

## 斯钙素蛋白-1 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的相互作用对 肾癌细胞线粒体膜电势稳定的影响

杨清滔<sup>1</sup>, 谷江<sup>1</sup>, 张永春<sup>1</sup>, 朱致晖<sup>1</sup>, 杨永安<sup>1</sup>, 王楠<sup>1</sup>, 祝庆亮<sup>2</sup>

<sup>1</sup>贵阳医学院附属医院泌尿外科, 贵阳 550004

<sup>2</sup>江都人民医院泌尿外科, 江苏扬州 225200

通信作者: 谷江 电话: 0851-6773096, 电子邮件: gj0851@gmail.com

**摘要:** **目的** 研究斯钙素蛋白-1 (STC-1) 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 相互作用后的调钙功能对肾癌细胞线粒体膜电势稳定的影响。**方法** 构建高表达 HIF-1 $\alpha$  的肾癌细胞模型, 采用不同浓度 STC-1 蛋白分别干预荷基因肾癌细胞和单纯肾癌细胞, MTT 法检测细胞增殖, RT-PCR 和 ELISA 法检测细胞内 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 的基因及蛋白表达情况, 荧光探针检测细胞内 Ca<sup>2+</sup> 变化, 荧光分光光度计检测线粒体膜电位 ( $\Delta\psi_m$ ), 紫外分光光度计检测线粒体通透性转换孔 (mPTP)。**结果** HIF-1 $\alpha$  基因转染、STC-1 干预及基因转染后再 STC-1 干预 3 种方式均可提高  $\Delta\psi_m$ , 降低细胞内 Ca<sup>2+</sup> 和 mPTP 水平, 促进细胞增殖 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 以上结果可随着 STC-1 浓度的增加而逐渐增强, 但细胞增殖率的升高趋势却逐渐减缓。**结论** HIF-1 $\alpha$  可能通过促进 STC-1 表达, 下调 Ca<sup>2+</sup> 水平, 从而稳定线粒体膜电势来参与肾癌细胞的恶性增殖, 但此作用亦因外源性 STC-1 对 HIF-1 $\alpha$  的抑制而逐渐减弱。

**关键词:** 肾癌细胞; 斯钙素蛋白-1; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 线粒体

中图分类号: R445.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2014)01-0012-08

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2014.01.003

### Effects of Stanniocalcin-1 and Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ on Mitochondrial Membrane Potential Stability in Renal Carcinoma Cells

YANG Qing-tao<sup>1</sup>, GU Jiang<sup>1</sup>, ZHANG Yong-chun<sup>1</sup>, ZHU Zhi-hui<sup>1</sup>,  
YANG Yong-an<sup>1</sup>, WANG Nan<sup>1</sup>, ZHU Qing-liang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Urologic Surgery, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

<sup>2</sup>Department of Urologic Surgery, Jiangdu People's Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225200, China

Corresponding author: GU Jiang Tel: 0851-6773096, E-mail: gj0851@gmail.com

**ABSTRACT: Objective** To explore the effects of stanniocalcin-1 (STC-1) and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) on the calcium and thus on the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in renal carcinoma cells. **Methods** We successfully established the renal carcinoma cell models with high HIF-1 $\alpha$  gene expression. After various concentrations of STC-1 solutions were added to the culture medium, the proliferation of cells, expressions of HIF-1 $\alpha$  and STC-1, levels of Ca<sup>2+</sup>,  $\Delta\psi_m$ , and mPTP were detected by MTT, RT-PCR, ELISA, fluorescence spectrophotometry, and ultraviolet spectrophotometry, respectively. **Results** The prolifer-

ation of renal carcinoma cells and  $\Delta\psi_m$  were improved after HIF-1 $\alpha$  gene transfection, STC-1 protein intervention, and STC-1 protein intervention after gene transfection. While the intracellular  $Ca^{2+}$  level and mPTP were decreased significantly ( $P < 0.05$ ), all the changes were intensified with the gradual increase of STC-1. However, the increasing trend of cell proliferation gradually declined. **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  may participate in malignant proliferation of renal carcinoma cells by promoting STC-1 proliferation or down-regulating  $Ca^{2+}$ ; however, such an effect may be gradually attenuated due to the inhibitory effect of STC-1 on HIF-1 $\alpha$ .

