

缺氧条件下白花丹醌对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡与侵袭及 HIF-1 α 表达的影响

韦燕飞¹, 吕贝贝^{1,2}, 金丽杰^{1,2}, 刘莎莎^{1,2}, 成桃^{1,2}, 刘欢^{2,3*} (1.广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200; 2.广西中医药大学防治医学分子生物重点实验室, 南宁 530024; 3.广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530024)

摘要: 目的 研究白花丹醌在缺氧条件下对肝癌细胞 HepG2 增殖、凋亡、侵袭和低氧诱导因子 1 α (hypoxia induced factor 1 α , HIF-1 α)及其下游基因表达的影响。方法 采用二氯化钴(CoCl₂)化学诱导法建立 HepG2 细胞体外缺氧模型, 经不同浓度(2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)白花丹醌处理 24 h 后, MTT、平板克隆形成试验观察 HepG2 细胞增殖水平变化; 使用 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡情况; 使用 Transwell 试验观察 HepG2 细胞侵袭能力的变化; 使用 qRT-PCR 检测 HepG2 细胞内 HIF-1A mRNA 转录水平变化; 使用 Western blotting 检测细胞内 HIF-1 α 及其下游基因 *c-Myc*、*VEGFA*、*MMP9* 和 *Twist1* 的蛋白表达水平。结果 当 CoCl₂ 处理浓度为 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HepG2 细胞增殖水平未见显著变化, 而 HIF-1 α 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$), 提示体外缺氧模型建立成功。与常氧对照组相比, MTT、平板克隆形成试验结果显示不同浓度白花丹醌作用 HepG2 细胞后, 其增殖水平受到显著抑制($P<0.05$ 或 $P<0.01$); Transwell 试验结果显示白花丹醌可显著抑制 HepG2 细胞侵袭($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 流式细胞术结果表明白花丹醌能显著诱导 HepG2 细胞凋亡($P<0.05$ 或 $P<0.01$); Western blotting 及 qRT-PCR 检测结果显示, 白花丹醌能显著下调 HIF-1 α 蛋白及 HIF-1A mRNA 表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Western blotting 检测结果显示 HIF-1 α 及其下游基因 *c-Myc*、*VEGFA*、*MMP9* 和 *Twist1* 的蛋白表达水平均显著下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 CoCl₂ 体外模拟肝癌 HepG2 细胞缺氧的适宜浓度为 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在缺氧条件下, 白花丹醌可显著抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖与侵袭, 同时诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与下调 HIF-1 α 蛋白及其下游靶基因蛋白表达有关。

关键词: 白花丹醌; 肝癌; 细胞凋亡; 肿瘤侵袭; 氯化钴; 低氧诱导因子 1 α ; 缺氧

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)14-1789-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.14.001

引用本文: 韦燕飞, 吕贝贝, 金丽杰, 等. 缺氧条件下白花丹醌对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡与侵袭及 HIF-1 α 表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1789-1795.

Effects of Plumbagin on Proliferation, Apoptosis, Invasion and Expression of HIF-1 α in Hepatocellular HepG2 Cells Under Hypoxia Condition

WEI Yanfei¹, LYU Beibei^{1,2}, JIN Lijie^{1,2}, LIU Shasha^{1,2}, CHENG Tao^{1,2}, LIU Huan^{2,3*} (1.College of Basic Medicine of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2.Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Preventive Medicine of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530024, China; 3.The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530024, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of plumbagin on proliferation, apoptosis, invasion and expression of hypoxia induced factor 1 α (HIF-1 α) as well as its target genes in HepG2 cells under hypoxia condition. **METHODS** Cobalt chloride(CoCl₂) was used to induce a chemical hypoxia condition for HepG2 cells. Under this hypoxia condition, HepG2 cells were treated with plumbagin at 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h respectively. The proliferation of HepG2 cells were measured by MTT and plate clone formation assay. The apoptotic of HepG2 cells were detected by flow cytometry to detect labeled Annexin V/PI. Transwell experiment was conducted to analyze the invasion ability of HepG2 cells after plumbagin treatment. qRT-PCR were used to detect the transcription level of its coding gene, HIF-1A. Western blotting analysis was further used to detect the protein expression level of HIF-1 α and its downstream target genes such as *c-Myc*, *VEGFA*, *MMP9* and *Twist1* in cells. **RESULTS** The concentration of CoCl₂ were optimized to 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ without interference with cell proliferation and the expression level

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760757); 广西自然科学基金项目(2019GXNSFBA245041, 2019JJD140032); 广西中医药大学第二批“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(2021001)

