

低氧培养的肝癌细胞中低氧诱导因子 1 的表达与血管生成和细胞凋亡相关蛋白的关系

傅志超^{1*}, 王凤玫², 程惠华¹

(1. 南京军区福州总医院放疗科, 福州 350025; 2. 福州总医院妇产科)

[摘要] **目的:** 观察低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 在低氧培养的肝癌细胞中的表达变化, 并初步探讨其与血管生成和细胞凋亡的关系。**方法:** 将终浓度为 125 μ mol/L 的氯化钴加入 HepG2 肝癌细胞培养液中模拟低氧环境, 并设培养不同时间(0、1、2、4、6、8 h)组。(1) 采用 RT-PCR 技术检测低氧培养不同时间的肝癌细胞中 HIF-1 α 、VEGF、Caspase-3、bcl-2 和 bax mRNA 的表达;(2) 应用 Western 印迹方法及酶标免疫测量仪分别检测了各培养组细胞 Caspase-3 蛋白表达及 Caspase-3 酶活性。**结果:** (1) HepG2 细胞在低氧培养 1~2 h 后, 其 HIF-1 α 、VEGF、bcl-2 mRNA 的表达逐渐增加, 在 4 h 达到高峰, 随后下降, 但仍高于低氧处理前水平; 而 bax mRNA 表达无明显变化, bcl-2/bax 比值与上述变化趋势一致。(2) Caspase-3 mRNA 及蛋白的表达及酶活性变化趋势与 HIF-1 α 正好相反。**结论:** HIF-1 α 可能通过调节 VEGF、bcl-2、bax 和 Caspase-3 的表达而抑制肝癌细胞凋亡, 且这种抑制作用与缺氧程度有关。

[关键词] 低氧诱导因子; 血管内皮生长因子类; 基因, bcl-2; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 肝肿瘤

[中图分类号] R 730.23; R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1328-05

Expression of hypoxia inducible factor-1 α in HepG2 cells cultured under hypoxia and its relationship with vascularization and apoptosis-related protein

FU Zhi-chao^{1*}, WANG Feng-mei², CHENG Hui-hua¹ (1. Department of Radiotherapy, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in HepG2 cells cultured under hypoxia for different time periods, and to assess its relationship with vascularization and cell apoptosis. **Methods:** HepG2 cells were cultured in a medium containing cobalt chloride (125 μ mol/L) for different time periods (0, 1, 2, 4, 6, and 8 hours). RT-PCR was used to measure the expression of HIF-1 α mRNA, VEGF mRNA, and bcl-2 mRNA, and bax mRNA at the above time points; Western blot was used to determine the expression of Caspase-3 protein and the activity of Caspase-3 enzyme. **Results:** After 1-2 hour culture under hypoxia, the expression of HIF-1 α mRNA, VEGF mRNA, and bcl-2 mRNA began to increase gradually, peaked at 4 h, and then decreased, but were still higher than that before culture. There was no obvious change in the expression of bax mRNA and the ratio of bcl-2 to bax mRNA expression had a similar change with that of bcl-2 mRNA expression. The changes of Caspase-3 protein/mRNA and Caspase-3 enzyme activity were contrary to that of HIF-1 α . **Conclusion:** HIF-1 α may inhibit the apoptosis of hepatic cancer cells through regulating the expression of VEGF, bcl-2, bax, and Caspase-3, and the inhibition is related to the severity of hypoxia.

[KEY WORDS] hypoxia inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factors; genes, bcl-2; Caspases; liver neoplasmas

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1328-1332]

氧是机体新陈代谢和维持生存的必要因素, 在某些生理或病理生理条件下, 整体或局部低氧能引起机体出现一系列适应性反应, 如红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)合成分泌增加, 糖酵解途径酶的合成增加等。这些反应与低氧诱导细胞产生的低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 有关, 它可调节一系列基因的转录和表达, 以维持机体的正常代谢和功能^[1]。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成的异二聚体, 其

中 α 亚单位被认为是特异性氧调节亚单位, 决定了 HIF-1 的活性。人类实体肿瘤中存在低氧条件, 已在多种恶性肿瘤甚至癌前病变中检测到 HIF-1 α 过表达^[1~3]。HIF-1 α 参加了肿瘤对低氧的适应过程, 从而增强了肿瘤细胞对低氧的抵抗能力, 进而促进肿瘤细胞的生长及恶性转化。肝癌是常见的恶性肿瘤, 死亡率居第 3 位, 而细胞凋亡与增殖的失衡在肝

