

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00808

· 研究简报 ·

HIF-1 α 对缺氧条件下人脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖和凋亡的影响

吴胜春,石晓明,唐雷,吕柏楠*,杨永宾

河北省人民医院普外二科,石家庄 050051

[关键词] 低氧诱导因子 1 α ;内皮细胞;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R 543.7 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2013)07-0808-04

Effect of HIF-1 α on proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial ECV304 cells exposed to hypoxia

WU Sheng-chun, SHI Xiao-ming, TANG Lei, LÜ Bo-nan*, YANG Yong-bin

Department of General Surgery (II), People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

[Key words] hypoxia inducible factor-1 α ; endothelial cells; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7):808-811]

缺氧是临床常见下肢静脉性疾病如静脉曲张、静脉血栓等形成与发展的重要原因之一^[1]。低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factors-1 α , HIF-1 α)是最早发现的缺氧状态下特异性发挥作用的 DNA 结合蛋白,当缺氧发生时, HIF-1 α 多有特异性表达并引起一系列相关分子改变,在疾病发生进展过程中广泛作用于细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化等过程^[2-5]。然而,缺氧状态下内皮细胞中 HIF-1 α 表达与细胞凋亡和增殖关系的报道较少。本研究观察缺氧对人脐静脉内皮细胞 ECV304 HIF-1 α 表达及细胞增殖与凋亡的影响,以期为临床靶向性治疗下肢静脉性疾病提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 MTT(美国 Sigma 公司);RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶(Gibco 公司);TUNEL 试剂盒(瑞士 Roche 公司);荧光定量 RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司);PCNA、P53、Bcl-2、Bax、HIF-1 α 及 GAPDH 抗体(美国 Santa Cruz 公司);PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 细胞培养 人脐静脉内皮细胞 ECV304 购自中国科学院上海细胞研究所,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的湿润恒温培养箱中。

1.3 HIF-1 α siRNA 转染和实验分组 HIF-1 α -siRNA 序列根据文献^[6]设计,序列为:5'-ACA CGC AAA UAG CUG AUG GUA AGC CUC-3',无关对照 siRNA (non-specific control siRNA, NS-siRNA)序列为:5'-UCA CAA GGG AGA GAA AGA GAG GAA GGA-3'。转染前 24 h 将 ECV304 细胞以 4 \times 10⁵/mL 密度接种于 6 孔板中,用 LipofectamineTM 2000 试剂将 HIF-1 α -siRNA 或 NS-siRNA(终浓度为 50 nmol/L)转染 ECV304 细胞。传代 24 h 后置于三气数字培养箱内,用混合气(94% N₂-5% CO₂-1% O₂)置换法低氧培养 24 h。实验分为正常氧对照组、低氧对照组、低氧+NS-siRNA 对照组、低氧+HIF-1 α -siRNA 干扰组,采用蛋白质印迹法检测沉默效果。

1.4 MTT 法检测细胞增殖率 对数生长期的 ECV304 细胞消化后,以 5 \times 10⁴/mL 密度接种于 96 孔板,并用培养液调整至每孔 200 μ L,每组设 6 个复孔。各组细胞于实验结束前 4 h 加入 MTT(浓度为 5 mg/mL)20 μ L,继续培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 DMSO 150 μ L,室温振荡 15 min 至蓝紫色结晶完全溶解,用酶标仪于波长 490 nm 处测光密度(D)值。实验重复 3 次。生长抑制率(%)=(1-实验组 D 值/对照组 D 值) \times 100%。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期分

[收稿日期] 2013-02-28

[接受日期] 2013-05-21

[基金项目] 河北省卫生厅科研基金(20090027)。Supported by Fund from Health Department of Hebei Province (20090027)。

[作者简介] 吴胜春,副主任医师。E-mail: wushengchun2008@sina.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 0311-85989949

