

低氧诱导因子 1 α 对子宫颈癌细胞生物学行为的影响

程艳香 濮德敏 刘嵘 李天 尹伶 马丁

【摘要】 目的 探讨低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 对宫颈癌细胞的生物学行为的影响以及其中可能存在的分子机制。方法 通过 CoCl₂ 化学诱导宫颈癌 HeLa 细胞缺氧; 构建靶向 HIF-1 α 的反义真核表达载体, 经脂质体介导转染 HeLa 细胞的方法沉默 HIF-1 α 的表达。将实验细胞分为常氧未转染对照 (NN) 组、常氧空质粒转染对照 (NI) 组、常氧转染 pcDNA3.0/HIF-1 α 质粒 (NT) 组、缺氧未转染对照 (HN) 组、缺氧空质粒转染对照 (HI) 组、缺氧转染 pcDNA3.0/HIF-1 α 质粒 (HT) 组。用四甲基偶氮唑蓝法、Transwell 侵袭小室方法观察各组细胞的增殖、侵袭能力的改变, 用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率, 用 RT-PCR 技术检测各组细胞目的基因 HIF-1 α 及其靶基因血管内皮生长因子 (VEGF)、葡萄糖转运体 1 (GLUT1)、多药耐药基因 1 (MDR1) 的表达变化。结果 NT 组细胞在培养 12、24、48、72 h 时的活细胞数分别为 0.053 ± 0.003 、 0.074 ± 0.004 、 0.148 ± 0.015 、 0.192 ± 0.038 , 而 HT 组分别为 0.069 ± 0.003 、 0.155 ± 0.022 、 0.224 ± 0.022 、 0.308 ± 0.069 ; NT 和 HT 组的细胞增殖受到抑制, NT 组与 NN 及 NI 组、HT 组与 HN 及 HI 组间的活细胞数分别比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。各组细胞的凋亡率分别是, NN 组 (29.27 ± 0.18)%、NI 组 (31.13 ± 0.08)%、NT 组 (51.11 ± 0.14)%、HN 组 (11.46 ± 0.28)%、HI 组 (15.77 ± 0.49)%、HT 组 (40.05 ± 0.97)%; HT 组与 HN 及 HI 组、NT 组与 NN 及 NI 组间分别比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。各组细胞的侵袭能力由高到低依次为 HI、HN、NI、NN、HT、NT 组, 分别为 (40 ± 9)%、(37 ± 12)%、(28 ± 5)%、(26 ± 7)%、(19 ± 7)%、(10 ± 5)%; NT 组与 NN 及 NI 组、HT 组与 HN 及 HI 组间分别比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。NT 组细胞 HIF-1 α 、VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的相对表达量分别为 0.05 ± 0.12 、 0.09 ± 0.11 、 0.08 ± 0.15 、 0.05 ± 0.15 , 而 HT 组分别为 0.04 ± 0.16 、 0.16 ± 0.16 、 0.12 ± 0.20 、 0.20 ± 0.21 ; NT 组与 NN 及 NI 组、HT 组与 HN 及 HI 组间分别比较, HIF-1 α 、VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的相对表达量均有降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 HIF-1 α 可能主要通过其下游的靶基因对宫颈癌细胞的恶性生物学行为产生影响, 包括抗凋亡、促增殖、增加血液供应和能量供应、耐药等, 且体外抑制 HIF-1 α 的表达对宫颈癌细胞有抑制作用。

【关键词】 宫颈肿瘤; DNA 结合蛋白质类; 核蛋白质类; 血管内皮生长因子 A; 单糖转运蛋白质类; 基因, MDR

Influence of hypoxia inducible factor-1 α on cervical cancer cell line HeLa in vitro CHENG Yan-xiang, PU De-min, LIU Rong, LI Tian, YIN Ling, MA Ding. Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430032, China

