



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.010  
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3756.shtml

· 基础研究 ·

# CoCl<sub>2</sub> 模拟缺氧环境下肝癌细胞生物钟基因表达的变化

程全胜<sup>1</sup>, 刘平<sup>2</sup>, 刘利平<sup>3</sup>, 赵凤<sup>1</sup>, 杨盛力<sup>2</sup>, 吴超<sup>2</sup>

(1. 新疆建设兵团第五师医院 普通外科, 新疆 博乐 833400; 2. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院 普通外科, 湖北 武汉 430077; 3. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院 肝胆胰外科, 广东 深圳 518020)

## 摘要

目的: 观察氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 模拟缺氧环境下肝癌细胞生物钟基因表达的变化。

方法: 以不同浓度 (0, 50, 100, 200 μmol/L) 的 CoCl<sub>2</sub> 处理肝癌细胞系 Huh7 细胞 24 h 后, 用 Western blot 检测细胞中缺氧诱导因子 1α (HIF-1α) 的蛋白表达, real-time PCR 检测细胞中生物钟基因 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、CKIε 的 mRNA 表达。

结果: Western blot 结果显示, 未处理 Huh7 细胞 (0 μmol/L CoCl<sub>2</sub>) 无 HIF-1α 表达, 而各浓度的 CoCl<sub>2</sub> 处理后, Huh7 细胞出现明显的 HIF-1α 的蛋白表达, 且表达水平随 CoCl<sub>2</sub> 浓度增加而升高。real-time PCR 结果显示, CoCl<sub>2</sub> 处理后的 Huh7 细胞中 BMAL1、Per1、Cry2 的 mRNA 水平明显上调, 而 CLOCK、Cry1、Per2、Per3、CKIε 的 mRNA 水平明显下调, 且均呈 CoCl<sub>2</sub> 浓度依赖性 (均  $P < 0.05$ )。

结论: 缺氧微环境可能是引起肝癌细胞生物钟基因表达异常的原因之一。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(1):48-52]

## 关键词

癌, 肝细胞; 缺氧; 肝癌; 生物钟; 缺氧诱导因子 1, α 亚基  
中图分类号: R735.7

## Expression changes of clock genes in hepatocellular carcinoma cells under CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxic condition

CHENG Quansheng<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>2</sup>, LIU Liping<sup>3</sup>, ZHAO Feng<sup>1</sup>, YANG Shengli<sup>2</sup>, WU Chao<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, the Fifth Agricultural Division Hospital, Bole, Xinjiang 833400, China; 2. Department of General Surgery, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China; 3. Department of Hepatobiliary and Pancreas Surgery, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medical College, Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Corresponding author: YANG Shengli, Email: yangshengli1982@aliyun.com

## ABSTRACT

**Objective:** To observe the expression changes of the clock genes in hepatocellular carcinoma (HCC) cells under cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>)-induced hypoxic condition.

**Methods:** HCC Huh7 cells were exposed to different concentrations (0, 50, 100 and 200 μmol/L) of CoCl<sub>2</sub> for 24 h, and then, the protein expressions of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) in the cells were determined by Western blot analysis and the mRNA expressions of the clock genes that included CLOCK, BMAL1, Per1, Per2,

收稿日期: 2013-07-16; 修订日期: 2013-12-02。

作者简介: 程全胜, 新疆建设兵团第五师医院主治医师, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通信作者: 杨盛力, Email: yangshengli1982@aliyun.com

Per3, Cry1, Cry2 and CKI $\epsilon$  in the cells were detected by real-time PCR method.

**Results:** The results of Western blot showed that there was no visible HIF-1 $\alpha$  protein expression in the Huh7 cells (0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$ ), while the HIF-1 $\alpha$  protein expressions were clearly seen in the Huh cells treated with each concentration of  $\text{CoCl}_2$ , and the expression level was increased with  $\text{CoCl}_2$  concentration. The results of real-time PCR showed that the mRNA levels of BMAL1, Per1 and Cry2 were up-regulated while mRNA levels of CLOCK, Cry1, Per2 and CKI $\epsilon$  mRNA levels were down-regulated significantly after  $\text{CoCl}_2$  treatment, and all presented a  $\text{CoCl}_2$  concentration-dependent manner (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Hypoxia microenvironment may be one of the causes for the abnormal expression of clock genes in HCC cells. [Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(1):48-52]

#### KEYWORDS

Carcinoma, Hepatocellular; Anoxia; Biological Clocks; Hypoxia-Inducible Factor 1, alpha Subunit