[作者简介] 傅志超, 硕士, 住院医师。

* Corresponding author. E-mail: fuzhichao@gmail.com

癌发生中起着重要作用。目前关于 HIF-1 α 与肝癌细胞凋亡与增殖关系的研究较少,为此,我们利用分子生物学方法检测了 HIF-1 α 、VEGF、bcl-2、bax、Caspase-3 在化学性低氧培养的肝癌细胞中的表达情况,以初步探讨 HIF-1 α 与肝癌细胞凋亡及增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 人 HepG2 肝癌细胞株由第二军医大学东方肝胆外科医院惠赠。TRIzol 试剂盒购自华舜生物工程有限公司。Caspase-3 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司。BcaBEST RNA PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。100 bp DNA ladder 为上海生工生物工程有限服务公司产品。Caspase-3 酶活性检测试剂盒为 Clontech 公司产品。

1.2 细胞培养 HepG2 置 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱内培养,培养液为含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液,其中含有谷氨酰胺、青霉素和链霉素,终浓度分别为 0.3 g/L、100 U/ml 和 100 mg/L。待 HepG2 细胞进入指数生长期后,更换培养液,以含 125 μ mol/L 终浓度氯化钴的 DMEM 培养液培养不同时间,进行化学模拟缺氧,分别设为 0、1、2、4、6、8 h 缺氧组。

1.3 细胞总 RNA 的抽提 取经过不同缺氧时间培养的 HepG2 细胞,去除培养液后加冰冷 PBS 3 ml, 温柔洗涤 3 次。加 TRIzol 5 ml, 充分混匀,过夜。而后加氯仿 400 μ l, 涡流震荡 1 min。12 000 r/min 室温离心 15 min(半径 6.6 cm), 转移上清。加异丙醇 500 μ l 混匀,置 37℃ 恒温箱 2 h。而后再 12 000 r/min 离心 15 min(半径 6.6 cm), 真空干燥,加 20 μ l 焦磷酸二乙酯(DEPC) 处理的水溶解。检测 RNA 浓度及电泳鉴定提取的 RNA, -80℃ 保存备用。

1.4 扩增引物设计 HIF-1 α 、VEGF、bcl-2、bax 和 caspase-3 扩增引物序列如下:(1) HIF1 α , (F) 5'-CTT CTG GAT GCT GGT GAT TTG-3', (R) 5'-TAT ACG TGA ATG TGG CCT GTG-3', 378 bp; (2) VEGF, (F) 5'-AGG AGG GCA GAA TCA TCA CG-3', (R) 5'-TAT GTG CTG GCC TTG GTG AG-3', 356 bp; (3) Bcl-2, (F) 5'-CAA ATG CTG GAC TGA AAA ATT GTA-3', (R) 5'-TAT TTT CTA AGG ACG GCA TGA TCT-3', 325 bp; (4) Bax, (F) 5'-GAC ACC TGA GCT GAC CTT GG-3', (R) 5'-GAG GAA GTC CAG TGT CCA GC-3',

310 bp; (5) Caspase-3, (F) 5'-GCT ACG AGT GGG ATA CTG GAG A-3', (R) 5'-AGT CAT CCA CAG AGC GAT GTT-3', 412 bp。内参照采用 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) 基因,产物大小为 990 bp,序列如下:(F) 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3', (R) 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'。

1.5 半定量 RT-PCR 利用 TaKaRa 一步法 RNA PCR 试剂盒进行检测。将提取的 6 组细胞 RNA 在 GENEQUANT 仪上读取 D_{260}/D_{280} 比值,计算 RNA 浓度,并将其浓度调整一致。而后分别行 HIF-1 α 和 VEGF、Caspase-3、bcl-2、bax 基因的 RT-PCR。反应体系为反应混合液 10.5 μ l, 模板 RNA 10 μ l, 引物 1 和引物 2 各 0.5 μ l, TaKaRa AVM 逆转录酶和 AVM₂ Optimized Taq 各 0.5 μ l, 水 2.5 μ l, 共 25 μ l。反应程序:55℃ 30 min, 94℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 53℃ 45 s, 72℃ 3 min, 40 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 5 min, 1 个循环。

