

[文章编号] 1000-4718(2017)10-1831-06

## 慢性缺氧应激可能通过 EMT 增强乳腺癌 MCF-7 细胞恶性生物学行为\*

陈 坚<sup>1,2</sup>, 何咏竟<sup>3</sup>, 汪思应<sup>3</sup>, 胡 敏<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup>安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038; <sup>2</sup>厦门大学第一附属医院超声科, 福建 厦门 361001;

<sup>3</sup>安徽医科大学, 安徽 合肥 230032)

[摘 要] 目的: 探讨慢性缺氧应激对人乳腺癌 MCF-7 细胞恶性生物学行为的影响及可能机制。方法: 将人乳腺癌 MCF-7 细胞分为缺氧组(1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 和 94% N<sub>2</sub>) 和正常对照组(常氧) 进行培养。利用 MTT 法、CCK-8 实验、细胞直接计数法及细胞侵袭和迁移实验对 MCF-7 细胞活力、增殖及侵袭和迁移能力进行检测; 用软琼脂集落形成实验及 Matrigel 3D 培养技术检测 MCF-7 细胞非锚定生长能力及极性改变情况; 利用 MCF-7 细胞构建裸鼠皮下种植瘤模型 检测慢性缺氧应激对体内肿瘤生长及肺转移的影响; 利用倒置显微镜观察 MCF-7 细胞形态改变; Western blot 检测低氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 和磷酸化的糖原合成酶激酶 3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β) 在缺氧环境下表达水平的改变, 以及 E-钙黏连蛋白(E-cadherin)、N-钙黏连蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、MMP-9 等上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白的表达水平。结果: 与正常对照组相比较, 慢性缺氧组 MCF-7 细胞活力、增殖能力及侵袭迁移能力增强, 细胞非锚定生长能力提高且在 3D 培养系统更容易发生极性改变, 呈现侵袭样生长, 体内生长及转移能力增强; 除了 HIF-1 被缺氧诱导表达升高外, GSK-3β 呈现活化趋势, 且上皮样标志物 E-cadherin 蛋白表达水平明显下降, 而间充质样标志物 N-cadherin、vimentin、MMP-3 和 MMP-9 蛋白表达水平明显升高。结论: 慢性缺氧应激促进了乳腺癌细胞恶性生物学行为, 且其机制可能与 EMT 有关。

[关键词] 乳腺癌; 缺氧; 肿瘤转移; 肿瘤微环境; 上皮-间充质转化

[中图分类号] R363.1; R737.9

[文献标志码] A

doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2017.10.016

## Chronic hypoxia enhances aggressiveness of MCF-7 breast cancer cells through EMT

CHEN Jian<sup>1,2</sup>, HE Yong-jing<sup>3</sup>, WANG Si-ying<sup>3</sup>, HU Min<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230028, China; <sup>2</sup>Department of Ultrasonography, The First Affiliated Hospital, Xiamen University, Xiamen 361001, China; <sup>3</sup>Anhui Medical University, Hefei 230032, China. E-mail: 598370287@qq.com)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the effects of chronic hypoxia on the aggressiveness of MCF-7, a human breast cancer cell line, and the underlying mechanisms. METHODS: MCF-7 cells were cultured under hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 94% N<sub>2</sub>) or control (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) condition. The viability, proliferation, and invasion and migration abilities of the MCF-7 cells were determined by MTT assay, CCK-8 assay, cell counting, and cell invasion and migration assays. Anchorage-independent growth and the alteration of cellular polarization of the MCF-7 cells were tested by soft agar colony formation assay and Matrigel-3D culture assay, respectively. The effects of chronic hypoxia on the growth and metastasis of MCF-7 cells *in vivo* were investigated by xenograft in nude mice. The morphological changes of the MCF-7 cells were observed under an inverted microscope. Hypoxia-induced alterations in the levels of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and phosphorylated glycogen synthase kinase-3β (p-GSK-3β) as well as epithelial-mesenchymal transition (EMT) molecules, such as E-cadherin, N-cadherin, vimentin, matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9, were determined by Western blot. RESULTS: Chronic hypoxia significantly increased the viability, proliferation, and invasion and migration

