

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.005

· 基础研究 ·

## 缺氧诱导因子 1- $\alpha$ 参与结直肠癌细胞上皮间质转化及 DNA 同源重组修复的机制

唐康,程勇,庞云,伍鑫,张百川,王五艺(重庆医科大学附属第一医院 胃肠外科,重庆 400016)

**[摘要]** **目的:** 研究氯化钴( $\text{CoCl}_2$ )模拟的细胞体外缺氧微环境对结直肠癌细胞株 SW480 及 Caco-2 上皮间质转化及 DNA 同源重组修复的影响并探究其机制。**方法:** 应用不同浓度的氯化钴( $\text{CoCl}_2$ )处理 SW480 及 Caco2 细胞 72 h 后, CCK8 法检测细胞增殖能力, 划痕及 Transwell 试验检测细胞的迁移及侵袭能力, 流式细胞术(FCM)检测细胞周期及凋亡情况, RT-PCR 及 Western blotting 实验检测细胞内相关基因 mRNA 及蛋白水平的变化情况。**结果:** CCK-8 实验提示细胞在缺氧后增殖能力明显增加( $P < 0.05$ ); 划痕试验及 Transwell 侵袭实验提示细胞在缺氧条件下迁移及侵袭能力明显增强( $P < 0.05$ ); 流式细胞术提示细胞在缺氧后被阻滞在 S 期( $P < 0.05$ ), 凋亡率明显下降( $P < 0.05$ ); RT-PCR 试验表明缺氧后细胞内缺氧诱导因子 1- $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 $\alpha$ )及 RAD51 的 mRNA 水平上调( $P < 0.05$ ); Western blotting 实验表明在缺氧环境下细胞内 HIF-1 $\alpha$  表达上调( $P < 0.05$ ), 上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition)相关蛋白: 钙黏附蛋白 E(E-cadherin)表达下调, 波形蛋白(vimentin)及转录抑制因子(snail)表达上调( $P < 0.05$ ), DNA 同源重组相关蛋白 BRCA1 及 RAD51 表达上调( $P < 0.05$ ), PI3K/AKT(磷脂酰肌醇-3-羟激酶)信号通路下游关键信号分子 AKT1 及其失调毛细血管扩张症突变基因(ataxia-telangiectasia mutant gene)的编码产物 ATM 激酶磷酸化水平显著上调( $P < 0.05$ )。 **结论:** 慢性缺氧环境可促进结直肠癌细胞 SW480 及 Caco-2 的增殖、迁移和侵袭能力, 抑制凋亡, 其机制可能与 HIF-1 $\alpha$ /PI3K-AKT、HIF1- $\alpha$ /ATM 信号通路介导 EMT 及 DNA 同源重组修复过程有关。

**[关键词]** 缺氧诱导因子 1- $\alpha$ ; 结直肠癌; 上皮间质转化; DNA 同源重组修复

**[中图分类号]** R735.3<sup>+</sup>4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)06-0766-07

## Mechanism of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ to participate epithelial mesenchymal transition and DNA homologous recombination repair of colorectal cancer cells

TANG Kang, CHENG Yong, PANG Yun, WU Xing, ZHANG Baichuan, WANG Wuyi (Department of Gastrointestinal Surgery, the 1st Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effect of hypoxic microenvironment in vitro which built by cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2$ ) on epithelial mesenchymal transition and DNA homologous recombination repair of colorectal cancer SW480 and Caco-2 line cells and to explore their mechanisms. **Methods:** After the SW480 and Caco-2 cells were treated with various concentrations of  $\text{CoCl}_2$  for 72 h, proliferation abilities of the cells were detected by CCK8 assay, migration and invasion abilities of the cells detected by scratch test and transwell assay, cell cycles and apoptosis status of the cells detected by flow cytometry (FCM), changes of mRNA and protein levels of associated gene in the cells detected by RT-PCR and Western blotting assays. **Results:** CCK8 assay prompted that proliferation ability of the cells significantly increased after hypoxia ( $P < 0.05$ ); scratch and transwell tests suggested that under hypoxia, migration and invasion abilities of the cells obviously enhanced ( $P < 0.05$ ); FCM disclosed that after anoxic treatment the cells were maintained at S phase and apoptosis rates of the cells significantly decreased ( $P < 0.05$ ); RT-PCR assay showed that mRNA levels of HIF-1 $\alpha$  and RAD51 in the cells after hypoxic treatment raised ( $P < 0.05$ ); Western blotting assay indicated that under hypoxic microenvironment in the cells expression of HIF1- $\alpha$  enhanced ( $P < 0.05$ ), expression of epithelial mesenchymal transition (EMT) associat-