作者简介: 韦燕飞, 女, 博士, 教授 E-mail: weiyanyanfei@gxcmu.edu.cn *通信作者: 刘欢, 男, 博士, 助理研究员 E-mail: liuchujie@yeah.net

of HIF-1 α was significantly increased($P<0.01$), indicating successfully establishment of the hypoxia model by CoCl₂ treatment. Compared to the normoxia control group, MTT and plate clone formation assay results showed that proliferation of HepG2 cells was significantly inhibited by treatment with different concentration of plumbagin($P<0.05$ or $P<0.01$). In addition, Transwell experiment result showed that the invasion ability of HepG2 cells was also decreased by plumbagin($P<0.05$ or $P<0.01$). Flow cytometry results indicated that plumbagin could significantly induce the apoptosis of HepG2 cells($P<0.05$ or $P<0.01$). The results of Western blotting and qRT-PCR showed that plumbagin could significantly down-regulate the expression levels of HIF-1 α protein and HIF-1A mRNA($P<0.05$ or $P<0.01$). Western blotting analysis results further showed that the protein expression levels of HIF-1 α and its downstream genes *c-Myc*, *VEGFA*, *MMP9* and *TWIST1* were significantly down-regulated($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** The optimal modeling concentration of CoCl₂ is measured as 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Under hypoxia conditions, plumbagin can also significantly inhibit the proliferation and invasion of HepG2 cells. The apoptosis-inducing ability of plumbagin is also strong under hypoxia condition, which may be related to the significantly down-regulated expression of HIF-1 α and its target genes.

KEYWORDS: plumbagin; hepatocellular carcinoma; apoptosis; tumor invasion; cobalt chloride; hypoxia induced factor 1 α (HIF-1 α); hypoxia

肝癌是一种异质性强、致死率高的恶性肿瘤。在我国,肝癌的危害更为严重,每年约有 38 万人死于肝癌,占全球肝癌死亡病例的 51%^[1]。大多数肝癌患者确诊时已为晚期阶段;除此之外,肝癌易发生侵袭和转移、术后易复发等特点往往导致患者预后不佳。由于肿瘤细胞代谢水平高、增殖速度快,因此包括肝癌在内的许多实体肿瘤组织通常会由于血氧供应不足而形成缺氧微环境^[2]。虽然越来越多的研究指出瘤内缺氧微环境对于肿瘤的进程具有关键作用,但是目前仍然没有有效的方法来抵抗瘤内缺氧肿瘤细胞。缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是一种具有转录活性的异源二聚体核蛋白,由活性亚基 HIF-1 α 和结构亚基 HIF-1 β 构成。在常氧条件下, HIF-1 α 翻译后随即被细胞内泛素-蛋白酶水解复合体降解,而 HIF-1 β 在胞浆内稳定表达。在缺氧微环境下, HIF-1 α 由于降解途径被抑制,因而与 β 亚基形成具有转录活性的 HIF-1, 随后转移到细胞核内激活众多靶基因的转录,参与肝癌细胞增殖、血管生成、侵袭以及转移等过程^[3-5], 成为近年来抗肝癌治疗的靶点^[6]。

白花丹醌是民族药材白花丹(*Plumbago zeylanica* L.)的主要活性成分,具有多种药理活性,包括抗菌消炎、抗凝、抗动脉粥样硬化、强心、抗肝纤维化、抗肿瘤等作用^[7]。近年来白花丹醌的抗肿瘤活性受到了广泛的关注,研究指出白花丹醌可对肝癌等十余种肿瘤细胞具有抑制增殖、促凋亡以及抑制转移等作用^[8]。笔者前期通过小鼠体内外实验已证实白花丹醌对肝癌具有显著的抑制作用,可抑制肝癌血管新生、促进细胞凋亡等^[9-10]。但白花丹醌在缺氧条件下对肝癌的抗肿瘤作用仍需进一步的实验证实。本研究以人肝癌细胞株 HepG2 为研究对象,采用二氯化钴(CoCl₂)模拟缺

氧微环境,建立肝癌细胞体外缺氧模型,观察白花丹醌干预后各组细胞的增殖、凋亡与侵袭水平以及 HIF-1 α 蛋白及其下游靶基因的表达式变化,进一步明确白花丹醌抗肿瘤作用机制,为今后白花丹醌的开发利用提供理论与实验依据。

1 材料

1.1 细胞及试剂

人肝癌细胞 HepG2 由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供;白花丹醌(批号:SLBS8515)、六水合氯化钴(CoCl₂·6H₂O,批号:SLBV8359)均购自美国默克公司;高糖 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司,批号:8121145);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 以色列 Biological Industries 公司,批号:1818356);噻唑蓝(MTT)试剂盒、二甲基亚砜(DMSO)均购自索莱宝公司;Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号:8072965);兔抗 HIF-1 α 、兔抗 β -actin 单克隆抗体(批号分别为 042018,092017)均购自美国 CST 公司;兔抗 VEGFA 抗体(批号:GR256989-1)、鼠抗 TWIST 抗体(批号:GR3188766-7)购自美国 Abcam 公司;MMP9 抗体(Gene Tex,批号:GTX100458-s);兔抗 c-Myc 抗体(博士德公司,批号:BOS1090BP09);总 RNA 提取试剂 NucleoZOL(德国 MN 公司,批号:1911001);反转录试剂 GoScript™ Reverse Transcription Mix 和 qPCR 反应液 GoTaq® qPCR Master Mix 均为美国普洛麦格产品;qPCR 引物由上海生工生物公司合成。

