

CoCl₂ 缺氧诱导 SW480 细胞化疗耐药及其机制

谭泽明¹, 伍莹¹, 张华莉², 肖献忠^{2,*}

(1. 中南大学湘雅医学院临床医学七年制 2000 级学生;

2. 中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 长沙 410078)

[摘要] 目的:研究不同程度的 CoCl₂ 化学缺氧条件下 SW480 细胞的生长情况及对氟尿嘧啶 (fluorouracil, FU) 的敏感性, 以及缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 和诱导型血红素氧化酶 (heme oxygenase-1, HO-1) 基因在缺氧条件下的表达, 以探讨缺氧条件下导致肿瘤细胞耐药的机制。方法:采用四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法测定不同 CoCl₂ 浓度下 SW480 细胞的生长情况及化疗药物 FU 对 SW480 细胞的生长抑制作用;采用逆转录聚合酶链反应检测 HIF-1 α 和 HO-1 mRNA 在缺氧条件下的表达。结果:MTT 结果显示, 随着 CoCl₂ 浓度增加, SW480 细胞的增殖速度减慢, FU 对 SW480 的杀伤作用降低。RT-PCR 结果显示, CoCl₂ 化学缺氧处理使 HIF-1 α 和 HO-1 mRNA 表达上调, 并呈较好的剂量和时间依赖性关系。结论:CoCl₂ 诱导的体外缺氧可以减缓 SW480 细胞的生长速度, 并降低 SW480 细胞对 FU 的敏感性, 其机制可能与 HIF-1 α 及 HO-1 的表达上调有关。

[关键词] 缺氧; 二氯化钴; SW480 细胞; 缺氧诱导因子-1 α ; 血红蛋白氧化酶-1; 化疗耐药性

[中图分类号] R730.23 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2006)03-0345-05

CoCl₂-induced chemotherapy resistance in SW480 cells and its mechanism

TAN Ze-ming¹, WU Ying¹, ZHANG Hua-li², XIAO Xian-zhong^{2,*}

(1. Medical Student of Seven-year Program, Grade 2000, Xiangya School of Medicine, Central South University;

2. Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract : Objective To observe the proliferation of SW480 cells exposed to different concentrations of CoCl₂, and to examine the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and heme oxygenase-1 (HO-1) during hypoxia to explore the chemotherapy resistance effect and role of HIF-1 α and HO-1. **Methods** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the proliferation of SW480 cells in the presence of fluorouracil (FU). RT-PCR was applied to examine the expression of HIF-1 α and HO-1 mRNA in hypoxia. **Results** SW480 cells were proliferated at a slow rate, and had a strong resistance to FU with the increase of CoCl₂. RT-PCR showed that the up-regulated expression of HIF-1 α and HO-1 mRNA was consistent with the dose-effect curve and time-effect curve. **Conclusion** The hypoxia induced by CoCl₂ can inhibit the proliferation of SW480, and it can also decrease the sensitivity of the cell to FU. The mechanism is probably related to the up-regulated expression of HIF-1 α and HO-1 mRNA.

Key words : hypoxia; CoCl₂; hypoxia inducible factor-1 α ; heme oxygenase-1; chemotherapy resistance effect

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(3):0345-05]

自20世纪50年代Thomlinson^[1]发现肿瘤缺氧现象至今,随着缺氧检测技术的不断发展和完善,越来越多的证据表明缺氧普遍存在于人类肿瘤中。缺氧作为恶性实体瘤的特征之一,不仅改变了肿瘤细胞的生物学特性,导致肿瘤细胞的遗传不稳定性及恶性选择,而且也是肿瘤对放、化疗产生抗性的主要原因之一。但是缺氧引起肿瘤细胞耐药性的机制并不十分清楚。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物及人体的一种转录因子^[2]。许多研究表明,HIF-1 α 在动物及人体许多肿瘤组织中大量表达,它除了在肿瘤细胞耐受缺氧方面起重要作用外,也能调节肿瘤细胞的凋亡及降低缺氧肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[3]。本研究采用CoCl₂处理SW480细胞模拟结肠癌在体内的缺氧环境,观察缺氧条件下SW480细胞的生长情况及对氟尿嘧啶(flourouracin, FU)的敏感性,并进一步检测HIF-1 α 及其调控的基因HO-1在缺氧条件下的表达,以探讨缺氧导致肿瘤细胞耐药的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

