

缺氧应激对肝癌细胞代谢信号通路的调节作用*

施冬云¹⁾ 刘珊林^{1,2)**} 李浩然²⁾ 沈新南¹⁾ 俞培忠¹⁾ 程建¹⁾ 龚兴国²⁾

(¹⁾复旦大学上海医学院,复旦大学自由基调控与应用研究中心, 上海 200032; ²⁾浙江大学自由基生命科学研究中心, 杭州 310027)

摘要 通过实验阐明在缺氧条件下糖酵解相关基因表达的变化规律及对肿瘤细胞和正常细胞增殖的影响, 并探索活性氧(ROS)介导肝癌细胞代谢途径及对相关基因表达和酶活性的调节作用. 以 SMMC-7721 人肝癌细胞和 L02 正常肝细胞作为研究对象, 分别在单纯缺氧及加葡萄糖缺氧条件下, 观察细胞生长, 并检测糖代谢关键酶: 丙酮酸激酶(pyruvate-kinase, PK)、己糖激酶(hexokinase, HK)、琥珀酸脱氢酶(succinic dehydrogenase, SDH)、异柠檬酸脱氢酶(isocitric dehydrogenase, IDH) mRNA 表达水平和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性. 还检测了 *pkb* 基因及缺氧诱导因子 *hif-1* 的表达. 实验结果说明: a. 肿瘤细胞较正常细胞具有更强的缺氧耐受性; b. 缺氧条件下, 糖酵解途径的增强是保证肿瘤细胞能快速增殖的机制之一; c. ROS 通过 HIF-1 介导了糖代谢通路相关酶的基因表达, 参与肝癌细胞缺氧信号通路调节, 用抗氧化剂干预可以降低肿瘤细胞的缺氧耐受能力.

关键词 缺氧, 糖酵解, 活性氧, 缺氧诱导因子-1, 肝癌

学科分类号 R364.4

肿瘤组织糖酵解能力显著高于正常组织, 在有氧条件下肿瘤组织也会以糖酵解作为主要产能方式, 这种现象称为“Warburg effect”^[1]. 但该效应的分子机制尚不很清楚. 有些学者认为, 这是一些原癌基因如 *ras*、*src*、*myc* 等的高表达改变了代谢通路而导致, 也有人认为是肿瘤细胞中某些转录因子异常活化而诱导了糖酵解某些关键酶的表达^[1~3]. 但迄今为止, 对此效应具体机制尚无定论.

肿瘤细胞具有分化程度低、增殖迅速的特点. 因实体肿瘤或者恶性变组织在短期内可迅速增大体积, 血管生长相对滞后, 从而会引起瘤体组织和细胞的局部缺血、缺氧. 所以, 缺氧条件下维持细胞的代谢活动也是肿瘤细胞生长的特点, 而且因缺氧释放过剩自由基在一定程度下应与诱导肿瘤增殖恶化和癌细胞转移也有关.

分子氧对肿瘤细胞和正常细胞的代谢活动都是必需的, 通过生物氧化可获得细胞增殖所需能量, 但由于 2 种细胞其生物学特征不同, 对氧的需求可能也有不同, 超过或低于自身细胞代谢需氧限度都可能对细胞造成损害. 缺氧过程会使线粒体产生过剩活性氧(ROS), 而 ROS 也是肿瘤细胞生长信号通路的第二信使^[4~6], ROS 可能也参与了缺氧信号通

路的调控. 故在不同程度缺氧实验条件下研究自由基参与对代谢通路的作用, 有利于探明和发现肿瘤细胞特有的代谢机制.

已知一定程度缺氧可引起细胞基因发生变异, 归纳大致有 3 种情况^[7~9]: a. 一些癌基因产生功能获得性变异, 引起基因本身或者相应蛋白质的表达升高; b. 一些抑癌基因发生功能缺失性突变, 基因表达量下调或减弱了表达产物的活性; c. 一些与 DNA 修复相关的基因发生了功能缺失性突变, 提高了癌基因和抑癌基因的变异频率. 这些基因突变的综合结果, 将决定细胞生长功能和状态的变化. 而细胞的一切生物学性状改变, 离不开细胞能量代谢的变化因素. 本文以 SMMC-7721 人肝癌细胞和 L02 正常人肝细胞作为研究对象, 在缺氧条件下分别用无血清培养基和无血清培养基加葡萄糖处理, 并对 2 种细胞进行培养观察, 分析研究缺氧干预对 2 种细胞株的能量代谢通路及相关基因表达的调节作用和差异.

*国家自然科学基金重点和面上资助项目 (30130100, 30270501).