1.6 PCR 产物测定 取 PCR 产物 10 μ l 行 2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察,经凝胶扫描系统进行光密度积分扫描,以 GAPDH 为内标计算 HIF-1 α 与 GAPDH 光密度积分比值进行定量分析。

1.7 细胞蛋白获取 将处理细胞用冰浴 PBS 冲洗 3 次,然后在冰上用细胞刮将细胞刮下,4℃, 12 000 r/min 离心 1 min 收集细胞。按 5×10^6 个细胞加 100 μ l 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(pH 7.4, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 1 mmol/L NaF 和 Na₃VO₃), 蛋白酶抑制剂(1 mmol/L ZnCl₂, 0.1 mmol/L PMSF, 20 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin) 用前临时加入。在冰上反应 30 min 后,4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, -80℃ 保存备用。

1.8 免疫印迹检测 Caspase-3 蛋白 取样品总蛋白 40 μ g, 加入等体积的 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液, 100℃ 变性 4 min。上清加入上样孔,行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 用槽式转膜仪将蛋白转移到 PVDF 膜(Whatman)上,该膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液(50 mmol/L, pH 7.5, 含 0.1% Tween-20), 4℃ 封闭过夜,用封闭液稀释的兔抗 Caspase-3 抗体与膜蛋白结合后,再与羊抗兔的 IgG-HRP 结合,最后经 ECL 化学发光试剂盒(上海普飞生物公司)显影, X 线片记录结果。

1.9 Caspase-3 酶活性的检测 分别收集 6 组的细胞,每集约 1×10^6 个细胞,处理后加入底物 DEVD-pNA, 使其终浓度为 50 μ mol/L, 置 37℃ 孵育 1 h

后,转移至96孔酶标板中,用酶标免疫测定仪测定 D_{405} 值,以此来表示 Caspase-3 的相对活性。参照试剂盒说明书的方法进行测定。

1.10 图像分析和统计学处理 图像经 Smart-View2001 生物电泳图像分析软件(上海复日科技有限公司)进行处理、分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 氯化钴处理不同时间 HepG2 细胞 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达的变化 结果可见氯化钴处理后 2 h, HIF-1 α mRNA 的表达即逐渐增加 ($P < 0.05$), 4 h 达最大, 随后逐渐降低, 但仍高于处理前 (0 h)(图 1A、1C)。而在氯化钴处理后 1 h, VEGF mRNA 的表达即出现与 HIF-1 α mRNA 相似的变化(图 1B、1C)。

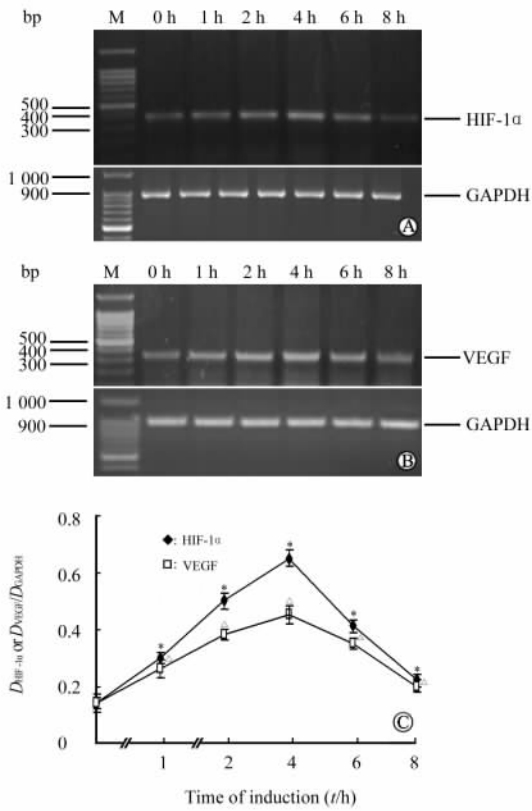


图 1 HepG2 细胞在 CoCl_2 诱导的低氧状态下 HIF-1 α mRNA(A)、VEGF mRNA(B) 表达的变化及时间曲线(C)

Fig 1 Expression of HIF-1 α mRNA(A), VEGF mRNA(B), and their time-course curve(C) for HepG2 cells cultured under CoCl_2 -induced hypoxia

