

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00005

常氧酸性环境对肝癌细胞 HepG2 HIF-1 α 蛋白表达及其活性的影响

徐佳骏, 彭兆云, 康志敏, 刘 昀, 徐伟刚, 陶恒沂, 孙学军*

第二军医大学海军医学系潜水医学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 观察常氧酸性环境对体外肝癌细胞低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 蛋白表达及其活性的影响, 初步探讨其在肿瘤生长中的作用。**方法:** 体外培养肝癌细胞 HepG2, 以 MTT 法测定常氧酸性环境(AP组, pH 6.5)作用 20 h 后细胞存活率, 并与正常培养细胞(SD组, pH 7.2)作比较; Western 印迹法检测 AP组和SD组 HepG2 细胞核内 HIF-1 α 蛋白表达的变化; 应用转录因子 DNA 结合 ELISA 试剂盒(TransAMTM)分析 AP组和SD组 HepG2 细胞核内 HIF-1 DNA 结合活性的变化; 免疫细胞化学法和 Western 印迹法检测各组 HepG2 细胞内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 蛋白表达的变化。**结果:** 常氧酸性环境(pH 6.5)作用 20 h 后, AP组细胞存活率为(98.71 \pm 1.79)%, 与SD组相比轻微降低, 但无统计学意义($P>0.05$)。Western 印迹结果表明, AP组 HepG2 细胞核内 HIF-1 α 和胞内 VEGF 蛋白条带平均灰度值分别是SD组的(9.34 \pm 1.67)倍和(3.42 \pm 0.83)倍, 组间均有统计学差异($P<0.01$)。AP组 HepG2 细胞核内 HIF-1 DNA 结合活性明显高于对照组($P<0.01$)。**结论:** 常氧酸性环境能显著提高 HepG2 细胞 HIF-1 蛋白含量及其 DNA 结合活性, 同时其下游基因 VEGF 蛋白含量增加, 推测除低氧环境外, 酸性环境也可能是导致恶性肿瘤中 HIF-1 高表达的原因之一。

[关键词] 酸性环境; 低氧诱导因子; 血管内皮生长因子; HepG2 细胞

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0005-04

Effect of normoxic acidosis on HIF-1 α protein expression and activity in human liver cancer cell line HepG2

XU Jia-jun, PENG Zhao-yun, KANG Zhi-min, LIU Yun, XU Wei-gang, TAO Heng-yi, SUN Xue-jun*

Department of Diving Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of normoxic acidosis on HIF-1 α protein expression and activity in human liver cancer cell line HepG2, so as to assess the role of acidosis in tumor growth. **Methods:** HepG2 cells were cultured *in vitro*; the cell growth was assessed by MTT assay after exposure to normoxic acidosis culture media (AP, pH 6.5) for 20 h, and the results were compared with those of the control cells (SD, pH 7.2). Nuclear extractions were performed in the cultured cells, and HIF-1 α protein level and HIF-1 DNA binding activities were examined by immunocytochemistry, Western blotting, and HIF-1 α Transcription Factor Assay Kit (TransAMTM). The protein level of VEGF (vascular endothelial growth factor) was detected in whole cell extractions by Western blotting assay. **Results:** MTT assay demonstrated that the cell survival rate was (98.71 \pm 1.79)% after treatment with normoxic acidosis culture media (AP, pH 6.5). In comparison with SD group, we noted a slight decrease of cell viability in AP group ($P>0.05$). Western blotting analysis showed that the levels of HIF-1 α and VEGF protein increased by (9.34 \pm 1.67) folds and (3.42 \pm 0.83) folds, respectively ($P<0.01$). Moreover, normoxic acidosis greatly enhanced HIF-1 DNA-binding activity compared to SD groups ($P<0.01$). **Conclusion:** Normoxic acidosis can evidently increase HIF-1 α protein level and DNA-binding activity in HepG2 cells. Furthermore, the protein level of VEGF, an important target gene of HIF-1, is also increased. Therefore it is suggested that, in addition to hypoxia, acidosis may also play an important role in induction of HIF-1 in cancer.

[KEY WORDS] acidosis; hypoxia-inducible factor; vascular endothelial growth factor; HepG2 cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):5-8]

氧稳态的维持是细胞生命活动的基本前提。在发育过程中,生物体获得了一系列机制以适应氧浓度的变化,其中最重要的低氧信号传递因子是低氧

诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)。HIF-1 属于 DNA 结合蛋白,是由 α 、 β 两个亚基组成的异二聚体,其活性主要由 HIF-1 α 亚基决定。作为

[收稿日期] 2008-06-12 **[接受日期]** 2008-10-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30500579), Supported by National Natural Science Foundation of China(30500579).