**[基金项目]** 重庆市科委自然科学基金项目(No. cstc2012jjA10038)。Project supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Municipal Science and Technology Commission (No. Cstc2012jjA10038)

**[作者简介]** 唐康(1991-),男,四川南充人,硕士生,主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究, E-mail:754524854@qq.com

**[通信作者]** 程勇(CHENG Yong, corresponding author), E-mail:chengyongcq@aliyun.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20161110.1135.010.html>

ed proteins, namely E-cadherin was down-regulated, expressions of vimentin and transcription inhibitor ( snail ) were up-regulated (  $P < 0.05$  ), expressions of DNA homologous recombination associated protein BRCA1 and RAD51 were up-regulated (  $P < 0.05$  ), phosphorylation levels of down stream key molecule Akt1 on PI3K/AKT ( phosphatidylinositol-3-hydroxy kinase ) signaling pathway and ATM kinase encoded by ataxia-telangiectasia mutant gene were significantly enhanced (  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** Chronic hypoxia environment could promote abilities of proliferation, migration and invasion of the colorectal cancer SW480 and Caco-2 cells as well as inhibit apoptosis of the cells. Mechanism of the actions might related to HIF-1 $\alpha$ /PI3K and HIF-1 $\alpha$ /ATM signaling pathways mediated EMT and DNA homologous recombination repair process.

[ **Key words** ] hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  ( HIF1- $\alpha$  ); colorectal cancer; epithelial-mesenchymal transition ( EMT ); DNA homologous recombination repair

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23( 6 ): 766-772. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.005 ]

全世界范围内,结直肠癌是第三大常见肿瘤类型,其发病率及致死率约占 8%<sup>[1]</sup>。在实体肿瘤内,肿瘤细胞的失控性生长和恶性增殖消耗大量氧气,使得肿瘤细胞处于急性(灌注缺乏)或慢性(弥散障碍)缺氧状态,肿瘤内部缺氧微环境由此产生<sup>[2]</sup>。缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIFs)是由  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位组成的异构二聚体,在低氧条件下 HIFs 与下游靶基因的缺氧反应元件(HRE)结合并发挥作用<sup>[3]</sup>,使肿瘤细胞获得更有侵袭性的表型,细胞的侵袭、增殖、抵御凋亡及耐药能力增加<sup>[4]</sup>。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指细胞丧失上皮细胞表型的同时向间质细胞转化,表现出细胞迁移能力的增强,其在肿瘤的原位浸润及远处转移过程中占有重要地位<sup>[5]</sup>。钙黏附蛋白 E( E-cadherin )表达的缺失被认为是上皮-间质转化的重要标志<sup>[6]</sup>,缺氧能下调细胞间黏附分子的表达来促进肿瘤的转移,但其具体机制还未可知<sup>[7-8]</sup>。同源重组(homologous recombination, HR)修复是指各种原因导致细胞内 DNA 发生损伤后,存在同源序列的 DNA 之间发生的一种高保真度的修复途径<sup>[9-10]</sup>。有研究<sup>[11]</sup>表明,缺氧环境下,细胞在不同周期内 HR 相关蛋白的表达具有波动性,且急性与慢性缺氧条件下细胞内 HR 相关蛋白表达亦有很大差异,本研究旨在探究由氯化钴(  $\text{CoCl}_2$  )模拟的细胞慢性缺氧对结直肠癌细胞 DNA 损伤修复的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

人结直肠癌细胞 SW480 与 Caco-2 细胞株由重医大附一院分子肿瘤及表观遗传学实验室惠赠;胎牛血清购自德国 PAN 公司, RPMI 1640 购自美国 Hyclone 公司,  $\text{CoCl}_2$  购自美国 Sigma 公司,青-链霉素溶液、胰酶、RIPA 裂解液、PMSF(蛋白酶抑制剂)、

BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天公司, ECL 发光液购自美国 Millipore 公司, CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒购自日本同仁研究所, transwell 小室购自美国 Corning 公司, Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,兔抗人 ATM、p-ATM、RAD51、BRCA1、P53、AKT1、p-AKT1、E-cadherin、vimentin、snail、MMP2、MMP9 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司,鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自台湾 Arigo 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗鼠 IgG 二抗、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购自武汉三鹰生物科技公司, RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司, HIF-1 $\alpha$ 、RAD51、 $\beta$ -actin 引物由武汉金斯瑞公司合成。

