

## 缺氧与肿瘤恶性演进的关系及其机制探讨\*

杨庆强<sup>1</sup>, 唐春燕<sup>2</sup>

(1. 泸州医学院附属医院普外科, 四川泸州 646000; 2. 泸州医学院护理学院卫校, 四川泸州 646000)

**[摘要]** **目的** 观察 HT-29 细胞在低氧下分泌的基质金属蛋白酶 2/9(MMP-2/9)活性,检测 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达,初步探讨低氧与肿瘤恶性演进的关系。**方法** 参照体内肿瘤的氧分压,建立低氧模型。将 HT-29 细胞低氧处理不同时段,明胶酶谱分析检测其分泌的 MMP-2/9 活性变化;提取细胞核蛋白,Western blot 测定胞核内 NF- $\kappa$ B 的表达。**结果** 低氧 12 h,HT-29 细胞分泌的 MMP-2/9 活性逐渐上调,24 h 达顶峰。在低氧的诱导下,HT-29 细胞核内 NF- $\kappa$ B 的表达趋势与 MMP-2/9 活性变化趋势基本一致。**结论** 低氧能诱导 HT-29 细胞分泌高活性的 MMP-2/9 而促进其向恶性演进,可能与细胞核内 NF- $\kappa$ B 的表达上调有关。

**[关键词]** 缺氧;肿瘤;NF- $\kappa$ B;MMP-2/9**[中图分类号]** R730.23**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)16-2174-03

## Investigation of correlation and mechanism between moderate hypoxia and tumor malignant transformation\*

Yang Qingqiang<sup>1</sup>, Tang Chunyan<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Nursing Institute of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the correlation between moderate hypoxia and tumor invasiveness in colon carcinoma cell line HT-29 and detect the expression of NF- $\kappa$ B protein in nucleus and activities of MMP-2/9, so as to explore its latent mechanism of malignant transformation. **Methods** The moderate hypoxia model was established according to the pressure of O<sub>2</sub> of tumor in vivo. After different period in moderate hypoxia, activities of MMP-2/9 secreted by HT-29 cells were measured by gelatin zymography, NF- $\kappa$ B levels in nucleus were assessed by Western blot after extraction of nucleic protein. **Results** MMP-2/9 activities under moderate hypoxia gradually up-regulated in 12 h and reached the peak at 24 h. The expression of NF- $\kappa$ B protein in nucleus was similar to that of MMP-2/9. **Conclusion** Moderate hypoxia could induce malignant phenotype in HT-29 cells through up-regulating MMP-2/9 activities, in which NF- $\kappa$ B may involve in this progression.

**[Key words]** anoxia; neoplasms; NF- $\kappa$ B; MMP-2/9

绝大多数实体肿瘤中存在低氧微环境,氧分压为 0~20 mm Hg,而正常组织则在 40 mm Hg 以上<sup>[1]</sup>。低氧微环境与肿瘤的恶性进展、放化疗的耐受性及预后不良密切相关<sup>[2-3]</sup>。本实验观察低氧下 HT-29 细胞分泌的基质金属蛋白酶 2/9(MMP-2/9)活性,并检测细胞核内 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达,初步探讨低氧与肿瘤恶性转化的关系。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 人结肠癌细胞株 HT-29 由泸州医学院附属医院中心实验室提供;细胞核蛋白/细胞质蛋白抽提试剂盒(百泰克公司);兔抗人 NF- $\kappa$ B 多克隆抗体(Neomarkers 公司);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥公司);明胶(Sigma 公司);RPMI-1640(Hyclone 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);4.8% O<sub>2</sub>、90.2% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 三元混合气体;低氧培养装置。

**1.2 细胞培养** 以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 HT-29 细胞。分为对照组和低氧组。对照组置于普通氧下的 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养;低氧条件参照文献<sup>[1,4]</sup>,在前期的研究中发现持续灌注低流量(4.8%)的 O<sub>2</sub>,培养液氧分压(PO<sub>2</sub>)恒定于 20 mm Hg(参照体内肿瘤的氧分压水平)。将低氧培养装置置于 37℃ 恒温水浴箱内,真空泵抽尽前者的空气,从入气口灌入含 4.8% O<sub>2</sub>、90.2% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混

合气体(3.0 L/min),并打开出气口阀门,20 min 后减少混合气流量至 0.1 L/min,以维持低氧状态,低氧组 HT-29 细胞置于该低氧装置内培养。

