

[文章编号] 1000 - 4718(2010)07 - 1416 - 04

全反式维甲酸对不同增殖潜能的结肠癌细胞株 HIF - 1 α 表达的影响*

田瑞华¹, 殷平^{1 Δ} , 金光辉², 冯子杰², 吴媛², 郑良楷³

(¹ 福建医科大学教学医院 - 厦门大学附属中山医院病理科, 福建 厦门 361004; ² 厦门大学医学院基础医学部实验室, 福建 厦门 361006; ³ 厦门市妇幼保健院病理科, 福建 厦门 361003)

[摘要] 目的: 探讨全反式维甲酸(ATRA) 对不同增殖结肠癌细胞系的生长抑制作用, 以及对低氧诱导因子(HIF - 1 α) 表达的抑制作用。方法: 采用体外培养属于结肠癌 Dukes C 期的 HCT - 8 细胞和 LOVO 细胞, 不同浓度的全反式维甲酸(ATRA) 干预。利用 MTT 观察 ATRA 对结肠癌细胞系的生长, 采用半定量 RT - PCR 和 Western 印迹检测 ATRA 干预后在低氧状态下结肠癌细胞中 HIF - 1 α 的表达。结果: 全反式维甲酸(ATRA) 对结肠癌细胞的增殖有抑制作用, 对不同增殖能力的结肠癌细胞 HIF - 1 α 的表达量有抑制作用。结论: 全反式维甲酸可以抑制结肠癌细胞的增殖, 对结肠癌细胞 HIF - 1 α 的表达有明显的抑制作用。

[关键词] 低氧诱导因子 - 1 α ; 维甲酸; 结肠肿瘤

[KEY WORDS] Hypoxia - inducible factor - 1 α ; Retinoic acid; Colonic neoplasms

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

doi: 10. 3969/j. issn. 1000 - 4718. 2010. 07. 036

维甲酸(retinoic acid, RA) 又称视黄酸或维生素 A 酸, 是维生素 A 的衍生物。机体内一定浓度的维甲酸可调节细胞的增殖、分化、成熟, 是机体正常生长发育和各种生理活动必不可少的重要因子, 在恶性肿瘤的发生与治疗方面也有重要的作用。RA 由胃肠道吸收后经氧化形成全反式维甲酸(all - trans retinoic acid, ATRA) 通过单纯弥散进入细胞。

ATRA 在改善 p53 以及相关下游基因的水平上, 有明显的作用^[1-3]。ATRA 也促进泛素连接酶 E3 水平的提高^[4], 是诱导白血病细胞分化中的一个重要途径。这些研究表明, p53 和相关下游基因的转导途径以及泛素连接酶 E₃ 信号转导途径, 均可以受到 ATRA 药物的影响而发生改变。

低氧诱导因子 - 1(hypoxia inducible factor 1, HIF - 1) 是迄今为止发现唯一的特异性低氧状态下发挥活性的转录因子^[5]。HIF - 1 α 是 HIF - 1 所独有的氧调节蛋白, 也是 HIF - 1 的可调节亚基^[6]。Sutton 等^[7] 在肾脏的缺血再灌注损伤模型中发现 p53 对 HIF - 1 α 合成具有负向的调控机制。Oda 等^[8] 在前列腺癌肿瘤标记物巨噬细胞移动抑制因子(MIF) 的研究中, 也发现 MIF 通过了依赖野生型 p53 的途径, 调控了 HIF 合成的过程。另一方面, 在泛素连接酶诱导的细胞分化途径中, 正常氧浓度时, HIF - 1 α 能够与泛素连接酶(E₃) VHL 结合, 导致 HIF - 1 α 发生羟基化而被泛素化降解^[9]。

本研究拟对 2 个低氧环境中生长的结肠癌细胞系进行全反式维甲酸的干预, 采用 MTT、RT - PCR 及 Western blotting 法, 观察癌细胞的生长和 HIF - 1 α 的表达变化, 探讨 ATRA

