

高表达 HIF-1 α 对肾癌细胞增殖及细胞内 STC-1、Ca²⁺ 水平的影响*

杨清滔¹, 谷江^{1**}, 张永春¹, 杨永安¹, 王楠¹, 朱致晖¹, 祝庆亮²

(1. 贵阳医学院附院 泌尿外科, 贵州 贵阳 550004; 2. 扬州市江都人民医院 泌尿外科, 江苏 扬州 225200)

[摘要] 目的: 研究高表达缺氧诱导因子(HIF-1 α)对肾癌(GRC-1)细胞增殖和细胞内斯钙素-1(STC-1)、Ca²⁺水平的影响。方法: 构建 HIF-1 α 重组质粒, 转染 GRC-1 细胞, MTT 法检测 GRC-1 细胞的增殖, RT-PCR 法检测 GRC-1 细胞内 HIF-1 α 及 STC-1 的表达, 荧光探针检测细胞内 Ca²⁺ 水平, 同时设正常 GRC-1 细胞作为对照组。结果: 与对照组相比, 转染了 HIF-1 α 的 GRC-1 细胞增殖率和 STC-1 表达水平显著增高($P < 0.05$), Ca²⁺ 水平明显降低($P < 0.05$)。结论: HIF-1 α 可能参与了肾癌细胞的恶性增殖, 其机制可能与 STC-1 下调肿瘤细胞内 Ca²⁺ 水平有关。

[关键词] 肾肿瘤; 癌; 细胞; 缺氧诱导因子; 斯钙素; 钙

[中图分类号] R363.21; R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)05-0461-04

Effects of High Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α on Proliferation of Renal Carcinoma Cells, and Stanniocalcin 1 and Ca²⁺ Levels inside Cells

YANG Qingtao¹, GU Jiang¹, ZHANG Yongchun¹, YANG Yongan¹, WANG Nan¹, ZHU Zhihui¹, ZHU Qingliang²

(1. Department of Urinary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Urinary Surgery, Jiangdu People's Hospital of Yangzhou City, Yangzhou 225200, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of high expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) on renal carcinoma (GRC-1) cell proliferation and the levels of stanniocalcin (STC-1) and Ca²⁺ inside the cells. **Methods:** HIF-1 α recombinant plasmid was constructed and transfected GRC-1 cells. The GRC-1 proliferation was observed with MTT assay. RT-PCR was used to assess the expression levels of HIF-1 α and STC-1. Ca²⁺ levels were tested by fluorescence probe. GRC-1 cells that did not received transfection served as control group. **Results:** Proliferation rates and STC-1 levels in HIF-1 α transfected GRC-1 cells were higher and Ca²⁺ level was lower than those in GRC-1 of control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** HIF-1 α is involved in malignant proliferation of renal carcinoma cells, The mechanism may relate to down-regulating of Ca²⁺ level in the cell by STC-1.

[Key words] kidney neoplasms; carcinoma; cells; stanniocalcin; hypoxia inducible factor; calcium

恶性肿瘤的生长与增殖较正常细胞需要更多的氧支持,故肿瘤内部易出现低氧环境,且低氧微环境与肿瘤的发生发展有密切关系^[1-2]。缺氧诱导因子 1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 作为介导肿瘤细胞适应缺氧的关键性转录调控因子,可能与多种肿瘤的发生有关^[3]。斯钙素蛋白

-1 (Stanniocalcin 1, STC-1) 是一种高表达于肾小管上皮细胞,调节细胞内 Ca²⁺ 平衡的糖蛋白激素^[4]。HIF-1 α 是低氧诱导 STC-1 表达的关键调节因子,而 Ca²⁺ 的动态平衡参与了肿瘤细胞增殖、转移和侵袭^[5-6]。故本实验选择 HIF-1 α 、STC-1 为研究靶点,通过基因干预技术,探讨二者是否通

* [基金项目] 贵州省科技厅社会攻关计划项目(黔科合 sy 字[2011]3060)

** 通信作者 E-mail: gj0851@yahoo.com.cn。

过调节肿瘤细胞内 Ca^{2+} 的平衡参与肾癌的发生。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