**Key words:** renal carcinoma cells; stanniocalcin-1; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; mitochondria

*Acta Acad Med Sin*, 2014, 36(1): 12-19

肿瘤细胞侵袭性、异型性的生理特性可导致细胞内相对缺氧环境产生,同时,缺氧亦能下调呼吸链电子传递速度,促氧化磷酸化解偶联,最终影响线粒体供能<sup>[1]</sup>。线粒体膜电位 (mitochondrion membrane potential,  $\Delta\psi_m$ ) 与线粒体通透性转换孔 (mitochondrion permeability transition pore, mPTP) 不仅可衡量线粒体结构和功能的正常与否,亦与肿瘤发生发展相关<sup>[2]</sup>。研究显示,肿瘤细胞在缺氧刺激下可反应性促进缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的表达<sup>[3]</sup>,使其适应缺氧环境,而 HIF-1 $\alpha$  又是低氧诱导斯钙素蛋白-1 (stanniocalcin1, STC-1) 表达的关键调节因子<sup>[4]</sup>。STC-1 是一种高表达于肾小管上皮细胞,作用于细胞线粒体,调节细胞内  $Ca^{2+}$  平衡的糖蛋白,在多种实体瘤组织内高表达<sup>[5]</sup>。 $Ca^{2+}$  作为重要的第二信使,与线粒体离子平衡、阴离子蛋白交换、电荷转移等密切相关并影响 mPTP,调控  $\Delta\psi_m$ <sup>[6]</sup>。本研究采用外源性 STC-1 干预高表达 HIF-1 $\alpha$  的肾癌细胞模型,研究了 STC-1 与 HIF-1 $\alpha$  的相互作用,探讨了两者的调钙功能对线粒体膜电势稳定性的影响。

## 材料和方法

**质粒、细胞和菌株** pcDNA3.0-HIF-1 $\alpha$  质粒由本实验室构建,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌种为贵阳医学院干细胞实验室保存,人肾癌 GRC-1 细胞株由上海弗雷堡生物公司提供。

**主要试剂** MTT (美国 Sigma 公司), RPMI1640 (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司), STC-1 (以色列 Prospec 公司), G418 (北京 Solarbio 公司), 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR MasterMix (加拿大 Fermentas 公司), ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司), Fura-2/AM 钙离子探针 (碧云天生物技术研究所), 脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司)。

**细胞培养** GRC-1 细胞置于 25  $cm^2$  培养瓶中,用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养液于 5%  $CO_2$ 、37 $^\circ C$  下培养。

**HIF-1 $\alpha$  重组质粒的鉴定** 由本实验室构建重组质粒后,取 pcDNA3.0-HIF-1 $\alpha$  阳性克隆经 BamH I 和 Xba I 酶切后,琼脂糖凝胶电泳回收扩增片段,并由大连宝生物公司经 3730XL 型 DNA 自动测序仪检测基因序列。

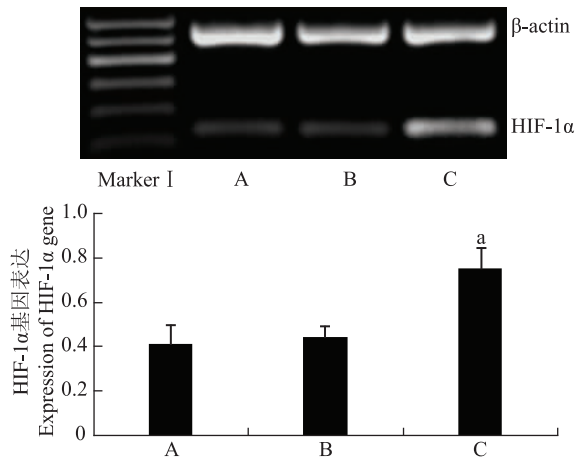
**HIF-1 $\alpha$  克隆细胞的筛选** 质粒序列鉴定吻合后,采用脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染试剂,按照说明书将 pcDNA3.0-HIF-1 $\alpha$ 、空载体分别转染 GRC-1 细胞株,37 $^\circ C$  培养 48 h,待细胞汇合度约 80%~90% 时弃培养基,加 800  $\mu g/ml$  G418 筛选培养基,每 4 d 更换 1 次筛选培养基,待单克隆细胞团形成后传代培养,分别命名为转染组 (pcDNA3.0-HIF-1 $\alpha$ -GRC-1)、空载体组 (pcDNA3.0-GRC-1),未转染细胞命名为正常组 (GRC-1)。