布 各组 ECV304 细胞消化后,4 $^{\circ}$ C 500 \times g 离心 5 min 收集细胞,沉淀加入 1 mL 预冷的 70%乙醇,轻轻吹打成单细胞悬液,4 $^{\circ}$ C 固定过夜。4 $^{\circ}$ C 500 \times g 离心 10 min,弃去上清,用 PBS 清洗 2 次。然后用 1 mL PI 染液重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,上 Becton Dickinson FACscan 流式细胞仪进行检测。实验重复 3 次。

1.6 TUNEL 检测细胞凋亡 各组细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次,用新鲜配制的 4%多聚甲醛室温固定 40 min,PBS 洗涤 3 次,3% H₂O₂-甲醇室温 30 min,PBS 洗涤 3 次,加入含 0.1% Triton X-100 的 0.1%枸橼酸钠溶液 4 $^{\circ}$ C 冰箱冰上通透 3 min,PBS 洗涤 3 次,加入 TUNEL 反应混合物,37 $^{\circ}$ C 湿盒内孵育 90 min,PBS 洗涤 3 次,加入 POD 转换液,37 $^{\circ}$ C 湿盒 30 min,PBS 洗涤 3 次,加入 DAB 显色。之后脱水、透明、封固、镜检。随机选取 5 个高倍视野,计算每 1 000 个细胞中的凋亡细胞数。

1.7 RNA 提取及荧光实时定量 RT-PCR 收集各组细胞,采用 TRIzol 一步法提取 RNA。各组取 RNA 1 μ g,进行反转录反应并建立 PCR 反应体系:2 μ L cDNA 作为 PCR 反应的模板,2 \times Ultra SYBR Mixture 10 μ L,上、下游引物(浓度 10 μ mol/L)1 μ L;最后加无 DNase-RNase 水至总体积 20 μ L。PCR 反应参数为:95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性后,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 40 个循环,于每个循环的延伸阶段采集荧光信号。以 GAPDH 为内参照基因,计算目的基因表达的相对定量值(RQ 值)。所用引物序列如下:PCNA 上游引物 5'-GTG GAG AAC TTG GAA ATG GAA AC-3',下游引物 5'-TTG AAG AGA GTG GAG TGG CT-3';P53 上游引物 5'-TTT GAG GTG CGT GTT TGT G-3',下游引物 5'-CCC TTT CTT GCG GAG ATT C-3';Bax 上游引物 5'-GAT GCG TCC ACC AAG AAG C-3',下游引物 5'-AAG TCC AAT GTC CAG CCC AT-3';Bcl-2 上游引物 5'-TGT GTG GAG AGC GTC AAC C-3',下游引物 5'-TGG ATC CAG GTG TGC AGG T-3';HIF-1 α 上游引物 5'-TCT GGG TTG AAA CTC AAG CAA CTG-3',下游引物 5'-CAA CCG GTT TAA GGA CAC ATT CTG-3';GAPDH 上游引物 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3',下游引物 5'-GCT TCA CCA CCT TCT TGA TGT C-3'。

1.8 蛋白质印迹检测增殖和凋亡相关分子的表达 收集各组细胞,用冷的 PBS 洗涤 3 次,于细胞裂解液中重悬细胞,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 7 104 \times g 离心 10

min,上清进行定量后,各组取等量的蛋白上样,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭,依次加入一抗和相应二抗,化学发光法进行显色,对条带进行光密度积分扫描,GAPDH 作为内参照。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett *t* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HIF-1 α siRNA 沉默效果的鉴定 正常氧对照组 ECV304 细胞几乎不表达 HIF-1 α ;低氧对照组 ECV304 细胞 HIF-1 α 表达上调($P<0.05$);低氧+NS-siRNA 对照组与低氧对照组 HIF-1 α 表达差异无统计学意义;低氧+HIF-1 α -siRNA 干扰组 HIF-1 α 表达与低氧+NS-siRNA 对照组比较下调($P<0.05$,图 1),说明 HIF-1 α siRNA 沉默效果较好。