** 通讯联系人. Tel: 021-54237698, E-mail: slliu@shmu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-05, 接受日期: 2006-05-28

1 材料和方法

1.1 材料

SMMC-7721 人肝癌细胞系, 由上海第二军医大学病理解剖教研室建株, 购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所; L02 正常人肝细胞系, 由复旦大学上海中山医院肝病研究所馈赠; 缺氧混合气由上海申威氧气公司提供; 2',7'-二氯氢化荧光素二酯 (DCFH-DA) 购自 Calbiochem 公司 (San Diego, CA); 总 RNA 提取试剂 TRIZOL 购自美国 Invitrogen 公司; 小鼠抗人 hif-1 α 单克隆抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗小鼠 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司; PMSF、TES 和二巯基苏糖醇 (DTT) 购自华美公司; 其他试剂均为市售产品. PCR 仪为德国 Biometra 公司产品; 流式细胞仪 (FCM) 为 Becton-Dickon 公司产品; 核酸电泳系统、冷冻高速离心机均为 Bio-Rad 公司产品; 荧光检测仪为日立公司产品; 凝胶成像扫描仪为 Pharmacia 公司产品; 紫外-可见光分光光度计为岛津公司产品. 引物寡聚核苷酸片段均由上海生物工程公司合成.

1.2 细胞培养

分装接种细胞 1×10^6 于培养瓶中, 待细胞贴壁后, 换用无血清 RPMI-1640 培养液饥饿培养 24 h.

1.3 细胞缺氧模型

将饥饿 24 h 的 SMMC-7721 和 L02 细胞弃去培养液, 置入特制培养容器中, 然后通过预先置入容器中的加液细管, 将已经用通入含 95% N_2 + 5% CO_2 的混合气平衡 4 h 的 RPMI-1640 无血清缺氧培养液, 及另加有葡萄糖的缺氧培养液, 分别注入上述含细胞的培养瓶中, 并在保持 1 L/min 流速通入

缺氧混合气和 37℃ 条件下继续培养. 另外, 肝癌细胞再作不同缺氧程度处理, 具体采用 5% O_2 + 90% N_2 + 5% CO_2 , 1% O_2 + 94% N_2 + 5% CO_2 , 以及 0% O_2 + 95% N_2 + 5% CO_2 , 3 种不同混合气处理 6 h 后, 检测细胞中 hif-1 α 的表达变化, 并在 1% O_2 + 94% N_2 + 5% CO_2 缺氧条件下, 定时观察 1、3、6、12 h 和 24 h hif-1 α 的表达.

1.4 细胞存活率和生长抑制率

在不同的培养时间分别对贴壁细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 做成细胞悬液, 用 0.2% 台盼蓝染色进行细胞计数, 并计算细胞存活率和生长抑制率. 生长抑制率按公式: 抑制率 = (对照细胞数 - 相同时间点缺氧细胞数) / 对照细胞数. 细胞存活率 = 活细胞数 / 细胞总数.

1.5 RT-PCR 测定相关基因表达

a. 细胞总 RNA 的提取: 弃去培养瓶中的液体, 加入 TRIZOL 试剂, 提取总 RNA, 经紫外分光光度计检测纯度, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间, 并根据 A_{260} 值计算样品总 RNA 浓度. b. 引物: 内标 β -actin, 及相关基因 pkm2, pkb α , hk, sdhA, idh3 α 及 hif-1 α 等的引物序列见表 1. c. RT-PCR: 分别取各组细胞 2 μ g 总 RNA 进行逆转录反应, 然后分别取 2 μ l 逆转录反应产物与各对引物进行 PCR. 条件: 94℃ 变性 1 min; (β -actin, 62℃; pkb α , 58℃; pkm, 56℃; hk, 54℃; sdhA, 57℃; idh3 α , 56℃) 退火 1 min; 72℃ 延伸 1.5 min; 25 个循环, 最后 72℃ 10 min 结束反应. d. RT-PCR 产物的检测和分析: 取 RT-PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 GDS 凝胶成像系统拍摄打印实验结果, 电泳条带用 IBAS 计算机图像分析系统扫描分析.

Table 1 The primers used in this paper

Gene	Sense primer	Anti-sense primer	Length / bp
pkm2	CGCTGGATAACGCCTACA	CATCAAACCTCCGAACCC	417
pkb α	ATGACAGCATGGAGTGTGTG	CCTCAGAGACACGGCCTTAG	612
hk	TGGCAAAGTGAGGATGTAGC	AAGCAGAGGTTTCGAGAAAATG	406
sdhA	GTGGACAGAGCCTCAAGTT	ACAGCCTCGTCTTCTCG	551
idh3 α	CTGCCAAAGCACCTATTC	CTGCACGACTCCATCAAC	332
hif-1 α	ACTTCTGGATGCTGGTGATT	GTCGTGCTGAATAATACCACT	394
β -actin	ACCTTCAACAACCCAGCCATGTACG	CTGATCCACATCTGCTGGAGGGTGG	703

1.6 免疫印迹法测 HIF-1 蛋白表达

将提取的细胞总蛋白按 Bradford 法测量蛋白质浓度, 取 50 μ g 总蛋白质进行 SDS-聚丙烯酰胺

凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电印迹转移法将凝胶内的蛋白质转至硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1.5 h, 再分别与一抗 (1:500

小鼠抗人 HIF-1 单克隆抗体) 4℃ 孵育过夜, 用 TBST 溶液洗脱 3 次, 再与二抗 (1:2000 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗小鼠 IgG) 室温孵育 1.5 h, 以 TBST 溶液洗脱 3 次后与 ECL 试剂反应 1 min, X 光胶片压片曝光 10~60 s, 以 IBAS 图像处理系统对胶片进行扫描测定感光区带的感光密度。

