

· 基础研究 ·

高压氧对结肠癌细胞缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响

张丽达 马里 田小强 张伟 黄平 钱霞 杨琳

【摘要】目的 初步探讨高压氧(HBO)对结肠癌细胞缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达的影响。**方法** 将结肠癌细胞 SW480 分为正常对照组、高压氧不同压力(0.15 MPa、0.20 MPa、0.25 MPa)组和高压氧不同暴露时间(12 h、24 h、36 h)组,各组分别处理后,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测不同压力及时间 HBO 暴露后结肠癌 SW480 细胞的 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达水平改变。**结果** SW480 细胞在 0.25 MPa HBO 暴露后 12 h HIF-1 α mRNA 表达水平较 0.15 MPa 和 0.20 MPa HBO 暴露后 12 h 为低($P < 0.01$),0.25 MPa HBO 暴露后 24 h HIF-1 α mRNA 表达缺失;0.25 MPa HBO 暴露后 36 h VEGF mRNA 表达较 0.15 MPa、0.20 MPa HBO 暴露后 12 h 和 24 h 为低($P < 0.05$)。**结论** HBO 可能通过下调 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 来抑制肿瘤组织的血管形成。

【关键词】 高压氧; 结肠癌细胞; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子

Effects of hyperbaric oxygen on the expression of hypoxia inducible factor-1 α mRNA and vascular endothelial growth factor mRNA in colon adenocarcinoma cells ZHANG Li-da*, MA Li, TIAN Xiao-qiang, ZHANG Wei, HUANG Ping, QIAN Xia, YANG Lin. *Department of Hyperbaric Oxygen Therapy, Zhongda Hospital, Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in colon adenocarcinoma cells. **Methods** SW480 colon cancer cells were divided into a control group and an HBO group, which was in turn divided into various subgroups according to the various HBO pressures (0.15 MPa, 0.20 MPa, 0.25 MPa) and exposure times (12, 24 and 36 h) tested. The expression of HIF-1 α and VEGF mRNA was evaluated with RT-PCR after the various treatments. **Results** The expression of HIF-1 α mRNA was lower in the SW480 cells than in the controls after exposure to 0.25 MPa HBO for 12 h. No expression of HIF-1 α mRNA was detected after exposure to 0.25 MPa HBO for 24 h. The expression of VEGF mRNA was lower after exposure to 0.25 MPa HBO for 36 h than in the controls. **Conclusion** Absence of HIF-1 α mRNA expression and decreased expression of VEGF mRNA in SW480 can be observed after exposure to 0.25 MPa HBO for 24 h, suggesting that HBO may inhibit the formation of tumor blood vessels through down-regulating the expression of these mRNAs.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Adenocarcinoma; Hypoxia inducible factor-1 α ; Vascular endothelial growth factor

高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)作为一种辅助治疗手段已广泛应用于临床,但有关 HBO 对肿瘤作用的基础和临床研究鲜见报道。目前有研究认为,实体瘤部分细胞缺氧状态可以诱导肿瘤细胞对放疗和化疗的耐受性^[1],因此,改善肿瘤组织的供氧状况,使乏氧的肿瘤细胞获得充足的氧可增强其对放疗和化疗的敏感性;同时抑制肿瘤的血管新生可不同程度阻断肿瘤组织给养,进而影响肿瘤细胞的生存。实体肿瘤组织的

生存有赖于肿瘤组织中的血管形成和增生,影响肿瘤组织中的血管形成和增生的主要机制之一是调控缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。HBO 是否可影响大肠癌细胞的 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达,目前鲜见报道。本实验旨在初步探讨 HBO 对结肠癌 SW480 细胞的 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达的影响,为肿瘤治疗开辟新的途径。

材料与方法

一、材料与细胞株

结肠癌细胞株 SW480 购自中国科学院上海细胞所, HIF-1 α 、VEGF 和内参引物由 Takara 公司合成。逆

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.02.003

基金项目:江苏省教育厅科研基金项目(HJ03-059)、南京市社会发展科技项目(200401070-3,20080439)资助

作者单位:210009 南京,东南大学附属中大医院(张丽达、马里、黄平、钱霞),东南大学医学院(田小强、张伟、杨琳)

转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自日本 Takara 公司, RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青公司), TRIZOL 细胞裂解液(Invitrogen 公司), 高压氧舱 DWC150-300 型动物实验舱购自上海 701 所。