1.2 仪器

Forma 370 型 CO₂ 细胞培养箱、MultiscanMK3 酶标仪(美国 Thermo);IX51 倒置荧光显微镜(日本 Olympus);5804R 型高速离心机(德国 Eppendorf);

CytoFLEX 流式细胞仪(美国 Beckman); Mini-PROTEAN 蛋白垂直电泳系统、Transblot Turbo 蛋白转印系统均购自美国 Bio-Rad; Amersham Imager 600 多功能成像仪(美国 GE); Transwell 小室购自美国康宁公司。

2 方法

2.1 CoCl_2 工作浓度的筛选

取对数生长期的 HepG2 细胞以每孔 5 000 个接种于 96 孔培养板中。设置空白组、对照组(含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液)、实验组(含不同浓度 CoCl_2 的完全培养液), 每组设 5 个复孔。待细胞贴壁后分别更换含 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 的完全培养液, 继续培养 24, 48 h。培养至指定时间后, 每孔加入 10 μL MTT(5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 小心吸弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 微型混合器上水平震荡 10 min 后于酶标仪上测定 490 nm 处的 OD 值。将 HepG2 细胞传代接种于 12 孔板, 待细胞生长至单层之后, 使用 CoCl_2 分别作用 HepG2 细胞 24 h, Western blotting 检测细胞内 HIF-1 α 蛋白表达水平。

2.2 分组与给药

将 HepG2 细胞以每孔 4×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后分为 5 组: 常氧对照组、缺氧模型组及白花丹醌组(2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。常氧对照组不加任何药物常规培养; 缺氧模型组加入含 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 的完全培养液; 白花丹醌处理组在加入 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 的同时分别加入 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白花丹醌, 给药后继续培养 24 h。

2.3 MTT 检测缺氧条件下 HepG2 细胞增殖情况

将 HepG2 细胞按照每孔 2.5×10^3 个接种于 96 孔板, 每孔 200 μL 。按“2.2”项下方法设置分组, 干预 24 h 后, 每孔加入 10 μL MTT, 培养箱孵育 4 h 后吸弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 10 min 后于酶标仪上测定 490 nm 处的 OD 值。

2.4 平板克隆试验缺氧条件下 HepG2 细胞克隆形成能力

将 HepG2 细胞计数后接种于 6 孔板内, 每孔接种细胞 1 000 个。待细胞贴壁后, 分别加入含 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 和不同浓度(2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)白花丹醌的完全培养液继续培养 1 周左右, 当培养板出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃上清, 4%多聚甲醛室温固定 30 min, 结晶紫染色 1 h, 显微镜下取不同视野统计细胞克隆数。

2.5 流式细胞术检测缺氧条件下 HepG2 细胞凋亡水平

将 HepG2 细胞接种至 6 孔板, 按“2.2”项下分组方法加药干预 24 h 后, 使用无 EDTA 胰酶消化、离心收集细胞制成单细胞悬液, PBS 离心洗涤细胞 2 次后使用 Annexin-V/PI 染料联合标记, 避光孵育 15 min, 使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.6 Transwell 检测

取缺氧条件下经不同浓度白花丹醌(2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 24 h 的 HepG2 细胞, 经 PBS 洗涤 2 次后, 使用无血清 DMEM 饥饿处理 12 h。胰酶消化收集处理后的细胞, 制成单细胞悬液, 按照每孔 5 万个细胞接种于 Transwell 上室, 下室加入 600 μL 完全培养液继续培养 24 h。取出小室, 擦除未迁移的细胞, 4%多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 2 次后晾干, 结晶紫染色并置于光学显微镜下观察、计数。

2.7 Western blotting 检测

HepG2 细胞经缺氧及白花丹醌处理后, 弃培养液, 使用 RIPA 裂解液提取细胞内总蛋白。BCA 法测定总蛋白浓度, 加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 经沸水浴 10 min 之后, 使用 10% PAGE 胶电泳分离目的蛋白; 半干法将分离后的蛋白转印至 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入 HIF-1 α 、VEGFA、MMP9、c-Myc、TWIST 以及 β -actin 抗体(1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次(每次 5 min), 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗, 室温下孵育 1 h, 经 TBST 缓冲液洗涤 3 次后采用电化学发光法显影, 拍照保存结果。使用 Image J 软件测定各条带灰度值, 以 β -actin 作为内参, 分析比较目的蛋白的相对表达水平变化。