1.7 胞内活性氧及乳酸脱氢酶活性测定

细胞内 ROS 水平按 Jakubowski 等^[10]建立的方法, 用荧光比色法检测。乳酸脱氢酶活性利用 LDH 催化作用于乳酸和 NAD⁺反应时, 产生丙酮酸和 NADH 的原理, 在 λ=340 nm 时, 测定吸光度增高的速率, 从而计算出 LDH 的活性。

2 结 果

2.1 缺氧对细胞增殖的影响

如图 1 所示, 单纯缺氧和缺氧加 5 mmol/L 葡萄糖 2 种条件下, SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞生长都受到不同程度抑制, 并随缺氧时间延长, 抑制率逐渐增高。单纯缺氧 24 h, SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞生长抑制率分别为 20.12%和 35.07%, 二者有显著性差异。在 5 mmol/L 葡萄糖存在情况下, 缺氧 24 h, SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞生长抑制率分别为 11.04%和 28.55%, 有显著性差异。说明缺氧应激对 L02 正常细胞的抑制作用明显高于 SMMC-7721 肝癌细胞。加入葡萄糖后, 虽缺氧对 2 种细胞造成的抑制作用都减轻, 但也存在明显差

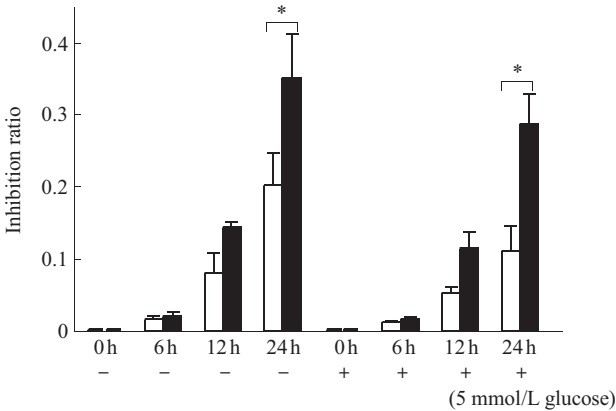


Fig. 1 Influence of hypoxia on inhibition ratio of cell proliferation in SMMC-7721 and L02 cells
Cells were serum-starved for 24 h prior to exposure under 5% CO₂ and 95% N₂ hypoxia condition. Some cells were treated with 5 mmol/L glucose before hypoxia. At different times (6 to 24 h) after hypoxia, cells were harvested and counted for growth inhibition ratio. Data are present as ($\bar{x} \pm s$) of three experiments. * $P < 0.05$. □: SMMC-7721; ■: L02.

异。单纯缺氧 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞存活率与抑制率变化趋势相反, 随缺氧时间延长却逐渐降低, 缺氧 24 h, SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞存活率分别为 63.21%和 22.30%, 存在显著性差异。在各时间点 SMMC-7721 肝癌细胞存活率都高于 L02 正常肝细胞存活率。加入 5 mmol/L 的葡萄糖后, 2 种细胞的存活率都有所提高, 且 SMMC-7721 肝癌细胞的存活率各时间点都在 95%以上, 明显高于 L02 正常细胞。而 L02 细胞加入葡萄糖后, 在 24 h, 存活率只有 31.1%, 表明 2 种细胞对缺氧的反应差异很明显。

2.2 缺氧对 pkb mRNA 基因表达的影响

采用 RT-PCR 方法检测了 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞在单纯缺氧条件下 pkb 基因表达变化。结果发现: 同对照相比, 2 种细胞经 95% N₂ + 5% CO₂ 混合气的处理后, pkb 基因表达随缺氧时间延长而逐步降低, 如图 2 所示。缺氧 24 h, pkb 在 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞中分别降低至对照的 20.1%和 15.6%。L02 正常细胞相对下降速度较快, 说明缺氧条件下细胞生长受到抑制与 pkb 基因表达下调有关。

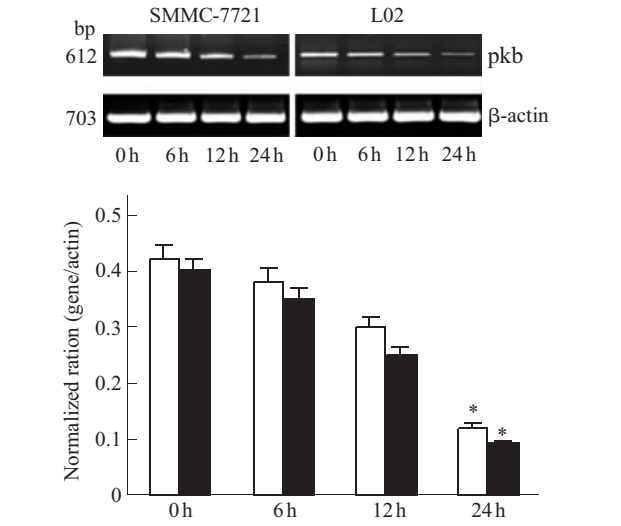


Fig. 2 Effect of hypoxia on pkb gene expression under hypoxia in SMMC-7721 and L02 cells
Cells were incubated under 5% CO₂ and 95% N₂ hypoxia as described before. Total RNA of cell was extracted and RT-PCR was performed. DNA products were visualized with ethidium bromide on 2% agarose gels. The bottom bar graph shows the ratio of genes to β-actin. Data are present as ($\bar{x} \pm s$) of three experiments. * $P < 0.05$ compared to control cells. □: SMMC-7721; ■: L02.