二、方法

(一) 细胞培养

结肠癌细胞株 SW480, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 培养液为含 10% 小牛血清、1 × 10⁵ U/L 青霉素和 1 × 10⁵ U/L 链霉素的 RPMI-1640。细胞用胰酶消化, 6 × 10⁴ /ml 种植于培养瓶中, 培养 1 d 后进行后续实验。

(二) HBO 暴露方法

实验开始前用紫外线消毒氧舱 20 min, 纯氧洗舱 10 min。然后将培养瓶(盛于消毒盒中)放入加压舱, 将瓶盖松开一部分以便于氧气进入, 15 min 内缓慢升压至实验所需的压力后稳压, HBO 暴露 60 min, 减压 15 min。HBO 暴露过程中保持持续通风, 纯氧流量 2 L/min, 舱内平均氧浓度为 95%。HBO 暴露总时间 90 min。细胞出舱后置 CO₂ 培养箱继续培养。

(三) 实验分组

实验时选取对数生长期的细胞, 调整细胞数至 6 × 10⁴ /ml, 按照是否给予 HBO, 分为正常对照组和实验组; 为减少误差, 各实验组至少 3 个样本。实验组根据不同压力 HBO 和 HBO 暴露 60 min 后的不同时间分组。

1. 正常对照组: 对数生长期细胞不作 HBO 处理, 在舱外暴露时间与 HBO 暴露组时间相同, 然后置 CO₂ 培养箱继续培养。

2. 依据不同压力的 HBO 实验细胞分组: ①HBO-A 组, 压力为 0.15 MPa, 纯氧浓度为 95%; ②HBO-B 组, 压力为 0.20 MPa, 纯氧浓度为 95%; ③HBO-C 组, 压力为 0.25 MPa, 纯氧浓度为 95%。

3. 依据 HBO 暴露后的不同时间实验细胞分组: ①HBO 暴露后 12 h 组, 即将细胞行 HBO 暴露后, 置 CO₂ 培养箱继续 10.5 h, 总时间 12 h; ②HBO 暴露后 24 h 组, 在 HBO 暴露后 12 h 组基础上, 细胞再进行一次 HBO 暴露后, 再置 CO₂ 培养箱继续培养 10.5 h, 总时间 24 h; ③HBO 暴露后 36 h 组, 在 HBO 暴露后 24 h 组基础上, 进行第 3 次 HBO 暴露后, 置 CO₂ 培养箱继续培养 10.5 h, 总时间 36 h。

(四) RT-PCR 检测不同组 HBO 暴露后 SW480 细胞 HIF-1α、VEGF mRNA 表达的变化

用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 按照 RT-PCR 试剂盒的反应体系进行逆转录和 PCR。内参照和基

因引物序列设计参照 Liu 等介绍的方法^[3], 同时应用 Prime5.0 引物设计进行引物设计(表 1)。HIF-1α 反应体系 25 μl, 94℃ 4 min 预变性, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 45 s 共 32 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 或 -20℃ 保存, 共 32 个循环(内参为 25 个循环); 最后 72℃ 延伸 7 min。扩增片段产物长度 320 bp。VEGF: 95℃ 4 min 预变性, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min, 扩增片段产物长度 234 bp。PCR 产物用 2% 的琼脂糖进行电泳, 紫外灯光下观察。

表 1 β-actin 和 HIF-1α、VEGF 基因的引物序列

名 称	引物序列
HIF-1α	上游 5'-ACCTATGACCTGCTTGCTGCTGAT-3' 下游 5'-TTGGCAAGCATCTGTACTGTCTCT-3'
VEGF	上游 5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGTGGT-3' 下游 5'-TCTGCATGGTGATGTTGACTCCT-3'
β-actin	上游 5'-CGC CGC GCT CGT CGT CGA CA-3' 下游 5'-GTC ACG CAC GAT TTC CCG CT-3'

(五) RT-PCR 产物检测

应用激光光密度扫描仪扫描琼脂糖凝胶电泳图谱, 并对图像进行分析(FR-980 生物电泳图像分析系统及 Smartview-2001 电泳图像分析软件), 图像处理系统中测定各条带的光密度, 光密度以 β-actin 校正作相对量分析, 数值以两者光密度的比值(亮带面积 × 总吸光度)表示。比较 SW480 细胞的 HIF-1α、VEGF mRNA 在不同压力 HBO 和 HBO 暴露 60 min 后的不同时间的表达差异。

