

# 缺氧对骨肉瘤细胞系 MG-63 HIF-1、p53、*bcl-2* 及细胞凋亡的影响

蔡文涛<sup>1\*</sup>, 陈安民<sup>1</sup>, 郭风劲<sup>1</sup>, 管 频<sup>2</sup>

Effect of Hypoxia on the Expression of Hypoxia Inducible Factor 1、p53、*bcl-2* and Apoptosis in Osteosarcoma Cell Line MG-63

CAI Wen-tao<sup>1\*</sup>, CHEN An-min<sup>1</sup>, GUO Feng-jin<sup>1</sup>, GUAN Pin<sup>2</sup>

1. Department of Orthopaedic, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (\* Present: Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311); 2. Hainan Provincial People's Hospital

Corresponding Author: CHEN An-min, E-mail: Cabbage7724 @Tom.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of hypoxia on the expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)、p53、*bcl-2* and apoptosis in osteosarcoma cell line MG-63 under hypoxia environment. **Methods** The hypoxia culture model was established by a hypoxia incubator. The gene productions of HIF-1、p53、*bcl-2* and the changes of the apoptosis were observed at different hypoxia culture phase. The semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to test the mRNA expression of HIF-1、p53 and *bcl-2*. The protein level of HIF-1、p53 and *bcl-2* was observed by immunohistochemical staining and western blot analysis. The changes of apoptosis were analyzed using flow cytometry. **Results** After the hypoxia treatment, the mRNA level of HIF-1 was not changed significantly, however, the protein expression of HIF-1 was increased remarkably with correspondence to the hypoxia time. But the expression of p53 and *bcl-2* were up-regulated in mRNA and protein level. Besides, the *bcl-2* activity was markedly associated with the level of HIF-1. However, the apoptosis rate was not increased markedly. **Conclusion** In hypoxia environment, the apoptosis of osteosarcoma cell line MG-63 could not induce by the p53 avenue which depended on HIF-1. The mechanism is possibly related with the mutation of p53 that increases the expression of HIF-1 and *bcl-2*.

**Key words:** Osteosarcoma; Hypoxia inducible factor-1; p53; *bcl-2*; Apoptosis

**摘要:** **目的** 了解缺氧环境对骨肉瘤 MG-63 细胞缺氧诱导因子 HIF-1、p53、*bcl-2* 的表达及细胞凋亡的影响。 **方法** 建立骨肉瘤细胞体外缺氧模型, 观察不同缺氧时间段 (8、16、24 h) HIF-1、p53、*bcl-2* 的表达和细胞凋亡的情况。半定量 RT-PCR 方法检测 HIF-1、p53、*bcl-2* 的表达水平; 免疫组化 (SP 法) 和免疫印迹 (Western Blot) 检测 HIF-1、p53、*bcl-2* 蛋白表达情况; 流式细胞仪检测细胞凋亡率。 **结果** 缺氧处理后, HIF-1 转录水平未见明显改变, 蛋白表达水平随缺氧时间延长明显增强; 而 p53、*bcl-2* mRNA 及蛋白表达水平均显著增强, 两者间存在一定的相关性; 细胞凋亡率却未见明显增加。 **结论** 在缺氧条件下, 不能通过以 HIF-1 为中介的 p53 依赖途径来诱导骨肉瘤 MG-63 细胞的凋亡, 其机制可能与缺氧诱导野生型 p53 的突变或缺失使 HIF-1 和 *bcl-2* 的过表达有关。

**关键词:** 骨肉瘤; 缺氧诱导因子-1; p53; *bcl-2*; 细胞凋亡

**中图分类号:** R738.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2007)08-0568-04

## 0 引言

缺氧是实体肿瘤组织内部普遍存在的现象。研

究表明缺氧可以诱导 HIF-1 正常表达的肿瘤细胞凋亡, 而在 HIF-1 表达缺失的肿瘤不可以, 反而导致肿瘤恶性程度的增高和转移的加快<sup>[1]</sup>。说明缺氧诱导的肿瘤细胞凋亡是通过 HIF-1 介导的。本实验研究缺氧条件下, 骨肉瘤 MG-63 细胞 HIF-1、p53、*bcl-2* 的表达水平以及对细胞凋亡的影响, 进一步了解肿瘤细胞逃避凋亡的机制, 为开展针对 HIF-1 介导的细胞凋亡途径的治疗提供理论依据。

