

## HIF-1 $\alpha$ 通过调控上皮-间充质转化对胆囊癌侵袭转移的影响

李 鹏, 邹仁超, 代龙翱, 傅嵩洲, 魏 东, 唐 波  
(昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科, 云南 昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 探讨 HIF-1 $\alpha$  对胆囊癌细胞迁移侵袭的影响及其相关调控机制。**方法** 构建 GBC-SD 细胞, 使用慢病毒转染, 分别得到实验组(HIF-1 $\alpha$  shRNA)、阴性对照组(空载慢病毒转染)和空白对照组(未处理)。蛋白质免疫印迹法检测 E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白的表达水平, GBC-SD 细胞的迁移能力用细胞划痕实验检测, GBC-SD 细胞的侵袭能力用 Transwell 侵袭实验检测。**结果** 与对照组相比, 实验组 E-Cadherin 蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.001$ ), N-Cadherin 蛋白的表达水平明显降低( $P < 0.001$ ), 对照组之间 E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白的表达水平无明显差异( $P > 0.05$ )。实验组细胞划痕愈合度较对照组低( $P < 0.001$ )、穿膜个数较对照组少( $P < 0.001$ ), 而对照组之间细胞划痕愈合度、穿膜个数无明显差异( $P > 0.05$ )。**结论** 靶向敲低 HIF-1 $\alpha$  可以降低 GBC-SD 细胞的迁移侵袭能力, 其作用机制可能与调控上皮-间充质转化有关。

**[关键词]** 胆囊肿瘤; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 肿瘤迁移; 肿瘤侵袭; 上皮-间充质转化

**[中图分类号]** R735.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)05-0044-05

## The Effect of HIF-1 $\alpha$ on Invasion and Metastasis of Gallbladder Cancer by Regulating the Epithelial-Mesenchymal Transformation

LI Peng, ZOU Renchao, DAI Longao, FU Songzhou, WEI Dong, TANG Bo  
(Dept. of Hepatopancreatobiliary Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of HIF-1 $\alpha$  on the migration and invasion of gallbladder cancer cells and its related regulatory mechanism. **Methods** GBC-SD cells were constructed and transfected with lentivirus, and the experimental group (HIF-1 $\alpha$  shRNA), negative control group (empty lentivirus transfection) and blank control group (untreated) were obtained respectively. The expression levels of E-Cadherin, and N-Cadherin proteins were detected by Western blotting assay, Cell scratch assay was used to detect the migratory ability of GBC-SD cells, and Transwell invasion assay was used to detect the invasive ability of GBC-SD cells. **Results** Compared with the control group, the expression level of E-Cadherin protein in the experimental group was significantly increased ( $P < 0.001$ ), while the expression level of N-Cadherin protein was significantly decreased ( $P < 0.001$ ), and there was no remarkable difference in the expression level of E-Cadherin and N-Cadherin proteins between the control groups ( $P$  both  $> 0.05$ ). In the experimental group, the cell scratch healing degree was inferior to the control group ( $P < 0.001$ ), and the number of penetrating molds was also inferior to the control group ( $P < 0.001$ ), while there was no obvious otherness in the cell scratch healing degree and the number of penetrating molds between the control groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Targeted knockdown of HIF-1 $\alpha$  can reduce the migration and

**[收稿日期]** 2023-12-25

**[基金项目]** 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202101AY070001-145); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目(2023S080); 昆明医科大学第二附属医院院内科科技计划基金资助项目(2021yk012); 昆明医科大学第二附属医院对外合作研究基金资助项目(2022dwhz05)

**[作者简介]** 李鹏(1995~), 男, 甘肃庆阳人, 在读硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤基础研究工作。

**[通信作者]** 唐波, E-mail: tangbo1227@163.com; 魏东, E-mail: mdhiweidong@sina.com

invasion ability of gallbladder cancer cells, and its mechanism of action may be related to the regulation of epithelial mesenchymal transition.

