

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200224.1349.002.html\(2020-02-24\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200224.1349.002.html(2020-02-24))

缺氧对人乳腺癌细胞微球体成瘤性的影响及机制研究*

谢佳良¹, 范原铭^{1△}, 吴 兰², 侯 婧², 徐宏宇¹, 罗小红³

(重庆市长寿区人民医院:1. 普外二科;2. 肿瘤科;3. 病理科 401220)

[摘要] **目的** 研究缺氧状态对人乳腺癌细胞微球体(MSs)成瘤性的影响,进一步探讨产生这种影响的可能机制。**方法** 在缺氧及常氧状态下对接受过化疗的人乳腺癌细胞进行无血清悬浮培养,将获得的微球体细胞(MSDCs)注入小鼠背部两侧以观察其成瘤情况,RT-PCR 及 Western blot 检测移植瘤细胞增殖相关基因及蛋白表达水平。**结果** 缺氧组 MSDCs 的成瘤性强于常氧组,Western blot 及 RT-PCR 检测结果提示,缺氧组 MSDCs 中低氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)、三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 抗体(ABCG2)、表皮细胞生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白及 mRNA 的表达水平高于常氧组($P < 0.05$)。**结论** 缺氧可能通过影响 MSDCs 中 HIF-2 α 、ABCG2、EGF、VEGF 表达水平,从而增强 MSDCs 的成瘤性。

[关键词] 乳腺肿瘤;肿瘤干细胞;低氧;缺氧诱导因子 2 α ;三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2;表皮生长因子;血管内皮生长因子 A

[中图法分类号] R73-3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)18-2997-05

Study of the impacts and mechanism of hypoxia on tumorigenicity of human breast cancer cells mammospheres*

XIE Jialiang¹, FAN Yuanming^{1△}, WU Lan², HOU Jing², XU Hongyu¹, LUO Xiaohong³

(1. The Second Department of General Surgery; 2. Department of Oncology; 3. Department of Pathology, People's Hospital of Changshou District, Chongqing 401220, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of hypoxia on the tumorigenesis of human breast cancer mammospheres (MSs), and to further explore the possible mechanism of this effect. **Methods** Under hypoxia and normoxia status, chemotherapy human breast cancer tissue cells were cultured in suspension in a serum-free medium, and the obtained microspheres-derived cells (MSDCs) were injected into both sides of the back of mice to observe their tumor formation. The expression levels of HIF-2 α , ABCG2, EGF, VEGF in the transplanted tumors were tested by Western blot and RT-PCR. **Results** The tumorigenicity of MSDCs in the hypoxia group was stronger than those in the normoxia group. The protein and mRNA expression levels of HIF-2 α , ABCG2, EGF, VEGF in the normoxia group were higher than that of the hypoxia group normoxia ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxia is likely to enhance the tumorigenicity of MSDCs by affecting the expression of HIF-2 α , ABCG2, EGF, VEGF.

[Key words] breast tumor; neoplastic stem cells; hypoxia; hypoxia inducible factor-2 α ; ABCG2; epidermal growth factor; vascular endothelial growth factor A

本课题组前期工作发现无血清悬浮培养法获得的人乳腺癌细胞微球体(mammospheres, MSs)细胞(mammospheres-derived cells, MSDCs)动物成瘤性强于人乳腺癌 MCF-7 细胞^[1]。而缺氧微环境广泛存在于包括乳腺癌在内的多种实体肿瘤中^[2]。本文将缺氧与无血清培养获得的 MSDCs 相结合,观察不同氧浓度 MSDCs 的成瘤情况,并通过 Western blot 及 RT-PCR 技术检测瘤细胞增殖相关基因及其蛋白

表达水平,从而探讨缺氧影响乳腺癌细胞生物学成瘤性的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(中科院上海细胞库),稳压 DNA 电泳仪、PCR 仪(BioRad 公司),Mini 离心机(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司),三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 抗体(ABCG2)

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目(2017ZBXM025)。 作者简介:谢佳良(1990-),主治医师,硕士,主要从事内分泌肿瘤研究。

