



(扫描二维码查看原文)

· 论著 ·

# 低氧诱导大鼠垂体腺瘤 GH3 细胞增殖、侵袭和上皮-间质转化的机制研究

张欢<sup>1</sup>, 石文健<sup>1</sup>, 刘永亮<sup>1</sup>, 李景武<sup>2</sup>, 张于<sup>3</sup>, 董桂兰<sup>4</sup>, 董伟<sup>1</sup>

**【摘要】** 背景 约 35% 的垂体腺瘤呈侵袭性生长, 而上皮-间质转化 (EMT) 与肿瘤的侵袭和复发密切相关。低氧会在多种肿瘤中诱导 EMT, 但其在垂体腺瘤中的作用尚不清楚。目的 探究低氧诱导大鼠垂体腺瘤 GH3 细胞增殖、侵袭和 EMT 的机制。方法 本实验时间为 2020 年 9 月至 2021 年 6 月。将 GH3 细胞分为常氧组〔不转染低氧诱导因子 (HIF)-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 19.5%〕、低氧组 (不转染 HIF-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 2.5%)、常氧+siRNA 组 (转染 HIF-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 19.5%)、低氧+siRNA 组 (转染 HIF-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 2.5%)。比较各组干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力, 细胞侵袭能力, GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-钙黏蛋白 (N-Cad)、波形蛋白 (Vim) mRNA 及其蛋白表达水平。结果 低氧组干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力高于常氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 常氧+siRNA 组干扰后 72 h 细胞增殖能力低于常氧组, 干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力低于低氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 低氧+siRNA 组干扰后 24 h 细胞增殖能力高于常氧组, 干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力低于低氧组、高于常氧+siRNA 组 ( $P < 0.05$ )。常氧组、低氧组、常氧+siRNA 组、低氧+siRNA 组干扰后 48、72 h 细胞增殖能力分别高于本组干扰后 24 h ( $P < 0.05$ ) ; 常氧组、低氧组、常氧+siRNA 组、低氧+siRNA 组干扰后 72 h 细胞增殖能力分别高于本组干扰后 48 h ( $P < 0.05$ )。低氧组细胞侵袭能力高于常氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 常氧+siRNA 组细胞侵袭能力低于常氧组、低氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 低氧+siRNA 组细胞侵袭能力低于低氧组, 高于常氧+siRNA 组 ( $P < 0.05$ )。低氧组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平高于常氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 常氧+siRNA 组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、Vim mRNA 表达水平低于常氧组, HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平低于低氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 低氧+siRNA 组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平低于低氧组, HIF-1 $\alpha$ 、Vim mRNA 表达水平高于常氧+siRNA 组 ( $P < 0.05$ )。低氧组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平高于常氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 常氧+siRNA 组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平低于常氧组、低氧组 ( $P < 0.05$ ) ; 低氧+siRNA 组 GH3 细胞中 Vim 蛋白表达水平高于常氧组, HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平低于低氧组、高于常氧+siRNA 组 ( $P < 0.05$ )。结论 低氧通过上调 HIF-1 $\alpha$  表达而促进 GH3 细胞增殖和细胞侵袭, 低氧通过上调 N-Cad、Vim 表达而促进 EMT 的发生, 而干扰 HIF-1 $\alpha$  表达可部分阻断这些作用。

**【关键词】** 垂体肿瘤; 低氧; 细胞增殖; 细胞侵袭; 上皮-间质转化

**【中图分类号】** R 736.4 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.268

张欢, 石文健, 刘永亮, 等. 低氧诱导大鼠垂体腺瘤 GH3 细胞增殖、侵袭和上皮-间质转化的机制研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29 (12): 86-91. [www.syxnf.net]

ZHANG H, SHI W J, LIU Y L, et al. Mechanism of cell proliferation, cell invasion and epithelial-mesenchymal transition of rat pituitary adenoma GH3 cells induced by hypoxia [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29 (12): 86-91.

