

HIF-1 α 基因沉默后对 SW480 人结肠癌细胞生物学特性的影响^{*}

王 强¹, 郝朗松^{2 Δ} , 史 佳¹, 黄 健¹

1. 贵州医科大学(贵阳 550004); 2. 贵州医科大学附属人民医院 胃肠外科(贵阳 550002)

【摘要】 目的 探讨缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)基因沉默对 SW480 人结肠癌细胞增殖、凋亡的影响。**方法** 利用脂质体法转染介导的 siRNA 干扰技术转染人结肠癌细胞 SW480,设立干扰组:转染 *HIF-1 α* 干扰序列;阴性对照组:转染无关序列;空载体组:为空白质粒;空白对照组:未转染。用 Real-time PCR 及 Western blot、MTT 比色法、流式细胞仪(FCM) 检测各组 *HIF-1 α* mRNA 及蛋白的表达、SW480 细胞增殖及凋亡。**结果** 干扰组在各时间点 *HIF-1 α* mRNA 表达的沉默效率均在 80% 以上,高于其他 3 组(P 均 <0.05);与其余 3 组相比,干扰组 *HIF-1 α* 蛋白相对表达量降低($P<0.05$),增殖曲线表明其增殖受抑;凋亡率显著升高($P<0.01$)。**结论** *HIF-1 α* 基因沉默可促进人结肠癌细胞 SW480 凋亡,抑制肿瘤细胞生长。

【关键词】 缺氧诱导因子-1 α RNA 干扰 结肠癌细胞 增殖 凋亡

Effect of *HIF-1 α* Gene Silence on Biological Characteristics of Human Colon Cancer Cells SW480 WANG Qiang¹, HAO Lang-song^{2 Δ} , SHI Jia¹, HUANG Jian¹. 1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated People's Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550002, China

Δ Corresponding author, E-mail: hls616@163.com

【Abstract】 Objective To investigate changes in proliferation and apoptosis of human colon cancer SW480 cells after silencing hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression. **Methods** siRNA interference technology was performed to silence the expression of *HIF-1 α* using lipofectamine mediation to transfect siRNA into human colon cancer SW480 cells. The siRNA interfered SW480 cells were compared with a negative control group, an empty vector group, and a blank control group. Real-time PCR and Western blot were used to measure the expressions of HIF-1 α protein and mRNA. MTT and flow cytometry (FCM) were used to evaluate the apoptosis and proliferation of SW480 cells. **Results** The interfered SW480 cells had a higher level of silence of *HIF-1 α* mRNA ($>80\%$) compared with those of in the three control groups ($P<0.05$). Higher levels of apoptosis and lower levels of proliferation were detected in the interfered cells compared with those in the control groups ($P<0.01$). **Conclusion** HIF-1 α silencing promotes apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 cells *in vitro*.

【Key words】 Hypoxia inducible factor-1 α RNA interference Colon cancer cells Proliferation Apoptosis

在临床研究已证实缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducing factor-1 α , HIF-1 α)与结肠癌临床特征、疗效、预后相关的基础上^[1-4],研究其对结肠癌细胞生物学特性的影响有助于阐明 HIF-1 α 的具体功能,并有望改善结肠癌的治疗现状。通过对其他肿瘤的类似研究结果表明:①HIF-1 α 是肿瘤 Wrberg 效应的促发因素;②通过保护肿瘤线粒体 DNA 对抗氧自由基所致的凋亡;③促进肿瘤细胞的增殖。然而,关于 HIF-1 α 对肿瘤细胞增殖、抗凋亡的影响目前

尚存在争议^[5,6]。部分学者认为 HIF-1 α 主要以抗凋亡作用为主,并且存在抑制肿瘤细胞增殖的作用^[7]。鉴于上述结论来自于不同的实验设计、方法及肿瘤细胞,因此,本研究拟采用阳离子脂质体转染法转染 *HIF-1 α* 干扰序列沉默其在结肠癌 SW480 细胞株的表达,并通过与设定的对照组相比,评估 *HIF-1 α* 沉默后的结肠癌细胞在体外的增殖、凋亡情况,以期明确 HIF-1 α 对结肠癌细胞增殖、凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株及细胞培养