△ 通信作者, E-mail: fym11cn@163.com。

兔抗人多克隆抗体、低氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)鼠抗人多克隆抗体、表皮细胞生长因子(EGF)鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司),血管内皮生长因子(VEGF)兔抗人单克隆抗体(上海碧云天生物技术研究所), β -actin 兔抗人多克隆抗体(北京中杉金桥公司),PCR 引物设计及合成(上海博奥基因化学技术有限公司),BALB/c 无胸腺裸鼠(北京大学实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 标本收集及细胞准备

选取 2015 年 4 月至 2019 年 4 月本院接受 3 个周期新辅助化疗(吡柔比星 40 mg/m² + 多西他赛 75 mg/m² + 环磷酰胺 500 mg/m²)的乳腺浸润性导管癌患者,共 26 例,临床分期为 II B ~ III C 期。将肿瘤组织切碎后与细胞培养液混合,高速离心后加入红细胞裂解液,均匀吹打后漂洗。再次离心后重悬细胞,常温培养 1 h,将收集到的细胞接种于培养基[1 : 50 B27 培养液,20 ng/mL EGF,20 ng/mL 成纤维细胞生长因子(bFGF)]中,37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,从而获得乳腺癌单细胞。准备 16 个培养瓶,分为常氧组及缺氧组,每组 8 个,将上述方法获得的乳腺癌单细胞(约 2 × 10⁴ /mL)置于其中。缺氧组在 37 °C 1% O₂、5% CO₂、94% N₂ 的密闭环境中培养。每 4 天更换培养液 1 次。MSs 出现后,每 6 ~ 8 天传代 1 次。离心 5 min 后,用胰酶消化 MSs 获得微球体 MS-DCs,离心后继续无血清培养。

1.2.2 动物成瘤实验

将缺氧及常氧状态下培养获得的 MSs 用胰酶消化后获得相应 MSCDs,按每只小鼠 1 × 10³ 个细胞分别接种于小鼠背部两侧,缺氧组 MSCDs 接种于小鼠背部右侧,常氧组 MSCDs 接种于小鼠背部左侧。小鼠共 8 只,常规条件饲养 6 周。每周观察小鼠背部移植瘤生长情况,绘制移植瘤生长曲线图。6 周后处死小鼠,取下移植瘤,分别用于苏木素-伊红(HE)染色、Western blot、RT-PCR。

1.2.3 HE 染色

选取移植瘤组织,4%多聚甲醛溶液将其固定,在无水乙醇与 95%乙醇中,按操作步骤梯度脱水。置于二甲苯中浸泡 2 次,每次 10 min,以蜡块包埋。标本蜡块常规超薄切片,切片以二甲苯脱蜡 5 次,梯度乙醇逐级脱水,苏木素液染色,伊红染色,二甲苯透明 3 次,封片。

1.2.4 Western blot

肿瘤组织块称重后将其粉碎,常规以入 RIPA 缓冲液(每克组织 3 ml 缓冲液)与 PMSF(每克组织 30 μ L 缓冲液,PMSF:10 mg/mL)混匀,通过离心及冰上孵育 30 min 后,离心抽取上清液。按照试剂盒提供实验步骤完成蛋白提取、配胶、上样,以恒压 110 V 电泳 60 min,转膜。将一抗(ABCG2 兔抗人多克隆抗

体、HIF-2 α 鼠抗人多克隆抗体、VEGF 兔抗人单克隆抗体、EGF 鼠抗人单克隆抗体)加入缓冲液稀释孵于膜上,4 °C 冰箱孵育过夜。加入二抗(羊抗鼠及羊抗兔,1 : 2 000 比例稀释),室温下孵育 2 h,化学发光反应完成显影、定影及拍摄后获取目标条带。凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.2.5 RT-PCR 检测