## Mechanism of Cell Proliferation, Cell Invasion and Epithelial-mesenchymal Transition of Rat Pituitary Adenoma GH3 Cells Induced by Hypoxia

ZHANG Huan<sup>1</sup>, SHI Wenjian<sup>1</sup>, LIU Yongliang<sup>1</sup>, LI Jingwu<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>3</sup>, DONG Guilian<sup>4</sup>, DONG Wei<sup>1</sup>

1. Department of Neurosurgery, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China

2. Department of Tumor Surgery, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China

3. Department of Intensive Care Medicine, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China

4. Department of Oncology, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China

Corresponding author: DONG Wei, E-mail: polly0522@yeah.net

基金项目: 河北省自然科学基金精准医学联合基金细化项目 (H2020105017)

1.063000 河北省唐山市人民医院神经外科 2.063000 河北省唐山市人民医院肿瘤外科 3.063000 河北省唐山市人民医院重症医学科 4.063000 河北省唐山市人民医院肿瘤内科

通信作者: 董伟, E-mail: polly0522@yeah.net

**【Abstract】 Background** About 35% of pituitary adenomas grow aggressively, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) is closely related to tumor invasion and recurrence. Hypoxia can induce EMT in a variety of tumors, but its role in pituitary adenomas is unclear. **Objective** To explore the mechanism of cell proliferation, cell invasion and EMT of rat pituitary adenoma GH3 cells induced by hypoxia. **Methods** The study period was from September 2020 to June 2021. GH3 cells were divided into normoxia group [without transfection of hypoxic inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ -siRNA, oxygen concentration was 19.5%], hypoxia group (without transfection of HIF-1 $\alpha$ -siRNA, oxygen concentration was 2.5%), normoxia+siRNA group (transfected with HIF-1 $\alpha$ -siRNA, oxygen concentration was 19.5%), hypoxia+siRNA group (transfected with HIF-1 $\alpha$ -siRNA, oxygen concentration was 2.5%). The cell proliferation ability at 24, 48, and 72 h after the interference, cell invasion ability, HIF-1 $\alpha$ , N-cadherin (N-Cad), vimentin (Vim) mRNA and protein expression levels in GH3 cells were compared in each group. **Results** The cell proliferation ability of the hypoxia group was higher than that of the normoxia group at 24, 48, and 72 h after interference ( $P < 0.05$ ). The cell proliferation ability of the normoxia+siRNA group was lower than that of the normoxia group at 72 h after the interference, and the cell proliferation ability was lower than that of the hypoxia group at 24, 48, and 72 h after the interference ( $P < 0.05$ ). The cell proliferation ability of the hypoxia+siRNA group was higher than that of the normoxia group at 24 h after interference, and the cell proliferation ability was lower than that of the hypoxia group and higher than that of the normoxia+siRNA group at 24, 48, and 72 h after the interference ( $P < 0.05$ ). In the normoxia group, hypoxia group, normoxia+siRNA group, and hypoxia+siRNA group, the cell proliferation ability at 48 and 72 h after interference was higher than that at 24 h after interference, respectively ( $P < 0.05$ ). In the normoxia group, hypoxia group, normoxia+siRNA group, and hypoxia+siRNA group, the cell proliferation capacity at 72 h after interference was higher than that at 48 h after interference, respectively ( $P < 0.05$ ). The cell invasion ability of hypoxia group was higher than that of normoxia group ( $P < 0.05$ ). The cell invasion ability of normoxia+siRNA group was lower than that of normoxia group and hypoxia group ( $P < 0.05$ ). The cell invasion ability of hypoxia+siRNA group was lower than that of hypoxia group and higher than that of normoxia+siRNA group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim mRNA in GH3 cells in the hypoxia group were higher than those in the normoxia group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of HIF-1 $\alpha$  and Vim mRNA in GH3 cells in the normoxia+siRNA group were lower than those in the normoxia group, and the expression levels of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim mRNA were lower than those in the hypoxia group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim mRNA in GH3 cells in the hypoxia+siRNA group were lower than those in the hypoxia group, and the expression levels of HIF-1 $\alpha$  and Vim mRNA were higher than those in the normoxia+siRNA group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim protein in GH3 cells in the hypoxia group were higher than those in the normoxia group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim protein in GH3 cells in the normoxia+siRNA group were lower than those in the normoxia group and hypoxia group ( $P < 0.05$ ). The expression level of Vim protein in GH3 cells in the hypoxia+siRNA group was higher than that in the normoxia group, and the expression levels of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim protein were lower than that in the hypoxia group and higher than that in the normoxia+siRNA group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Hypoxia promotes GH3 cell proliferation and cell invasion by up-regulating the expression level of HIF-1 $\alpha$ , hypoxia promotes the occurrence of EMT by up-regulating the expression levels of N-Cad and Vim, while interference with the expression of HIF-1 $\alpha$  can partially block these effects.

