

• 论 著 •

HIF-2 α 表达对低氧环境下胃癌细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响

郭培玲, 马 铭, 闫兰芳, 陈双艳, 赵富锋, 陈 蓉[△]

四川省成都市双流区第一人民医院/四川大学华西空港医院医学检验科, 四川成都 610200

摘 要:目的 探讨抑制缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)表达对人胃癌细胞株 BGC823 低氧状态下细胞增殖、凋亡和周期的影响。方法 利用氯化钴诱导的人胃癌细胞株 BGC823 作为研究对象, 构建 HIF-2 α 小干扰 RNA(siRNA)特异性载体, 转染低氧环境下的 BGC823 细胞, 采用 RT-PCR 和免疫印迹法(Western blot)分别检测转染前后细胞中 HIF-2 α mRNA 和蛋白表达, CCK-8 法检测转染前后 BGC823 细胞增殖情况, 流式细胞术检测转染前后 BGC823 细胞凋亡和细胞周期分布情况。结果 低氧诱导下, BGC823 细胞 HIF-2 α 表达显著增多。低氧环境下, 特异性转染 HIF-2 α siRNA 于 BGC823 细胞后, HIF-2 α mRNA 和蛋白表达水平均受到明显抑制, 细胞增殖能力降低, 凋亡率升高, 分布于 G2 期细胞比例升高($P<0.05$)。结论 低氧环境下 BGC823 细胞表达 HIF-2 α 增多, 通过特异性 HIF-2 α siRNA 下调低氧环境下 BGC823 细胞中 HIF-2 α 基因表达, 能够抑制 BGC823 细胞增殖, 改变细胞周期分布并诱导其凋亡, 为胃癌分子靶向治疗提供新的证据。

关键词: 缺氧诱导因子-2 α ; 胃癌; 小干扰 RNA; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.019

中图法分类号:R735.2

文章编号:1673-4130(2021)08-0975-04

文献标志码:A

Effects of downregulation of HIF-2 α gene on proliferation, apoptosis and cell cycle of gastric cancer cells induced by hypoxia

GUO Peiling, MA Ming, YAN Lanfang, CHEN Shuangyan, ZHAO Fufeng, CHEN Rong[△]

Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Shuangliu District/ West China (Airport) Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610200, China

Abstract: **Objective** To explore the effects of hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) genes on under hypoxia on proliferation, apoptosis, and cell cycle distribution of human gastric cancer cell BGC823. **Methods** Human gastric cancer cell BGC823 induced by cobalt chloride (CoCl₂) was selected as the research objects, small interfering RNA (siRNA) specific carrier HIF-2 α was constructed, BGC823 cells under hypoxia was transfected. Real-time PCR and Western blot method were used in the detection of HIF-2 α mRNA and protein expression before and after transfection in each group, CCK-8 method was used to detect the proliferation of BGC823 cells before and after transfection. Apoptosis rate and distribution of cell cycle of BGC823 cells before and after transfection were detected by flow cytometry. **Results** Under hypoxia, HIF-2 α expression significantly increased in BGC823 cells. After specific transfection of HIF-2 α siRNA in BGC823 cells, HIF-2 α mRNA and protein expression levels had been significantly inhibited, cell proliferation had decreased, apoptosis rate had increased, ratio of cells in the G2 phase had increased ($P<0.05$). **Conclusion** Expression of HIF-2 α increases in BGC823 cells under hypoxia. Specific siRNA can be cut by HIF-2 α gene expression in BGC823 cells under hypoxia. Down regulation of HIF-2 α gene expression in BGC823 cells under hypoxia by specific siRNA could inhibit the proliferation of BGC823 cells, change cell cycle distribution and induce apoptosis, which provides new evidence for molecular targeted therapy of gastric cancer.

Key words: hypoxia induced factors 2 α ; gastric cancer; small interfering RNA; cell apoptosis

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 每年约有 100 万新发胃癌病例, 病死率在恶性肿瘤中位居第二^[1]。作为典型的实体肿瘤之一, 胃癌能够在短期内快速增长

导致肿瘤组织内部存在缺血、缺氧区^[2]。局部缺氧是胃癌发生发展的重要环节, 肿瘤细胞在缺氧环境下形成一系列补偿机制以适应低氧微环境, 从而促进肿瘤

作者简介: 郭培玲, 女, 主管技师, 主要从事感染性疾病和肿瘤的实验室诊断及分子机制方面的研究。 [△] **通信作者,** E-mail: 1752832966@qq.com。

本文引用格式: 郭培玲, 马铭, 闫兰芳, 等. HIF-2 α 表达对低氧环境下胃癌细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(8): 975-978.