使用 TRIzol 试剂进行细胞裂解提取总 RNA,SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒用于反转录及 PCR 反应,内参为 β -actin。总 RNA 经反转录为 cDNA。反转录反应条件:42 °C 60 min,95 °C 5 min。分别将上、下游引物,cDNA 加入 SYBRGreen mix 反应体系中进行实时荧光定量 PCR(RT-PCR),反应条件:95 °C 2 min;95 °C 15 s,50 °C 15 s,72 °C 45 s,40 次循环。由 RT-PCR 仪自动进行 Ct 值记录。引物由上海吉凯基因化学技术有限公司设计合成,见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	方向	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
HIF-2 α	正向	ATGGTAGCCCTCTCCAACAAG	134
	反向	AGGTTCTTCATCCGTTTCCAC	
ABCG2	正向	AGAGTGGCTTTCTACCTTGTCG	124
	反向	AATAACGAAGATTTCCTCCAC	
VEGF	正向	GCACCCATGGCAGAAGGAGGAG	363
	反向	GTGCTGACGCTAACTGACC	
EGF	正向	TCTGAACCCGGACGGATTG	214
	反向	GACATCGCTCGGAACGTAG	
β -actin	正向	AGCGAGCATCCCCAAAGTT	325
	反向	GGGCACGAAGGCTCATCATT	

1.3 统计学处理

采用 SPSS24.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析及 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSs 培养结果

缺氧组在第 4 天出现球体,常氧组在第 8 天出现球体。缺氧组球体的生长速度明显快于常氧组,最终成球体积也较大。培养情况及球体生长曲线见图 1、2。

2.2 动物成瘤实验结果

接种后第 9 天观察到裸鼠右侧背部开始出现移植瘤,在接种后第 15 天后观察到裸鼠左侧背部出现移植瘤。第 12 天时所有小鼠右侧背部均出现移植瘤,并随时间逐渐增大。第 18 天所有小鼠左侧背部均出现移植瘤,并随时间缓慢增大。生长曲线图见图 3。

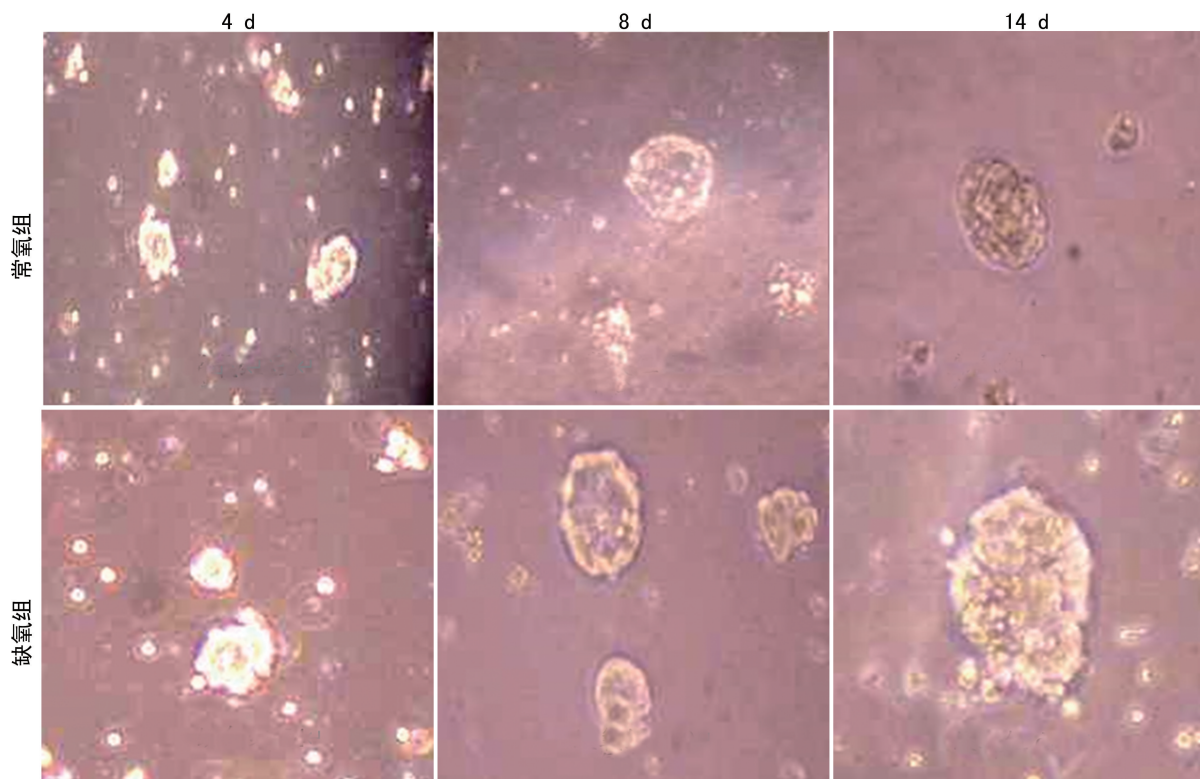


图 1 MSs 培养(普通光学显微镜, ×200)