抑制结肠癌细胞 HIF - 1 α 表达及其抑制结肠癌细胞增殖的可能性。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂 ATRA 购自 Sigma。MTT 购自 Amresco。DMSO 购自 Sigma。DMEM、RPMI - 1640 细胞培养液、胰蛋白酶 - EDTA、小牛血清均购自 Hyclone; 总 RNA Trizol 抽提试剂盒购自 Invitrogen, 逆转录试剂盒以及 PCR 试剂盒(含 DL2000 marker) 均购自 TaKaRa。总蛋白浓度测试试剂盒购自 Pierce。HRP 标记的羊抗兔 IgG II 抗购自 Invitrogen, β - actin 抗体购自 Bethyl。HIF - 1 α 抗体由福州迈新代购自 Thermo。

1.2 细胞培养及药物干预 结肠腺癌细胞株 HCT - 8 细胞以及 LOVO 细胞, 购于厦门闽博生物技术有限公司。DMEM 细胞培养液和胰蛋白酶 - EDTA 购于 Gibco, 小牛血清购于 Hyclone。癌细胞接种于培养板上, 在含有 5% CO₂、95% O₂、37 °C 饱和湿度条件下的培养箱中培养, HCT - 8 细胞用 RPMI - 1640 培养液(含 10% 小牛血清、1 \times 10⁵ U/L 青霉素、1 \times 10⁵ U/L 链霉素), LOVO 细胞用 DMEM 培养液(含 10% 小牛血清、1 \times 10⁵ U/L 青霉素、1 \times 10⁵ U/L 链霉素) 培养。ATRA 的浓度分组如下: ATRA 的工作浓度分别为 10⁻⁷ mol/L(低浓度组)、10⁻⁶ mol/L(中浓度组) 和 10⁻⁵ mol/L(高浓度组), 以 ATRA 粉剂溶解于培养液中使用。设立空白对照组, 其中空白对照组未经任何处理, 仅加入与 ATRA 实验组等量培养液。各组

[收稿日期] 2009 - 11 - 16

[修回日期] 2010 - 03 - 05

* [基金项目] 厦门市科技局基金资助项目(No. 3502Z20074019)

Δ 通讯作者 Tel: 0592 - 2993342; E - mail: yinping20022002@ yahoo. com. cn

细胞反复传代,取生长状态良好的细胞用于实验。细胞进入对数生长期后,将培养皿置于10% O₂的环境内8 h。经过不同浓度的ATRA干预和8 h的低氧环境培养后进行实验。

2 方法

2.1 MTT 观察细胞生长状况 2株结肠癌细胞分组为10⁻⁷ mol/L(低浓度组)、10⁻⁶ mol/L(中浓度组)、10⁻⁵ mol/L(高浓度组)、空白对照组和培养液组。处于对数生长期时,均以3×10³ cells/well的密度接种于96孔板中,每组为6个复孔。加药组培养12 h后加入10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁵ mol/L ATRA,培养24 h后加入显色剂MTT以及DMSO,设置培养液对照以及调零孔。每孔加入MTT(0.5 g/L)100 μL,孵育4 h,加入二甲亚砜(DMSO)100 μL/well,作用30 min,用酶标仪检测490 nm波长下每孔细胞吸光度(A)值,每组6个复孔取平均值。按下列公式计算细胞生长抑制率:抑制率(%)=(1-实验组平均A值/对照组平均A值)×100%。连续培养4 d,制作2种细胞系的生长曲线。

2.2 RT-PCR 检测 结肠癌细胞株HCT-8、LOVO细胞分别设培养液对照组和不同浓度的ATRA实验组。培养细胞长满80%皿底面积时,去除含血清培养液,用不含血清的培养液洗3次,离心收集细胞后,去除上清PBS液。沉淀加入1 mL Trizol液和200 μL氯仿,手动振荡数秒,静置2 min。4℃下13 000 r/min离心10 min,取上清。加入0.5 mL异丙醇,轻轻混匀。静置10 min。4℃下13 000 r/min离心10 min,去除上清。加入1 mL 75%乙醇(DEPC水配兑)轻轻洗涤。最后4℃下7 500 r/min离心5 min,去上清。晾干,加入20 μL DEPC水溶解。放入-20℃保存。测定浓度及260/280 nm的吸光度(A)值定量后,取总RNA 2 μg作20 μL反应体系逆转录。