2.8 qRT-PCR 检测

根据 Genbank 数据库各目的基因参考序列, 针对 HIF-1A、ACTB 基因序列设计 qPCR 引物。其中 HIF-1A 上游引物序列为 5'-GTCTGAGGGGA CAGGAGGAT-3'; 下游引物序列为 5'-CTCCTC AGGTGGCTTGTCAG-3'; 内参 ACTB 上游引物序列为 5'-GGATTCCTATGTGGGCGACG-3'; 下游引物序列为 5'-GCGTACAGGGATAGCACAGC-3'。使用 Trizol 法提取细胞内总 RNA, 经逆转录反应合成第一链 cDNAs, 以其为模板进行 qPCR 反应。参照 PCR 试剂盒说明书, 分别加入 10 μL GoTaqR

qPCR Master Mix(2×), 上、下游引物($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $1\ \mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\ \mu\text{L}$, $6\ \mu\text{L}$ ddH₂O, 构成 $20\ \mu\text{L}$ PCR 反应体系。qPCR 反应程序为 $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $2\ \text{min}$; $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $15\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火 $1\ \text{min}$, 共 40 个循环。反应结束后分析计算各组 Ct 值, 以 *ACTB* 作为内参, 以缺氧模型组作为比较组, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行组间比较分析。

2.9 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析, 计量资料数据符合正态分布采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组之间通过单因素方差分析, 然后两两对比分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CoCl₂ 工作浓度的筛选

MTT 检测结果显示, 当 CoCl_2 浓度 $\geq 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HepG2 细胞增殖受到显著抑制 ($P < 0.05$); 而当 CoCl_2 浓度 $\leq 150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 与

CoCl_2 浓度为 $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比差异无统计学意义。Western blotting 结果显示, 随着 CoCl_2 作用浓度的增加, HIF-1 α 蛋白的表达水平逐渐升高, 提示缺氧环境模拟成功。与 CoCl_2 浓度为 $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比, $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 作用 24, 48 h 后, HIF-1 α 蛋白均表达显著增加 ($P < 0.01$)。综合以上结果, 确定缺氧环境 CoCl_2 作用浓度为 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 作用时间为 24 h。结果见图 1。

3.2 缺氧条件下白花丹醌对肝癌细胞增殖的影响

参照“3.1”项下结果建立缺氧模型, 分别使用不同剂量白花丹醌处理 HepG2 细胞 24, 48 h。MTT 检测结果发现, 在缺氧条件下, 白花丹醌显著抑制 HepG2 细胞增殖 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。平板克隆试验结果表明, 缺氧条件下白花丹醌可显著抑制 HepG2 细胞的克隆形成能力, 且随着作用浓度的增加, 其抑制效果更为显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。当作用浓度 $\geq 8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HepG2 细胞无克隆形成能力, 结果见图 2。

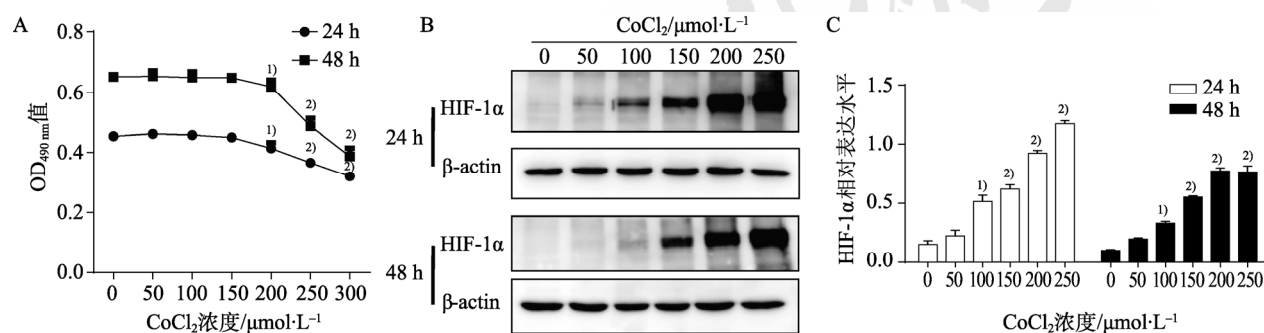


图 1 氯化钴对 HepG2 细胞增殖及 HIF-1 α 表达的影响

A-MTT 检测结果($n=5$); B-Western blotting 检测 HIF-1 α 的结果; C-HIF-1 α 灰度值统计学分析($\bar{x} \pm s$, $n=3$); 与 $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effects of CoCl_2 treatment on HepG2 cell proliferation and expression of HIF-1 α

A-MTT results($n=5$); B-Western blotting analysis of HIF-1 α expression; C-Gray value statistical analysis of HIF-1 α ($\bar{x} \pm s$, $n=3$); compared with $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 , ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