**细胞干预及分组** 正常组与转染组细胞分别使用 0、0.1、0.5、1.0 nmol/L 的 STC-1 浸染细胞培养基对细胞进行干预,分别命名为相应的对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。

**RT-PCR 检测 HIF-1 $\alpha$ 、STC-1 基因表达** 提取各组细胞总 RNA,取 1  $\mu g$  RNA 进行逆转录并合成 cDNA。引物序列: (1)  $\beta$ -actin: 正向: 5'-CCCTGGACTTCGAGCAAGAGAT-3', 反向: 5'-GTTTTCTGCGCAAGTTAGG-3', 片段长度 531 bp; (2) HIF-1 $\alpha$ : 正向: 5'-TCCAGCAGACTCAAATACAAGAAG-3', 反向: 5'-GTATGTGGTAGGAGATGGAGATG-3', 片段长度 130 bp; (3) STC-1: 正向: 5'-TGAGGTCTCCAGCTCCCAATC-3', 反向: 5'-GGCACAGTGGTCTGTCTGCAGGATG-3', 片段长度 142 bp。反应条件: 预变性 94 $^\circ C$  3 min; 变性 94 $^\circ C$  30 s, 退火 30 s, 退火温度均为 53 $^\circ C$ , 延伸 72 $^\circ C$  1 min, 35 个循环; 终止反应 72 $^\circ C$  5 min。以  $\beta$ -actin 作为内参照,PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳。所得条带经 Im-



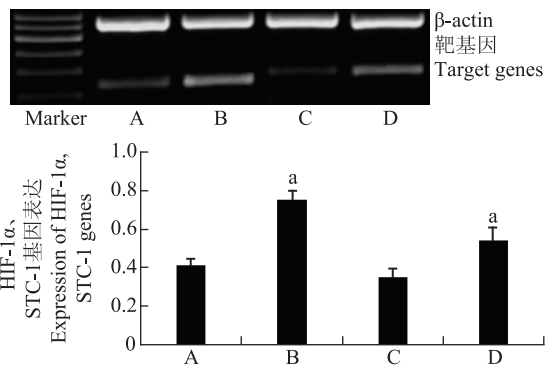
**STC-1 干预转染组和正常组细胞后 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 的基因及蛋白表达情况** 与对照组相比, HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 基因表达在转染组与正常组分别随 STC-1 蛋白给药浓度的增加而逐渐降低 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 各转染组均显著高于相同剂量正常组 ( $P$  均  $< 0.05$ ) (图 5、6)。HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 蛋白表达在转染组与正常组分别随 STC-1 蛋白给药浓度的增加而逐渐降低, 在中、高剂量组出现显著降低 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 各转染组均显著高于相同剂量正常组 ( $P < 0.05$ ) (图 7、8)。



A: 正常组; B: 空载体组; C: 转染组; 与正常组比较,  $^a P < 0.05$   
A: normal group; B: empty vector group; C: transferred group;  
 $^a P < 0.05$  compared with the normal group