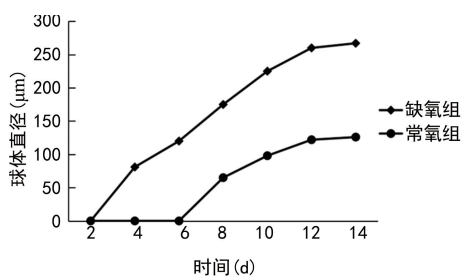
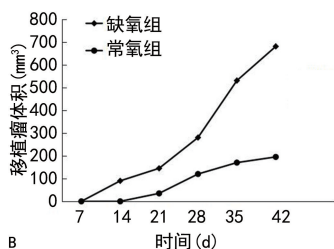
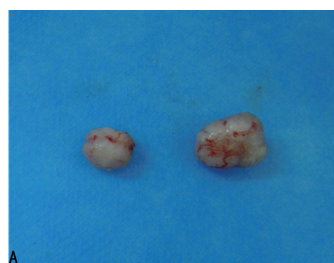


图 2 MSs 生长曲线



B

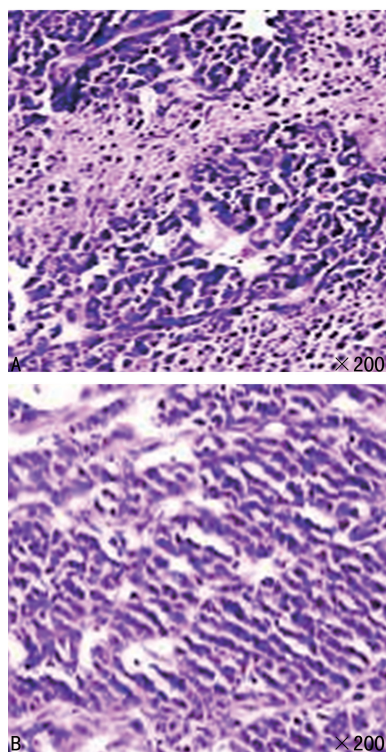
A: 小鼠移植瘤, 左侧为常氧组、右侧为缺氧组; B: 移植瘤生长曲线。

图 3 裸鼠移植瘤生长情况

2.3 移植瘤 HE 染色结果

6 周后处死小鼠, 取下的移植瘤经过石蜡包埋、切

片后 HE 染色证实两组移植瘤中均含有癌细胞, 见图 4。

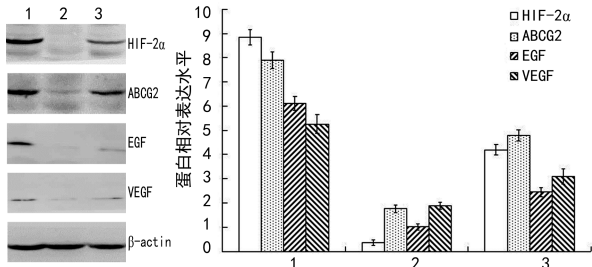


A: 缺氧组; B: 常氧组。

图 4 移植瘤石蜡切片 HE 染色结果(×200)

2.4 移植瘤中瘤细胞增殖相关蛋白的表达

缺氧组移植瘤中的 HIF-2α、ABCG2、EGF、VEGF 的相对表达水平均高于常氧组(均 $P < 0.05$), 见图 5。



A: Western blot 图; B: Western blot 分析图; 1: 缺氧组; 2: MDA-MB-231 细胞; 3: 常氧组。

图 5 乳腺癌增殖相关蛋白 Western blot 检测结果

2.5 移植瘤增殖相关蛋白 mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示, 缺氧组移植瘤的 HIF-2 α 、ABCG2、EGF、VEGF mRNA 相对表达水平均高于常氧组 ($P < 0.05$), 见图 6。