GRC-1 细胞购自上海弗雷堡生物公司, MTT 购自 Sigma 公司, RPMI1640 购自 Hyclone 公司, G418 购自 Solarbio 公司, 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR MasterMix 均购自 Fermentas 公司, Fura-2/AM 钙离子探针购自碧云天生物技术研究, DH5 α 菌种为贵阳医学院干细胞实验室保存, 脂质体 LipofectamineTM2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养

GRC-1 细胞置于 25cm² 培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养液于 5% CO₂、37℃ 下培养。

1.3 质粒的构建、鉴定与测定

HIF-1 α /pcDNA3.0 表达载体的构建, 氯化钙法制备 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 冻存于 -70℃ 备用。从 NCBI 获得 HIF-1 α 基因的 CDS 区序列 (NM-001530), 根据 HIF-1 α 基因 CDS 区序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 上游为 5'-AAAAATCTA-GAATGGAGGGCGCCGCGCGCGAACG-3', 下游为 5'-CCCCCGGATCCTCAGTTAACTTGATCCAAAGCTC TG-3', (大连宝生物试剂公司合成), 进行 PCR 扩增, 反应条件: 预变性 94℃、3 min, 变性 94℃、30 sec, 退火 53℃、30 sec, 延伸 72℃、1 min, 35 个循环。获得目的基因, 载体 pcDNA3.0 及目的基因分别经 BamHI 和 HindIII 双酶切, 将酶切目的基因与载体按摩尔比 3:1 的比例 16℃ 过夜连接, 同时设立阴性及质粒阳性对照。将连接产物各取 4 μL 分别接种于 100 μL 的 DH5 α 感受态细胞中进行转化。挑取单菌落扩增后并抽提质粒, 用限制性内切酶 Bgl II 对重组质粒进行单酶切鉴定, 得到的重组质粒命名为: HIF-1 α /pcDNA 3.0。

1.4 质粒转染

GRC-1 细胞接种于 24 孔板中, 加含 10% 胎牛血清且无双抗的 RPMI1640 培养液培养 24 h。A 液: 3 μL 质粒加入 147 μL 无血清无双抗 RPMI1640 培养液中, 室温静置 5 min。B 液: 6 μL LipofectamineTM2000 加入 144 μL 无血清无双抗 RPMI1640 培养液中, 室温静置 5 min。C 液: A 液和 B 液混合为 C 液, 室温静置 20 min; 将 C 液加入各孔, 再加无血

清无双抗的 RPMI1640 培养液培养, 6 h 后换成含血清及双抗的 RPMI1640 培养液培养, 24 h 后按 1:10 传代, 24h 后加含 G418 (800 mg/L) 的维持液筛选, 3~5 d 换液一次, 10~14 d 后得到单克隆。

1.5 细胞分组

采用脂质体 LipofectamineTM2000 分别转染空载体质粒 (空载体组) 与 HIF-1 α 质粒 (转染组), 并用正常 GRC-1 细胞设立对照组。

1.6 HIF-1 α 、STC-1 表达

使用试剂盒提取各组 GRC-1 细胞总 RNA, 取 1 μg RNA 进行逆转录, 合成 cDNA。引物序列: β -actin 正向为 5'-CCCTGGACTTCGAGCAAGA GAT-3', 反向为 5'-GTTTTCTGCGCAAGTTAGG-3'; HIF-1 α : 正向为 5'-TCCAGCAGA CTCAAATACAAGAAC-3', 反向为 5'-GTATGTGGGTAGGAGATGGAGATG-3'; STC-1 正向为 5'-TGAGGTCGTCCAGCTCCCAATC-3', 反向为 5'-GGCACAGTGCTC TGTCTGCAGGATG-3'。退火温度均为 53℃, 35 个循环后, 以 β -actin 作为内参, PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳。

1.7 MTT 法检测细胞的增殖活性

细胞接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔, 培养 24 h 后每孔加入 80 μL 无血清培养基和 20 μL MTT 溶液, 37℃ 孵育 4 h 后弃去孔内液体, 加入 150 μL 二甲基亚砷, 低速震荡 10 min 后, 用酶标仪检测 490 nm 处的 OD 值, 并根据公式计算细胞增殖率。