图 2 各组细胞 HIF-1 $\alpha$  基因表达

Fig 2 Expression of HIF-1 $\alpha$  gene in each group



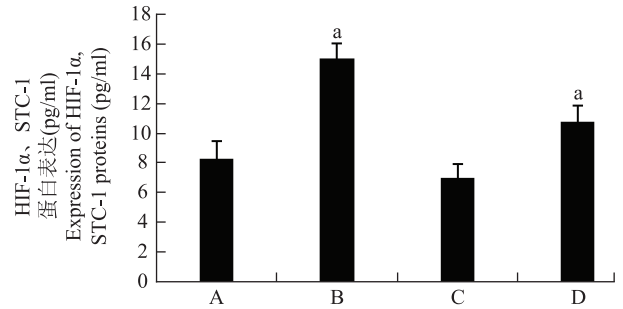
STC-1: 斯钙素蛋白-1  
STC-1: stanniocalcin-1

A: 正常组-HIF-1 $\alpha$ ; B: 转染组-HIF-1 $\alpha$ ; C: 正常组-STC-1; D: 转染组-STC-1; 与正常组比较,  $^a P < 0.05$

A: normal group-HIF-1 $\alpha$ ; B: transferred group-HIF-1 $\alpha$ ; C: normal group-STC-1; D: transferred group-STC-1;  $^a P < 0.05$  compared with the normal group

图 3 各组细胞 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 的基因表达

Fig 3 Expressions of HIF-1 $\alpha$  and STC-1 genes in each group

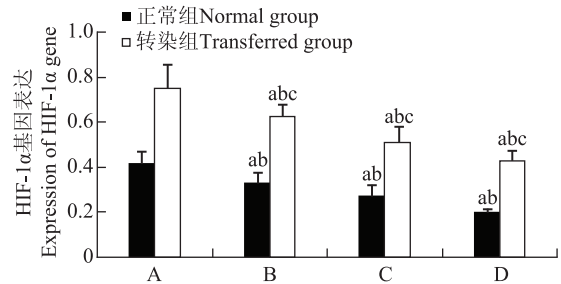
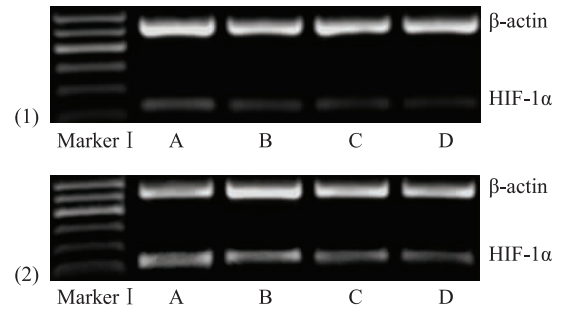


A: 正常组-HIF-1 $\alpha$ ; B: 转染组-HIF-1 $\alpha$ ; C: 正常组-STC-1; D: 转染组-STC-1; 与正常组比较,  $^a P < 0.05$

A: normal group-HIF-1 $\alpha$ ; B: transferred group-HIF-1 $\alpha$ ; C: normal group-STC-1; D: transferred group-STC-1;  $^a P < 0.05$  compared with the normal group

图 4 各组细胞 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 蛋白表达

Fig 4 Expressions of HIF-1 $\alpha$  and STC-1 proteins in each group



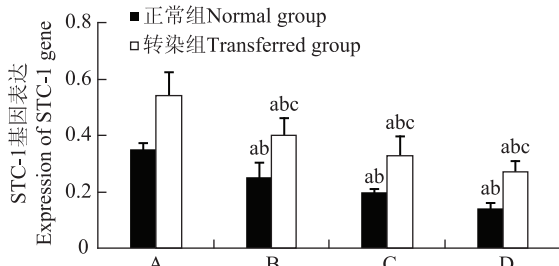
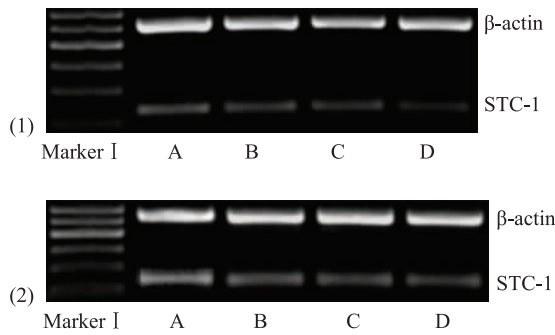
(1): 正常组电泳图; (2): 转染组电泳图; A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 组间比较,  $^b P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较,  $^c P < 0.05$