实验按说明书逆转录合成cDNA,反应体系如下:模板RNA 2 μL,oligo随机引物1 μL,dNTP 4 μL,DEPC水3 μL,65℃ 5 min,4℃ 5 min,5×reaction buffer 4 μL,RNA inhibitor 0.5 μL,逆转录酶0.5 μL,DEPC水5 μL。37℃ 5 min(模板与引物退火)→42℃ 60 min(cDNA合成)→70℃ 15 min(反转录酶灭活)→4℃ 5 min。获得逆转录产物(cDNA),-20℃冰箱保存备用。

取1 μL逆转录产物为模板,以25 μL反应体系进行PCR扩增。引物序列:human β-actin上游5'-GGCACCA-CACCTTCTACAAT-3',下游5'-TCTCCTTAATGTCACG-CACGAT-3'。产物长度为460 bp左右;HIF-1α上游5'-CACCATTGAAAGCAGTTCGG-3',下游5'-GGCTGTC-CGACTTTGAGTAT-3',产物长度为740 bp左右。DNA marker片段为250-750 bp。

PCR反应参数分别为:(1)目的HIF-1α:94℃ 5 min预变性,94℃ 30 s,60℃ 40 s,72℃ 60 s,23个循环,最后72℃ 10 min;(2)内参照β-actin:退火56℃ 30 s。电泳分析:分别取目的产物和内参产物与loading buffer混匀后在1%琼脂糖凝胶上电泳,采用Innotech凝胶图像分析系统扫描,并分析电泳条带,测定目的条带的吸光度比值(A_A)以及内参条带β-actin吸光度值(A_B)以吸光度比值(HIF-1α基因条带吸光度值/β-actin基因条带吸光度值)即(A_A×S)/(A_B×s)(S与s分别

表示条带的面积)代表对应mRNA的表达量,半定量分析。

2.3 Western blotting 检测蛋白表达 当细胞进入对数生长期后,将培养皿置于O₂10%的环境内8 h。经过以上ATRA干预和低氧环境培养后,收集细胞提取蛋白,离心去除上清PBS液,沉淀加入蛋白裂解液RIPA 200 μL,以及蛋白酶抑制剂PMSF。剧烈振荡,冰上放置1 h,4℃下13 000 r/min离心10 min,将上清转移至1.5 mL EP管,各组取等量待测蛋白质样本,按照1:50比例稀释样品。测量总蛋白浓度。放入-20℃保存。然后取各组蛋白提取液,加入4×上样buffer混合煮沸5 min后上样。12% SDS-PAGE电泳,转膜,0.5%脱脂奶粉封闭1.5 h,分别加入HIF-1α(1:400)抗体和βactin(1:500)抗体,4℃过夜,洗膜,分别加入1:1 000鼠抗HRP,孵育2 h,在暗室中进行ECL染色,X胶片曝光、显影和定影,图像分析系统扫描,并分析电泳条带,以吸光度比值表示蛋白的表达量(即各条HIF-1α蛋白条带吸光度/β-actin条带吸光度)。半定量分析不同浓度ATRA下的HIF-1α表达。

3 统计学处理

采用SPSS 13.0软件整理分析数据,方差分析比较各组间的差异。计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1 ATRA 干预后 HCT-8 细胞和 LOVO 细胞形态学改变

2株细胞均呈上皮样贴壁依赖性生长,其中HCT-8细胞胞核大而圆,居中,胞浆丰富,透光度大,折光性一般,轮廓清晰,形态为不规则星芒形、梭形。胞膜呈枝桠状贴壁延伸,贴附性良好,聚堆现象明显,生长快。ATRA干预后,星芒形减少,梭形增多,胞膜呈现毛刺状生长。而LOVO细胞胞核大而圆,居中,胞浆透光度和折光度一般,轮廓清晰,形状为不规则多角形、梭形,贴附性良好,聚堆现象不明显,生长较快。ATRA干预后,细胞形态呈短梭形增多,胞膜外缘出现毛刺状生长。

