低氧对人喉癌 Hep-2 细胞增殖及凋亡的影响

胡艳红[1] 李晓明[2]

［摘要］ 目的:探讨低氧对喉癌 Hep-2 细胞增殖及凋亡的影响。方法:模拟人体实体肿瘤低氧环境,应用 MTT 法检测低氧组与常氧组 6、12、24、36 h 细胞增殖率,流式细胞学方法检测低氧组与常氧组 6、12、24、36 h 细胞凋亡率。结果:常氧与低氧细胞增殖率随时间延长均呈逐渐升高趋势;常氧组与低氧组 6、12、24、36 h 各时间点下比较于 24 h 差异有统计学意义($P<0.01$)。低氧组细胞凋亡率于 6、12、24 h 较常氧组低($P<0.01$),于 36 h 较常氧组高($P<0.05$)。结论:低氧可促进细胞增殖,且细胞增殖率可随时间延长逐渐增高。低氧能够抑制细胞凋亡,但持续缺氧还可以促进细胞凋亡。

［关键词］ 低氧;增殖;凋亡;喉肿瘤
doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.12.011
［中图分类号］ R739.65 ［文献标志码］ A

Effects of hypoxia on cell proliferation and apoptosis in human laryngeal cancer Hep-2 cells

HU Yanhong[1] *LI Xiaoming*[2]
([1]Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Tangshan Xiehe Hospital, Tangshan, 063000, China; [2]Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Bethune International Peace Hospital)
Corresponding author: LI Xiaoming, E-mail: xmlmo@126.com

Abstract **Objective**: To explore the effects of hypoxia on cell proliferation and apoptosis in human laryngeal cancer Hep-2 cells. **Method**: This experiment simulates the hypoxia environment of human solid tumor. Apoptosis rate and proliferation rate were detected by flow cytometry and MTT respectively. Both were measured under both the hypoxia and normoxia conditions at 6 h, 12 h, 24 h and 36 h, respectively. **Result**: The proliferation rate showed a trend of gradual increase under both hypoxia and normoxia conditions. The proliferation rate at 6 h, 12 h, and 36 h respectively were significant different from that at 24 h under both conditions ($P<0.01$). The apoptosis rate in hypoxic group were significant lower that in normoxic group at 6 h, 12 h, 24 h, respectively ($P<0.01$), while the opposite happened at 36 h ($P<0.05$). **Conclusion**: Hypoxia can promote cell proliferation, and cell proliferation rate can be increased gradually with time. Hypoxia can inhibit apoptosis, but persistent hypoxia may promote cell apoptosis.

Key words hypoxia; proliferation; apoptosis ; laryngeal neoplasms

缺氧是实质性肿瘤微环境的基本特征之一,它不仅改变了肿瘤的生物学特征,还导致肿瘤细胞的遗传不稳定性,在肿瘤的增殖、恶性侵袭、远处转移乃至肿瘤对放、化疗的抵抗等方面都起着重要的作用。本课题模拟人体实体肿瘤低氧环境进行体外细胞培养,用流式细胞学方法检测常氧及低氧条件下细胞凋亡情况,用 MTT 法检测细胞增殖情况,旨在探讨低氧对喉癌 Hep-2 细胞增殖及凋亡的影响,从而为肿瘤的发生机制提供理论依据与实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

喉鳞癌细胞系 Hep-2 由白求恩国际和平医院耳鼻咽喉-头颈外科中心实验室提供保存,10%胎牛血清 RPMI-1640 培养液购自美国 Invitrogen 公司,四甲基偶氮唑盐 MTT 购自北京华美生物工程有限公司。

1.2 细胞培养及分组

Hep-2 细胞培养在含 10% 胎牛血清、100 U/ml青链霉素的 RPMI-1640 培养液中,于 37℃、5% CO_2、20% O_2、饱和湿度条件下培养,选用处于对数生长期的细胞进行实验。实验条件设置[1]:常氧条件(37℃、5% CO_2、20% O_2、75% N_2)将细胞放置于常规培养箱内,低氧条件(37℃、5% CO_2、2% O_2、93% N_2)将细胞放置于特制的低氧箱内,持续给通气速度约 1 L/min 混合气体(5% CO_2、2% O_2、93% N_2),定时抽取低氧箱内气体进行分析以保持氧浓度的稳定。

1.3 MTT 检测

取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 5×10^4

[1]唐山市协和医院耳鼻咽喉头颈外科(河北唐山,063000)
[2]白求恩国际和平医院耳鼻咽喉头颈外科
通信作者:李晓明,E-mail:xmlmo@126.com

个/ml，铺于 96 孔培养板，设 6 副孔，每孔细胞混悬液 100 μl，均于常氧箱内培养 3～4 h，待细胞完全贴壁，随机分为低氧组(6、12、24、36 h)及常氧组(6、12、24、36 h)，分别置于常氧及低氧箱中培养，于每一相应时间点前 4 h 加入 MTT，继续孵育 4 h 后加入甲瓒，检测波长 490 nm 的吸光度(OD)值，每组实验重复 3 次。计算细胞存活率＝(OD 实验组/OD 对照组)×100％。增殖率＝存活率－100％。