增长^[3-4]。在胃癌适应缺氧的补偿机制中,缺氧诱导因子- α (HIF- α) 起主导作用,其中作用最显著的是 HIF-1 α 和 HIF-2 α ^[5]。HIF-1 α 及 HIF-2 α 的阳性表达均能够通过诱导局部缺氧环境的形成,加剧癌细胞核 DNA 的转录速度,提高癌细胞的浸润和黏附能力^[6]。现有的研究主要报道了 HIF-2 α 在如小细胞肺癌^[7]、结肠癌^[8]、肝癌^[9] 等癌症中的作用。有关 HIF-2 α 在胃癌中的研究相对较少。因此,本文旨在应用特异性 HIF-2 α 小干扰 RNA (siRNA) 下调低氧诱导下胃癌细胞 BGC823 中 HIF-2 α 的表达,探讨 HIF-2 α 对低氧环境下胃癌 BGC823 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响,为胃癌分子靶向治疗提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人胃癌细胞株 BGC823 购自中国科学院上海生科院细胞资源中心;RPMI1640 细胞培养基、胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;HIF-2 α siRNA 由上海吉玛股份有限公司设计并合成;Lipo 6000 转染试剂、Trizol RNA 提取试剂盒、CCK-8 分析试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞低氧培养 胃癌 BGC823 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液 (37 °C 培养箱, 5% 的 CO₂) 培养,胰酶消化传代。低氧环境采用 200 μ mol/L 氯化钴 (CoCl₂) 诱导,细胞于低氧环境中培养 24 h 后收集用于检测。

1.2.2 细胞转染与分组 细胞低氧诱导培养后,细胞融合度达到 85% 左右时,在 Lipo 6000 脂质体介导下转染细胞。试验分为 3 组,即 BGC823 常氧培养组, BGC823 低氧诱导组与 BGC823 (HIF-2 α -/-) 低氧诱导组。

1.2.3 RT-PCR 检测 HIF-2 α mRNA 表达 收集转染 48 h 后的各组细胞,按照 Trizol RNA 提取试剂盒说明书步骤操作,逆转录成 cDNA, RT-PCR 方法检测各组细胞中 HIF-2 α mRNA 表达。试验均重复检测 3 次,计算 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算分析。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞消化后制备成细胞悬液,以 2×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,贴壁过夜。每组各设 6 个复孔,在培养 24、36、48、60、72 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,孵育 3 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值 ($A_{450 \text{ nm}}$),绘制细胞生长曲线分析细胞增殖情况。

1.2.5 PI 单染检测细胞周期 收集各组对数生长期细胞,用细胞筛过滤,磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤 2 次,计数 1×10^5 个细胞,加入 75% 预冷乙醇 4 °C 固定过夜,加入 5 μ L PI 染色液,轻摇 10 min 避光混匀后,上流式细胞仪进行周期变化检测。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡情况 收集各组对数生长期细胞,用细胞筛过滤, PBS

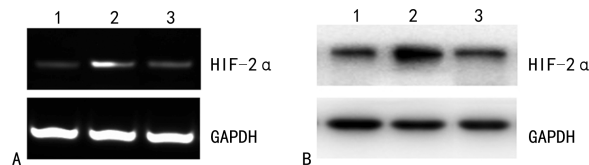
洗涤 2 次,计数 2×10^5 个细胞,加入 0.3 mL Binding buffer 重悬细胞,再加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,避光温育 15 min,加入 400 μ L Binding buffer,流式细胞仪检测凋亡细胞的百分比。

1.2.7 免疫印迹法 (Western blot) 检测各组细胞中 HIF-2 α 蛋白的表达情况 收集对数生长期细胞,裂解细胞提取总蛋白,二喹啉甲酸 (BCA) 法对蛋白进行定量,100 °C 下变性 5 min。将样本等量上样至 12% 的 SDS-PAGE 凝胶,电泳分离蛋白后恒流转至 PVDF 膜,5% 脱脂乳粉封闭 2 h,分别加入稀释的一抗 4 °C 振荡孵育过夜, TBST 漂洗后室温振荡孵育二抗 60 min, ECL 试剂盒显色,凝胶成像分析仪扫描,计算灰度值,比对各组 HIF-2 α 蛋白的表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

