维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0206－04

低氧诱导人乳腺癌细胞 VEGF 的表达及机制

宗建春，吴诚义

(重庆医科大学临床学院普外科，重庆 400016)

【摘 要】目的：研究低氧对体外培养乳腺癌细胞株 MD－MBA－435S 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor VEGF)表达的影响。方法：建立 MD－MBA－435S 细胞体外低氧培养模型。在缺氧处理后(4h、8h、12h、16h 和 20h)，RT－PCR 和 Western blot 分别检测 VEGF 基因和 HIF－1α 蛋白、VEGF 蛋白的表达变化，台盘兰排斥法检测 20h 以内细胞的存活率。结果：缺氧 20h 以内对细胞生存率影响较小；缺氧 4h 后，VEGFmRNA 的两个亚型 VEGF121 及 VEGF165 的表达相对常氧条件下有显著增加，且随着缺氧时间的增加呈时间效应关系。免疫细胞化学及 Western blot 证实 VEGF 蛋白的表达与 VEGFmRNA 的表达同步；HIF－1α 蛋白在常氧条件下很少表达，缺氧 4h 即有显著表达，且表达量随缺氧时间而升高，Pearson 级差相关分析显示 HIF－1α 蛋白水平和 $VEGF_{165}$mRNA 及蛋白表达显著正相关。结论：缺氧可以显著增加乳腺癌细胞 VEGF 的表达，且 HIF－1α 蛋白在其中发挥重要作用，这可能是乳腺癌恶性增殖和转化的一个重要机制。

【关键词】缺氧；乳腺癌；血管内皮生长因子；缺氧诱导因子－1α

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－08－31

VEGF expression in human breast carcinoma cell line induced by hypoxia and its mechanism

ZONG Jianchun, et al

(*Department of General surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of hypoxia on vascular endothelial growth factor expression in breast carcinoma cell line (MD－MBA－435S) and its mechanism. *Methods*: Hypoxia culture model in vitro was established to test the expression of VEGF and HIF－1α and their correlation in MD－MBA－435S cell line. After cultured in hypoxia circumstance for a given period of time(4 hours, 8 hours, 12 hours, 16 hours, 20 hours), VEGF expression was tested in mRNA level and protein level by RT－PCR and Western blot analysis, HIF－1 α expression tested in protein level. Cell viability in twenty hours was tested by trypan blue exclusion assay. *Results*: Cell survival was affected a little within 20 hours under hypoxia. Two isoforms of VEGFmRNA, VEGF－121 and VEGF165, were identified by RT－PCR, and their expressions increased after treatment of hypoxia for 4 hours. VEGF and HIF－1 α protein expressions increased equally with VEGFmRNA confirmed by immunocytochemistry and Western blot and its positive correlation was found by Pearson product－moment correlation analysis. *Conclusion*: VEGF gene and protein can be induced remarkably by hypoxia in breast carcinoma cell line, which is regulated mostly by transcription factor HIF－1 α. This mechanism may be involved in the malignant proliferation and transformation of breast neoplasm.

【Key words】Hypoxia; Breast neoplasm; VEGF; Hypoxia－inducible factor－1 α(HIF－1α)

低氧广泛存在于实体瘤组织中，随着实体瘤的增大，肿瘤内部不能得到足够血液供应，导致局部处于缺血缺氧状态[1]。本研究采用 RT－PCR、免疫细胞化学及 Western blot 分别检测人乳腺癌细胞在常氧和低氧下其 VEGFmRNA、VEGF 蛋白和 HIF－1α 蛋白的表达，以探讨低氧在乳腺癌发生发展中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及低氧处理

人乳腺癌细胞株 MD－MBA－435S(由本院普外科实验室提供)培养在含 10% 的新鲜胎牛血清的 RMPI1640 培养液中，分别加入 50U/ml 的青霉素及 50mg/ml 的链霉素，预

