

[文章编号] 1000- 4718(2005)06- 1225- 05

# 人 HepG2 细胞低氧习服模型的建立\*

陈 伟<sup>1,2</sup>, 陈家佩<sup>1</sup>, 葛世丽<sup>1</sup>, 从玉文<sup>1</sup>( <sup>1</sup> 军事医学科学院放射医学研究室, 北京 100850; <sup>2</sup> 解放军第 304 医院全军创伤修复重点实验室, 北京 100037)

[摘要] 目的: 建立人 HepG2 细胞的低氧习服模型, 以探讨细胞低氧习服的机制。方法: HepG2 细胞在 1% O<sub>2</sub> 低氧条件下培养 24 h 后, 正常氧压条件下培养 24 h, 以此为一个周期, 连续低氧处理 6 个周期, 期间以 MTT 法、透射电镜观察法、Northern 杂交检测细胞达到低氧习服后, 细胞增殖能力、细胞超微结构以及细胞内 EPO 基因表达的变化。结果: HepG2 细胞在 1% O<sub>2</sub> 低氧条件下培养 48 h 后, 细胞增殖受到抑制, 超微结构受到损伤; 而经过 6 周期的间断低氧处理后, 再低氧 48 h, 细胞的增殖能力恢复到常氧对照组水平, 提示细胞耐氧能力明显升高, 细胞的形态、胞浆突起数量、线粒体数目和结构都接近于常氧对照组水平。急性低氧能够引起 HepG2 细胞内 EPO 基因表达增强, 而低氧习服的 HepG2 细胞再低氧 48 h, EPO 基因表达量接近到常氧对照细胞水平。结论: HepG2 细胞经过 6 个周期低氧处理后, 细胞耐低氧能力增强, 急性低氧促进 EPO 基因表达的作用受到抑制, 细胞达到低氧习服状态。

[关键词] 缺氧; 低氧习服; 红细胞生成素; HepG2 细胞

[中图分类号] Q151.93; R852.11 [文献标识码] A

## Establishment of a cellular model of hypoxic acclimatization in human HepG2 cells

CHEN Wei<sup>1,2</sup>, CHEN Jia-pei<sup>1</sup>, GE Shi-li<sup>1</sup>, CONG Yu-wen<sup>1</sup>*(<sup>1</sup>Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100850, China; <sup>2</sup>Key Research Laboratory of Wound Repair, 304 th Hospital of PLA, Beijing 100037, China)*

[ABSTRACT] **AIM:** To establish a cellular model of hypoxic acclimatization using HepG2 cells to explore the mechanism of cellular hypoxia acclimatization. **METHODS:** HepG2 cells were cultured in 1% O<sub>2</sub> for 24 hours, then in 21% O<sub>2</sub> for another 24 hours, which composed a hypoxic treating cycle. After 6 cycles, the activity of cell proliferation was estimated with MTT method. The morphologic features of HepG2 cells were observed with optical microscope and transmission electron microscope. EPO gene expression was detected by Northern blotting technique. **RESULTS:** Acute hypoxia inhibited cellular mitosis, impaired cellular ultrastructure and induced EPO gene expression. After 6 cycles of hypoxic treatment, proliferation ability of HepG2 treated with acute hypoxia for 48 h was resumed to the level of control cells cultured in 21% O<sub>2</sub>. The ultrastructure of HepG2 cells injured by hypoxia recovered and the level of EPO gene expression returned to that in control cells. **CONCLUSION:** After 6 cycles of hypoxic treatment, the ability of HepG2 to endure hypoxia is obviously enhanced and HepG2 cells might reach the status of hypoxic acclimatization.