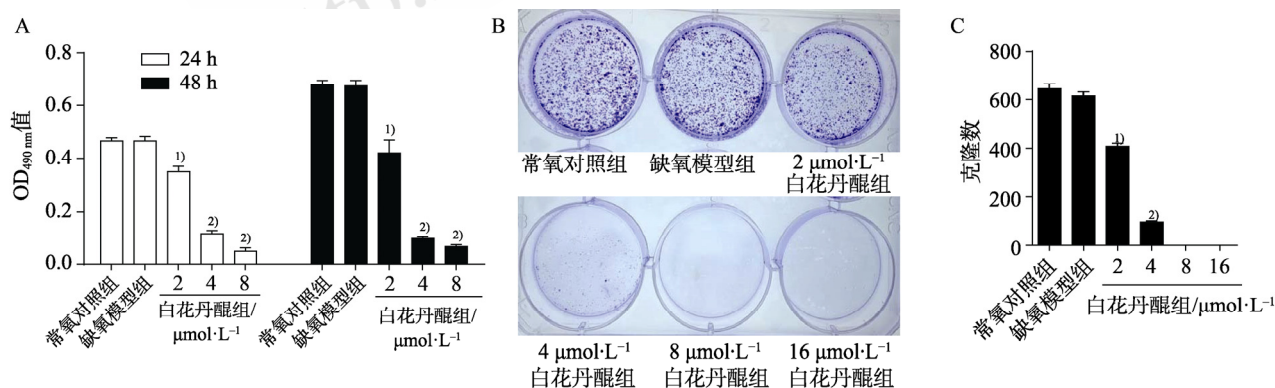


图 2 白花丹醌在缺氧条件下对 HepG2 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A-MTT 检测结果; B-平板克隆形成试验; C-HepG2 细胞克隆形成能力统计学分析; 与缺氧模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effects of plumbagin on proliferation of HepG2 cells under hypoxia condition($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A-MTT results; B-colony formation results; C-statistical analysis of clonal formation ability of HepG2 cells; compared with hypoxia model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.3 缺氧条件下白花丹醌对 HepG2 细胞凋亡的影响

流式细胞检测结果显示, 常氧对照组与缺氧模型组相比, 差异无统计学意义; 当白花丹醌作用浓度分别为 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HepG2 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 3。

3.4 缺氧条件下白花丹醌对 HepG2 细胞转移能力的影响

Transwell 试验结果发现, 与缺氧模型组相比, 白花丹醌作用后, 穿过 Transwell 小室的细胞数减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 提示白花丹醌可显著抑制肝癌细胞侵袭, 结果见图 4。

3.5 缺氧条件下白花丹醌对 HepG2 细胞 HIF-1A mRNA 及蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 常氧对照组未见 HIF-1 α 明显表达; 缺氧模型组 HIF-1 α 表达明显升

高; 而随着白花丹醌浓度的增加, HIF-1 α 蛋白表达水平下调, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组最为显著($P<0.01$)。结果见图 5。

与常氧对照组相比较, qRT-PCR 检测结果显示缺氧条件下 HIF-1A mRNA 转录水平未见显著升高。而当白花丹醌处理后, 细胞内 HIF-1A 的转录水平显著下降, 且作用浓度越大, 其抑制效果越显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 5。

3.6 缺氧条件下白花丹醌对 HIF-1 α 下游靶基因表达的影响

Western blotting 检测结果显示, 缺氧条件下 HIF-1 α 的下游靶基因如 *c-Myc*、*MMP9*、*TWIST* 和 *VEGFA* 的蛋白表达水平显著高于常氧对照组($P<0.05$)。在白花丹醌处理后, 以上 HIF-1 α 靶蛋白在缺氧条件下的表达水平显著下调, 结果见图 6。

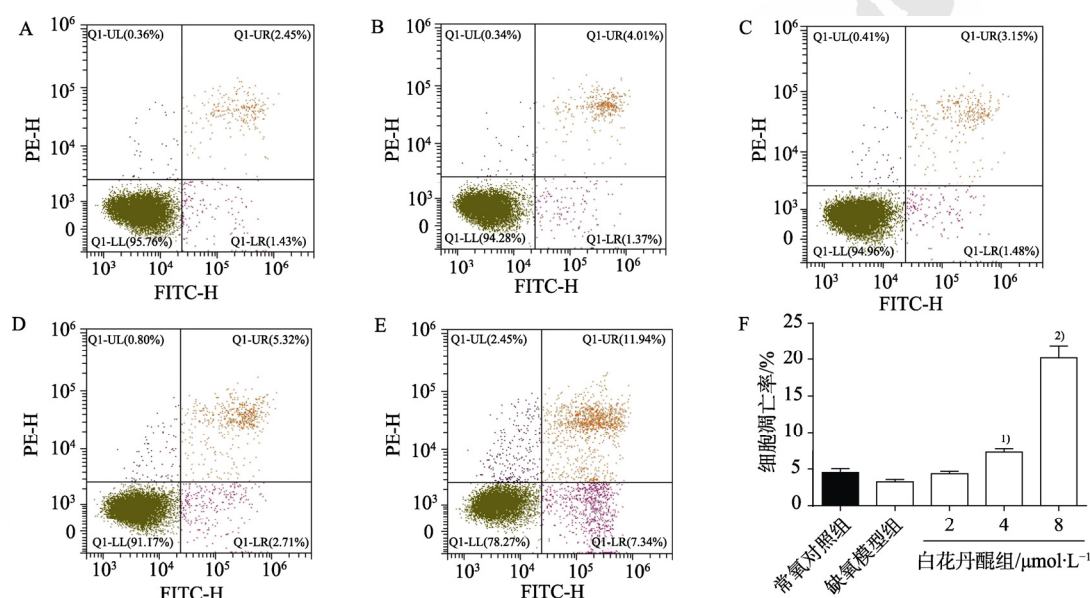


图3 白花丹醌在缺氧条件下诱导 HepG2 细胞凋亡检测($n=3$)