作者介绍：宗建春(1976－)，男，硕士，
主要研究方向：乳腺肿瘤基础与临床。

基金项目：重庆市卫生局科研项目(03－02－074)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

先 37℃、5%CO_2 和 100% 相对湿度环境中培养 24h 使细胞进入对数生长期后，更换新鲜无血清培养液，再将细胞分别置于常氧(对照组缺氧 0h)和低氧(95%N_2、5%CO_2、<1%O_2)(实验组)环境中分别培养 4h、8h、12h、16h、20h。

低氧培养在一顶端有两支带活塞的玻璃管的密闭真空干燥器中进行。实验开始时，从入气孔输入纯氮以置换装置内的残余 O_2；然后输入混合气(95%N_2、5%CO_2、<0.1%O_2)使气体维持低氧状态。

1.2 逆转录 PCR(RT-PCR)

Trizol 试剂提取细胞总 RNA，RNA 含量通过 752 型紫外分光光度计测定 260nm 和 280nm 的吸收值确定。PCR 引物：VEGF，正义引物：5'-GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC-3'，反义引物：5'-CGATCGTTCTGTATCAGTCTTTCC-3'[2]。β-actin(用 Primer premier version5.0 软件设计，产物大小 323bp)，正义引物：5'-GCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTC-3'，反义引物：5'-AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG-3'(皆由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)，阴性对照或空白对照不加模板 RNA。PCR 反应条件：①94℃ 预变性 5min，②35 循环：94℃ 45s，55℃ 45s，72℃ 1min15s，③72℃ 延伸 5min。

1.3 免疫细胞化学染色

乳腺癌细胞中的 VEGF 蛋白质表达检测采用免疫组化 SP 法，主要步骤如下：新鲜配置的 3%H_2O_2(试剂 A)阻断内源性的过氧化酶活性；微波抗原修复后加非免疫性动物血清(试剂 B)减少非特异背景，直接滴加相应的一抗，4℃ 冰箱孵育过夜；滴加生物素化山羊抗兔 IgG20℃ 20min，加试剂 SP，室温孵育后 DAB 显色，苏木素复染、封片。

1.4 蛋白印迹(Western blot)

Bradford 法测定裂解物总蛋白浓度。收集细胞，预冷 PBS 洗两次，转移至 1.5mlEP 管中，加入 4℃ 预冷蛋白提取液和 1×SDS，4℃ 下离心弃上清液，取裂解物与等量的 2×上样缓冲液混合，煮沸 3min 后以每泳道 100μg 蛋白的量上样于 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶，150v 恒压电泳 90min。蛋白转移到硝酸纤维素膜，经丙春红染色后标记蛋白标准品的位置。杂交前泳 BlottoA 溶液室温孵育 60min 阻断非特异性结合位点，加稀释好的兔抗人 VEGF 室温孵育 120min，TBS 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 90min，TBS 洗涤后进行化学发光，暗室 X 片曝光显示实验结果，采用图像分析软件 Scion Image 比较杂交条带的相对光密度值，获得 VEGF 蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析

计量资料用配伍资料的方差分析，Pearson 级差相关分析 HIF-1α 和 VEGF 的相互关系，$P<0.05$ 为具有统计学意义，统一采用统计学软件 SAS8.1 进行分析。

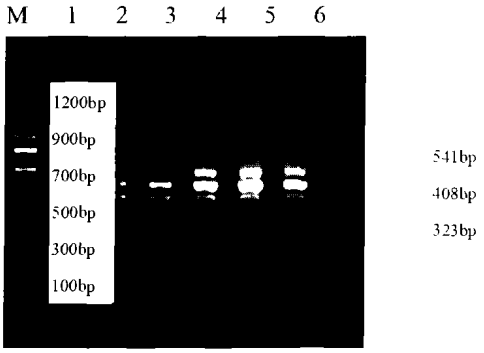
2 结 果

2.1 低氧对 MD-MBA-435S 细胞活力的影响

1×10^5 细胞接种在 100ml 培养瓶中，在缺氧不同时间收集细胞，台盘兰排斥法检测细胞的存活率(至少进行 3 次重复试验)。结果显示：缺氧 4、8、12、16、20h 细胞的存活率分别为 96.3±1.4%、96.4±2.2%、95.9±2.1%、96.3±1.7%、96±1.3%，与常氧对照组(96.3±1.8%)比较无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 低氧对 MD-MBA-435S 细胞 VEGF 基因转录的影响