2.3 缺氧对己糖激酶、丙酮酸激酶基因表达的影响

在缺氧 6 h、12 h、24 h 时间点分别检测 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞 2 种糖酵解关键酶基因 mRNA 表达变化, 发现 2 种细胞株, hk 基因表达在 0~12 h 都随时间呈升高趋势, 但在 24 h 却明显下调, 其中 SMMC-7721 肝癌细胞下调至 0 时间对照的 25%, L02 正常细胞下降至 6.1%, 二者差异显著. pkm 基因在 SMMC-7721 细胞中的

表达, 0~12 h 表达水平稳定, 24 h 稍下调. L02 正常细胞 24 h 下调幅度很大, 2 种细胞株在缺氧 24 h 的表达差异很显著 (图 3).

在培养液中加入 5 mmol/L 葡萄糖的缺氧处理, 2 种细胞株 hk、pkm 基因表达同单纯缺氧相比, 24 h 表达都显著上调. 说明葡萄糖作为糖酵解底物, 可以刺激糖酵解关键酶的表达, 从而使细胞提高耐缺氧的能力.

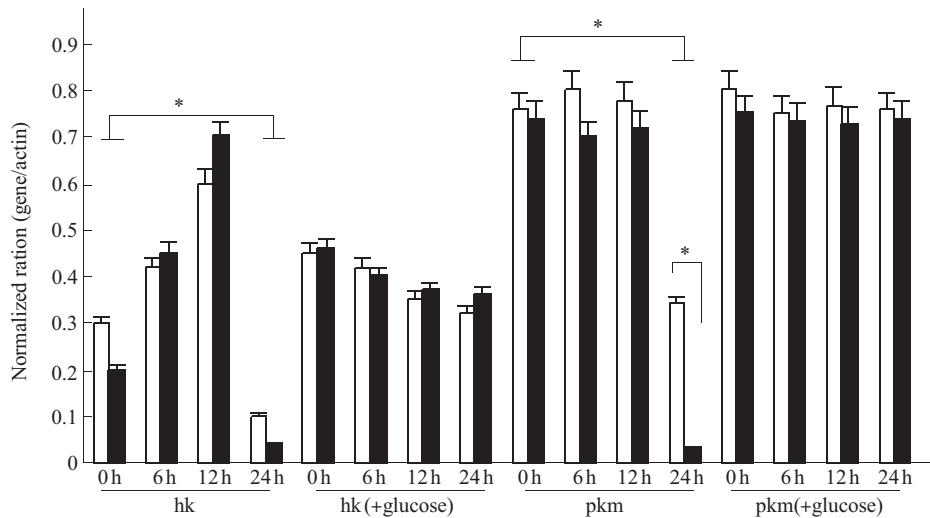


Fig. 3 Effect of hypoxia on hk and pkm gene expression with or without glucose treatment in SMMC-7721 cells and L02 cells

The bar graph shows the ratio of genes to β -actin. Data are present as $(\bar{x} \pm s)$ of three experiments. * $P < 0.05$.

□: SMMC-7721; ■: L02.

2.4 缺氧对乳酸脱氢酶活性的影响

单纯缺氧条件下, SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性都随缺氧时间延长而增加, 缺氧 24 h 的 SMMC-7721 肝癌细胞 LDH 活性升高达 48.5 倍, L02 正常细胞也升高 16 倍, 且在缺氧各个时间点, SMMC-7721 肝癌细胞的 LDH 活性都高于 L02 正常细胞. 加入葡萄糖后, SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞 LDH 活性随时间提高幅度加大, 且各时间点 SMMC-7721 肝癌细胞的 LDH 活性都高于 L02 正常细胞, 呈现肝癌细胞相对比正常细胞具有更强的糖酵解水平 (图 4).

2.5 缺氧对有氧氧化关键酶异柠檬酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶表达的影响

如图 5 所示, 单纯缺氧时 SMMC-7721 肝癌细胞在缺氧 6 h idh 表达稍上调, 以后迅速降低. L02 细胞异柠檬酸脱氢酶 idh 基因表达在缺氧 6 h 也稍上调, 12 h 下调接近 0 h 对照水平, 24 h 下调更显著.

著. 琥珀酸脱氢酶 sdh 基因在 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞的表达与 idh 类似, 24 h 2 种细胞都几乎呈不表达. 但在 6~12 h, L02 正常细胞 sdh 表达水平相对高于 SMMC-7721 肝癌细胞细胞的表达.