主要采用CoCl₂(上海生物工程技术服务有限公司),RPMI-1640培养基(Gibco产品),新生小牛血清(中南大学湘雅医学院细胞中心产品),MTT,二甲亚(Dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma公司),FU(上海旭东海普药业有限公司),Trizol(美国GIBCO公司),TaqDNA聚合酶,AMV逆转录酶(Takara公司)(宝生物公司),CO₂培养箱(美国Thermo Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator),PCR引物由上海博亚生物公司合成,高速冷冻离心机(国产GL20A),电泳仪(国产DYY-III7B)及PCR仪(英国HYBAID)。

1.2 细胞培养

结肠癌细胞株SW480购自中南大学湘雅医学院细胞中心。SW480细胞用含10%新生小牛血清的RPMI 1640培养基,置37℃,5% CO₂混合气体的孵育箱中培养。

1.3 SW480细胞生长曲线的测定

收集细胞制成悬液,加入96孔培养板中(每孔细胞数约5000个),移入CO₂孵育箱培养8h贴壁,用含不同浓度的CoCl₂(0,50,100,150,200 μ mol/L)1640培养液培养各组细胞,其中0 μ mol/L CoCl₂为对照组,另设空白组(无细胞)。每组复孔6个,在37℃5% CO₂培养箱中培养1~6d。吸去培养液,每孔加入MTT溶液(5g/L)20 μ L,37℃反应4

h,吸去孔内培养基,再加入DMSO 180 μ L,充分溶解后在酶标仪570 nm下测吸光度OD值,再以OD值作图。

1.4 肿瘤细胞生长抑制率的测定

采用MTT法检测FU(50 mg/L)对SW480细胞生长的抑制作用。收集细胞制成悬液,加入96孔培养板中(每孔细胞数约5 \times 10⁴),移入CO₂孵育箱培养8h贴壁,然后用不同浓度的CoCl₂(0,100,200 μ mol/L)处理各组细胞,每个浓度设6个复孔,并设对照孔(未加药物)和空白孔(无细胞),培养24h后加入FU(50 mg/L),继续培养48h,每孔加入MTT溶液(5g/L)20 μ L,37℃反应4h,吸去孔内培养基,再加入DMSO 180 μ L,充分溶解后在酶标仪570 nm下测吸光度(A)值,按下列公式计算细胞生长抑制率。

肿瘤抑制率(%) = [1 - (实验组平均A - 空白组平均A) / (对照组平均A - 空白组平均A)] \times 100%。

1.5 RT-PCR检测HIF-1和HO-1 mRNA的表达

SW480细胞按1 \times 10⁶个/瓶接种于100 mL培养瓶中,孵育24h待细胞贴壁后加CoCl₂。CoCl₂按0,50,100,150,200 μ mol/L浓度梯度分别处理8h,随后在CoCl₂ 200 μ mol/L浓度的基础上,选取0,2,4,8和24h时间点进行观测。在指定的时间收集细胞用Trizol提取总RNA。并用DNA酶I消化除去总RNA中的痕量DNA,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA,紫外分光光度计测量A_{260nm/280nm}比值。用AMV逆转录酶合成第一链,用1 μ L的逆转录产物作为模板进行PCR。HIF-1 α 引物序列:5'-GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC-3'和5'-GTTAACCTGATCCAAAGCTCTGAG-3',扩增片段为487 bp,退火温度为55℃(27个循环);HO-1引物序列:5'-CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3'和5'-GATGTTGAGCAGGAACGCAGT-3',扩增片段为550 bp,退火温度为60℃(27个循环)。选取 β -actin为内对照,引物如下:5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'和5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3',扩增片段为626 bp,退火温度为60℃(30个循环)。