1.4 流式细胞仪检测

所有样本均先于常氧培养箱内培养 4 h，待细胞完全贴壁后，随机分为低氧组(6、12、24、36 h)及常氧组(6、12、24、36 h)，分别置于低氧及常氧环境下进行培养，每组设 3 复瓶(每个样本用培养瓶培养)，每瓶内加入 3 ml 细胞混悬液(含 1×10^6 个细胞)，计时截止后迅速收集细胞，采用美国 Beckman Corlter 公司生产的 Epics-XLⅡ型流式细胞仪检测得到细胞凋亡率，每组实验重复 3 次。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计学软件，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多样本间比较行方差分析，组间比较使用 Pearson 相关分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 常氧组及低氧组 Hep-2 细胞增殖率的比较

常氧组及低氧组 Hep-2 细胞增殖率的比较见表 1。以常氧 6 h 组为对照组，常氧与低氧细胞增殖率均呈逐渐升高趋势。常氧组与低氧组 6、12、24、36 h 各时间点下比较于 24 h 差异有统计学意义($P<0.01$)；常氧组与低氧组 6、12、24、36 h 各时间点之间两两比较均差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 常氧组及低氧组 Hep-2 细胞凋亡率的比较

常氧组及低氧组 Hep-2 细胞凋亡率的比较见表 2。常氧组 6、12、24、36 h 各时间点之间比较凋亡率无明显差别；低氧组 6、12、24 h 之间两两比较无明显差别，36 h 与 6、12、24 h 之间有差别，于 36 h凋亡率有升高趋势；低氧组细胞凋亡率于 6、12、24 h 较常氧组低($P<0.01$)，于 36 h 较常氧组高($P<0.05$)。

3 讨论

低氧是人类和动物肿瘤的共同特征，它是肿瘤发展过程中所必须经历的环境条件之一。目前临床实验和动物模型都已证实实体瘤内存在低氧情况。它不仅改变了肿瘤的生物学特征，还导致肿瘤细胞的遗传不稳定性。缺氧是指可利用氧的减少或氧分压降至临界值以下的状态，限制甚至终止器官、组织和细胞的生理功能。处于低氧条件下的肿瘤细胞仍然能够不断增殖、浸润，说明肿瘤细胞存在对缺氧的自身调节和适应。

缺氧能引起多种转录因子的活化。其中最重要的是缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor1，HIF-1)。HIF-1 是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子。HIF-1a 为 HIF-1 所特有，其蛋白稳定性和转录活性均受细胞内氧浓度调节，HIF-1 的生理活性主要取决于 HIF-1a 亚基的活性和表达。HIF-1α 同肿瘤细胞增殖的关系一直存有争议。Horiuchi 等[2]在研究缺氧对卵巢癌细胞株的影响时发现，缺氧时卵巢癌细胞株的细胞数目不减少，同 HIF-1α 表达增加从而增加 Tp27 的表达和降低 CyclindA 及 CyclindB 表达有关。Bos 等[3]发现在乳腺癌组织中，HIF-la 表达与 Ki-67 指数正相关。樊利芳等[4]发现肺癌组织中同时检测 HIF-1α 和增殖细胞核抗原可以帮助预测肺癌的预后。Kondo 等[5]研究认为 HIF-1α 的过表达在肾癌和膀胱癌的增殖过程中起重要作用。本实验通过 MTT 的方法检测到常氧对照组及低氧对照组均随时间的延长增殖率逐渐升高，且低氧条件下 24 h 组比常氧条件下增殖率明显增高，说明低氧条件下 Hep-2 细胞的增殖力明显增强。肿瘤细胞处于低氧环境中，新生血管和代谢途

表 1 常氧组及低氧组 Hep-2 细胞增殖率的比较

组别	6 h	12 h	24 h	36 h
常氧组	0.028±0.024	0.181±0.059	0.222±0.025	0.751±0.050
低氧组	0.058±0.057	0.203±0.052	0.325±0.024$^{1)}$	0.765±0.077

与常氧组比较，$^{1)}P<0.01$。

表 2 常氧组及低氧组 Hep-2 细胞凋亡率的比较

组别	6 h	12 h	24 h	36 h
常氧组	1.213±0.316	1.290±0.125	1.273±0.297	1.305±0.106
低氧组	1.060±0.057$^{2)}$	0.927±0.212$^{2)}$	1.023±0.232$^{2)}$	1.510±0.035$^{1)}$