[**Key words**] Gallbladder neoplasms; HIF-1 $\alpha$ ; Neoplasm metastasis; Neoplasm invasiveness; Epithelial-mesenchymal transition

胆囊癌(gallbladder carcinoma, GBC)起源于胆囊粘膜上皮, 是胆道系统较为常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 位于消化系统肿瘤第六位, 且全球发病率和死亡率存在显著差异, 据流行病学调查显示, 南美洲 GBC 发病率最高, 北美洲较低, 而智利特异性死亡率最高<sup>[2-3]</sup>, 女性的发病率是男性的 2~6 倍, 我国 GBC 的发病率和死亡率也在逐年上升。由于缺乏特异的临床症状, 很难获得早期诊断, 加上其早期转移的组织学特征, 多数患者就诊时已达到晚期, 丧失了手术的最佳时机。即使实施根治性手术, 术后复发率达 25%~65%<sup>[4]</sup>, GBC 对放疗不敏感, 患者的总体预后较差, 5a 生存率仅 5%~10%<sup>[5]</sup>。因此, 对胆囊癌迁移和侵袭的机制进行详细研究, 对降低胆囊癌患者的早期转移率和术后复发率有较大的临床意义。

在大多数实体肿瘤微环境中, 缺氧是其特异性标志<sup>[6]</sup>, 这是由于细胞快速增殖超出周围血管系统供氧而导致氧气消耗和供应之间不平衡的结果<sup>[7]</sup>, 从而导致缺氧诱导因子(hypoxia inducible

factor, HIF)转录因子家族的激活, 其调节肿瘤微环境中肿瘤细胞和免疫细胞内的基因表达, 影响肿瘤进展和治疗反应。在大多数实体肿瘤中(例如肺癌、肝细胞癌、胰腺癌、乳腺癌和宫颈癌等), 通过上调 HIF-1 $\alpha$  来响应氧张力的降低。在这种条件下, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 积累并易位到细胞核, 激活许多参与细胞存活、侵袭、血管生成、转移、代谢重编程和癌症发生的基因<sup>[8]</sup>。在本研究将探索 HIF-1 $\alpha$  对胆囊癌细胞侵袭转移的影响及其具体调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究材料

胆囊癌细胞株 GBC-SD 细胞来源于中国科学院昆明动物研究所, 细胞培养在含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 1640 培养基中。HIF-1 $\alpha$  shRNA 慢病毒载体购于湖南普拉特泽生物科技有限公司, 1640 培养基购于 Gibco 公司, 抗体信息见表 1。

表 1 抗体信息

Tab. 1 Antibody information

抗体名称	厂家	货号	稀释浓度	种属
GAPDH	PROTEINTECH	10068-1-AP	1 : 5000	Mouse
HIF1 $\alpha$	Affinity Biosciences	AF1009	1 : 5000	Rabbit
E-Cadherin	Affinity Biosciences	AF0131	1 : 5000	Rabbit
N-cadherin	Affinity Biosciences	AF5239	1 : 5000	Rabbit
Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody, Peroxidase-Labeled	KPL	074-1506	1 : 5000	
Anti-Mouse IgA + IgG + IgM (H+L) Antibody, Human Serum Adsorbed and Peroxidase-Labeled	KPL	074-1807	1 : 5000	

### 1.2 细胞培养

细胞复苏后培养于 1640 完全培养基, 37 $^{\circ}$ C、含 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内, 48 h 后换液, 当细胞密度达 80%~90% 时消化传代。

### 1.3 细胞感染

将处于对数生长期的细胞消化成单细胞悬液, 接种于 24 孔板(4 $\times$ 10<sup>4</sup> 个细胞/孔)。在培养箱中培养过夜, 当细胞达到 50% 的融合度时加病毒(MOI = 50)。培养至 48~72 h, 用荧光倒置显微

镜观察荧光强度。

### 1.4 蛋白印迹检测

用 1 mL 生理盐水对离心下来的细胞进行洗涤, 并转移至 1.5 mL 的离心管, 按 1 mL 裂解液加 10  $\mu$ L PMSF (100 mM), 4 $^{\circ}$ C 旋转裂解 30 min。离心(12000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min), 收集上清用于蛋白定量检测。BCA 法检测蛋白浓度。样品蛋白浓度=[(Y-b)/a] $\times$ 稀释倍数(Y 为 OD 值)。蛋白样经电泳、转膜、封闭。分别加入一抗、二抗,(加入

一抗、二抗前后须洗膜,共 3 次)。化学发光法曝光显影并拍照,用 Image J 软件进行分析。

### 1.5 细胞划痕实验

取处于对数生长期,状态良好的各组细胞用 0.25% 胰酶消化后,细胞计数。将上述细胞种到 6 孔板中,密度为  $2.0 \times 10^6$  个/孔。待细胞铺满单层后用移液器枪头比着直尺,尽量垂直于背后的横线划痕。用 PBS 清洗,去除划下的细胞;加入含 2% FBS 的培养基继续培养,按 0 h, 24 h, 48 h 在  $40 \times$  镜下进行拍照。根据 Graphpad 进行数据分析。

