

缺氧对人肝癌细胞 MHCC-97L 迁移的影响

张万秋¹, 朱一超^{2*}

(¹泰州职业技术学院, 江苏 泰州 225300; ²南京医科大学生理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究缺氧对人肝癌细胞 MHCC-97L 迁移的影响,并初步揭示其分子机制。方法:建立划痕实验检测缺氧条件下人肝癌细胞 MHCC-97L 迁移能力变化的可靠模型,研究 Wnt5a 对 MHCC-97L 细胞迁移的调控。结果:缺氧使 MHCC-97L 细胞缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)和 Wnt5a mRNA 表达上调,并可促进 MHCC-97L 细胞迁移能力显著增强,干扰 HIF-1 α 表达的 MHCC-97L 细胞在缺氧条件下 Wnt5a mRNA 表达显著降低,干扰 Wnt5a 表达的 MHCC-97L 细胞在缺氧环境中的迁移能力则明显降低。结论:在缺氧条件下 MHCC-97L 细胞迁移能力可发生明显改变,HIF-1 α 和 Wnt5a 调控其迁移过程。这些结果为深入阐明肝癌细胞转移和侵袭分子调控机制提供了新的实验线索。

[关键词] 缺氧; MHCC-97L; 肝癌细胞; 迁移; Wnt5a

[中图分类号] R73-37

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1522-05

Hypoxia induces the migration of MHCC-97L hepatic carcinoma cells

ZHANG Wan-qiu¹, ZHU Yi-chao^{2*}

(¹Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; ²Department of Physiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the function of hypoxia, and investigate the underlying mechanisms whereby hepatic carcinoma cell migration is regulated. **Methods:** Under hypoxia microenvironment, the migration of MHCC-97L hepatic carcinoma cells were detected using wound healing assay. Then we analyzed the migration of MHCC-97L cells after blocking Wnt5a expression using siRNA. **Results:** The mRNA transcription of HIF-1 α and Wnt5a in MHCC-97L cells were upregulated under hypoxia microenvironment. HIF-1 α siRNA suppressed the mRNA transcription of Wnt5a in MHCC-97L cells under hypoxia microenvironment. Wnt5a siRNA were capable of retarding hypoxia-induced MHCC-97L cell migration. **Conclusion:** It is demonstrated that hypoxia promotes MHCC-97L cell migration via HIF-1 α and Wnt5a signaling. These findings could provide a rationale for designing novel therapy based on inhibition of hepatic carcinoma metastasis.

[Key words] hypoxia; MHCC-97L; hepatic carcinoma cell; migration; Wnt5a

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1522-1526]

肝癌为我国常见恶性肿瘤之一,其病死率仅次于胃癌和食管癌居消化系统恶性肿瘤第3位。我国肝癌发病人数占全球的55%,而病死人数约占全世界肝癌病死人数的45%^[1]。侵袭和转移是恶性肿瘤最基本的生物学特性之一,同时也是恶性肿瘤威胁患者健康乃至生命的主要原因。

在恶性肿瘤的发生和发展中,肿瘤细胞与周围正常细胞或细胞外基质有着广泛而密切的联系^[2],这构成了肿瘤微环境,肿瘤微环境在肿瘤的发生和

发展中起着举足轻重的作用。绝大多数实体肿瘤内存在缺氧微环境^[2]。肝癌的发生和发展过程中也存在缺氧现象,但缺氧在肝癌转移中的确切机制尚不清楚。据此,本研究观察了人肝癌细胞 MHCC-97L 在缺氧条件下迁移能力的变化,并初步探讨其可能的分子机制,进而为深入研究肝癌转移的确切机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞 MHCC-97L 系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81101999)

*通讯作者, E-mail: zhuyichao@njmu.edu.cn

兔抗 Wnt5a 单克隆抗体、兔抗缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), 鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (美国 Sigma 公司), 羊抗鼠和羊抗兔 IgG-HRP (美国 Santa Cruz 公司), ECL 发光试剂盒 (美国 Pierce 公司), TRIzol (美国 Invitrogen 公司), Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (北京天根公司), Taq 酶 (大连宝生物公司), siRNA-Wnt5a、siRNA-HIF-1 α (美国 Santa Cruz 公司), 转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司)。光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司), 电泳仪、转膜仪、PCR 仪和成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MHCC-97L 细胞使用添加 10% (V/V) 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 5% CO₂、常氧 (20% O₂) 或缺氧 (1% O₂)、饱和湿度的细胞培养箱中 37℃ 培养。