[收稿日期] 2017-03-08

[修回日期] 2017-06-15

\* [基金项目] 中国博士后科学基金第 59 批面上资助项目 (No. 2016M592037); 安徽省自然科学基金资助项目 (No. 1608085MH187)

△通讯作者 Tel: 13955139826; E-mail: 598370287@qq.com

abilities of MCF-7 cells *in vitro*, enhanced the anchorage-independent growth, facilitated cellular polarization alteration in Matrigel-3D culture, and promoted cancer metastasis *in vivo*. Hypoxia up-regulated HIF-1, activated GSK-3 $\beta$ , down-regulated E-cadherin and increased the protein levels of N-cadherin, vimentin, MMP-3 and MMP-9. **CONCLUSION:** Chronic hypoxia enhances the aggressiveness of breast cancer cells probably through EMT.

**[KEY WORDS]** Breast carcinoma; Hypoxia; Tumor metastasis; Tumor microenvironment; Epithelial-mesenchymal transition

乳腺癌发病率在经济发达地区居于女性恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>,以手术为主的综合治疗虽然取得较好的临床疗效,但浸润和转移仍旧是影响患者生存率和死亡率的主要因素<sup>[2]</sup>。促进乳腺癌转移的潜在分子机制目前尚不清楚。由于肿瘤细胞快速增殖而相应的血管网络不能及时建立,且新生血管在结构上存在异常,肿瘤缺氧微环境是人类恶性实体肿瘤的基本特征之一<sup>[3]</sup>。局部微环境缺氧可以对肿瘤细胞的增殖、浸润和转移等恶性生物学行为的发生产生显著影响<sup>[4]</sup>。阐明乳腺癌恶性生物学行为与肿瘤缺氧微环境的关系,进而明确其在肿瘤恶性进展过程中发挥重要作用的关键分子,寻找其相对应的靶点,对于提高乳腺癌的生存率具有重要的作用。本文通过体内及体外实验研究,观察慢性缺氧应激对人乳腺癌 MCF-7 细胞恶性生物学行为的影响,并探究其机制是否与上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物及细胞

SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠 24 只,雌性 6 周龄,体重 15~21 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号为 SCXK(京)2014-0004。人乳腺癌 MCF-7 细胞购自中科院上海细胞生物所细胞库,本实验室冻存。

### 2 主要试剂

DMEM 高糖培养基、胰酶和小牛血清购于 Gibco;  $1 \times 10^5$  U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素购于 HyClone; MTT 细胞活力试剂盒购于 KeyGEN Biotech; 三(羟甲基)氨基甲烷、丙烯酰胺、过硫酸铵和十二烷基硫酸钠购于上海生工生物公司;蛋白酶抑制剂购于 Roche; Transwell 小室购于 BD; 琼脂糖粉剂购自 Bio-west; 蛋白印迹化学发光检测试剂盒购于北京康为世纪生物有限公司; 抗低氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)、抗糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )、抗 E-钙黏连蛋白(E-cadherin)、抗 N-钙黏连蛋白(N-cadherin)、抗波形蛋白(vimentin)、抗基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、抗 MMP-9 和抗  $\beta$ -actin 抗

体均购于 Abcam; HRP 偶联的山羊抗鼠 II 抗购于 Proteintech。

### 3 主要方法

**3.1 细胞培养及分组** 人乳腺癌 MCF-7 细胞分为正常对照组(常氧培养)和缺氧组,用含有 10% 小牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基进行培养。将正常对照组置于 37 °C、95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下的 CO<sub>2</sub> 细胞培养孵箱内进行培养;缺氧组置于 37 °C、1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub> 的三气培养箱内进行缺氧培养。

**3.2 细胞形态观察** 取对数生长期细胞制成单细胞悬液,调整浓度为  $2 \times 10^7$  /L,把细胞悬液按每孔 150  $\mu$ L 接种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔。将细胞置于细胞培养箱中分别进行常氧或者缺氧培养,并于培养 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h 及 60 h 后在倒置相差显微镜下对肿瘤细胞形态进行观察、拍照。