[KEY WORDS] Anoxia; Hypoxic acclimatization; Erythropoietin; HepG2 cells

机体处于低氧习服状态的一个重要表现是维持组织和细胞内足够氧的供应, 其中红系造血系统起着十分重要的作用<sup>[1]</sup>。目前, 关于哺乳动物急性低氧和低氧习服时红系造血系统变化的研究进行得较多, 但多局限于研究血液内红细胞和血红蛋白的变化, 少数资料报道了调节红系造血的细胞因子之一,

即红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的变化, 由于取材不易, 个体差异较大, 对不少变化的发生机理和影响因素的深入研究难度较大<sup>[2]</sup>。EPO 是影响机体内红系造血系统的一种重要的细胞因子, 因此建立一种细胞低氧习服模型显得十分必要。人细胞 HepG2 是体外表达 EPO 基因的两种细胞株之一, 低氧能够

[收稿日期] 2003- 10- 20 [修回日期] 2004- 04- 07

\* [基金项目] 国家自然科学基金重点课题(No. 39730190)

Tel: 010- 66867391; E- mail: weichen 304@ yahoo. com. cn

诱导 HepG2 细胞内 EPO 基因表达<sup>[2]</sup>。因此本实验以 HepG2 细胞为对象, 给予细胞间断低氧处理, 旨在建立低氧习服的细胞模型, 以便于深入研究低氧习服时红系造血系统的适应机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

人细胞株 HepG2 由北京放射医学研究所贺福初教授惠赠。低氧气体(1% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> 和 94% N<sub>2</sub>) 由北京核普气体有限公司配制。总 RNA 提取试剂盒、Wizard<sup>TM</sup> Plus Minipreps DNA Purification System、Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps DNA Purification System、Primer- $\alpha$ -Gene 标记试剂盒等为 Promega 公司产品。 $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTP 购自亚辉生物技术有限公司。其它如: 3-(N-吗啉)-丙磺酸(MOPS)、焦碳酸二乙脂、尼龙膜、琼脂糖和甲醛购自华美公司。

### 2 细胞间断低氧处理

浓度为  $1 \times 10^8$  cells/L 的 HepG2 细胞在 1% O<sub>2</sub> 低氧条件下培养 24 h 后, 再在正常氧含量(21% O<sub>2</sub>) 条件下培养 24 h, 以此为 1 个周期, 连续低氧处理 6 个周期。

### 3 细胞增殖活性的检测

在 HepG2 细胞低氧处理的每一个周期, 不同处理组的细胞, 即常氧对照组(在常氧压下培养 48 h)、急性低氧组(在 1% O<sub>2</sub> 低氧下连续低氧处理 48 h)、低氧处理组(经低氧处理不同周期后, 细胞再在 1% O<sub>2</sub> 低氧下连续低氧处理 48 h), 经消化洗涤后, 用锥虫蓝染色计数活细胞, 稀释成  $1 \times 10^8$  cells/L 的细胞悬液。每孔 100  $\mu$ L 分别接种于两块 96 孔板内, 每组 5 个复孔。3 组细胞再分别置于常氧(21% O<sub>2</sub>) 和低氧(1% O<sub>2</sub>) 条件下, 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h 后, 用 MTT 法检测细胞增殖活性和细胞耐低氧能力的变化, 用吸光度(A) 值反映细胞的增殖活性, 具体步骤参考文献<sup>[3]</sup>。

### 4 细胞形态和超微结构的观察

在 100 倍和 400 倍光镜下观察不同低氧处理的 HepG2 细胞形态的变化, 随机选取 5 个视野, 每个视野观察 100 个细胞。不同处理的 HepG2 细胞经 3% 戊二醛及 1% 四氧化锇固定脱水浸透包埋后, 醋酸铀及柠檬酸铅染色, 在 Philips EM-400T 透射电镜下观察细胞超微结构的变化。每组细胞重复 3 次, 每次观察 20 个细胞。

