

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2005)09-0789-03

促红细胞生成素与卵巢癌细胞缺氧耐受的关系

刘晓峰¹, 陈必良¹, 马晓东², 马向东¹, 王德堂¹¹第四军医大学西京医院妇产科, 陕西 西安 710033, ²解放军 537 医院妇产科, 陕西 宝鸡 721006

Relationship between hypoxic-endurance and erythropoietin in ovarian carcinoma cell line

LIU Xiao-Feng¹, CHEN Bi-Liang¹, MA Xiao-Dong², MA Xiang-Dong¹, WANG De-Tang¹¹Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China,²Department of Obstetrics and Gynecology, PLA 537th Hospital, Baoji 721006, China

【Abstract】 AIM: To investigate the endurance of ovarian carcinoma cell line to hypoxia by measuring the expression of erythropoietin (EPO) and to study the role of EPO in the anti-apoptosis and the genesis and development of ovarian carcinoma. **METHODS:** The 3AO cells plated in culture bottles were placed in an anaerobic system consisting of 950 mL/L N₂ and 50 mL/L CO₂ for different time periods. The cell growth was observed by MTT assay, the apoptosis rate was detected by FCM and the mRNAs expression of EPO was detected by in situ hybridization. **RESULTS:** Apoptosis of cells cultured under hypoxic condition increased after 6 h of hypoxic exposure compared with that at 0 h ($P < 0.01$) and the activity of cell growth decreased obviously. The intensity of expression of EPO-mRNA increased from 2 h after hypoxic exposure. The number of apoptosis cells reduced after 16 h of hypoxic exposure and the activity of cell growth gradually resumed. After 24 h of hypoxic culture, apoptosis was the same as that at 0 h. **CONCLUSION:** EPO is correlated with hypoxic-endurance and it may be involved in anti-apoptosis of ovarian cancer cells under hypoxic condition.

【Keywords】 erythropoietin; hypoxic-endurance; ovarian malignancy; apoptosis

【摘要】目的:研究在卵巢癌细胞株的缺氧耐受现象中,内源性促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的表达情况及在缺氧条件下发挥抗细胞凋亡的生理学作用,探讨 EPO 与卵巢

癌恶性生物学行为的关系。方法:将卵巢癌细胞株 3AO 在缺氧条件下培养(950 mL/L N₂, 50 mL/L CO₂),取不同缺氧时间,应用 MTT 显色法检测细胞生长活性变化,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,原位杂交检测 EPO mRNA 的表达变化。结果:缺氧培养 6 h 后,凋亡细胞增加(与缺氧 0 h 相比, $P < 0.01$),细胞生长活力明显降低;从缺氧 2 h 开始, EPO mRNA 表达明显增加;缺氧 16 h 后凋亡细胞减少,细胞生长活力逐渐恢复,缺氧 24 h 后细胞凋亡与 0 h 相比无显著差异。结论:内源性 EPO 与缺氧耐受有关,可能参与了肿瘤细胞在缺氧条件下的抗凋亡过程。

【关键词】 内源性促红细胞生成素;缺氧耐受;卵巢恶性肿瘤;凋亡

【中图分类号】 R737.31

【文献标识码】 A

0 引言

近年来,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的非造血作用相继被阐明。许多学者在研究中发现,在大多数人类恶性肿瘤中存在 EPO 的表达,蔡国青等^[1]的实验证实, EPO 在子宫内膜异位症(Ems)组织中的表达也明显升高,且与子宫内膜异位症的生物学恶性行为密切相关,由此 EPO 在妇科疾病尤其是妇科恶性肿瘤中的作用成为关注和研究的热点。缺氧也是细胞凋亡的诱导因子,但恶性肿瘤细胞通过何种机制来对抗缺氧诱导的凋亡尚不清楚。我们拟采用 MTT、原位杂交等方法探讨 EPO 在卵巢癌细胞缺氧耐受中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 卵巢癌细胞株 3AO 取自第四军医大学西京医院妇产科实验室,体外传代培养;凋亡检测试剂盒购自北京中山生物技术有限公司;EPO 探针购自武汉博士德生物工程公司,探针寡核苷酸序列为: EPO 5'-CTGGAGAGGTACCTC TTGGAGGC-CAAGGAG-3';缺氧环境为 950 mL/L N₂, 50 mL/L CO₂;有氧环境为 950 mL/L 空气, 50 mL/L CO₂, 氧饱和度 21%。四唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO),均购自美国 Sigma 公司;细胞培养基 1640 购自于 Gibico 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;流式细胞仪为美国 Coulter 公司产品。