2 结 果

2.1 缺氧条件下SW480细胞的生长情况

用CoCl₂模拟实体肿瘤在体内的缺氧环境,采用MTT测定SW480细胞的生长情况,发现对照组细胞生长曲线呈现比较明显的“S”形,1~3d为滞留期,

3~4 d 迅速进入对数增长期, 4 d 以后进入平台期; 经过 CoCl₂ 不同浓度处理后, 各组细胞生长曲线大致亦呈“S”形, 但是对数增长期提前, 对数期短, 生长速度减慢, 进入平台期较早及曲线低平(图1)。

2.2 FU 对缺氧 SW480 细胞的抑制作用 采用

MTT 法检测 FU 对 100, 200 μmol/L CoCl₂ 处理后的 SW480 细胞生长的抑制作用, 结果发现, 100 μmol/L 和 200 μmol/L CoCl₂ 处理 SW480 细胞后, FU 对细胞的生长抑制率分别为 (52.0299 ± 5.2888)% (43.3237 ± 6.8776)%, 明显低于未经 CoCl₂ 处理的对照组(图2)。

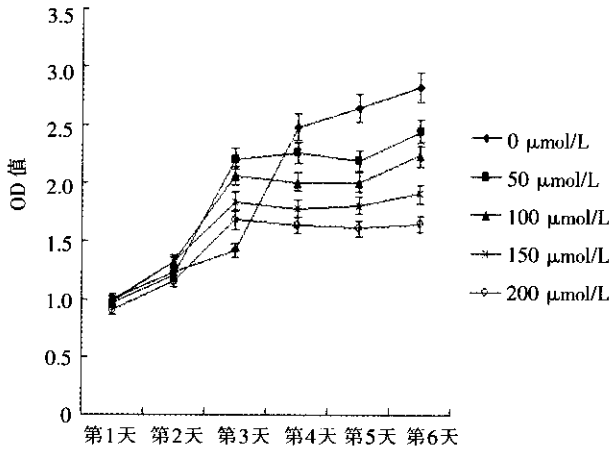


图1 不同 CoCl₂ 浓度下 SW480 的生长曲线

Fig.1 Growth curves of SW480 cells culture in medium containing different concentration of CoCl₂

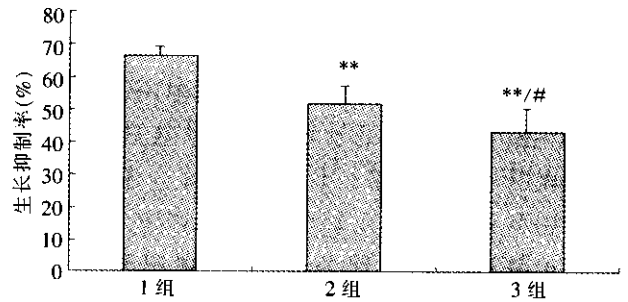


图2 FU 对缺氧 SW480 细胞的生长抑制率 1 组 :对照组 2 组 :100 μmol/L CoCl₂ 处理组 3 组 :200 μmol/L CoCl₂ 处理组 ;与对照组比较, * P < 0.001 (n = 6); 与 100 μmol/L CoCl₂ 处理组比较, # P < 0.05 (n = 6)

Fig.2 Growth inhibition ratio of FU to SW480 cells Group 1 : control group ; Group 2 : cultivate in medium containing 100 μmol/L CoCl₂ ; Group 3 : cultivate in medium containing 200 μmol/L CoCl₂ ; * * P < 0.01 (n = 6) vs Group 1 ; # P < 0.05 (n = 6) vs Group 2