(1): normal group electrophoretogram; (2): transferred group electrophoretogram; A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group;  $^a P < 0.05$  compared with the control group;  $^b P < 0.05$  compared between groups;  $^c P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 5 各组细胞 HIF-1 $\alpha$  基因表达

Fig 5 Expression of HIF-1 $\alpha$  gene in each group

**STC-1 干预转染组和正常组 GRC-1 细胞 48h 后的 Ca<sup>2+</sup> 含量** 低、中、高剂量组细胞内 Ca<sup>2+</sup> 含量显著低于对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 且随着 STC-1 蛋白浓度增高而逐渐降低; 各转染组 Ca<sup>2+</sup> 含量显著低于相同剂量正常组 ( $P$  均  $< 0.05$ ) (图 9)。

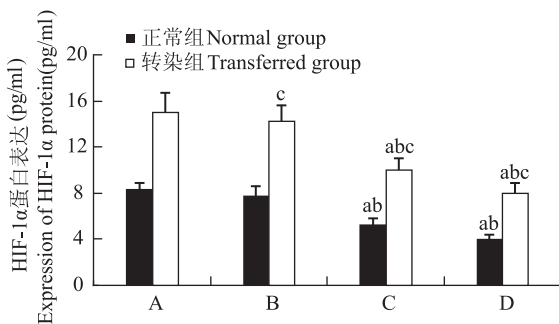


(1): 正常组电泳图; (2): 转染组电泳图; A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 组间比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

(1): normal group electrophoretogram; (2): transfected group electrophoretogram; A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with the control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared between groups; <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 6 各组细胞 STC-1 基因表达

Fig 6 Expression of STC-1 gene in each group



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 组间相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

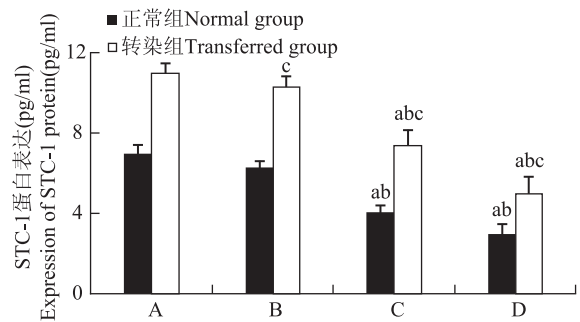
A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with the control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared between groups; <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 7 各组细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达

Fig 7 Expression of HIF-1 $\alpha$  protein in each group

**线粒体形态学鉴定** 詹纳斯绿 B 染色结果显示, 提取的线粒体呈现圆形、椭圆形和杆状的蓝绿色物质 (图 10)。

**STC-1 干预转染组和正常组 GRC-1 细胞后 mPTP 的变化情况** 与对照组相比, 随着 STC-1 给药浓度的逐渐增加吸光度逐渐升高, 在中、高剂量组差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 各转染组吸光度显著高于相同剂量正常组 ( $P$  均  $< 0.05$ ) (图 11)。

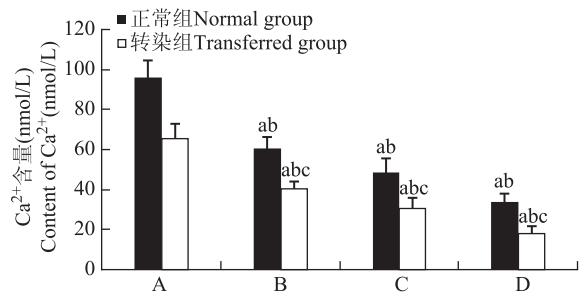


A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 组间比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with the control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared between groups; <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 8 各组细胞 STC-1 蛋白表达

Fig 8 Expression of STC-1 protein in each group



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 组间比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group; <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with the control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared between groups; <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 9 各组细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平

