

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.26.003

沉默 HIF-1 α 基因逆转结肠癌 MDR 的研究*杨光磊¹, 胡岩芳², 张 丛¹, 许书清¹, 彭林涛¹, 葛国庆¹, 胡延伟¹, 王 钊¹, 张仕东¹

(邢台市人民医院:1. 普外科;2. 神经内科, 河北邢台 054031)

[摘要] **目的** 探讨沉默 HIF-1 α 基因对结肠癌多药耐药(MDR)逆转的影响。**方法** 建立 MDR1、HIF-1 α 的慢病毒和亲本 HT-29 细胞多细胞球的体系,低氧引导形成耐药的模型,分为 Neg-miR 感染组(A组)、亲本 HT-29 MCS 未处理(常氧)组(B组)、MDR1 miR 感染组(C组)、亲本 HT-29 MCS 未处理(低氧)组(D组)、HIF-1 α miR 感染组(E组),检测耐药扭转情况和肿瘤细胞死亡情况。**结果** MDR1 与 HIF-1 α 的两套 miR 的重组慢病毒的干扰体系可以跟随细胞进行传代,能够显著对靶基因蛋白表达产生抑制作用;各组细胞周期比较,D组、E组和 C组、B组对比差异均有统计学意义($P < 0.05$),E组与 B组对比差异有统计学意义($P < 0.05$),C组与 E组对比差异有统计学意义($P < 0.05$);各组敏感性和细胞凋亡率比较,D组(VCR、ADR、5-Fu)、C组(5-Fu)、E组(5-Fu)与 B组对比差异有统计学意义($P < 0.05$),E组(VCR、ADR、5-Fu)、C组(ADR、VCR)与 D组对比差异有统计学意义($P < 0.05$),C组(5-Fu)与 E组对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 沉默 HIF-1 α 能够显著逆转 HT-29MCS 细胞对 5-Fu、VCR 和 ADR 的耐药性。

[关键词] 缺氧诱导因子-1 α ;结肠肿瘤;多药耐药;逆转机制**[中图分类号]** R735.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)26-3372-03Research on silencing HIF-1 α gene reversing MDR in colon cancer*YANG Guanglei¹, HU Yanfang², ZHANG Cong¹, XU Shuqing¹, PENG Lintao¹, GE Guoqing¹,
HU Yanwei¹, WANG Zhao¹, ZHANG Shidong¹(1. Department of General Surgery; 2. Department of Neurology, Xingtai Municipal
People's Hospital, Xingtai, Hebei 054031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of silencing HIF-1 α gene for reversing MDR of colon cancer. **Methods** The slow virus of MDR1, HIF-1 α and the multicellular spheroids system of the parental HT-29 cell were established. The drug resistance model was formed by the low-oxygen guide. They were divided into five groups, including Neg-miR infection group (group A), parent N group (group B), MDR1-miR infection group (group C), parent H group (group D) and HIF-1 α miR infection group (group E). Then the drug resistance reversion and tumor cell death were detected. **Results** The interference system of two sets of miR recombinant lentivirus with MDR1 and HIF-1 could be passaged by following cells, could significantly produce the inhibiting effect on the expression of the target gene protein ($P < 0.05$); in the cell cycle; there was statistically significant difference between the group D and group E and between group C and group B ($P < 0.05$). There was statistically significant difference between the group E and group B ($P < 0.05$). There was statistically significant difference between the group C and group E ($P < 0.05$). The sensitivity and apoptosis rate in each group; there was statistically significant difference among group D (VCR, ADR, 5-Fu), group C(5-Fu), group E(5-Fu) and group B ($P < 0.05$). There was statistically significant difference between group E (VCR, ADR, 5-Fu) and group C(ADR, VCR) with group D ($P < 0.05$). There was statistically significant difference between the group C (5-Fu) and group E ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing HIF-1 α can significantly reverse the resistance of HT-29 MCS cells to 5-Fu, VCR and ADR.

