

# 不同间歇性缺氧诱导方式对 SW480 细胞缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 表达的影响

蒋 尧<sup>1</sup>, 傅仲学<sup>2 $\Delta$</sup> , 李明洋<sup>2</sup> (1. 重庆市渝州监狱医院 400026; 2. 重庆医科大学附属第一医院外三科 400016)

**【摘要】 目的** 利用不同方法模拟间歇性缺氧(intermittent hypoxia, IH)环境, 观察缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) 在 SW480 细胞中的表达情况。**方法** 利用 CoCl<sub>2</sub> (A) 和三气培养箱(B) 两种方式诱导 IH。根据缺氧时间的不同每种诱导方式分 2 组, IH2 h: A2、B2 组, IH3 h: A3、B3 组; C 组为常氧组。利用免疫细胞化学检测 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达部位, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$  表达量的变化。**结果** HIF-1 $\alpha$  蛋白主要在胞质表达。各缺氧组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达水平高于 C 组(0.76 $\pm$ 0.03), A3 组(0.87 $\pm$ 0.04) 高于 A2 组(0.78 $\pm$ 0.04), B3 组(0.98 $\pm$ 0.04) 高于 B2 组(0.85 $\pm$ 0.03), 差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。HIF-1 $\alpha$  蛋白在各缺氧组的表达水平高于 C 组(0.19 $\pm$ 0.03), A3 组(0.39 $\pm$ 0.04) 高于 A2 组(0.21 $\pm$ 0.02), B3 组(0.46 $\pm$ 0.04) 高于 B2 组(0.24 $\pm$ 0.03), 差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。B2、B3 组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达量分别高于 A2、A3 组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** IH 可以上调 HIF-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白水平。HIF-1 $\alpha$  在氧箱诱导的 IH 环境中上调更显著。

**【关键词】** 结肠肿瘤; 间歇性缺氧; 缺氧诱导因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.05.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)05-0555-03

**Effects of different intermittent hypoxia-inducible ways on expression of HIF-1 $\alpha$  in SW480 cells** JIANG Yao<sup>1</sup>, FU Zhong-xue<sup>2 $\Delta$</sup> , LI Ming-yang<sup>2</sup> (1. Hospital of Yuzhou Prison, Chongqing 400026, China; 2. Department of Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**【Abstract】 Objective** To use the different ways to induce intermittent hypoxia(IH) for determining the expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) in SW480 cells. **Methods** IH was simulated by A; CoCl<sub>2</sub> and B; three gases incubator. The different hypoxia-inducible ways were divided into two groups, IH2h; A2, B2 group and IH3h; A3, B3 group; C group was normoxia group. Immunocytochemistry was used to detect the expression site of HIF-1 $\alpha$ . RT-PCR and Western blot were adopted to detect the changes of HIF-1 $\alpha$  expression. **Results** The expression of HIF-1 $\alpha$  protein was mainly in the cytoplasm. The expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA in hypoxia groups was higher than C group(0.76 $\pm$ 0.03), A3 group(0.87 $\pm$ 0.04) was higher than A2 group(0.78 $\pm$ 0.04), B3 group(0.98 $\pm$ 0.04) was higher than B2 group(0.85 $\pm$ 0.03). All differences had statistical significance( $P<0.01$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$  protein in hypoxia groups was higher than C group(0.19 $\pm$ 0.03), A3 group(0.39 $\pm$ 0.04) was higher than A2 group(0.21 $\pm$ 0.02), B3 group(0.46 $\pm$ 0.04) was higher than B2 group(0.24 $\pm$ 0.03), all differences had statistical significance( $P<0.01$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA and HIF-1 $\alpha$  protein in B2 group was higher than that in A2 group, and B3 group was higher than A3 group with statistical significance( $P<0.05$ ). **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein level are increased in IH condition. In IH condition induced by three gases incubator, the expression of HIF-1 $\alpha$  is increased markedly.