Fig 9 Level of Ca<sup>2+</sup> in each group



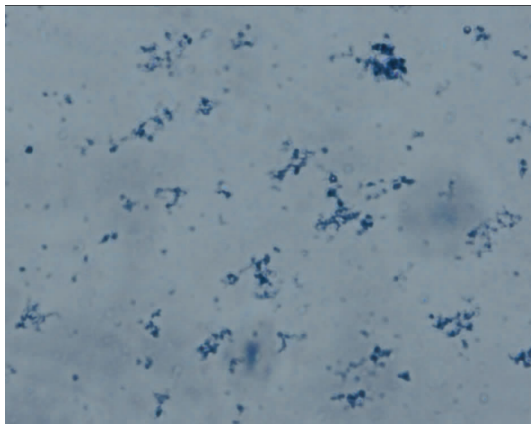
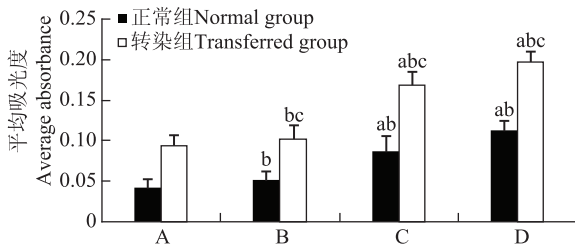


图 10 线粒体的詹纳斯绿 B 染色 ( $\times 400$ )  
Fig 10 Janus green B staining of isolated mitochondria ( $\times 400$ )



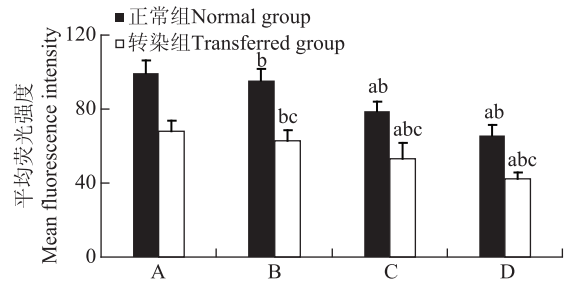
mPTP: 线粒体通透性转换孔  
mPTP: mitochondrion permeability transition pore  
A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 组间比较,  $^b P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较,  $^c P < 0.05$

A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group;  $^a P < 0.05$  compared with the control group;  $^b P < 0.05$  compared between groups;  $^c P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 11 各组细胞 mPTP 的变化  
Fig 11 Membrane permeability transition pore in each group

**STC-1 干预转染组和正常组 GRC-1 细胞后  $\Delta\psi_m$  的变化情况** 与对照组相比, 随着 STC-1 给药浓度的逐渐增加荧光强度逐渐降低, 在中、高剂量组差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 各转染组荧光强度显著低于相同剂量正常组 ( $P$  均  $< 0.05$ ) (图 12)。

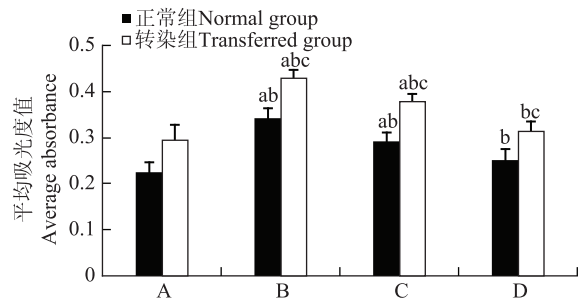
**STC-1 干预转染组和正常组 GRC-1 细胞后的细胞增殖情况** 与对照组相比, 低、中剂量组吸光度显著增高 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 但随着 STC-1 浓度增高而逐渐下降, 在高剂量组虽变化不明显, 但仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 各转染组吸光度显著高于相同剂量正常组 ( $P$  均  $< 0.05$ ) (图 13)。



$\Delta\psi_m$ : 线粒体膜电位  
 $\Delta\psi_m$ : mitochondrion membrane potential  
A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 组间比较,  $^b P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较,  $^c P < 0.05$