[Key words] hypoxia-inducible factor-1 α ; colon neoplasms; multidrug resistance; reversal mechanism

结肠癌为临床上较为常见恶性肿瘤,化疗对患者的疗效有重要影响,但患者不同化疗的方式间的敏感性有非常大的差异,患者的治疗效果不是很理想,而患者体内肿瘤细胞的多药耐药(multidrug resistance,

* 基金项目:河北省邢台市科技计划项目(2017ZC116)。 作者简介:杨光磊(1982-),主治医师,硕士,主要从事普外科急腹症及胃肠肿瘤方面的研究。

表 1 HT-29 MCS 的水平下各组目的蛋白表达的抑制情况对比

项目	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
RGS _{P-SP}	1.02±0.02 ^{acd}	0.29±0.03	0.25±0.04 ^b	1.01±0.05 ^a	0.21±0.04 ^b
RGS _{HIF-1α}	0.98±0.04 ^{ac}	0.30±0.21	0.97±0.03 ^{ac}	1.02±0.05 ^a	0.20±0.03 ^b

a: P<0.05, 与 B 组对比; b: P<0.05, 与 D 组对比; c: P<0.05, 与 E 组对比; d: P<0.05, 与 C 组对比

MDR)是其化疗失败的重要因素^[1]。肿瘤细胞不仅对服用过的药物产生耐药性,还会对和原药物作用机制、结构完全不一样药物也发生较差的耐药性。相关研究显示,造成恶性的肿瘤患者死亡中有近 95% 都是和肿瘤的耐药有关联。在结肠癌患者机体内,肿瘤细胞的缺氧为正常的状况,在缺氧所导致肿瘤细胞的生物学特征变化中,缺氧的诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)在这个过程中有这重要影响。HIF-1 α 一般在肿瘤细胞内进行过度表达,和肿瘤患者预后也有密切联系,在缺氧的情况下还会使肿瘤细胞对抗肿瘤药物的抵抗性加大^[2-3]。本文通过探讨沉默 HIF-1 α 基因对结肠癌 MDR 逆转的影响,为临床患者的治疗提供一些新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂、仪器 (1)材料:人结肠腺癌细胞 HT-29 细胞(通派上海生物科技有限公司)。(2)试剂:琼脂糖粉(美国 Sigma 公司)、胰酶(美国 Hyclone 公司)、长春新碱(VCR,浙江海正药业股份有限公司)、胎牛血清(FBS,民海生物公司)、二甲亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司)、盐酸阿霉素(ADR,海正药业公司)、伊立替康(CPT-11,山东罗欣药业集团股份有限公司)、miR 的重组慢病毒(美国 Invitrogen 公司)、5-氟尿嘧啶(5-Fu,上海旭东海普药业有限公司)。(3)仪器:CO₂ 的培养箱(美国 Thermo Forma 公司)、酶标仪(型号:Bio-RAD Model 550,美国 Biol-Tiok 公司)、流式的细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养细胞 (1)常氧的培养:使用 DMEM 的高糖培养基对 HT-29 细胞进行培养,内含 100 U/mL 的链霉素、10% 的 FBS 和 100 U/mL 的青霉素,使用 0.3% 的胰酶进行消化传代;(2)低氧的培养:向密封的容器内充进混合的气体(4% CO₂、96% N₂),速度为 10 L/min,连续 10 min;(3)使用 liquid overlay 的技术对 HT-29 细胞进行三维的培养。

1.2.2 Western blot 法检查 使用 Western blot 法检查 HT-29 MCS 内 HIF-1 α 的 miR 的重组慢病毒的干扰情况^[4]:将 HT-29 MCS 的实验细胞分成 5 组, Neg-miR 感染组(A 组)、亲本 HT-29 MCS 未处理(常氧)组(B 组)、MDR1 miR 感染组(C 组)、亲本 HT-29 MCS 未处理(低氧)组(D 组)和 HIF-1 α miR 感染组(E 组);分别进行 3 次实验,取其平均值当做最终的结果。

1.2.3 检查细胞周期 检查低氧与常氧情况下 HT-29 MCS 的细胞周期^[5]:把未处理亲本 HT-29 的细胞分成低氧组与常氧组(即 D 组和 B 组),待 HT-29 MCS 产生中等大小以后,加入无酶的消化液(每孔 28 μ L),使 MCS 的细胞逐渐分散;使用 PBS 进行 2 次洗涤,使用流式的细胞仪进行检测。

1.2.4 检查化疗的敏感性^[6] 将 MDR1 或 HIF-1 α miR 的慢病毒感染 HT-29 细胞和亲本的 HT-29 细胞进行三维的培养建立 HT-29 MCS,采用 CPT-11、ADR、5-Fu 和 VCR 检测其在低氧和常氧情况下的化疗的敏感性。