1.2.2 蛋白提取和 Western blot 实验

用蛋白裂解液 (pH7.4, 1% SDS, 100 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 正钒酸钠, 混合蛋白酶抑制剂) 裂解 MHCC-97L 细胞, 提取总蛋白, BCA 比色法测定蛋白浓度。取相同量总蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 250 mA 湿转 120 min, 将蛋白转印到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入抗 Wnt5a 抗体 (1:1 000) 或抗 HIF-1 α 抗体 (1:500) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜, 羊抗鼠或羊抗兔 IgG-HRP (1:2 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 加入 ECL 液孵育 5 min 后, 利用凝胶电泳成像系统进行读片分析^[3]。

1.2.3 RT-PCR 实验

用 TRIzol 分别裂解 MHCC-97L 细胞, 提取总 RNA, 利用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA。以 MHCC-97L 细胞 cDNA 为模板, 以 Wnt5a 特异性引物 (上游: 5'-CTTCGCCAGGTTGTAATFGA-AGC-3', 下游: 5'-CTGCCAAAACAGAGGTGTTATCC-3') 和 GAPDH 特异性引物 (上游: 5'-TGAACGG-GAAGCTCACTGG-3', 下游: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3') 为 PCR 引物, 行 RT-PCR, PCR 程序如下: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 40 s, 运行 26 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 利用紫外凝胶成像系统进行分析。

1.2.4 划痕实验

将 1 × 10⁵ 个 MHCC-97L 细胞接种于 96 孔板, 常规培养至细胞单层完全融合, 无血清 DMEM 高糖培养基中饥饿过夜, 用移液器吸头沿培养板底部作一“一”字形划痕, 倒置显微镜下拍照并确定划痕边缘区域后, 分别置于常氧或缺氧的细胞培养箱中培养 12 h 后, 倒置显微镜观察并确定划痕边缘, 计算处理前后划痕边缘相对距离的差值, 以确定细胞迁移能力的改变。

1.2.5 RNA 干扰实验

将细胞以 5 × 10⁵ 个/孔接种至含 DMEM 培养基的 6 孔板中, 置于 37℃ 常氧细胞培养箱中培养。待细胞生长融合度约 50% 时, 按转染试剂说明书进行 siRNA 转染。将 siRNA-Lipofectamine 2000 混合物逐滴加入细胞培养板中并混匀; 将培养板置于 37℃ 常氧细胞培养箱中培养; 6 h 后, 将培养液更换成含血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析, 采用 *t*-test 法分析, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。每组实验独立重复 3 次或以上。

2 结果

2.1 缺氧促进 MHCC-97L 细胞的迁移

缺氧微环境可引起细胞中 HIF-1 α 表达上调^[4]。本实验通过 Western blot 检测缺氧和常氧条件下培养 2 h 的 MHCC-97L 细胞 HIF-1 α 的表达, 以确定本实验系统的可靠性。结果发现, 缺氧 2 h 的 MHCC-97L 细胞中 HIF-1 α 的表达量明显高于常氧条件下的表达量 (图 1)。该结果表明, 本研究所采用的缺氧培养实验体系可靠。

在此基础上, 用经典的划痕实验检测缺氧对 MHCC-97L 人肝癌细胞迁移的影响。结果发现, 在缺氧条件下培养的 MHCC-97L 细胞的迁移速率约为常氧条件下的 1.85 倍 (图 2)。该结果清楚地表明, 缺氧诱导的 MHCC-97L 细胞迁移加快。

2.2 缺氧诱导 MHCC-97L 细胞 Wnt5a mRNA 表达增加

有研究表明, 缺氧可诱导细胞核内多种因子表达的改变^[4]。RT-PCR 观察缺氧条件下培养 2 h 的 MHCC-97L 细胞 Wnt5a mRNA 表达的改变。结果发现, 缺氧 2 h 的 MHCC-97L 细胞中 Wnt5a mRNA 的表达量明显高于其常氧培养条件下的表达量 (图 3)。该结果表明, 缺氧可诱导 MHCC-97L 细胞 Wnt5a

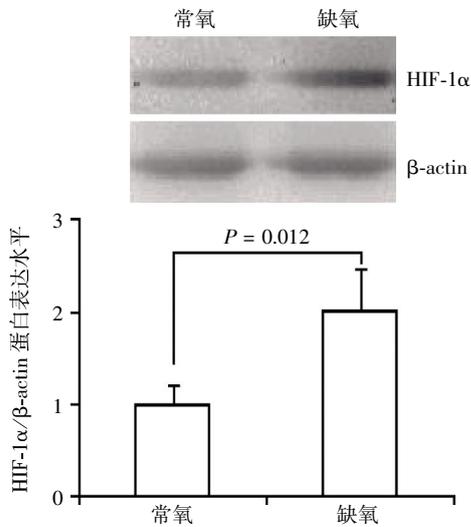


图 1 Western blot 检测缺氧诱导 MHCC-97L 细胞中 HIF-1α 表达增加 (n = 3)

