

· 论 著 ·

缺氧环境肝癌 SMMC-7721 细胞 ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  的表达及其关系卿小松, 孔宪炳 $\Delta$ 

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 400016)

**摘要:**目的 探讨在缺氧条件下人肝癌 SMMC-7721 细胞中三磷酸腺苷结合盒转运体 G2(ABCG2)和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的表达及其关系。方法 将 SMMC-7721 细胞分为对照组、缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组及缺氧 72 h 组, Western blot 检测各组 SMMC-7721 细胞 ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达。将缺氧 72 h 组 SMMC-7721 细胞分别用终浓度为 1.0、2.0、4.0  $\mu$ mol/L 的 HIF-1 $\alpha$  抑制剂 YC-1 处理, Western Blot 检测不同浓度 YC-1 处理的 SMMC-7721 细胞 ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达。结果 随缺氧时间延长, ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达均逐渐增加( $P < 0.05$ ), 且 ABCG2 与 HIF-1 $\alpha$  的表达呈正相关( $r = 0.944, P < 0.05$ ); 随 YC-1 浓度的增加, 缺氧 72 h 组 SMMC-7721 细胞 ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达下调( $P < 0.05$ )。结论 ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  的表达随缺氧加重而增加, ABCG2 表达上调可能是 HIF-1 $\alpha$  介导肝癌细胞缺氧环境中生存及耐药的机制之一。

**关键词:**腺嘌呤核苷酸转运体 2; 缺氧; 肝肿瘤, 实验性; 缺氧诱导因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)07-0640-03

### Expression of ABCG2 and HIF-1 $\alpha$ in hepatoma SMMC-7721 cells under the anoxic conditions and their relationship

Qing Xiaosong, Kong Xianbing $\Delta$

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Objective To explore the expression of ATP-binding cassette transporter G2(ABCG2) and hypoxia-inducible factor-1 alpha(HIF-1 $\alpha$ ) in human hepatoma SMMC-7721 cells under the anoxic conditions and their relationship. Methods SMMC-7721 cells were divided into control group, 24 h hypoxia group, 48 h hypoxia group and 72 h hypoxia group. Western blot was employed to detect the protein expression of ABCG2 and HIF-1 $\alpha$  in SMMC-7721 cells of each group. SMMC-7721 cells in 72 h hypoxia group were treated with HIF-1 $\alpha$  inhibitor YC-1 at the final concentration of 1.0, 2.0 and 4.0  $\mu$ mol/L, respectively, and Western blot was used to inspect the protein expression of ABCG2 and HIF-1 $\alpha$  in SMMC-7721 cells treated by different concentration of YC-1. Results With prolonged hypoxia, ABCG2 and HIF-1 $\alpha$  protein expression were gradually increased( $P < 0.05$ ), and the positive correlation was found between the expression of ABCG2 and HIF-1 $\alpha$ ( $r = 0.944, P < 0.05$ ). The protein expression of ABCG2 and HIF-1 $\alpha$  were down-regulated with increasing concentration of YC-1( $P < 0.05$ ). Conclusion ABCG2 and HIF-1 $\alpha$  expression are increased with increasing hypoxia, and ABCG2 up-regulation may be one of the mechanism of HIF-1 $\alpha$ -mediated survival and drug resistance of hepatoma cells under the anoxic conditions.

**Key words:** adenine nucleotide translocator 2; anoxia; liver neoplasms, experimental; hypoxia-inducible factor

三磷酸腺苷结合盒转运体 G2(ATP-binding cassette transporter G2, ABCG2)是近年来发现的三磷酸腺苷结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运体蛋白家族新成员。研究表明, ABCG2 参与了多种肿瘤的发生、发展及耐药,并能维持干细胞特性<sup>[1-2]</sup>。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1 $\alpha$ )是目前发现的介导细胞低氧反应最关键的核转录因子,它可促进血管形成,维持细胞氧及代谢平衡,以保证肿瘤生长,并导致化疗耐受<sup>[3-4]</sup>。本实验研究了在缺氧条件下人肝癌 SMMC-7721 细胞 ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  表达的变化,探索二者表达的关系,并进一步探讨缺氧诱导 ABCG2 表达的可能机制,为抗肿瘤治疗提供理论依据。

#### 1 材料与方法

**1.1 材料** 人肝癌 SMMC-7721 细胞株由重庆医科大学普外科学重点实验室提供。RPMI 1640 培养基、小牛血清购于 Gibco 公司;抗 HIF-1 $\alpha$  多克隆兔抗人抗体购自 Santa Cruz 公司;抗 ABCG2 多克隆兔抗人抗体购自武汉博士德公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔第二抗

体及增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购于碧云天生物技术公司;HIF-1 $\alpha$  抑制剂 3-(5'-羟甲基-2'-咪唑)-1-苄基吡唑 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole, YC-1]购自 Cayman 公司;全细胞裂解液及聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自博海生物有限公司。

**1.2 细胞培养** SMMC-7721 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养,将其分为对照组及缺氧组。对照组在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱中培养。待细胞生长至 60% 汇合状态时,缺氧组细胞放入含 1% O<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的培养箱培养,根据缺氧时间,缺氧组再分为缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组及缺氧 72 h 组。

**1.3 HIF-1 $\alpha$  与 ABCG2 蛋白的检测** 收获培养的各組细胞,按照全细胞裂解液说明书提取细胞总蛋白,二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定总蛋白浓度。取 50  $\mu$ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜上,丽春红染色证实转移成功,5% 脱脂奶粉封闭非特异性抗原,第一抗体封闭过夜,第二抗体 37℃ 孵育 1 h。第一抗体 HIF-1 $\alpha$  抗体 1:100 稀释,

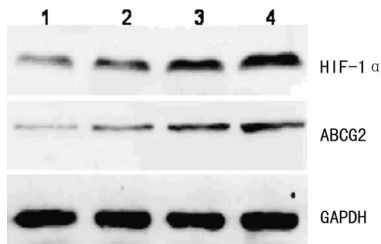
ABCG2 抗体 1 : 100 稀释,第二抗体工作浓度均为 1 : 1 000。ECL 显影, Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片, 将 HIF-1 $\alpha$  与 ABCG2 灰度值分别与甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 灰度值的比值作为蛋白表达水平的参数, 对产物相对定量, 实验重复 3 次。

**1.4 YC-1 抑制 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$  表达后对 ABCG2 表达的影响** 将缺氧 72 h 组 SMMC-7721 细胞加入 HIF-1 $\alpha$  抑制剂 YC-1, 按 YC-1 终浓度分为 YC-1 1.0、2.0 及 4.0  $\mu\text{mol/L}$  组, 将不含 YC-1 的缺氧 72 h 组 SMMC-7721 细胞设为 YC-1 对照组。各组分别处理 24 h 后, 采用 Western blot 检测各组细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、ABCG2 蛋白的表达。实验重复 3 次。

**1.5 统计学处理** 所有数据采用 SPSS17.0 软件行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 行 SNK 方差分析及 Pearson 相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 缺氧环境 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、ABCG2 蛋白的表达** Western blot 结果显示, 与对照组比较, 在缺氧条件下 SMMC-7721 细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达上调, HIF-1 $\alpha$  的表达在缺氧 24 h 时即开始增加, 48 h 稳步上升, 72 h 达到高峰, 各缺氧组 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$  的表达与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1、表 1。ABCG2 的表达趋势同 HIF-1 $\alpha$  的表达, 二者表达呈正相关 ( $r = 0.944, P < 0.05$ ), 表明随着缺氧的加剧, HIF-1 $\alpha$  与 ABCG2 蛋白表达逐渐增加。



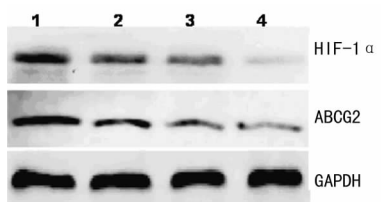
1: 对照组; 2: 缺氧 24 h 组; 3: 缺氧 48 h 组; 4: 缺氧 72 h 组。

**图 1 Western blot 检测缺氧环境 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$  与 ABCG2 蛋白的表达**

**表 1 Western blot 检测 SMMC-7721 细胞中 HIF-1 $\alpha$  与 ABCG2 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	HIF-1 $\alpha$	ABCG2
对照组	0.184 $\pm$ 0.017	0.087 $\pm$ 0.017
缺氧 24 h 组	0.289 $\pm$ 0.044 *	0.166 $\pm$ 0.019 *
缺氧 48 h 组	0.385 $\pm$ 0.044 *	0.227 $\pm$ 0.034 *
缺氧 72 h 组	0.608 $\pm$ 0.090 * # $\Delta$	0.344 $\pm$ 0.061 * # $\Delta$

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与缺氧 24 h 组比较;  $\Delta$ : 与缺氧 48 h 组比较。



1: 对照组; 2: YC-1 1  $\mu\text{mol/L}$  组; 3: YC-1 2  $\mu\text{mol/L}$  组; 4: YC-1 4  $\mu\text{mol/L}$  组。

**图 2 不同浓度 YC-1 对 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、ABCG2 蛋白表达的影响**

**2.2 YC-1 抑制 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$  表达后对 ABCG2 表达的影响** Western blot 检测结果显示, 随着 YC-1 浓度的增加, 缺氧 72 h 组 SMMC-7721 细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达逐渐减少, 同时 ABCG2 表达亦逐渐下降, 除 YC-1 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组与 YC-1 2.0  $\mu\text{mol/L}$  组比较, 差异无统计学意义外, 其余各组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 2。

**表 2 不同浓度 YC-1 对 HIF-1 $\alpha$ 、ABCG2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	HIF-1 $\alpha$	ABCG2
YC-1 对照组	0.615 $\pm$ 0.059	0.509 $\pm$ 0.087
YC-1 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.387 $\pm$ 0.054 *	0.287 $\pm$ 0.039 *
YC-1 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.315 $\pm$ 0.030 *	0.239 $\pm$ 0.033 *
YC-1 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.085 $\pm$ 0.020 * # $\Delta$	0.105 $\pm$ 0.019 * # $\Delta$

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 YC-1 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组比较;  $\Delta$ : 与 YC-1 2.0  $\mu\text{mol/L}$  组比较。

**3 讨 论**

ABCG2 首次发现于乳腺癌 MCF-7/Adr-Vp3000 细胞系, 因此, 又称为乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)<sup>[5]</sup>。随着研究的深入, 人们发现它在多种肿瘤组织及肿瘤细胞中亦有表达<sup>[6-7]</sup>。ABCG2 作为一种转运体, 可以将多种化学结构不同的药物“泵出”细胞外, 其转运的药物包括: 多柔比星、米托蒽醌、长春新碱、紫杉醇及拓扑替康等, 其介导的多药耐药 (multi-drug resistance, MDR) 是导致临床化疗失败的原因之一<sup>[8-9]</sup>。肿瘤生长快, 代谢旺盛, 耗氧量大, 而肿瘤内部的血管生成则相对较慢, 因而缺氧几乎是所有实体瘤微环境的共同特征。缺氧时细胞内亚铁血红素、卟啉类化合物等物质大量堆积, 它们可破坏细胞 DNA、蛋白质及包膜脂质。此外, 缺氧微环境还是造成化疗耐药的原因之一。

赵大伟等<sup>[10]</sup>发现 ABCG2 蛋白在正常肝组织及肝硬化组织中均有表达, 呈弱阳性。在肝癌组织中, ABCG2 表达约 2/3 呈弱阳性, 1/3 呈强阳性; ABCG2 表达水平与肿瘤直径及数目有关。ABCG2 还是肝癌侧群细胞表型的主要因素, 后者具有肿瘤干细胞特性, 而肿瘤干细胞目前被认为是维持肿瘤生长及化疗失败的根本原因<sup>[10-12]</sup>。因此, ABCG2 可能对维持肝癌生长和化疗耐药发挥重要作用。本研究发现, 缺氧环境中 SMMC-7721 细胞 ABCG2 的表达较常氧环境中的表达增加, 这与 Krishnamurthy 等<sup>[13]</sup>的研究结果相符。同时本实验结果还显示, ABCG2 的表达随缺氧时间的延长而增加, 随着缺氧加剧, 细胞能量供求矛盾突出, 细胞内糖酵解途径代谢物不断积累, 肿瘤细胞上调 ABCG2 表达以将这些代谢产物排出体外, 抵抗缺氧带来的伤害, 而由此导致的 ABCG2 表达增加可能是缺氧下肿瘤细胞耐药的机制之一。

HIF-1 $\alpha$  在细胞缺氧信号途径中处于核心位置, 它可以促进新生血管形成, 维持氧及代谢平衡, 以保证肿瘤生长和促进其转移, 并引起化疗耐受<sup>[3]</sup>。本研究发现, 在缺氧时 SMMC-7721 细胞 HIF-1 $\alpha$  的表达强于常氧环境, 并随着时间延长而增加, 这表明在持续缺氧条件下, 肿瘤细胞可通过上调 HIF-1 $\alpha$  的表达来维持氧及代谢平衡, 促进细胞生长, 而这种表达趋势也与相关文献报道一致<sup>[14]</sup>。

本研究还发现, ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  在 SMMC-7721 细胞中

的表达水平随着缺氧信号的加强而呈现出一致的增高趋势,且二者表达呈正相关。有关研究显示,HIF-1 $\alpha$ 可调控 40 余种基因的表达,诸如 MDR1 便是其调控的靶基因之一<sup>[15]</sup>,而 MDR1 基因编码产物 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-GP)与 ABCG2 同属 ABC 转运体家族,这就提示 ABCG2 是 HIF-1 $\alpha$  的下游目的基因,HIF-1 $\alpha$  可上调 ABCG2 的表达。为了证明这一假设,本研究采用 HIF-1 $\alpha$  抑制剂 YC-1 干预 HIF-1 $\alpha$  的表达,发现随着 YC-1 浓度的增加,HIF-1 $\alpha$  的表达水平逐渐下降,更重要的是,ABCG2 的表达亦逐渐降低,这表明 ABCG2 是 HIF-1 $\alpha$  的相关调控蛋白,缺氧对 ABCG2 的调控是通过 HIF-1 $\alpha$  的机制而实现的。

综上所述,缺氧环境中,SMMC-7721 细胞 ABCG2 和 HIF-1 $\alpha$  的表达上调,并随时间延长而增加,YC-1 抑制 HIF-1 $\alpha$  后可有效下调 ABCG2 的表达。本实验表明缺氧时 SMMC-7721 细胞生存及耐药的机制可能是通过缺氧诱导 HIF-1 $\alpha$  的表达而实现,后者上调 ABCG2 的表达,增强了肿瘤细胞对缺氧环境的适应能力及化疗抵抗能力。抑制 HIF-1 $\alpha$ -ABCG2 这一途径有望成为治疗肝癌以及逆转肝癌患者耐药的治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] Cascorbi I, Haenisch S. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 596: 95-121.
- [2] Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy [J]. *Life Sci*, 2010, 86(17/18): 631-637.
- [3] Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4): 678-685.
- [4] Rademakers SE, Span PN, Kaanders JH, et al. Molecular aspects of tumour hypoxia[J]. *Mol Oncol*, 2008, 2(1): 41-53.
- [5] Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(26): 15665-15670.
- [6] Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, et al. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)

[J]. *Curr Drug Metab*, 2010, 11(7): 603-617.

- [7] Ejendal KF, Hrycyna CA. Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2002, 3(5): 503-511.
- [8] Takahata T, Ookawa K, Suto K, et al. Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 102(4): 399-407.
- [9] Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance[J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(1): 105-127.
- [10] 赵大伟, 殷晓煜, 郑进方, 等. ABCG2 蛋白在肝癌中表达的临床意义[J]. *中华消化外科杂志*, 2010, 9(3): 213-215.
- [11] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.
- [12] Zhang N, Li R, Tao KS, et al. Characterization of a stem-like population in hepatocellular carcinoma MHCC97 cells [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(3): 827-831.
- [13] Krishnamurthy P, Ross DD, Takeo N, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(23): 24218-24225.
- [14] Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, Hiroshi H, et al. The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for Cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7/8): 623-632.
- [15] Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of Cancer cells to chemotherapy and promotes Cancer progression [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(7): 790-797.

(收稿日期: 2011-09-03 修回日期: 2011-12-04)

(上接第 639 页)

- inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo [J]. *Prostate*, 2001, 47(4): 293-303.
- [14] Flanagan AM, Letai A. BH3 domains define selective inhibitory interactions with BHRF-1 and KSHV BCL-2 [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 580-588.
  - [15] Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, et al. The BCL-2

family reunion [J]. *Mol Cell*, 2010, 37(3): 299-310.

- [16] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5684): 626-629.
- [17] Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(6): 617-625.

(收稿日期: 2011-11-22 修回日期: 2012-01-04)