### 1.6 Transwell 侵袭实验

将过夜融化的 Matrigel 基质胶用无血清培养基稀释,上室加  $60 \mu\text{L}$ ,放入  $37^\circ\text{C}$  培养箱中凝固;吸出孔内未凝固的液体,上下室均加入无血清培养基(上室约  $300 \mu\text{L}$ ,下室约  $500 \mu\text{L}$ )水化 1 h;加  $500 \mu\text{L}$  含有 10% FBS 的培养基至下室,加  $300 \mu\text{L}$  已处理的细胞悬液至 Transwell 小室内,孵育 24 h。取出小室,多聚甲醛固定后加  $500 \mu\text{L}$  结晶紫染色。

用棉签擦拭去除小室内多余细胞和染液并用 PBS 清洗。100 倍显微镜拍照,统计各孔穿过去的细胞数量。

### 1.7 统计学处理

所有数据使用 SPSS 25.0 软件进行数据处理。计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,方差齐性且服从正态分布的计量资料采用完全随机设计方差分析(ANOVA),两两比较用  $q$  检验,方差不齐或不服从正态分布的计量资料采用 K-W 秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 靶向敲低 HIF-1 $\alpha$ 对 EMT 分子的调节

实验组 E-Cadherin 蛋白的表达水平明显高于阴性组和空白组( $P < 0.001$ ),N-Cadherin 蛋白的表达水平明显低于阴性组和空白组( $P < 0.001$ ),阴性组及空白组间 E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白的表达水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 1。

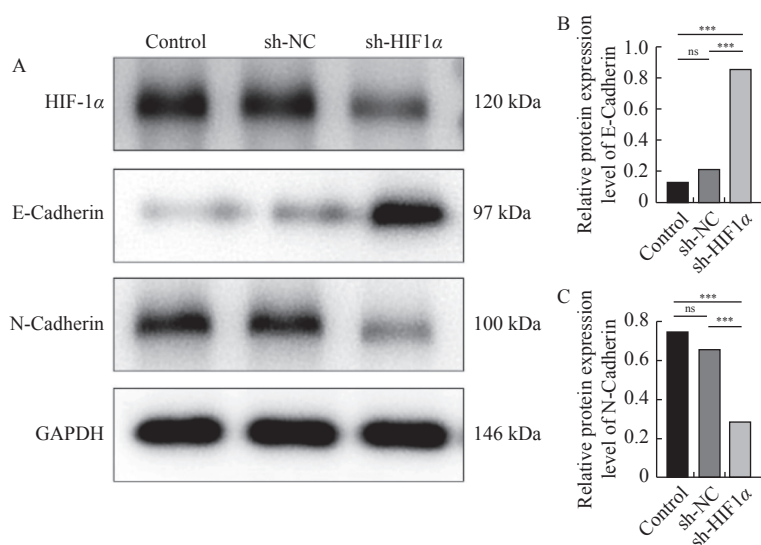


图 1 各组 GBC-SD 细胞 E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白的表达水平

Fig. 1 Expression levels of E-Cadherin and N-Cadherin proteins in GBC-SD cells of each group

A: 各组 E-Cadherin 和 N-Cadherin 蛋白表达电泳图; B: E-Cadherin 蛋白表达分析; C: N-Cadherin 蛋白表达分析; ns 为  $P > 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

### 2.2 靶向敲低 HIF-1 $\alpha$ 降低 GBC-SD 细胞迁移侵袭能力

细胞划痕实验和 Transwell 侵袭实验分析得出,与对照组相比,实验组细胞的划痕愈合度低,穿膜个数少,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。而阴性对照组和空白对照组实验结果,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明靶向敲低 HIF-1 $\alpha$  降低 GBC-SD 细胞迁移侵袭能力,见表 2、图 2 ~ 图 3。

## 3 讨论

HIF-1 最初被视为人类红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因中的 1 个关键元件,用于应对肾组织中的缺氧<sup>[9]</sup>。随后发现 HIF-1 的功能不受 EPO 基因的限制,而是调节其他基因,这被认为是直接氧传感领域的 1 个里程碑。HIF 家族有 3 名成员,它们都由 1 个异二聚体结构组成,该