1.8 荧光探针检测细胞内 Ca^{2+} 含量

细胞接种于 6 孔板中, 融合度达 80% 左右后消化成细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 用 D-Hanks 液重悬细胞, 加入 Fura-2/AM 探针, 37℃ 避光孵育 45 min; 再用 D-Hanks 液洗涤细胞 2 次, 3 mL D-Hanks 液重悬细胞。荧光分光光度计激发波长分别为 340 nm、380 nm, 发射波长为 510 nm 双波长测定负载探针细胞的荧光强度。加 158 μL Triton-100, 5 min 后测定细胞双波长荧光强度, 加 42 μL EGTA 测定细胞双波长荧光强度。所得结果按公式计算: $[\text{Ca}^{2+}] = 224 \times F_0/F_s \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$, 其中 R 为最初测的 F_{340}/F_{380} (F_{340} 是 340nm 时所测的荧光强度, F_{380} 是 380nm 时所测的荧光强度), R_{\max} 为加入 Triton-100 后的 F_{340}/F_{380} , R_{\min} 为加入 Triton-100 后再加 EGTA 的 F_{340}/F_{380} , F_s 为加入 Triton-100 后的 F_{380} , F_0 为加入 Triton-100 后再加 EGTA 的 F_{380} 。

1.9 统计学处理

所有数据均采用 PASW Statistics 18 软件进行

统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因测序

重组质粒基因序列经 3730XL 型 DNA 测序仪测序,结果显示与 Gene bank 上的序列相符。见图 1。

2.2 RT-PCR 测定目的基因的表达

2.2.1 HIF-1 α 表达 经 RT-PCR 检测 HIF-1 α 基因在 GRC-1 细胞中表达,转染组相对光密度比值 (0.152 ± 0.004),明显高于对照组 (0.0856 ± 0.005) 和空载体组 (0.0875 ± 0.007) ($P < 0.05$),且转染组 HIF-1 α 相对表达量约为对照组的 1.7 倍,空载体组与对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明成功构建稳定表达 HIF-1 α 的 GRC-1 细胞系。见图 2。