三、统计学分析

应用 SPSS 17.0 版软件, 所有结果均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 样本均数之间的比较用方差分析比较 SW480 细胞的 HIF-1α、VEGF mRNA 在不同压力 HBO 和 HBO 暴露不同时间后的表达差异, 并比较各组之间的相关性 r 分析, 绘制重叠散点图。

结 果

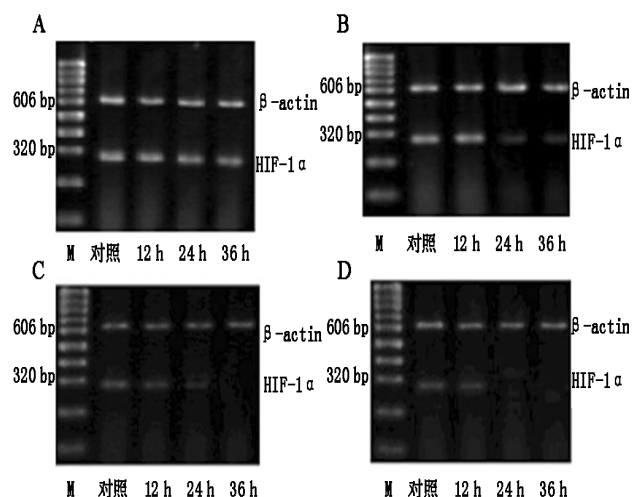
一、不同压力 HBO 暴露后不同时间对 SW480 细胞 HIF-1α 表达影响

采用半定量 RT-PCR 方法检测不同压力 HBO (0.15, 0.20, 0.25 MPa) 和 HBO 暴露后不同时间 (12, 24, 36 h) SW480 细胞 HIF-1α 表达水平改变, 与对照组比较结果显示, HIF-1α 在 HBO 暴露后不同时间其表达存在差异, 随着压力和氧浓度的增加, HIF-1α mRNA 表达水平呈现逐渐减弱趋势, 0.25 MPa HBO 暴露后 12 h 与其他组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1, 0.25 MPa HBO 暴露后 24 h 甚至检测不到 HIF-1α

mRNA, 见图 1A-D。

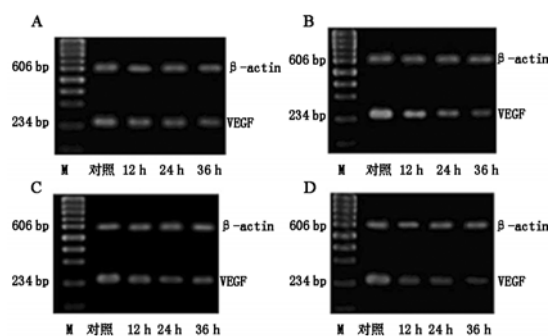
二、不同压力 HBO 暴露后不同时间对 SW480 细胞 VEGF mRNA 表达影响

用同样方法检测 SW480 细胞 mRNA 表达水平的改变, 与对照组比较结果显示, VEGF 在 HBO 暴露后不同时间其表达存在差异, 随着压力和氧浓度的增加, VEGF mRNA 表达水平呈现逐渐减弱趋势, 0.25 MPa HBO 暴露后 VEGF mRNA 表达减弱与其他各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



注: A. 正常对照组不同时间 SW480 细胞 HIF-1 α mRNA 表达; B. 0.15 MPa HBO 暴露后不同时间 SW480 细胞 HIF-1 α mRNA 表达; C. 0.20 MPa HBO 暴露后不同时间 SW480 细胞 HIF-1 α mRNA 表达; D. 0.25 MPa HBO 暴露后不同时间 SW480 细胞 HIF-1 α mRNA 表达

图 1 不同压力 HBO 暴露后不同时间 HIF-1 α mRNA 电泳图



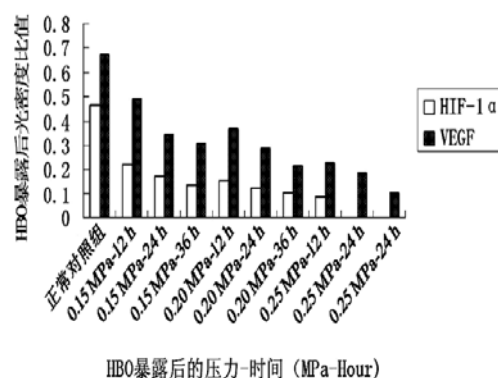
注: A. 正常对照组不同时间 SW480 细胞 VEGF mRNA 表达; B. 0.15 MPa HBO 暴露后不同时间 SW480 细胞 VEGF mRNA 表达; C. 0.20 MPa HBO 暴露后不同时间 SW480 细胞 VEGF mRNA 表达; D. 0.25 MPa HBO 暴露后不同时间 SW480 细胞 VEGF mRNA 表达