**【Key words】** Pituitary neoplasms; Hypoxia; Cell proliferation; Cell invasion; Epithelial-mesenchymal transition

垂体腺瘤是最常见的颅内肿瘤之一, 占原发性中枢神经系统肿瘤的14%, 约35%的垂体腺瘤呈侵袭性生长<sup>[1]</sup>, 与非侵袭性垂体腺瘤相比, 侵袭性垂体腺瘤不仅手术全切率低, 而且术后复发率高。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)是上皮细胞转化为间质细胞的生物学过程, 与肿瘤的发生发展、远处转移、转移定植、癌症干性和化学抗性有关<sup>[2-3]</sup>。缺氧是组织中氧分压低的一种情况, 已成为肿瘤病理生理学的一个关键因素。低氧会在多种肿瘤中诱导EMT<sup>[4-6]</sup>, 但在垂体腺瘤中尚不清楚。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIF)是一类介导细胞适应低氧应激反应的调控因子, 是细胞适应缺氧的主要驱

动力。研究显示, HIF-1 $\alpha$ 与垂体腺瘤的侵袭性行为有关<sup>[7]</sup>。在生长激素腺瘤中, HIF-1 $\alpha$ 可通过促进蛋白激酶A活性增加而导致生长激素过度合成<sup>[8]</sup>。本研究旨在分析低氧诱导大鼠垂体腺瘤GH3细胞增殖、侵袭和EMT的机制, 以期为垂体腺瘤的临床诊疗提供新的理论支持。

## 1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2020年9月至2021年6月。

1.2 主要仪器与试剂 HIF-1 $\alpha$ 干扰片段(HIF-1 $\alpha$ -siRNA)购自北京傲锐东源生物科技有限公司, GH3细胞购自美国ATCC公司, [3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲酯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(金翁),

内盐; MTS] 购自北京泽平科技有限责任公司, RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 反转录试剂盒和实时荧光定量试剂盒购自美国 Thermo 公司, HIF-1 $\alpha$ 、N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-Cad)、波形蛋白(Vimentin, Vim)、GAPDH 一抗购自英国 Abcam 公司, 小室实验用 Transwell 板购自美国 Corning 公司。

**1.3 细胞分组** 将 GH3 细胞分为常氧组(不转染 HIF-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 19.5%)、低氧组(不转染 HIF-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 2.5%)、常氧+siRNA 组(转染 HIF-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 19.5%)、低氧+siRNA 组(转染 HIF-1 $\alpha$ -siRNA, 氧浓度为 2.5%)。将 GH3 细胞置于 2.5% 胎牛血清+15% 马血清中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。将处于对数生长期的 GH3 细胞先接种于 6 孔板中, 常规培养至融合度为 80%, 更换新鲜培养液; 将 3  $\mu\text{g}$  HIF-1 $\alpha$ -siRNA 稀释于 5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 3000<sup>TM</sup> 中, 加入含 5  $\mu\text{l}$  P3000<sup>TM</sup> 的减血清培养基, 补充总体系至 250  $\mu\text{l}$ , 混匀后室温孵育 5 min; 将 DNA-脂质体复合物加入 6 孔板中, 分别将细胞置于不同氧浓度(常氧: 19.5%  $\text{O}_2$ ; 低氧: 2.5%  $\text{O}_2$ ) 的恒温恒湿培养箱中培养。

**1.4 细胞增殖能力检测** 取各组对数生长期的 GH3 细胞置于 96 孔板中, 每孔种  $1 \times 10^4$  个细胞, 待细胞贴壁后, 瞬时干扰 HIF-1 $\alpha$  表达, 继续培养 24、48、72 h 后分别加入 20  $\mu\text{l}$  [3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲酯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(金翁), 内盐; MTS], 继续培养 4 h, 检测 490 nm 波长处吸光度值, 即细胞增殖能力。实验独立重复 3 次。

**1.5 细胞侵袭能力检测** 取各组对数生长期的 GH3 细胞, 干扰 HIF-1 $\alpha$  表达 24 h 后, 吸弃培养基, 采用 4 $^{\circ}\text{C}$  磷酸盐缓冲液洗 2 次, 胰酶消化后, 4 $^{\circ}\text{C}$  下 1 000 r/min 离心 5 min (离心半径 60 mm), 收集各组细胞, 调整细胞密度为  $2 \times 10^5/\text{ml}$ , 在 Transwell 板小室内种 200  $\mu\text{l}$  细胞, 继续培养 24 h 后取出, 采用 4% 甲醛固定, 擦去小室内的细胞, 苏木素染色后随机取 5 个高倍视野( $\times 400$ ), 计算细胞数目, 取均值, 即细胞侵袭能力。实验独立重复 3 次。