^{*} 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2008]2304)和贵州省优秀科技教育人才省长专项资金(黔省专合字[2009]32)资助

Δ 通讯作者, E-mail: hls616@163.com

人结肠癌 SW480 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞库。用含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 高糖培养基进行培养,培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱。2~3 d 传代 1 次,传代至 P5 后用以后续实验。

1.2 HIF-1 α 干扰序列及转染、分组

带荧光标记的 HIF-1 α 干扰序列(FAM-HIF-1 α -siRNA)购自上海吉玛制药技术有限公司,其序列为:上游引物 5'-CCA GCA GAC UCA AAU ACA ATT-3',下游引物 5'-UUG UAU UUG AGU CUG CUG GTT-3'。无关序列阴性对照 siRNA oligos:上游引物 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',下游引物 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。采用 HIF-1 α -siRNA oligos 脂质体法转染 SW480 细胞。细胞转染前 24 h,取 P5 生长状态良好的对数期生长细胞,0.25%胰酶消化,新鲜含 10% 胎牛血清终止消化吹打成细胞悬液,计数,按 2×10^5 /孔接种六孔板,约 24 h 后细胞长至 50%~60% 融合。转染前 1 h 将六孔板培养基换为无血清和抗生素培养基,每孔体积为 1.5 mL。根据转染的序列及内容的不同,将其分为:①干扰组:转染 HIF-1 α 干扰序列;②阴性对照组:转染无关序列;③空载体组:为空白质粒;④空白对照组:未转染。于转染后 6 h 荧光显微镜下观察转染效率,转染后 24、48、72 h 评估沉默率,沉默率(%)=(1- $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) $\times 100\%$ 。转染后普通视野下计数细胞 A,荧光下相同视野计荧光细胞数 a,转染效率(%)=a/A $\times 100\%$ 。

1.3 Real-time PCR 检测转染后细胞中 HIF-1 α mRNA 的表达

收集转染后 24、48、72 h 的细胞,用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,按 RNA 逆转录试剂盒行逆转录合成 cDNA。引物用 Primer 5 软件设计,交由上海生物工程有限责任公司合成。HIF-1 α ,上游引物 5'-GCAAGACTTTCCTCAGTCGACACA-3';下游引物 5'-GCATCCTGTACTGTCCTGTGGTGA-3',扩增片段长度 207 bp;内参基因 β -actin,上游引物 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTC CTA-3',下游引物 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3',扩增片段长度 150 bp。体系为 20 mL,反应体系如下:上、下游引物各 0.5 mL,cDNA 2.0 mg,Super Mixture 10.0 mL。在 FTC2000 上 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min 后,95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s、53 $^{\circ}\text{C}$ 20 s、60 $^{\circ}\text{C}$

1 min,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时收集荧光,循环 44 次,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。观察分析扩增曲线,读出每一扩增的 Ct 值。根据荧光变化曲线获得每个反应的 Ct 值,从而绘制目标基因和内参照基因的标准曲线。在定量 PCR 仪上 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min 后,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min、60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时分别在第二荧光通道(FAM)收集荧光,循环 40 次。以 Bio-Rad CFX manager 3.0 分析,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 来表示基因相对表达量。

1.4 Western blot 检测转染后细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达

收集转染后 24 h 细胞,用预冷 PBS 清洗 3 遍,加入含 PMSF 的裂解液,于冰上裂解 30 min 并且来回摇动培养瓶,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清,BCA 试剂盒(碧云天)测定蛋白总浓度,各组样品取上清 12 μL 进行 100 g/L SDS-PAGE 电泳,120 V 60 min 分离后,将蛋白转移至 PVDF 膜上,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗(HIF-1 α 抗体购自 abcom 公司 1:80 稀释, β -actin 抗体购自晶美生物科技公司 1:200 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗膜 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(购自北京中杉金桥,HIF-1 α 羊抗鼠抗体 1:80, β -actin 羊抗兔抗体 1:200)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,显影底物处理后显影,底片在 Bio-Rad 凝胶系统下保存,并定量分析 Western blot 条带。目的蛋白 HIF-1 α 的相对表达量为蛋白条带灰度值与内参照灰度值的比值。