1.2 方法

收稿日期:2004-11-01; 修回日期:2005-01-07

作者简介:刘晓峰(1970-),男(汉族),辽宁省大连市人。主治医师,硕士生(导师 陈必良)。Tel. (029)83375429 Email. Liuxiaofeng638@hotmail.com

1.2.1 分组 体外传代培养卵巢癌 3AO 细胞,于培养瓶中加入 1640 完全培养液(150 mL/L 小牛血清, 2 mmol/L 谷氨酸钠,10 g/L 青链霉素),培养细胞至对数生长期,使细胞密度达 1×10^9 /L 后分为有氧、缺氧组,有氧组置于正常 37℃ 有氧孵箱内,缺氧组置于 37℃ 缺氧培养箱内继续培养。

1.2.2 MTT 检测 细胞培养及分组同上,取 2,6,10,16,20 和 24 h 6 个时间点分别对两组细胞做 MTT 细胞生长活力测定.用酶标仪在 570 nm 处测定各组 A 值,使用 Microsoft Excel 软件绘图。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将两组细胞培养至对数生长期,消化收集细胞,调整细胞密度为 1×10^9 /L,取 2,6,16 和 24 h 4 个时间点以 Annexin V-FITC 双标记染色法,上流式细胞仪进行双参数分析,测定凋亡细胞的百分率。

1.2.4 原位杂交 培养细胞至对数生长期使细胞密度达 1×10^9 /L,接种于 6 孔板内进行细胞爬片,24 h 后待细胞全部贴壁后分为有氧组、缺氧组,取 2,6,16 和 24 h 4 个时间点进行原位杂交检测 EPO mRNA 的表达.操作步骤严格按照试剂盒说明书进行.原位杂交(DAB 显色)染色标本采用组织化学半定量评分标准进行评分:即对每张切片的阳性细胞率及阳性细胞着色强度分别进行分级记分.每张切片任意选 5 个视野,观察其阳性细胞胞质表达强度,无表达为阴性(0 分)、阳性颗粒呈浅黄色为可疑阳性(1 分)、浅棕色为弱阳性(2 分)、棕黄色为阳性(3 分)、棕褐色为强阳性(4 分).计算阳性细胞百分数(5 个视野的平均数),无表达为阴性(0 分)、1%~15%为可疑阳性(1 分)、16%~50%为弱阳性(2 分)、51%~85%为阳性(3 分)、86%~100%为强阳性(4 分).按公式(阳性细胞表达强度×阳性细胞百分数)^{1/2}计算出该标本的阳性指数。

统计学处理:实验中所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 10.0 统计学软件进行方差分析,组间方差不齐时采用非参数秩和检验. $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测 细胞缺氧培养 6 h 后,细胞生长活力明显降低;缺氧 16 h 细胞生长活力逐渐恢复,缺氧 24 h 后细胞生长活力与 0 h 相比无显著差异.细胞生长曲线出现相应的改变(Fig 1)。

2.2 流式细胞仪检测 缺氧诱导 3AO 细胞凋亡仅发生于缺氧培养 6~16 h(与 0 h 相比, $P < 0.05$),24 h 后,细胞几乎无凋亡(与 0 h 相比, $P = 0.0910$).有

