

文章编号:1005-6947(2010)04-0364-05

· 基础研究 ·

缺氧下调结肠癌细胞株 CDX2 表达的研究

郑见宝, 孙学军, 王炜, 禄韶英, 任海亮, 王伟, 石景森

(西安交通大学医学院第一附属医院 普通外科, 陕西 西安 710061)

摘要:目的 探讨缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 和基因系尾型同源盒基因 2 (CDX2) 在人结肠癌细胞株 SW480 和 LS174T 不同缺氧时间的表达及其可能的作用机制。方法 (1) MTT 方法检测在不同 CoCl₂ 浓度 (100, 150, 200 μ mol/L) 下和不同时段 (24, 36, 48 h) 时对 SW480 和 LS174T 细胞活力以及增殖的影响, 筛选适宜的 CoCl₂ 作用浓度。(2) 在细胞化学缺氧培养相应时段, 采用半定量 RT-PCR 技术检测 HIF-1 α , Snail 和 CDX2 的 mRNA 的表达变化; 同时采用 Western blotting 技术检测 CDX2 的蛋白表达。结果 结肠癌细胞株在不同浓度 CoCl₂ 环境下随缺氧时间的延长, 细胞活力明显受到抑制。在低浓度 CoCl₂ (100 μ mol/L) 干预下, 随着缺氧时间的延长, HIF-1 α 和 Snail mRNA 表达逐渐上升, 缺氧 24 h 时达到高峰, CDX2 mRNA 及蛋白表达水平逐渐下降。结论 缺氧诱导 HIF-1 α 过表达可通过下调 CDX2 而加速结直肠癌的进展。 [中国普通外科杂志, 2010, 19(04): 364-368]

关键词: 结肠肿瘤; HIF-1 α ; Snail; CDX2; 缺氧微环境

中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** A

Hypoxia-induced expression of HIF-1 α decreases CDX2 expression in human colorectal cancer cell lines

ZHENG Jianbao, SUN Xuejun, WANG Wei, LU Shaoying, REN Hailiang, WANG Wei, SHI Jingsen

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University of Medical School, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanisms and relationship between HIF-1 α and CDX2 expressions in human colonic cancer cell line SW480 and LS174T during different time of hypoxia. **Methods** (1) The two tumor cell lines (SW480 and LS174T) were respectively exposed to CoCl₂ (100, 150 and 200 μ mol/L) for different time periods (24 h, 36 h and 48 h), and cells viability and proliferation were detected by MTT methods in order to select suitable CoCl₂ concentration. (2) Semiquantitative RT-PCR were used to detect the change in mRNA level of SW480 and LS174T under CoCl₂ (100 μ mol/L). Total amounts of CDX2 protein in SW480 and LS174T were examined by Western blot. **Results** Higher concentrations of CoCl₂ (150, 200 μ mol/L) significantly decreased cell survival rate ($P < 0.05$). So, we selected low concentration of CoCl₂ (100 μ mol/L) to construct hypoxic model. HIF-1 α mRNA expression of SW480 and LS174T increased with prolongation of hypoxia time when cells were exposed to CoCl₂ (100 μ mol/L) and reached peak at 24 hours hypoxia ($P < 0.05$). Similar results were observed in Snail mRNA expression. But mRNA and protein expression of CDX2 reduced significantly under CoCl₂ (100 μ mol/L) and gradually declined as the time of hypoxia was prolonged. **Conclusions** HIF-1 α might be up-stream regulator of CDX2 and its over expression may play an important role in progression of colorectal cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2010, 19(04): 364-368]

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672070;30400430);陕西省科学技术研究发展计划项目(2009K12-01)。

收稿日期:2009-07-31; **修订日期:**2010-02-03。

作者简介:郑见宝,西安交通大学医学院第一附属医院博士研究生,主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究。