### 5 Northern 杂交实验

EPO 和  $\beta$ -actin 探针经扩增、回收、纯化后用随

机引物标记法标记探针。每份 RNA 样品取 30  $\mu$ g 变性、电泳、转膜, 紫外交联仪内固定后, 将膜放入 42  $^{\circ}$ C 的预杂交液内孵育 30 min。将含有 [<sup>32</sup>P]-dATP 的探针加入 6.2 mL 杂交 A 液内于 100  $^{\circ}$ C 变性后, 加入 5.24 mL 杂交 B 液内, 42  $^{\circ}$ C 预热。弃杂交管内的预杂交液加入杂交液, 并杂交过夜。42  $^{\circ}$ C 洗膜两次, 每次 15 min, 62  $^{\circ}$ C 洗膜 2 次, 每次 15 min。滤纸吸干后, 将膜置 -70  $^{\circ}$ C 放射自显影 24 h。每个基因的 Northern 杂交各重复 5 次。以凝胶图像分析系统(UVP-GDS800) 测定 X-光片各个杂交带的灰度, 以常氧对照组为 100%, 计算灰密度比值, 并绘制灰密度图。

### 6 统计学处理

用 SAS 软件对数据进行统计学处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。阳性率资料组间采用单因素方差分析。

## 结 果

### 1 低氧处理的 HepG2 细胞在常氧(21% O<sub>2</sub>) 条件下的增殖能力变化

急性低氧组细胞在常氧(21% O<sub>2</sub>) 条件下培养 48 h 后, 经 MTT 检测, 反映细胞的增殖能力的吸光度值均低于未低氧处理的常氧对照组细胞; 随着低氧处理周期的延长, 细胞的吸光度值逐渐增大, 到低氧处理第 6 周期时, 反映细胞增殖能力的吸光度值为  $2.003 \pm 0.072$ , 接近常氧对照组的水平( $2.075 \pm 0.115$ ), 没有显著差异( $P > 0.05$ ) (表 1)。经过进一步低氧处理, 低氧处理组细胞的增殖能力仍保持与常氧对照组细胞相接近的水平。

### 2 低氧处理的 HepG2 细胞在低氧(1% O<sub>2</sub>) 条件下的增殖能力变化

HepG2 细胞在 1% O<sub>2</sub> 条件下培养 48 h 后, 细胞的增殖能力在各实验点上均低于在正常氧压(21% O<sub>2</sub>) 条件下培养的细胞(表 1 和表 2)。细胞连续低氧 48 h 后, 再置 1% O<sub>2</sub> 低氧环境中培养 48 h, 经 MTT 检测, 反映细胞增殖能力的吸光度值进一步下降。HepG2 细胞经过 3 个周期的低氧处理后, 在连续低氧条件下培养 48 h 后, 经 MTT 检测, 细胞的吸光度值为  $1.629 \pm 0.047$ , 明显高于急性低氧组( $1.397 \pm 0.041$ ) ( $P < 0.01$ )。HepG2 经过进一步低氧处理后, 细胞的增殖能力都明显高于急性低氧组, 接近甚至超过常氧对照组细胞(见表 2)。

### 3 不同低氧处理的 HepG2 细胞形态的变化

人细胞株 HepG2 是贴壁生长的上皮细胞。在常氧条件下, 细胞呈多边形, 细胞间紧密接触; 急性低

氧 48 h 后, 细胞体积缩小, 胞体细长, 细胞间相互接触明显减少, 细胞间仅以点状相连。低氧处理 6 周期后再低氧处理 48 h, HepG2 细胞间又呈紧密连接, 细胞体积和形态与常氧对照组细胞相似。

表 1 不同低氧处理对常氧(21% O<sub>2</sub>) 条件下培养的 HepG2 细胞增殖活性的影响

Tab 1 Effects of acute hypoxia and hypoxic treating on proliferative ability of HepG2 cells cultured in 21% O<sub>2</sub> circumstances (A value.  $\bar{x} \pm s$ . n= 5)