收稿日期: 2006-06-02; 修回日期: 2006-12-14

基金项目: 国家 973 计划课题基金资助项目 (2002CB513107)

作者单位: 1. 430030 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科 (\*现工作单位: 570311 海南省人民医院骨病外科); 2. 海南省人民医院

通讯作者: 陈安民, E-mail: Cabbage7724 @Tom.com

作者简介: 蔡文涛 (1979-), 男, 硕士研究生, 医师, 主要从事骨肿瘤研究

1 材料与方法

1.1 材料

骨肉瘤细胞株 MG63 于武汉大学中国典型培养物保藏中心购得;新生牛血清、RPMI1640 培养基购于 Gbcol 公司;鼠抗人 HIF-1、p53、bcl2 单克隆抗体均购于 San Cruze 公司;AP 碱磷酶标记抗小鼠 IgG 和过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 的二抗以及 BCIP/ NBT 和二氨基联苯胺(DAB)显色液,购自北京中杉生物技术公司;RT-PCR 试剂盒均购自晶美生物工程公司。95 %N<sub>2</sub>和 5 %CO<sub>2</sub> 缺氧培养箱(英国 Galaxy 公司生产,由同济医院呼吸科实验室提供)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MG63 细胞于含 10 %小牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 5 %CO<sub>2</sub>、37 培养箱中培养。以 0.25 %的胰酶消化、传代。实验细胞均取二、三代的对数期的细胞。

1.2.2 分组 取对数期细胞以 (2 ~ 5) ×10<sup>5</sup>/孔接种至 2 ml 培养液的 6 孔板中,于 5 %CO<sub>2</sub>、37 培养箱中培养。待细胞长至 90 %以上时随即分为 A 组(常氧组)和 B 组(缺氧组)在不同的培养箱内继续培养,分不同时间段(8、16、24 h)对其进行相应处理,每组每个时间段设 6 个复孔。

1.2.3 RT-PCR Tizol 法提取总 RNA,用分光光度计进行定量和纯度检测。逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 反应,引物见表 1,琼脂糖电泳鉴定产物,照相后灰度值分析,以目的基因与内参照基因的比值作为 mRNA 的相对含量。

表 1 HIF-1、p53、Bcl2 和 -actin 引物

扩增产物	产物大小	产物序列(5'-3')	退火温度
HIF-1	498bp	上游:CCGATGGAA GCACTAG 下游:AGGCTGTCCGACTTTG	48.1
p53	352bp	上游:GTTTCCGTCTGGGCTTCT 下游:ACCTCAGCGGCTCATAG	52.3
bcl2	460bp	上游:CGCACGCTGGGA GAACA 下游:CCACCGAACTCAAAGAAAGG	60
-actin	745bp	上游:GGCACACACCTTCTACAATGA 下游:TCA GGA GGA GCA GCAATGATCTTG	58.1

1.2.4 免疫印迹试验(Western Blot) 裂解液提取细胞核蛋白,考马斯亮兰蛋白定量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,350 V 电转移 30 min 将蛋白转移至硝酸纤维素膜,封闭非特异结合位点,然后分别加入 HIF-1、p53、bcl2 一抗(1 1000 稀释),37 温育 2 h,再加入二抗(1 5000),37 温育 1h,DAB 显色。照相后行图像定量分析。

1.2.5 免疫组化(SP 法) 制 1 ×1 细胞爬片,待细胞长至 70 %~80 %时,加入相应的干预。95 %的冷

丙酮固定 10 分钟,然后按照 SP 试剂盒说明进行染色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定:随机观察 6 个高倍镜(10 ×20)下肿瘤细胞染色阳性的细胞个数,计算平均阳性细胞率。

1.2.6 凋亡细胞检测(Sub-G1 法) 胰酶消化后,取 2 ×10<sup>5</sup> 细胞,70 %的乙醇固定,4 保存过夜。PBS 漂洗,溴化丙啶染色后,FAC Sort 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。