2 体外细胞增殖抑制实验

ATRA作用的结肠癌细胞株HCT-8和LOVO与对照组比较有一定差别。ATRA处理1 d、2 d、3 d和4 d后,细胞增殖明显受到抑制。浓度越高细胞增殖抑制现象越明显,见图1。

3 RT-PCR 检测 ATRA 干预后 HCT-8 和 LOVO 细胞的 HIF-1α mRNA 表达

RT-PCR检测结果如图2所示,2种细胞的HIF-1α mRNA表达与空白对照组比较均明显降低,2种细胞HIF-1α受抑制的水平随着ATRA药物的浓度升高而下降(P<0.05)。并且,HCT-8细胞的HIF-1α mRNA表达比LOVO细胞的表达降低更明显,见图2。

4 Western 印迹检测 ATRA 干预后 HCT-8 与 LOVO 细胞的 HIF-1α 蛋白表达

ATRA干预后,2种细胞的HIF-1α蛋白表达与空白对照组相比较明显降低,差异显著(P<0.05),2株细胞HIF-1α蛋白受抑制的水平随着ATRA药物的浓度升高而下降(P<0.05),并且LOVO细胞HIF-1α蛋白表达被抑制程度比HCT-8细胞更明显,见图3。

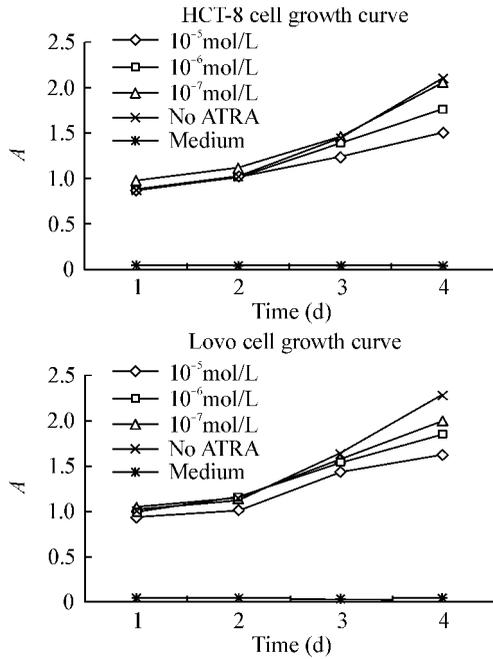


Figure 1. MTT assay for HCT - 8 and LOVO cell growth after ATRA treatment. After treating with ATRA for 1 d , 2 d , 3 d and 4 d , the cell proliferation was significantly inhibited , and the inhibition effect was correlated with ATRA concentration. ATRA (10^{-5} mol/L) , ATRA (10^{-6} mol/L) , ATRA (10^{-7} mol/L) : Cells were treated with 10^{-7} mol/L , 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L ATRA , respectively. No ATRA control: only culture medium without ATRA. Medium: only solution without cells.

图1 HCT-8 以及 LOVO 细胞的 MTT 生长曲线

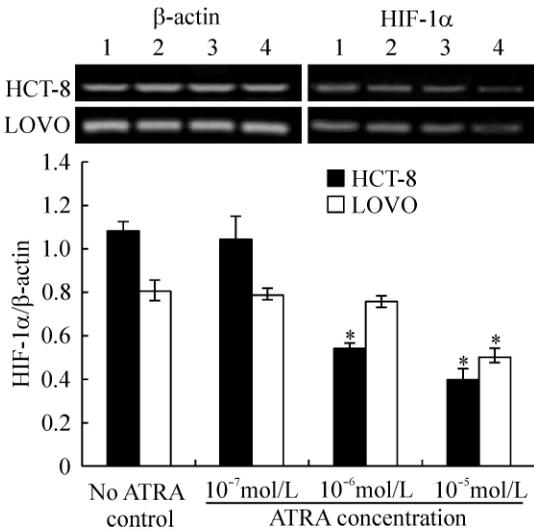


Figure 2. HIF - 1 α transcription levels of HCT - 8 and LOVO cells after treated with different concentrations of ATRA. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control. HIF - 1 α mRNA levels were determined by RT - PCR and gray scale analysis. Cells were treated with 10^{-7} mol/L , 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L ATRA , then the mRNA levels were compared with non - treated controls. Lane 1: non - treated control; Lane 2 - 4: cells treated with 10^{-7} mol/L , 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L ATRA.