### 1.2 细胞培养及体外缺氧微环境的构建

结直肠癌细胞株 SW480 及 Caco-2 在 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液的 RPMI 1640 细胞培养基体系中,于 5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度、37  $^{\circ}\text{C}$  恒温细胞孵箱中培养。本试验拟利用  $\text{CoCl}_2$  在体外模拟细胞缺氧微环境,具体操作见文献[12],预先在上述细胞培养基中加入  $\text{CoCl}_2$  制剂,无菌过滤,至其药物终浓度为 0(对照组)、100(轻度缺氧组)、200(中度缺氧组)、300(重度缺氧组)、400(无氧组)  $\mu\text{mol/L}$ 。细胞传代后以正常含 10% 胎牛血清培养基在常氧状态下培养约 24 h 后,按分组情况处理细胞,继续培养 72 h(中途按上述分组更换实验处理培养液一次),收集各组细胞进入后续实验。

### 1.3 CCK-8 细胞增殖-毒性检测试验

胰酶消化上述两株结直肠癌细胞后收集细胞并计数,接种于 96 孔板中,细胞终浓度为 5 000 个/孔,不含细胞的培养基作为空白组,每组设置 5 个复孔,按前述不同程度缺氧分组情况处理细胞,设置 6、24、48 和 72 h 4 个检测时间点,在各个时间点将孔板中培养基更换为含 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 试剂 + 100  $\mu\text{l}$  含 10%

胎牛血清培养基, 在 37℃ 细胞恒温孵箱反应 2 ~ 3 h 后于 450 nm 处以酶标仪检测各孔吸光度( D 值)。试验重复 3 次。

### 1.4 划痕试验

将各组细胞消化后接种适宜浓度于孔板中, 待细胞铺满单层后用小号枪头垂直划痕。分别于 24、48 和 72 h 显微镜下拍照, 用 ImageJ 软件分析, 细胞相对迁移距离 = [ D<sub>处理组</sub> - D<sub>对照组</sub> ] / 2。试验重复 3 次。

### 1.5 Transwell 侵袭实验

收集并调整各组细胞浓度, 接种 Matrigel 基质胶细胞悬液于铺的小室上室( 100 μl/室 ), 细胞终浓度为 8 × 10<sup>4</sup> 个/室, 另向下室加入 750 μl 含血清培养基。分别于培养 48、40 h 后取出两株细胞的实验及对照组 transell 小室, 结晶紫染色, 显微镜下随机选取 5 个视野拍照, 收集试验数据分析。试验重复 3 次。

### 1.6 流式细胞术检测细胞周期及凋亡

调整两株实验及对照组细胞浓度至 200 × 10<sup>4</sup> 个/ml, 接种 1 ml 细胞悬液于 1.5 ml EP 管中, 4 ℃ 过夜, 次日送重庆医科大学生命科学院流式细胞室检测细胞周期。细胞凋亡则在消化细胞并离心重悬后, 各组取 1 ml 细胞悬液, 立即送流式细胞术上机检测。收集试验数据并分析。试验重复 3 次。

### 1.7 细胞总 RNA 提取及 RT-PCR 试验

收集各组细胞, 提取总 RNA, 并进行 RNA 纯度分析。采用 TakaRa 公司逆转录试剂盒得到 cDNA。按说明书扩增 cDNA, 所得产物上样电泳, 在 Bio-Rad 自动凝胶成像仪上曝光显影, 各目的基因 mRNA 相对表达量 = 目的基因 mRNA 灰度值/内参 β-actin mRNA 灰度值。试验重复 3 次。

引物序列如下: HIF-1α: F 5'-CGTTCCTTCGAT-CAGTTGTC-3', R 5'-TCAGTGGTGGCAGTGGTAGT-3'; RAD51: F 5'-AGTGATGTCCTGGATAATGT-3',

R 5'-GACCCGAGTAGTCTGTTCT-3', β-actin: F 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAA-3', R 5'-CCTGCTCTC-CCTACGC-3'。

### 1.8 细胞总蛋白提取及 Western blotting 实验

RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。取各组蛋白样品约 60 μg 进入 6% ~ 12% SDS-PAGE 胶电泳体系。将蛋白转到 PVDF 膜。按说明书操作鼠抗人 HIF-1α 单克隆抗体, 兔抗人 ATM、p-ATM、RAD51、BRCA1、P53、AKT1、p-AKT1、E-cadherin、vimentin、snail、MMP2、MMP9、GAPDH 单克隆抗体, 鼠抗人 VEGF 单克隆抗体。对应的羊抗兔及山羊抗鼠二抗。ECL 发光液显影, Bio-rad 成像。Quantity-one 软件分析各泳道灰度值, 各目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。收集数据并分析。试验重复 3 次。

### 1.9 统计学处理

本实验所有数据均由 SPSS 22.0 统计学软件完成, 计量资料  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用 F 检验及单因素方差分析( one-way ANOVA ), 两组间均数比较采用 t 检验, 以 P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氯化钴体外模拟缺氧环境可促进结直肠癌细胞增殖