A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group;  $^a P < 0.05$  compared with the control group;  $^b P < 0.05$  compared between groups;  $^c P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 12 各组细胞  $\Delta\psi_m$  的变化  
Fig 12 Mitochondrion membrane potential in each group



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 组间比较,  $^b P < 0.05$ ; 与相同剂量正常组比较,  $^c P < 0.05$

A: control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group;  $^a P < 0.05$  compared with the control group;  $^b P < 0.05$  compared between groups;  $^c P < 0.05$  compared with the normal group of the same dosage

图 13 STC-1 对肾癌细胞增殖的影响  
Fig 13 Effect of STC-1 on the proliferation of renal carcinoma cells

## 讨 论

肿瘤细胞较正常组织细胞生长更为迅速, 为了满足其生长代谢, 对线粒体供能的需求也更为迫切<sup>[8]</sup>。作为“能量工厂”的线粒体产能的前提和基础主要取决于线粒体结构和功能的调控枢纽, 即 mPTP 与  $\Delta\psi_m$  的稳定与否<sup>[2]</sup>。mPTP 是位于线粒体内外膜之间的复合性孔道, 是线粒体内外信息交流的中心枢纽, 正常

情况下 mPTP 只允许相对分子质量小于 1500 的分子通过, 质子可自由通过线粒体膜, 形成稳定的  $\Delta\psi_m$ <sup>[9]</sup>。然而, 肿瘤由于细胞自身代谢高、相对缺氧环境等因素使其持续存在氧化应激, 导致钙超载, 进而诱发 mPTP 开放<sup>[6]</sup>, 但持续开放的 mPTP 又将导致  $\Delta\psi_m$  降低或丧失, 这可能是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 线粒体一旦发生崩溃, 则细胞凋亡不可逆转<sup>[10]</sup>。有研究表明, HIF-1 $\alpha$  与肿瘤发生发展密切相关, 可通过上调细胞内质网钙泵 SERCA2 蛋白表达及增强线粒体  $Ca^{2+}$  缓冲能力, 促进细胞内  $Ca^{2+}$  向内质网、线粒体转移<sup>[11]</sup>, 并下调细胞膜非典型 L 型钙通道表达, 引起  $Ca^{2+}$  内流减少, 从而避免钙超载<sup>[12]</sup>。加之 HIF-1 $\alpha$  是低氧诱导 STC-1 表达的关键调节因子<sup>[3]</sup>, 而 STC-1 具有调节  $Ca^{2+}$  平衡的作用, 且属于肾癌的高显基因<sup>[4]</sup>。本研究因此建立了 STC-1 蛋白干预高表达 HIF-1 $\alpha$  的肾癌细胞模型, 探讨了 STC-1 和 HIF-1 $\alpha$  是否通过影响  $Ca^{2+}$ 、STC-1、HIF-1 $\alpha$  等线粒体膜电势稳定相关指标, 参与肾癌细胞的恶性增殖机制。

本研究首先成功构建了过表达 HIF-1 $\alpha$  的 GRC-1 细胞系, 随后检测了转染组和正常组细胞内 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 的基因及蛋白表达, 结果发现转染组显著高于正常组, 说明 GRC-1 细胞高表达 HIF-1 $\alpha$  能够促进自身 STC-1 的表达, 这与 HIF-1 $\alpha$  是乏氧诱导 STC-1 表达的关键调节因子<sup>[3]</sup>这一观点相符。转染组和正常组细胞经不同浓度 STC-1 蛋白干预后, 低、中、高剂量组 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 基因及蛋白表达较之相应对照组逐渐降低, 推测这可能是 STC-1 蛋白下调肿瘤细胞内 HIF-1 $\alpha$  表达<sup>[13]</sup>, 进而减弱了 HIF-1 $\alpha$  刺激 STC-1 表达的作用, 亦可能是外源性 STC-1 直接作用于细胞后的负反馈调节所致。横向比较, 各转染组 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 基因及蛋白表达均显著高于相同剂量正常组, 原因可能是转染组细胞 HIF-1 $\alpha$  高表达刺激了 STC-1 表达, 该作用部分拮抗了 STC-1 蛋白下调肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达。从各实验组  $Ca^{2+}$  含量的检测结果可推测: STC-1 蛋白可降低细胞内  $Ca^{2+}$  含量, 且随着 STC-1 蛋白浓度的增加而逐渐降低; 横向比较,  $Ca^{2+}$  含量在各转染组显著低于相同剂量正常组, 这与转染组较正常组中 HIF-1 $\alpha$  和 STC-1 基因及蛋白的表达量上升相匹配。结合 mPTP 和  $\Delta\psi_m$  结果可以发现, 与对照组相比, 正常组和转染组细胞随 STC-1 蛋白给药浓度的增加, mPTP 开放度逐渐降低,  $\Delta\psi_m$  逐渐升高, 且在中、高剂量组出现显著差异; 各剂量组细胞内 mPTP 开放度逐渐降低、 $\Delta\psi_m$  逐渐升高与  $Ca^{2+}$  含量逐