图 2 不同压力 HBO 暴露后不同时间 VEGF mRNA 电泳图

三、不同压力 HBO 暴露后不同时间对 SW480 细胞 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达相关性影响

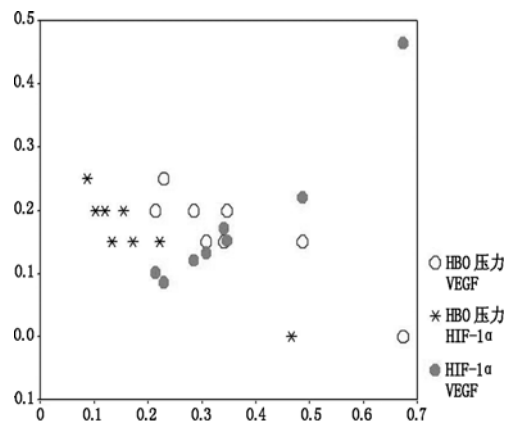
本研究通过检测 SW480 细胞 HIF-1 α 、VEGF mRNA 在不同压力 HBO 和 HBO 暴露后不同时间的表达水平来探究它们之间的关系。结果显示, HIF-1 α

mRNA 和 VEGF mRNA 在 HBO 为 0.25 MPa 情况下, 作用时间 (12 h, 24 h, 36 h) 和两者的表达差异具有统计学意义 ($P_{\text{HIF-1}\alpha} = 0$, $P_{\text{VEGF}} = 0.023$), 这表明, 在 0.25 MPa 高压氧作用下, 随着时间的延长, HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 的表达逐渐下降, 见图 3。相关性分析表明, 高压氧的压力和 HIF-1 α mRNA 及 VEGF mRNA 之间具有负相关性 ($r_{\text{HIF-1}\alpha} = -0.835$, $r_{\text{VEGF}} = -0.808$); 并且在 HBO 作用下, HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 之间的表达具有正相关性 ($r_{\text{HIF-1}\alpha\text{-VEGF}} = 0.927$), 见图 4。



注: SW480 细胞 0.25 MPa HBO 暴露后 12 h 组 HIF-1 α mRNA 表达水平与其他各组比较有差异 ($P = 0$), SW480 细胞 0.25 MPa HBO 暴露后 36 h 组 VEGF mRNA 表达与其他各组比较有差异 ($P = 0.023$)

图 3 不同压力 HBO 暴露后不同时间 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达情况直方图



注: HBO 分别与 HIF-1 α 、VEGF 之间呈现明显的线性相关 ($r_{\text{HIF-1}\alpha} = -0.835$, $r_{\text{VEGF}} = -0.808$) 呈负相关, HIF-1 α 和 VEGF 之间具有明显的线性相关 ($r_{\text{HIF-1}\alpha\text{-VEGF}} = 0.927$) 且呈正相关

图 4 压力、HIF-1 α 、VEGF 之间线性相关重叠散点图

讨 论

目前研究结果表明, 在缺氧条件下 HIF-1 的降解受阻, 可以导致胞内 HIF-1 α 积聚并发生核转位至细胞核中与 HIF-1 β 结合形成 HIF-1, HIF-1 α 与目的基因的

缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)结合从而激活目的基因的转录过程^[2],调控氧调节蛋白(oxygen-regulated proteins, ORPs)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、VEGF 以及糖酵解酶等细胞因子的表达,而这一过程在氧浓度升高的情况下会受到抑制。

VEGF 作为最主要的血管生成因子,与肿瘤的发生、发展、浸润、转移和预后密切相关。HIF-1 α 对 VEGF 的调控主要是通过与一种特异性 VEGF 的 DNA 低氧性应答物质连接,进而促进 mRNA 的转录,促进 VEGF mRNA 的稳定表达^[3],促进肿瘤血管生成和转移。近年的研究发现,HIF-1 α 通过与 VEGF 基因缺氧反应元件结合^[4],上调其转录。由此可见,持续保持肿瘤组织较高的氧含量,可下调肿瘤细胞 HIF-1 α 和 VEGF 等因子的表达,抑制其促血管形成的生物学活性^[5-6],进而影响肿瘤细胞的增殖和侵袭。