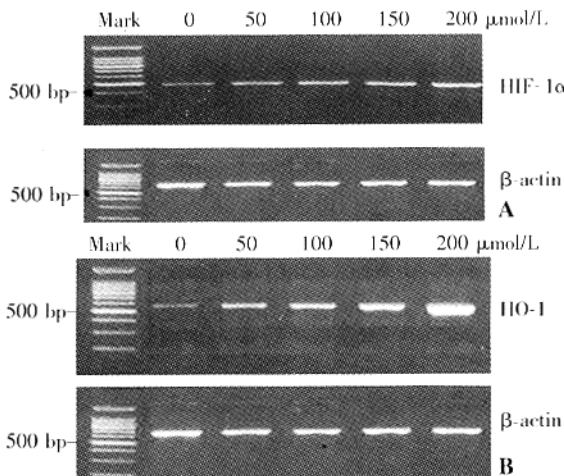


图3 不同浓度的 CoCl₂ 处理后 SW480 细胞 8 h 后检测 HIF-1α 和 HO-1 mRNA 的表达 A :HIF-1α mRNA ; B :HO-1 mRNA

Fig.3 HIF-1α and HO-1 mRNA levels of SW480 cells cultivated in the medium containing different concentration of CoCl₂ for 8 h A :HIF-1α mRNA ; B :HO-1 mRNA

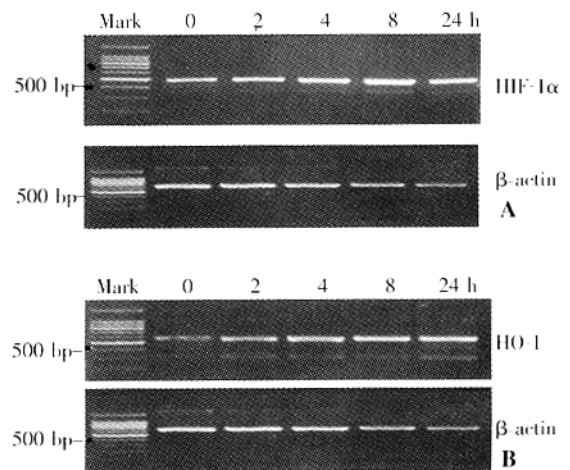


图4 200 μmol/L CoCl₂ 处理后 HIF-1α 和 HO-1 mRNA 的表达 A :HIF-1α mRNA β :HO-1 mRNA

Fig.4 HIF-1α and HO-1 mRNA levels of SW480 cells cultivated in the medium containing 200 μmol/L CoCl₂ for different time A :HIF-1α mRNA β :HO-1 mRNA

2.3 CoCl₂ 缺氧处理后 HIF-1 和 HO-1 mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示, 未经 CoCl₂ 处理的细胞中 HIF-1 α mRNA 和 HO-1 mRNA 水平很低, 随着 CoCl₂ 浓度增高, HIF-1 α mRNA 和 HO-1 mRNA 水平表达逐渐增加(图 3)。在 200 μ mol/L CoCl₂ 的作用下, 随着 CoCl₂ 作用时间的延长, HIF-1 α 和 HO-1 mRNA 的表达量亦有不同程度的上调(图 4)。CoCl₂ 与 HIF-1 α 和 HO-1 mRNA 表达间表现出较好的剂量和时间依赖性关系。

3 讨 论

结肠癌发生发展时, 随着实体瘤的增大, 肿瘤内部不能得到足够的血液供应, 导致局部处于缺血缺氧状态, 使肿瘤组织内局部氧分压改变。肿瘤细胞存在着对缺血缺氧的自身调节和适应, 其机制主要通过提高葡萄糖转运、糖酵解(Warburg 效应)及肿瘤血管形成, 另外, 细胞周期由增殖旺盛的 S 期向 G₁/G₀ 期转换。本实验中, 用 CoCl₂ 处理 SW480 细胞模拟肿瘤体内缺氧模型, 采用 MTT 法测定 SW480 细胞的生长曲线, 结果表明随着 CoCl₂ 浓度增加, SW480 细胞的增殖速度减慢。同时, 在不同的 CoCl₂ 浓度下观察 FU 对 SW480 细胞的杀伤作用, 发现经过 100 μ mol/L 和 200 μ mol/L CoCl₂ 处理后的 SW480 细胞对 FU 的敏感性下降, 说明缺氧增加了肿瘤细胞的耐药性。