通讯作者:孙学军 E-mail:sunxy@mail.xjtu.edu.cn

Key words: Colonic Neoplasms; HIF-1 α ; Snail; CDX2; Hypoxia Microenvironment

CLC number: R 735.3

Document code: A

结直肠恶性肿瘤细胞之所以能够以特定的方式增殖和分化并适应于特定的微环境,往往与该微环境下某些关键的生物活性分子的异常变化有关。缺氧是大多数实体肿瘤的微环境特征之一。有研究表明,缺氧可诱导 Snail 基因表达,进而抑制 E-钙粘蛋白(E-cadherin)表达,促进卵巢癌浸润转移^[1]。最近发现锌指转录因子 Snail(Snail)可以明显下调基因系尾型同源盒基因 2(caudal homeobox gene, CDX2)的表达,从而加速结直肠癌的浸润、转移^[2]。但缺氧对结直肠肿瘤细胞 CDX2 表达的影响却不明了。本文采用蛋白印迹法(Western blot)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测人结肠癌细胞株 SW480 和 LS174T,在模拟缺氧环境不同时间段缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), Snail, CDX2 的表达,探讨缺氧对结直肠肿瘤细胞恶性进展的影响及其可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人结肠癌细胞系 SW480, LS174T 由本学院中心实验室提供。DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,胎牛血清购自兰州明海公司。troizol 为 Invitrogen 公司产品。逆转录试剂盒及 PCR 所用试剂和酶均为 Fermentas 公司产品。CDX2, HIF-1 α , Snail 和 GAPDH 引物由北京奥科生物科技有限公司合成,序列如下:CDX2(正向, 5'-GAACCTGTGCGAGTGATG-3', 反向, 5'-GGTGATGTAGCGACTGTAGT-GAA-3'), HIF-1 α (正向, 5'-CCCAGATTCAGGATCAGACAC-3', 反向, 5'-TTGGGATATAGG-GAGCTAACATC-3'), Snail(正向, 5'-TCTAGCCCTGGCTGCTACAA-3', 反向, 5'-ACATCTGAGTGGCTCTGGAGCTG-3'), GAPDH(正向, 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 反向, 5'-TGTTGAAGACGCCAGTGA-3')。产物分别为 148, 288, 131, 138 bp。DNA marker 系广州东盛科技有限公司产品。CDX2 鼠抗人单克隆抗体系美国 BIOGENEX 公司产品(AM392-5M)。 β -actin 鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司(sc-47778)。HRP 标记羊抗鼠 IgG, 哺乳动物细胞蛋白抽提液(Ripa)及 BCA 法测蛋白浓度试剂盒均购自北京中杉生物科技有限公司。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 分 组 将常规培养的细胞分为 2 组。(1)对照组:将 SW480 和 LS174T 细胞置于含

10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂, 95% 空气和饱和湿度条件下的 CO₂ 培养箱中常规培养。(2)缺氧组:在 SW480 和 LS174T 细胞培养液中加入氯化钴(CoCl₂)浓度分别为 100, 150, 200 $\mu\text{mol/L}$, 两种细胞分别在不同浓度 CoCl₂ 干预缺氧 24, 36, 48 h。

1.2.2 甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 CoCl₂ 对结肠癌细胞生长增殖的影响 取对数生长期 SW480, LS174T 以 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 后换为含 0.5% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养 24 h 使细胞同步化, CoCl₂ (100, 150, 200 $\mu\text{mol/L}$)处理 24, 36, 48 h 后,每孔加入 0.5% MTT 20 μL ,继续培养 4 h;小心吸弃上清液,每孔内加入 200 μL 二甲亚砜(DMSO),振荡 10 min 溶解沉淀,酶标仪在 492 nm 下读取吸光度值。

1.2.3 RT-PCR 总 RNA 抽提按 TRIZOL 试剂盒说明书进行, RNA 纯度 = OD260/OD280。具体方法如下:(1)逆转录 70 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 42 $^{\circ}\text{C}$, 1 h; 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 5 min。(2)PCR 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$, 59 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 10 min。各基因均为 35 个循环。(3)电泳及显像 PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶 110 V, 30 min 电泳,凝胶显像系统观察并照相, Quantity One 软件对成像结果进行灰度扫描分析。各组操作重复 3 次。

1.2.4 Western blot 总蛋白抽提 细胞置于冰上,弃培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,每次 5 min;每 10⁶ 细胞加入 0.1 mL Ripa,冰上充分裂解 20 min; 14 000 r/min 离心收集上清液,BCA 法测蛋白浓度; -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取各组蛋白高温变性, 100 g/L 聚丙烯酰胺电泳分离约 1 h, 100 EV, 低温 2 h 转至硝酸纤维素(PVDF)膜,室温封闭 1 h;各组分别加入一抗 CDX2, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;漂洗,加二抗,室温孵育 1 h;漂洗,用增强型化学发光试剂(ECL)显示蛋白条带,以 β -actin 作为内对照。采用 Quantity One 图象分析软件测定 Western blot 条带净灰度值,并与内参照的测定结果比较,计算其比值。

1.3 统 计 学 处 理

目的基因表达强度以 $R_v = V(\text{目的基因})/V(\text{GAPDH})$ 的比值表示,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS13.0 统计分析软件包。多组间比较采用方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 CoCl₂ 对肿瘤细胞存活及增殖状态的影响