[作者简介] 徐佳骏,助教。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81870349, E-mail:sunxjk@hotmail.com

调节生理或病理条件下氧稳态的核心转录因子, HIF-1 α 在肿瘤形成中也起着非常重要的作用。HIF-1 α 的DNA结合活性和转录活性主要受氧分压调节,同时也受过渡金属、一氧化氮、活性氧、生长因子和酸性环境等多种因素影响^[1-4]。最近的研究^[5-6]发现,pH值依赖的核仁囚禁肿瘤抑制蛋白(Von Hippel-Lindau tumour suppressor protein, VHL)可以影响HIF-1 α 的稳定性,即酸性环境能将VHL囚禁在细胞核仁中,阻断HIF氧依赖降解过程而使细胞内HIF-1 α 增高,调节HIF-1的水平。组织酸化是炎症、缺血、肿瘤组织中常见的一种伴随病理现象,由于细胞损伤和代谢异常,胞外的pH可以降低至6.0以下。酸性环境可使细胞内HIF-1 α 蛋白含量增加,而对其转录活性的影响尚不清楚。本实验以肝癌细胞株HepG2细胞为对象,通过检测HIF-1 α 的DNA结合活性和HIF目的基因表达水平来判断酸性环境所诱导的HIF-1是否具有转录活性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清、青-链霉素抗生素购自美国Gibco公司;核蛋白提取试剂盒、转录因子DNA结合ELISA试剂盒(TransAMTM)购自美国Active Motif公司;四甲基偶氮唑盐试剂(MTT, Sigma公司);兔源HIF-1 α 多克隆抗体、兔源VEGF多克隆抗体、兔源 β -actin单克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司。

1.2 细胞培养 人肝癌HepG2细胞(本实验室保存)置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养。取对数生长期HepG2细胞,2 \times 10⁵/孔接种于6孔板,分为3组,具体如下:(1)常氧酸性环境(AP, acidosis-permissive)组:高糖DMEM培养基(pH 6.5),置常氧37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱内20 h;(2)SD组:高糖DMEM培养基(pH 7.2),置常氧37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱内20 h;(3)CoCl₂组:高糖DMEM培养基(pH 7.2),含CoCl₂终浓度为150 μ mol/L,置常氧37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱内16 h,即CoCl₂模拟低氧环境诱导HIF-1作为阳性对照。

1.3 MTT法测定细胞存活率 培养细胞至对数生长期,接种于96孔板,细胞密度2 \times 10⁴/孔,待细胞贴壁后,分为AP(pH 6.5)组、SD(pH 7.2)组和CoCl₂组进行培养。终止培养前每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)50 μ l,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱继续孵育4 h,终止培养,小心吸取孔内培养上清液。每孔加入150 μ l DMSO,震荡10 min,显微镜下观察结晶全部溶解后,在酶标仪上读取光密度(D)值(测定波长570 nm,

参照波长630 nm)。细胞存活率(%)=(实验孔D值/对照孔D值) \times 100%。实验重复3次,每组均设6孔。

1.4 免疫细胞化学法检测HepG2细胞HIF-1 α 蛋白 将细胞接种于培养皿中的盖玻片上,待细胞贴壁后,分为AP(pH 6.5)组、SD(pH 7.2)组、CoCl₂组进行培养。终止培养后用95%乙醇固定30 min, PBS洗3次,每次5 min,甲醇-过氧化氢封闭非特异性染色30 min,正常工作血清封闭,与HIF-1 α 多克隆抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗3次,依次加二抗和A、B工作液室温60 min。DAB显色,流水充分冲洗后,脱水、透明、封片、观察。

1.5 Western印迹法检测HepG2细胞HIF-1 α 和VEGF蛋白 细胞分为AP(pH 6.5)组、SD(pH 7.2)组、CoCl₂组,分别处理完后,利用核蛋白提取试剂盒提取核蛋白进行HIF-1 α 蛋白的测定;利用全细胞裂解液提取全细胞蛋白进行VEGF蛋白测定。BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,取80 μ g样品上样行免疫印迹测定,将一抗用TBST稀释至适当比例(HIF-1 α , 1:500; VEGF, 1:500, β -actin, 1:2000), ECL显色。结果摄像扫描输入电脑,用Smart Scape 2002生物图像分析软件测定各组HIF-1 α 、VEGF表达量与内参表达量的比值。