RT-PCR 结果显示细胞在缺氧不同时间同时表达两种产物，他们同时与不同的 VEGF 亚型 mRNA 相对应[2]：$VEGF_{121}$(541bp)和 $VEGF_{165}$(408bp)。缺氧 4h 后，细胞的 VEGFmRNA 相对常氧下有显著增加，16h 到达最高峰，20h 后略有下降，其中 $VEGF_{165}$ 的表达要明显高于 $VEGF_{121}$，具有统计学意义($P<0.01$)(图 1、表 1)。



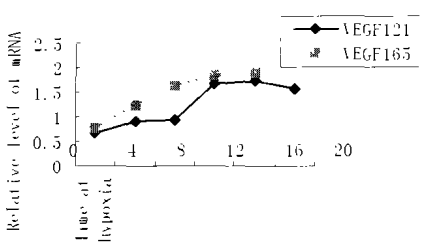


图 1 低氧诱导 MD-MBA-435S 细胞 VEGFmRNA 的表达(RT-PCR)

M：Marker，1~6 分别为对照组(常氧条件)、缺氧 4、8、12、16、20h

维普资讯 http://www.cqvip.com

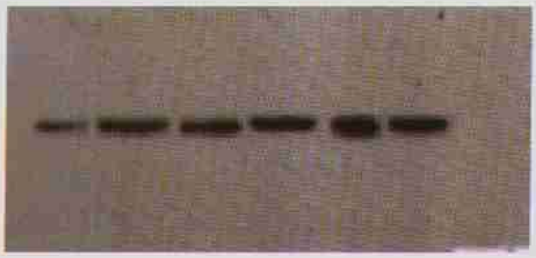


图 2 低氧诱导 MD－MBA－435S 细胞 VEGF 蛋白的表达
1～6 分别为对照组(常氧条件)、缺氧 4、8、12、16、20h

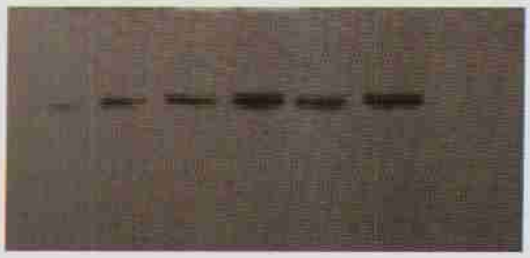


图 3 低氧诱导 MD－MBA－435S 细胞 HIF－1α 蛋白的表达
1～6 分别为对照组(常氧条件)、缺氧 4、8、12、16、20h

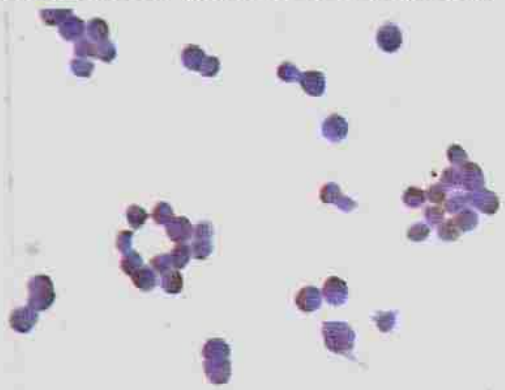


图 4 常氧下 HIF－1α 蛋白呈低表达(SP×400)

表 1 低氧对细胞 VEGFmRNA 的调节($\bar{x} \pm s$)

低氧培养时间(h)	VEGFmRNA 的表达(对应阳性对照光密度值)	
	$VEGF_{121}$	$VEGF_{165}$
0(control)	0.664±0.081	0.768±0.050
4	0.887+0.043	1.226±0.081
8	0.948±0.052	1.636±0.046
12	1.681±0.028	1.850+0.038
16	1.748±0.032	1.915±0.032
20	1.572±0.032	1.845±0.027

Compared with control group, $P<0.01$.