**1.3 提取细胞核蛋白及 Western blot 分析** 分别低氧培养 0、6、12、24 和 48 h,对照组常氧下培养相应时间,各时相点设 8 个复孔,实验重复 3 次。收集细胞后用 PBS 液漂洗。依照细胞核蛋白/细胞质蛋白抽提试剂盒说明书提取细胞核蛋白,加入添加了苯甲基磺酰氨的 CER A,漩涡震荡 15 s,冰浴 15 min,再加入 CER B,漩涡震荡 5 s,冰浴 1 min,4℃ 12 000×g 离心 5 min,弃上清。对于沉淀,加入添加了苯甲基磺酰氨的 NER 并将其分散,冰浴 40 min,期间每 5 分钟剧烈漩涡 15 s,再 4℃ 12 000×g 离心 10 min,该上清即为细胞核蛋白,吸取后用于检测 NF- $\kappa$ B。蛋白样品加入上样缓冲液煮沸 5 min,离心、上样(20  $\mu$ g/道),行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,再转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入 1:200 稀释的兔抗人 NF- $\kappa$ B/p65 多克隆抗体,4℃ 过夜,用  $\beta$ -actin 作内参照。TBST 洗膜,再加入 1:1 000 稀释的辣根酶标记山羊抗兔 IgG,37℃ 1 h,洗膜,滴加 ECL 发光试剂, Bio-Rad 图像处理系统 Hisensitivity 模式监测其曝光显影,并测定蛋白条带相对灰度,相对灰度积分值

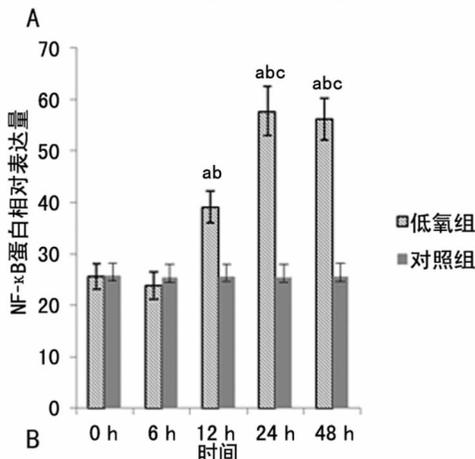
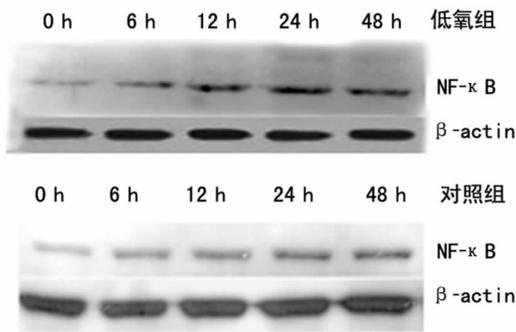
代表蛋白的表达量。

**1.4 明胶酶谱分析** HT-29 细胞以  $1 \times 10^6$ /孔、含 10% FBS 的 RPMI-1640 接种到六孔板内培养过夜。次日用 0.01 mmol/L PBS(pH7.4) 洗涤后,加入无血清 RPMI-1640。分别低氧培养 0、6、12、24 和 48 h,对照组常氧下培养相应时间,各时相点设 8 个复孔,实验重复 3 次。收集各时段点上清液,按照 1:3 比例将上清液与上样缓冲液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH 6.8,10%甘油,2%SDS,0.1%溴酚蓝)混合,进行 1.5%明胶/8% PAGE、80 V 电泳 20 min、100 V 电泳 2 h。2.5% Triton X-100 洗脱凝胶,加入 50 mmol/L Tris-HCl pH7.5,0.2 mol/L NaCl,5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>,0.02% Triton X-100,37 °C 孵育 24 h,再经 0.4%考马斯亮蓝 R-250,10%冰醋酸,20%甲醇的染色缓冲液和 10%冰醋酸,20%甲醇的脱色缓冲液处理,直至凝胶显现出蛋白负染条带。对负染条带用 Bio-Rad 的图像处理系统进行扫描分析,负染条带的大小、亮度代表 MMP-2/9 的活性。

**1.5 统计学处理** 采用 SAS9.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,行方差分析或 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

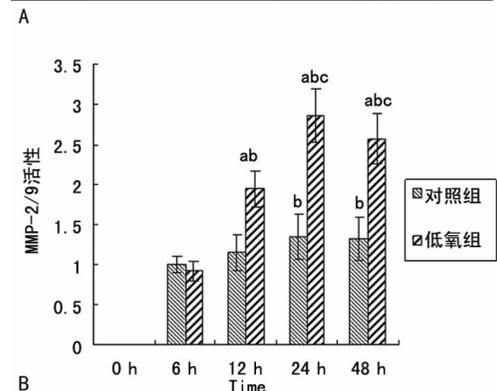
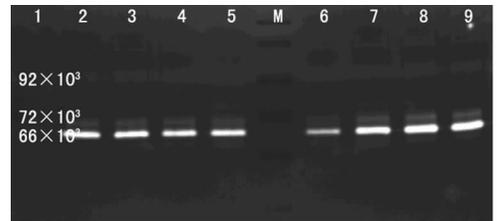
**2.1 低氧下细胞核内 NF-κB 蛋白的表达** 各时相点设 8 个复孔,实验重复 3 次。Western blot 显示:在常氧下的对照组,HT-29 细胞核内的 NF-κB/p65 表达呈低水平。在低氧组,低氧最初 6 h,HT-29 细胞核内的 NF-κB 表达无显著变化,低氧 12 h 后逐渐升高,24 h 达到顶峰。低氧各时段组(除 6 h 组外),NF-κB 蛋白的表达均显著高于对照组。低氧可诱导细胞核内 NF-κB/p65 的表达,见图 1。