实体瘤部分细胞缺氧状态可诱导肿瘤细胞对放疗和化疗的耐受性。目前陆续有文献报道,通过改善肿瘤组织的供氧状况,可诱导乏氧的肿瘤细胞周期同步化,如张伟等^[7]通过 HBO 作用于 LoVo 细胞后在 S 期积聚。提示临床上可以通过 HBO 辅助治疗以增强细胞周期特异性化疗药物的敏感性,从而明显减轻药物的副作用;同时抑制肿瘤的血管新生可不同程度阻断肿瘤组织给养,进而影响肿瘤细胞的生存。Li 等^[8]通过 HBO 短暂暴露发现其可抑制 HIF-1 α 及其靶基因的表达。McCarty 等^[9]认为,在肿瘤治疗中,通过抑制 HIF-1 α 的活性或许能成为一种潜在可行的策略。这就提示我们应用 HBO 治疗肿瘤的可行性。

本研究结果显示,0.25 MPa HBO 暴露后 12 h HIF-1 α mRNA 的表达与其他组间差异有统计学意义($P < 0.01$),并且随着氧分压逐渐升高,HIF-1 α mRNA 表达逐渐减弱,0.25 MPa HBO 暴露后 24 h HIF-1 α mRNA 甚至检测不到。VEGF mRNA 的表达同样随着氧分压的增加而逐渐降低,并且和 HIF-1 α mRNA 的表达之间具有正相关。这种表达水平的改变,可能与 HBO 暴露后通过改善肿瘤细胞的乏氧状态引起 HIF-1 α 在转录水平的变化有关,肿瘤细胞的缺氧环境的改善,细胞内氧的积聚引起 HIF-1 α 的迅速降解,同时 VEGF 的表达也随之下降,细胞内氧浓度的提高可抑制 HIF-1 α 和 VEGF 的表达。国内一些研究显示,HIF-1 α 和 VEGF 的表达与肿瘤的发生呈正相关^[10-11]。Toiyama 等^[12]的研究显示,直肠癌患者术前 VEGF 的表达水平与其术后生存期有很大关系,这些结果提示,若

抑制肿瘤细胞的 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平可能会阻断肿瘤的发生发展。而本研究结果显示,HBO 明显抑制了体外培养的肿瘤细胞 SW480 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达,提示 HBO 对肿瘤血管的形成及肿瘤的生长及转移可能具有抑制作用,为临床应用 HBO 辅助治疗肿瘤提供了实验理论依据。

参 考 文 献

- [1] Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer*, 2000, 36: 1649-1660.
- [2] Takiguchi N, Saito N, Nunomura M, et al. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 47: 11-14.
- [3] Liu LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 908-914.
- [4] Weidner N, Folkman J. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients; the evidence continues to grow. *J Pathol*, 1998, 184: 130-135.
- [5] Patel V, Chivukula IV, Roy S, et al. Oxygen: from the benefits of inducing VEGF expression to managing the risk of hyperbaric stress. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7: 1377-1387.
- [6] Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, et al. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Cancer Res*, 2006, 66: 3688-3698.
- [7] 张伟, 张丽达, 汪爱国, 等. 高压氧对结肠癌 LoVo 细胞周期的影响. *中华航海医学杂志*, 2006, 13: 88-91.
- [8] Li Y, Zhou C, Calvert JW, et al. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol*, 2005, 191: 198-210.
- [9] McCarty MF, Barroso-Aranda J, Conlras F. Practical strategies for suppressing hypoxia-inducible factor activity in cancer therapy. *Med Hypotheses*, 2010, 74: 789-797.
- [10] 黄艳, 范新娟, 林汉良, 等. 结直肠癌中 HIF-1A 和 VEGF 的表达及其相关性. *临床与实验病理学杂志*, 2009, 25: 646-648.
- [11] 苏乃伟, 冯旭, 覃家锦. VEGF, MMP-9 在广西地区食管癌中的表达及其相关性研究. *广西医科大学学报*, 2009, 26: 875-877.
- [12] Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, et al. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol*, 2010, 22: 272-280.

(修回日期: 2010-09-02)

(本文编辑: 松 明)