,而且这种机制的充分激活可能需要达到一定数量的缺氧/复氧循环。Yuan 等[6]发现总计缺氧时间为 1 h 的 120 次 IH 能诱导缺氧反应元件(Hypoxia response element,HRE)依赖的转录。而 1 h 的 CH 却不能,并且 IH 可诱导钙调蛋白激酶Ⅱ(CaMKⅡ)的活性并参与 HIF-1 的转录激活,其作用可被 CaMKⅡ抑制剂抑制,而 CH 下 CaMKⅡ抑制剂却对 HIF-1 的转录激活无影响。经过相同的缺氧时间,在 IH 条件下比 CH 有更高的 HIF-1 转录活性。这可能也是本实验间歇性缺氧 3 h 上调 HIF-1α mRNA 水平的机制之一。Western blot 的结果提示一定程度的间歇性缺氧和持续性缺氧均能上调 HIF-1α 蛋白的表达,而经历相同的缺氧时间,间歇性缺氧比持续性缺氧能更有效的上调 HIF-1α 蛋白的表达。IH 引起 HIF-1α 的增加可能部分与缺氧/复氧损伤导致 H_2O_2 和应激颗粒的释放,从而稳定 HIF-1α 有关[1]。Martinive 等[2]已证实复氧 30 min 可导致 HIF-1α 的完全降解,说明 IH 引起 HIF-1α 含量的增加应主要归因于 HIF-1α 稳定性的增加。此外,Yuan 等[7]发现 IH 可导致 mTOR 通路的激活,从而增加 HIF-1α 蛋白的合成,活性氧族则可稳定 HIF-1α。

然而,间歇性缺氧 2 h 并没有上调 HIF-1α 蛋白的表达。这与 Martinive 等[2]报道的结果不一致,可能与物理性和化学性间歇性缺氧存在一定差异、不同类型的细胞以及 $CoCl_2$ 的作用浓度及时间等因素有关。

总之,在间歇性缺氧模式下研究肿瘤生物学特性的变化有助于加深和扩展缺氧对肿瘤影响的认识,并为进一步针对间歇性缺氧肿瘤细胞的治疗提供依据。

参 考 文 献

[1] Dewhirst M W, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(6): 425-437.

[2] Martinive P, Defresne F, Bouzin C, et al. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anti-cancer therapies[J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11736-11744.

[3] Pajonk F, Grumann T, McBride W H. The proteasome inhibitor MG-132 protects hypoxic SiHa cervical carcinoma cells after cyclic hypoxia/re-oxygenation from ionizing radiation[J]. Neoplasia, 2006, 8(12): 1037-1041.

[4] Toffoli S, Feron O, Raes M, et al. Intermittent hypoxia changes HIF-1 alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-depen dent regulation of HIF-1alpha[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(10): 1558-1571.

[5] 宋 炯,傅仲学,李明星.HIF-1α 在直肠癌中的表达和血管生成的关系[J].肿瘤,2005,25(6):604-608.

[6] Yuan G, Nanduri J, Bhasker C R, et al. Ca^{2+}/calmodulin kinase-depe ndent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia[J]. J Biol Chem, 2005, 280(6): 4321-4328.

[7] Yuan G, Nanduri J, Khan S, et al. Induction of HIF-1 alpha expression by intermittent hypoxia: Involvement of NADPH oxidase, $Ca^{(2+)}$ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR[J]. J Cell Physiol, 2008, 217(3): 674-685.

(责任编辑:关蕴良)