增加 CoCl₂ 浓度或延长处理时间均能明显降低两种细胞的活力。SW480 和 LS174T 之间细胞

活力的变化无差异。两个细胞系均观察到在相同干预时间内(24,36,48 h), CoCl₂ 在 100,150,200 μmol/L 均能明显抑制细胞活力($P < 0.05$), 故本研究构建缺氧模型的选择终浓度为 100 μmol/L (图 1)。

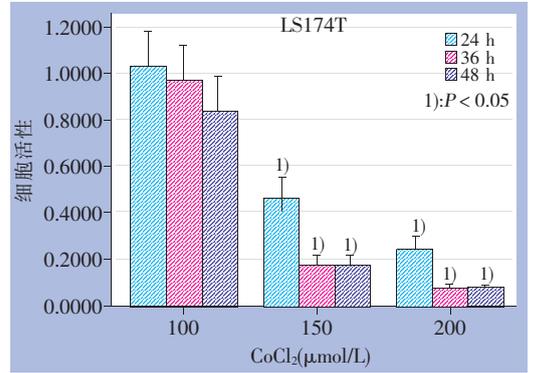
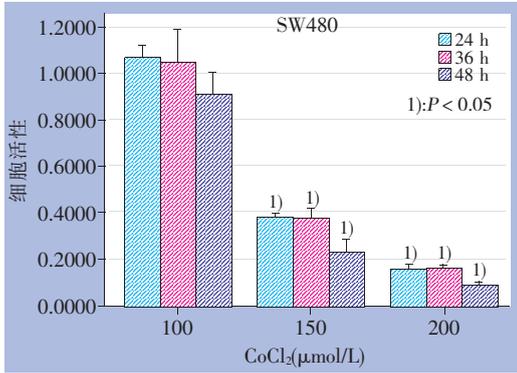


图1 不同浓度 CoCl₂ 对结肠癌细胞活力影响

2.2 缺氧对结肠癌细胞 HIF-1α, Snail, CDX2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 显示,SW480 和 LS174T 细胞随着缺氧时间的延长, HIF-1α mRNA 表达逐渐上升,于缺氧 24 h 达高峰,为对照组的 485.5% 和 142.8%,缺氧 36,48 h 时为对照组的 404.1%,401.4% 和 134.2%,128.3%,但仍比对照组高($P < 0.05$)。Snail mRNA 表达亦逐渐上升,于缺

氧 24 h 达表达高峰,为对照组的 142.8% 和 216.9%,缺氧 36,48 h 为对照组的 134.2%,128.3% 和 205.6%,185.2%。CDX2 蛋白的表达却随着缺氧时间的延长而减少,与对照组相比,缺氧 24 h 其表达下降 45.9% ($P < 0.05$) 和 92.0%,缺氧 36 h 其表达减少了 34.8% ($P < 0.05$) 和 76.3%,缺氧 48 h 其表达减少了 27.1% 和 62.2% ($P < 0.05$) (图 2)。