图2 不同浓度 ATRA 干预后 HCT-8 细胞与 LOVO 细胞的 HIF-1 α mRNA 的表达

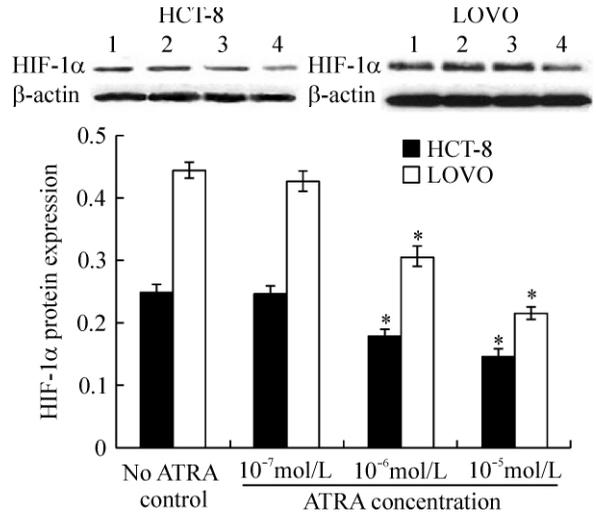


Figure 3. HIF - 1 α expression levels of HCT - 8 and LOVO cells after treated with different concentrations of ATRA. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control. HIF - 1 α protein levels were determined by Western blotting and gray scale analysis. Cells were treated with 10^{-7} mol/L , 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L ATRA , then the protein levels were compared with non - treated controls. Lane 1: non - treated control; Lane 2 - 4: cells treated with 10^{-7} mol/L , 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L ATRA , respectively.

图3 不同浓度 ATRA 干预后 HCT-8 细胞与 LOVO 细胞的 HIF-1 α 蛋白的表达。

讨 论

细胞内对 HIF - 1 的调控主要通过其 α 亚基进行。低氧诱导因子 - 1 (HIF - 1) 通过与低氧反应元件 (hypoxic response element , HRE) 结合 , 引发下游基因的转录。目前已知受 HIF 调控的基因有 150 余种 , 包括诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase , iNOS)^[10] 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor , VEGF)^[11] 等 , 以上基因的大量表达 , 可以促进肿瘤血管再生和细胞能量代谢加强 , 通过提高糖酵解速率和多血管生成对低氧环境的适应 , 使得肿瘤得以生长和转移。由于 HIF - 1 基因在肿瘤细胞中特异性表达和介导肿瘤细胞生长特性 , 调节 HIF - 1 水平可以作为肿瘤治疗手段 , 近年来成为肿瘤基因治疗的新靶点。有学者发现^[12] 在结直肠癌中 , HIF - 1 α 的表达水平从腺瘤到腺癌病变中不断增高。HIF - 1 α mRNA 在部分结直肠癌及大部分腺癌中呈过度表达 , 提示细胞低氧出现在癌变发生之前并持续到肿瘤发展全过程。有淋巴结转移或远处转移 (主要为肝转移) 的 Dukes C/D 期患者 HIF - 1 α 的 mRNA 、 VEGF 、 MVD 显著高于 Dukes A 、 B 期 , 也提示 HIF - 1 α 参与了结直肠癌的浸润和转移。HIF - 1 α 过表达在 90 % 以上的结肠癌中被检测到 , 然而在相应的正常组织中却没能检测到 HIF - 1 α 的表达^[13]。Zhang 等^[14] 最近发现 , 在 ATRA 治疗急性粒细胞性白血病的过程中 , 不仅在 RNA 水平上 HIF - 1 参与了肿瘤细胞的诱导分化 , 并且在采用 shRNA 干扰 HIF - 1 α