两组细胞在不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 模拟体外缺氧环境培养后, 通过 CCK-8 法检测各组细胞增殖情况, 与对照组比较, 随着缺氧程度的增加, 细胞的增殖能力逐渐增强( 图 1 ), 最佳药物处理浓度与时间分别为 300 μmol/L 和 72 h ( P < 0.05 ), 当 CoCl<sub>2</sub> 浓度达到 400 μmol/L 时, 细胞增殖受到明显抑制, 细胞破裂, 且出现少量碎片。

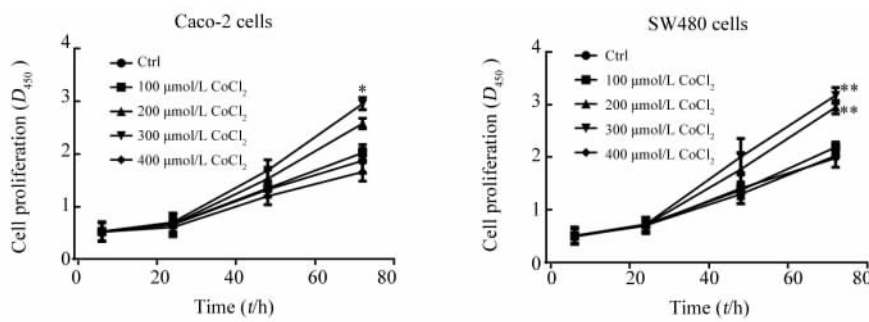


图 1 CCK-8 法检测不同缺氧条件下 SW480 及 Caco-2 细胞的增殖能力

Fig. 1 Proliferations of the SW480 and Caco-2 line cells under different hypoxia conditions detected by CCD-8 assay

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs Ctrl group

2.2 缺氧可促进结直肠癌细胞的迁移及侵袭

划痕及 Transwell 侵袭实验结果提示,当  $\text{CoCl}_2$  浓度达到  $300 \mu\text{mol/L}$  后,细胞的迁移及侵袭能力明显增强(图 2),表现为药物组中细胞的相对迁移距离及穿透膜的细胞数目明显增加( $P < 0.05$ )。

2.3 缺氧对结直肠癌细胞周期及凋亡的影响

流式细胞术检测缺氧处理后两株结直肠癌细胞周期及凋亡的变化(图 3)。各组 SW480 细胞处于 S 期的比例(%)分别为: $21.31 \pm 3.00, 38.35 \pm 2.84, 55.04 \pm 6.43$  和  $58.18 \pm 2.30$ ; 各组 Caco-2 细胞处于 S 期的比例(%)分别为: $16.17 \pm 2.67, 23.84 \pm 3.08, 32.93 \pm 3.43$  和  $54.39 \pm 5.21$ 。随着  $\text{CoCl}_2$  浓

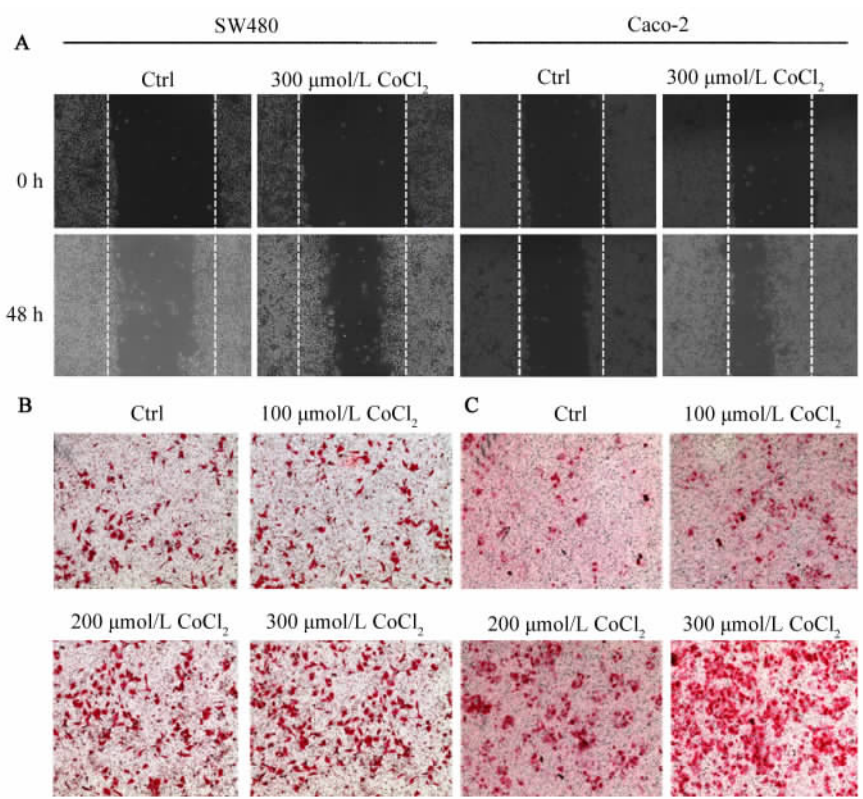


图 2 划痕试验及 Transwell 检测各组细胞迁移侵袭能力(×100)