1.5 四甲基偶氮唑盐法(MTT) 检测转染后细胞的增殖

0.25%胰蛋白酶消化转染后 24 h 的 SW480 细胞,用含 10% 胎牛血清培养液配成单个细胞悬液,调整细胞浓度后接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 1×10^4 个细胞,培养过夜。更换无血清、无抗生素的 DMEM 培养基继续培养 8 h。培养基总体积每孔 100 mL。24 h 后更换完全培养基。继续培养 72 h 后每孔加入 20 mL 5 mg/mL MTT 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h(记为 0 d),倾去上清液,加入 200 mL DMSO,充分混匀后,于 0~5 d 每日测量吸光度(490 nm 比色)。每组重复 3 孔。

1.6 流式细胞仪检测细胞的凋亡

收集各组转染后 48 h 的细胞,调整各组待测细胞的浓度约 $5 \times 10^5/\text{L}$,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL PI,混匀,室温、避光、反应 5~15 min,用流式细胞仪检测各组细胞早期凋亡和晚期凋亡及坏死率。其中,Annexin V-FITC⁻/PI⁻ 为

活细胞群位于左下象限(V); Annexin V-FITC⁺/PI⁻为早期凋亡细胞位于右下象限(AP); Annexin V-FITC⁺/PI⁺为晚期凋亡和坏死细胞位于右上象限(N); Annexin V-FITC⁻/PI⁺为培养操作过程中出现的机械损伤细胞位于左上象限(O)。计算公式为:早期凋亡率(%)=右下象限细胞数/总细胞数×100%,晚期凋亡及坏死率(%)=右上象限细胞数/总细胞数×100%。

1.7 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数比较用单因素方差分析,组内多重比较视方差齐性采用 LSD 法或 Games-Howell 法进行检测。 $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率

荧光显微镜观察结果显示,通过脂质体法转染 SW480 人结肠癌细胞 6 h 后可见荧光, *HIF-1α*-siRNA 的转染效率约为 85%。见图 1。

2.2 转染后各时间点 *HIF-1α* 的表达量及沉默率

由表 1 结果可知:干扰组沉默率均 $>80\%$,而空载体组及阴性对照组均 $<6\%$ 。该结果证明转染干扰序列后,SW480 细胞 *HIF-1α* 的表达明显受抑,达到预期要求。