Figure 1 Hypoxia induced the increase of HIF-1α expression in MHCC-97L cells detected by Western blot (n = 3)

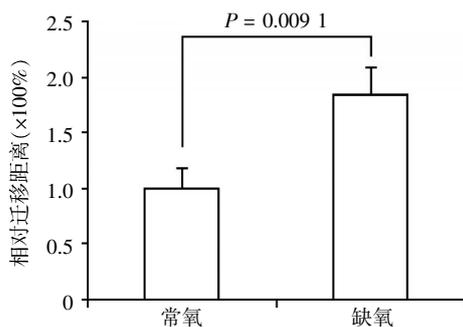


图 2 缺氧促进 MHCC-97L 细胞的迁移 (n = 5)

Figure 2 Hypoxia induced the migration of MHCC-97L cells (n = 5)

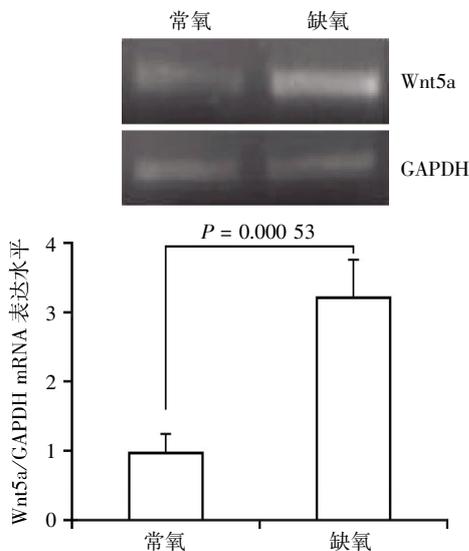


图 3 RT-PCR 检测缺氧诱导 MHCC-97L 人肝癌细胞中 Wnt5a mRNA 表达增加 (n = 3)

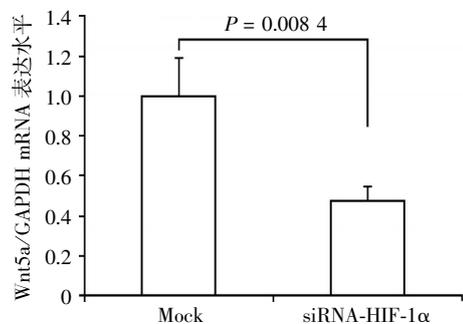
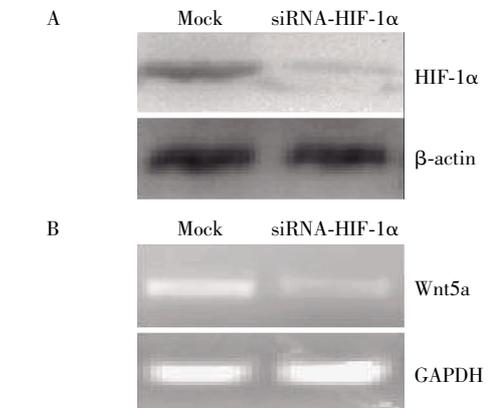
Figure 3 Hypoxia induced the increase of Wnt5a mRNA transcription in MHCC-97 cells detected by RT-PCR (n = 3)

mRNA 的转录增强。

为了进一步研究 HIF-1α 和 Wnt5a mRNA 表达之间的关系,我们利用 siRNA 干扰 HIF-1α 的表达后,检测缺氧条件下 MHCC-97L 细胞 Wnt5a mRNA 表达的改变。结果发现,siRNA-HIF-1α 可有效下调缺氧条件下 MHCC-97L 细胞中 HIF-1α 的表达 (图 4A),干扰 HIF-1α 表达的 MHCC-97L 细胞在缺氧条件下 Wnt5a mRNA 表达显著降低 (图 4B)。这些结果充分表明,缺氧诱导的 MHCC-97L 细胞 Wnt5a mRNA 表达量的变化依赖于 HIF-1α。