Fig. 2 Migration and invasion abilities of the cells in various groups detected by scratch and Transwell assays(×100)

A: Migration of the SW480 and Caco-2 line cells; B: Invasion ability of the SW480 line cells; C: Invasion ability of the Caco-2 line cells

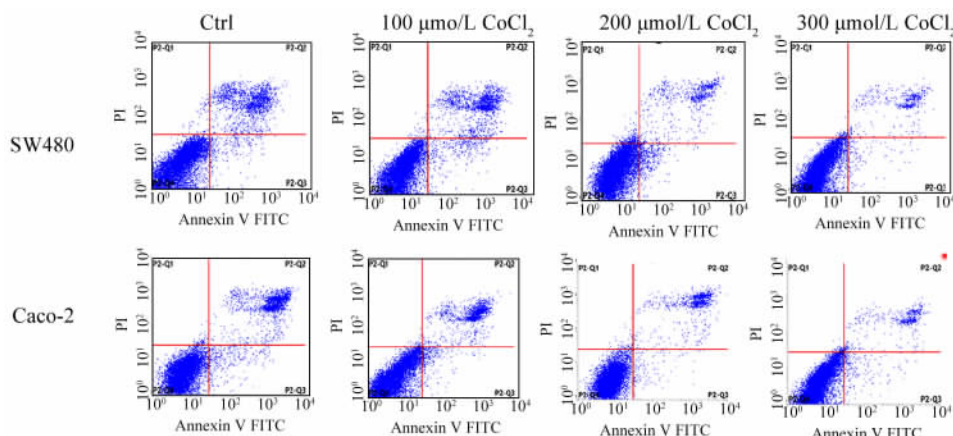


图 3 流式细胞术检测各组细胞周期及凋亡

Fig. 3 Cell cycles and apoptosis of the cells in the various groups detected by FCM

度增加,S期细胞比例明显增加( $P < 0.05$ )。两株细胞各组的凋亡率(%)分别为:SW480:16.18 ± 2.86,16.38 ± 1.56,11.09 ± 3.34和6.00 ± 1.60;Caco-2:20.69 ± 1.75,18.86 ± 1.33,13.25 ± 1.92和7.13 ± 1.26。结果提示随着CoCl<sub>2</sub>浓度增加,细胞的凋亡率递减( $P < 0.05$ ),缺氧可以抑制结直肠癌细胞的凋亡。

#### 2.4 CoCl<sub>2</sub>模拟缺氧环境上调结直肠癌细胞内HIF-1α及RAD51的mRNA水平

RT-PCR结果显示,与对照组对比,两株结直肠癌细胞各缺氧组中HIF-1α及RAD51的mRNA表达均上调(图4),差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

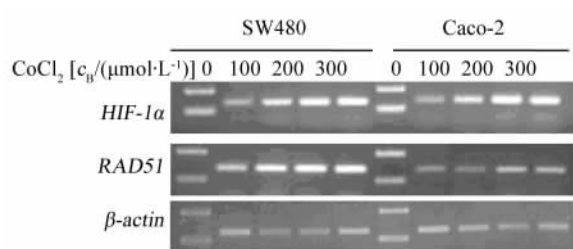


图4 不同缺氧状态下SW480及Caco-2细胞内HIF-1α及RAD51 mRNA的表达

Fig. 4 Expressions of HIF1-α and RAD51 mRNA in the SW480 and Caco-2 line cells under different hypoxic conditions

#### 2.5 缺氧环境下结直肠癌细胞内MMP2、MMP9及VEGF蛋白表达上调

Western blotting结果(图5A)显示,两株结直肠癌细胞中,随着CoCl<sub>2</sub>浓度增加,作为反映肿瘤侵袭力的独立指标基质金属蛋白酶家族成员MMP2及MMP9蛋白表达水平逐渐上调,当CoCl<sub>2</sub>浓度达到300 μmol/L时达到峰值( $P < 0.05$ );在SW480细胞中,VEGF蛋白水平在CoCl<sub>2</sub>浓度达到200 μmol/L时递增达到峰值( $P < 0.05$ ),而在Caco-2细胞各组中,VEGF蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。上述结果提示:结直肠癌细胞在缺氧环境下侵袭力增强。