1.6 TransAMTM(HIF-1)试剂盒检测HIF-1 DNA结合活性^[7] TransAMTM HIF-1试剂盒可快速、高敏感性、定量分析转录因子活性,其中的96孔板上包被了具有共结合位点的寡聚核苷酸,先后向96孔板每孔加入40 μ l结合缓冲液和10 μ l核蛋白提取物(10 μ g)或COS-7核提取物(阳性对照);密封后,室温下电子摇床孵育1 h,依次经HIF-1 α 一抗和HRP标记二抗孵育后,加入标准或化学荧光显色试剂,用酶标仪检测D值(450 nm,参考波长655 nm)。

1.7 统计学处理 实验结果用SPSS 11.0统计软件分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析(One Way ANOVA),组间差异有统计学意义者用SNK-q检验进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 常氧酸性环境对HepG2细胞生长的影响 MTT检测结果显示:HepG2细胞经处理后各组的细胞生存率分别为:SD组100%、AP组(98.71 \pm 1.79)%, CoCl₂组(98.13 \pm 1.73)%。AP组细胞生存率虽然有轻微的降低,但无统计学差异($P>0.05$)。结果表明,我们所选择的酸性培养环境对细

胞存活率的影响不显著。

2.2 常氧酸性环境对 HepG2 细胞 HIF-1 α 蛋白表达的影响 免疫细胞化学染色结果显示, HIF-1 α 免疫阳性染色主要分布在核内, AP 组和 CoCl₂ 组均有显著阳性表达(图 1)。同时 Western 印迹检测显示, 酸性环境(pH 6.5)处理 HepG2 细胞 20 h 后, 胞核内 HIF-1 α 蛋白表达显著上升(图 2), AP 组 HIF-1 α 蛋白条带平均灰度值是 SD 组的(9.34 \pm 1.67)倍。这说明常氧酸性环境处理能增加 HepG2 细胞核内 HIF-1 α 蛋白含量。

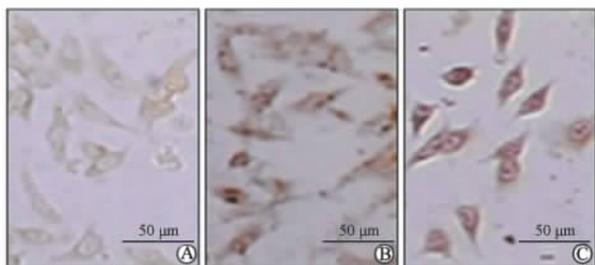


图 1 免疫细胞化学法检测 SD 组(A)、AP 组(B)、CoCl₂ 组(C) HepG2 细胞内 HIF-1 α 蛋白的表达

Fig 1 Detection of HIF-1 α protein by immunocytochemistry in HepG2 cells of SD(pH 7.2, A), AP(pH 6.5, B), and CoCl₂ (C) groups

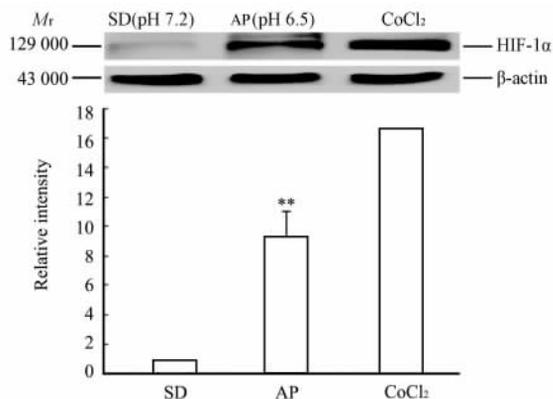


图 2 SD 组、AP 组、CoCl₂ 组 HepG2 细胞 HIF-1 α 蛋白表达的 Western 印迹检测

Fig 2 Western blotting analysis of HIF-1 α in HepG2 cells of SD, AP and CoCl₂ groups