**CLC number:** R735.7

生物钟是人类及其他生物为适应周围的环境, 与外界环境 (尤其是日出、日落) 同步而在长期的进化过程中形成的内在节律。人的生物钟在分子水平上由 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、CKI $\epsilon$ 、NPAS2、Rev-Erb $\alpha$  等多个生物钟基因 (clock gene) 精确调控。生物钟基因通过调控其下游的钟控基因 (clock controlled genes, CCG) 将生物钟的节律信号输出, 从而使细胞内的分子活动也呈现出时间节律<sup>[1-3]</sup>。

大量流行病学研究发现昼夜节律的紊乱与乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌的发生有着一定的关联。上夜班及轮班工作的女性患乳腺癌、卵巢癌的风险和男性患前列腺癌的风险大大增加<sup>[4-7]</sup>。进一步研究发现生物钟基因可以调控癌基因、抑癌基因、细胞周期蛋白、血管内皮生长因子等多种同肿瘤发生、发展密切相关的基因的表达。同时研究还发现在肝癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌等多种肿瘤中普遍存在生物钟基因的表达异常, 且 Per1、Per3 等基因的表达与肿瘤的发展及预后密切相关。因此生物钟紊乱很可能是这些肿瘤发生、发展的又一原因<sup>[8-13]</sup>。

目前肝癌及其他肿瘤中生物钟基因表达异常的原因尚不清楚, 笔者的前期研究<sup>[14]</sup>显示乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 可能是其原因之一。肝癌等实体瘤普遍处于缺氧状态<sup>[15-16]</sup>, 是否缺氧微环境也可引起生物钟基因的异常表达尚不清楚, 故本研究在氯化钴 ( $\text{CoCl}_2$ ) 诱导的化学缺氧模型上观察缺氧微环境对生物钟基因表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体和鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司;  $\text{CoCl}_2$  购于 Sigma 公司; 胎牛血清购于 Hyclone 司; PCR 引物由 Invitrogen 公司合成; 人肝癌细胞系 Huh7 细胞 (购自中国典型物种保藏中心)。

### 1.2 蛋白印迹法检测不同浓度的 $\text{CoCl}_2$ 处理后 Huh7 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达

将 Huh7 细胞种于六孔板中, 待细胞长至 75% 融合时分别加入 0、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{CoCl}_2$ , 作用 24 h, 收集细胞, 用三去污裂解液提取细胞总蛋白, 所得总蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳转移至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h, 加入鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体 (1:500), 鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (1:2 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。洗膜 3 次后, 加入 HRP 标记的兔抗鼠二抗, 浓度 1:2 000, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后, 洗脱二抗。用化学发光法 (ECL) 显色, X 线片曝光。

### 1.3 real-time PCR 技术检测不同浓度的 $\text{CoCl}_2$ 处理后 Huh7 细胞中 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、CKI $\epsilon$ mRNA 的表达

将 Huh7 细胞种于六孔板中, 待细胞长至 75% 融合时分别加入 0、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{CoCl}_2$ , 作用 24 h, 收集细胞, 提取细胞总 RNA, 测 RNA 的浓度和纯度, 取相同量的 mRNA 逆转录为 cDNA, 每组 cDNA 均以基因引物加荧

光染料复合物 sybrGreen Mix (2×) 进行定量 PCR 反应, 每个反应做 3 个复孔。经预实验, 将逆转录的 cDNA 稀释 5 倍为模板。总反应体系为 25 μL: sybrGreen Mix 12.5 μL, cDNA 模板 2 μL, 10 μmol/L 上游引物和 10 μM 下游引物

各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。反应条件: 94 °C 变性 1 min, 40 次循环内 94 °C 变性 60 s、58 °C 退火 60 s、72 °C 延伸 60 s, 72 °C 再延伸 10 min。重复 3 次。所用引物见表 1。