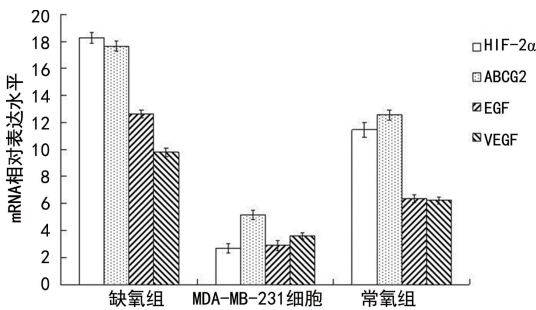


图 6 乳腺癌增殖相关基因 mRNA 表达分析图

3 讨论

有研究表明部分乳腺癌细胞具有无限增殖能力, 并且具有一定的动物成瘤能力^[3]。肿瘤细胞的快速增殖及血液供应不足导致肿瘤中心缺氧, 而肿瘤的形成一部分与肿瘤驱动的代谢途径及肿瘤微环境之间的相互作用有关^[4]。缺氧微环境广泛存在于包括乳腺癌在内的多种实体肿瘤中^[2]。缺氧微环境是恶性肿瘤增殖、浸润和转移的始动因素^[5]。本研究发现缺氧组裸鼠移植瘤出现的时间明显早于常氧组, 且移植瘤体积明显大于常氧组, 由此说明缺氧对乳腺癌细胞的成瘤性具有促进作用。在缺氧微环境下, 癌细胞利用各种代谢途径, 如激活 HIF, 来弥补缺氧状态并适应肿瘤微环境^[4]。HIF-2 是一个二聚的蛋白复合体, 是 HIF 家族的第二个成员, 在机体应对缺氧反应时发挥着不可或缺的作用, HIF-2 由 2 个不同亚基组成^[6]。其中之一便是 HIF-2 α , 它对促进肿瘤血管生成、调节增殖凋亡及诱导侵袭转移至关重要^[5]。有研究发现, HIF-2 α 基因表达与乳腺癌细胞增殖呈正相关^[7]。ABCG2 是 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运超家族中 G 亚族的第二个成员, XIANG 等^[8] 研究发现, 乳腺浸润性导管癌中, HIF-2 α 的表达与 ABCG2 的表达呈正相关。此外, XIANG 等^[9] 发现, 在乳腺浸润性导管癌中, ABCG2 与 Her-2

表达、临床分期相关, ABCG2 可能是一个预测生物学行为、疾病进展、预后及化疗有效性的潜在指标^[9]。本研究中, Western blot 及 RT-PCR 的定量检测发现缺氧组的 HIF-2 α 、ABCG2 及 mRNA 相对表达水平均明显高于常氧组, 由此猜想缺氧条件诱导 HIF-2 α 表达水平增加, 随后 ABCG2 表达上调, 进而促进肿瘤细胞的增殖。本研究结果与以往的研究结果^[10] 相符。

缺氧是肿瘤发生和转移的共同特征, 而血管生成在肿瘤生长和进展中起着重要作用, 报道发现, HIF-2 α 在非小细胞肺癌、子宫内膜癌、头颈部鳞癌、星型细胞瘤、结直肠癌、胆囊癌、乳腺癌等多种肿瘤中过表达。在这些血管化的肿瘤中, HIF-2 α 的表达与血管生成因子, 如 VEGF、EGF 的表达呈正相关, 进一步提示 HIF-2 α 在肿瘤血管生成过程中具有关键作用^[11]。另有研究表明, 缺氧情况下, 转录因子 HIF-1 通过反向激活 VEGF 启动子, 促使 VEGF mRNA 表达水平增高^[12]。在许多肿瘤中, EGF 信号被认为是一种正向调节 VEGF 生成的血管生成诱导因子^[13-15]。NICOLAS 等^[12] 发现, 低氧及 EGF 两种刺激通过不同的信号通路引起 VEGF 表达和分泌水平增加, 在人胶质瘤细胞中, EGFR 是缺氧反应的一个下游中介^[16]。本研究中, Western blot 及 RT-PCR 的定量检测发现缺氧组 MSDCs 中的 EGF、VEGF 蛋白及 mRNA 相对表达水平均明显高于常氧组, 由此猜想缺氧引起 HIF-2 α 、EGF、VEGF 的表达水平增加, 而 EGF 的表达增加使 VEGF 表达进一步增加, 从而促进肿瘤细胞的增殖。