1.2.5 各组 HT-29 MCS 的细胞死亡^[7] 使用流式的细胞检测仪对 CPT-11、ADR、5-Fu 和 VCR 影响后各组细胞的死亡情况。

1.3 统计学处理 使用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用独立样本 t 检验,计数资料用率表示,使用 χ^2 检验,以 P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HT-29 MCS 的水平下各组目的蛋白表达的抑制情况 HT-29 MCS 的水平下各组目的蛋白表达的抑制差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

2.2 HT-29 MCS 的细胞周期情况 D 组、E 组和 C 组与 B 组对比差异均有统计学意义(P<0.05),E 组与 D 组对比差异有统计学意义(P<0.05),C 组与 E 组对比差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 2 HT-29 MCS 的细胞周期情况对比

组别	G ₂ /M	S	G ₀ /G ₁
C 组	6.60±0.68 ^{ac}	8.71±0.59 ^{ac}	85.02±1.31 ^{ac}
B 组	12.01±0.78	24.99±0.97	62.89±1.80
E 组	17.88±0.49 ^{ab}	36.95±1.17 ^{ab}	44.89±1.56 ^{ab}
D 组	5.09±0.89 ^a	7.81±1.30 ^a	86.96±2.07 ^a

a: P<0.05, 与 B 组对比; b: P<0.05, 与亲 D 组对比; c: P<0.05, 与 E 组对比

2.3 各组化疗的敏感性情况 D 组(VCR、ADR、5-Fu)、C 组(5-Fu)、E 组(5-Fu)与 B 组对比差异有统计学意义(P<0.05),E 组(VCR、ADR、5-Fu)、C 组(ADR、VCR)与 D 组对比差异有统计学意义(P<0.05),C 组(5-Fu)与 E 组对比差异有统计学意义(P<0.05),见表 3。

2.4 各组 HT-29 MCS 细胞的死亡情况 D 组

(VCR、ADR、5-Fu)、C 组(5-Fu)、E 组(5-Fu)与 B 组对比差异有统计学意义($P < 0.05$), E 组(VCR、ADR、5-Fu)、C 组(ADR、VCR)与 D 组对比差异有统计学意义($P < 0.05$), C 组(5-Fu)与 E 组对比差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 4。

表 3 不同药物影响下各组 IC₅₀ 情况对比

项目	C 组	B 组	E 组	D 组
CPT-11	147.92±9.01	121.81±7.48	133.05±8.27	146.07±9.36
ADR	62.97±5.03 ^b	20.01±2.15	52.10±4.27 ^b	196.33±14.08 ^a
5-Fu	820.06±27.21 ^{ac}	166.24±12.07	375.52±15.91 ^{ab}	820.31±23.73 ^a
VCR	30.05±3.17 ^b	15.52±2.33	26.28±3.21 ^b	93.95±5.82 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 B 组对比; ^b: $P < 0.05$, 与 D 组对比; ^c: $P < 0.05$, 与 E 组对比

表 4 在药物的作用下 HT-29 MCS 细胞的死亡情况对比

项目	C 组	B 组	E 组	D 组
CPT-11	40.94±4.02	45.84±3.06	43.10±3.52	41.19±2.53
ADR	47.97±3.31 ^b	50.03±4.70	50.89±3.95 ^b	5.49±1.31 ^a
5-Fu	20.06±2.61 ^{ac}	59.94±5.13	48.22±3.93 ^{ab}	18.19±2.93 ^a
VCR	45.97±3.33 ^b	52.05±4.12	46.91±4.04 ^b	6.25±1.48 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 B 组对比; ^b: $P < 0.05$, 与 D 组对比; ^c: $P < 0.05$, 与 E 组对比

3 讨论

很多实体的瘤内的缺氧情况很常见, 结肠癌患者的组织缺氧状况更加明显。肿瘤的细胞发生缺氧以后会产生代谢与遗传的变化, 不但使细胞本身继续生存增殖, 还会对很多化疗的药物产生耐受性, 致使患者的疗效降低^[8-10]。HIF-1 在肿瘤细胞的缺氧反应中有重要作用, 这使它成为扭转缺氧的肿瘤细胞疗效的新靶点。