**【Key words】** colonic neoplasms; intermittent hypoxia; hypoxia-inducible factor

缺氧是肿瘤微环境的特征之一, 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 在肿瘤细胞对缺氧环境的适应以及对放、化疗耐受等方面起到中心调控的作用。随着对肿瘤缺氧研究的深入, 肿瘤组织中存在的间歇性缺氧(intermittent hypoxia, IH) 也得到证实<sup>[1]</sup>。但是现有对肿瘤进行缺氧环境下的研究主要还是在持续性缺氧(continuous hypoxia, CH) 环境中进行的。本实验利用 CoCl<sub>2</sub>、三气培养箱模拟 IH 的环境, 探讨不同 IH 诱导方式对 SW480 细胞 HIF-1 $\alpha$  表达部位及表达量的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 结肠癌细胞株 SW480(中科院上海细胞所); 培养基(Gibco 公司); 小牛血清(杭州四季青公司); CoCl<sub>2</sub> (Sigma 公司); RNAiso Reagent、Marker 及 Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver 2.0 试剂盒(TaKara 公司); 兔抗人 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体, HRP 标记羊抗兔二抗及 ECL 化学发光试剂盒(武汉博士德公司)。其余试剂均为分析纯。

**1.2 实验分组及缺氧诱导的具体方式** IH 时间参照 Martinive 等<sup>[2]</sup> 的方法进行。CoCl<sub>2</sub> 诱导 IH2 h 组(A2 组): 培养基中

$\Delta$  通讯作者, E-mail: FZX990521@sina.com。

加入终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{CoCl}_2$ , 放置常规培养箱中培养 1 h。复氧时以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞并换以常规培养液放置常规培养箱中培养 30 min。如此反复进行,以总缺氧时间达到 2 h 终止培养。 $\text{CoCl}_2$  诱导 IH3 h 组(A3 组):方法如 A2 组,以总缺氧时间达到 3 h 终止培养。三气培养箱诱导 IH2 h 组(B2 组):将细胞置于 37  $^\circ\text{C}$ 、1%氧气、5% $\text{CO}_2$ 、94% $\text{N}_2$  的三气培养箱中培养 1 h。转入常规培养箱中培养 30 min。如此反复进行,以总缺氧时间达到 2 h 终止培养。三气培养箱诱导 IH3 h 组(B3 组):方法如 B2 组,以总缺氧时间达到 3 h 终止培养。常氧组(C 组):细胞置于 37  $^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 、95%空气和饱和湿度条件下的常规培养箱中培养。

**1.3 免疫细胞化学(ICC)方法测定 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达部位**  
SW480 细胞在 24 孔培养板中爬片生长。缺氧诱导结束后,0.01 mol/L PBS 冲洗,90%乙醇固定。分别滴加过氧化酶阻断溶液和正常非免疫动物血清;滴加一抗,空白对照应用 0.01 mol/L PBS 代替,4  $^\circ\text{C}$  过夜;PBS 冲洗,滴加生物素标记的二抗,最后应用 DAB 显色试剂盒进行显色反应。待显色满意后,用蒸馏水洗涤终止显色。苏木素复染,脱水,中性树胶封片待检。

**1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达** 引物由 Takara 公司合成。序列 HIF1- $\alpha$ (320 bp)上游:5'-AGA AAC CAC CTA TGA CCT GC-3',下游:5'-TGA GTT TCA ACC CAG ACA TA-3'。GAPDH(450 bp)上游:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。缺氧诱导结束后,细胞总 RNA 的抽提按 RNAiso Reagent 试剂说明书进行。取总 RNA 0.5  $\mu\text{g}$ ,按 Takara 说明书配置 25  $\mu\text{L}$  反应体系,反应条件:50  $^\circ\text{C}$  30 min,94  $^\circ\text{C}$  2 min,27 个循环(94  $^\circ\text{C}$  30 s,60  $^\circ\text{C}$  30 s,72  $^\circ\text{C}$  45 s),最后 72  $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。取 PCR 产物 2.5  $\mu\text{L}$  在 3%琼脂糖凝胶上电泳(100 V,50 min)。采用凝胶成像仪进行光密度扫描分析。

**1.5 Western blot** 取对数生长期的 SW480 细胞,每  $10^6$  个细胞加入 500  $\mu\text{L}$  细胞裂解液,冰上放置 30 min 裂解细胞,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,测定提取的总蛋白浓度。取等量蛋白样品 50  $\mu\text{g}$  进行 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以  $\beta$ -actin 蛋白作为等量蛋白质上样对照。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-1 $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 多克隆抗体 4  $^\circ\text{C}$  反应过夜及相应的羊抗兔二抗反应。加入化学发光剂 ECL 反应,显色,密度扫描分析。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。两组间的均数比较采用  $t$  检验,多组间的均数差异性比较采用方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达部位** HIF-1 $\alpha$  蛋白表达主要定位于细胞质,着色呈棕黄色(图 1)。表达部位并没有因为缺氧诱导方式的不同而发生改变。