2.3 干扰 Wnt5a 的表达可抑制缺氧诱导的 MHCC-97L 细胞的迁移

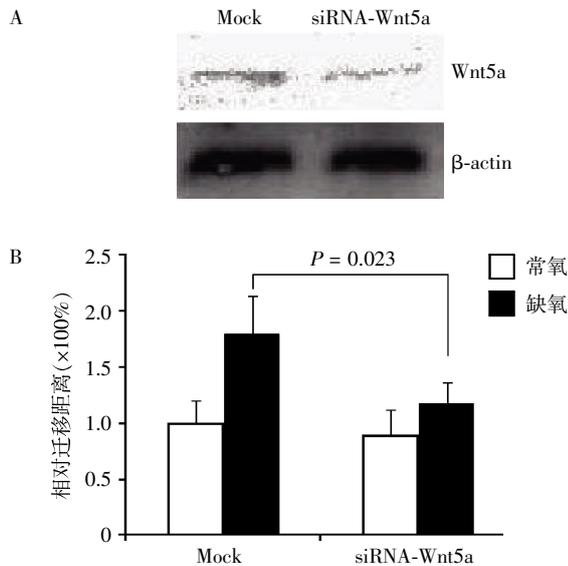
为了进一步确定 Wnt5a 在缺氧诱导的 MHCC-97L 人肝癌细胞迁移过程中的作用,我们利用 siRNA 干扰 Wnt5a 的表达后,检测人肝癌细胞 MHCC-97L 迁移能力的改变。结果发现,siRNA-Wnt5a 可有效下调 MHCC-97L 细胞中 Wnt5a 的表达 (图 5A),干扰 Wnt5a 表达的 MHCC-97L 细胞在缺氧条件下的迁移能力显著降低 (图 5B)。这些结果充分表明,缺氧诱导的 MHCC-97L 细胞的迁移依赖于 Wnt5a 的高表达。



Mock: 阴性对照; siRNA-HIF-1α: HIF-1α 干扰组。A: HIF-1α 干扰效率的检测; B、C: Wnt5a mRNA 表达量的检测 (n = 3)。

图 4 干扰 HIF-1α 的表达抑制缺氧诱导的 MHCC-97L 人肝癌细胞 Wnt5a 的表达

Figure 4 Blocking of HIF-1α suppressed the Wnt5a transcription of MHCC-97L cells under hypoxia



Mock:阴性对照组;siRNA-Wnt5a;Wnt5a 干扰组。A:Wnt5a 干扰效率的检测;B:MHCC-97L 细胞迁移能力的检测($n = 5$)。

图 5 干扰 Wnt5a 的表达抑制缺氧诱导的 MHCC-97L 细胞的迁移

Figure 5 Blocking of Wnt5a suppressed the migration of MHCC-97L cells under hypoxia

3 讨论

肝癌是我国常见的消化道肿瘤之一,肝癌的复发和转移是其难以治愈的重要原因之一。肝癌细胞的转移和其他恶性肿瘤细胞的转移类似,是个多步骤的过程。虽然,已有的研究使人们对于恶性肿瘤细胞转移的机制有了一定了解^[5-6],然而由于恶性肿瘤细胞转移机制十分复杂,其确切的分子机制仍未阐明,因此,为了对恶性肿瘤细胞转移的分子机制有一个完整的了解,更多更深入的研究显得十分迫切。

缺氧是一种重要的病理状态,与肿瘤微环境的形成密切相关,90%的实体瘤中存在缺氧^[7]。HIF-1 是调控缺氧反应基因的主要转录因子,它调控着下游 100 多种基因转录^[2]。HIF-1 由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 异源二聚转录因子组成。HIF-1 β 在常氧或缺氧状态下均稳定存在于细胞中,但是 HIF-1 α 在氧正常时迅速被蛋白酶降解,在缺氧时其半衰期显著延长,从而与 HIF-1 β 结合形成一个完整的 HIF-1 转录因子。大多数肿瘤中存在 HIF-1 α ,如胃癌、膀胱癌、神经胶质瘤、乳腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等^[8-9]。因此,HIF-1 α 表达的改变可以作为肿瘤局部是否发生缺氧的标志。本研究发现缺氧促使人肝癌细胞 MHCC-97L 的 HIF-1 α 表达上调,同时促进肿瘤细胞的迁移。由此可见,肝癌细胞中转录因子 HIF-1 α 表达的改变和迁移能力密切相关。