**1.6 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平检测** 取各组对数生长期的 GH3 细胞, 胰酶消化后利用一步法提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR。PCR 扩增条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$  20 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 40 个循环。HIF-1 $\alpha$  的正向引物为 5'-TGCTCATCAGTTGCCACTTC-3', 反向引物为 5'-CCATCCAGGGCTTTTCAGATA-3'; N-Cad 的正向引物为 5'-ACGGGCAGATCACCCTATC-3', 反向引物为 5'-TTTCACAAGTCTCGGCCTCT-3'; Vim 的正向引

物为 5'-CCCAGATTCAGGAACAGCAT-3', 反向引物为 5'-CACCTGTCTCCGGTATTCGT-3'; 内参基因 GAPDH 的正向引物为 5'-AAGCACCCTTCATTGACCT-3', 反向引物为 5'-CCCCATTGATGTTAGCGGG-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平。实验独立重复 3 次。

**1.7 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平检测** 取各组对数生长期的 GH3 细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$  下 1 000 r/min 离心 5 min (离心半径 60 mm), 收集各组细胞, 采用磷酸盐缓冲液洗 3 次, 加入非变性裂解液, 冰上孵育 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 15 min (离心半径 60 mm), 取上清液, 采用 BCA 法检测样品总蛋白浓度。电泳, 采用湿转法将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜, 采用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 分别加入 HIF-1 $\alpha$  一抗(1:2 000)、E-Cad 一抗(1:1 000)、Vim 一抗(1:2 000)、GAPDH 一抗(1:10 000), 4 $^{\circ}\text{C}$  下过夜。采用 TBST 洗膜 3 次, 加入相应的二抗孵育 1 h, 采用等渗 Tris-HCl-Tween 缓冲盐溶液洗膜 3 次。加入 ECL 化学发光液, 分析条带灰度值, 即 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平。实验独立重复 3 次。

**1.8 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。服从正态分布的计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞增殖能力比较** 常氧组、低氧组、常氧+siRNA 组、低氧+siRNA 组干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低氧组干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力高于常氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 常氧+siRNA 组干扰后 72 h 细胞增殖能力低于常氧组, 干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力低于低氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 低氧+siRNA 组干扰后 24 h 细胞增殖能力高于常氧组, 干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力低于低氧组、高于常氧+siRNA 组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。常氧组、低氧组、常氧+siRNA 组、低氧+siRNA 组干扰后 48、72 h 细胞增殖能力分别高于本组干扰后 24 h, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 常氧组、低氧组、常氧+siRNA 组、低氧+siRNA 组干扰后 72 h 细胞增殖能力分别高于本组干扰后 48 h, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。

**2.2 各组细胞侵袭能力比较** 常氧组、低氧组、常氧+siRNA 组、低氧+siRNA 组细胞侵袭能力分别为( $301.3 \pm 6.4$ )%、( $477.3 \pm 20.2$ )%、( $188.7 \pm 19.4$ )%、( $321.0 \pm 17.9$ )%。常氧组、低氧组、常氧+siRNA 组、低氧+siRNA 组细胞侵袭能力比较, 差异有统计学意义



( $F=49.30$ ,  $P < 0.001$ )。低氧组细胞侵袭能力高于常氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 常氧+siRNA组细胞侵袭能力低于常氧组、低氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 低氧+siRNA组细胞侵袭能力低于低氧组, 高于常氧+siRNA组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 各组细胞增殖能力比较( $\bar{x} \pm s$ , %,  $n=3$ )  
Table 1 Comparison of cell proliferation in each group

组别	干扰后 24 h	干扰后 48 h	干扰后 72 h
常氧组	0.42 ± 0.01	0.57 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.82 ± 0.02 <sup>de</sup>
低氧组	0.59 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.03 <sup>ad</sup>	1.54 ± 0.07 <sup>ade</sup>
常氧+siRNA组	0.38 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>bd</sup>	0.60 ± 0.06 <sup>abde</sup>
低氧+siRNA组	0.48 ± 0.02 <sup>abc</sup>	0.61 ± 0.02 <sup>bcd</sup>	0.91 ± 0.04 <sup>bcdde</sup>
<i>F</i> 值	37.71	41.26	68.56
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: <sup>a</sup>表示与常氧组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与低氧组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>表示与常氧+siRNA组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup>表示与本组干扰后 24 h 比较,  $P < 0.05$ ; <sup>e</sup>表示与本组干扰后 48 h 比较,  $P < 0.05$