与常氧组比较，$^{1)}P<0.05$；$^{2)}P<0.01$。

径的改变下调了肿瘤细胞对氧的依赖性，使其能够在低氧环境中不断生存并增殖。肿瘤细胞对低氧的适应主要取决于糖酵解和新生血管生成，糖酵解的升高不仅可使肿瘤细胞适应低氧不利环境，而且可能减少有氧代谢中反应性氧类（ROS）对细胞 DNA 复制的破坏；同时 HIF-1 还可以刺激胰岛素样生长因子-2 等的表达，以促进细胞增殖。

肿瘤的发生和发展与细胞凋亡过程的障碍有很大关系。凋亡在正常情况下可消灭受损或细胞循环周期失调的细胞，即有恶变潜能的细胞，而凋亡机制受损则促进肿瘤的进展和转移。细胞凋亡受到促凋亡因子（野生型 P53，fas，Bax，caspases 等）和抑制凋亡因子（Survivin，Bcl-2，xIAP）的多方面因素的调节，HIF-1α 在细胞的凋亡中起到了重要作用。Piret 等[6]研究发现，缺氧或氯化钴可以诱导 HIF-1α 的表达，进而抑制叔丁基过氧化氢或去血清引起的肝细胞瘤株 HepG2 的凋亡，说明 HIF-1α 发挥抗细胞凋亡的作用。Carmeliet 等[7]发现缺氧能够增加野生型胚胎干细胞凋亡，他们对胚胎干细胞来源的肿瘤进行培养时，同样发现 HIF-1α－/－基因型肿瘤的凋亡比 HIF-1α＋/＋基因型肿瘤少，可见缺氧诱导的凋亡也是由 HIF-1α 介导的。因此，HIF-1α 与细胞凋亡的关系是错综复杂的，它既可抗凋亡，又可促进凋亡。本实验低氧条件下 6、12、24 h Hep-2 细胞凋亡率明显低于常氧，说明低氧能够抑制细胞凋亡。肿瘤细胞处于短期缺氧时期，HIF-1α 表达显著升高，HIF-1α 的磷酸化与 ARNT 结合形成二聚体，且对凋亡促进剂的敏感显著降低[8]。Akakura 等[9]的研究发现常氧条件下，HIF-1α 组成性表达的胰腺癌细胞系比无 HIF-1α 表达的其他细胞系更能抵抗缺氧和无糖所诱导的细胞凋亡；在缺氧和无糖培养条件下，组成性表达 HIF-1α 的胰腺癌细胞中 HIF-1a 水平高于 HIF-1α 非组成性表达的其他细胞系，进一步研究发现胰腺癌细胞在缺氧的环境下通过 HIF-1 促使 GLUT-1 和 ALDA 的转录，从而增加无氧代谢和葡萄糖摄取而使细胞存活，导致肿瘤的生长。

而实验中低氧 36 h，细胞对培养液的大量消耗导致细胞营养严重不足，活力减低，气体交换能力减弱，因此长期持续的低氧引起细胞凋亡率比常氧增高。其部分机制与 HIF-1α、p53 及 p53 介导的基因有直接关系，HIF-1α 的去磷酸化使 p53 稳定，通过 Bax 的过表达介导凋亡。在不同的细胞类型和不同的实验条件（pH 值、氧浓度、持续时间、生长因子状况等）下，低氧环境通过不同的机制对凋亡产生相反的调节作用。

参考文献

[1] 王卫东，陈正堂，段玉忠，等. 一种用于定量研究细胞缺氧的简易模型[J]. 中国病理生理杂志，2003，19(8)：1151－1152.

[2] HORIUCHI A, IMAI T, SHIMIZU M, et al. Hypoxia-induced changes in the expression of VEGF, HIF-1 alpha and cell cycle-related molecules in ovarian cancer cells[J]. Anticancer Res, 2002, 22: 2697－2702.

[3] BOS R, VAN DIEST P J, VAN DER GROEP P, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related[J]. Breast Cancer Res, 2004, 6: 450－459.

[4] 樊利芳，刁路明，陈德基，等. 肺癌组织中缺氧诱导因子-1α 的表达及其与凋亡和增殖的关系[J]. 癌症，2002，21(3)：254－258.

[5] KONDO Y, HAMADA J, KOBAYASHI C, et al. Over expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in renal and bladder cancer cells increases tumorigenic potency[J]. J Urol, 2005, 173: 1762－1766.

[6] PIRET J P, 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 N Y Acad Sci, 2002, 973: 443－447.

[7] CARMELIET P, DOR Y, HERBERT J M, et al Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. Nature, 1998, 394: 485－490.

[8] HOSSAIN M A, RUSSELL J C, GOMEZ R, et al. Neuroprotection by scatter factor/hepatocyte growth factor and FGF-1 in cerebellar granule neurons isphosphatidylinositol 3-kinase/akt-dependent and MAPK/CREB-independent[J]. J Neurochem, 2002, 81: 365－378.

[9] AKAKURA N, KOBAYASHI M, HORIUCHI I, et a1. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation [J]. Cancer Res, 2001, 61: 6548－6554.

（收稿日期：2013-09-01）