**3.3 MTT 实验** 取对数生长期细胞制成单细胞悬液,调整浓度为  $2 \times 10^7$  /L,把细胞悬液按每孔 150  $\mu$ L 接种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔。分别进行常氧或缺氧培养(0 h、12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h)后进行 MTT 实验对细胞活力进行检测。每孔加入 5 g/L MTT 溶液 10  $\mu$ L,常规培养 4 h 后,将孔内的培养液吸出,每孔再加入二甲基亚砜(DMSO) 150  $\mu$ L,孵育 15 min,利用酶标仪对 490 nm 处各孔的吸光度(A)进行检测。

**3.4 CCK-8 实验** 取对数生长期细胞制成单细胞悬液,调整浓度为  $2 \times 10^7$  /L,把细胞悬液按每孔 150  $\mu$ L 接种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔。分别进行常氧或缺氧培养(0 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h)后进行 CCK-8 实验,对细胞活力进行检测。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 置于 37 °C 培养箱孵育 2 h,利用荧光分光光度计对 450 nm 处各孔的吸光度(A)进行检测。

**3.5 直接计数法** 将  $2 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔培养板(每组设 4 复孔,取均值),分别进行常氧或缺氧培养(0 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h)后,用 3 mL 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化液进行消化,取细胞悬液用细胞计数器进行计数,对细胞增殖能力进行检测。实验重复 3 次。

**3.6 Transwell 侵袭和迁移实验** 将 100  $\mu$ L 的 50

mg/L Matrigel 用稀释液 1:40 稀释,均匀涂于 Transwell 小室底膜的上室面,4 °C 晾干。取对数生长期细胞消化后重悬,并调整细胞浓度至  $2 \times 10^7$  /L。将 Matrigel 包被的 Transwell 小室小心放入 24 孔板(在放置小室时确保小室底层薄膜和培养液之间没有气泡)水化后,在小室下层加入含 10% 血清的 DMEM 完全培养基,细胞悬液按每孔 200  $\mu$ L 接种于小室的上室。分别进行常氧或者缺氧培养 36 h 后收 24 孔板,吸弃上清液,并用 PBS 清洗 2 次,然后用 40 g/L 多聚甲醛固定,随后 0.1% 结晶紫染色 30 min。染色结束后,清洗脱色,用棉签轻拭上室残余细胞,室温干燥后置于倒置显微镜下进行观察,每孔随机选取 5 个视野的细胞进行计数并拍照、统计分析。细胞迁移实验无需预先进行 Matrigel 包被,其余步骤同侵袭实验。

**3.7 软琼脂集落形成实验** 将含有 0.5% 底层琼脂、20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基充分混匀,按每孔 1 mL 加入 6 孔板中,室温凝固备用。取对数期生长细胞制成单细胞悬液,调整浓度为  $2 \times 10^7$  /L,加至铺有底层琼脂的 6 孔板中,每孔 1 mL,每组细胞设 3 个复孔。分别进行常氧或者缺氧培养连续培养 2 周。于倒置显微镜下进行观察,统计集落形成数。

**3.8 Matrigel 3D 培养实验** 在 3.6 的实验基础上,将小室预先用 Matrigel 基质胶进行包被。将稀释好的 Matrigel 胶均匀铺于小室底部(所有操作均在冰上进行),37 °C 培养箱内凝固 30 min 后用于实验。

**3.9 裸鼠成瘤实验** 常规消化正常对照组和缺氧组对数生长期的 MCF-7 细胞,用无血清培养基将细胞调整为密度为  $1 \times 10^11$  /L 的细胞悬液。分别将 2 组细胞悬液注射于裸鼠腋窝处皮下,每只注射 0.2 mL,接种细胞数为  $2 \times 10^7$  个。注射后观察肿瘤生长情况,分别于接种后的 5、12、15、18、21 和 24 d 用游标卡尺测量每只小鼠腋下肿瘤长径(a)和短径(b),并计算肿瘤体积,计算公式为:肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) =  $1/2 \times a \times b^2$ 。绘制肿瘤生长曲线。4 周后小鼠脱颈椎处死,留取肿瘤组织及肺组织。观察肺组织表面肉眼可见的瘤结节并计数,固定一侧肺进行石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察计数转移灶。