A-常氧对照组; B-缺氧模型组; C-2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白花丹醌组; D-4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白花丹醌组; E-8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白花丹醌组; F-细胞凋亡率统计分析图; 与缺氧模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of plumbagin on apoptosis of HepG2 cells under hypoxia condition($n=3$)

A-normoxia control group; B-hypoxia model group; C-2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ plumbagin group; D-4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ plumbagin group; E-8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ plumbagin group; F-statistical analysis chart of apoptosis rate; compared with hypoxia model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

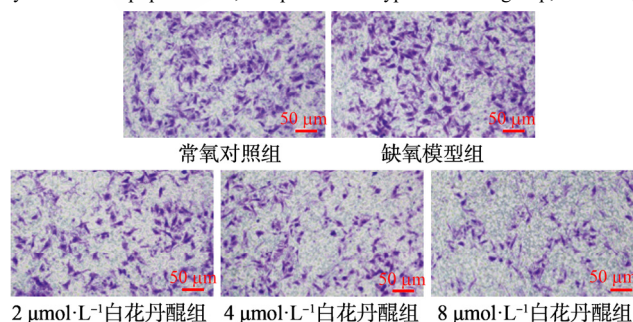
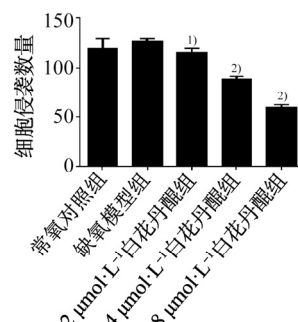


图4 白花丹醌在缺氧条件下对 HepG2 细胞侵袭的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

与缺氧模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of plumbagin on the invasionability of HepG2 cells under hypoxia condition($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Compared with hypoxia model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.



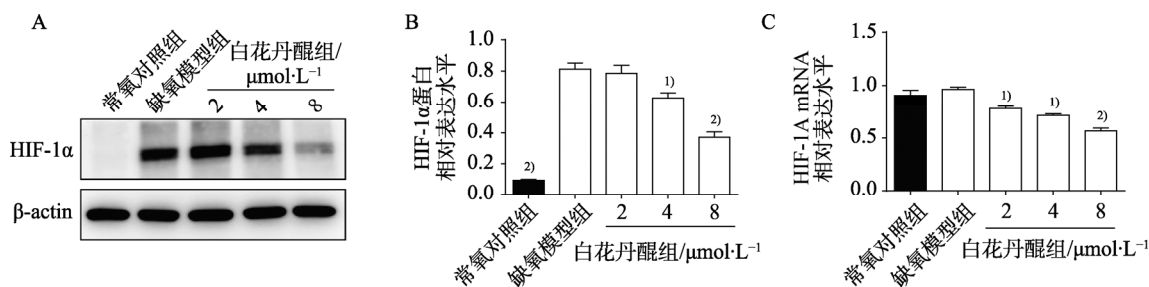


图5 缺氧条件下白花丹醌对 HepG2 细胞 HIF-1A 基因转录及蛋白表达的影响($n=3$)

A-HIF-1α Western blotting 检测; B-HIF-1α 灰度值分析; C-HIF-1A mRNA qRT-PCR 检测结果; 与缺氧模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of plumbagin on expression of HIF-1A mRNA transcription and HIF-1α expression in HepG2 cells under hypoxia condition ($n=3$)

A-HIF-1α Western blotting analysis; B-gray value statistical of HIF-1α; C-HIF-1A mRNA qRT-PCR detection result; compared with hypoxia model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

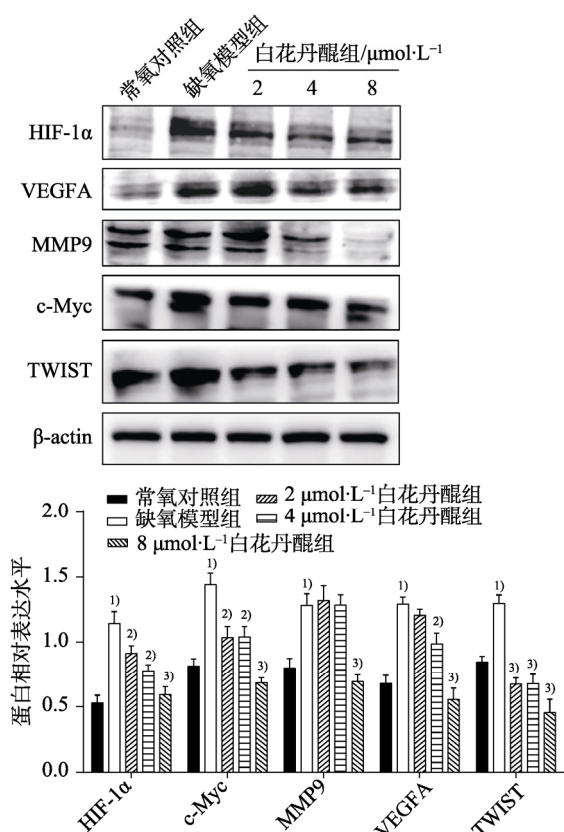


图6 缺氧条件下白花丹醌对 HIF-1α 下游靶基因表达的影响($n=3$)