表 2 各组细胞愈合度和穿模细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Cell healing degree and number of perforated cells in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	48 h 划痕愈合度(%)	穿模细胞数(个)
Control组	69.96 $\pm$ 0.47	215.00 $\pm$ 2.94
sh-NC组	69.25 $\pm$ 0.86	215.33 $\pm$ 2.05
sh-HIF1 $\alpha$ 组	44.51 $\pm$ 0.93 <sup>ab</sup>	121.67 $\pm$ 1.69 <sup>ab</sup>
$\chi^2/F$	18.00	1108.18
<i>P</i>	<0.001*	<0.001*

与sh-NC组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.001; 与Control组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.001; \**P* < 0.05。

结构由一个 O<sub>2</sub> 敏感的  $\alpha$  亚基(HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  和 HIF-3 $\alpha$ )和一个 O<sub>2</sub> 不敏感的  $\beta$  亚基(HIF-1 $\beta$ ，也称为芳烃受体核转运子，ARNT)组成<sup>[10]</sup>。其中，HIF-1 $\alpha$  是最具特征的亚型。HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  分别包含 826、789 个氨基酸，位于亚基前半部分的 2 个氨基酸序列区(PAS-A 和 PAS-B)和HLH 结构域负责 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  之间的异二聚作用。HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  亚基的 HLH 结构域 N 末端上游的碱性区域介导与靶基因启动子的 HRE 的结合<sup>[11]</sup>。HIF-1 $\alpha$  亚基中的 2 个反式激活结构域(TAD)，即 N-TAD(N-端 TAD)和 C-TAD(C-端 TAD)，它们被抑制结构域(ID)分开，在有氧条

件下抑制转录活性<sup>[12]</sup>，在 N-TAD 区域的上游，HIF-1 $\alpha$  的氧依赖性降解(ODD)结构域介导蛋白酶体降解，而 HIF-1 $\beta$  亚基仅含有 C-TAD。HIF-1 $\beta$  在有氧和缺氧条件下都是稳定的，HIF-1 $\alpha$  亚基在有氧条件下通过泛素化-蛋白酶体系统降解<sup>[13]</sup>，缺氧通过 pVHL 的失活稳定 HIF-1/2 $\alpha$ ，从而降低 HIF- $\alpha$  泛素化和蛋白酶体降解<sup>[14]</sup>。

在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)中，HIF-1 $\alpha$  通过上调 GLUT1, HK2, PKM2, LDHA 和 PGK1 的表达促进 PTC 细胞的糖酵解，此外，在 PTC 中，HIF-1 $\alpha$  的高表达亦促进 PTC 细胞的迁移和侵袭<sup>[15]</sup>。在食管癌(esophageal cancer, ESCA)中，ATF5 与 HIF1 靶基因(PDK1、CA9、PAI1、VEGFA、TWIST1、PGK1)的启动子结合，促进 ESCA 细胞的侵袭和迁移。ATF5 沉默抑制 ESCA 细胞的迁移和侵袭能力<sup>[16]</sup>。2010 年，Erdenebulgan 等<sup>[17]</sup>的研究证明在 70% 胆囊癌患者的标本中 HIF-1 $\alpha$  表达阳性，HIF-1 $\alpha$  的表达与分期、肿瘤可治愈性、淋巴结转移、静脉浸润、肝浸润和淋巴结浸润显著相关。本实验研究发现，在 GBC 中，靶向敲低 HIF-1 $\alpha$  可以降低 GBC 细胞的迁移和侵袭能力，并且可以上调 E-Cadherin 的表达，下调 N-Cadherin 的表达，表明靶向敲低 HIF-1 $\alpha$  降低胆囊癌细胞迁移

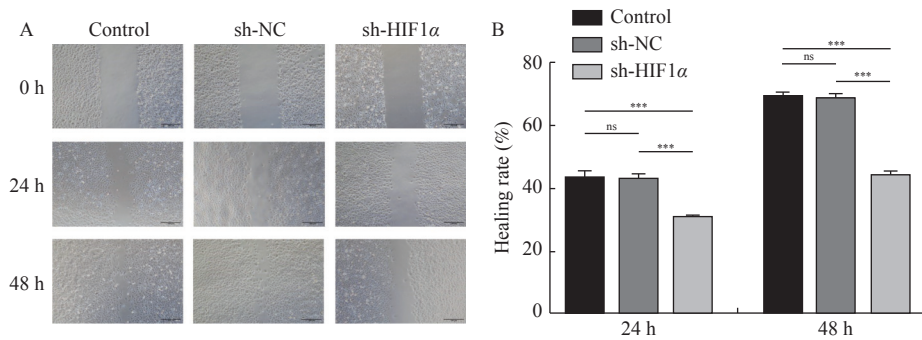


图 2 各组 GBC-SD 细胞的迁移能力

Fig. 2 Migratory capacity of GBC-SD cells in each group

A: 24 h、48 h 后 3 组细胞划痕愈合情况( $\times 40$ ); B: 24 h、48 h 后 3 组细胞划痕愈合率; ns 为 *P* > 0.05, \*\*\**P* < 0.001。