**2.2 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达量的变化** RT-PCR 产物的电泳结果见图 2。各缺氧组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达水平高于 C 组(0.76 $\pm$ 0.03),A3 组(0.87 $\pm$ 0.04)高于 A2 组(0.78 $\pm$ 0.04),B3 组(0.98 $\pm$ 0.04)高于 B2(0.85 $\pm$ 0.03)组,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。B2、B3 组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达量分别高于

A2 组、A3 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量的变化** HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量的结果见图 3。各缺氧组 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达水平高于 C 组(0.19 $\pm$ 0.03),A3 组(0.39 $\pm$ 0.04)高于 A2 组(0.21 $\pm$ 0.02),B3 组(0.46 $\pm$ 0.04)高于 B2 组(0.24 $\pm$ 0.03),差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。B2、B3 组 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达量分别高于 A2 组、A3 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

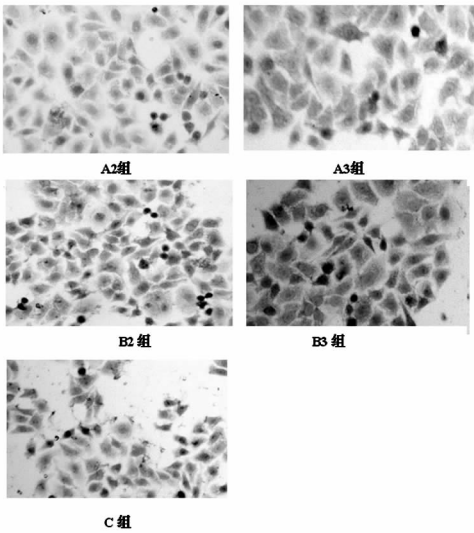
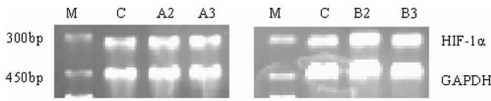
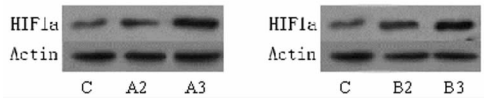


图 1 SW480 细胞免疫细胞化学染色( $\times 200$ )



注:M 指 Marker;C 指 C 组;A2 指 A2 组;A3 指 A3 组;B2 指 B2 组;B3 指 B3 组。

图 2 RT-PCR 检测各组 SW480 细胞内 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的变化



注:C 指 C 组;A2 指 A2 组;A3 指 A3 组;B2 指 B2 组;B3 指 B3 组。

图 3 Western blot 检测各组 SW480 细胞内 HIF-1 $\alpha$  蛋白的变化

## 3 讨 论

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 IH 或周期性缺氧<sup>[3]</sup>。这种现象已通过染色标记、氧传感微电极、活检、核磁共振等多种途径加以证实。肿瘤的不规则生长、微血栓形成、肿瘤新生血管的结构异常以及红细胞流量不稳定均是导致肿瘤 IH 的原因。许多研究发现,缺氧是恶性实体肿瘤预后不良因素之一<sup>[4]</sup>。缺氧应激情况下,肿瘤细胞的生物学特性有所改变:一方面肿瘤的生长受到限制,甚至可引起细胞死亡。但另一方面,肿瘤细胞也可通过一系列的适应性机制来适应缺氧环境,HIF-1 在这里起到中心调节的作用。