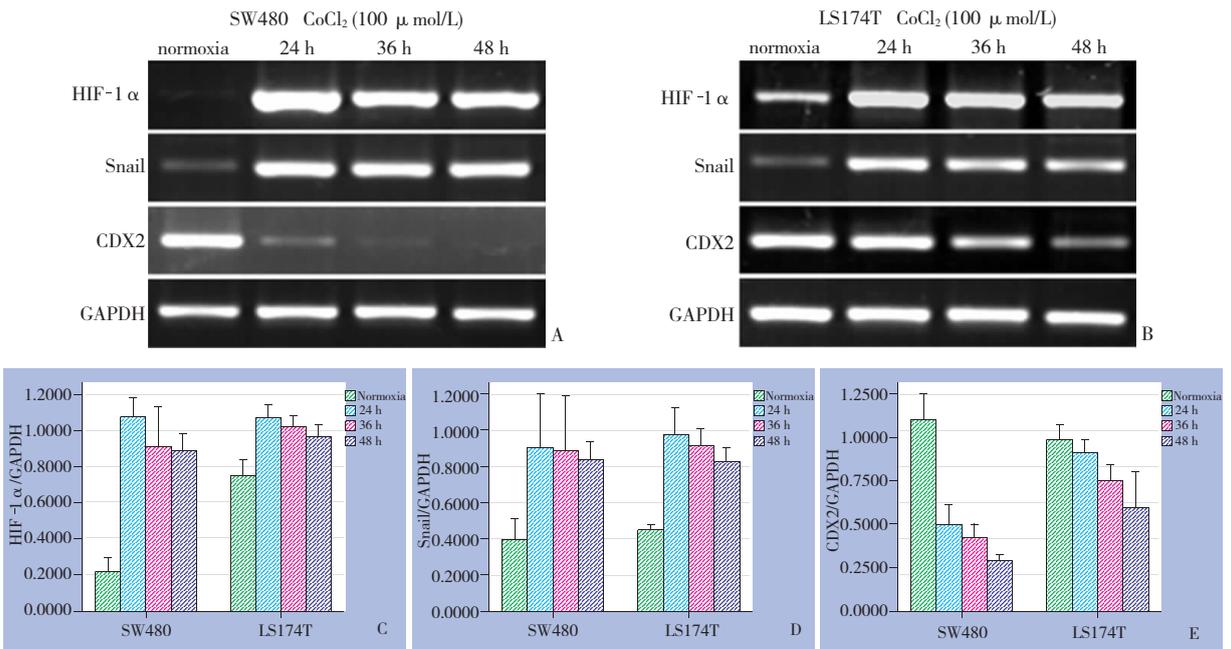


图2 模拟缺氧环境(100 μM CoCl₂)对结肠癌细胞 HIF-1α, Snail, CDX2 mRNA 表达的影响 A, B: 不同干预时间电泳条带; C, D, E: HIF-1α, Snail 和 CDX2 mRNA 相对表达量

2.3 缺氧对结肠癌细胞 CDX2 蛋白表达的影响

Western blot 显示, SW480 和 LS174T 细胞 CDX2 蛋白的表达随着缺氧时间的延长而减少, 与对照组比较: 缺氧 24 h 分别为对照组的 68.7%

和 77.0% ($P < 0.05$), 缺氧 36 h 分别为对照组的 37.6% 和 57.0% ($P < 0.05$), 缺氧 48 h 分别为对照组的 18.9% 和 45.1% ($P < 0.05$) (图 3)。

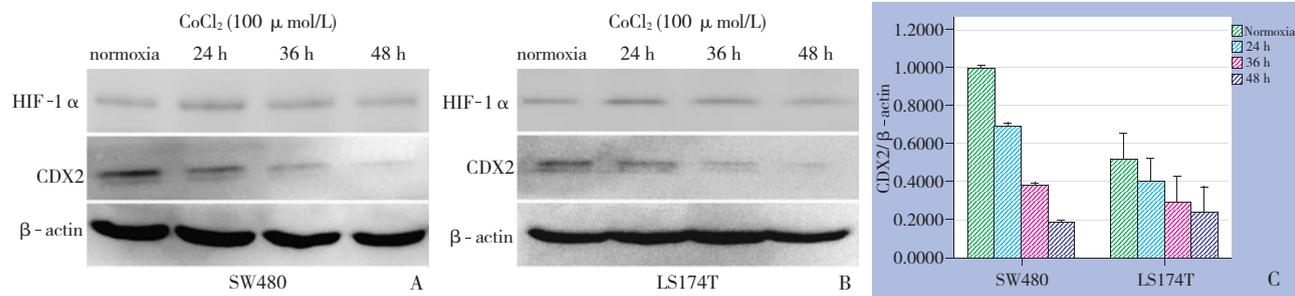


图 3 模拟缺氧环境(100 μM CoCl_2)对结肠癌细胞 CDX2 蛋白表达的影响 A, B: 不同干预时间 CDX2 蛋白表达; C: CDX2 蛋白相对表达量

3 讨论

实体肿瘤中广泛存在着缺氧微环境, 这主要是由于肿瘤血管结构和功能异常、微循环障碍所致的氧供减少及肿瘤细胞快速增殖氧耗增加所致。HIF-1 是机体细胞适应低氧的主要中介物质。在低氧环境中, 它介导缺氧诱导基因的调控, 使缺氧诱导基因的转录增强, 表达产物增多, 从而产生一系列的生理效应。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 亚单位组成的异源二聚体, 基因分别定位于 14q21-24 和 1q21, 其中 HIF-1 α 是主要的氧调节亚基^[3]。CoCl₂ (100 ~ 250 $\mu\text{mol/L}$) 常用于化学模拟低氧, 通过 Co²⁺ 与 Fe²⁺ 置换使低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的降解受阻, 从而使 HIF-1 α 水平上调^[4]。研究表明, 缺氧及其诱导的遗传及表遗传学变化是肿瘤细胞遗传异质性和遗传不稳定性的重要原因, 并可促使相对良性的细胞群向恶性程度更高、表型更具有恶性、侵袭性的细胞群转变^[5-6]。