2.2 HIF-1 α 对低氧状态下 ECV304 细胞增殖的影响 MTT 检测结果如表 1 所示,低氧使 ECV304 细胞增殖抑制率增加($P<0.05$),表明低氧可以抑制 ECV304 细胞增殖,而细胞转染了 HIF-1 α -siRNA 之后,低氧对细胞的增殖抑制率下降($P<0.05$)。

2.3 HIF-1 α 对低氧状态下 ECV304 细胞周期的影响 ECV304 细胞经低氧处理后,处于 G₀/G₁ 期的细胞数增加($P<0.05$),处于 S 期的细胞数减少($P<0.05$),表明低氧可以抑制 ECV304 细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期。而细胞转染了 HIF-1 α -siRNA 后,低氧对细胞周期进程的抑制作用减弱($P<0.05$),见表 1。

图 1 HIF-1 α 特异性小干扰 RNA 沉默效果的鉴定

1: 正常氧对照组; 2: 低氧对照组; 3: 低氧+NS-siRNA 对照组; 4: 低氧+HIF-1 α -siRNA 干扰组。* $P<0.05$ 与正常氧对照组比较; Δ $P<0.05$ 与低氧+NS-siRNA 对照组比较。 $n=3$, $\bar{x}\pm s$

表 1 HIF-1 α 对低氧状态下 ECV304 细胞增殖抑制率、细胞周期和细胞凋亡的影响

$n=3, \bar{x} \pm s$

组别	细胞增殖抑制率 (%)	细胞周期 (%)			细胞凋亡率 (%)	TUNEL 阳性细胞数
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M		
正常氧对照	7.96 \pm 0.61	63.4 \pm 5.1	19.1 \pm 4.2	17.5 \pm 3.6	2.26 \pm 0.48	55.49 \pm 11.17
低氧对照	30.74 \pm 2.58*	73.2 \pm 6.6*	9.7 \pm 2.5*	17.1 \pm 4.2	21.05 \pm 3.47*	248.34 \pm 18.13*
低氧+NS-siRNA 对照	29.86 \pm 2.83*	72.1 \pm 7.8*	10.5 \pm 2.2*	17.4 \pm 3.7	20.56 \pm 3.52*	246.73 \pm 17.96*
低氧+HIF-1 α -siRNA 干扰	10.23 \pm 1.25 Δ	65.8 \pm 6.4 Δ	16.8 \pm 4.4 Δ	17.4 \pm 3.5	4.53 \pm 0.62* Δ	68.92 \pm 8.07* Δ

* $P < 0.05$ 与正常氧对照组比较; $\Delta P < 0.05$ 与低氧+NS-siRNA 对照组比较

2.4 HIF-1 α 对低氧状态下 ECV304 细胞凋亡的影响
流式细胞术检测结果表明,ECV304 细胞经低氧处理后,细胞凋亡率增加($P < 0.05$),表明低氧可以促进 ECV304 细胞凋亡。而细胞转染了 HIF-1 α -siRNA 后,低氧对细胞凋亡的促进作用下降($P < 0.05$)。TUNEL 染色检测细胞凋亡的结果与流式细胞术检测细胞凋亡率的结果一致,见表 1。

2.5 HIF-1 α 对低氧状态下 ECV304 细胞增殖和凋亡

相关分子表达的影响 ECV304 细胞经低氧处理后,PCNA 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平下降($P < 0.05$),P53 和 Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平上升($P < 0.05$)。而细胞转染了 HIF-1 α -siRNA 后,PCNA 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平升高($P < 0.05$),P53 和 Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。见图 2。

图 2 HIF-1 α 对低氧状态下 ECV304 细胞增殖和凋亡相关分子表达的影响

1: 正常氧对照组; 2: 低氧对照组; 3: 低氧+NS-siRNA 对照组; 4: 低氧+HIF-1 α -siRNA 干扰组. * $P < 0.05$ 与正常氧对照组比较; $\Delta P < 0.05$ 与低氧+NS-siRNA 对照组比较. $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