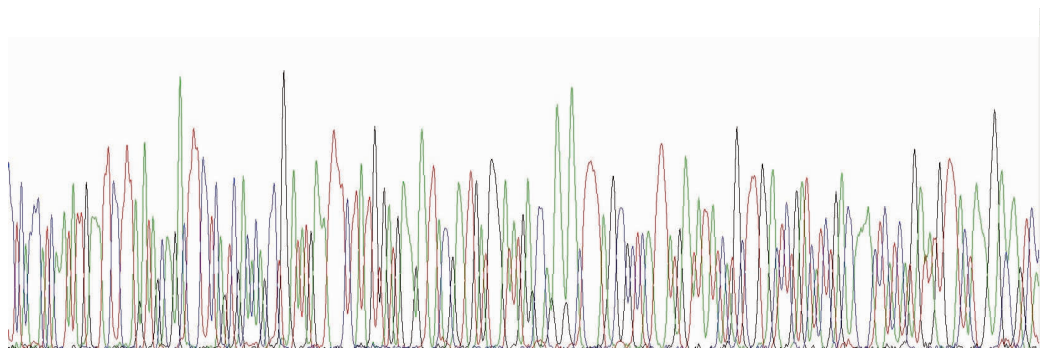
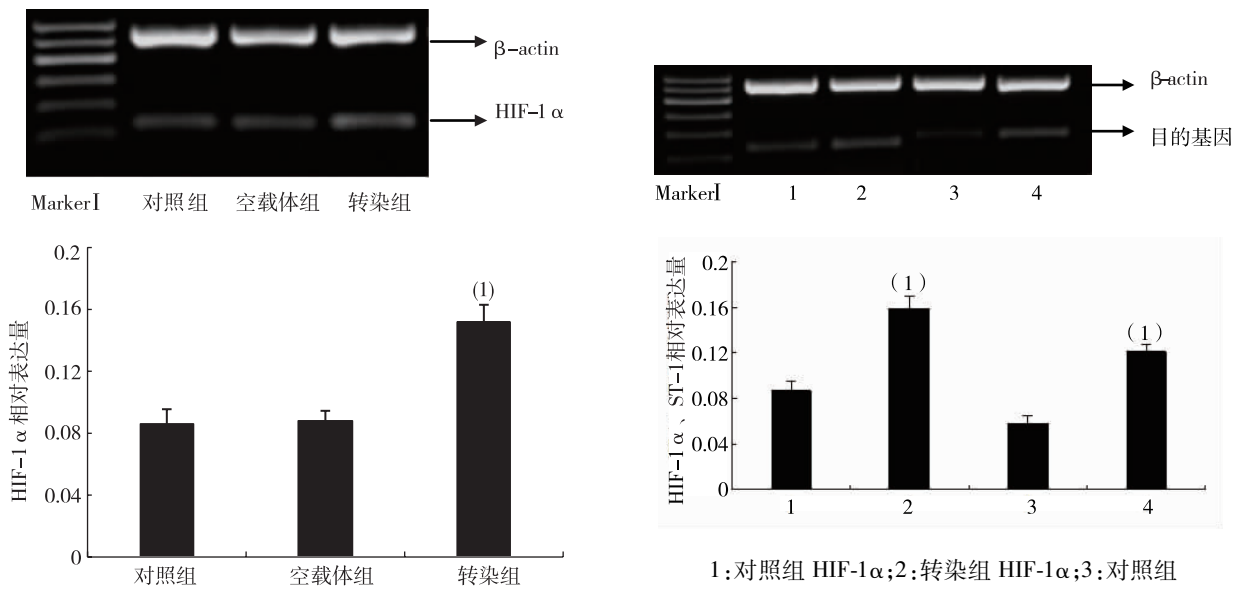


图 1 HIF- α /pcDNA3.0 质粒部分测序图

Fig. 1 A part of sequencing map of HIF- α /pcDNA3.0 plasmid



注:与对照组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$
图 2 各组细胞 HIF-1 α 相对表达水平
Fig. 2 Relative expression levels of HIF-1 α in cells of each group

2.2.2 HIF-1 α 、STC-1 表达 经 RT-PCR 检测各组中 HIF-1 α 、STC-1 表达,发现转染组目的基因的表达明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.3 转染 HIF-1 α 对 GRC-1 细胞增殖的影响

MTT 法检测对照组与转染组 GRC-1 细胞培养 24h 后的增殖情况,每组 5 个复孔,发现转染组细胞 OD 值 (0.295 ± 0.013),显著高于对照组细胞 OD 值 (0.226 ± 0.011), $P < 0.05$,增殖率约为

1:对照组 HIF-1 α ;2:转染组 HIF-1 α ;3:对照组 STC-1;4:转染组 STC-1; ⁽¹⁾ 与对照组相比 $P < 0.05$ 。
图 3 各组细胞 HIF-1 α 、STC-1 相对表达水平
Fig. 3 Relative expression levels of HIF-1 α , STC-1 in each group

30.57%。

2.4 细胞内 Ca^{2+} 含量

荧光分光光度计检测各组 GRC-1 细胞内 Fura-2/AM 探针的荧光强度,经公式计算出各组细胞内 Ca^{2+} 含量,发现转染组细胞内 Ca^{2+} 含量(37.482 ± 9.4) nmol/L,显著低于对照组细胞内 Ca^{2+} 含量(95.797 ± 19.3) nmol/L, $P < 0.05$ 。