与常氧对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与缺氧模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effect of plumbagin on expression of HIF-1α target genes under hypoxia condition($n=3$)

Compared with normoxia control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with hypoxia model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

4 讨论

缺氧微环境是多数实体瘤内普遍存在的现象,对肿瘤细胞本身、肿瘤免疫、代谢以及干细胞特性等具有重要影响,也是促进肿瘤细胞转移的重要因素之一^[11]。为了适应外部缺氧环境,肿瘤细胞可通过缺氧诱导因子激活其下游一系列适应性基因以保证细胞存活和维持其高水平增殖^[12]。由于 HIF-1

的活性亚基 HIF-1α 在常氧条件下被泛素-蛋白酶系统降解,因而无法与 HIF-1β 形成具有转录活性的 HIF-1。而在缺氧条件下,肿瘤细胞的生物学行为会发生改变,具有更强的侵袭、转移能力,这与 HIF-1α 有着密切关系^[13]。由此可知,建立体外缺氧模型对于研究肿瘤细胞 HIF-1α 的生物学意义以及筛选有效的抗肿瘤药物是十分必要的^[14]。常用的体外模拟缺氧方法有化学缺氧法和物理缺氧法。虽然以控制细胞培养箱内氧浓度为原理的物理缺氧法是建立缺氧模型的最佳方法,然而由于需要使用昂贵的仪器设备而限制了其应用。而以 CoCl₂ 为代表的化学诱导法不需要其他特殊设备,可在常氧条件下维持细胞内 HIF-1α、HIF-2α 蛋白稳定性,避免其被降解,因而该方法也得到了广泛的认可^[15]。已有报道指出不同类型的肿瘤细胞对 CoCl₂ 的敏感性和耐受性不同^[16],因此需要对 CoCl₂ 的使用条件进行筛选确定。本实验以人肝癌细胞株 HepG2 为研究对象,实验结果显示当 CoCl₂ 作用浓度 $\leq 150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HepG2 细胞增殖活性没有受到明显影响;同时细胞内 HIF-1α 的蛋白表达水平显著高于常氧对照组,提示化学缺氧法建立成功。

缺氧微环境对肿瘤细胞具有筛选作用,使其恶性程度进一步提高,对于诱导肝癌细胞耐药、血管生成等方面具有重要意义^[17]。因此,缺氧微环境是多种实体瘤化疗失败的主要因素^[18]。在常氧条件下,本课题组前期研究结果显示白花丹醌可诱导肝癌细胞凋亡与自噬、抑制肝癌侵袭与转移和血管生成^[9,19-20]。缺氧条件下,本研究结果显示白花丹醌可显著抑制肝癌细胞增殖、侵袭以及诱导细胞凋亡,提示白花丹醌亦能保持良好的抗肝癌活性。HIF-1α 对于肝癌的侵袭与转移具有关键意义,研究指出 HIF-1α 在被 siRNA 干扰表达之后,细胞的侵袭与转移能力显著下降^[21]。在白花丹醌处理后, HepG2 细胞内 HIF-1α 蛋白表达水平

显著下调,提示其缺氧条件下的抗肝癌活性可能与下调 HIF-1 α 有关。

HIF-1 α 作为缺氧条件下的关键转录调控因子,可靶向调控多个下游基因表达,参与肿瘤存活、代谢、侵袭、血管生成以及上皮间质转化等多个过程^[6,12]。缺氧环境下,肿瘤细胞内激活的 HIF-1 α -c-Myc 信号轴可持续抑制 DNA 修复基因的转录,造成细胞内 DNA 损伤、基因的不稳定性和肿瘤恶性程度进一步提高^[22]。临床样本检测发现,肝癌组织内 HIF-1 α 、Survivin 以及 VEGF 的表达量显著高于癌旁组织,并且与患者肝癌分期、肿瘤分化程度以及肝外转移水平显著相关^[23]。TWIST 是肿瘤转移过程中的关键转录调控因子,已有研究指出 HIF-1 α 可以直接结合于 TWIST 基因近端启动子附近的缺氧反应元件,从而调控其转录表达^[24]。在缺氧条件下, HIF-1 α 可反式激活基质金属蛋白酶 9 转录启动子,从而促进其转录和肿瘤侵袭^[25]。因此,进一步考察以上 HIF-1 α 下游基因的表达水平变化。研究结果显示, HepG2 细胞内如 c-Myc、VEGFA、TWIST、MMP9 等下游靶蛋白均有不同程度的表达下调,提示白花丹醌对肝癌细胞的抑制作用,与 HIF-1 α 及其下游靶基因的表达下调具有一定的关系。