2.3 低氧对 VEGF、HIF－1α 蛋白表达的影响

免疫细胞化学染色结果显示细胞 VEGF 蛋白染色主要表现在胞浆和胞膜，暴露于缺氧环境中 VEGF 蛋白的阳性表达要明显高于常氧条件下的培养(图 6、7)。蛋白印迹结果显示一条特异的 VEGF 条带，分子量约为 29kd，VEGF 蛋白相对光密度值在缺氧条件下明显高于常氧条件($P<0.01$)，缺氧 16h 最高，约为常氧时 5 倍(图 2、表 2)。HIF－1α 蛋白主要在胞核染色，胞浆部分染色；常氧时，乳腺癌细胞 HIF－1α 蛋白很少表达，缺氧时显著表达，表现为胞核强阳性染色(图 4、5)。蛋白印迹结果显示 HIF－1α 蛋白分子量约 120kd，常氧条件下几乎不能检出，缺氧 4h 即有显著表达，表达量随缺氧时间延长而升高($P<0.01$)(图 3、表 2)。

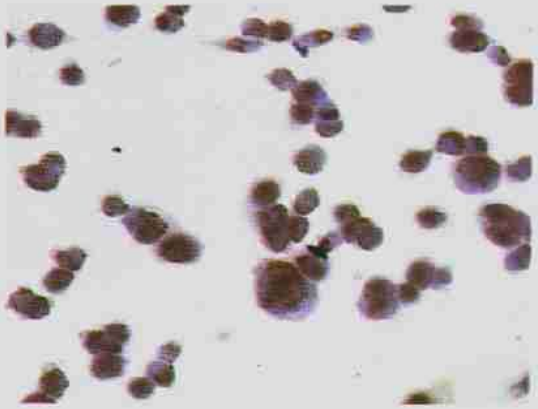


图 5 缺氧 16h HIF－1α 蛋白主要位于细胞的胞核，呈高表达(SP×400)

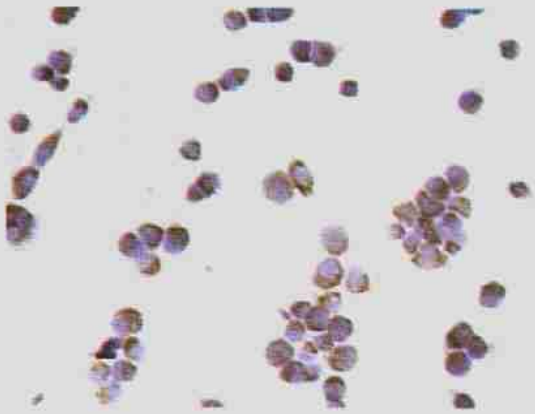


图 6 常氧下 VEGF 蛋白主要位于细胞的胞浆，呈中度表达(SP×400)

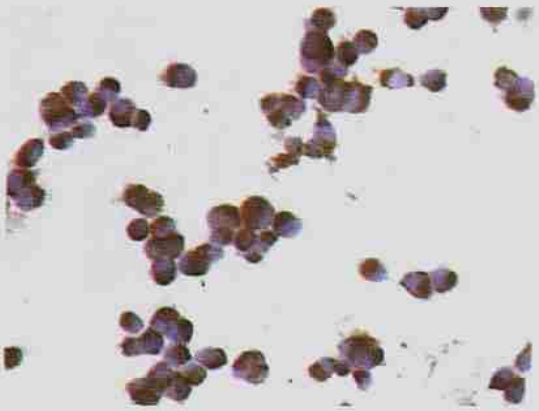


图 7 缺氧 16h VEGF 蛋白主要位于细胞的胞浆，呈高表达(SP×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 低氧对细胞 VEGF、HIF－1α 蛋白的调节($\bar{x} \pm s$)

低氧时间(h)	VEGF	HIF－1α
0(control)	35.09±3.78	12.41±2.14
4	98.52±7.04	86.87±5.47
8	105.01±6.79	95.76±5.44
12	168.18±8.41	107.31±6.53
16	179.20±5.65	114.04±6.58
20	169.13±4.58	109.26±6.40