#### 2.6 缺氧环境可能通过激活HIF-1α/PI3K-αKT信号通路介导结直肠癌细胞发生EMT

在SW480及Caco-2细胞中,随着缺氧程度的增加,HIF-1α蛋白表达水平明显上调,当氯化钴浓度达到300 μmol/L时达到峰值( $P < 0.05$ ),同时EMT相关蛋白表达水平表现为上皮细胞标志物钙黏蛋白E(E-cadherin)逐渐下调、间质细胞标志物波形蛋白(vimentin)逐渐上调( $P < 0.05$ )。此外,PI3K/AKT信号通路下游关键信号分子Akt1的磷酸化水平亦

逐渐上调( $P < 0.05$ )。上述结果提示在缺氧环境下,结直肠癌细胞中内HIF-1α表达上调,PI3K/Akt信号通路激活,并出现上皮间质转化过程的活化,上述两条信号通路可能共同作用并介导了EMT过程的活化(图5B),EMT的活化可能参与缺氧环境下结直肠癌细胞的侵袭及远处转移。

#### 2.7 缺氧环境通过激活HIF-1α/ATM信号通路介导结直肠癌细胞DNA同源重组修复

Western blotting检测结果提示SW480及Caco-2两株细胞在缺氧状态下,随着缺氧程度增强,抑制基因BRCA1、DNA修复基因RAD51及抑癌基因P53的蛋白表达水平逐渐上调( $P < 0.05$ ),ATM激酶的磷酸化水平亦逐渐上调( $P < 0.05$ ),提示缺氧环境引起的HIF-1α上调,可能通过激活HIF1-α/ATM信号通路,上调BRCA1、RAD51表达,进一步介导DNA同源重组过程(图5C)。

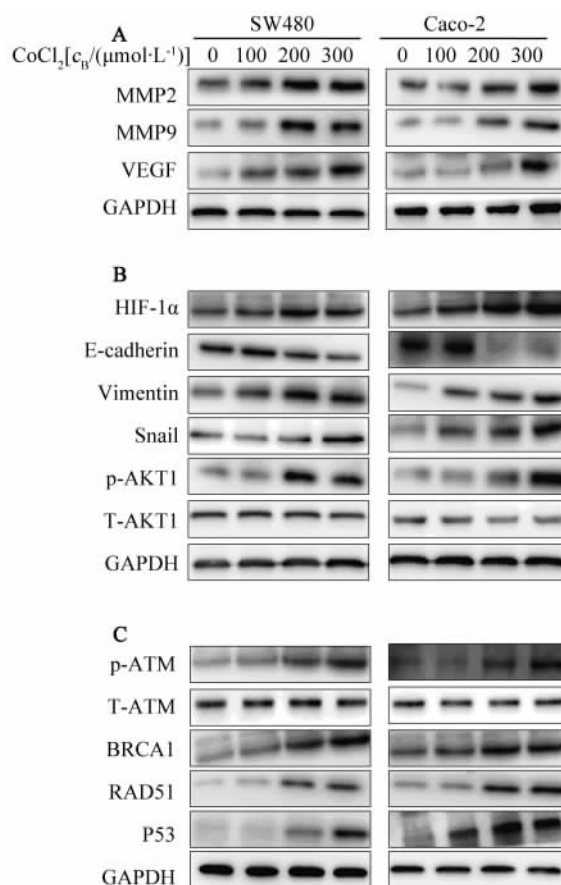


图5 缺氧条件下细胞内EMT及DNA同源重组相关蛋白水平  
Fig. 5 Levels of EMT and DNA homologous recombination associated proteins in the cells under various hypoxic conditions

A: Expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins;  
B: Expressions of HIF-1α, p-AKT1, E-cadherin, vimentin and snail proteins; C: Expressions of p-ATM, T-ATM, BRCA1, PAD51 and P53 proteins

### 3 讨论

HIFs 是缺氧环境下的关键调控因子,与下游多种转录因子结合参与肿瘤细胞增殖、局部浸润与远处转移、上皮-间质转化、DNA 修复、血管生成、肿瘤耐药等一系列肿瘤生物学行为中<sup>[13-15]</sup>。小鼠的基因敲除实验中发现, HIF1- $\alpha$  与 HIF-2 $\alpha$  对于肿瘤细胞的影响在某些领域不尽相同,敲除其中之一产生的后果截然不同, HIF1- $\alpha$  可能在缺氧早期起到主要作用,原因可能在于两者在细胞中的表达存在组织和时间特异性<sup>[16]</sup>。