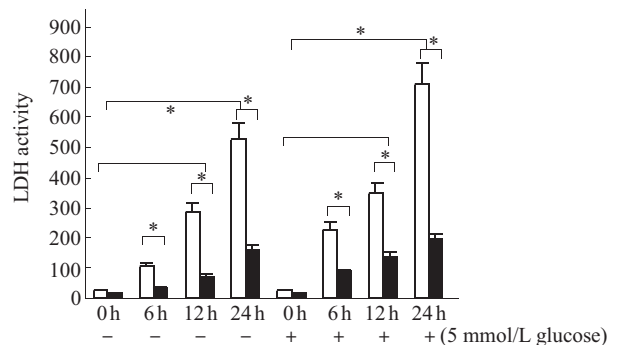


Fig. 4 Effect of hypoxia on the LDH activity in SMMC-7721 and L02 cells

Cells were treated with or without 5 mmol/L glucose before exposure to hypoxia. Data in the graphs represent activity of LDH in $(\bar{x} \pm s)$ from three experiments. * $P < 0.05$. □: SMMC-7721; ■: L02.

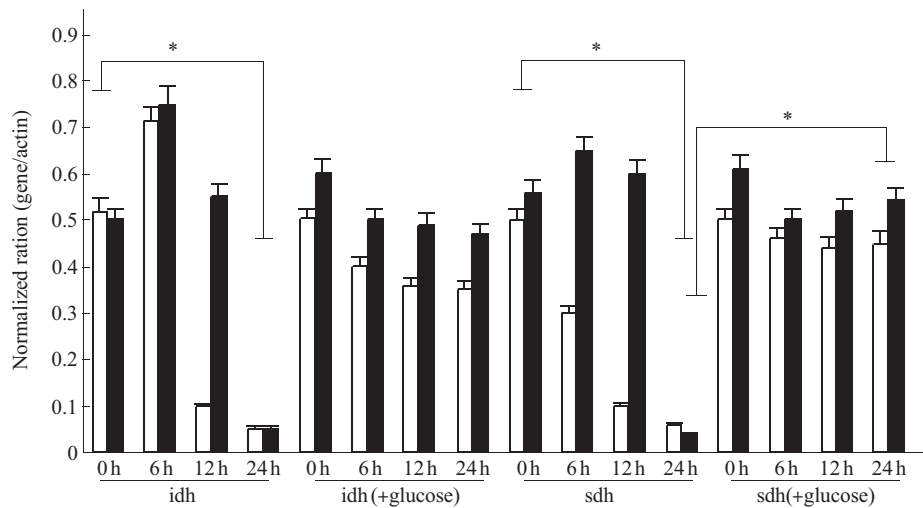


Fig. 5 Effect of hypoxia on idh and sdh gene expression with or without glucose treatment in 7721 cells and L02 cells

The bar graph shows the ratio of genes to β -actin. Data based on this experiment expressed as $(\bar{x} \pm s)$ from three experiments. * $P < 0.05$. □: SMMC-7721; ■: L02.

加入葡萄糖后, SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常细胞 idh 基因的表达虽仍表现随时间减低趋势, 但下调幅度明显减小, 24 h 仍有较多表达, 且 L02 正常细胞表达也相对比 SMMC-7721 肝癌细胞高. sdh 表达变化类同. 显示正常细胞在增加底物葡萄糖条件下对有氧氧化的限速酶更敏感. 与单纯缺氧相比, idh 和 sdh 在缺氧 24 h 表达都明显升高.

2.6 缺氧诱导肝癌细胞的 ROS 水平提高

缺氧过程中 ROS 水平在 1 h 内迅速升高, 以后缓慢增加, 至 6 h 后稳定在一较高水平 (图 6).

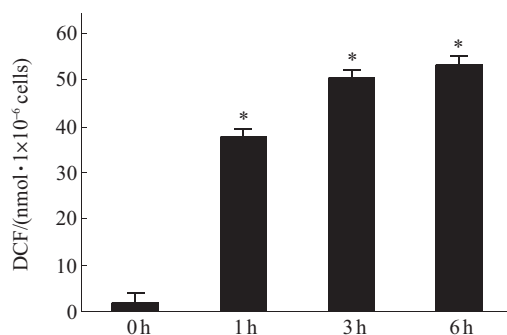


Fig. 6 Level of ROS induced by hypoxia at different time points

ROS production was measured by DCF-DA. The fluorescence was measured using fluorescence spectrophotometer (excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively). Data based on this experiment expressed as $(\bar{x} \pm s)$ from three experiments. * $P < 0.05$ compared to control cells.

2.7 不同缺氧程度对肝癌细胞 hif-1 α 表达的影响

通过不同缺氧程度处理, 结果表明随氧分压降低, hif-1 α 表达呈逐渐上调趋势. 并在含氧 1% 的缺氧条件下, hif-1 α 表达随缺氧时间延长也逐渐升高, 6 h 达最高峰值 (图 7).

2.8 ROS 对 hif-1 α 基因表达的调节作用及对蛋白质表达的影响

以上实验表明: 缺氧条件下 ROS 释放增加, hif-1 α 表达相应上调. 为证明在 SMMC-7721 肝癌细胞中 ROS 是否直接诱导了 hif-1 α 的表达, 将 SMMC-7721 肝癌细胞在 95% N_2 + 5% CO_2 缺氧条件下培养 6 h, 然后在培养液中加入 10 mmol 抗氧化剂 NAC, 使清除过剩的 ROS, 继续缺氧培养 6 h, 然后检测 hif-1 α mRNA 及蛋白质的表达. 如图 8 所示, hif-1 α 的 mRNA 及蛋白质表达均明显下调, 表明 ROS 参与了对 hif-1 α 表达的调控.