1.3 统计学方法

SPSS12.0 软件进行数据分析,采用 t 检验和 Spearman s 检验。

2 结果

2.1 缺氧处理后 HIF-1、p53 和 bcl2 mRNA 转录的变化

缺氧各个时间段的结果显示,见图 1, MG63 细胞系中 HIF-1 mRNA 常氧条件下存在较高转录,随着缺氧时间延长,mRNA 的转录没有明显改变(P >0.05);而 p53、bcl2 mRNA 的转录在缺氧培养后显著升高。与对照组相比,缺氧 8、16、24 小时后 p53 mRNA 的转录分别提高了 3.43 倍、5.22 倍和 7.15 倍(P <0.01),bcl2 mRNA 活性也分别提高了 4.25 倍、6.64 倍和 7.56 倍(P <0.01)。同时,统计学分析发现缺氧组各时间段之间 p53、bcl2 mRNA 的转录也存在显著性差异(P <0.05)。

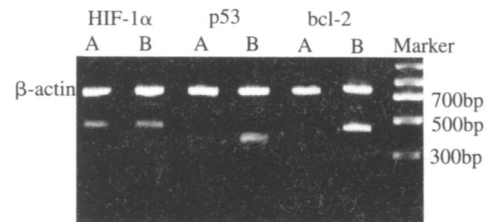


图 1 mRNA 的表达(RT-PCR)

2.2 缺氧对 HIF-1、p53 和 bcl2 蛋白表达的影响

免疫组化显示(图 2~4),常氧下,HIF-1 蛋白表达阴性;缺氧后,可见强表达的 HIF-1 蛋白棕黄色颗粒,主要定位于细胞核,阳性细胞率随缺氧时间的延长阳性细胞率逐渐增加。p53 阳性反应产物呈棕褐色颗粒状,主要定位于细胞核,部分可见于胞浆。常氧组 p53 为弱阳性表达,其阳性细胞率为(21 ±2) %;缺氧处理后,p53 蛋白表达水平明显增强(P <0.05),各时间段的阳性细胞率分别为(43 ±2) %、(61 ±2) %、(75 ±2) %。bcl2 阳性产物主要定位于胞浆,常氧下未见明显表达;缺氧处理后,bcl2 蛋白表达明显提高(P <0.05),阳性细胞率分别为(34 ±2) %、(46 ±2) %、(63 ±2) %。

Western Blot 分析表明,见表 2,图 5: HIF-1 在常氧组未见表达,缺氧处理组在分子量  $120 \times 10^3$  (120kD) 处可见高表达的 HIF-1 蛋白印迹,其中缺氧 24 小时组表达最高。而 p53 蛋白水平与常氧组比较,缺氧各时段分别提高了 2 倍、2.8 倍和 3.5 倍。*bcl-2* 表达水平缺氧组较常氧组显著升高 ( $P < 0.05$ )。并且在缺氧组,三者的蛋白表达水平随缺氧时间的延长而明显增加 ( $P < 0.05$ )。

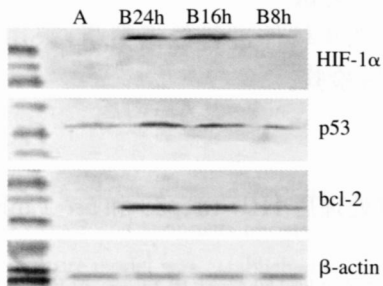


图 5 蛋白的表达(Western Blot)

以往实验证实,p53 蛋白表达在一定程度上可以反映 p53 基因的点突变<sup>[2]</sup>。本试验各组 p53 蛋白水平和相应 HIF-1、*bcl-2* 的表达水平相比较,发现 HIF-1、*bcl-2* 的表达水平与突变型 p53 蛋白的量明显相关,相关系数分别为 0.963、0.975 ( $P = 0.001$ )。

表 2 蛋白表达 Western Blot ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	HIF-1 / -actin		p53/ -actin		<i>bcl-2</i> / -actin	
	A	B	A	B	A	B
8h	0	35.37 ± 3.2	13.76 ± 2.7	27.20 ± 3.4	0	21.76 ± 5.2
16h	0	52.69 ± 2.2	13.55 ± 2.6	38.17 ± 4.8	0	38.97 ± 4.0
24h	0	66.47 ± 2.8	13.61 ± 3.3	47.82 ± 4.7	0	61.89 ± 3.8

### 2.3 各组细胞凋亡情况

流式细胞仪检测结果显示,见表 3,图 6:常氧组细胞凋亡较少,缺氧处理后,细胞凋亡率未见明显增加,与常氧组比较,其差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