Corresponding author: PU De-min, Email: hf20016@163.com

【Abstract】 Objective To explore the direct influence of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) on the development of invasive cervical cancer and the possible molecular mechanism. **Methods** Recombinant antisense targeting HIF-1 α eukaryotic expression vector was constructed and transfected into cultured human cervical cancer cell line HeLa to reduce the expression of HIF-1 α and its effect on cell proliferation, apoptosis, invasion and the cascade downstream gene expression of HIF-1 α , including vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transport 1 (GLUT1) and multidrug resistance 1 (MDR1) genes was observed. The chemical method using CoCl₂ to induce hypoxia environment of growing cell was performed. Cells were divided into six groups, NN (normal non-transfected), NI (normal invalid transfected), NT

作者单位: 430032 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科

通信作者: 濮德敏, Email: hf20016@163.com

(normal transfected), HN (hypoxia non-transfected), HI (hypoxia invalid transfected), and HT (hypoxia transfected). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), flow cytometry, and Transwell methods were performed to evaluate the proliferation, invasion and apoptosis, and RT-PCR method was used to detect the gene expression of HIF-1 α , VEGF, GLUT1 and MDR1. **Results** After induction of hypoxia by CoCl₂, the change of gene expression of HIF-1 α in HN (or HI) group compared to that in NN (or NI) group was not obvious ($P > 0.05$), but expression of VEGF, GLUT1 and MDR1 were all enhanced and overall proliferation was promoted, apoptosis inhibited [(11.46 \pm 0.28)% vs (29.27 \pm 0.18)%, (15.77 \pm 0.49)% vs (31.13 \pm 0.08)%], and transmembrane behavior enhanced [(37 \pm 12)% vs (26 \pm 7)%, (40 \pm 9)% vs (28 \pm 5)%], and the variations were significant ($P < 0.05$). On the contrary, transfection with pcDNA3.0/HIF-1 α was accompanied by declined gene expression of HIF-1 α (NT: 0.05 \pm 0.12, HT: 0.04 \pm 0.16), and all the variations were significant ($P < 0.05$). **Conclusions** HIF-1 α may participate in malignant biological behaviors of cervical cancer such as anti-apoptosis, accelerating proliferation, increasing supply of blood and energy, increased resistance to chemotherapy through upregulation of its downstream genes. Suppression of HIF-1 α expression in vitro can inhibit cervical cancer cell line.

【Key words】 Cervix neoplasms; DNA-binding proteins; Nuclear proteins; Vascular endothelial growth factor A; Monosaccharide transport proteins; Genes, MDR

实体肿瘤在发展过程中,因瘤体增大血液供应不足而产生缺氧,缺氧又能通过一个关键的转录因子——低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)使肿瘤的血管增生、转移、耐药等恶性行为更为明显^[1]。HIF-1 α 在恶性肿瘤发生发展中所发挥的作用主要与其调节的下游基因有关,这些下游基因包括血管内皮生长因子(VEGF)、葡萄糖转运体1(GLUT1)、多药耐药基因1(MDR1)、促红细胞生成素、整合素、E-钙黏蛋白等基因^[2],这些基因表达上调后共同参与恶性肿瘤的演进。近年宫颈癌的发病率呈反弹上升趋势,对晚期宫颈癌的治疗也无明显突破,因此,寻求敏感特异性高的诊断指标和有效的干预靶点是临床科研人员研究的焦点。本研究探讨HIF-1 α 在体外对宫颈癌细胞生物学行为的影响,并探讨其中可能存在的分子机制。

材料与方法

一、细胞培养与转染

人宫颈癌细胞株(HeLa)购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),在武汉大学中国典型培养物保藏中心保存。HeLa细胞用含有10%胎牛血清的1640完全培养基培养,常氧培养条件为37℃、5%CO₂、相对湿度90%。缺氧处理条件是在常氧培养条件基础上用化学缺氧诱导剂CoCl₂加入相同的培养液中,浓度为150 μ mol/L,用于模拟肿瘤内部的缺氧微环境。HIF-1 α 表达质粒的构建,利用HIF-1 α 两条引物(5'-GGGGATCCTCTGGACTTGTCTCTTTC-3'和5'-GGGCTCGAGTAACTGATGGTGAGCCTC-3'),经PCR反应合成320bp大小的cDNA,该cDNA编码HIF-1 α 的5'末端(152~454位核苷酸,GenBank编号为AF003698)。cDNA先克隆入质粒