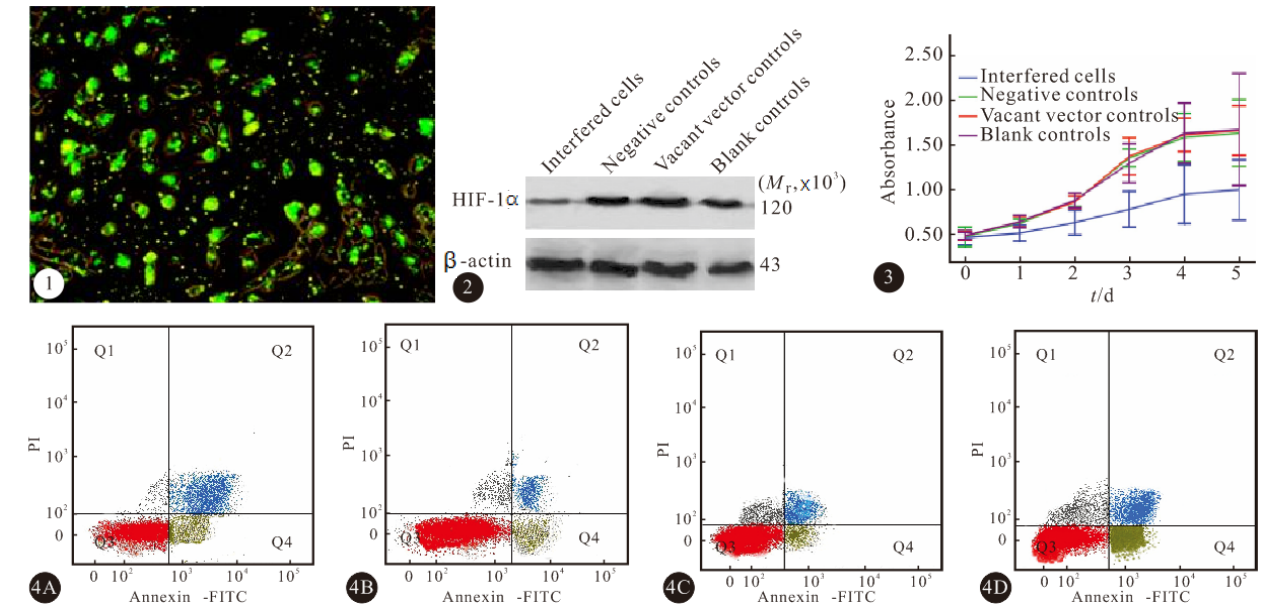


图 1 荧光显微镜下观察 *HIF-1α*-siRNA 在 SW480 细胞中的转染率。×400

SW480 增殖曲线

Fig 1 Transfection efficiency of *HIF-1α*-siRNA. ×400

curve of proliferation of SW480 cells

4A: Interfered cells; 4B: Negative controls; 4C: Vacant vector controls; 4D: Blank controls

表 1 转染后各时间点 *HIF-1α* 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 及沉默率($\bar{x} \pm s$)

Group	24 h		48 h		72 h	
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Silencing rate (%)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Silencing rate (%)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Silencing rate (%)
Interfered cells	0.13 ± 0.03	87.27 ± 2.37	0.17 ± 0.01	83.38 ± 0.8	0.11 ± 0.01	89.41 ± 0.44
Negative controls	0.95 ± 0.03	5.36 ± 3.28	0.96 ± 0.03	4.71 ± 2.64	0.96 ± 0.02	4.06 ± 1.99
Vacant vector controls	0.98 ± 0.04	5.36 ± 3.31	0.97 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.98 ± 0.01	2.06 ± 0.68

2.3 转染后 24 h *HIF-1α* 蛋白的表达水平

Western blot 结果显示(图 2),干扰组、阴性对照组、空载体组、空白对照组的 *HIF-1α* 蛋白的相对表达量分别为 0.15 ± 0.01 、 0.81 ± 0.12 、 $0.92 \pm$

0.23 、 0.94 ± 0.12 ,各组 *HIF-1α* 蛋白的相对表达量差异具有统计学意义($F = 13.771, P = 0.012$)。组内多重比较可知:干扰组蛋白的相对表达量低于其他 3 个对照组(P 均 < 0.05),但其余 3 组之间差异

图 2 转染后 24 h 各组的 *HIF-1α* 蛋白的表达

图 3

Fig 3 The

curve of proliferation of SW480 cells

无统计学意义。

2.4 各组 SW480 人结肠癌细胞的增殖情况

单因素方差分析显示,SW480 人结肠癌细胞细胞各时间点各组间吸光度值差异均有统计学意义($P<0.05$);干扰组吸光度值低于其他 3 组(P 均 <0.05),随着时间延长,细胞增殖受到抑制。见图 3、

表 3。

2.5 沉默 HIF-1 α 对 SW480 人结肠癌细胞凋亡的影响

HIF-1 α 干扰组早期凋亡率及晚期凋亡坏死率较阴性对照组、空载体组和空白对照组增加(P 均 <0.05),后 3 组间差异无统计学意义。见图 4、表 4。

表 3 不同组各时间点吸光度值 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 The absorbance values of cells ($\bar{x}\pm s$)