2.3 各组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平比较 常氧组、低氧组、常氧+siRNA组、低氧+siRNA组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低氧组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平高于常氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 常氧+siRNA组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、Vim mRNA 表达水平低于常氧组, HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平低于低氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 低氧+siRNA组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平低于低氧组, HIF-1 $\alpha$ 、Vim mRNA 表达水平高于常氧+siRNA组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

2.4 各组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平比较 常氧组、低氧组、常氧+siRNA组、低氧+siRNA组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低氧组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平高于常氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 常氧+siRNA组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平低于常氧组、低氧组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 低氧+siRNA组 GH3 细胞中 Vim 蛋白表达水平高于常氧组, HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平低于低氧组、高于常氧+siRNA组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 3、图 1。

### 3 讨论

肿瘤微环境是由肿瘤细胞和肿瘤周围浸润的免疫细

表2 各组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 2 Comparison of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim mRNA expression levels in GH3 cells of each group

组别	HIF-1 $\alpha$ mRNA	N-Cad mRNA	Vim mRNA
常氧组	0.012 ± 0.002	0.029 ± 0.003	0.004 0 ± 0.001 0
低氧组	0.091 ± 0.018 <sup>a</sup>	0.166 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.012 0 ± 0.001 0 <sup>a</sup>
常氧+siRNA组	0.003 ± 0.001 <sup>ab</sup>	0.006 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.001 0 ± 0.000 1 <sup>ab</sup>
低氧+siRNA组	0.011 ± 0.001 <sup>bc</sup>	0.046 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.002 0 ± 0.000 2 <sup>bc</sup>
<i>F</i> 值	20.66	68.65	37.75
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

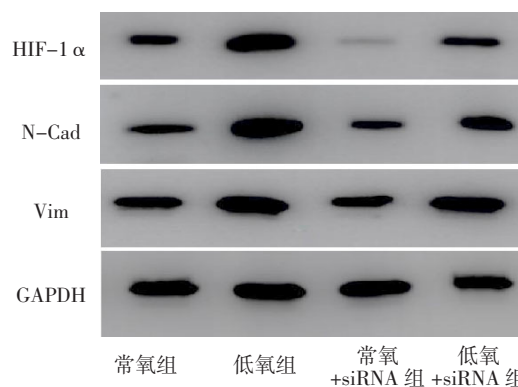
注: HIF=低氧诱导因子, N-Cad=N-钙黏蛋白, Vim=波形蛋白; <sup>a</sup>表示与常氧组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与低氧组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>表示与常氧+siRNA组比较,  $P < 0.05$

表3 各组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 3 Comparison of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim protein expression levels in GH3 cells of each group

组别	HIF-1 $\alpha$ 蛋白	N-Cad 蛋白	Vim 蛋白
常氧组	0.323 ± 0.052	0.430 ± 0.021	0.660 ± 0.032
低氧组	0.910 ± 0.035 <sup>a</sup>	1.110 ± 0.055 <sup>a</sup>	1.260 ± 0.095 <sup>a</sup>
常氧+siRNA组	0.140 ± 0.026 <sup>ab</sup>	0.203 ± 0.024 <sup>ab</sup>	0.340 ± 0.052 <sup>ab</sup>
低氧+siRNA组	0.283 ± 0.038 <sup>bc</sup>	0.493 ± 0.012 <sup>bc</sup>	0.983 ± 0.044 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值	76.27	143.60	42.94
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: <sup>a</sup>表示与常氧组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与低氧组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>表示与常氧+siRNA组比较,  $P < 0.05$



注: HIF=低氧诱导因子, N-Cad=N-钙黏蛋白, Vim=波形蛋白  
图1 BCA法检测各组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、N-Cad、Vim 蛋白表达水平的电泳图

Figure 1 The electrophoretic patterns of HIF-1 $\alpha$ , N-Cad and Vim protein expression levels in GH3 cells of each group detected by BCA method