Snail 是近年发现的锌指转录因子, 是 E-cad 基因的抑制子。luo 等^[7]发现 Snail 基因启动子区域存在两个 HRE 位点, 从而表明 Snail 是 HIF-1 α 调节的潜在靶基因。Imai 等^[8]体外构建卵巢癌细胞缺氧模型, 发现缺氧可诱导 Snail 基因表达, 进而抑制 E-cadherin 表达, 促进卵巢癌浸润转移。

基于以上结果, Sahlgren C 等^[9]进一步研究缺氧促进 Snail 表达的具体机制, 他们发现缺氧通过 Notch 信号传导通路, 以以下两种方式调节 Snail 表达: 第一, 缺氧直接诱导 Notch 表达, Notch 本身可以和 Snail 启动子区域特异性结合, 从而促进 Snail 表达; 第二, HIF-1 α 可以与赖氨酸氧化酶 (lysyl oxidase, LOX) 启动子区域结合, 上调 LOX 表达, 而 LOX 可以稳定 Snail 蛋白, 使其不被降解。

近年来研究发现, Snail 不仅是 E-cad 的抑制子, 而且其在基因的相互影响下发挥着重要作用, 共同调节着肿瘤的恶性进展, 其中包括 CDX2。CDX2 基因表达的变化和失控对消化道肿瘤的发生和发展起重要作用^[10]。Gross, Tanaka, 等^[2,11]研究认为, CDX2 是结直肠癌的一个高度特异性、敏感性的标志物, 而用 RNA 干涉法抑制 CDX2 表达可增加转移。在移植裸鼠体内 3 个不同部位, 强有力的 CDX2 表达能抑制肿瘤细胞播散。上述结果显示, CDX2 可抑制肿瘤的形成和播散过程, 并推测在此过程中 CDX2 可代表一个新的治疗靶点。Gross 等^[2]研究证实转录因子 Snail 可明显下调 CDX2 的表达, 从而加速结直肠癌的浸润、转移。本实验从体外研究证实, 模拟缺氧可直接导致结肠癌细胞株 SW480, LS174T 的 CDX2 表达下降, 这种改变不仅发生在蛋白水平, 也发生在 mRNA 水平, 进而促进结直肠癌

的恶性进展。笔者还发现模拟缺氧可以明显上调 HIF-1 α 和 Snail mRNA 的表达,进一步证实 HIF-1 α 和 Snail 可能参与此调节过程。

肿瘤的发生、发展是多基因、多步骤参与的过程,既包括遗传学上的改变,还涉及到细胞肿瘤微环境的相互作用,它贯穿于肿瘤细胞浸润和转移过程的始终,是各种信息产生和传导的中心。本实验从体外研究缺氧对 CDX2 基因表达的影响,探讨缺氧调节 CDX2 表达对结肠癌恶性进展影响及其可能机制,为结直肠癌进一步的靶向性生物治疗奠定了一定的实验和理论基础。

参考文献:

- [1] Imai T, Horiuchi A, Wang C, *et al.* Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(4): 1437 - 1447.
- [2] Gross I, Duluc I, Benameur T, *et al.* The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27(1): 107 - 115.
- [3] Huang LE, Bunn HF. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(22): 19575 - 19578.
- [4] Hervouet E, Pecina P, Demont J, *et al.* Inhibition of cytochrome oxidase subunit 4 precursor processing by the hypoxia mimic cobalt chloride [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(4): 1086 - 1093.
- [5] 郭芮伶, 吴国明, 戢福云. 缺氧对人小细胞肺癌 H446 细胞 DNA 错配修复基因 MLH1、MSH2 表达的影响及其机制探讨 [J]. *中国癌症杂志*, 2008, 18(1): 26 - 29.
- [6] Guo M, House MG, Suzuki H, *et al.* Epigenetic silencing of CDX2 is a feature of squamous esophageal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(6): 1219 - 1226.
- [7] Luo DC, Wang JX, Jeff Li, *et al.* Snail is a Target Gene for HIF [J]. *FASEB*, 2007, 21: 814 - 817.
- [8] Imai T, Horiuchi A, Wang C, *et al.* Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(4): 1437 - 1447.
- [9] Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, *et al.* Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(17): 6392 - 6397.
- [10] 方义湖, 来茂德. 结直肠肿瘤的新标记 - CDX2 [J]. *国际遗传学杂志*, 2006, 29(4): 311 - 316.
- [11] Tanaka S, Saito K, Ito T, *et al.* CDX2 as a useful marker of colorectal adenocarcinoma metastases to lung in preoperative biopsy specimens [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(1): 87 - 92.