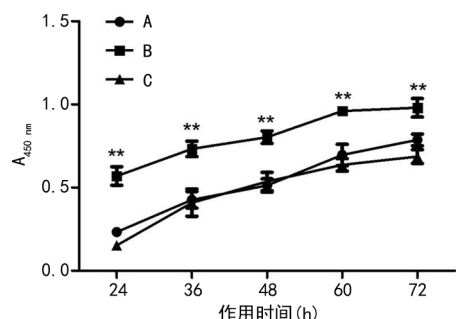
2.1 低氧诱导 HIF-2 α 基因和蛋白的表达 RT-PCR 结果显示, BGC823 常氧培养组中细胞在常氧环境下有少量 HIF-2 α mRNA 和蛋白表达。 BGC823 低氧诱导组中细胞在 CoCl₂ 诱导的低氧环境下 HIF-2 α mRNA 和蛋白表达显著上调,与 BGC823 常氧培养组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 BGC823 (HIF-2 α -/-) 低氧诱导组中特异性转染 HIF-2 α siRNA 后细胞在低氧环境下 HIF-2 α mRNA 和蛋白表达显著下调,与 BGC823 低氧诱导组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 BGC823 常氧培养组与 BGC823 (HIF-2 α -/-) 低氧诱导组比较, HIF-2 α mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。



注:1 为 BGC823 常氧培养组;2 为 BGC823 低氧诱导组;3 为 BGC823 (HIF-2 α -/-) 低氧诱导组。A 为 RT-PCR 法检测各组细胞中 HIF-2 α mRNA 的表达情况;B 为 Western blot 检测各组细胞中 HIF-2 α 蛋白的表达情况;GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 1 RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞中 HIF-2 α mRNA 和蛋白的表达情况

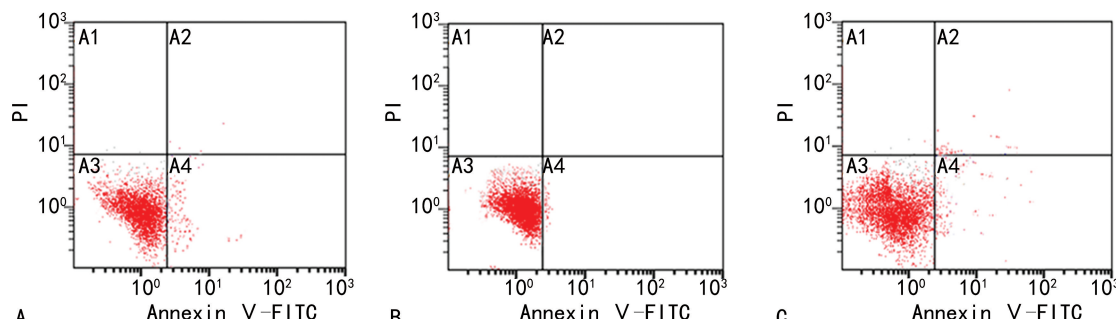
2.2 各组 BGC823 细胞的增殖情况 CCK-8 法检测结果显示,与 BGC823 常氧培养组相比, BGC823 低氧诱导组细胞在 24、36、48、60、72 h 时间点的 $A_{450 \text{ nm}}$ 均显著升高 ($P < 0.01$)。与 BGC823 低氧诱导组相比, BGC823 (HIF-2 α -/-) 低氧诱导组对应时间点的 $A_{450 \text{ nm}}$ 均显著降低 ($P < 0.05$)。 BGC823 (HIF-2 α -/-) 低氧诱导组与 BGC823 常氧培养组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。



注:A 为 BGC823 常氧培养组;B 为 BGC823 低氧诱导组;C 为 BGC823(HIF-2 α -/-)低氧诱导组;与 BGC823 常氧培养组比较, ** $P<0.01$ 。

图 2 CCK-8 法检测各组细胞的增殖情况

2.3 各组 BGC823 细胞在细胞周期中 G2 期细胞所占比例 流式细胞仪检测结果显示,BGC823 常氧培



注:A 为 BGC823 常氧培养组;B 为 BGC823 低氧诱导组;C 为 BGC823(HIF-2 α -/-)低氧诱导组。

图 3 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况

3 讨 论

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,据统计胃癌居全球恶性肿瘤发病率的第 5 位,病死率居第 3 位,在亚洲胃癌病死率仅次于肺癌,给患者带来巨大的卫生经济负担^[10]。由于胃癌起病比较隐匿、无明显特异性症状,缺乏精准的早期诊断技术,在发现时常已是中晚期,晚期胃癌患者 5 年生存率仅为 5%~17%,严重影响了人类的生命健康^[11]。目前,外科手术和放化疗仍然是主要的治疗手段,但是 30%~40% 的胃癌患者在初诊时就失去了根治手术的机会,长期使用化疗药物又普遍出现耐药现象,导致整体治疗效果有限。因此,深入探索胃癌发生、发展的相关机制,有助于寻求新的诊断、预防及治疗策略。