胞、新生血管及其内皮细胞、肿瘤相关成纤维细胞和细胞外基质共同构成的<sup>[9]</sup>, 在实体肿瘤的发生发展及转移中起重要作用。作为肿瘤微环境的特征之一, 低氧与多种肿瘤侵袭性和预后不良相关<sup>[10-11]</sup>。HIF-1 $\alpha$  是细胞对缺氧做出反应的关键转录因子之一, 与肿瘤 EMT<sup>[7]</sup>、

血管生成<sup>[12]</sup>、药物抗性<sup>[13]</sup>密切相关。本研究旨在分析低氧诱导大鼠垂体腺瘤 GH3 细胞增殖和 EMT 的机制。

国际癌症基因组联盟发起的“全基因组泛癌分析”计划显示,在 27 类 1 188 种癌症中肿瘤组织内低氧程度与基因突变频率增加有关,低氧在基因组重构和肿瘤恶性进展中起关键作用<sup>[11]</sup>。肿瘤组织内低氧环境有助于肿瘤的可塑性和异质性<sup>[14]</sup>。国内有报道称,低氧促进小鼠垂体腺瘤 GT1-1 细胞增殖,在 12 h 达到峰值,随后呈下降趋势<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,低氧组干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力高于常氧组;常氧 +siRNA 组干扰后 72 h 细胞增殖能力低于常氧组,干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力低于低氧组;低氧 +siRNA 组干扰后 24 h 细胞增殖能力高于常氧组,干扰后 24、48、72 h 细胞增殖能力低于低氧组、高于常氧 +siRNA 组;常氧组、低氧组、常氧 +siRNA 组、低氧 +siRNA 组干扰后 48、72 h 细胞增殖能力分别高于本组干扰后 24 h;常氧组、低氧组、常氧 +siRNA 组、低氧 +siRNA 组干扰后 72 h 细胞增殖能力分别高于本组干扰后 48 h;提示低氧可促进垂体腺瘤细胞增殖,而干扰 HIF-1 $\alpha$  未能完全阻断低氧的促肿瘤细胞增殖作用。低氧组细胞侵袭能力高于常氧组;常氧 +siRNA 组细胞侵袭能力低于常氧组、低氧组;低氧 +siRNA 组细胞侵袭能力低于低氧组,高于常氧 +siRNA 组;提示低氧可促进垂体腺瘤细胞侵袭,而干扰 HIF-1 $\alpha$  未能完全阻断低氧的促肿瘤细胞侵袭作用。推测在垂体腺瘤中除了 HIF-1 $\alpha$  外,还有其他的调控机制,如 2-酮戊二酸依赖性<sup>[16]</sup>、低氧诱导的内质网应激反应<sup>[17]</sup>,但这需要进一步研究验证。

HIF-1 是由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  组成的异源二聚体,其中 HIF-1 $\alpha$  可反映机体缺氧程度,通过代谢、增殖和血管生成等多个生理过程参与癌症的发生发展<sup>[8]</sup>。HIF-1 $\alpha$  能增强内皮细胞向低氧组织的迁移,即促进 EMT,进而促进新生血管形成<sup>[18]</sup>。垂体腺瘤中 EMT 与腺瘤的侵袭性密切相关,诱导 EMT 可促进 GH3 细胞的侵袭和增殖,相反则抑制 GH3 细胞的侵袭和增殖,并引起 GH3 细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期<sup>[19]</sup>。大部分垂体腺瘤均有 HIF-1 $\alpha$  表达并且其水平与垂体腺瘤的侵袭性密切相关<sup>[20]</sup>。与血管丰富的正常脑垂体相比,垂体腺瘤具有较低的血管密度,但肿瘤内的缺氧条件仍可激活一些诱导途径,导致血管密度增加或形成更有序的微血管几何形状以维持肿瘤生长<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,低氧组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 及其蛋白表达水平高于常氧组;常氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 及其蛋白表达水平低于常氧组、低氧组;低氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 及其蛋白表达水平低于低氧组、高于常氧 +siRNA 组;提示低氧状态下 GH3 细胞的 HIF-1 $\alpha$  表达水平明显升高,本研究采用