表 1 real-time PCR 引物  
Table 1 Primer for real-time PCR

基因	引物	温度 (°C)	产物大小
Per1	5'-AGG CAA CGG CAA GGA CTC-3'	60.2	101
	5'-GGC TGT AGG CAA TGG AAC TG-3'		
Per2	5'-CTA CAG CAG CAC CAT CGT C-3'	58.9	78
	5'-CCA CTC GCA GCA TCT TCC-3'		
Per3	5'-TGG TGG TGG TGA ATG TAA GAC-3'	57.2	104
	5'-GGC TGT GCT CAT CGT TCC-3'		
Cry1	5'-CAA CCT CCA TTC ATC TTT CC-3'	58.9	151
	5'-CTC ATA GCC GAC ACC TTC-3'		
Cry2	5'-TGG GCT TCT GGG ACT GAG-3'	57.2	136
	5'-GGT AGG TGT GCT GTC TTA GG-3'		
Clock	5'-GCA GCA GCA GCA GCA GAG-3'	61.9	149
	5'-CAG CAG AGA GAA TGA GTT GA GTT G-3'		
BMAL1	5'-TGC CAC CAA TCC ATA CAC AGA AG-3'	60.9	123
	5'-TTC CCT CGG TCA CAT CCT ACG-3'		
CKI ε	5'-TCA GCG AGA AGA AGA TGT C-3'	58.9	149
	5'-GAA GAG GTT GCG GAA GAG-3'		
β-actin	5'-AGT TGC GTT ACA CCC TTT CTT GAC-3'	60	171
	5'-GCT CGC TCC AAC CGA CTGC-3'		

#### 1.4 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 13.0 统计分析软件, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间的两两比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 处理后 Huh7 细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达

Western blot 结果显示, 在无 CoCl<sub>2</sub> 诱导时, 未见 HIF-1 α 表达; 在 50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L 浓度之间, HIF-1 α 的蛋白水平随着 CoCl<sub>2</sub> 浓度的增加而升高, 呈浓度依赖性 (图 1)。

### 2.2 不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 处理后 Huh7 细胞中 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、CKI ε mRNA 的表达

real-time PCR 结果显示, CoCl<sub>2</sub> 处理后,

BMAL1, Per1 和 Cry2 的 mRNA 水平随着 CoCl<sub>2</sub> 浓度的增加而升高, 呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ); CLOCK, Cry1, Per2, Per3 和 CKI ε mRNA 水平随着 CoCl<sub>2</sub> 浓度的增加而降低, 亦呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

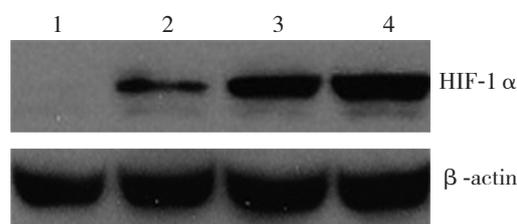


图 1 Western blot 检测不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 处理后 Huh7 细胞 HIF-1 α 蛋白表达 1-4: 0, 50, 100, 200 μmol/L CoCl<sub>2</sub>

Figure 1 Western blot analysis for HIF-1α protein expression in Huh7 cells exposed to different concentration of CoCl<sub>2</sub> 1-4: 0, 50, 100 and 200 μmol/L CoCl<sub>2</sub>