综上所述, 缺氧微环境下, 乳腺癌细胞 MSs 成瘤性更强, 这可能与 HIF-2 α 、ABCG2、VEGF、EGF 共同参与了肿瘤的血管生成有关, 这也为乳腺癌抗血管生成治疗提供了依据。

参考文献

- [1] 范原铭, 侯婧, 董宁, 等. 人乳腺癌细胞微球体生物学特性研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(4): 456-458.
- [2] LUO W, WANG Y. Hypoxia Mediates tumor malignancy and therapy resistance[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1136: 1-18.
- [3] CORTER ARDEN L, REUBEN B, DAVID P, et al. Predicting non-adherence to adjuvant endocrine therapy in women with early stage breast cancer [J]. Psycho oncology, 2018, 27(9): 2096-2103.
- [4] HAJIZADEH F, OKOYE I, ESMAILY M, et

- al. Hypoxia inducible factors in the tumor microenvironment as therapeutic targets of cancer stem cells[J]. *Life Sci*, 2019, 237: 116952.
- [5] GARVALOV B K, ACKER T. Implications of oxygen homeostasis for tumor biology and treatment[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 903: 169-185.
- [6] BEFANI C, LIAKOS P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(12): 9087-9098.
- [7] 李娜, 王洪兴, 张洁, 等. siRNA 干扰缺氧诱导因子-2 α 对乳腺癌细胞增殖能力的影响[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(1): 6-9.
- [8] XIANG L, LIU Z H, HUAN Q, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α is associated with ABCG2 expression, histology-grade and Ki67 expression in breast invasive ductal carcinoma[J]. *Diagn Pathol*, 2017, 7: 32.
- [9] XIANG L, SU P, XIA S, et al. ABCG2 is associated with HER-2 Expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma[J]. *Diagn Pathol*, 2011, 6: 90.
- [10] STIEHL D P, BORDOLI M R, ABREU-RODRÍGUEZ I, et al. Non-canonical HIF-2 α function drives autonomous breast cancer cell growth via an AREG-EGFR/ErbB4 autocrine loop[J]. *Oncogene*, 2018, 31(18): 2283-2297.
- [11] BEFANI C, LIAKOS P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(12): 9087-9098.
- [12] NICOLAS S, ABDELLATEF S, HADDAD M A. Hypoxia and EGF stimulation regulate VEGF expression in human glioblastoma multiforme (GBM) cells by differential regulation of the PI3K/Rho-GTPase and MAPK pathways[J]. *Cells*, 2019, 8(11): E1397.
- [13] LIANG X, DING Y, LIN F, et al. Overexpression of ERBB4 rejuvenates aged mesenchymal stem cell and enhances angiogenesis via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway[J]. *FASEB J*, 2018, 33(3): 4559-4570.
- [14] PETIT A M, RAK J, HUNG M C, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors[J]. *Am J Pathol*, 2017, 151(6): 1523-1530.
- [15] NAGANE M, COUFAL F, LIN H. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2016, 56(21): 5079-5086.
- [16] STEINBACH J P, KLUMPP A, WOLBURG H. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death[J]. *Cancer Res*, 2015, 64(5): 1575-1578.

(收稿日期: 2020-03-08 修回日期: 2020-05-12)

(上接第 2996 页)

- [16] RAY P, GUHA D, CHAKRABORTY J, et al. Crocetin exploits p53-induced death domain (PIDD) and FAS-associated death domain (FADD) proteins to induce apoptosis in colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32979.
- [17] WILLIAMS K, CHRISTENSEN J, RAPPILBER J, et al. The histone lysine demethylase JMJD3/KDM6B is recruited to p53 bound promoters and enhancer elements in a p53 dependent manner[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96545.
- [18] WU H, BAI H, DUAN S, et al. Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 deteriorates hepatic ischemia-reperfusion injury through ROS/JNK/P53 signaling in mice[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2712185.

(收稿日期: 2020-03-15 修回日期: 2020-05-11)