EMT 是胚胎时期形态发生不可或缺的机制之一。在肿瘤的转移过程中,肿瘤细胞必须通过获得间质基因的表达模式及功能,从而激活细胞的蛋白质水解作用及能动性。持续的缺氧刺激可通过上调 EMT 相关转录因子 Twist、snail 及 HIFs 的表达,与 EMT 相关信号通路如经典 TGF- $\beta$ 、Wnt/ $\beta$ -catenin、PI3K/AKT、NOTCH<sup>[17]</sup>等相互作用介导肿瘤细胞发生上皮间质转化。PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要的生物学信号通路之一,参与到细胞的增殖、分化、转化、凋亡、血管生成、纤维形成、糖转运等多种生物功能的调控中。有研究<sup>[18]</sup>表明,在肾小管上皮细胞中,缺氧环境下细胞内 HIF-1 $\alpha$  的异常积累可通过激活 PI3K/Akt 信号通路上调转录抑制因子 snail 的表达,进而抑制 E-cadherin 的表达,参与 EMT 过程。本实验在缺氧环境下的结直肠癌细胞株 SW480 及 Caco-2 中观察到了类似现象,细胞在受到缺氧刺激后,细胞增殖能力明显增强,并出现 S 期阻滞,凋亡受到抑制,细胞迁移及侵袭能力增强,胞内 HIF-1 $\alpha$  表达水平上调,同时 PI3K/AKT 信号通路激活,进而出现上皮细胞标志物钙黏附蛋白 E 表达下调,间质细胞标志物 Vimentin 表达上调,表现为上皮间质转化过程活化,上述结果表明缺氧环境能调控结直肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力,在结直肠癌的发生发展过程中起到核心作用。

肿瘤的进展同肿瘤的基因组不稳定性有关,持续积累的染色体畸变主导了肿瘤细胞亚群的进化,肿瘤细胞以此获得更具侵袭性的表型。当肿瘤细胞出现基因组不稳定性时,细胞会启动 DNA 损伤修复程序,而 DNA 双链断裂损伤修复(double strand breaks, DSBs)是 DNA 损伤修复形式之一。DSBs 主要通过 HR 的方式进行,后者的缺失会导致处于 S 期的细胞及细胞凋亡过程中不能启动有效的 DSBs。磷脂酰肌醇激酶(PIKKs)家族毛细血管扩张共济失调突变基因(ATM)及 ATR 是 DNA 损伤反应的重要

调控检查点<sup>[19]</sup>, ATM 能启动细胞 DSBs, ATM/ATR 通过与下游基因 *Chk1*、*Chk2* 结合,上调细胞内 *BRCA1* 的表达。而 *BRCA1* 通过上调 *BRCA2* 的表达,反馈性上调同源重组(HR)核心基因 *RAD51* 的水平<sup>[20]</sup>。此外, DNA 损伤时,活化的 ATM/ATR 亦能激活抑癌基因 *P53* 信号通路及其下游靶基因,从而参与到 HR 过程中<sup>[21]</sup>。本实验在 mRNA 及蛋白质水平观察了结直肠癌细胞在慢性缺氧环境下, DNA 重组修复相关蛋白 ATM、p-ATM、BRCA1、RAD51、P53 的表达情况。结果显示缺氧环境下 ATM 信号通路激活,下游分子 BRCA1、RAD51、P53 表达水平上调。从而初步确定了 HIF-1 $\alpha$ /ATM 信号通路激活在缺氧环境下 DNA 同源重组修复中的作用。

综上所述,本研究结果表明,结直肠癌细胞在慢性缺氧环境下,增殖、迁移及侵袭能力增强,凋亡受到抑制,上皮间质转化过程活化,其可能与 HIF1- $\alpha$  高表达以及 PI3K/Akt 信号通路的激活有关。此外,本实验证明 ATM 信号通路在缺氧环境下结直肠癌细胞 DNA 同源重组修复过程中的重要作用,其具体机制还有待进一步探究。总之,本研究明确了缺氧环境在结直肠癌发生发展过程中的核心作用,为临床上结直肠癌的治疗提供新的思路。

### [参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, STEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] PATEL A, SANT S. Hypoxic tumor microenvironment: opportunities to develop targeted therapies [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5):803-12. DOI:10.1016/j.biotechadv.2016.04.005.
- [3] RATCLIFFE P J. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(4):862-865. DOI:10.1172/JCI31750.
- [4] VAUPEL P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis [J]. *Oncologist*, 2008, 13(Suppl 3):21-26. DOI:10.1634/theoncologist.13-S3-21.
- [5] THOMPSON E W, NEWGREEN D F, TARIN D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):5991-5995. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-0616.
- [6] PEINADO H, PORTILLO F, CANO A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5/6):365-375. DOI: 10.1387/ijdb.041794hp.
- [7] WANG Y, JIANG Y, LUO Y, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -dependent epithelial to mesenchymal transition under hypoxic conditions in prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1):521-527. DOI: 10.3892/or.2016.4766.