Group	Normal control	Hypoxic treating	Acute hypoxia
1th cycle	1.969 ± 0.064 <sup>△△</sup>	1.371 ± 0.044*	1.371 ± 0.044*
2th cycle	1.908 ± 0.149 <sup>△△</sup>	1.409 ± 0.028* <sup>△</sup>	1.244 ± 0.024*
3th cycle	1.906 ± 0.056 <sup>△△</sup>	1.538 ± 0.025* <sup>△△</sup>	1.254 ± 0.019*
4th cycle	1.866 ± 0.031 <sup>△△</sup>	1.571 ± 0.028* <sup>△△</sup>	1.325 ± 0.036*
5th cycle	1.900 ± 0.014 <sup>△△</sup>	1.566 ± 0.059* <sup>△△</sup>	1.102 ± 0.023*
6th cycle	2.075 ± 0.115 <sup>△△</sup>	2.003 ± 0.072 <sup>△△</sup>	1.656 ± 0.078*

\* P < 0.01 vs normal control group; <sup>△</sup> P < 0.05, <sup>△△</sup> P < 0.01 vs acute hypoxia group.

表 2 不同低氧处理对低氧(1% O<sub>2</sub>) 条件下培养的 HepG2 细胞增殖活性的影响

Tab 2 Effects of acute hypoxia and hypoxic treating on proliferative ability of HepG2 cells cultured in 1% O<sub>2</sub> circumstances (A value.  $\bar{x} \pm s$ . n= 5)

Group	Normal control	Hypoxic treating	Acute hypoxia
1th cycle	1.461 ± 0.024 <sup>△</sup>	1.079 ± 0.055**	1.079 ± 0.055**
2th cycle	1.461 ± 0.063 <sup>△</sup>	1.253 ± 0.069**	1.266 ± 0.032**
3th cycle	1.768 ± 0.054 <sup>△</sup>	1.629 ± 0.047** <sup>△</sup>	1.397 ± 0.041**
4th cycle	1.347 ± 0.041 <sup>△</sup>	1.429 ± 0.018* <sup>△</sup>	1.237 ± 0.085**
5th cycle	1.503 ± 0.081 <sup>△</sup>	1.375 ± 0.085* <sup>△</sup>	0.979 ± 0.043**
6th cycle	1.339 ± 0.050 <sup>△</sup>	1.440 ± 0.030** <sup>△</sup>	1.200 ± 0.054**

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs normal control group; <sup>△</sup> P < 0.01 vs acute hypoxia group.

#### 4 不同低氧处理的 HepG2 细胞超微结构的变化

常氧对照组细胞表面突起较多; 细胞质内糖原、线粒体丰富; 线粒体内嵴结构清晰、基质多、形状规则; 细胞核大, 核仁清晰, 有的细胞含有双核仁。急性低氧组细胞的表面突起明显减少, 细胞内糖原和线粒体数量下降, 线粒体形状不规则、体积肿胀、基质减少、嵴结构模糊, 细胞内核仁不清晰, 整个细胞体积缩小, 个别细胞进入坏死状态。HepG2 细胞经过 6 周期低氧处理后再置 1% O<sub>2</sub> 低氧环境培养 48 h, 细胞表面的突起数量增多, 细胞大小接近常氧对照组细胞, 细胞内糖原和线粒体数量较多, 线粒体内嵴结构又变得清晰、基质较多, 细胞核较大, 细胞超显