回顾既往研究, 缺氧引起肿瘤对放、化疗产生抗性可能的机制有: (1) 缺氧肿瘤细胞生长缓慢或处于 G₀ 期的细胞; (2) 缺氧细胞由于远离血管, 导致获得的药物浓度降低; (3) 肿瘤内缺氧区域细胞内外形成一个相对“外酸内碱”的 pH 梯度, 抑制了弱碱类化合物在胞内的聚集; (4) 缺氧环境通过诱导基因点突变、缺失、DNA 链断裂和增加基因组的不稳定性等机制使一些原癌基因激活或抑癌基因失活, 如抑癌基因 p53 缺失、凋亡抑制蛋白 Bcl-2 过表达, 使肿瘤细胞凋亡减少, 从而对抗癌药物产生耐药性^[4,5]; (5) 经缺氧诱导表达的一系列蛋白或酶类能影响药物抗癌活性的发挥, 如 DT-硫辛酰胺脱氢酶, 葡萄糖调节蛋白的增加则分别会导致肿瘤对顺铂和多柔比星的抗性^[6,7], 缺氧诱导的多耐药基因 1 (multiple drug-resistance 1, MDR1) 的编码产物 P-糖蛋白是一种能量依赖性药物排出的跨膜蛋白, 它一旦与抗肿瘤药物相结合, 就会将药物从细胞内泵出细胞, 降低胞浆内药物的浓度从而产生耐药。

除此之外, 缺氧诱导表达的 HIF-1 α 在缺氧肿瘤细胞的耐药中发挥了重要作用。Piret 等^[8] 研究发现缺氧或氯化钴可以诱导 HIF-1 α 的表达, 进而抑制叔丁基过氧化氢或去血清引起的肝癌细胞的凋亡。Ghafar 等^[9] 发现前列腺癌细胞处于短期缺氧时, HIF-1 α 表达显著升高且对凋亡促进剂佛波酯的敏感显著降低。本研究发现, 受 HIF-1 α 调控的基因 HO-1 在缺氧的肿瘤细胞表达也上调。HO-1 是一个分子量 32kD 的热休克蛋白, 具有抗细胞凋亡作用^[10]。HO-1 在多种肿瘤细胞中过量表达被认为是肿瘤细胞适应较恶劣生长条件和放疗化疗抗性产生的主要原因之一。Berberat 等^[11] 通过小 RNA 干扰技术抑制 HO-1 基因表达, 证明可以增加胰腺癌细胞对放疗的敏感性。HO-1 和 p21 表达上调可以显著地降低乳头状甲状腺癌对凋亡刺激的敏感性, 及增加胃癌细胞的抗凋亡能力^[12,13]。HO-1 表达水平可以用于评价舌鳞状细胞癌向颈部淋巴结转移的能力^[14]。HO-1 基因启动子多态性与男性吸烟者肺腺癌, 及口腔鳞状细胞癌的发生相关, 其中长 (GT)_n 重复片段可以增加癌症发生的危险性, 短 (GT)_n 重复片段则对肿瘤细胞有保护作用^[15,16]。根据本研究结果, 作者认为缺氧环境中, HO-1 表达上调可能增加 SW480 细胞的抗凋亡能力, 从而对化疗药物产生抗性。可以进一步采用反义寡核苷酸技术干扰缺氧时 HO-1 的表达, 观察 FU 处理后 SW480 细胞的凋亡情况, 有助于探讨 HO-1 在缺氧诱导肿瘤细胞耐药中的作用。

参考文献:

- [1] Thomlinson RH. An experimental method for comparing treatments of intact malignant tumours in animals and its application to the use of oxygen in radiotherapy [J]. *Br J Cancer*, 1960, 14(6): 555-576.
- [2] Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(8): 345-350.
- [3] Fan LF, Diao LM, Chen DJ, et al. Expression of HIF-1 alpha and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer [J]. *Ai Zheng*, 2002, 21(3): 254-258.
- [4] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(4): 266-276.
- [5] Airley RE, Monaghan JE, Stratford IJ, et al. Hypoxia and disease: opportunities for novel diagnostic and therapeutic pro-drug strategies [J]. *Pharm J*, 2000, 264(7094): 666-

673.