**3.10 Western blot 实验** 收集正常对照组和缺氧组对数生长期的 MCF-7 细胞沉淀,加入 RIPA 裂解液裂解细胞提取总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量,按每个孔 30  $\mu$ g 的蛋白总量上样,SDS-PAGE,全湿电转膜仪进行转膜。室温下用 TBST 溶液(含 5% 脱脂奶粉)封闭 2 h,按说明书分别加入稀释的 I 抗(HIF-1、GSK-3 $\beta$ 、E-cadherin、N-cadherin、vimentin、MMP-3、

MMP-9 和  $\beta$ -actin),4 °C 摇床孵育过夜。次日用 TBST 洗膜,HRP 标记的 II 抗 37 °C 摇振 1 h 后,再洗膜 10 min  $\times$  3 次。利用增强的化学发光试剂盒进行 ECL 检测目的蛋白。实验至少重复 3 次。

**4 统计学处理**

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。数据以均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示,用单因素方差分析对两组间数据差异进行检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

**结 果**

**1 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响**

利用 MTT 和 CCK-8 实验对常氧或者缺氧条件下培养不同时点的 MCF-7 细胞的活力进行检测。MTT 结果显示,在培养 24 h 后,缺氧组细胞的细胞活力增强,尤其在 48 h 和 60 h,与正常对照组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CCK-8 实验结果显示,在培养 24 h、36 h 和 48 h 后,缺氧组细胞的细胞活力增强,与正常对照组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

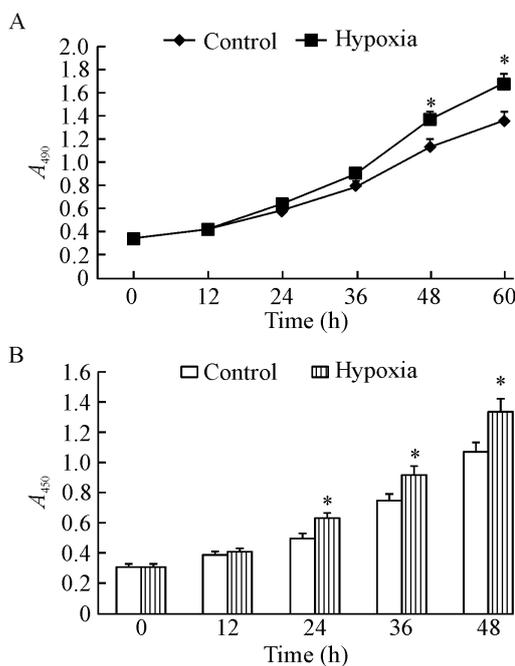


Figure 1. The effect of chronic hypoxia stress on the viability of human breast cancer MCF-7 cells *in vitro*. A: MTT assay; B: CCK-8 assay. Mean  $\pm$  SD.  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

**图 1 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响**

**2 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响**

MCF-7 活细胞计数结果显示,在培养 24 h、36 h 和 48 h 后,缺氧组细胞的细胞数量明显增多,与正常对照组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

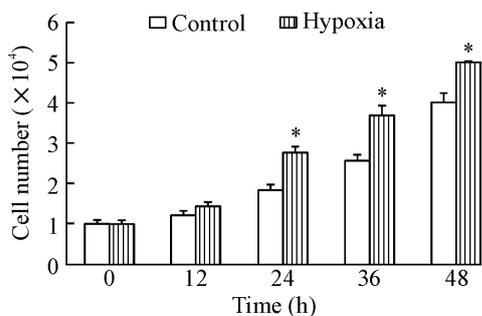


Figure 2. The effect of chronic hypoxia stress on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells *in vitro*. Mean  $\pm$  SD.  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图2 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

### 3 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞迁移和侵袭能力的影响

倒置显微镜下,对穿过 Transwell 小室底膜的迁移和侵袭细胞数目进行观察与计数。结果显示,与对正常对照组相比较,随着缺氧时间的增加,缺氧组细胞的迁移和侵袭数量增多,迁移和侵袭能力均增强,两组细胞间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见图 3)。