微结构基本接近常氧对照组细胞 (图 1)。

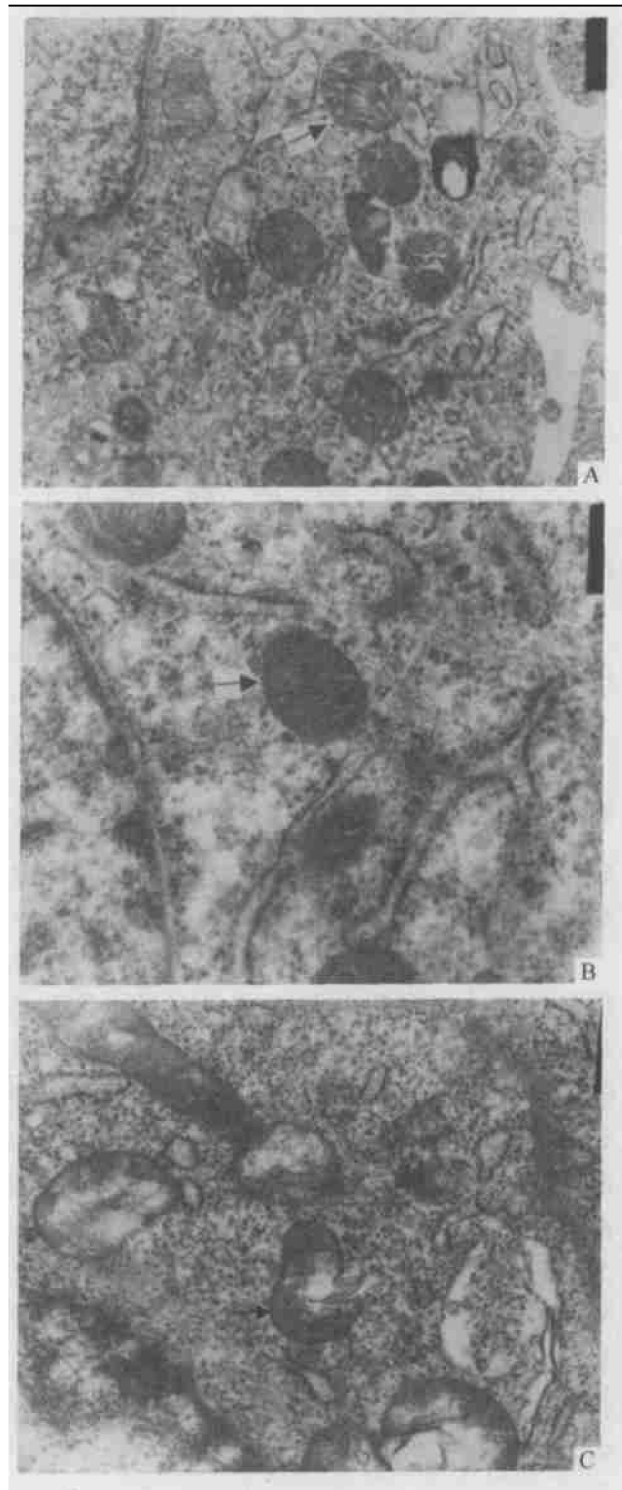


Fig 1 Effects of acute hypoxia and hypoxic treating on mitochondrial ultrastructure (↑) in HepG2. A: normal control group (× 17 000). Ultrastructure of mitochondria was normal and ridges in mitochondria were abundant; B: six-cycle hypoxic treating group (× 36 000). Ultrastructure of mitochondria was like normal control cells; C: acute hypoxia group (× 28 000). Mitochondria was swollen and ridges in mitochondria were rare.

图 1 不同低氧处理 HepG2 细胞内线粒体结构(↑)的变化

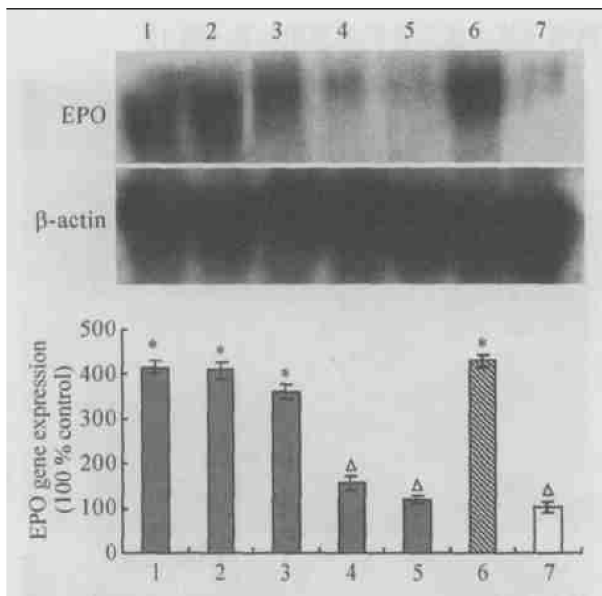


Fig 2 Effects of acute hypoxia and hypoxic treating on EPO gene expression in HepG2.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ .

1: 2th cycle; 2: 3th cycle; 3: 4th cycle; 4: 5th cycle; 5: hypoxic acclimatization; 6: acute hypoxia; 7: normal control. \*  $P < 0.05$  vs normal control group;  $^{\Delta} P < 0.05$  vs acute hypoxia group.

图 2 不同低氧处理的 HepG2 细胞内 EPO 基因表达的变化

### 5 不同低氧处理的 HepG2 细胞内 EPO 基因表达的变化

如图 2 显示,急性低氧处理 HepG2 细胞 48 h 后,细胞内 EPO 基因表达量是常氧对照组细胞的  $429.8\% \pm 13.9\%$ ,明显高于常氧对照组细胞 ( $P < 0.05$ ),而经低氧处理 2 3 4 5 周期的细胞再连续低氧 48 h 后,细胞内 EPO mRNA 的含量分别是常氧对照组细胞的 4.2 4.1 3.6 1.6 倍,随着低氧处理周期的延长,EPO 基因表达量逐渐下降,到低氧处理 6 周期后再低氧处理 48 h,HepG2 细胞内 EPO 基因的 mRNA 含量为常氧对照组细胞的  $118.8\% \pm 8.3\%$ ,与常氧对照组细胞的水平相近,差异不显著 ( $P > 0.05$ )。作为内参的  $\beta$ -actin 基因在不同处理的 HepG2 细胞内表达相似,相互间没有明显的差异。

## 讨 论

氧在生物体内起着十分重要的作用,低氧能够引起机体代谢紊乱,生长阻滞<sup>[4,5]</sup>。本研究发现,HepG2 细胞在 1% O<sub>2</sub> 低氧条件下连续培养 48 h 后,细胞增殖活性显著下降,这一变化的机制可能与细胞经过持续低氧处理后,细胞内无氧酵解活动增强,细胞内特别是线粒体内有机酸和醇类物质的浓度增多,细胞内膜结构破坏,细胞器包括线粒体功能丧

失,细胞代谢活动降低,能量释放减少,最终引起细胞增殖活性下降。电镜观察结果显示,HepG2 细胞急性低氧 48 h 后,线粒体结构明显受到损伤,而经过 6 周期的低氧处理后,细胞内线粒体结构与常氧对照组细胞相似,其机制可能与 HepG2 细胞经过 6 周期的低氧处理后,细胞体积增大,表面突起增多,氧通过细胞膜进入细胞内浓度增大的同时,细胞还可能通过一些其它机制从外界获得更多的氧,以满足细胞对氧的需要<sup>[6]</sup>;另外,细胞对氧的利用率也可能升高,减轻低氧对细胞特别是细胞内线粒体的损伤,维持细胞正常结构和生理功能<sup>[7]</sup>。这种变化可能是 HepG2 细胞经过 6 周期低氧处理后,细胞在常氧条件下的增殖能力接近常氧对照组细胞,在低氧条件下细胞的增殖能力也显著增强,细胞耐低氧能力增大的机制之一。