pGEMT,再由Xho I和BamH I限制性内切酶反向克隆入质粒pcDNA3.0。提取质粒,测序法鉴定重组质粒pcDNA3.0/HIF-1 α 。按照脂质体lipofectemin(购自美国Invitrogen公司)转染说明将重组质粒pcDNA3.0/HIF-1 α 和阴性对照空质粒pcDNA3.0转染HeLa细胞,氨基糖苷类抗生素G418选择培养基中筛选,3周后获得抗性克隆,利用有限稀释法分选单克隆细胞逐步扩增至常规培养传代。将未转染任何质粒、转染阴性对照空质粒以及转染重组质粒pcDNA3.0/HIF-1 α 的HeLa细胞按常氧和缺氧两种培养方式分别培养,并命名为常氧未转染对照(NN)组、常氧空质粒转染对照(NI)组、常氧转染重组质粒(NT)组、缺氧未转染对照(HN)组、缺氧空质粒转染对照(HI)组、缺氧转染重组质粒(HT)组。

二、四甲基偶氮唑蓝法检测细胞的增殖状态

于96孔板分别接种6种细胞 1×10^4 个,每组设4个复孔,另设含空培养液的培养基作为空白对照,经12、24、48、72h后加入10mg/ml四甲基偶氮唑蓝(MTT)10 μ l,继续培养4h,加二甲基亚砜200 μ l,振荡10min后,用空白对照调零,并于酶标仪490nm处读取吸光度(A)值,以此间接代表每组细胞的增殖状态(活细胞数),实验重复3次。

三、流式细胞仪检测细胞的凋亡情况

膜联蛋白(annexin)V/碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒购自美国Oncogene公司。各组细胞处于指数生长期时收获细胞,加入5 μ l annexin V和5 μ l PI,置于4℃避光孵育30min,流式细胞仪上检测并用CellQuest软件分析计算各组细胞的凋亡率。

四、细胞侵袭实验

采用改良的Transwell侵袭小室方法检测各组

细胞的侵袭能力。Transwell 小室购自美国 Costar 公司,上、下室之间经聚碳酸酯膜(孔径 12 μm , 直径 13 μm , 购自美国 Collaborative Research 公司)隔开,朝上室方向的上膜面(光滑面)铺 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 人工重组基底膜 Matrigel(含 IV 型胶原和层粘连蛋白等成分,购自美国 Collaborative Research 公司),参照文献[3]进行操作后用棉签擦掉上膜面的 Matrigel 及未穿过膜的细胞,染色、优凯特胶封片于 400 倍显微镜下观察,每膜计数上、中、下、左、右 5 个不同视野的背面透过的细胞数作为侵袭细胞数,计算平均值,每组细胞重复 3 孔,后取平均数,计算侵袭率,计算方法为侵袭细胞数/细胞总数 $\times 100\%$,以此代表每组细胞的侵袭能力。

五、RT-PCR 技术检测各组细胞 HIF-1 α 、VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的表达

RNA 提取试剂盒购自美国 GIBCO 公司,逆转录和扩增试剂盒购自美国 Promega 公司,实验步骤严格按照试剂盒说明进行,所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列:HIF-1 α 的引物同上述;内参照 β 肌动蛋白(β -actin):正义链 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3',反义链 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3',扩增片段长 218 bp; VEGF:正义链 5'-TCGGCCTCCGAAACCATGA-3',反义链 5'-CCTGGTGAGAGATCTGGTTC-3',扩增片段长 500 bp; GLUT1:正义链 5'-TCATCGTGGCTGAACCTCTCAG-3',反义链 5'-TCACACTTGGGAATCAGCCCC-3',扩增片段长 314 bp; MDR1:正义链 5'-CATGGTGTGGTGAGTCAGG-3',反义链 5'-CTCTCTCTCCAACCAGGGTG-3',扩增片段长 174 bp。RT-PCR 产物凝胶电泳后以 Eagle EyeII 凝胶成像分析系统扫描分析,测定各电泳条带的 A 值,各目的基因 PCR 产物与 β -actin 的 A 值的比值作为目的基因 mRNA 的相对表达量。

六、统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较用单因素方差分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验。