综上所述,本研究利用 CoCl₂ 化学缺氧法成功地建立了体外 HepG2 细胞缺氧模型,并证实了白花丹醌在缺氧条件下对 HepG2 细胞的抑增殖、促凋亡和抗侵袭等抗肿瘤活性。随后进一步探讨发现 HIF-1 α 及其下游效应基因的表达水平变化,为白花丹醌的临床应用提供一定的科学参考。

REFERENCES

- [1] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: The major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [2] CASAZZA A, DI CONZA G, WENES M, et al. Tumor stroma: A complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment[J]. *Oncogene*, 2014, 33(14): 1743-1754.
- [3] WANG X W, LIANG X J, LIANG H, et al. SENP1/HIF-1 α feedback loop modulates hypoxia-induced cell proliferation, invasion, and EMT in human osteosarcoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1819-1826.
- [4] LIU Z, WANG Y, DOU C, et al. Hypoxia-induced up-regulation of VASP promotes invasiveness and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2018, 8(17): 4649-4663.
- [5] DOU C, ZHOU Z, XU Q, et al. Hypoxia-induced TUF1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating the Ca²⁺/PI3K/AKT pathway[J]. *Oncogene*, 2019, 38(8): 1239-1255.
- [6] MASOUD G N, LI W. HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 378-389.
- [7] 戴斌. 中国现代瑶药[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2009:

- 19-21.
- [8] YIN Z H, ZHANG J J, CHEN L, et al. Anticancer effects and mechanisms of action of plumbagin: Review of research advances[J]. *Biomed Res Int*, 2020(2020): 6940953. Doi:10.1155/2020/6940953.
- [9] WEI Y, LV B, XIE J, et al. Plumbagin promotes human hepatoma SMMC-7721 cell apoptosis via caspase-3/vimentin signal-mediated EMT[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019(13): 2343-2355.
- [10] ZHONG J, LI J, WEI J, et al. Plumbagin restrains hepatocellular carcinoma angiogenesis by stromal cell-derived factor (SDF-1)/CXCR4-CXCR7 axis[J]. *Med Sci Monit*, 2019(25): 6110-6119.
- [11] QIN C D, REN Z G, TANG Z Y. The role of hypoxic microenvironment in the progress of tumor[J]. *Tumor(肿瘤)*, 2016, 36(1): 96-102.
- [12] SCHITO L, SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors: Master regulators of cancer progression[J]. *Trends Cancer*, 2016, 2(12): 758-770.
- [13] XIANG Z L, ZENG Z C, FAN J, et al. Gene expression profiling of fixed tissues identified hypoxia-inducible factor-1 α , VEGF, and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of lymph node metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(16): 5463-5472.
- [14] JING X, YANG F, SHAO C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 157. Doi:10.1186/s12943-019-1089-9.
- [15] MUÑOZ-SÁNCHEZ J, CHÁNEZ-CÁRDENAS M E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model[J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(4): 556-570.
- [16] MAHEY S, KUMAR R, ARORA R, et al. Effect of cobalt(II) chloride hexahydrate on some human cancer cell lines[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 930. Doi:10.1186/s40064-016-2405-0.
- [17] LI Z G, YANG X Z, LI X K, et al. Association of hypoxia microenvironment with the development and progression of liver diseases[J]. *J Clin Hepatol(临床肝胆病杂志)*, 2020, 36(8): 1891-1895.
- [18] ERIN N, GRAHOVAC J, BROZOVIC A, et al. Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2020(53): 100715. Doi:10.1016/j.drug.2020.100715.
- [19] WEI Y, YANG Q, ZHANG Y, et al. Plumbagin restrains hepatocellular carcinoma angiogenesis by suppressing the migration and invasion of tumor-derived vascular endothelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 15230-15241.
- [20] LIN Y, CHEN Y, WANG S, et al. Plumbagin induces autophagy and apoptosis of SMMC-7721 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9820-9830.
- [21] FEI M, GUAN J, XUE T, et al. Hypoxia promotes the migration and invasion of human hepatocarcinoma cells through the HIF-1 α -IL-8-Akt axis[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018(23): 46. Doi:10.1186/s11658-018-0100-6.
- [22] YOO Y G, HAYASHI M, CHRISTENSEN J, et al. An essential role of the HIF-1 α -c-myc axis in malignant progression[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1177(1): 198-204.
- [23] TIAN Q G, WU Y T, LIU Y, et al. Expressions and correlation analysis of HIF-1 α , survivin and VEGF in patients with hepatocarcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3378-3385.
- [24] YANG M H, WU M Z, CHIOU S H, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(3): 295-305.
- [25] CHOI J Y, JANG Y S, MIN S Y, et al. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in breast cancer cells under hypoxic conditions[J]. *J Breast Cancer*, 2011, 14(2): 88-95.

收稿日期: 2021-05-31

(本文责编: 蔡珊珊)