3 讨论

恶性肿瘤发生发展过程中一个关键的步骤是对缺氧的适应,缺氧进一步加剧了肿瘤细胞基因的不稳定性并激活一些肿瘤生存因子,促进了肿瘤的转移^[7]。鉴于肿瘤缺氧微环境与肿瘤的发生发展、预后、转移以及治疗的效果密切相关,以 HIF-1 α 为靶点的抗肿瘤药物的研究已经成为寻找癌症新治疗方法的热点^[8]。HIF-1 α 在人肾癌组织中高表达,并对肾癌的生长、侵袭、转移与多药耐药性有促进作用^[9-10]。HIF-1 α 是低氧诱导 STC-1 表达的关键调节因子,STC-1 亦是作用于线粒体的糖蛋白激素,具有调节 Ca^{2+} 平衡的功能,且作为第二信使的 Ca^{2+} 又可能参与了肿瘤的发生机制^[4-5]。

本实验成功构建表达 HIF-1 α 的 GRC-1 细胞系,转染组细胞内 HIF-1 α 、STC-1 基因在 GRC-1 细胞中表达明显高于对照组($P < 0.05$),说明高表达 HIF-1 α 的 GRC-1 细胞能够促进自身内源性 STC-1 基因表达或者使其反应性增高,这一结果印证了 Lal 等报道的 STC-1 可被 HIF-1 α 激活,内源性 HIF-1 α 是低氧条件下诱导 STC-1 表达的关键因子这一观点^[5,11]。本实验发现,转染组较对照组细胞内 Ca^{2+} 含量显著降低($P < 0.05$),与 STC-1 表达增强相匹配。细胞内 Ca^{2+} 含量降低的原因可能有两方面,一方面可能是 HIF-1 α 高表达促进细胞内 Ca^{2+} 向内质网、线粒体转移,直接降低细胞内 Ca^{2+} 含量^[12-13];另一方面可能是基于 HIF-1 α 高表达,进而促使 STC-1 表达增强,间接降低细胞内 Ca^{2+} 含量。本实验还发现,转染组细胞促进 GRC-1 细胞增殖的作用明显高于对照组($P < 0.05$),原因也可能有以下两方面:一方面可能是基于 HIF-1 α 高表达进而促进 STC-1 表达增强,从而降低细胞内 Ca^{2+} 含量,避免细胞内钙超载,对细胞起到保护作用从而减少细胞凋亡;另一方面可能是由于 HIF-1 α 高表达后,使细胞适应缺氧环境,从而促进细胞增殖。这一结果与 He LF 等提出的 STC-1 可能通

过减少细胞凋亡促进肿瘤细胞增殖这一观点相符合^[13-14]。

由上述结果可以看出,HIF-1 α 质粒转染,使 GRC-1 细胞高表达 HIF-1 α ,从而促进细胞内 STC-1 表达增强或者使其反应性增高;伴随 STC-1 表达增强,细胞内 Ca^{2+} 含量显著降低,从而避免细胞内钙超载,减少细胞凋亡;又因 HIF-1 α 高表达,使细胞更好地适应缺氧环境,最终促使细胞增殖率上升。因此推测 HIF-1 α 可能在一定程度上介导了肾癌细胞的恶性增殖,其机制可能与 STC-1 下调肿瘤细胞内 Ca^{2+} 水平有关。在后续实验中将采用基因干预技术,选择性沉默 HIF-1 α 基因,深入研究 HIF-1 α 对肾癌细胞的作用及其机制。

4 参考文献

- [1] Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis [J]. *Oncologist*, 2008 (3): 21-26.
- [2] Bordoli MR, Stiehl DP, Borsig L, et al. Protyl-4-hydroxylase PHD2 and hypoxia-inducible factor 2-dependent regulation of amphiregulin contributes to breast tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2011(5): 548-560.
- [3] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O_2 availability on human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008 (12): 967-975.
- [4] 张延涛,王静蓉,李晓燕. 人类斯钙素生物学特性的相关研究[J]. *医学综述*, 2009(19): 2926-2928.
- [5] 郝卫刚,张海蓉,段丽平. 人类斯钙素与肿瘤相关性研究进展[J]. *重庆医学*, 2011(36): 3725-3727.
- [6] Liu G, Yang G, Chang B, et al. Stanniocalcin 1 and ovarian tumorigenesis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010(11): 812-827.
- [7] Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, et al. Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors [J]. *Curr Mol Med*, 2008(8): 60-67.
- [8] Manolescu B, Oprea E, Busu C, et al. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signaling pathway [J]. *Biochimie*, 2009(11): 1347-1358.
- [9] 舒博,申钧,陈鹏,等. HIF-1 α 和 p53 蛋白的表达对肾透明细胞癌预后的影响[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2010(6): 435-439.
- [10] Semenza GL. Defining the role of Hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics [J]. *Oncogene*, 2010(5): 625-634.
- [11] Lal A, Peters H, St Croix B, et al. Transcriptional response to hypoxia in human tumors [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001(17): 1337-1343.