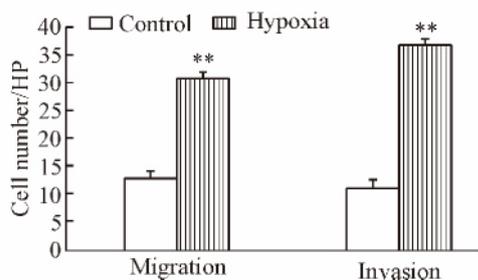
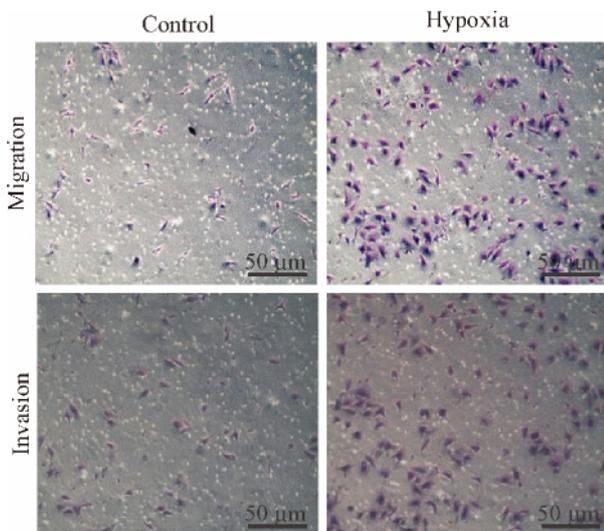


Figure 3. Chronic hypoxia stress promoted the migration and invasion abilities of MCF-7 cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图3 缺氧慢性刺激促进了人乳腺癌 MCF-7 细胞的迁移和侵袭能力

### 4 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞非锚定生

### 长及极性的影响

软琼脂集落形成实验以及 Matrigel 3D 实验结果显示,缺氧条件下可使乳腺癌 MCF-7 细胞的非锚定生长能力提高,且在 3D 培养系统更容易发生极性改变,呈现侵袭样生长,见图 4。

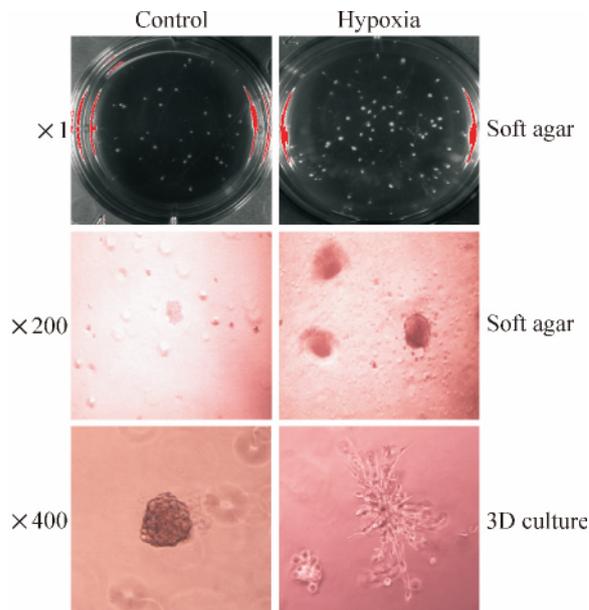


Figure 4. The effect of chronic hypoxia stress on anchorage-independent growth and polarity of human breast cancer MCF-7 cells *in vitro*.