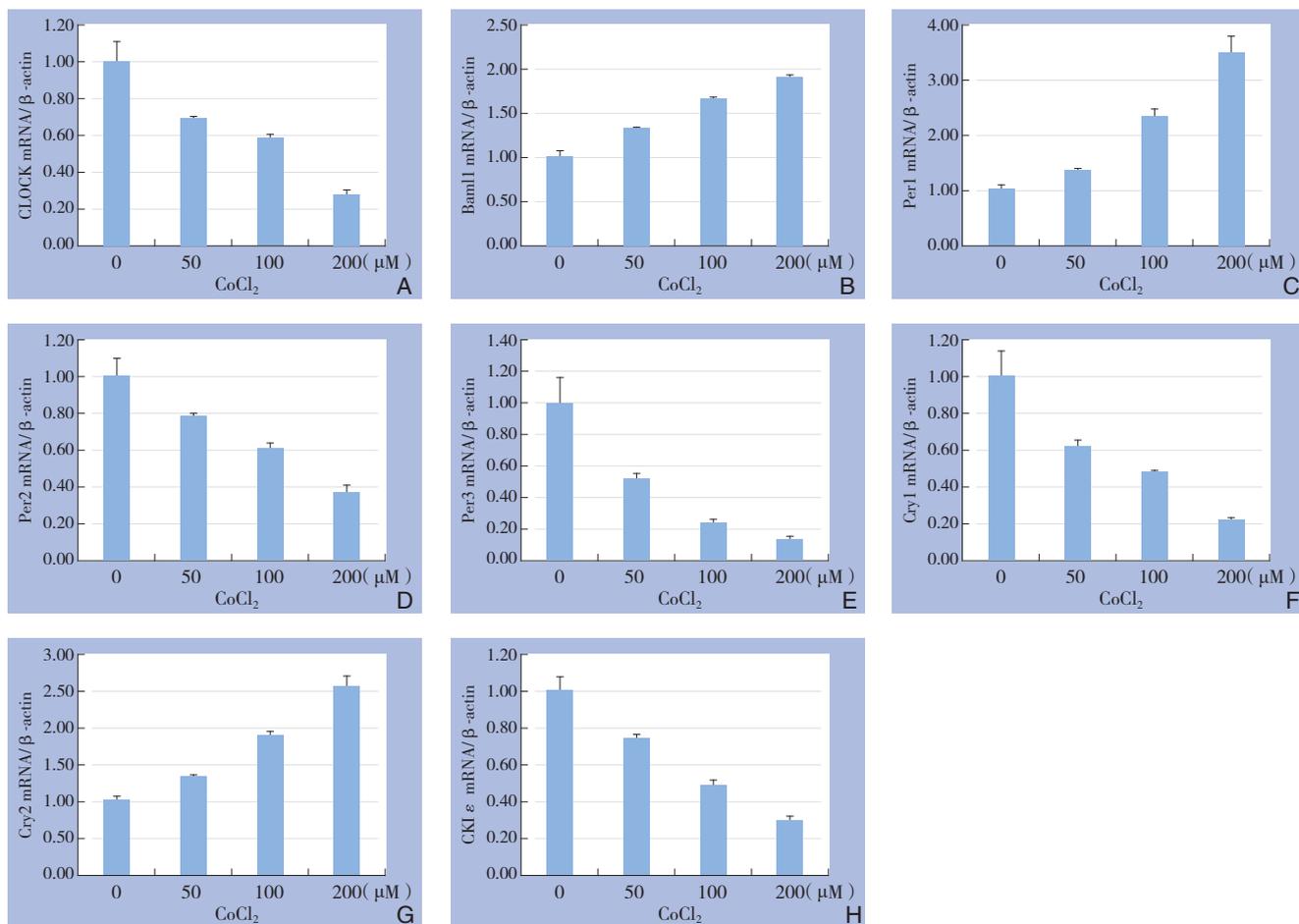


图 2 real-time PCR 检测不同浓度的  $\text{CoCl}_2$  处理后 Huh7 细胞各生物钟基因 mRNA 的表达 A: CLOCK; B: BMAL1; C: Per1; D: Per2; E: Per3; F: Cry1; G: Cry2; H: CKIε

Figure 2 Real-time PCR detection for the mRNA expressions of the clock genes A: CLOCK; B: BMAL1; C: Per1; D: Per2; E: Per3; F: Cry1; G: Cry2; h: CKIε

### 3 讨论

生物钟是人体内容观存在的生物节律, 在人体体温、呼吸、睡眠、进食、血压、血糖、内分泌等诸多稳态中发挥着关键作用。最近研究<sup>[1]</sup>发现其与肿瘤的发生、发展也存在着一定的关系。Filipski 等<sup>[17]</sup>研究发现生物钟紊乱后小鼠肝癌的发展速度增快。生物钟是由细胞内的多个生物钟基因精密调控的。其中 Per1、Per2、Per3 除了参与生物钟的调控外, 还能抑制肿瘤细胞的生长和增殖, 诱导细胞凋亡, 被认为是潜在的抑癌基因<sup>[18-19]</sup>。肿瘤组织中普遍存在生物钟基因的表达异常。Lin 等<sup>[8]</sup>研究发现肝癌组织中 Per1、Per2、Per3 和 Cry2 的表达下调。

目前虽然发现生物钟基因同肝癌及其他肿

瘤的发生、发展关系密切, 但是引起生物钟基因表达异常的原因尚不清楚。本研究发现肝癌细胞在  $\text{CoCl}_2$  模拟的缺氧环境下生物钟基因的表达均发生了改变: Bmal、Per1、Cry2 的表达上调, CLOCK、Cry1、Per2、Per3、CKIε 的表达下调。 $\text{CoCl}_2$  可以占据 HIF-1α 同 VHL 泛素-蛋白酶复合体的结合位点, 从而竞争性抑制 HIF-1α 与 VHL 泛素-蛋白酶复合体结合, 使 HIF-1α 不被降解从而增加了细胞内 HIF-1α 蛋白的表达, 因而可以用来模拟细胞缺氧状态<sup>[20-21]</sup>。本研究也证实了加入  $\text{CoCl}_2$  作用 24 h 后肝癌细胞中 HIF-1α 蛋白水平增加, 呈浓度依赖性。在模拟的缺氧条件下 Per2, Per3 的变化趋势同其在肝癌组织中的表达状态相一致, 而 Per1、Cry2 的变化趋势则同其在肝癌组织中的表达状态相反, 说明肝癌组织中生