A: Western blot 图; B: Western blot 分析图; a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 0、6 h 比较; c:  $P < 0.01$ , 与 12 h 比较。

图 1 低氧及对照组细胞核内 NF-κB/p65 蛋白表达水平

**2.2 低氧下 MMP-2/9 的活性** 各时相点设 8 个复孔,实验重复 3 次。MMP-2 及其前体溶解明胶后呈现分子量为  $66/72 \times 10^3$  的负染条带,MMP-9 则呈现  $92 \times 10^3$  的负染条带,HT-29 细胞分泌的 MMP 活性以 MMP-2 及其前体为主。明胶酶谱分析可检测出 HT-29 细胞在常氧下可分泌一定活性的 MMP-2 及其前体和 MMP-9,低氧最初 6 h,MMP-2/9 活性无显著变化。低氧 12 h,HT-29 细胞分泌的 MMP-2/9 活性逐渐上调,24 h 达顶峰。低氧各时段组(除 6 h 组外),MMP-2/9 活性均显著高于对照组( $P < 0.01$ ),见图 2。由此可见,低氧可诱导 HT-29 细胞分泌的高活性的 MMPs。



A: 明胶酶谱分析图;1、2、3、4、5 分别为常氧下 0、6、12、24、48 h, M 为 marker,6、7、8、9 分别为低氧下 6、12、24、48 h; B: 明胶酶谱分析图; a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 0、6 h 比较; c:  $P < 0.01$ , 与 12 h 比较。

图 2 明胶酶谱分析 MMP-2/9 活性

**3 讨 论**

在人和小鼠的肿瘤组织中,距离血管 50~250 μm 处即可观察到低氧细胞<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞更倾向于糖酵解,即使在氧气充足的情况下依然会进行糖酵解,这一过程被称为 Warburg effect<sup>[6]</sup>。糖酵解过程产生的乳酸会使肿瘤细胞处于酸性微环境,这一现象在肿瘤低氧区表现得更为明显,实验表明,低氧肿瘤细胞内 pH 值约为 7.05,而正常值为 7.30。因此,低氧是实体肿瘤物理外环境的典型特征。

细胞外间质的微环境对实体肿瘤的恶性表型起着重要的调控作用。癌细胞对低氧的耐受以及演进主要依赖缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)来进行调节。此外,生物体内还存在非 HIF 信号转导通路,从而形成了细胞对低氧应答的特异性和多样性。

本研究用低氧环境培养 HT-29 细胞并提取细胞核蛋白,以 Western blot 分析细胞核 NF-κB 的表达水平,发现在低氧 12 h 后,细胞核中的 NF-κB 开始升高,低氧 24 h,细胞核中的 NF-κB 已显著增加,并达到顶峰。正常情况下 NF-κB 以同二聚体或异二聚体存在,并和抑制性蛋白 IκB 呈非共价结合而不能发生核转位。IκB 蛋白泛素化和磷酸化后可激活 NF-κB 蛋白,但其活化过程受严格调控。一旦 IκB 被磷酸化,IκB 被含

Cull(Cullin 蛋白的一种)的多聚泛素连接酶泛素化,进而通过蛋白酶体途径降解,NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 分离,暴露出核定位信号,激活 NF- $\kappa$ B,游离的 NF- $\kappa$ B 二聚体进入细胞核,在大量激活子的作用下,NF- $\kappa$ B 复合体与同源 DNA 序列结合产生基因表达的效应<sup>[7]</sup>。本研究表明:在低氧诱导下,HT-29 细胞质中的 NF- $\kappa$ B 可能经某些因素的作用,从细胞质向细胞核转位,具有转化活性、位于细胞核的 NF- $\kappa$ B 进一步上调其下游基因。

低氧条件会诱导癌细胞分泌许多 MMPs 和血纤维蛋白溶酶原抑制因子 1(PAI-1) 等破坏细胞外基质的分子<sup>[8-9]</sup>,从而向基底层扩散、浸润。