Compared with control group, $P<0.01$

3 讨 论

至今,已发现的内源性血管生成因子及血管抑制因子有 40 余种,其中作用最强、特异性最高的促血管因子为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor VEGF),VEGF 调节许多内皮细胞的功能,包括有丝分裂形成、通透性、血管紧张度及血管作用分子的产生[3]。VEGF 基因定位于染色体 6P21.3,总长度约为 14Kb,包含 8 个外显子和 7 个内含子。根据剪接方式不同,VEGF 基因转录出不同长度的 VEGFmRNA,主要为 VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189 和 VEGF206[4]。

本实验表明,缺氧 20h 以内乳腺癌细胞的存活率相对常氧条件并不下降,而且在缺氧条件下,乳腺癌细胞 VEGF 无论在转录水平还是蛋白表达水平皆显著增加,提示 VEGF 是乳腺癌细胞在低氧下获得大量增殖的重要因子。另外,VEGFmRNA 同工型在乳腺癌细胞中的表达与大多数肿瘤相似,以 $VEGF_{121}$ 和 $VEGF_{165}$ 为主,说明 $VEGF_{121}$ 和 $VEGF_{165}$ 是引起乳腺癌细胞血管形成的主要亚型[2]。以往研究已证实,大部分实体瘤(包括乳腺癌)内部氧分压大都低于 0.5%,明显低于周围正常组织[5]。因此从我们的实验结果可以推测人乳腺癌在迅速增殖的过程中,由于内部耗氧增加,逐渐处于低氧状态,而低氧促进 VEGF 的大量表达又可进一步促进乳腺癌的生长继而发生远处转移。

另外,本实验从信号传导机制方面初步探讨了低氧促进乳腺癌细胞 VEGF 大量表达的机制。实验发现低氧不仅在蛋白水平而且在基因转录水平刺激乳腺癌细胞 VEGF 的表达(表 1、2),表明缺氧首先通过信号传导影响 VEGF 的上游基因,刺激 VEGFmRNA 的表达继而促进 VEGF 蛋白的大量表达。以往研究表明 VEGF 增强子区域存在数个转录因子结合位点,如 AP－1,AP－2,SP－1 和缺氧诱导因子－1[6]。常氧条件下 VEGF 的表达主要由 SP－1 蛋白调节,SP－1 通过结合在 VEGF 转录启动区附近,促进 VEGF 的转录增强[7]。在低氧条件下,大部分肿瘤细胞内 AP－1,AP－2,SP－1 蛋白水平相对常氧条件增高并不明显,说明缺氧时肿瘤细胞内 VEGF 大量表达另有其它因子调控[8]。我们的实验结果显示,常氧条件下,HIF－1α 很少表达,而在缺氧条件下其表达水平显著增加,其低氧下的表达水平与 VEGFmRNA 及蛋白同步;另外 Pearson 级差相关分析显示 HIF－1α 蛋白水平和 $VEGF_{165}$mRNA 及蛋白表达呈显著正相关(相关系数 r 分别为 0.9411 及 0.9154),说明 HIF－1α 是缺氧条件下介导 VEGF 表达的关键转录因子。

HIF－1 是在缺氧时诱导产生的一类转录因子,由 α 亚基和 β 亚基共同构成异二聚体。缺氧时,HIF－1α 大量产生并进入核内与 HIF－1β 形成异二聚体,而后与靶基因的缺氧反应组件(Hypoxia－responsive element HRE 5'－RCGTG－3')结合,促进靶基因的转录增强。HIF－1 的活性主要取决于 HIF－1α 蛋白的稳定,而且,在常氧下 HIF－1α 蛋白迅速降解,低氧时获得稳定表达,而 HIF－1β 在细胞内固定表达不受氧分压的影响[9,10]。