HIF 最先由 Semenza 和 Wang<sup>[5]</sup>在缺氧诱导的 Hep3 B 细胞中发现,后来观察到该因子对多种缺氧反应性基因的转录都

有调控作用,并可能参与对缺氧反应的其他信号转导过程。HIF-1 由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  2 个亚单位构成,其中 HIF-1 $\beta$  在常氧或缺氧状态下均稳定存在于细胞中,呈组成性表达,与 HIF-1 的稳定及其二聚体的形成有关。HIF-1 $\alpha$  受氧浓度的调节,在正常氧浓度条件下,HIF-1 $\alpha$  中存在羟基化的脯氨酸,将导致其迅速被泛素依赖的蛋白酶降解<sup>[6]</sup>;当细胞处于缺氧或者受到其他刺激时,脯氨酰羟化酶的活性大大降低,降解通路被阻断,其半衰期显著延长,HIF-1 $\alpha$  亚基表达增高,从而得以与 HIF-1 $\beta$  结合形成一个完整的 HIF-1 转录因子。激活的 HIF-1 与众多靶基因中所共有的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)内的核心序列 5'-TAC GTG CT-3'结合,形成转录起始复合物启动下游基因的表达<sup>[7]</sup>,对机体一系列事件进行调节,使机体或细胞达到对缺氧的适应<sup>[8]</sup>。所以 HIF-1 $\alpha$  是调节亚基和活性亚基,决定 HIF-1 的活性<sup>[9]</sup>。目前,HIF-1 的目的基因涉及到细胞的增殖、存活、稳态,细胞的结构、代谢、生成等方面。其中有 5 类目的基因的蛋白产物与肿瘤关系密切,包括与血管生成相关的因子、葡萄糖转运与糖酵解酶、肿瘤侵袭和转移、放化疗耐受及与肿瘤增殖和凋亡相关的蛋白<sup>[10]</sup>。所以 HIF-1 $\alpha$  一直是肿瘤研究领域内备受关注的热点。

在体外,如涉及到肿瘤缺氧的微环境及 HIF-1 $\alpha$  的表达对肿瘤细胞生物学行为造成影响的研究,面临的首要问题就是如何模拟出较为真实的肿瘤 IH 微环境。现在主要有三气培养箱和 CoCl<sub>2</sub> 两种诱导方式。三气培养箱是一种诱导缺氧的物理方法,其对 HIF-1 $\alpha$  的上调不需要 MAPKs 及 PI3K/Akt 途径参与<sup>[11]</sup>。而 CoCl<sub>2</sub> 模拟缺氧环境的机制为 Co<sup>2+</sup> 可替代氧感受器血红蛋白中的 Fe<sup>2+</sup>,阻断氧感受器与氧结合,抑制细胞氧化反应使细胞感受缺氧。其诱导的 HIF-1 $\alpha$  的转录活性依赖于活性氧簇的产物,并且通过 PI3K 和 MAPK 途径<sup>[12]</sup>。本实验对上述两种方式诱导的间断性缺氧对 SW480 细胞 HIF-1 $\alpha$  表达的影响进行研究,发现 HIF-1 $\alpha$  蛋白主要在胞质表达,不受缺氧及不同缺氧诱导方式的影响;各缺氧组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达水平高于常氧组;同一种诱导方式,随着缺氧时间的延长 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达水平逐步升高;HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的升高在三气培养箱诱导的 IH 环境中比 CoCl<sub>2</sub> 诱导的环境中更为显著,这可能就是由于两种缺氧方式诱导 HIF-1 $\alpha$  产生的途径不同所造成的。

随着生命科学研究进入后基因组时代,传统的对单个基因和蛋白质进行研究的方式已无法满足后基因组时代的要求。蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,对蛋白质结构和功能的研究将会直接阐明生命在生理和病理条件下的变化机制。课题组在后续研究中将利用蛋白质组学的方法在缺氧模式、特别是 IH 模式下,更加深入地探讨不同的缺氧诱导方式对结直肠细胞的影响以及 HIF-1 $\alpha$  在肿瘤缺氧适应中的作用;研究肿瘤生物学特性的变化,加深和扩展缺氧对肿瘤影响的认识,为进一步针对缺氧环境下肿瘤细胞的治疗提供依据。

## 参考文献

[1] Toffoli S, Michiels C. Intermittent hypoxia is a key regu-

- lator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours [J]. FEBS J, 2008, 12: 2991-3002.
- [2] Martinive P, Defresne F, Bouzin C, et al. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies [J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11736-11744.
- [3] Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(6): 425-437.
- [4] Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells; a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia [J]. Cancer Res, 2005, 65(2): 613-621.
- [5] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation [J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(12): 5447-5454.
- [6] Ruas JL, Poellinger L, Pereira T, et al. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription [J]. J Cell Sci, 2005, 118(2): 301-311.
- [7] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation [J]. Science, 2001, 292(5516): 468-472.
- [8] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions [J]. Exp Mol Med, 2004, 36(1): 1-12.
- [9] Li H, Ko HP, Whitlock JP, et al. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of ARNT and HIF1 $\alpha$  [J]. J Biol Chem, 1996, 271(5): 21262-21267.
- [10] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.
- [11] Toffoli S, Feron O, Raes M, et al. Intermittent hypoxia changes HIF-1 $\alpha$  phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1 $\alpha$  [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(10): 1558-1571.
- [12] Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, et al. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism [J]. Free Radic Res, 2006, 40(8): 847-856.

(收稿日期: 2010-09-17)