	Interfered cells	Negative controls	Vacant vector controls	Blank controls	F	P
0 d	0.48 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 0.08	0.49 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.05	0.96	>0.05
1 d	0.52 $\pm$ 0.09	0.63 $\pm$ 0.05 Δ	0.65 $\pm$ 0.06 Δ	0.65 $\pm$ 0.07 Δ	21.41	<0.01
2 d	0.64 $\pm$ 0.14	0.88 $\pm$ 0.06 Δ	0.87 $\pm$ 0.07 Δ	0.89 $\pm$ 0.08 Δ	51.38	<0.01
3 d	0.79 $\pm$ 0.20	1.37 $\pm$ 0.10 Δ	1.39 $\pm$ 0.21 Δ	1.31 $\pm$ 0.22 Δ	1 464.31	<0.01
4 d	0.96 $\pm$ 0.33	1.60 $\pm$ 0.27 Δ	1.63 $\pm$ 0.19 Δ	1.65 $\pm$ 0.34 Δ	439.29	<0.01
5 d	1.01 $\pm$ 0.34	1.66 $\pm$ 0.39 Δ	1.68 $\pm$ 0.28 Δ	1.69 $\pm$ 0.63 Δ	658.94	<0.01

$\Delta P<0.05$, vs. interfered cells

表 4 干扰后 48 h 各组 SW480 人结肠癌细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$)
Table 4 The apoptotic rate of SW480 cells 48 hours after transfection ($\bar{x}\pm s$)

Group	Early apoptotic rate (%)	Lated apoptotic and necrosis rate (%)
Blank controls	3.07 $\pm$ 0.12 Δ	3.51 $\pm$ 0.14 Δ
Vacant vector controls	3.38 $\pm$ 0.17 Δ	3.60 $\pm$ 0.13 Δ
Negative controls	4.07 $\pm$ 0.15 Δ	4.19 $\pm$ 0.17 Δ
Interfered cells	49.86 $\pm$ 2.74	33.18 $\pm$ 2.06

$\Delta P<0.05$, vs. interfered cells

3 讨论

缺氧诱导因子与肿瘤的关系成为近年来肿瘤学研究的热点,HIF-1 α 在多种人类肿瘤中持续高表达,且其表达程度升高往往提示肿瘤快速增殖、转移、生存率低^[1]。Rajaganeshan、Schmitz 及 Cleven 等^[2-4]发现 HIF-1 α 表达程度与 Dukes' B 结肠癌术后复发相关,其在结肠癌中的高表达往往为侵袭程度高的亚型,且为结肠癌预后不良的独立危险因素,其理论基础主要基于肿瘤细胞所特有的有氧糖酵解生物学背景(Warburg 效应)。HIF-1 α 升高被认为是肿瘤细胞对低氧环境的应激性应答并成为驱动低氧所致的糖酵解因素之一^[5]。HIF-1 α 通过上调位于细胞膜的葡萄糖相关转运受体(GLUT-1、4、8)及糖酵解关键酶表达,以促进肿瘤细胞对葡萄糖的摄取及利用,并通过糖酵解途径生成更多的肿瘤细胞增殖、分化所需的生物合成原材料。此外,HIF-1 α 可上调 PDK1 表达,并抑制线粒体氧自由基生成、蓄积,防止氧化应激所致的细胞凋亡,从而最大限度保证肿瘤细胞在相对低氧环境下的存活^[6]。

然而,尽管既往研究认为 HIF-1 α 是促进肿瘤代谢紊乱并促进肿瘤不受调控增殖的主要原因,但 Ward 等^[7]的研究却发现 HIF-1 α 对肿瘤的影响并非促进增殖,相反,HIF-1 α 对肿瘤的增殖起抑制效应,且该种抑制效应是通过对肿瘤细胞线粒体的影响而达成。一方面,HIF-1 α 可通过抑制 c-myc 表达影响肿瘤细胞线粒体的能量发生,将细胞对营养物质的需求降至最低,以适应肿瘤细胞在低氧环境下的存活,而非积极生长;而另一方面 HIF-1 α 所致的 PDK1 高表达可阻止葡萄糖的细胞内代谢合成,减少以葡萄糖为碳源的合成代谢从而导致细胞增殖受抑^[8]。因此,对以 HIF-1 α 为靶点的肿瘤干预治疗其目的并非抑制肿瘤增殖,而是促进其凋亡。