3 讨 论

肿瘤细胞无论在常氧还是在缺氧环境下, 都表现出了不同于正常细胞的生物学性状. 70 年前, Warburg 研究了多种人和动物肿瘤, 发现同正常组织相比, 肿瘤组织糖酵解速率明显增高, 由葡萄糖酵解产生的乳酸也明显增多, 这种现象称为 “Warburg effect” [11~13]. Warburg 效应的发现, 将肿瘤可能具特有代谢方式的课题研究提到了重要地

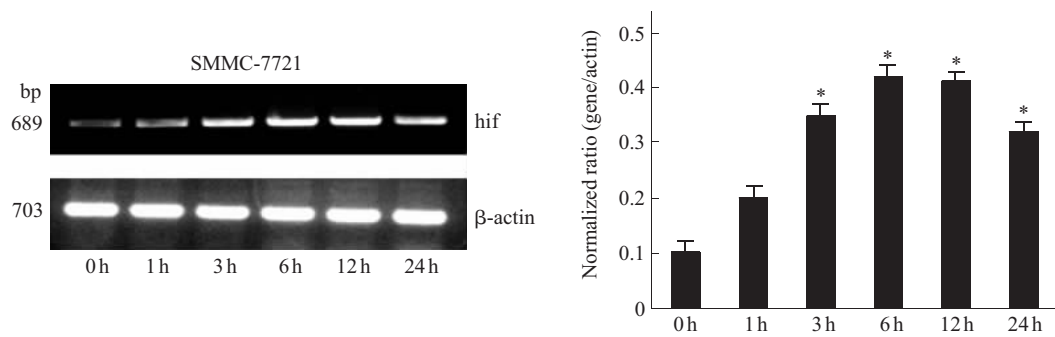


Fig. 7 Influence of hypoxia on hif-1α gene expression

The hif-1α gene expression in SMMC-7721 cells under different time course of hypoxia. RT-PCR was performed for quantification of hif-1α expression. The right bar graph shows the ratio of hif-1α to β-actin. Data are present as ($\bar{x} \pm s$) of three experiments. * $P < 0.05$ compared to control cells.

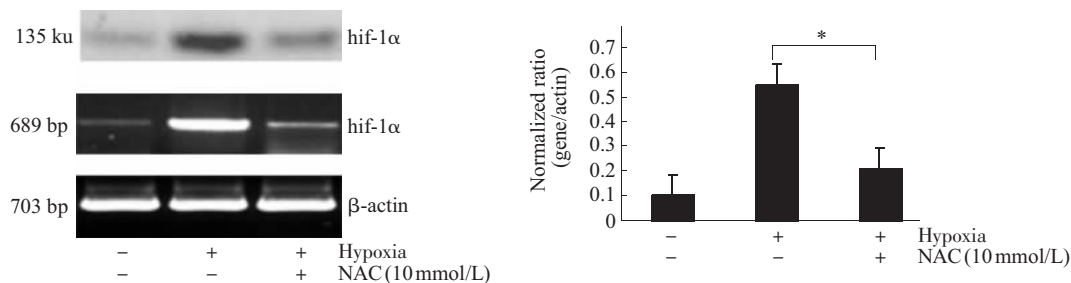


Fig. 8 Effect of ROS on hif-1α gene expression in SMMC-7721 cells undergoing hypoxia

SMMC-7721 cells were cultured under hypoxia for 6 h, then added 10 mmol/L NAC and further cultured for 6 h. Cells were collected for Western blot and RT-PCR. Western blot was shown on the top. Results are representative three independent experiments. The right bar graph shows the ratio of hif-1α to β-actin. Data are present as ($\bar{x} \pm s$) of three experiments. * $P < 0.05$.

位, 但其分子机制在以后很长时间都未能阐明。

人们已知肿瘤细胞由于某些癌基因和转录因子的高表达, 如缺氧诱导因子 HIF-1、原癌基因 c-myc 可以促进 pk、hk 等基因的表达^[14,15], 使肿瘤组织表现出了高水平的糖酵解水平, 这种特性, 有利于保证肿瘤细胞在缺氧条件下的能量供应。另一方面, HIF 高表达还可促进血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 的表达, 这有利于满足肿瘤细胞快速生长对营养物质的需求。故胞内缺氧既是肿瘤迅速增殖的结果, 又可通过胞内 ROS 释放调控相关基因而促进肿瘤的生长^[4,16]。

通过研究缺氧干预对细胞生长的影响, 发现缺氧对肿瘤和正常细胞的增殖均具有一定抑制作用, 但对 SMMC-7721 肿瘤细胞的抑制作用较 L02 正常肝细胞弱, 说明肿瘤细胞较正常细胞具有更强的缺氧耐受力。加入葡萄糖后, 缺氧对 SMMC-7721 肝癌细胞的抑制作用减弱, 存活率明显提高, 而 L02