在哺乳动物体内,红细胞生成素(EPO)是调节血液内红细胞生成的重要细胞因子之一<sup>[8]</sup>。在低氧等条件下,机体血浆内 EPO 浓度显著升高,通过血液循环抵达造血系统,与红系祖细胞和原红细胞等细胞膜上的 EPO 受体特异性结合,促进细胞增殖和分化,形成功能成熟的红细胞;同时,EPO 还能促进红细胞释放进入血液,最终减轻低氧对机体的损伤。本研究发现,急性低氧 48 h 能够引起 HepG2 细胞内 EPO 基因表达增强。这显示,单个细胞的细胞膜上也可能存有氧的传感器,能够感受外界氧压的变化,外界氧压的变化通过氧传感器转变为第二信使后,改变细胞内低氧诱导因子-1(HIF-1)等转录因子的含量和活性,促进 EPO 基因表达;另一方面,该基因表达增强也可能是细胞在长时间低氧环境中的一种应激反应,减轻低氧对细胞损伤。作为结构基因  $\beta$ -actin 在不同处理的各组细胞内呈稳定性表达,这表明,长时间低氧处理虽然导致细胞结构损伤和增殖活性的降低,但细胞基因组结构和转录系统可能未受到严重破坏,细胞经过一段时间的低氧处理后,通过自身调控和修复,可能会达到低氧习服状态。本研究结果还表明,随着低氧处理周期的延长,HepG2 细胞内 EPO 基因的 mRNA 含量逐渐下降,到低氧处理第 6 周期,EPO 基因表达降低至常氧对照组的水平。这显示,细胞经过 6 个周期的低氧处理,细胞获氧能力和用氧效率可能增强,细胞膜上的氧感受器对外界低氧的敏感性降低,细胞内 HIF-1 等转录因子含量和活性降低,细胞结构、增殖活性和 EPO 的 mRNA 含量均接近常氧对照细胞水平,基本达到



了能够模拟机体低氧习服的细胞模型要求。因此 HepG2 细胞经过 6 周期的低氧处理后, 细胞基本达到低氧习服状态, 这为进一步研究急性低氧和低氧习服影响红系造血系统的变化机制提供基础。

[参 考 文 献]

- [ 1 ] Heinicke K, Prommer N, Cajigal J, et al. Long- term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man[ J]. Eur J Appl Physiol, 2003, 88(6): 535- 543.
- [ 2 ] 吕永达, 李开兴, 尹昭云 主编. 高原医学与生理学[ M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 1995. 310- 337.
- [ 3 ] 陈家佩, 从玉文, 马 平, 等. 吉林放射事故病人血浆造血活性观察[ J]. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17(1): 26- 29.
- [ 4 ] Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia- reperfusion injury [ J]. Circulation, 2003, 108(1): 79- 85.
- [ 5 ] Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF- 1 $\alpha$  in hypoxia- mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[ J]. Nature, 1998, 394(6692): 485- 490.
- [ 6 ] Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Induction of hypoxia- inducible factor- 1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter- 1 by hypoxia: Evidence against a regulatory role for Src kinase[ J]. Blood, 1997, 89(2): 503 - 509.
- [ 7 ] 蔡明春, 柳君泽, 吴利平, 等. 急、慢性低氧对大鼠脑线粒体蛋白翻译合成的影响[ J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(9): 1038- 1041.
- [ 8 ] Jelkmann W, Hellwig- Burgel T. Biology of erythropoietin [ J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 502(1): 169- 187.

---

## 《中华现代医院管理杂志》征稿

《中华现代医院管理杂志》是由中华临床医药学会主办的国际性医院管理专业期刊, 具有 ISSN/ CN 标准刊号, 被收入中华首席医学网等国内多种学术期刊网, 得到国内 1 000 多家权威医院及 2 000 多位管理专家的支持。

本刊积极倡导职业化医院管理理念, 探讨有中国特色的医院发展之路。为医院院长、医院职业管理人员及从事医院管理的教学者提供一个学习、交流和展示成果的平台。栏目设有: 医院管理论坛、经营管理、人力资源管理、信息管理、质量管理、医疗设备管理、护理管理、病案管理、医技科室管理、药事管理、门诊管理、医院文化、后勤管理、专题研究、医事法规、医疗事故与纠纷管理、危机管理、服务管理、国外医院管理、文献综述、学术讲座、医院介绍等。

关于本刊的详细介绍请登录[www.shouxi.net](http://www.shouxi.net) 免费查询。

投稿邮箱: 北京 100035- 47 信箱 医院管理编辑部 收

邮 编: 100035

电 话: 010- 62250990, 62252523

E- mail: hospital@ chinamed. cn

网 站: [www.shouxi.net](http://www.shouxi.net)

网络实名: 医学杂志、中华首席医学网