和 HIF-1 β 后, HIF-1 α 表达的蛋白依然通过非转录机制参与 ATRA 对肿瘤细胞的诱导分化。特别在 ATRA 治疗的过程中, HIF-1 α 的表达也扮演了重要的角色。

本研究中, 我们体外培养 2 种细胞, 均为结肠癌 Dukes C 期细胞, 其中 LOVO 细胞为原发灶在回盲部的癌细胞。观察 2 种细胞在物理低氧条件下的生长情况, 以及各自的 HIF-1 α 表达, 并使用不同浓度的 ATRA 干预后, 观察到 HIF-1 α 表达受到不同程度的抑制。在转录水平上, 我们通过 RT-PCR 实验证明 2 株体外培养的细胞表达 HIF-1 α 受到干预后表达明显降低, 并且与 ATRA 的浓度呈正比。HCT-8 细胞在 HIF-1 α mRNA 表达量上比 LOVO 细胞受到 ATRA 干预的影响更明显。在翻译水平上, 我们通过 Western 印迹实验证明 2 株细胞表达的 HIF-1 α 受到干预后表达也有降低, 但是 HCT-8 细胞降低的程度较 LOVO 为小。

我们的研究通过形态学、生长曲线的增殖抑制实验、转录与翻译 2 个水平的分子生物学方法表明, ATRA 可以明确抑制结肠癌细胞在低氧环境下的 HIF-1 α 表达, 并且抑制的程度与药物的浓度呈正比。其中在 HIF-1 α 因子表达的转录水平上, HCT-8 细胞受到的抑制比 LOVO 更多, 在翻译水平上, HCT-8 细胞受抑制的程度比 LOVO 更少, 其中的机制, 尚待进一步探索阐明。

[参 考 文 献]

- [1] 李良平, 张 正, 韩盛玺. 维甲酸对人肝癌细胞转化生长因子 β_1 基因及蛋白水平的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 12(9): 367-368.
- [2] Nakashima T, Sun SY, Lotan R, et al. All-trans-retinoic acid enhances the effect of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Laryngoscope, 2001, 111(8): 1459-1464.
- [3] Pepper C, Ali K, Thomas A, et al. Retinoid-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells is mediated through caspase-3 activation and is independent of p53, the retinoic acid receptor, and differentiation [J]. Eur J Haematol, 2002, 69(4): 227-235.
- [4] Baxter SS, Carlson LA, Mayer AM, et al. Granulocytic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells is associated with increased expression of Cul5 [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2009, 45(5-6): 264-274.
- [5] Semenza G, 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] Song LP, Zhang J, Wu SF, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha-induced differentiation of myeloid leukemic cells is its transcriptional activity independent [J]. Oncogene, 2008, 27(12): 519-527.
- [7] Sutton TA, Wilkinson J, Mang HE, et al. p53 regulates renal expression of HIF-1 α and pVHL under physiological conditions and after ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(6): F1666-F1677.
- [8] Oda S, Oda T, Nishi K, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner [J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2215.
- [9] Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF [J]. Science, 2001, 294(5545): 1337-1340.
- [10] 殷 平, 李 才, 孙 波, 等. 不同增殖能力结肠癌细胞株 iNOS mRNA 表达的比较研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(5): 883-886.
- [11] 殷 平, 王效民, 王 斌, 等. 全反式维甲酸对结肠癌不同增殖潜能细胞株 VEGF 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(11): 2198-2201.
- [12] 樊利芳, 刁路明. 低氧诱导因子-1 α 在结直肠腺癌中的表达及意义 [J]. 中华病理学杂志, 2004, 6(33): 242-246.
- [13] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor alpha (HIF-1): its protein stability and biological functions [J]. Exp Mol Med, 2004, 36(1): 1-12.
- [14] Zhang J, Chen GQ. Hypoxia-HIF-1 alpha-C/EBP alpha/Runx1 signaling in leukemic cell differentiation [J]. Pathophysiology, 2009, 16(4): 297-303.