图4 缺氧慢性刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞非锚定生长及极性的影响

### 5 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞体内生长及转移的影响

裸鼠种植瘤实验结果显示,人乳腺癌 MCF-7 细胞接种后裸鼠成瘤率为 100%。缺氧对裸鼠肿瘤生长有明显的促进作用,缺氧组小鼠肿瘤体积明显大于同一时点正常对照组小鼠肿瘤体积( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );分别在正常对照组和缺氧组随机选取 10 只小鼠,对发生肺转移的小鼠进行计数,结果显示缺氧组小鼠发生肺转移数目明显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果表明,缺氧不仅可以促进乳腺癌细胞在裸鼠体内的生长,同时还促进了乳腺癌细胞在裸鼠体内的转移,见图 5。

### 6 慢性缺氧刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞形态及 EMT 相关蛋白的表达的影响

倒置相差显微镜下观察可见,常氧环境下人乳腺癌 MCF-7 细胞呈上皮形态,多角形,细胞之间连接紧密,而缺氧组细胞形态拉长,呈梭形,细胞间隙变大,转变为间质细胞形态。另外,缺氧状态下,人乳腺癌 MCF-7 细胞 HIF-1 达升高,GSK-3 $\beta$  呈现活化趋

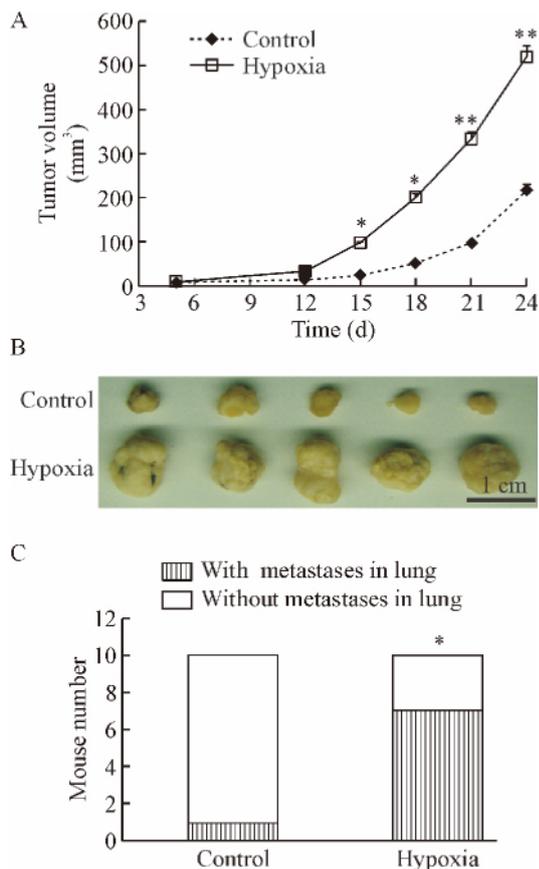


Figure 5. The effect of chronic hypoxia stress on progression and metastasis of human breast cancer MCF-7 cells in nude mice. A: the subcutaneous tumor growth curves between control group and hypoxia group ( Mean ± SD. n = 3 ) ; B: the representative images of subcutaneously implanted tumors taken on day 24; C: the numbers of mice with lung metastasis ( n = 10 ) . \* P < 0.05 , \*\* P < 0.01 vs control group.

图5 缺氧慢性刺激对人乳腺癌 MCF-7 细胞在裸鼠体内生长及转移的影响

势,且上皮样标志物 E-cadherin 蛋白表达水平明显下降,而间充质样标志物 N-cadherin、vimentin、MMP-3 和 MMP-9 蛋白表达水平明显增加,提示 EMT 的发生,见图 6。

### 讨 论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在世界范围内居第 1 位,死亡率居第 5 位<sup>[5]</sup>,严重威胁女性健康。近年来,虽然乳腺癌综合治疗手段的不断发展,但流行病学调查显示,乳腺癌的发病率及病死率仍呈逐年上升的趋势,肿瘤侵袭转移问题仍是影响乳腺癌治疗效果的重要因素<sup>[6]</sup>。因此,对乳腺癌侵袭转移机制的研究具有重要的临床意义。缺氧是实质性肿瘤局部微环境的基本特征之一。近几年,随着对缺氧在肿瘤影响方面不断深入的研究显示,缺氧