胃癌属于实体瘤,在肿瘤细胞快速增殖与血管新生滞后等多重因素共同作用下,实体瘤内部普遍存在低氧区域。低氧环境可进一步诱导肿瘤细胞产生 HIFs,HIFs 可通过调控血管内皮生长因子(VEGF)的表达从而诱导肿瘤产生新生血管^[12]。HIFs 包括 HIF-1、HIF-2 和 HIF-3,其中以 HIF-1 的研究居多,HIF-2 次之。HIF-2 是由相关学者克隆出的一种含有 bHLH、PAS 域的细胞因子,HIF-2 α 是 HIF-2 的功能性亚基和活性亚基,包括 15 个外显子和 14 个内含子,基因长约 120 kb,相对分子质量为 96.5 ×

养组细胞周期中 G2 期细胞占比为 23.73%,BGC823 低氧诱导组细胞 G2 期细胞占比为 20.25%,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。BGC823(HIF-2 α -/-)低氧诱导组细胞 G2 期细胞占 25.52%,明显高于 BGC823 低氧诱导组($P<0.05$)。

2.4 各组 BGC823 细胞的凋亡情况比较 流式细胞仪检测结果显示,与 BGC823 常氧培养组相比,BGC823 低氧诱导组细胞凋亡比例显著降低($P<0.05$)。与 BGC823 低氧诱导组相比,BGC823(HIF-2 α -/-)低氧诱导组细胞凋亡比例显著升高($P<0.05$)。BGC823(HIF-2 α -/-)低氧诱导组与 BGC823 常氧培养组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

10³[13]。缺氧条件可激活 HIF-2 α 的转录活性,参与肿瘤细胞的血管生成、侵袭转移及放化疗抵抗。MIZOKAMI 等^[14]在研究胃癌及正常胃黏膜上皮组织中 HIF-2 α mRNA 及蛋白的表达时,发现 HIF-2 α 在胃癌组织的表达明显高于正常胃黏膜上皮组织,提示 HIF-2 α 与胃癌关系密切。GRIFFITHS 等^[15]在研究 HIF-2 α 与胃癌患者预后的关系时,发现 HIF-2 α 在多变量分析中没有独立的预后意义,不能作为一种常规的预后指标。吴友亮等^[16]研究发现在胃癌患者中 HIF-2 α 的阳性表达率平均提高 45%,且在合并远处转移的患者中,阳性表达率上升更为显著。这些研究已充分证实 HIF-2 α 与胃癌发生、发展关系密切,但是其具体调控机制尚未完全清楚。

在探索 HIF-2 α 与胃癌的信号通路的研究中,WANG 等^[17]发现 JNK 抑制剂能够阻断 HIF-1 α 和 HIF-2 α 的表达,提示 HIF-2 α 通过 JNK 信号通路参与抑制胃癌细胞的侵袭能力。在研究 HIF-2 α 与肿瘤血管生成的关系中,WU 等^[18]指出在非小细胞肺癌中 HIF-2 α 与 VEGF 共同主导肿瘤血管生成过程。但 SONG 等^[19]指出缺氧环境下胃癌中 VEGF 和葡萄糖代谢相关基因表达的是 HIF-1 α 和 HIF-1 β ,而不是 HIF-2 α 。但是,HIF-2 α 在肿瘤组织和血管内皮的表达比 HIF-1 α 更强烈^[20],因此以 HIF-2 α 为靶点的抗

癌研究仍然具有深远的价值。

本研究通过模拟胃癌低氧环境,发现 BGC823 低氧诱导组细胞增殖速度与常氧培养组比较明显升高,低氧环境可显著促进 BGC823 细胞的 HIF-2 α 蛋白的表达,这与相关研究报道相一致^[21]。肿瘤的进展离不开肿瘤细胞的过度增殖和凋亡减弱,并与细胞周期的调控异常有密切关系。细胞周期遵循 G1-S-G2-M 的发展规律,细胞一旦从 G1 期跨入 S 期则不再依靠外来信息刺激而自动完成分裂过程^[22]。本研究通过 siRNA 技术下调 BGC823 细胞中 HIF-2 α 的表达后能够促进细胞凋亡。与 BGC823 低氧诱导组相比,BGC823(HIF-2 α -/-)低氧诱导组细胞的凋亡比例升高,其机制可能与低氧环境中 HIF-2 α 低表达能够阻滞肿瘤细胞在 G2 期有关。