M:100 bp ladder DNA marker; * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.05$ vs 0 h values of each group; $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.2 氯化钴处理不同时间 HepG2 细胞 bcl-2 与 bax mRNA 表达的变化 bcl-2 mRNA 的表达(图 2A)与 HIF-1 α 、VEGF mRNA 有相似的变化, 而 bax mRNA 在各个时间点均处于基础表达水平(图 2B), bcl-2 和 bax mRNA 的比值趋势为 4 h 最高, 而后逐步回落(图 2C)。

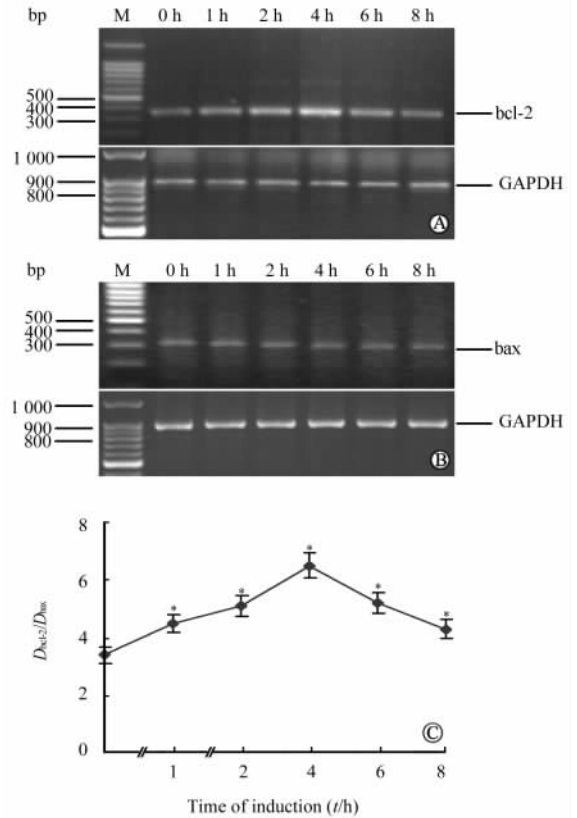


图 2 HepG2 细胞在 CoCl_2 诱导的低氧状态下 bcl-2 mRNA(A)、bax mRNA(B) 表达的变化及 bcl-2/bax 比值变化的时间曲线(C)

Fig 2 Expression of bcl-2 mRNA(A), bax mRNA(B), and time-course curve of bcl-2/bax ratio HepG2 cells cultured under CoCl_2 -induced hypoxia

M:100 bp ladder DNA marker; * $P < 0.05$ vs 0 h; $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.3 氯化钴处理不同时间 HepG2 细胞 Caspase-3 mRNA 及蛋白的表达情况 结果可见, 与 HIF-1 α 、VEGF 及 bcl-2 mRNA 的表达相反, 在氯化钴处理后 1 h, Caspase-3 mRNA 的表达逐渐降低 ($P < 0.05$), 以 4 h 最低, 随后逐渐上升(图 3); 而 Caspase-3 蛋白的表达与 mRNA 的表达趋势一致(图 4)。

2.4 氯化钴处理不同时间 HepG2 细胞 Caspase-3 酶活性变化 HepG2 细胞 Caspase-3 的酶活性在氯化钴处理后开始下降, 4h 达最低值, 随后逐渐上

升, 与 Caspase-3 蛋白的表达趋势一致(图 5)。

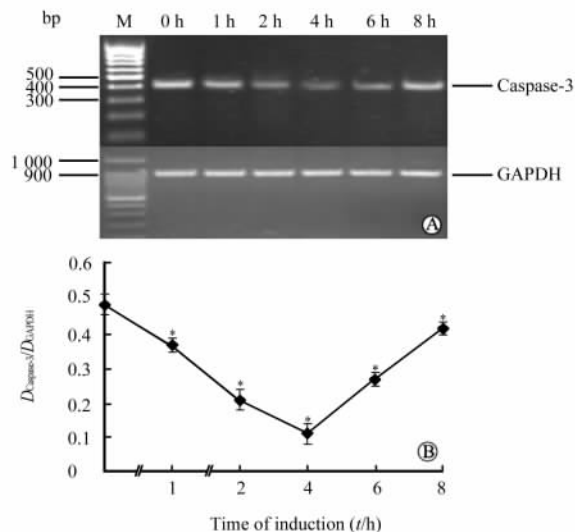


图 3 HepG2 细胞在 CoCl_2 诱导的低氧状态下 Caspase-3 mRNA 表达(A)的变化及时间曲线(C)
Fig 3 Expression of Caspase-3 mRNA(A) and its time course curve(B) for HepG2 cells cultured under CoCl_2 -induced hypoxia