氧培养各时相凋亡差异无显著性(Tab 1, Fig 2)。

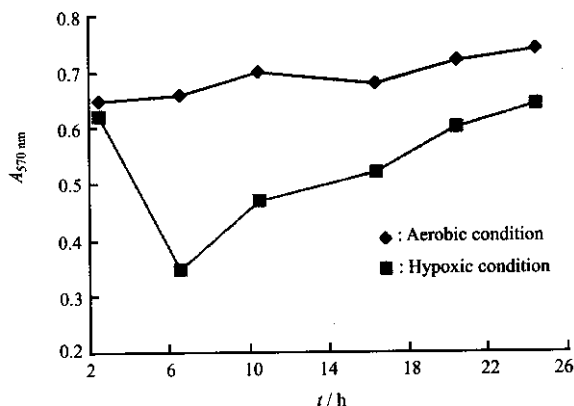


Fig 1 Growth curves of the cells 图 1 细胞生长曲线图

表 1 不同缺氧时间 3AO 细胞株凋亡率

Tab 1 Apoptosis rate of 3AO cells with different thypoxic degrees ($\bar{x} \pm s$)

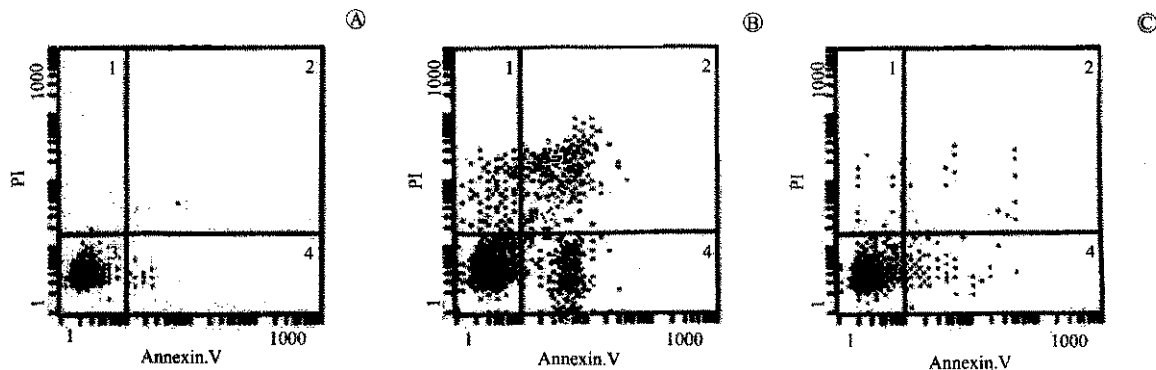
Group	n	Apoptosis rate
0 h	3	1.40±0.26
6 h	5	15.80±1.02 ^a
10 h	5	13.30±1.13 ^a
16 h	4	9.70±1.16 ^a
20 h	4	4.20±0.67 ^a
24 h	4	2.06±0.49

^a $P < 0.05$ vs 0 h.

2.3 原位杂交结果 EPO mRNA 在有氧组存在弱阳性表达,缺氧组中以阳性或强阳性表达为主,棕黄色颗粒集中于胞质,核膜、核内可见表达,表达强度明显高于有氧组,差异显著($P < 0.05$, Tab 2)。

3 讨论

EPO 是一种糖蛋白细胞因子, M_r 34×10^3 ,由 165 个氨基酸组成. EPO 早期由胎肝产生,出生后主要由肾小管间质细胞分泌.当机体缺氧时,氧分压下降改变了胞质中的还原状态后启动缺氧诱导因子(HIF-1)最终造成 EPO 表达增多. Zaman 等^[2]进一步研究证实,在 EPO 基因的 3'-端存在低氧诱导增强子,而在 5'-端旁侧序列上含有转录因子的结合位点,低氧条件下,这些顺势调节元件与细胞核内反式作用因子特异性结合,相互作用致 EPO 基因表达增强.我们的实验结果发现,缺氧培养后卵巢癌 3AO 细胞在一定时间内(6~16 h)生长活力明显抑制,凋亡率增加;随着缺氧时间的延长,细胞生长活力逐渐恢复,凋亡



A: 0 h group; B: 10 h group; C: 24 h group. Quadrant 1: necrotic cells; 2: secondary necrotic cells; 3: viable cells; 4: apoptotic cells.