正常细胞缺氧 24 h 存活率和抑制率相对改变不大, 这进一步说明肿瘤细胞在缺氧条件下耐缺氧能力高于正常细胞, 肿瘤细胞应具有较高的糖酵解水平。

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 蛋白属于丝苏氨酸蛋白激酶, 是对细胞代谢、细胞增殖和迁移等信号转导有重要功能的蛋白激酶^[17,18]。胰岛素、PDGF 等生长因子可以通过受体酪氨酸蛋白激酶、磷脂酰肌醇激酶等活化 PKB, 调节细胞的新陈代谢及对抗细胞凋亡, 促进细胞存活^[19~21]。PKB 还可以磷酸化 Bad^[22,23]诱导 caspase-9 的前体磷酸化和抑制糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 发挥抗凋亡作用, 促进细胞生存^[24]。在本课题研究中发现 pkb 表达随缺氧时间延长而趋降低, 同时细胞增殖趋受抑制, 说明一定程度缺氧, 可通过下调 pkb 表达, 抑制细胞的增殖。

己糖激酶是糖酵解途径第一步反应的催化酶, 它决定可进入分解代谢途径葡萄糖的量。肝脏肿瘤中优势表达的己糖激酶同工酶^[25,26] HK II, 序列内

含有糖类反应元件(carbohydrate response element, ChoRE), 葡萄糖可以通过 ChoRE 激活编码糖酵解和脂代谢的酶类. 在缺氧条件下, 显然在 ROS 和缺氧诱导因子 HIF-1 的调控下 hk 基因的表达略呈代偿性的升高, pkm 基因在缺氧 6 h 和 12 h 变化不明显, 但缺氧 24 h, L02 正常细胞表达水平极低, SMMC-7721 肝癌细胞表达明显高于 L02 正常细胞, 表明正常细胞在严重缺氧条件下糖代谢通路明显会受影响, 肿瘤细胞相对变化小, 反映出有较强的抗缺氧能力. 当加入葡萄糖, hk 基因和 pkm 基因在缺氧 24 h 表达水平都随之提高, 表明增加底物有助恢复糖酵解的反应速率.

乳酸脱氢酶 (LDH) 催化丙酮酸脱氢生成乳酸, 其活力也反映糖无氧酵解水平. 文献报道, 缺氧条件下, LDH 活性升高, 同工酶谱发生变化^[14], 即向与 NADH 结合力强的结构形式转变, 这有利于使 NADH 氧化为 NAD⁺, 以维持糖酵解的继续进行. LDH 活力升高有利于糖的无氧酵解加速进行, 为肿瘤细胞增殖可提供足够能量. 缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 参与 LDH 活性的调节, 主要与乳酸脱氢酶的启动子区域存在缺氧反应元件有关^[15,27], 该元件是结合 HIF-1 的基本位点. 经检测 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞在缺氧干预条件下 LDH 活性随缺氧时间延长逐渐升高. 缺氧 24 h, SMMC-7721 肝癌细胞的 LDH 活性升高 48 倍, 而 L02 正常细胞 LDH 活性升高 16 倍. 说明在缺氧条件下, LDH 活性会代偿性升高, 且 SMMC-7721 肝癌细胞表现出了比 L02 正常细胞更高的活性. 这可能是 SMMC-7721 肝癌细胞具有比 L02 正常肝细胞更高缺氧耐受力原因之一.

异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 也是三羧酸循环关键酶, 催化异柠檬酸脱羧生成 α -酮戊二酸, 同时生成 NADH 或者 NADPH. 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸, 也是三羧酸循环的关键酶, IDH 和 SDH 的活性是有氧氧化代谢的标志. 经检测 2 种细胞在缺氧条件下, idh 与 sdh 基因的表达都随缺氧时间延长呈下调趋势, 但正常肝细胞的表达下调幅度相对低于肝癌细胞, 也反映正常细胞中对有氧氧化有较多依赖性.

实验结果提示, 肿瘤细胞具有更高的糖酵解水平是与缺氧过程释放的 ROS 有关, 并通过缺氧诱导因子 hif 和 pkb 等基因, 调节了糖酵解途径中某些关键酶的基因表达和酶活水平, 这可能也是 Warburg 效应和肿瘤细胞能耐受缺氧的机制之一.

实验也证明了肿瘤细胞在耐受缺氧能力和代谢方式上与正常细胞有所不同, 这对肿瘤的治疗将可提供新的思路.