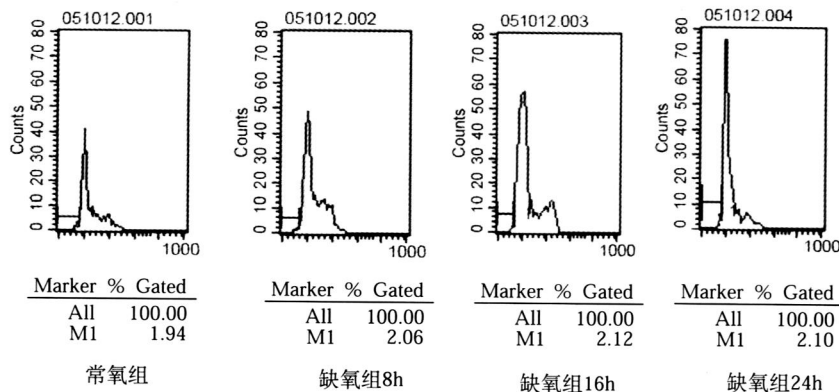


图 6 细胞凋亡率(Sub-G1 法)

表 3 细胞凋亡率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

分组/时间	8h	16h	24h
A	1.95 ± 0.13	1.96 ± 0.16	1.96 ± 0.18
B	2.02 ± 0.10	2.08 ± 0.17	2.11 ± 0.15

### 3 讨论

恶性肿瘤的发生和发展是细胞无限增殖所致,增殖过快必然导致肿瘤局部组织缺氧和供能与耗能之间的不平衡。缺氧时,肿瘤局部新生血管的形成和糖酵解的增加等提高供氧供能机制在促进肿瘤生长中的作用已被实验证实。近年来人们发现缺氧时细胞凋亡的抑制在肿瘤的发生及发展中可能有一定的作用。

细胞凋亡和增殖与细胞周期有关的基因密切相关。低氧诱导的与细胞周期有关的基因大致可以分为两类:一类是 HIF-1 依赖性的,如 p53、p21、*bcl-2* 等;另一类是非 HIF-1 依赖性的,如 p27、GADD153 等<sup>[3]</sup>。其中 HIF-1 与 p53 的关系在肿瘤的演进中有特别重要的地位。HIF-1 是氧调节亚基,实验证实它对维持肿瘤细胞的能量代谢、促进肿瘤增殖和转移起重要作用<sup>[4]</sup>。同时许多研究发现,HIF-1 也能调节细胞的凋亡。Carmeliet<sup>[3]</sup> 等证明,缺氧时 HIF-1 与野生型 p53 结合可以稳定 p53,并通过 Mdm2 稳定上调 p53 水平,从而介导肿瘤细胞通过 p53 依赖途径发生凋亡<sup>[6]</sup>。而 p53 基因是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因。缺氧是 p53 最强的生理性诱导剂。研究证实,缺氧情况下野生型 p53 也参加了对 HIF-1 的调节。一方面通过与 p300 竞争结合 HIF-1 的 CAD 抑制 HIF-1 介导的转录;另一方面促进 MDM2 介导 HIF-1 泛素化和蛋白酶性降解<sup>[7]</sup>,从而减弱 HIF-1 在细胞缺氧反应调节过程中作用。

然而在恶性肿瘤中存在着大量的基因突变,其中 p53 基因的改变是最常见的现象,包括 p53 基因

缺失或基因重排、点突变所致的失活等。研究发现,突变型 p53 丧失了对 HIF-1 表达的抑制功能,在 p53 缺失或突变的肿瘤细胞内, HIF-1 明显积聚<sup>[8]</sup>。本研究结果支持这一观点。缺氧组, HIF-1 的蛋白表达水平明显增强,突变型 p53 蛋白表达强度也显著高于常氧组,同时 HIF-1 的表达与突变型 p53 蛋白表达之间呈显著正相关。结果提示,在骨肉瘤 MG63 细胞体外缺氧模型中,野生型 p53 发生了缺失或突变,从而使 HIF-1 水平提高,进一步加强了肿瘤细胞对缺氧的适应性调节。