在本研究中,研究者通过脂质体转染法采用干扰序列稳定转染人结肠癌 SW480 细胞,使 HIF-1 α 基因沉默,通过 Real-time-PCR 方法证实,转染干扰序列的人结肠癌 SW480 细胞在 24 h、48 h、72 h 后 HIF-1 α mRNA 水平降低,沉默效率高;Western blot 结果显示转染干扰序列后的干扰组蛋白较其它 3 个组降低,证实通过 RNA 干扰技术可以有效的抑制目的基因的表达。在本实验中,流式细胞检测凋亡结果显示干扰组较其它 3 个组早期凋亡率、晚期凋亡和坏死率高,该结果支持了 Ward 等的观点:即通过沉默 HIF-1 α 表达可明显促进人结肠癌 SW480 细胞的凋亡。同时,本研究结果亦证实 HIF-1 α 可抑制 SW480 细胞的增殖。

HIF-1 α 可以调节很多基因表达,而这些基因(VEGF 等)可以在肿瘤新生血管(与浸润转移相

关)、发生发展、耐药中发挥作用,因此,从源头对 *HIF-1 α* 进行阻截,可有效地下调或者阻碍这些因子的表达;目前针对其他实体瘤细胞的体外及动物实验均表明:使用磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及热休克蛋白 90 (Hsp90) 系统等 *HIF-1 α* 抑制剂后,肿瘤细胞的增殖均明显受抑,且凋亡增加。但这些抑制剂并非 *HIF-1 α* 特异性抑制,从而导致其临床应用受到限制。

总之,本研究通过脂质体转染干扰序列沉默人结肠癌 SW480 细胞 *HIF-1 α* 表达后,SW480 细胞的增殖轻度受抑,但凋亡却显著增加。该结果或可有助于临床开发新型的抗肿瘤药物并阐明 *HIF-1 α* 与结肠癌发病、发生发展的相关性及其潜在机制。但从体外实验向体内及人体试验的转化过程中,肿瘤微环境、患者的一般情况、个体差异、药物动力学的变化均可能会导致与体外实验相反的结果。此外, *HIF-1 α* 并非唯一可调节肿瘤能量代谢的基因,当 *HIF-1 α* 受到靶向性干预后,肿瘤细胞的 STAT3 及相关性通路亦可应激性活化,行使类似 *HIF-1 α* 的功能^[9]。因此,未来的研究应着眼于对 *HIF-1 α* 及其相关通路的阐明,并在其上游及与其它类似功能调节通路的交叉点上寻找关键的分子开关,并以此为治疗靶点进行相关机制及药物的研发。

参 考 文 献

1 Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in

cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 2010; 29 (5): 625-634.

2 Rajaganeshan R, Prasad R, Guillou PJ, *et al.* The role of hypoxia in recurrence following resection of Dukes' B colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2008; 23(11): 1049-1055.

3 Schmitz KJ, Müller CI, Reis H, *et al.* Combined analysis of hypoxia inducible factor 1 α and metallothionein indicates an aggressive subtype of colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*, 2009; 24(11): 1287-1296.

4 Cleven AH, van Engeland M, Wouters BG, *et al.* Stromal expression of hypoxia regulated proteins is an adverse prognostic factor in colorectal carcinomas. *Cell Oncol*, 2007; 29 (14): 229-240.

5 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144(5): 646-674.

6 Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, *et al.* *HIF-1*-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, 2006; 3 (3): 177-185.

7 Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 2012; 21 (3): 297-308.

8 Lum JJ, Bui T, Gruber M, *et al.* The transcription factor *HIF-1 α* plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev*, 2007; 21(9): 1037-1049.

9 Kola L, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3(8): 1774-1776.

(2015 - 03 - 06 收稿, 2015 - 05 - 29 修回)

编辑 吕 熙