结 果

一、各组细胞的增殖状态结果

NN 组与 NI 组、HN 组与 HI 组间的活细胞数分别比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);NT 和 HT 组的细胞增殖受到抑制,NT 组与 NN 及 NI 组、HT 组与 HN 及 HI 组间的活细胞数分别比较,差异均有

统计学意义($P < 0.01$);HT 组与 NT 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组细胞培养不同时间的增殖状态($\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
NN 组	0.108 \pm 0.013	0.509 \pm 0.029	0.705 \pm 0.053	0.954 \pm 0.037
NI 组	0.107 \pm 0.021	0.467 \pm 0.026	0.811 \pm 0.047	1.008 \pm 0.041
NT 组	0.053 \pm 0.003	0.074 \pm 0.004	0.148 \pm 0.015	0.192 \pm 0.038
HN 组	0.134 \pm 0.035	0.824 \pm 0.043	1.109 \pm 0.062	1.404 \pm 0.027
HI 组	0.156 \pm 0.028	0.791 \pm 0.046	1.216 \pm 0.055	1.391 \pm 0.063
HT 组	0.069 \pm 0.003	0.155 \pm 0.022	0.224 \pm 0.022	0.308 \pm 0.069

二、各组细胞的凋亡情况

各组细胞的细胞凋亡率分别是,NN 组(29.27 \pm 0.18)%、NI 组(31.13 \pm 0.08)%、NT 组(51.11 \pm 0.14)%、HN 组(11.46 \pm 0.28)%、HI 组(15.77 \pm 0.49)%、HT 组(40.05 \pm 0.97)%;HT 组与 HN 及 HI 组、NT 组与 NN 及 NI 组间分别比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);HT 组与 NT 组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

三、各组细胞的侵袭能力结果

各组细胞的侵袭能力由高到低依次为 HI、HN、NI、NN、HT、NT 组,分别为(40 \pm 9)%、(37 \pm 12)%、(28 \pm 5)%、(26 \pm 7)%、(19 \pm 7)%、(10 \pm 5)%;HT 组与 NT 组间分别比较,差别无统计学意义($P > 0.05$);而 NT 组与 NN 及 NI 组、HT 组与 HN 及 HI 组间分别比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

四、各组细胞 HIF-1 α 、VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的表达

NN、NI、HN、HI、NT 与 HT 组间 HIF-1 α mRNA 的相对表达量分别比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);NT 组与 NN 及 NI 组、HT 组与 HN 及 HI 组间分别比较,HIF-1 α mRNA 的相对表达量有降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

NT 组与 NN、NI 组、HT 组与 HN、HI 组分别比较,VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);HT 组与 NT 组比较,VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的相对表达量升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。NN 组与 NI 组、HN 组与 HI 组间分别比较 VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的相对表达量,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

HT 组与 NN 及 NI 组比较,HIF-1 α 、VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的相对表达量下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞 HIF-1 α 、VEGF、GLUT1、MDR1 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α	VEGF	GLUT1	MDR1
NN 组	0.12 \pm 0.10	0.29 \pm 0.04	0.40 \pm 0.11	0.29 \pm 0.08
NI 组	0.14 \pm 0.09	0.21 \pm 0.16	0.39 \pm 0.13	0.30 \pm 0.11
NT 组	0.05 \pm 0.12	0.09 \pm 0.11	0.08 \pm 0.15	0.05 \pm 0.15
HN 组	0.17 \pm 0.09	0.57 \pm 0.16	0.61 \pm 0.10	0.60 \pm 0.07
HI 组	0.14 \pm 0.05	0.62 \pm 0.09	0.63 \pm 0.05	0.60 \pm 0.11
HT 组	0.04 \pm 0.16	0.16 \pm 0.16	0.12 \pm 0.20	0.20 \pm 0.21

讨 论

HIF-1 α 是 HIF-1 的调节亚基和活性亚基,其羧基端有两个相对独立的反式激活域(transactivation domain, TAD),分别为 N 端 TAD(NTAD)和 C 端 TAD(CTAD),二者之间存在一个抑制结构域(inhibitory domain, ID),抑制常氧下 HIF-1 α 的转录激活。CTAD 诱导辅激活蛋白进入细胞核,与 HIF-1 α 下游基因的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)上的 HIF 结合位点结合,共同形成转录起始复合物,启动下游基因的转录,引起细胞对缺氧的一系列适应性反应,如血管形成、能量供应等。在肿瘤形成过程中一个关键的步骤是对缺氧的自身调节和适应,实体肿瘤普遍存在的缺氧微环境是其对放化疗和免疫治疗产生耐受性的原因之一。