在肿瘤的浸润、转移中,MMP-2/9 所起的作用主要取决于其活性。本实验的明胶酶谱分析显示:低氧最初 6 h,MMP-2/9 活性无显著变化。低氧 12 h,HT-2/9 细胞分泌的 MMP-2/9 活性逐渐上调,24 h 达顶峰。低氧各时段组(除 6 h 组外),MMP-2/9 活性均显著高于对照组。高活性的 MMP-2/9 降解 IV 型胶原,为 HT-29 细胞浸润、转移提供通道。MMPs 因为缺乏缺氧反应元件(HRE)不受缺氧诱导因子的调控,这与尿激酶型胞浆素原活化物(uPA)有所不同。鉴于此,低氧时可能存在另外一条非 HIF-1 $\alpha$  的途径调控肿瘤细胞的侵袭能力。当整合素受体  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 被激活后,可活化 NF- $\kappa$ B,并使其转位至细胞核内与 MMP-9 启动子结合,上调 MMP-9 的表达;NF- $\kappa$ B 还可上调 MT1-MMP 的表达,使 MMP-2 的活性进一步增强<sup>[10-11]</sup>。Li 等<sup>[12]</sup>也报道,在低氧条件下,通过 NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  途径可上调 MMP-2/9 的表达。

低氧几乎影响整个肿瘤细胞的功能以及改变大多数信号转导途径的活性,这些信号途径并不是孤立存在的。肿瘤细胞在适应低氧并演进过程中,需要多条信号通路的协调,如 HIF-1 与 NF- $\kappa$ B 协同作用:一方面,HIF-1 可以激活 NF- $\kappa$ B;另一方面,低氧激活 NF- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B 转入核内又能与 HIF-1 $\alpha$  启动子区域-197/188 结合,上调 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白水平<sup>[13]</sup>。此外 HIF-1 的激活还需要 NF- $\kappa$ B 和低氧后翻译后调节机制的共同调节<sup>[14]</sup>,如此形成肿瘤细胞低氧应答的组织特异性和多样性。本实验发现:在低氧的诱导下胞核中 NF- $\kappa$ B 和 MMP-2/9 的活性明显上调,且上调趋势同步。因此推测:不同与 HIF-1,NF- $\kappa$ B 可能是低氧下的另一重要调控途径,可通过上调 MMP-2/9 的活性使肿瘤细胞的侵袭性增加。

## 参考文献

[1] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer,2003,3(10):721-732.  
 [2] Bittner MI, Wiedenmann N, Bucher S, et al. Exploratory geographical analysis of hypoxic subvolumes using 18F-MISO-PET imaging in patients with head and neck cancer in the course of primary chemoradiotherapy[J]. Radiother Oncol,2013,108(3):511-516.  
 [3] Iversen AB, Busk M, Horsman MR. Induction of hypoxia by vascular disrupting agents and the significance for their

combination with radiation therapy[J]. Acta Oncol,2013,52(7):1320-1326.

- [4] 杨庆强,张才全. 人结肠癌细胞 HT-29 离体缺氧模型的制备和鉴定[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(16):2454-2458.  
 [5] Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions;the multicell spheroid model[J]. Science,1988,240(4849):177-184.  
 [6] Sawayama H, Ishimoto T, Sugihara H, et al. Clinical impact of the Warburg effect in gastrointestinal cancer (review)[J]. Int J Oncol,2014,45(4):1345-1354.  
 [7] Rius J, Guma M, Schachtrup C, et al. NF-kappa B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 alpha[J]. Nature,2008,453(7196):809-807.  
 [8] Du R, Lu KV, Petritsch C, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion [J]. Cancer Cell,2008,13(3):206-220.  
 [9] Lara PC, Lloret M, Valenciano A, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in relation to hypoxia and oncoproteins in clinical cervical tumors[J]. Strahlenther Onkol,2012,188(12):1139-1145.  
 [10] Prakash M, Kale S, Ghosh I, et al. Hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) induces melanoma cell migration and tumor growth by NF-kappa B dependent MMP-2 activation through integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ (3) interaction [J]. Cell Signal,2011,23(10):1563-1577.  
 [11] Roy S, Chakraborti T, Chowdhury A, et al. Role of PKC- $\alpha$  in NF- $\kappa$ B-MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 by TNF- $\alpha$  in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. J Biochem,2013,153(3):289-302.  
 [12] Li G, Zhang Y, Qian Y, et al. Interleukin-17a promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway[J]. Mol Immunol,2013,53(3):227-236.  
 [13] Oliver KM, Taylor CT, Cummins EP. Hypoxia regulation of NF kappa B signalling during inflammation;the role of hydroxylases[J]. Arthritis Res Ther,2009,11(1):215.  
 [14] Yoshida T, Hashimura M, Mastumoto T, et al. Transcriptional upregulation of HIF-1 $\alpha$  by NF- $\kappa$ B/p65 and its associations with  $\beta$ -catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells[J]. Lab Invest,2013,93(11):1184-1193.

(收稿日期:2015-02-18 修回日期:2015-03-27)