物钟基因表达异常是由多因素引起的,如笔者前期研究发现 HBx 也可以改变肝细胞中生物钟基因的表达。

本研究虽然发现缺氧可以引起生物钟基因表达的变化的现象,但存在着几点不足:(1)只在 mRNA 水平上进行了检测,仍需在蛋白水平上进一步加以验证;(2)CoCl<sub>2</sub> 模拟的缺氧环境为化学缺氧,可能同物理缺氧有所不同,所以仍需在物理缺氧条件下进一步验证;(3)缺氧引起生物钟基因表达改变的机制还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 王正荣. 时间生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2008:142-164.
- [2] 吴超, 杨盛力, 赵志辉. 生物钟基因 NPAS2 的研究进展 [J]. 山东医药, 2013, 53(31):91-94.
- [3] 吴超, 张金玲, 杨盛力, 等. 孤儿核受体 Rev-Erb $\alpha$  功能与表达调控研究进展 [J]. 山东医药, 2013, 53(30):98-101.
- [4] Menegaux F, Truong T, Anger A, et al. Night work and breast cancer: a population-based case-control study in France (the CECILE study)[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(4):924-931.
- [5] Bhatti P, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, et al. Nightshift work and risk of ovarian cancer[J]. *Occup Environ Med*, 2013, 70(4):231-237.
- [6] Parent M $\acute{E}$ , El-Zein M, Rousseau MC, et al. Night work and the risk of cancer among men[J]. *Am J Epidemiol*, 2012, doi: 10.1093/aje/kws318
- [7] Savvidis C, Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology[J]. *Mol Med*, 2012, 18:1249-1260.
- [8] Lin YM, Chang JH, Yeh KT, et al. Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(12):925-933.
- [9] Dai H, Zhang L, Cao M, et al. The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 127(2):531-540.
- [10] Krugluger W, Brandstaetter A, K $\acute{u}$ llay E, et al. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: reduced period-1 and dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16):7917-7922.
- [11] Mazzocchi G, Panza A, Valvano MR, et al. Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients[J]. *Chronobiol Int*, 2011, 28(10):841-851.
- [12] Oshima T, Takenoshita S, Akaike M, et al. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25 (5):1439-1446.
- [13] Relles D, Sendeki J, Chipitsyna G, et al. Circadian gene expression and clinicopathologic correlates in pancreatic cancer[J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(3):443-450.
- [14] 杨盛力, 潘晓莉, 熊枝繁, 等. 乙肝病毒 X 蛋白对肝细胞生物钟基因的影响及其意义 [J]. 中德临床肿瘤学杂志: 英文版, 2011,10(8):468-471.
- [15] 金炜东, 马丹丹, 蔡逊, 等. 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  在肝癌细胞上皮-间充质化中的作用 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(7):885-889.
- [16] 何前进, 刘利平, 岑红兵, 等. 缺氧诱导因子与肝癌关系的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(20):299-301.
- [17] Filipski E, Subramanian P, Carri $\grave{e}$ re J, et al. Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice[J]. *Mutat Res*, 2009, 680(1/2):95-105.
- [18] Yang X, Wood PA, Ansell CM, et al. The circadian clock gene Per1 suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day[J]. *Chronobiol Int*, 2009, 26(7):1323-1339.
- [19] Hwang-Verslues WW, Chang PH, Jeng YM, et al. Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(30):12331-12336.
- [20] 杨盛力, 张万广, 陈孝平, 等. 缺氧诱导因子 -1 与缺氧诱导因子 -2 同肿瘤关系的比较 [J]. 肝胆外科杂志, 2007, 15(6):471-474.
- [21] 郑见宝, 孙学军, 王炜, 等. 缺氧下调结肠癌细胞株 CDX2 表达的研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(4):364-368.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 程全胜, 刘平, 刘利平, 等. CoCl<sub>2</sub> 模拟缺氧环境下肝癌细胞生物钟基因表达的变化 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1):48-52. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.010

Cite this article as: CHENG QS, LIU P, LIU LP, et al. Expression changes of clock genes in hepatocellular carcinoma cells under CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxic condition[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(1):48-52. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.010