在影响宫颈癌发生、发展的多种因素中,宫颈癌细胞内部缺氧问题越来越受到重视,虽然 HIF-1 α 与宫颈癌的临床病理特征的相关性存在许多争议,但是一般认为其可以作为宫颈癌组织缺氧的固有生物学标记物^[4],因此,HIF-1 α 可成为一个新的宫颈癌前病情监测指标和干预靶点。

本研究在体外细胞水平探索 HIF-1 α 参与宫颈癌细胞的生物学行为如增殖、凋亡、侵袭等过程,并选用 HIF-1 α 的下游靶基因 VEGF、GLUT1、MDR1 作为观察指标去分析细胞内 HIF-1 α 表达改变时它们的表达变化,从分子水平上研究 HIF-1 α 作用于宫颈癌细胞的具体机制。VEGF、GLUT1、MDR1 从分子机制上都直接代表着恶性肿瘤的生物学行为,如 VEGF 的表达与宫颈癌的新生血管密切相关;GLUT1 是机体糖酵解能量代谢的主要介质;而晚期宫颈癌的化疗耐药与 MDR1 密切相关^[5]。CoCl₂ 化学诱导缺氧后一般表现在翻译后水平而非转录水平上调 HIF-1 α 的表达,机制在于诱导缺氧后 HIF-1 α 蛋白的稳定性增高、降解受到抑制^[6]。本研究表明,宫颈癌细胞化学诱导缺氧后,在基因水平上 HIF-1 α 的表达并无明显增加,但其转录的下游基因

VEGF、GLUT1、MDR1 的基因表达明显升高,而且缺氧组较常氧组细胞增殖、侵袭能力增强而凋亡率下降,这提示 HIF-1 α 在 CoCl₂ 作用下其蛋白表达增加从而诱导下游基因表达,并增强了细胞的恶性生物学行为能力。同时,用反义核酸技术成功下调 HIF-1 α 表达后,RT-PCR 结果表明,转染的 NT、HT 组分别与对应的对照组 NN、NI 组和 HN、HI 组比较,HIF-1 α 的基因表达降低,且出现与化学诱导缺氧相反的效应,即下游基因表达下调,细胞的增殖、侵袭能力受抑制而凋亡率上升。这提示 HIF-1 α 可能通过其调节的靶基因而影响宫颈癌的恶性行为,且抑制 HIF-1 α 表达有干预这些行为的作用。

在缺氧条件下,HIF-1 α 是重要的信号传导通路,很多癌基因的激活和抑癌基因的失活与之相关^[7],研究表明,不管是用分子生物学方法还是用化学药物去干扰 HIF-1 α 的表达在体内外都可以对恶性肿瘤取得较好的疗效^[8]。而本研究体外抑制 HIF-1 α 表达可以通过多条途径影响宫颈癌细胞的生物学行为,这为宫颈癌的治疗提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] Hanze J, Eul BG, Savai R, et al. RNA interference for HIF-1 α inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312: 571-577.
- [2] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64: 993-998.
- [3] Buchholz M, Biebl A, Neesse A, et al. SERPINE2 (protease nexin 1) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. *Cancer Res*, 2003, 63: 4945-4951.
- [4] Vukovic V, Haugland HK, Nicklee T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts. *Cancer Res*, 2001, 61: 7394-7398.
- [5] Bachtary B, Schindl M, Potter R, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 2234-2240.
- [6] McNeill LA, Hewitson KS, Gleadle JM, et al. The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 1547-1550.
- [7] Qian D, Lin HY, Wang HM, et al. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor-1 α by interleukin-1 β involves the extracellular signal regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod*, 2004, 70: 1822-1827.
- [8] Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, et al. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res*, 2005, 65: 605-612.

(收稿日期:2007-02-02)

(本文编辑:沈平虎)