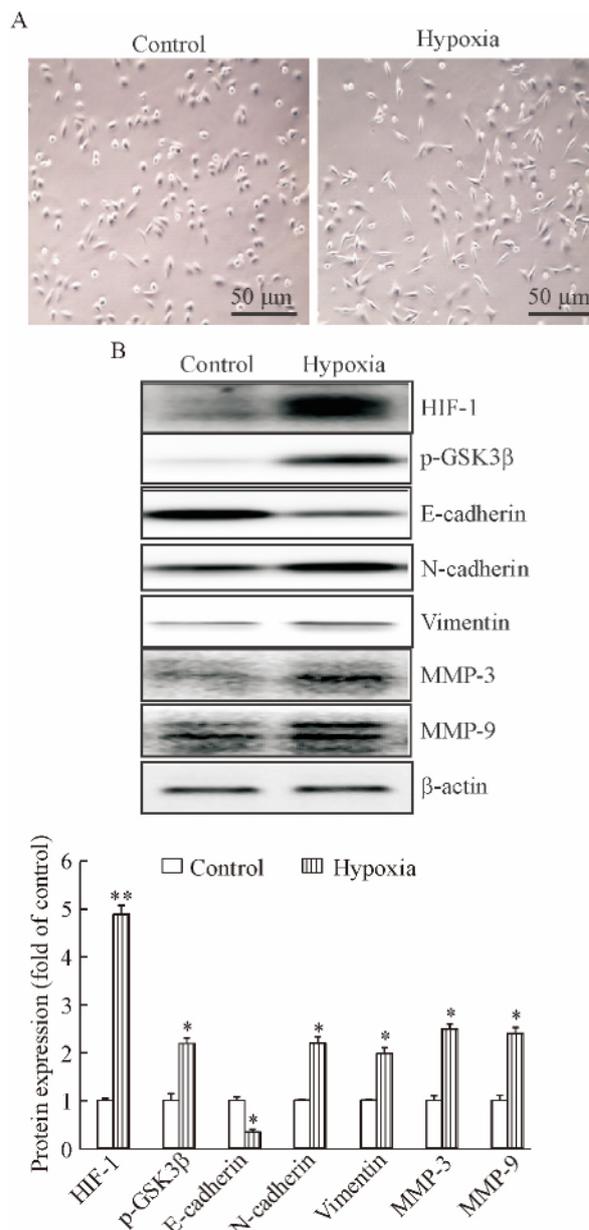


Figure 6. Chronic hypoxia stress promoted EMT in human breast cancer MCF-7 cells. A: the cell morphological changes were observed under reverted microscope; B: the effect of chronic hypoxia stress on the protein expression of EMT-related molecules in the human breast cancer MCF-7 cells. Mean ± SD. n = 3. \* P < 0.05 , \*\* P < 0.01 vs control group.

图6 缺氧慢性刺激可促进人乳腺癌 MCF-7 细胞发生 EMT 对恶性肿瘤的预后起着重要的作用。它既能促进肿瘤细胞的增殖,同时还能够诱导肿瘤细胞的浸润和转移<sup>[7-8]</sup>。因此,了解慢性缺氧对乳腺癌细胞恶性生物学的影响对乳腺癌的预后有重要意义。

本研究通过观察慢性缺氧刺激对体外培养的人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长、侵袭和迁移能力及细胞非锚定生长能力、极性,以及体内裸鼠成瘤和肺转移的影响,探讨慢性缺氧应激是否会对人乳腺癌 MCF-

7 细胞恶性生物学行为产生影响。

本实验选用物理缺氧法,采用充入含 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub> 混合气体的三气培养箱来模拟肿瘤缺氧微环境。我们对实验组的 MCF-7 细胞进行体外缺氧培养,对其和正常对照组的细胞进行行为学实验比较。MTT 实验、CCK-8 细胞活力实验、活细胞直接计数法、Transwell 迁移和侵袭实验等实验结果显示,缺氧状态下,乳腺癌 MCF-7 细胞的体外细胞活力、增殖能力、迁移和侵袭能力增强,且随着缺氧时间的加长,对细胞活力刺激的作用越明显;软琼脂集落实验及 3D Matrigel 结果显示,细胞非锚定生长能力提高且在 3D 培养系统更容易发生极性改变,呈现侵袭样生长,体内生长及转移能力增强。这些肿瘤细胞行为学的变化提示在慢性缺氧环境下,乳腺癌 MCF-7 细胞株的恶性生物学行为加强,且发生了 EMT。同时,我们建立裸鼠成瘤模型,观察慢性缺氧刺激对体内肿瘤生长及肺转移的影响。结果显示在同一时点,缺氧组小鼠比正常对照组小鼠肿瘤体积明显增大,且在肺内形成转移瘤的数目明显增加。这一结果说明慢性缺氧可促进肿瘤生长及肺部转移。