Fig 2 Double-parameter analysis on the apoptosis of 3AO cells with flow cytometry

图 2 细胞凋亡的双参数分析

表 2 不同缺氧时间 EPO mRNA 在 3AO 细胞株中的表达

Tab 2 Expression of EPO mRNA in 3AO cells with different hypoxic degrees ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Hypoxic condition	Aerobic condition
2 h	3	11.60 ± 1.27 ^a	3.84 ± 0.34
6 h	4	12.53 ± 1.02 ^b	4.01 ± 0.74
16 h	4	10.67 ± 1.53 ^c	2.40 ± 0.58
24 h	4	11.10 ± 1.16 ^d	3.17 ± 0.43

^aP=0.0011, ^bP=0.0004, ^cP=0.0003, ^dP=0.0002 vs aerobic condition group.

率减少,即出现缺氧耐受.通过原位杂交的方法鉴定卵巢癌细胞系 3AO 中 EPO mRNA 的表达情况,发现在正常条件培养的 3AO 细胞存在 EPO 的 mRNA 少量表达,在缺氧后表达明显增高,这提示我们 EPO 与卵巢癌细胞的抗凋亡特性有着密切关联.

Bernaudin 等^[3]发现,大鼠大脑中动脉栓塞前 24 h 脑室内注射 EPO,可有效减少梗死面积; Juul 等^[4]在体外缺氧条件下培养人类神经元,加入生理剂量的人基因重组 EPO(rHuEPO)后细胞的 DNA 断裂现象明显被抑制,EPO 可能通过保全基因组 DNA 的完整性和保持细胞膜的极性来抑制凋亡的诱导^[5].据此我们可以认为 EPO 在卵巢癌细胞系中的表达是一种自分泌,即作为内源性保护因子起作用,其平时处于静息状态或低表达,当组织受到外界不良刺激(缺氧)后会迅速高表达以对抗缺氧的不良环境,形成卵巢癌细胞的缺氧耐受.由于我们应用的缺氧环境低于任何体内生理条件,因此,可以推测在体内 3AO 细胞通过 EPO 的作用更能够适应缺氧环境而生存.

缺氧是恶性肿瘤微环境的重要特征,缺氧引起 EPO 迅速表达,可以阻断细胞死亡,降低缺氧、缺血所造成的组织损伤,将坏死过程推迟^[6]; Yasuda 等^[7]

还发现,EPO 及其受体在女性生殖系恶性肿瘤中 mRNA 的表达高于正常组织.据此我们认为 EPO 与卵巢癌的生长发生具有密切关系,而且在其他妇科疾病中也起着重要作用.

【参考文献】

[1] 蔡国青,陈必良,樊扬,等.原位杂交检测 Epo,VEGF 基因在子宫内膜异位症组织中的表达[J].第四军医大学学报,2004;25(6):548-550.
Cai GQ, Chen BL, Fan Y, et al. Detection of Epo and VEGF mRNAs in endometriosis tissues using *in situ* hybridization [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2004;25(6):548-550.
[2] Zaman K, Ryu H, Hall D, et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes p21 and erythropoietin [J]. *J Eur Sci*, 1999;9(22):9821-9830.
[3] Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. Potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999;19(6):643-651.
[4] Juul SE, Anderdon DK, Li Y, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system[J]. *Pediatr Res*, 1998;3(1):40-49.
[5] Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K, et al. Angiogenesis and plasticity: Role of erythropoietin in vascular systems[J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002;1(6):863-871.
[6] Ribatti D, Marzullo A, Nico B, et al. Erythropoietin as an angiogenic factor in gastric carcinoma[J]. *Histopathology*, 2003;42(3):246-250.
[7] Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, et al. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs[J]. *Carcinogenesis*, 2002;23(11):1797-1805.