本文中选取 CPT-11、ADR、5-Fu 及 VCR 当作沉默靶基因和低氧处理的前后检查化疗的敏感性药物, 这几种药物都是临床上比较常见的, 而且他们间的耐药影响和作用的机制各不相同。MDR1 与 HIF-1 α 的两套 miR 的重组慢病毒的干扰体系可以跟随细胞进行传代, 不但在单层的 HT-29 的水平上对目的基因的表达进行沉默, 还能够显著地对靶基因蛋白的表达产生抑制作用。本文研究中对各组细胞死亡状况, 使用的 Annexin V-APC/PI 的检查系统, 工作机理为在一般的细胞内, 磷脂酰丝氨酸(PS)在细胞膜的脂质内侧有分布, 但在前期细胞发生死亡时, 细胞膜内 PS 会从内侧向外侧进行翻转。Annexin V 为磷脂结合的蛋白, 它和 PS 的亲合力比较强, 可以与前期的细胞外侧 PS 进行结合^[11-13]。本文研究发现, 低氧能够使结肠癌患者的 HT-29 MCS 细胞对 5-Fu、VCR 和 ADR 发生显著耐药性, 而且细胞的死亡率比正常情况下的要低。此后经过 MDR1 或者 HIF-1 α 基因验证了

HIF-1 α 受到了明显的抑制, HT-29 MCS 细胞对 5-Fu、VCR 和 ADR 敏感性明显加强, 药物的扭转率得到提升, 药物引导下细胞的死亡率也显著提升, 说明 HIF-1 α miR 的干扰体系结合药物能够使耐药的细胞死亡, 患者治疗效果提高。MDR1 基因也受到了明显地抑制, HT-29 MCS 细胞对 VCR 与 ADR 敏感性显著加强, 药物的扭转率得到提升, 药物引导下细胞的死亡率也显著提升, 但对 5-Fu 没有明显的作用^[14-15]。

综上所述, 低氧能够使结肠癌的亲本 HT-29 MCS 出现 MDR 的表型, 成为耐药的模型, 沉默 HIF-1 α 能够显著逆转 HT-29 MCS 细胞对 5-Fu、VCR 和 ADR 的耐药性。

参考文献

- [1] 刘小微, 王松坡. 缺氧诱导因子对肿瘤多药耐药的影响及其靶向治疗的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(14): 1590-1593.
- [2] 李功勤, 夏良斌. 宫颈癌乏氧诱导因子-1 α 和谷胱甘肽-S-转酶- π 的表达及与化疗药物耐药性关系的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(13): 43-47.
- [3] LV Y, ZHAO S, HAN J Z, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha induces multidrug resistance protein in colon cancer[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8(1): 1941-1948.
- [4] 朱邢超, 张开光, 王巧民, 等. 顺铂对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体逆转胃癌多药耐药现象的增敏作用及机制[J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 33(6): 404-411.
- [5] 李伯和, 袁磊, 时冉冉, 等. 地高辛逆转乳腺癌 MCF-7/阿霉素细胞的耐药性及其机制[J]. 生理学报, 2015, 67(6): 611-617.
- [6] LIU M X, DU K L, FU Z X, et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha up-regulates the expression of phospholipase D2 in colon cancer cells under hypoxic conditions[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 394-399.
- [7] 王文静, 齐聪. 缺氧条件下缺氧诱导因子-1 α 抑制剂 YC-1 对人卵巢癌 Skov3 干细胞耐药的逆转作用[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(3): 337-342.
- [8] LIANG X, XU X E, WANG F C, et al. E-cadherin increasing multidrug resistance protein 1 via hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to multicellular resistance in colorectal cancer[J]. Tumor Biol, 2016, 37(1): 425-435.
- [9] 刘利平, 杨盛力, 何婉, 等. 乙肝病毒 X 蛋白上调肝癌细胞缺氧诱导因子-1 α 的作用和机制研究[J]. 中国癌症杂志, 2015, 21(5): 333-338.
- [10] WANG W J, QI C. Under hypoxic conditions hypoxia-inducible factor-1 α inhibitor YC-1 human ovarian cancer stem cells Skov3 resistance reversal effect[J]. J Mod Oncol 2016, 9(2): 163-169.
- [11] 唐康, 程勇, 庞云, 等. 缺氧诱导因子 1- α 参与结直肠癌细胞上皮间质转化及 DNA 同源重组修复的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(6): 766-772. (下转第 3378 页)

管代谢风险的相关性最强,VAI 是一个能很好预测 2 型糖尿病患者心血管代谢风险的简单工具。

内脏型肥胖患者更容易出现慢性炎症、胰岛素抵抗及代谢紊乱^[10,13]。本研究发现,MONW 组虽然 BMI 正常,但其 VAI 明显升高,提示内脏型肥胖是 MONW 人群的重要特点。MONW 组血清 sCD163、TNF- α 、CRP 均显著升高,提示 MONW 患者存在慢性炎症反应。MONW 人群因内脏脂肪蓄积,TNF- α 、IL-6 等促炎因子增多,抗炎因子减少,致使骨骼肌、肝脏等的胰岛素抵抗和代谢紊乱的发生^[14-15]。本研究中,VAI 与炎症指标 sCD163、TNF- α 、CRP 均存在相关性,MONW 组 SBP、DBP、FBG 等明显高于 MHNW 组,预示 MONW 人群患糖尿病、心血管疾病的风险明显升高。