** $P < 0.01$ vs SD group; $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 常氧酸性环境对 HepG2 细胞 HIF-1 DNA 结合活性的影响 TransAM™ HIF-1 试剂盒检测显示, 酸性环境(pH 6.5)处理 HepG2 细胞 20 h 后, 胞内 HIF-1 DNA 结合活性显著上升(图 3), 其中 COS-7 组为试剂盒中的阳性对照组, 450 nm D 值设为 1; 其余各组 450 nm 平均 D 值分别为: SD 组(0.14 \pm 0.02)、AP 组(0.69 \pm 0.08)、CoCl₂ 组

(0.86 \pm 0.11)。AP 组与 SD 组相比, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

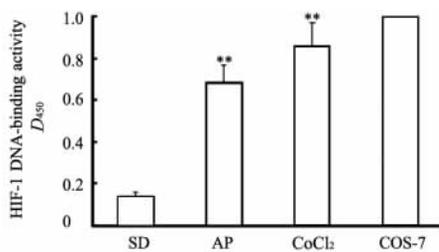


图 3 SD 组、AP 组、CoCl₂ 组

HepG2 细胞 HIF-1 DNA 结合活性检测

Fig 3 DNA-binding activity of HIF-1 in HepG2 cells of SD, AP, and CoCl₂ groups

** $P < 0.01$ vs SD group; $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.4 酸性环境对 HepG2 细胞 HIF-1 下游基因 VEGF 蛋白表达的影响 Western 印迹检测显示, 酸性环境(pH 6.5)处理 HepG2 细胞 20 h 后, 胞内 VEGF 蛋白表达显著上升, AP 组 VEGF 蛋白条带平均灰度值是 SD 组的(3.42 \pm 0.83)倍(图 4)。这说明, 常氧酸性环境处理可能通过增加 HepG2 细胞内 HIF-1 的转录活性, 使其下游重要的靶基因 VEGF 蛋白含量升高。

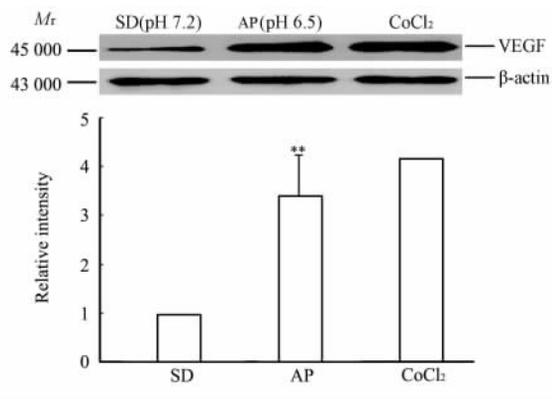


图 4 SD 组、AP 组、CoCl₂ 组

HepG2 细胞 VEGF 蛋白表达的免疫印迹检测

Fig 4 Western blotting analysis of VEGF in HepG2 cells of SD, AP and CoCl₂ groups

** $P < 0.01$ vs SD group; $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

在肿瘤的发生发展过程中, 由于肿瘤生长迅速, 其增生速度超过周围血管的生长速度, 必然会造成局部组织严重缺氧, 因此肿瘤形成过程中的一个关键步骤是肿瘤细胞对低氧的适应, 而适应低氧的策略就是形成多血管体系和提高糖酵解速率。HIF-1 是一种氧调节转录因子, 在缺氧条件下广泛存在于

哺乳动物体内,可调节多种靶基因如 VEGF、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、葡萄糖运载蛋白(glucose transporter-1, GLUT-1)和糖酵解酶等的表达。肿瘤细胞低氧可激活 HIF-1 的活性,诱导靶基因的表达,在维持肿瘤细胞的能量代谢、新生血管形成及促进肿瘤增殖和转移中起重要作用。

正常条件下 HIF-1 的调节是氧依赖的降解过程^[8-10]。Ohh 等^[11]首先证实肿瘤抑制蛋白 pVHL 能直接与 HIF-1 结合。pVHL 具有 E3 泛素化蛋白酶活性,一旦与 HIF-1 结合就会募集 Elongin B、C、Cullin2(cul2)和 RBX1 形成功能性的 E3 泛素-蛋白酶复合体,泛素化的 HIF-1 立即被 26S 蛋白酶体结合并降解。最近的研究^[5-6]发现,酸性环境能将 VHL 囚禁在细胞核仁中,阻断 HIF 氧依赖降解过程而使细胞内 HIF-1 α 增高。而处于缺氧状态下的实体肿瘤,由于细胞代谢异常,常伴随组织酸化现象,胞外的 pH 值可以降低至 6.0 以下。我们的研究发现,常氧酸性环境(pH 6.5)也可诱导 HepG2 细胞 HIF-1 α 蛋白含量和 DNA 结合活性增加,同时其下游基因 VEGF 蛋白表达增加。因此我们推测,除了低氧作为诱导肿瘤细胞 HIF-1 活性增加的主要因素外,伴随的组织酸化现象也对诱导肿瘤细胞 HIF-1 蛋白含量和转录活性增加起到了非常重要的作用。HIF-1 通过调节下游低氧反应基因表达,促进肿瘤组织新血管形成重塑和糖酵解等,提高了肿瘤细胞在低氧条件下的生存能力。