参考文献

- Dang C V, Semenza G L. Oncogenic alterations of metabolism. Trends Biochem Sci, 1999, **24** (2): 68~72
- Osthus RC, Shim H, Kim S, *et al.* Dereglulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. J Biol Chem, 2000, **275** (29): 21797~21800
- Flier J S, Mueckler M M, Usher P, *et al.* Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. Science, 1987, **235** (4795): 1492~1495
- Liu S L, Lin X, Shi D Y, *et al.* Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. Arch Biochem Biophys, 2002, **406** (2): 173~182
- Shi D Y, Deng Y R, Liu S L, *et al.* Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. FEBS Letters, 2003, **542** (1~3): 60~64
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. Cell Physiol Biochem, 2001, **11** (4): 173~186
- Liebermann D A, Hoffman B. Myeloid differentiation (MyD)/growth arrest DNA damage (GADD) genes in tumor suppression, immunity and inflammation. Leukemia, 2002, **16** (4): 527~541
- Semenza G L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2000, **35** (2): 71~103
- Semenza G L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol, 2000, **88**: 1474~1480
- Jakubowski W, Bartosz G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? Cell Biol Int, 2000, **24** (10): 757~760
- Lu H, Forbe R A, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. J Biol Chem, 2002, **277** (26): 23111~23115
- Racker E, Spector M. Warburg effect revisited: merger of biochemistry and molecular biology. Science, 1981, **213** (4505): 303~307
- Rodrigues L E, Gaudenzi T F. Modification of the Warburg's flask for the study of electric current effect upon the activity of enzymatic systems. Rev Bras Pesqui Med Biol, 1976, **9** (4): 187~191
- Rossignol F, Solares M, Balanza E, *et al.* Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia. J Cell Biochem, 2003, **89** (1): 67~79
- Semenza G L, Jiang B H, Leung S W, *et al.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem, 1996, **271** (51): 32529~32537
- Liu S L, Liu G Z, Cheng J, *et al.* Influence of PKB on ROS regulation of proliferation in human 7721 hepatoma cells. Acta Biochem Biophys Sin, 2002, **34** (1): 67~72

- 17 Hundal R S, Gomez-Munoz A, Kong J Y, *et al.* Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis by blocking ceramide generation, thereby maintaining PKB activation and Bcl-XL levels. *J Biol Chem*, 2003, **278** (27): 24399~24408
- 18 Alvarez B, Garrido E, Garcia-Sanz J A, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate. *J Biol Chem*, 2003, **278** (29): 26466~26473
- 19 Katome T, Obata T, Matsushima R, *et al.* Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J Biol Chem*, 2003, **278** (30): 28312~28323
- 20 Fukuda T, Guo L, Shi X, *et al.* CH-ILKBP regulates cell survival by facilitating the membrane translocation of protein kinase B/Akt. *J Cell Biol*, 2003, **160** (7): 1001~1008
- 21 Arboleda M J, Lyons J F, Kabbinnar F F, *et al.* Overexpression of AKT2/protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 2003, **63** (1): 196~206
- 22 Datta S R, Dudek H, Tao X, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997, **91** (2): 231~241
- 23 Pap M, Cooper G M. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, 1998, **273** (32): 19929~19932
- 24 Kohn A D, Summers S A, Birnbaum M J, *et al.* Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*, 1996, **271** (49): 31372~31378
- 25 Nakashima R A, Paggi M G, Scott L J, *et al.* Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Res*, 1988, **48** (4): 913~919
- 26 Shinohara Y, Ichihara J, Terada H. Remarkably enhanced expression of the type II hexokinase in rat hepatoma cell line AH130. *FEBS Lett*, 1991, **291** (1): 55~57
- 27 Firth J D, Ebert B L, Ratcliffe P J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem*, 1995, **270** (36): 21021~21027

Regulation of Metabolism Signaling in Hepatoma Cells by Hypoxic Stress*

SHI Dong-Yun¹⁾, LIU Shan-Lin^{1,2)**}, LI Hao-Ran²⁾, SHEN Xin-Nan¹⁾,

YU Pei-Zhong¹⁾, CHENG Jian¹⁾, GONG Xing-Guo²⁾

(¹⁾Shanghai Medical College, Free Radical Regulation and Application Research Center of Fudan University, Shanghai 200032, China;

(²⁾Free Radical Life Sciences Research Center, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract In order to investigate the expression of the glycolysis-associated genes and different proliferation between normal cells and tumor cells in response to hypoxia, and to explore the role of reactive oxygen species (ROS) in mediating metabolism of hepatoma cells and in regulating expression of glycolysis-associated genes and enzyme activity, SMMC-7721 hepatoma cell line and the normal liver cell line LO2 were taken as the investigation objects. The cell suppression ratio and surviving ratio were detected respectively under conditions of simple hypoxia, or 5 mmol/L glucose complicated with hypoxia. The mRNA levels of key enzymes that are involved in regulating glyco-metabolism were detected, including the mRNA levels of pyruvate-kinase, hexokinase, succinic dehydrogenase and isocitric dehydrogenase, and the activity of lactate dehydrogenase. The proliferation gene pkb and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) were detected as well. The results suggest that 1. tumor cell can endure severe hypoxia condition than normal cell, 2. under conditions of hypoxia, the strengthening of the glycolytic pathway is one of the important mechanisms to ensure the rapid proliferation of tumor cells, 3. ROS through HIF-1 mediates the changes of the gene expression of the enzyme of the glycometabolism pathway, and takes part in the regulation of the hypoxia-induced signal transduction. And the use of antioxidant will decrease the ability of tumor cell to endure hypoxia.

Key words hypoxia, glycolysis, ROS, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), hepatoma

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China Key Project and General Project (30130100, 30270501).

**Corresponding author. Tel: 86-21-54237698, E-mail: slliu@shmu.edu.cn

Received: April 5, 2006 Accepted: May 28, 2006