目前抑制肿瘤的新生血管形成已成为肿瘤治疗的又一新领域,结合我们的研究结果提示缺氧在乳腺癌的新生血管形成中发挥重要作用,而 HIF－1α 是调节这一信号传导的关键转录因子,通过研究 HIF－1α 的天然抑制剂或基因干扰来抑制乳腺癌合成和分泌 VEGF 而抑制新生血管的形成,有可能在乳腺癌的预防复发、提高生存方面发挥重要作用,但这尚需进一步的临床研究。

参 考 文 献

[1] Tempelhoff GF, Heilmnn L, Honmel G. Tumor hypoxia, the physiological link between Trousseau's syndronm (carcinom－induced coagulopathy) and metastasis[J]. Cancer Res, 2001; 61(20): 7697－7698.

[2] Sarah J, Welsh, William T, et al. The Redox Protein Thioredoxin－1 (Trx－1) Increases Hypoxia－inducible Factor 1α Protein Expression: Trx－1 Overexpression Results in Increased Vascular Endothelial Growth Factor Production and Enhanced Tumor Angiogenesis[J]. Cancer Res, (下转第 242 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

区,并诱导其生长分化为心肌细胞替代死亡细胞,可恢复心脏功能,为根治心血管疾病的组织工程学发展奠定坚实的理论基础,具有重大的前期临床意义。

(致谢:本文得到香港中文大学科学基金资助。感谢郑秀云女士在统计学方面给予的帮助。)

参 考 文 献

[1] Nemecek GM, Coughlin, Handley DA, et al. Stimulation of aortic - smooth muscle cell mitogenesis by serotonin[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1986;83:674 - 678.

[2] Fanburg BL, Lee SL. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen[J]. Am J Physiol, 1997; 272: L795 - 806.

[3] Yang M, Sridiathchorn A, Athony M, et al. Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaroblasts[J]. Int J Hematol, 1996;63:137 - 142.

[4] Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function[J]? Cell, 2001;105:829 - 841.

[5] Yang M, Li K, Lam AC, et al. Platelet - derived growth factor enhances granulopoiesis via bone marrow stromal cells [J]. Int J Hematol, 2001;73:327 - 334.

[6] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering[J]. Artif Organs, 2001;25(3):187 - 193.

[7] Dooley AE, Pappas IS, Pamavelas JG, et al. Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons in vitro[J]. Exp Neurol, 1997;148:205 - 214.

[8] Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, et al. 5 - Hydroxytryptamine 2B receptor is required for heart development[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000;97:9508 - 9513.

[9] Nebigil CG, Launay JM, Hickel P, et al. 5 - Hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell - cycle progression: Cross talk with tyrosine kinase pathways[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000;97:2591 - 2596.

[10] Battinelli E, Loscalzo J. Nitro oxide induces apoptosis in megakarocytic cell lines[J]. Blood, 2000;95:3451 - 3459.

(上接第 209 页)

2002;62,5089 - 5095.

[3] 佘 强,陈运贞. 大鼠缺血心肌中 VEGF 表达及毛细血管新生的动态变化[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27(4):406 - 409.

[4] 吴小候,罗春丽. 膀胱移行细胞癌尿脱落细胞 VEGF 表达的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27(1):45 - 47.

[5] M. C. Krishna S, English K, Yamda J, et al. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximerry: coregistrarion of tumor anatomy and tissue oxygen concentration [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002;99:2216 - 2221.

[6] H. Kimura A, Weisz Y, Karashima K, et al. Hypoxia response element of the human vasculax endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia - inducible factot - 1 activity by nitric oxide[J]. Blood, 2000;95:189 - 197.

[7] Ryuto M, Ono M, Izumi H, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP - 1[J]. J Biol Chem, 1996;271(45):28220 - 28228.

[8] Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. Cancer[J]. Metastasis Rev, 2000;19(1 - 2):139 - 145.

[9] Semenza GL. Hypoxia - inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends Mol Med, 2001: 7(8):345 - 350.

[10] Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: 02 - sensing protein hydroxylases, hypoxia - inducible transcription factors, and 02 - regulated gene expression[J]. FASEB J, 2002; 16 (10):1151 - 1162.