综上所述,不同肥胖类型中 VAI 存在差异,血清 sCD163、TNF- α 、CRP 升高的程度也不同,提示不同肥胖类型的患者内脏型肥胖程度及炎症状态不同。本研究还证实,VAI 与血清炎症因子 sCD163、TNF- α 、CRP 等均存在相关性,提示内脏脂肪蓄积与肥胖相关慢性炎症存在密切关联,VAI 可能是反应不同类型肥胖人群炎症及代谢状态的良好指标。由于本研究属于病例对照研究,无法证实 VAI 与血清 sCD163、TNF- α 、CRP 等炎症指标之间的因果关系,因此还需要进一步开展前瞻性研究或者动物实验进行验证。

参考文献

- [1] NG M, FLEMING T, ROBINSON M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2014, 384(9945):766.
- [2] 赵俊, 隋忠国, 辛晓玮, 等. 腹型肥胖对成人 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗、分泌功能的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(7):19-21.
- [3] KANG I S, PYUN W B, SHIN J, et al. Association between central obesity and circadian parameters of blood pressure from the Korean ambulatory blood pressure monitoring registry; Kor-ABP registry[J]. *J Korean Med Sci*, 2013, 28:1461-1467.
- [4] AMATO M C, GIORDANO C, GALIA M, et al. Visceral adiposity index: a reliable indicator of visceral fat function

associated with cardiometabolic risk[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33:920-922.

- [5] MAURY E, BRICHARD S M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(1):1.
- [6] HAASE J, WEYER U, IMMING K, et al. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation[J]. *Diabetologia*, 2014, 57(3):562-571.
- [7] WELCH S K, CALVERT J G. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection[J]. *Virus Research*, 2010, 154(1/2):98-103.
- [8] ETZERODT A, MOESTRUP S K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(17):2352-2363.
- [9] KOWAL K, SILVER R, SLAWINSKA E, et al. CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochem*[J]. *Cytobiol*, 2011, 49:365-374.
- [10] NEELAND I J, TURER A T, AYERS C R, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults[J]. *JAMA*, 2012, 308(11):1150-1159.
- [11] AL-DAAGHRI N M, AL-ATTAS O S, ALOKAIL M S, et al. Visceral adiposity index is highly associated with adiponectin values and glycaemic disturbances[J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43:183-189.
- [12] AMATO M C, PIZZOLANTI G, TORREGROSSA V, et al. Visceral adiposity index (VAI) is predictive of an altered adipokine profile in patients with type 2 diabetes [J]. *PLoS One*, 2014, 9:e91969.
- [13] LEE J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(2):208-222.
- [14] DIVOUX A, MOUTEL S, POITOU C, et al. Mast cells in human adipose tissue: Link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 97(9):1677-1685.
- [15] PAYAB M, AMOLI M M, QORBANI M, et al. Adiponectin gene variants and abdominal obesity in an Iranian population[J]. *Eat Weight Disord*, 2017, 22(1):85-90.

(收稿日期:2018-03-15 修回日期:2018-04-26)

(上接第 3374 页)

- [12] XU J N, SONG Z, GUO Q J, et al. Synergistic effect and molecular mechanisms of traditional Chinese medicine on regulating tumor microenvironment and cancer cells[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 206(5):1-14.
- [13] 朱林琳, 罗明惠, 孟亚飞, 等. 缺氧诱导因子 1 α 在大肠腺瘤-腺癌癌变-腺癌中的表达及意义[J]. *中国处方药*, 2015, 115(11):119-119, 120.

- [14] 任亚君, 熊枝繁, 曹仕琼, 等. 热休克蛋白 90、缺氧诱导因子——1 α 在大肠癌中的表达及意义[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(20):5733-5735.
- [15] 张慧峰, 刘晗, 秦秉玉, 等. 低氧诱导因子-1 α 短发卡 RNA 逆转乳腺癌阿霉素耐药的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(4):926-928.

(收稿日期:2018-03-11 修回日期:2018-04-27)