- [6] Comerford KM , Wallace TJ , Karhausen J , et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance(MDR1) gene[J]. *Cancer Res* , 2002 , 62(12) : 3387-3394.
- [7] Wartenberg M , Ling FC , Muschen M , et al. Regulation of the multidrug resistance MDR transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species[J]. *FASEB J* , 2003 , 17(3) : 503-505.
- [8] Piret JP , Mottet D , Raes M , et al. CoCl₂ , a chemical inducer of hypoxia inducible factor-1 , and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG₂[J]. *Ann NY Acad Sci* , 2002 , 973(5) : 443-447.
- [9] Ghafar MA , Anastasiadis AG , Chen MW , et al. Acute hypoxia increases the aggressive characteristics and survival properties of prostate cancer cells[J]. *Prostate* , 2003 , 54(1) : 58-67.
- [10] Petrache I , Otterbein L E , Alam J , et al. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblast[J]. *Am J Physiol Lung Cell Physiol* , 2000 , 278(2) : 312-319.
- [11] Berberat PO , Dambrauskas Z , Gulbinas A , et al. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment[J]. *Clin Cancer Res* , 2005 , 11(10) : 3790-3798.
- [12] Liu ZM , Chen GG , Ng EK , et al. Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells[J]. *Oncogene* , 2004 , 23(2) : 503-513.
- [13] Chen GG , Liu ZM , Vlantis AC , et al. Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor- α and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells[J]. *J Cell Biochem* , 2004 , 92(6) : 1246-1256.
- [14] Yanagawa T , Omura K , Harada H , et al. Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas[J]. *Oral Oncol* , 2004 , 40(1) : 21-27.
- [15] Kikuchi A , Yamaya M , Suzuki S , et al. Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism[J]. *Hum Genet* , 2005 , 116(5) : 354-360.
- [16] Chang KW , Lee TC , Yeh WI , et al. Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers[J]. *Br J Cancer* , 2004 , 91(8) : 1551-1555.

(本文编辑 傅希文)

(上接第 344 页)

- [3] Zhao Y , You H , Liu F , et al. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells[J]. *Cancer Lett* , 2002 , 185(2) : 211-218.
- [4] 樊代明,何风田,聂永战,等. MG7 Ag 在胃癌细胞系 SGC 7901 及其耐药亚系中的表达及功能[J]. 解放军医学杂志, 2001 , 26(6) : 396-398.
- [5] Kang HC , Kim IJ , Park JH , et al. Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays[J]. *Clin Cancer Res* , 2004 , 10(1 Pt 1) : 272-284.
- [6] Sinha P , Poland J , Kohl S , et al. Study of the development of chemoresistance in melanoma cell lines using proteome analysis[J]. *Electrophoresis* , 2003 , 24(14) : 2386-2404.
- [7] 刘定胜,张广森. Celecoxib 对羟基脲抗 K562 细胞增殖作用的增敏效应和机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2004 , 29(5) : 495-499.
- [8] Kondo C , Onuki R , Kusuvara H , et al. Lack of improvement of oral absorption of ME3277 by prodrug formation is ascribed to the intestinal efflux mediated by breast cancer resistant protein (BCRP/ABCG2)[J]. *Pharm Res* , 2005 , 22(4) : 613-618.
- [9] 陈主初,梁宋平. 肿瘤蛋白质组学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2002. 1-7.
- [10] Meyers MB. Sorcin : a calcium-binding protein overproduced in many multidrug-resistant cells[A]. Smith VL , Dedman JR. Stimulus response coupling : the role of intracellular calcium-binding proteins[M]. Boca Raton : CRC Press , 1990. 159.
- [11] Lee WP. Purification , cDNA cloning and expression of human sorcin in vincristine-resistant HOB1 lymphoma cell lines[J]. *Arch Biochem Biophys* , 1996 , 325(2) : 217-226.
- [12] Parekh HK. Overexpression of sorcin , a calcium-binding protein , induces a low level of paclitaxel resistance in human ovarian and breast cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol* , 2002 , 62(6) : 1149-1158.

(本文编辑 陈丽文)