- [ 8 ] CZEKAY R P, AERTGEERTS K, CURRIDEN S A, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins [ J ]. J Cell Biol, 2003, 160( 5 ): 781-791. DOI: 10.1083/jcb.200208117.
- [ 9 ] ARNAUDEAU C, LUNDIN C, HELLEDAY T. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells [ J ]. J Mol Biol, 2001, 307( 5 ): 1235-1245. DOI:10.1006/jmbi.2001.4564.
- [ 10 ] SHARMA R A, DIANOVGL. Targeting base excision repair to improve cancer therapies [ J ]. Mol Aspects Me, 2007, 28( 3/4 ): 345-374. DOI:10.1016/j.mam.2007.06.002.
- [ 11 ] CHAN N, KORITZINSKY M, ZHAO H, et al. Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance [ J ]. Cancer Res, 2008, 68( 2 ):605-614. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5472.
- [ 12 ] LI S, ZHANG J, YANG H, et al. Copper depletion inhibits CoCl<sub>2</sub>-induced aggressive phenotype of MCF-7 cells via downregulation of HIF-1 and inhibition of snail/Twist-mediated epithelial-mesenchymal transition [ J ]. Sci Rep, 2015, 5( 1 ): 12410. DOI:10.1038/srep12410.
- [ 13 ] TSAI Y P, WU K J. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis [ J ]. J Biom Sci, 2012, 19( 1 ):1-7. DOI: 10.1186/1423-0127-19-102.
- [ 14 ] BRISTOW R G, HILL R P. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability [ J ]. Nat Rev Cancer, 2008, 8( 3 ): 180-192. DOI:10.1038/nrc2344.
- [ 15 ] MATSUOKA J, YASHIRO M, DOI Y, et al. Hypoxia stimulates the EMT of gastric cancer cells through autocrine TGFβ signaling [ J/OL ]. PLoS One, 2013, 8( 5 ): e62310[ 2016/05/01 ]. http://dx. doi. org/10.1371/journal.pone.0062310. DOI: 10.1371/journal.pone.0062310.
- [ 16 ] IMAMURA T, KIKUCHI H M, PARK D, et al. HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer [ J ]. Inter J Cancer J Inter Du Cancer, 2009, 124( 4 ):763-771. DOI: 10.1002/ijc.24032.
- [ 17 ] POON E, HARRIS A L, ASHCROFT M. Targeting the hypoxia-inducible factor ( HIF ) pathway in cancer [ J ]. Expert Rev Mol Med, 2009, 11( 1 ): 2490-2508. DOI: http://dx. doi. org/10.1017/S1462399409001173.
- [ 18 ] DU R, XIA L, NING X, et al. Hypoxia-induced Bmi1 promotes renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition and renal fibrosis via PI3K/Akt signal [ J ]. Mol Biol Cell, 2014, 25( 17 ):2650-2659. DOI:10.1091/mbc.E14-01-0044.
- [ 19 ] BENADA J, MACUREK L. Targeting the checkpoint to Kill cancer cells [ J ]. Biomolecules, 2015, 5( 3 ): 1912-1937. DOI: 10.3390/biom5031912.
- [ 20 ] LIMA M, BOUZID H, SOARES D G, et al. Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair [ J ]. Oncotarget, 2016, 7( 18 ):25885-25901. DOI:10.18632/oncotarget.8292.
- [ 21 ] BAKKENIST C J, KASTAN M B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation [ J ]. Nature, 2003, 421( 6922 ): 499-506. DOI:10.1038/nature01368.
- [ 收稿日期 ] 2016 - 07 - 15 [ 修回日期 ] 2016 - 10 - 28  
[ 本文编辑 ] 宋关鸿

• 读者 • 作者 • 编者 •

## 参考文献题名后应标注文献类型和文献载体标识代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都应标上[ 文献类型标识代码 ]或[ 文献类型标识代码/文献载体标识代码 ]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[ J ];如为专著中析出文献,题名后应标上[ M ]。对电子资源类文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[ J/OL ];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[ M/OL ]。常用文献类型标识和电子文献载体标识代码见表 1。

表 1 文献类型和文献载体标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码	载体类型	标识代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		