综上所述,本研究结果提示 HIF-2 α 表达情况影响低氧环境下胃癌细胞增殖、凋亡和细胞周期。下调 HIF-2 α 表达可通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡,来减缓胃癌的恶性发展。

参考文献

- [1] SONG Z, WU Y, YANG J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7):1010428317714626.
- [2] TSAI C K, YEH T S, WU R C, et al. Metabolomic alterations and chromosomal instability status in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(33):3760-3769.
- [3] 梁明坤,梁杏秋,钟静,等.以 DNA 甲基化为靶标的中药治疗胃癌研究进展[J].中华中医药学刊,2020,38(7):47-54.
- [4] MACKLIN P S, MCAULIFFE J, PUGH C W, et al. Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta[J]. Placenta, 2017, 56:8-13.
- [5] MAJUMDAR A J, WONG W J, SIMON M C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress[J]. Mol Cell, 2010, 40(2):294-309.
- [6] JIANG X, ZHANG S, YIN Z, et al. The correlation between NEDD4L and HIF-1 α levels as a gastric cancer prognostic marker[J]. Int J Med Sci, 2019, 16(11):1517-1524.
- [7] KROTOVA K, PATEL J M, BLOCK E R, et al. Hypoxic upregulation of arginase II in human lung endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(6):C1541-C1548.
- [8] IMAMURA T, KIKUCHI H, HERRAIZ M T, et al. HIF-1 α and HIF-2 α have divergent roles in colon cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 124(4):763-771.
- [9] PANGOU E, BEFANI C, MYLONIS I, et al. HIF-2 α phosphorylation by CK1 δ promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia[J]. J Cell Sci, 2016, 129(22):4213-4226.

- [10] SASAKO M, SAKURAMOTO S, KATAI H, et al. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(33):4387-4393.
- [11] 林建姣,刘艳,许育君,等.血清 miR-188-3p 诊断胃癌的临床价值研究[J].现代消化及介入诊疗,2020,25(8):1115-1118.
- [12] RATTNER A, WILLIAMS J, NATHANS J. Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain[J]. J Clin Invest, 2019, 129(9):3807-3820.
- [13] EMA M, TAYA S, YOKOTANI N, et al. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor-1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development[J]. PNAS, 1997, 94(9):4273-4278.
- [14] MIZOKAMI K, KAKEJI Y, ODA S, et al. Clinicopathologic significance of hypoxia inducible factor 1 α overexpression in gastric carcinomas[J]. J Surg Oncol, 2006, 94(2):149-154.
- [15] GRIFFITHS E A, PRITCHARD S A, MCGRATH S M. Hypoxia-associated markers in gastric carcinogenesis and HIF-2 in gastric and gastro-oesophageal cancer prognosis[J]. British J Cancer, 2008, 98(5):965-973.
- [16] 吴友亮,胡玲娜,郑成德,等.缺氧诱导因子 1 α 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J].中华医学杂志,2016,96(18):1418-1423.
- [17] WANG Y, LI Z, ZHANG H, et al. HIF-1 α and HIF-2 α correlate with migration and invasion in gastric cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(4):376-382.
- [18] WU X H, QIAN C, YUAN K. Correlations of hypoxia-inducible factor-1 α /hypoxia-inducible factor-2 α expression with angiogenesis factors expression and prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Chin Med J, 2011, 124(1):11-18.
- [19] SONG I S, WANG A G, YOON S Y, et al. Regulation of glucose metabolism-related genes and VEGF by HIF-2 α and HIF-1 β , but not HIF-2 β , in gastric cancer[J]. Exp Mol Med, 2009, 41(1):51-58.
- [20] 吴海滨,张乐鸣. HIF-1 及 HIF-2 与胃癌关系的研究进展[J].现代实用医学,2012,24(1):117-119.
- [21] SPIRINA L V, USYNIN Y A, YURMAZOV Z A, et al. Transcription factors NF- κ B, HIF-1, HIF-2, growth factor VEGF, VEGFR2 and carbonic dehydrase IX mRNA and protein level in the development of kidney cancer metastasis[J]. Mol Biol (Mosk), 2017, 51(2):372-377.
- [22] SCHIPPER D L, WAGENMANS M J, PETERS W H, et al. Correlation between iododeoxyuridine and MIB-1 labelling index in gastric carcinoma and adjacent normal gastric tissue[J]. Anticancer Res, 2000, 20(2A):707-714.