(下转第 469 页)

第 7 天及第 14 天大鼠肾脏病理学改变较模型组减轻、TDI 减小、肾脏组织中 HMGB1、TGF- β 1 表达减少,提示肾炎舒可能通过抑制肾组织中 HMGB1、TGF- β 1 的表达,减轻 RIF,其确切机制尚有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] 韩红莉, 卢俊敏, 常蕴青. 高迁移率族蛋白 B1 在肝纤维化发生发展中的作用研究[J]. 长治医学院学报, 2008(5):321-324.
 - [2] 郭碧林, 朱春玲. Egr-1 蛋白、MMP-2、TGF- β 1 在肾小管间质纤维化大鼠中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2013(7):27-33.
 - [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 人民卫生出版社, 2001, 202-203.
 - [4] Marcussen N. Atubular glomeruli and the structural basis for chronic renal failure[J]. Lab Invest, 2004(66):265-284.
 - [5] Fang WH, Yao YM, Shi ZG, et al. The significance of changes in high mobility group - 1 protein mRNA expression in rats after thermal injury[J]. Shock, 2002(4):329-333.
 - [6] Hori O, Brett J, Slattery T, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and CO-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system[J]. J Biol Chem, 1995(270):25752-25761.
 - [7] van Beijnum JR, Buunann WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1) [J]. Angiogenesis, 2008(1):91-96.
 - [8] 姚咏明, 盛志勇. 高迁移率族蛋白 - 1 在脓毒症发病中的作用与意义[J]. 解放军医学杂志, 2002(9):753-756.
 - [9] Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Matrix metalloproteinase - 2: mechanism and regulation of NF- κ B-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion [J]. Glycoconj J, 2007(8-9):429-441.
 - [10] HAN HJ, OH YJ, LEC TJ. Effect of albumin on 14c - alpha Methyl-D- glucopyranoside uptake in primary cultured renal proximal tubule cells: involvement of PLC, MAPK, and NF- κ B [J]. Cell Physiol, 2005(1):246-254.
 - [11] Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, et al. Increased expression of the DNA binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004(12):232.
 - [12] 李瀛. 肾炎舒片减轻甘露醇肾毒性作用的临床观察[J]. 医学理论与实践, 2001(7):582.
 - [13] 杨中浩, 陈群, 焦庆才. 茯苓多糖硫酸酯 L-鸟氨酸盐对腺嘌呤致大鼠肾衰竭的防治作用[J]. 中国药理学杂志, 2008(1):31-35.
 - [14] Sang WH, Hyeyotmg K. Ginsenosides stimulate endogenous production of nitric oxide in rat kidney[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1996(5):573-580.
 - [15] 郝丽娜, 陈剑珩, 龙江, 等. 人参皂甙 Rg1 对梗阻肾细胞凋亡及 Bcl 2 表达作用的研究[J]. 昆明医学院学报, 2003(24):28-31.
- (2013-07-24 收稿, 2013-09-10 修回)
编辑: 潘 娅
-
- (上接第 464 页)
- [12] Neumann AK, Yang J, Biju MP, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005(47):17071-17076.
 - [13] He LF, Wang TT, Gao QY, et al. Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells [J]. J Biomed Sci, 2011(39):145-151.
 - [14] Loretz CA, Pollina C, Hyodo S, et al. Extracellular calcium sensing receptor distribution in osmoregulatory and endocrine tissues of the tilapia [J]. Gen Comp Endocrinology, 2009(2):216-228.
- (2013-07-12 收稿, 2013-08-01 修回)
编辑: 周 凌