M; 100 bp ladder DNA marker; * $P < 0.05$ vs 0 h; $n = 4, \bar{x} \pm s$

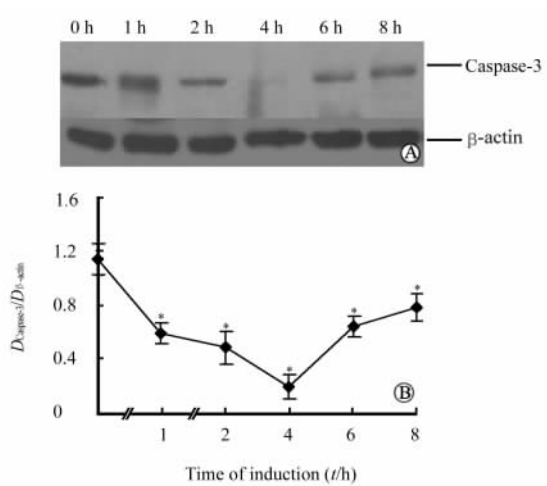


图 4 HepG2 细胞在 CoCl_2 诱导的低氧状态下 Caspase-3 蛋白表达(A)的变化及时间曲线(B)

Fig 4 Expression of Caspase-3 protein(A) and its time-course curve(B) for HepG2 cells cultured under CoCl_2 -induced hypoxia

* $P < 0.05$ vs 0 h; $n = 4, \bar{x} \pm s$

3 讨论

低氧是实体肿瘤常见的现象, 肿瘤形成过程中一个关键的步骤是肿瘤细胞对低氧的适应, 而适应低氧的策略则是形成多血管体系和提高糖酵解速

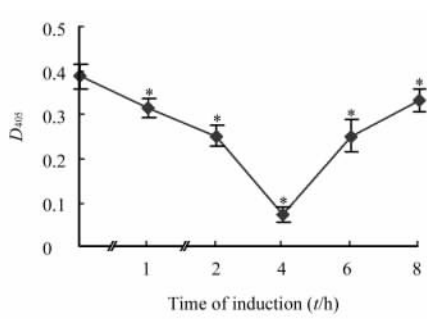


图 5 HepG2 细胞在 CoCl_2 诱导的低氧状态下 Caspase-3 酶活性的变化曲线
Fig 5 Time-course curve of Caspase-3 activity for HepG2 cells cultured under CoCl_2 -induced hypoxia
* $P < 0.05$ vs 0 h; $n = 4, \bar{x} \pm s$

率。通常, 乏氧存在能使肿瘤细胞的一些基因和蛋白表达发生改变, 如氧调节蛋白(oxygen regulated proteins, ORPs)中的血红素加氧酶和糖酵解酶等、VEGF、EPO、p53 和血小板衍生生长因子 β (PDGF- β) 等^[4]。它们的变化使肿瘤细胞在适应乏氧微环境的同时, 引起肿瘤自身的侵袭性增加和对放射治疗的抗拒性增加, 在这个过程中转录因子 HIF-1 起着中枢纽带作用^[2,3]。在 HIF-1 中, 亚单位 HIF-1 α 是一个新发现的含 826 个氨基酸的多肽, 在位于 401~603 的区域有一个氧依赖降解区(oxygen-dependent degradation domain, ODD), 它对氧的依赖性较强, 在调节微环境中的氧平衡起主要作用; 而亚单位 HIF-1 β 对氧的依赖性较弱, 但在 HIF-1 中也必不可少, 因为只有两个亚单位聚合并且发生适形性变化后, 与其要调节的下游基因(如 VEGF、p53 和 EPO 等)的低氧反应元素(hypoxic responsive element, HRE) 结合, 才能发挥调节作用^[5~7]。我们研究结果显示, 随着低氧时间的延长, HIF-1 α 表达水平逐渐升高, 至 4 h 达峰值, 随后逐渐下降。推测在乏氧状态下, HIF-1 α 在转录水平上被上调, 提示乏氧可能通过提高 HIF-1 α 基因转录水平的表达而调节下游基因的表达, 其中 VEGF 为最重要的下游分子。