的 siRNA 技术未能完全阻断 HIF-1 $\alpha$  的表达。E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-Cad)通常在上皮细胞中表达,其表达下调破坏细胞内连接使上皮细胞获得迁移能力。当 E-Cad 转变为 N-Cad 时,导致肿瘤细胞侵袭和扩散<sup>[22-23]</sup>。本研究结果显示,低氧组 GH3 细胞中 N-Cad mRNA 表达水平高于常氧组;常氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 N-Cad mRNA 表达水平低于低氧组;低氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 N-Cad mRNA 表达水平低于低氧组;低氧组 GH3 细胞中 N-Cad 蛋白表达水平高于常氧组;常氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 N-Cad 蛋白表达水平低于常氧组、低氧组;低氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 N-Cad 蛋白表达水平低于低氧组、高于常氧 +siRNA 组;提示 E-Cad 转化为 N-Cad 是低氧诱导 GH3 细胞发生 EMT 的主要机制。这一表现和既往应用细胞周期抑制剂帕博西尼影响 GH3 细胞侵袭的机制相同<sup>[24]</sup>,即影响 E-Cad 向 N-Cad 的转化。Vim 作为 EMT 的正调节因子,其上调被认为是 EMT 的先决条件<sup>[25]</sup>。本研究结果显示,低氧组 GH3 细胞中 Vim mRNA 表达水平高于常氧组;常氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 Vim mRNA 表达水平低于常氧组、低氧组;低氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 Vim mRNA 表达水平低于低氧组、高于常氧 +siRNA 组;低氧组 GH3 细胞中 Vim 蛋白表达水平高于常氧组;常氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 Vim 蛋白表达水平低于常氧组、低氧组;低氧 +siRNA 组 GH3 细胞中 Vim 蛋白表达水平高于常氧组、常氧 +siRNA 组,低于低氧组;提示在低氧促进 GH3 细胞发生 EMT 的过程中,Vim 也发挥重要作用。

综上所述,低氧通过上调 HIF-1 $\alpha$  表达而促进 GH3 细胞增殖和细胞侵袭,低氧通过上调 N-Cad、Vim 表达而促进 EMT 的发生,干扰 HIF-1 $\alpha$  表达可部分阻断这些作用。深入了解 HIF-1 $\alpha$  通路参与垂体腺瘤发生发展的分子调控机制可为垂体腺瘤的药物治疗提供新思路 and 理论依据。然而,本研究并未构建过表达 HIF-1 $\alpha$  模型,从过表达 HIF-1 $\alpha$  和干扰 HIF-1 $\alpha$  表达两方面证实 HIF-1 $\alpha$  与 EMT 的关系。在未来的研究中,本研究组计划构建稳定高表达 HIF-1 $\alpha$  和干扰 HIF-1 $\alpha$  表达的动物模型,比较两者的动物表型,为垂体腺瘤中靶向 HIF-1 $\alpha$  治疗提供新的证据。

作者贡献:张欢撰写论文,进行结果分析与解释;石文健、刘永亮、李景武进行数据收集;张于、董桂兰进行数据整理、分析;董伟进行文章的构思与设计,负责文章的质量控制及审校,并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

#### 参考文献

- [1] EZZAT S, ASA S L, COULDWELL W T, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review[J]. Cancer, 2004, 101(3):