酸性环境对保护细胞抵抗低氧和缺血损伤的保护效应,已在各种实验模型中被确立,但其机制尚不清楚。早在 20 世纪 70 年代就有人^[12-13]报道,细胞外酸性环境对心肌细胞,肾皮质细胞和埃列希腹水肿瘤细胞具有抗缺氧损伤的保护效应,即酸性环境显著增加细胞低氧生存率。Currin 等^[14]在大鼠缺血再灌注肝中发现酸性环境对缺氧细胞起到明显的保护作用,减少了细胞死亡。剧烈运动后,肌肉组织产生乳酸使组织 pH 值下降, Nielsen 等^[15]报道这种肌肉组织的酸化可能参与机体的抗疲劳保护作用。Morimoto 等^[16]报道细胞外酸性环境(pH 6.2)能显著延长成神经纤维瘤细胞在无糖无氧环境中的生存时间,而这种保护效应可能是由于细胞 ATP 能量增加或减少钙离子内流引起。

目前 HIF-1 越来越受到关注。在肿瘤治疗方面,抑制血管生成是一种很重要的新策略,许多研究表明,降低 HIF-1 的稳定性使其降解或使 HIF-1 的活性下降是抑制新血管生成的有效途径,且不少的抗肿瘤药物都有此作用。本研究提示改善肿瘤组织

酸化环境可能成为抑制 HIF-1 表达的重要靶点之一,为临床抗肿瘤治疗提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Chavez J C, LaManna J C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1[J]. *J Neurosci*, 2002, 22, 8922-8931.
- [2] Harris A L. Hypoxia- α key regulatory factor in tumour growth[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2, 38-47.
- [3] Maxwell P H, Pugh C W, Ratcliffe P J. Activation of the HIF pathway in cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11, 293-299.
- [4] Wang G L, Jiang B H, Rue E A, Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 5510-5514.
- [5] Mekhail K, Gunaratnam L, Bonicalzi M E, Lee S. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6, 642-647.
- [6] Willam C, Warnecke C, Schefold J C, Kügler J, Koehne P, Frei U, et al. Inconsistent effects of acidosis on HIF- α protein and its target genes[J]. *Pflugers Arch*, 2006, 451, 534-543.
- [7] Gu G J, Li Y P, Peng Z Y, Xu J J, Kang Z M, Xu W G, et al. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α and erythropoietin in rats[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 104, 1185-1191.
- [8] Bruick R K, McKnight S L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF[J]. *Science*, 2001, 294, 1337-1340.
- [9] Epstein A C, Gleadle J M, McNeill L A, Hewitson K S, O'Rourke J, Mole D R, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation[J]. *Cell*, 2001, 107, 43-54.
- [10] Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing[J]. *Science*, 2001, 292, 464-468.
- [11] Ohh M, Park C W, Ivan M, Hoffman M A, Kim T Y, Huang L E, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2, 423-427.
- [12] Bing O H, Brooks W W, Messer J V. Heart muscle viability following hypoxia: protective effect of acidosis[J]. *Science*, 1973, 180, 1297-1298.
- [13] Penttila A, Trump B F. Extracellular acidosis protects Ehrlich ascites tumor cells and rat renal cortex against anoxic injury[J]. *Science*, 1974, 185, 277-278.
- [14] Currin R T, Gores G J, Thurman R G, Lemasters J J. Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox[J]. *FASEB J*, 1991, 5, 207-210.
- [15] Nielsen O B, de Paoli F, Overgaard K. Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2001, 536, 161-166.
- [16] Morimoto Y, Kemmotsu O, Alojado E S. Extracellular acidosis delays cell death against glucose-oxygen deprivation in neuroblastoma x glioma hybrid cells[J]. *Crit Care Med*, 1997, 25, 841-847.