下肢静脉疾病是外科常见疾病,此类疾病危害较大,有致残、致死的风险,但有关此类疾病的病因及分子发病机制研究还不充分。缺氧是导致血管疾病发病的重要原因之一,大多血管疾病都存在缺氧状态^[1]。本研究应用 RNA 干扰技术特异性沉默 HIF-1 α ,发现沉默 HIF-1 α 不仅使低氧对细胞的增殖抑制作用减小,而且使低氧对细胞周期的阻滞作用和凋亡促进作用减弱。可见,HIF-1 α 在缺氧状态下 ECV304 细胞增殖与凋亡过程中发挥了重要作用。

增殖与凋亡由一系列相关分子共同调控,为进一步探讨 HIF-1 α 在静脉疾病发病过程中的作用机制,我们检测了几个有代表性的分子表达水平变化。PCNA 主要在 S 期表达,可有效反映细胞的增殖活力^[7]。已

有研究表明,低氧能导致多种细胞 P53 表达明显改变^[8],低氧对 P53 的富集与活化依赖于 HIF-1 的表达^[9]。本研究也观察到,低氧 24 h 细胞 PCNA 表达下降,P53 表达上升,而转染了 HIF-1 α -siRNA 之后,低氧不能引起 PCNA 表达下降和 P53 表达上升,说明在 ECV304 细胞中,低氧状态下细胞增殖相关分子的表达依赖于 HIF-1 α 。另外,我们对在细胞凋亡过程中发挥重要作用的 Bcl-2 家族成员 Bcl-2 和 Bax^[10-11] 的表达也进行了检测,结果表明,低氧 24 h 导致凋亡促进蛋白 Bax 表达升高,凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达下降。而在细胞转染了 HIF-1 α -siRNA 之后,大大削弱了低氧对 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。

总之,本实验表明缺氧能抑制 ECV304 细胞增殖、促进细胞凋亡,这种作用依赖于缺氧对 HIF-1 α 的诱导表达。本实验为以 HIF-1 α 为靶点的临床治疗提供了

一定的理论依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Chatterjee S S. Venous ulcers of the lower limb: where do we stand? [J]. *Indian J Plast Surg*, 2012, 45:266-274.
- [2] Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2-- is one more important than the other? [J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 56(5-6):245-251.
- [3] Lambert C M, Roy M, Robitaille G A, Richard D E, Bonnet S. HIF-1 inhibition decreases systemic vascular remodelling diseases by promoting apoptosis through a hexokinase 2-dependent mechanism [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88:196-204.
- [4] Yang W, Sun T, Cao J, Fan S. Hypoxia-inducible factor-1 α downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and enhances radiosensitivity in chemical hypoxic human hepatoma SMMC-7721 cells [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26:565-571.
- [5] Adams J M, Difazio L T, Rolandelli R H, Luján J J, Haskó G, Csóka B, et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia [J]. *Acta Physiol Hung*, 2009, 96:19-28.
- [6] Medici D, Olsen B R. Rapamycin inhibits proliferation of hemangioma endothelial cells by reducing HIF-1-dependent expression of VEGF [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e42913.
- [7] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 15):3051-3060.
- [8] Chattergoon N N, D'Souza F M, Deng W, Chen H, Hyman A L, Kadowitz P J. Antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in aortic and pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288:L202-L211.
- [9] An W G, Kanekal M, Simon M C, Maltepe E, Blagosklonny M V, Neckers L M. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α [J]. *Nature*, 1998, 392:405-408.
- [10] Li X, Zhang X L, Shen G, Tang G H. Effects of tensile forces on serum deprivation-induced osteoblast apoptosis: expression analysis of caspases, Bcl-2, and Bax [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125:2568-2573.
- [11] Kim E M, Kim J, Park J K, Hwang S G, Kim W J, Lee W J, et al. Bcl-w promotes cell invasion by blocking the invasion-suppressing action of Bax [J]. *Cell Signal*, 2012, 24:1163-1172.

[本文编辑] 孙岩