- 613–619.DOI: 10.1002/encr.20412.
- [2] GHEORGHIOU M L, NEGREANU F, FLESERIU M.Updates in the medical treatment of pituitary adenomas [J].Horm et Metab, 2020, 52 (1): 8–24.DOI: 10.1055/a-1066–4592.
- [3] RAMESH V, BRABLETZ T, CEPPI P.Targeting EMT in cancer with repurposed metabolic inhibitors [J].Trends Cancer, 2020, 6 (11): 942–950.DOI: 10.1016/j.trecan.2020.06.005.
- [4] SHAH V M, SHEPPARD B C, SEARS R C, et al.Hypoxia: friend or foe for drug delivery in pancreatic cancer [J].Cancer Lett, 2020, 492: 63–70.DOI: 10.1016/j.canlet.2020.07.041.
- [5] BADER S B, DEWHIRST M W, HAMMOND E M.Cyclic hypoxia: an update on its characteristics, methods to measure it and biological implications in cancer [J].Cancers, 2020, 13 (1): 23.DOI: 10.3390/cancers13010023.
- [6] ZIÓLKOWSKA–SUCHANEK I.Mimicking tumor hypoxia in non-small cell lung cancer employing three-dimensional in vitro models [J].Cells, 2021, 10 (1): 141.DOI: 10.3390/cells10010141.
- [7] HE W, HUANG L, SHEN X L, et al.Relationship between RSUME and HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A with invasion of pituitary adenoma [J].Gene, 2017, 603: 54–60.DOI: 10.1016/j.gene.2016.12.012.
- [8] LUCIA K, WU Y, GARCIA J M, et al.Hypoxia and the hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  activate protein kinase A by repressing R II beta subunit transcription [J].Oncogene, 2020, 39 (16): 3367–3380.DOI: 10.1038/s41388-020-1223-6.
- [9] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO M A, et al.EMT in cancer [J].Nat Rev Cancer, 2018, 18 (2): 128–134.DOI: 10.1038/nrc.2017.118.
- [10] TREIBER T, TREIBER N, MEISTER G.Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways [J].Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20 (1): 5–20.DOI: 10.1038/s41580-018-0059-1.
- [11] WONG H A, FATIMY R E, ONODERA C, et al.The cancer genome atlas analysis predicts microRNA for targeting cancer growth and vascularization in glioblastoma [J].Mol Ther, 2015, 23 (7): 1234–1247.DOI: 10.1038/mt.2015.72.
- [12] ZIMNA A, KURPISZ M.Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies [J].Biomed Res Int, 2015, 2015: 549412.DOI: 10.1155/2015/549412.
- [13] ALBADARI N, DENG S S, LI W.The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy [J].Expert Opin Drug Discov, 2019, 14 (7): 667–682.DOI: 10.1080/17460441.2019.1613370.
- [14] RICHARD D E, BERRA E, POUYSSEGUR J.Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha in vascular smooth muscle cells [J].J Biol Chem, 2000, 275 (35): 26765–26771.DOI: 10.1074/jbc.M003325200.
- [15] YANG Q, LI X J.Molecular network basis of invasive pituitary adenoma: a review [J].Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 7.DOI: 10.3389/fendo.2019.00007.
- [16] YANG G, SHI R, ZHANG Q.Hypoxia and oxygen-sensing signaling in gene regulation and cancer progression [J].Int J Mol Sci, 2020, 21 (21): 8162.DOI: 10.3390/ijms21218162.
- [17] CHIPURUPALLI S, KANNAN E, TERGAONKAR V, et al.Hypoxia induced ER stress response as an adaptive mechanism in cancer [J].Int J Mol Sci, 2019, 20 (3): E749.DOI: 10.3390/ijms20030749.
- [18] KINALI B, SENOGLU M, KARADAG F K, et al.Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and AT-rich interactive domain-containing protein 1A expression in pituitary adenomas: association with pathological, clinical, and radiological features [J].World Neurosurg, 2019, 121: e716–722.DOI: 10.1016/j.wneu.2018.09.196.
- [19] FOWKES R C, VLOTIDES G.Hypoxia-induced VEGF production 'RSUMEs' in pituitary adenomas [J].Endocr Relat Cancer, 2012, 19 (1): C1–5.DOI: 10.1530/erc-11-0297.
- [20] JING X M, YANG F M, SHAO C C, et al.Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment [J].Mol Cancer, 2019, 18 (1): 157.DOI: 10.1186/s12943-019-1089-9.
- [21] BHANDARI V, LI C H, BRISTOW R G, et al.Divergent mutational processes distinguish hypoxic and normoxic tumours [J].Nat Commun, 2020, 11 (1): 737.DOI: 10.1038/s41467-019-14052-x.
- [22] CHAUVET N, ROMANÒ N, MEUNIER A C, et al.Combining cadherin expression with molecular markers discriminates invasiveness in growth hormone and prolactin pituitary adenomas [J].J Neuroendocrinol, 2016, 28 (2): 12352.DOI: 10.1111/jne.12352.
- [23] SU Y, LI J, SHI C, et al.N-cadherin functions as a growth suppressor in a model of K-ras-induced PanIN [J].Oncogene, 2016, 35 (25): 3335–3341.DOI: 10.1038/onc.2015.382.
- [24] HEN Y, LI Z, FANG Q, et al.CDKN2A (p16INK4A) affects the anti-tumor effect of CDK inhibitor in somatotroph adenomas [J].Int J Mol Med, 2021, 47 (2): 500–510.DOI: 10.3892/ijmm.2020.4807.
- [25] CXU H, XU W H, REN F, et al.Prognostic value of epithelial-mesenchymal transition markers in clear cell renal cell carcinoma [J].Aging (Albany NY), 2020, 12 (1): 866–883.DOI: 10.18632/aging.102660.

(收稿日期: 2021-08-10; 修回日期: 2021-10-18)

(本文编辑: 崔丽红)