Wnt5a 是非经典 Wnt 信号通路中重要的一员,它参与调控多种组织或器官的细胞骨架重构或细胞极化过程^[10-11]。在肿瘤学研究过程中发现,Wnt5a 大量表达能够加剧乳腺癌、黑色素瘤和胃癌的恶性程度^[3,12-14],相反的研究有,在结直肠癌和甲状腺癌中,Wnt5a 起了抑癌基因的作用^[15-16]。因此,Wnt5a 在肿瘤发生和发展中的作用尚存在争议。本研究发现缺氧促使 MHCC-97L 细胞中 Wnt5a 表达明显增加,干扰 Wnt5a 表达的肝癌细胞在缺氧条件下的迁移能力显著降低。这些结果清楚说明,Wnt5a 可促进缺氧条件下肝癌细胞的迁移。Wnt5a 在肿瘤发生和发展中作用结果不一致,是对不同恶性肿瘤细胞系的研究获得的,实验体系不一样可能是获得差异结果的原因之一,同时也说明了 Wnt5a 作用机制的复杂性。此外,我们进一步的研究发现,干扰 HIF-1 α 表达的 MHCC-97L 细胞在缺氧条件下 Wnt5a mRNA 表达显著降低。该结果暗示,缺氧诱导的 MHCC-97L 细胞 Wnt5a mRNA 表达量的变化依赖于 HIF-1 α ,而 HIF-1 α 调控 Wnt5a mRNA 表达的确切分子机制需进一步研究。

综上所述,本研究观察了 MHCC-97L 细胞在缺氧条件下迁移能力的变化,并发现 Wnt5a 调控缺氧条件下肝癌细胞的迁移过程。这些结果为进一步研究缺氧微环境和 Wnt5a 信号通路在肝癌细胞迁移过程中的调控机制提供了新的实验线索。

[参考文献]

- [1] 龚新雷,秦叔逵. 原发性肝癌的分子靶向治疗研究新进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2008,13(1):1-9
- [2] Keith B,Johnson RS,Simon MC. HIF1 α and HIF2 α :sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression [J]. Nat Rev Cancer,2011,12(1):9-22
- [3] Zhu Y,Tian Y,Du J,et al. Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer cell migration [J]. PLoS One,2012,7(5):e37823
- [4] Chaika NV,Gebregiorgis T,Lewallen ME,et al. MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2012,109(34):13787-13792
- [5] Noguti J,De Moura CF,De Jesus GP,et al. Metastasis from oral cancer:an overview[J]. Cancer Genomics Proteomics,2012,9(5):329-335
- [6] Gay LJ,Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis [J]. Nature Rev Cancer,2011,11(2):123-134
- [7] Semino B,McDonald DM. Controlling escape from angiogenesis inhibitors [J]. Nat Rev Cancer,2012,12(10):

- 699-709
- [8] Wilczynski J, Duechler M, Czyz M, et al. Targeting NF- κ B and HIF-1 pathways for the treatment of cancer: Part I [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011, 59(4): 289-299
- [9] Du J, Xu R, Hu Z, et al. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25213
- [10] Xiong WJ, Hu LJ, Jian YC, et al. Wnt5a participates in hepatic stellate cell activation observed by gene expression profile and functional assays [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(15): 1745-1752
- [11] Yang GY, Liang B, Zhu J, et al. Calpain activation by Wingless-type murine mammary tumor virus integration site family, member 5A (Wnt5a) promotes axonal growth [J]. J Biol Chem, 2011, 286(8): 6566-6576
- [12] Camilli TC, Xu M, O'Connell MP, et al. Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2011, 24(1): 175-186
- [13] Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma [J]. Cancer Cell, 2002, 1(3): 279-288
- [14] Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion [J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10439-10448
- [15] Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, et al. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma [J]. Oncogene, 2005, 24(13): 2144-2154
- [16] Dejmek J, Dejmek A, Safholm A, et al. Wnt-5a protein expression in primary duodenal B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis [J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9142-9146

[收稿日期] 2012-06-11

(上接第 1504 页)

- vated protein kinases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(8): 977-985
- [26] Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress [J]. Circ Res, 2000, 87(9): 789-796
- [27] Liao DF, Jin ZG, Baas AS, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(1): 189-196
- [28] Ganster F, Burban M, de la Bourdonnaye M, et al. Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats [J]. Crit Care, 2010, 14(5): 165
- [29] Calvert JW, Jha S, Gundewar S, et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling [J]. Circ Res, 2009, 105(4): 365-374
- [30] Lu M, Zhao FF, Tang JJ, et al. The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP-sensitive potassium channels [J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17(6): 849-859
- [31] Fridovich I. Superoxide dismutases, an adaptation to a paramagenetic gas [J]. J Biol Chem, 1989, 264(14): 7761-7764
- [32] Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory disease [J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(5): 287-296

[收稿日期] 2012-08-20