血管生成是实体性肿瘤生长和转移的必要条件。肿瘤细胞(或含间质细胞)分泌好几种血管生成因子参与调节血管生成, 其中以 VEGF 的作用最为突出。许多研究表明 VEGF 具有双重功能: (1)增加微血管的通透性, 促进血浆蛋白(包括纤维蛋白原)外渗并与其他蛋白(如纤维结合素)结合形成纤维网络, 为成纤维细胞、内皮细胞或其他间质细

胞的迁移提供一个临时骨架,并最终形成血管化的结缔组织。(2)作为内皮细胞特异性的有丝分裂原,通过与内皮细胞膜上两个特异性受体 Flt1 和 Flk1/KDR 的结合,直接刺激内皮细胞分裂增殖、移行,诱导新血管生成^[8]。本研究中随着低氧程度的加深 VEGF 的表达逐渐升高,在 4 h 达到高峰,随后下降。推测低氧引起 HIF-1 α 表达上升,可促进 VEGF 的表达,最终导致肿瘤的浸润性增加。

bcl-2/ bax 是研究增殖凋亡机制的重要因子,bcl-2 是抑制凋亡的因子,bax 是促凋亡因子,bax 所含的 BH3 结构域是死亡结构域,bcl-2 能通过其 BH1、BH2 结构域与 bax 结合,抑制 bax 通过形成同源二聚体而诱导的凋亡。Caspase-3 是细胞凋亡基因,两者比值与细胞凋亡率显著相关。本实验中,bcl-2/ bax 的比值逐渐增大,肿瘤细胞的凋亡受到明显抑制;另一方面,随着低氧程度的增加,Caspase-3 蛋白表达及酶活性逐渐降低,提示 bcl-2/ bax 和 Caspase-3 的异常变化可能是肿瘤的发生过程中细胞凋亡受抑制的潜在机制。

HIF-1 α 在低氧诱导的凋亡与肿瘤增生中起重要作用,目前关于 HIF-1 α 与肝癌凋亡关系报道较少^[9,10]。我们观察了 HIF-1 α 在不同低氧时间肝癌细胞中的表达及其与 bcl-2/bax 和 Caspase-3 的关系,结果显示在低氧时间少于 4 h 的情况下,HIF-1 α 和 bcl-2/bax 随着低氧程度的增加而逐渐升高,而 Caspase-3 的表达及酶活性却相反。这表明 HIF-1 α 表达与肝癌细胞的凋亡抑制有关,它可能在肝细胞癌变过程中通过抑制细胞凋亡从而促进肝细胞的恶性转化。

总之,本研究结果提示,在肝癌的发生过程中,HIF-1 α 表达上调,一方面可以进一步诱导其下游基因表达,使肿瘤细胞适应低氧的环境,另一方面其又可抑制低氧所导致的凋亡,使凋亡/增生进一步失衡,从而最终导致癌变发生。

[参考文献]

- [1] Diaz-Gonzalez JA, Russell J, Rouzaut A, et al. Targeting hypoxia and angiogenesis through HIF-1 α inhibition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4:1055-1062.
- [2] Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4:601-605.
- [3] Bel Aiba RS, Dimova EY, Gorkach A, et al. The role of hypoxia inducible factor-1 in cell metabolism—a possible target in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, 10:583-599.
- [4] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36:1-12.
- [5] Zhong H, Willard M, Simons J. NS398 reduces hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 activity: multiple-level effects involving cyclooxygenase-2 dependent and independent mechanisms [J]. *Int J Cancer*, 2004, 112:585-595.
- [6] Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105:176-181.
- [7] Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8:1831-1837.
- [8] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23:1011-1027.
- [9] Piret JP, Mottet D, Raes M, et al. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2 [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 973:443-447.
- [10] Piret JP, Lecocq C, Toffoli S, et al. Hypoxia and CoCl₂ protect HepG2 cells against serum deprivation and t-BHP-induced apoptosis: a possible anti-apoptotic role for HIF-1 [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 295:340-349.

[收稿日期] 2006-04-30

[修回日期] 2006-11-06

[本文编辑] 孙岩,邓晓群

欢迎订阅

《军医大学学报(英文版)》 ISSN 1000-1948
CN31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA