

成稳定的复合物,抑或嵌附在结晶表面从而改变结晶的生长习性,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 欧阳健明. 草酸钙结石研究中的化学基础[J]. 化学通报, 2002; 326-333
- 2 Xu GZ, Li GX, Ma LT, *et al.* Study on the factors relative to traumatic subarachnoid hemorrhage [J]. Journal of Traumatic Surgery, 2004, 6(6): 430-432
- 3 沈珉. 当代尿石症的流行病学特征[J]. 国外医学社会医学分册, 1999, 16(4): 145
- 4 Messa P, Marangella M, Paganin L, *et al.* Different dietary calcium intake and relative supersaturation of calcium oxalate in the urine of patients forming renal stones [J]. Clin Sci, 1997, 93: 257
- 5 刘丽, 刘克基, 康廷国. 草酸钙结晶及其在中药显微鉴定中的应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(5): 70-71
- 6 朱军, 沈玉华, 谢安建, 等. 草酸钙型尿结石的研究进展[J]. 化学世界, 2007, 3: 175-178
- 7 Ouyang J - M, Duan L, Tiek B. Effect of carboxylic acids on the crystal growth of calcium oxalate nanoparticles in lecithin - water liposome systems[J]. Langmuir, 2003, 19(21): 8980-8985
- 8 尹亚君, 等. 自拟三金排石汤治疗泌尿系结石 120 例[J]. 中医药学刊, 2003, 21(6): 979-980
- 9 张培萍, 刘丽华, 董峻岭, 等. 草酸钙的形成机理及影响因素. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(5): 567-568
- 10 欧阳健明, 姚秀琼, 苏泽轩, 等. 草酸钙结石的体外模拟[J]. 中国科学(B 辑), 2003, 33(1): 14
- 11 姚秀琼, 欧阳健明, 庞乃章, 等. 泌尿系结石患者尿液中草酸钙结晶的研究[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(1): 1-3
- 12 叶章群, 章咏裳, 胡仁昭, 等. 氯化锌溴化钾对草酸钙结晶生长的影响[J]. 中华实验外科杂志, 1989, 6(3): 137-138
- 13 叶章群. 泌尿系结石成因及防治新进展[J]. 现代实用医学, 2007, 19(4): 258-261

(收稿: 2009-12-04)

(修回: 2010-01-04)

低氧下丹参酮 II A 对人胃癌 SGC7901 细胞 HIF-1 α 与突变型 p53 表达的影响

冯玉光 宗绪山 邢国辉 吴美英 朱 芸

摘 要 **目的** 观察低氧下丹参酮 II A (Tan II A) 对人胃癌 SGC7901 细胞突变型 p53 表达的影响, 及其与 HIF-1 α 表达和凋亡的关系。**方法** 用氯化钴 (CoCl₂) 创建低氧模型, 设常氧对照组、低氧对照组和低氧加不同浓度 Tan II A 组。分别取 0.5mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、5.0mg/L、10.0mg/L 的 Tan II A 干预低氧胃癌 SGC7901 细胞 48h 和 72h 后 HOECHST 染色法检测细胞凋亡。Tan II A (0.5mg/L、2.0mg/L、10.0mg/L) 干预低氧胃癌细胞 48h 后, 免疫细胞化学二步法检测 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达的变化。**结果** HOECHST 染色法发现, 低氧条件下, Tan II A 可呈时间、剂量依赖性地诱导胃癌 SGC7901 细胞凋亡 ($P < 0.01$), 10.0mg/L Tan II A 作用细胞 72h 后, 凋亡率达 (40.70 $\pm$ 1.55) %。免疫细胞化学法显示, Tan II A 呈剂量依赖性地抑制 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达, 且二者呈高度正相关 ($n=4$, $r=0.886$, $P < 0.05$)。**结论** 低氧条件下 Tan II A 抑制人胃癌 SGC7901 细胞 HIF-1 α 和突变型 p53 的表达, 并诱导其凋亡, 提示 Tan II A 可能对防治低氧及 p53 突变导致的克隆选择及凋亡抵抗具有重要作用。

关键词 丹参酮 II A 低氧 胃癌细胞 HIF-1 α p53

Effects of Tan II A on the Expression of HIF-1 α and mt p53 in Gastric Cancer SGC7901 Cell under Hypoxia. Feng Yuguang, Zong Xushan, Xing Guohui, Wu Meiyang, Zhu Yun. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Shandong 261042, China

Abstract Objective The effects of Tan II A on the expression of mutant p53 (mt p53) and HIF-1 α in gastric cancer SGC7901 cell under hypoxia and the correlation between expression of mt p53, HIF-1 α and apoptosis were studied. **Methods** The model of hypoxia was established by CoCl₂. There were three groups: normal control group, hypoxia control group, and hypoxia combined with different concentrations of Tan II A group. After Tan II A was added to the media with 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0mg/L respectively for 48 and 72h during hypoxia, the apoptosis of SGC7901 human gastric cancer cells was detected by HOECHST stain. After Tan II A was added

基金项目: 山东省中医药管理局中医药科技发展计划项目 (2007-156)

作者单位: 261042 山东省潍坊医学院附属医院消化内科

to the media with 0.5, 2.0 and 10.0mg/L respectively for 48h during hypoxia, the expression of HIF-1 α and mt p53 protein was detected by immunocytochemical staining. **Results** The results of HOECHST stain found that Tan II A induced apoptosis of gastric cancer cells in a dose- and time-dependent manner under hypoxia ($P < 0.01$), and the apoptosis rate reached $(40.70 \pm 1.55)\%$ after treatment with 10.0 mg/L Tan II A for 72h. The results of immunocytochemical staining revealed that the expression of HIF-1 α and mt p53 protein was inhibited by Tan II A in a dose-dependent manner under hypoxia. High positive correlation was found between the expression of HIF-1 α and mt p53 ($n = 4$, $r = 0.886$, $P < 0.05$). **Conclusion** Tan II A can inhibit the expression of HIF-1 α and mt p53 protein, and induce the apoptosis of SGC7901 human gastric cancer cells under hypoxia, suggesting that Tan II A might play an important role in fighting against hypoxia- and p53 mutation- induced clonal selection and apoptosis resistance of tumor.

Key words Tan II A; Hypoxia; Gastric cancer cell; Hypoxia inducible factor-1 alpha; p53

许多研究发现,肿瘤微环境低氧诱导 HIF-1 α 表达是肿瘤凋亡及化疗抵抗的重要机制^[1]。p53 基因是人类恶性肿瘤最常见的突变基因,大量研究表明 p53 突变导致肿瘤对化疗药物发生凋亡抵抗^[2]。近年来的研究发现,HIF-1 α 与 p53 突变的交互作用与低氧下凋亡及化疗抵抗、克隆选择有密切关系^[3]。寻找以 HIF-1 α 或突变型 p53 为靶点的小分子化合物是逆转或阻止低氧凋亡及化疗抵抗的有效途径^[4,5]。丹参酮 II A (tanshinone II A, Tan II A) 是从中药丹参中提取的一种脂溶性成分,近年来研究发现其对多种肿瘤细胞具有生长抑制、诱导凋亡作用,此前我们曾发现,低氧环境下 Tan II A 能显著抑制人胃癌 SGC7901 细胞增生,诱导其凋亡,并抑制低氧诱导的 HIF-1 α 表达^[6]。人胃癌 SGC7901 细胞为突变型 p53 细胞株,本实验进一步观察低氧环境下 Tan II A 对突变型 p53 表达的影响及其与 HIF-1 α 表达和凋亡的关系。

材料与方法

1. 材料:(1)细胞系:人胃癌细胞株 SGC7901 购自山东省医学科学院,培养于含 100ml/L 胎牛血清、青霉素、链霉素各 1×10^5 U/L 的 RPMI1640 培养液中,置 37 $^{\circ}\text{C}$, 50ml/L CO_2 培养箱内常规传代培养。(2)试剂 Tan II A 为中国药品生物制品检定所的标准品,用二甲亚砜(DMSO)溶解,终浓度为 0.2g/L,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。HOECHST32258 荧光染色试剂盒及氯化钴(CoCl_2)购于美国 Sigma 公司。突变型 p53、HIF-1 α 单克隆抗体及 PV-9000 免疫组化试剂盒均为北京中山金桥生物技术有限公司产品。

2. 方法:(1)HOECHST 染色法检测 Tan II A 对低氧下培养的胃癌细胞凋亡的影响:取对数生长期的 SGC7901 制成 2×10^8 /L 的细胞悬液,每孔 0.5ml,加入放有盖玻片的 24 孔板内,设常氧对照组、低氧模拟剂氯化钴(CoCl_2 , 150 $\mu\text{mol/L}$)对照组及 CoCl_2 加不同浓度 Tan II A 组,待细胞贴壁后分别加入 CoCl_2 及 Tan II A (0.5mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、5.0mg/L、10.0mg/L)作用 48h 和 72h 后分别取出细胞爬片,甲醇/冰醋酸固定液固定 5min 后,加入荧光染料 HOECHST 33258 重悬

细胞,室温避光 1h, PBS 冲洗,用抗荧光液封片。判定标准:正常细胞核为蓝色,凋亡的细胞核为白色。每片连续观察 6 个细胞分布均匀的 200 倍镜视野,每视野计数 50 个细胞,共 300 个细胞,计算其阳性率百分数,并取其均值($\bar{x} \pm s$)。凋亡率 = 凋亡细胞数 / (正常细胞数 + 凋亡细胞数) $\times 100\%$ 。(2)免疫细胞化学二步法观察 Tan II A 对低氧下培养的胃癌细胞 HIF-1 α 和突变型 p53 表达的影响:取对数生长期的 SGC7901 制成 2×10^8 /L 的细胞悬液,每孔 0.5ml,加入放有盖玻片的 24 孔板内,设常氧对照组、低氧模拟剂 CoCl_2 对照组及 CoCl_2 加不同浓度 Tan II A 组,待细胞贴壁后分别加入 CoCl_2 及不同浓度的 Tan II A (0.5mg/L、2.0mg/L、10.0mg/L), 48h 后取出细胞爬片,冷丙酮固定 5min, PBS 冲洗,按 PV-9000 试剂盒步骤检测 HIF-1 α 和 p53, DAB 显色,脱水,透明,中性树胶封片。用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定:HIF-1 α 和突变型 p53 阳性结果为胞核内有棕黄色颗粒出现。采用 HPAIS-1000 彩色病理图文分析系统,检测 HIF-1 α 和突变型 p53 阳性细胞的平均吸光度值(A 值),以间接反映 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白的表达量,并取其均值。

3. 统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验和单因素方差分析,两变量间用 Pearson 直线相关分析,用 SPSS16.0 统计软件分析。

结 果

1. Tan II A 对低氧下培养的胃癌细胞凋亡的影响:常氧组细胞培养 48h、72h,只有少数细胞发生凋亡;单纯低氧培养 48h、72h,细胞凋亡率分别为 $(3.01 \pm 0.35)\%$ 、 $(5.07 \pm 0.32)\%$,提示低氧可诱导胃癌细胞凋亡(单纯低氧组与常氧对照组比较 $P = 0.001$)。而 0.5 ~ 10.0mg/L 浓度的 Tan II A 低氧下作用胃癌细胞 48h、72h,凋亡率呈浓度和时间依赖性进一步升高(48h F 值 6.0354×10^{-4} , $P < 0.01$; 72h F 值 1.879×10^{-5} , $P < 0.01$; 各组 48h 与 72h 凋亡率比较 P 均 < 0.01 , 表 1)。10.0 mg/L Tan II A 低氧培养 72h 后细胞凋亡率达 $(40.70 \pm 1.55)\%$ (封三彩图 25)。

2. 低氧环境下 Tan II A 作用的胃癌细胞 HIF-

1 α 和突变型 p53 的表达:免疫细胞化学法检测表明:常氧对照组 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白均呈阳性表达,单纯低氧培养细胞 48h 后 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达均明显增高 ($P < 0.05$),而低氧加 Tan II A 组 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达随 Tan II A 浓度的增加而逐渐降低 ($P < 0.05$)。常氧组、单纯低氧组、低氧加 Tan II A 0.5mg/L、2.0mg/L、10.0mg/L 各组 HIF-1 α 的 A 值分别为 0.177 ± 0.019 、 0.670 ± 0.044 、 0.552 ± 0.035 、 0.438 ± 0.031 、 0.379 ± 0.034 ; 各组突变型 p53 的 A 值分别为 0.331 ± 0.112 、 0.621 ± 0.009 、 0.489 ± 0.012 、 0.402 ± 0.009 、 0.310 ± 0.023 ,说明 Tan II A 呈剂量依赖性地抑制低氧诱导的 HIF-1 α 和突变型 p53 的表达(封三彩图 26、彩图 27)。

表 1 Tan II A 对低氧 SGC7901 细胞
凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

	48h(%)	72h(%)	t
常氧组	1.07 ± 0.13	2.32 ± 0.16	43.65
低氧组	3.01 ± 0.35	5.07 ± 0.32	68.75
低氧加 Tan II A 组(mg/L)			
0.5	4.23 ± 0.39	6.74 ± 0.34	72.80
1.0	6.73 ± 0.58	10.05 ± 0.48	101.55
2.0	11.06 ± 1.30	18.87 ± 1.24	197.04
5.0	20.58 ± 1.46	26.97 ± 1.77	65.82
10.0	31.03 ± 1.47	40.70 ± 1.55	123.05

3. HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达的相关性分析:Pearson 直线相关分析显示,HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白在低氧下 Tan II A 作用的人胃癌细胞中的表达呈高度正相关($n = 4$, $r = 0.886$, $P < 0.05$)。

讨 论

研究发现,在 p53 未突变的细胞株,低氧环境下,HIF-1 α 通过与野生型 p53 蛋白竞争与 MDM2 的结合,防止野生型 p53 被 MDM2 途径降解,从而引起 p53 途径的活化,促进 p53 依赖的细胞凋亡^[7]。反过来,野生型 p53 通过两种方式对 HIF-1 α 进行调节^[8,9]:一是通过 MDM2 介导的泛素-蛋白酶解通路促进 HIF-1 α 蛋白的降解;二是和 HIF-1 α 竞争与 CBP/p300 结合,抑制 HIF-1 α 的转录激活活性。而当 p53 发生突变时,HIF-1 α -p53 之间的正常反馈环路中断,低氧无法诱导突变型 p53 肿瘤细胞凋亡,而且突变型 p53 还导致 HIF-1 α 水平进一步升高并增强其转录活性^[10]。因此,低氧作为一种环境选择压力使突变型 p53 肿瘤细胞发生凋亡及化疗抵抗,成为优势细胞群,导致肿瘤的恶性演进。在以前研究的

基础上,我们进一步观察了 Tan II A 对低氧下人胃癌 SGC7901 细胞突变型 p53 蛋白表达的影响及其与 HIF-1 α 表达和凋亡的关系,结果显示:常氧下,SGC7901 细胞即有突变型 p53 蛋白表达,单纯低氧组培养 48h 后突变型 p53 蛋白表达明显增高,说明低氧可诱导 SGC7901 细胞突变型 p53 蛋白表达。低氧加 Tan II A 组突变型 p53 蛋白表达随 Tan II A 浓度的增加而逐渐降低,说明 Tan II A 呈剂量依赖性地抑制低氧条件下突变型 p53 蛋白的表达。直线相关分析显示,HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达之间呈高度正相关。由此推测,Tan II A 通过原因不明的机制同时抑制了突变型 p53 及 HIF-1 α 的表达,这种作用可能与其抑制低氧环境下 SGC7901 细胞增生,并诱导其凋亡有关。上述作用提示,Tan II A 作为一种对 HIF-1 α 和突变型 p53 等多靶点均有抑制作用的小分子抑制剂,用于低氧及 p53 突变导致的肿瘤凋亡及化疗抵抗的防治。

参考文献

- Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, *et al.* Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev*, 2003, 29(4): 297-307
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, *et al.* p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 1993, 74: 957-967
- Hammond EM, Giaccia AJ. Hypoxia-inducible factor-1 and p53: friends, acquaintances, or strangers? *Clin Cancer Res*, 2006, 12(17): 5007-5009
- Melillo G. Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor 1 for Cancer Therapy. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(9): 601-605
- Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1: 68-76
- 宗绪山, 冯玉光, 王鑫, 等. 丹参酮 II A 对低氧培养下人胃癌 SGC7901 细胞增殖、凋亡及 HIF-1 α 表达的影响. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(7): 642-646
- An WG, Kanekal M, Simon MC, *et al.* Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature*, 1998, 392(6674): 405-408
- Chen D, Li M, Luo J, *et al.* Direct interactions between HIF-1 α and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 13595-13598
- Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, *et al.* p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem*, 1998, 273(20): 11995-11998
- Khromova NV, Kopnin PB, Stepanova EV, *et al.* p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett*, 2009, 276(2): 143-151

(收稿:2009-12-14)

(修回:2010-01-08)