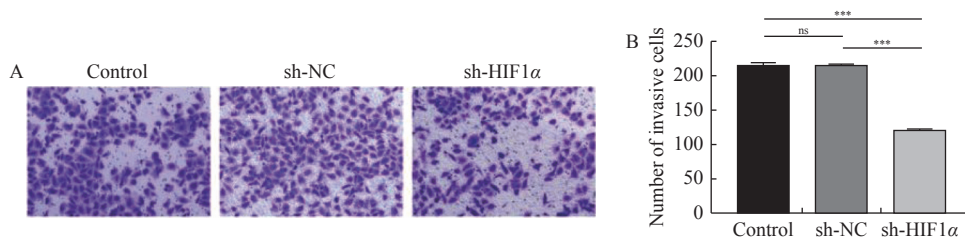


图 3 各组 GBC-SD 细胞的侵袭能力

Fig. 3 Assay of invasive ability of each group of GBC-SD cells

A: 结晶紫染色后 3 组细胞穿模情况( $\times 100$ ); B: 3 组细胞穿模个数; ns 为 *P* > 0.05, \*\*\**P* < 0.001。

和侵袭可能是通过调控上皮-间充质转化来实现的。

综上所述, HIF-1 $\alpha$  在 GBC 细胞中高表达, 靶向敲低 HIF-1 $\alpha$  可以降低胆囊癌细胞的迁移、侵袭能力, 并促进上皮-间充质转化, 因此笔者认为 HIF-1 $\alpha$  可作为 GBC 的独立预后因素, 靶向 HIF-1 $\alpha$  的生物制剂可能更有效地治疗 GBC 的早期阶段。该实验结果补充了胆囊癌侵袭转移的分子机制, 为胆囊癌的靶向治疗和预后提供了新的策略。

### [参考文献]

- [1] China Anti-cancer Association. 中国恶性肿瘤整合诊治指南: 胆囊癌 [J]. 肿瘤, 2022, 42(3): 188-202.
- [2] Narayan R R, Creasy J M, Goldman D A, et al. Regional differences in gallbladder cancer pathogenesis: Insights from a multi-institutional comparison of tumor mutations [J]. *Cancer*, 2019, 125(4): 575-585.
- [3] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [4] Sahara K, Tsilimigras D I, Kikuchi Y, et al. Defining and predicting early recurrence after resection for gallbladder cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2021, 28(1): 417-425.
- [5] de Savornin L E, de Bitter T, Verhoeven R, et al. Trends in treatment and survival of gallbladder cancer in the netherlands; Identifying gaps and opportunities from a nationwide cohort [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 918
- [6] McKeown S R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response [J]. *Br J Radiol*, 2014, 87(1035): 20130676.
- [7] Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: Causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response [J]. *Oncologist*, 2004, 9(Suppl 5): 4-9.
- [8] Muthamil S, Kim H Y, Jang H J, et al. Understanding the relationship between cancer associated cachexia and hypoxia-inducible factor-1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163(7): 114802.
- [9] Wang G L, Semenza G L. Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression [J]. *Curr Opin Hematol*, 1996, 3(2): 156-162.
- [10] Prabhakar N R, Semenza G L. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(3): 967-1003.
- [11] Jiang B H, Rue E, Wang G L, et al. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(30): 17771-17778.
- [12] Jiang B H, Zheng J Z, Leung S W, et al. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(31): 19253-19260.
- [13] Wang G L, Jiang B H, Rue E A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12): 5510-5514.
- [14] Maxwell P H, Wiesener M S, Chang G W, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 271-275.
- [15] Song H, Qiu Z, Wang Y, et al. HIF-1 $\alpha$ /YAP signaling rewrites glucose/Iodine metabolism program to promote papillary thyroid cancer progression [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(1): 225-241.
- [16] He F, Xiao H, Cai Y, et al. ATF5 and HIF1 $\alpha$  cooperatively activate HIF1 signaling pathway in esophageal cancer [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 53.
- [17] Batmunkh E, Shimada M, Morine Y, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in patients with the gallbladder carcinoma [J]. *Int J Clin Oncol*, 2010, 15(1): 59-64.