目前众多研究资料表明,EMT 在肿瘤的侵袭和转移中起到非常关键的作用<sup>[9]</sup>,是启动恶性肿瘤侵袭转移的重要途径之一<sup>[10-11]</sup>,而缺氧可以通过促进肿瘤细胞发生 EMT 而在肿瘤的迁移和侵袭过程中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。EMT 发生时,其上皮样细胞标志分子表达下降,而间充质样细胞标志分子表达上调,于是我们猜想慢性缺氧应激促进乳腺癌细胞的增殖和转移这一过程中是否有 EMT 的发生。我们通过 Western blot 实验对 EMT 相关蛋白表达进行检测。结果显示和正常对照组相比,缺氧组细胞上皮样标志物 E-cadherin 蛋白表达水平明显下降,而间充质样标志物 N-cadherin、vimentin、MMP-3 和 MMP-9 蛋白表达水平明显增加,GSK-3β 呈现活化趋势。同时形态学观察也得到相同的结果,倒置显微镜下可见缺氧组肿瘤上皮细胞间连接松散,细胞失去基底面至表面的极性排列,形态呈梭形。HIF-1 也是缺氧环境下促进肿瘤细胞发生 EMT 的重要因子<sup>[13]</sup>。HIF-1 主要通过降低细胞间的黏附、增加基质的降解、增加趋化作用几个方面对肿瘤细胞的侵袭与转移产生影响。实验中我们发现,缺氧组比正常对照组细胞的 HIF-1 蛋白表达明显增加。

综上所述,慢性缺氧刺激可使乳腺癌 MCF-7 细胞体外生长和迁移能力增强,同时在体内促进肿瘤形成及转移,并且 E-cadherin 蛋白表达水平明显下降,而 HIF-1、GSK-3β、N-cadherin、vimentin、MMP-3、

MMP-9 蛋白表达水平明显增加。这提示慢性缺氧应激可能通过激活 HIF-1 使细胞发生 EMT 进而促进乳腺癌 MCF-7 细胞恶性进展。

[参 考 文 献]

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Yang SX, Loo WT, Chow LW, et al. Decreased expression of C-erbB-2 and CXCR4 in breast cancer after primary chemotherapy [J]. J Translation Med, 2012, 10( Suppl 1): S3.
- [3] Semenza GL. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis [J]. Oncogene, 2013, 32(35): 4057-4063.
- [4] Xu Y, Li Y, Pang Y, et al. EMT and stem cell-like properties associated with HIF-2α are involved in arsenite-induced transformation of human bronchial epithelial cells [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37765.
- [5] Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM. Endocrine resistance in breast cancer: an overview and update [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 418(3): 220-234.
- [6] Luo M, Brooks M, Wicha MS. Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance [J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(10): 1301-1310.
- [7] Buyun K, Byoungduck P. Baohuoside I suppresses invasion of cervical and breast cancer cells through the down-regulation of CXCR4 chemokine receptor expression [J]. Biochemistry, 2014, 53(48): 7562-7569.
- [8] Chu CY, Jin YT, Zhang W, et al. CA IX is upregulated in CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer [J]. J Oncol, 2016, 48(1): 271-280.
- [9] Alderton GK. Metastasis: epithelial to mesenchymal and back again [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(1): 3.
- [10] Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, et al. EMT in breast carcinoma: a review [J]. J Clin Med, 2016, 5(7): E65.
- [11] Smith BN, Bhowmick NA. Role of EMT in metastasis and therapy resistance [J]. J Clin Med, 2016, 5(2): E17.
- [12] Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(24): 5928-5935.
- [13] Gilkes DM, Semenza GL. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis [J]. Future Oncol, 2013, 9(11): 1623-1636.

(责任编辑: 陈妙玲, 罗 森)