*bcl-2* 基因,即 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2,是一种抑制细胞凋亡的基因。它通过阻断细胞凋亡的信号传递通路达到抑制或阻断凋亡过程<sup>[10]</sup>。肿瘤中 *bcl-2* 的过度表达已得到证实<sup>[11]</sup>。研究发现,野生型 p53 可以通过下调 *bcl-2* 基因介导细胞的凋亡<sup>[11]</sup>;而突变型 p53 却在 mRNA 及蛋白水平上调 *bcl-2* 的表达<sup>[12]</sup>。本试验结果显示,缺氧条件下, *bcl-2* 的 mRNA 及蛋白水平明显升高,细胞凋亡未见明显增加,而 *bcl-2* 的表达与突变型 p53 蛋白水平显著相关。这说明缺氧作为一种生理性的选择,可以通过诱导和选择突变型 p53,从而上调 *bcl-2* 的表达,抑制凋亡的发生。

综上所述,在骨肉瘤 MG63 细胞体外缺氧模型中,缺氧并不能通过以 HIF-1 为中介的 p53 依赖途径来诱导肿瘤细胞的凋亡。其机制可能是缺氧诱导了野生型 p53 发生突变或缺失,一方面使 HIF-1 表达增加,提高肿瘤能量代谢和血管生成;另一方面使 *bcl-2* 过表达,抑制了细胞的凋亡。而且缺氧通过对突变型 p53 的选择,使肿瘤向更恶性的表型发展,更易于发生转移。

(本文图 2~4 见第 643 页)

#### 参考文献:

- [1] Hopfl G, Wenger RH, Ziegler U, et al. Rescue of hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient tumor growth by wild-type cells is independent of vascular endothelial growth factor[J]. Cancer Res, 2002, 6(10): 2962-2970.
- [2] 高大新, 吕刚, 黄涛, 等. 核因子 B 与细胞周期蛋白 D1 在骨肉瘤中的表达及相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2004, 33(2): 154-155.
- [3] Carmeliet P, Dor V, Herbert JM, et al. Role of HIF-1 in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. Nature, 1998, 394(6692): 485-490.
- [4] Choi KS, Bae MK, Jeong JW, et al. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis[J]. J Biochem Mol Biol, 2003, 36(1): 120-127.
- [5] Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T, et al. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia[J]. Oncogene, 2001, 20(41): 5779-5788.
- [6] Blagosklonny MV, An WG, Romanova L Y, et al. p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription[J]. J Biol Chem, 1998, 273(20): 11995-11998.
- [7] Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. Genes Dev, 2000, 14(1): 34-44.
- [8] 肖莎, 吕俊豪, 郭琳琅, 等. 应用原位聚合酶链反应检测肝癌组织中 *Bcl-2* 基因重排[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(7): 43-45.
- [9] Huang SC, Tang MJ, Hsu KF, et al. Fas and its ligand, caspases, and *Bcl-2* expression in gonadotropin-releasing hormone agonist-treated uterine leiomyoma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(10): 4580-4586.
- [10] An WG, Kanekal M, et al. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. Nature, 1998, 392(6674): 405-408.

[编辑:安凤;校对:张麟]

### 欢迎订阅《实用肿瘤杂志》

《实用肿瘤杂志》是由中华人民共和国教育部主管,浙江大学主办的肿瘤专业学术性期刊。本刊为中国抗癌协会系列期刊,中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国科学引文数据库来源期刊,并被《中国期刊全文数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库 - CMCC》、《中国生物医学期刊引文数据库 - CMCI》、《中文科技期刊数据库》等多家数据库收录;并被国际著名检索系统:俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI)列为来源期刊;美国《化学文摘》(Chemical Abstracts)和美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich International Periodicals Directory)收录。2005~2006 年度本刊又被评为浙江省优秀科技期刊一等奖,并入选 2006 年首届浙江期刊方阵工程期刊。本刊突出实用性,主要栏目有专家论坛,专题讨论,基础与临床研究,技术与经验,药物与临床,流行病学调查,综述与讲座,误诊分析,短篇报道与个案。适合于广大中、高级医务人员及从事肿瘤科研与教学工作阅读、参考。

《实用肿瘤杂志》为双月刊,大 16 开,92 页,每逢双月 10 日出版。每期定价 8.00 元,全年 48.00 元。本刊刊号 ISSN 1001-1692, CN 33-1074/R, 邮发代号 32-87, 国外发行代号 4816BM, 全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误,可汇款至浙江省杭州市解放路 88 号,浙江大学医学院附属第二医院《实用肿瘤杂志》编辑部补订。

电话(传真):(0571)87783654 邮编:310009 E-mail:shyzzhl@zju.edu.cn