渐降低相匹配。

此外本研究还发现, STC-1 能促进 GRC-1 细胞增殖, 而促增殖作用随着加入 STC-1 蛋白浓度的增加而降低, 推测其原因可能有以下两方面: (1) 正常组细胞随着 STC-1 蛋白给药浓度的增加, HIF-1 $\alpha$ 、 $Ca^{2+}$  水平逐渐下降, STC-1 对 GRC-1 细胞的促增殖作用可能是通过减少细胞内  $Ca^{2+}$  含量, 抑制 mPTP 开放, 提高  $\Delta\psi_m$ , 维持线粒体产能效应而实现; 但 HIF-1 $\alpha$  是使细胞抗乏氧的有利基因, STC-1 降低  $Ca^{2+}$  的同时也降低 HIF-1 $\alpha$ , 当 HIF-1 $\alpha$  的表达下降到一定程度时, STC-1 对细胞的增殖促进作用逐渐被 HIF-1 $\alpha$  表达下降所拮抗。(2) 转染组细胞内 HIF-1 $\alpha$  过表达, 但随着 STC-1 蛋白浓度的增加, HIF-1 $\alpha$ 、 $Ca^{2+}$  水平逐渐下降, 推测 GRC-1 细胞增殖活性增高的原因可能是 STC-1 及 HIF-1 $\alpha$  通过减少细胞内  $Ca^{2+}$  含量, 维持线粒体结构和功能的稳定而实现; 在低剂量组, STC-1 蛋白对 HIF-1 $\alpha$  表达的抑制作用小于高表达 HIF-1 $\alpha$  对细胞促增殖的作用, 但随着 STC-1 蛋白浓度的增加, 高表达 HIF-1 $\alpha$  对细胞促增殖的作用逐渐被 HIF-1 $\alpha$  表达下降所拮抗, 故 STC-1 对细胞促增殖的作用在低剂量组出现一过性增高, 在中、高剂量组逐渐降低。

综上, 本研究结果提示, 细胞增殖活性增高的程度可能主要取决于细胞内 STC-1、HIF-1 $\alpha$  基因和蛋白的表达程度及  $Ca^{2+}$  水平降低, 其减缓了 mPTP 的持续开放, 提高了  $\Delta\psi_m$ , 保障了线粒体结构和功能的完整, 维持了产能效应。但 HIF-1 $\alpha$ 、STC-1 对 mPTP、 $\Delta\psi_m$  的作用是通过调节细胞内  $Ca^{2+}$  间接实现还是通过其他细胞受体途径直接作用于线粒体, 尚需深入研究。此外, HIF-1 $\alpha$  诱导细胞内 STC-1 的表达与 STC-1 蛋白下调细胞内 HIF-1 $\alpha$  的表达之间是否存在剂量依赖关系, 也需要对 HIF-1 $\alpha$ 、STC-1 进行基因表达的定量研究。

## 参 考 文 献

- [1] 高文祥, 柳君泽, 吴利平, 等. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10):879-882.
- [2] Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, et al. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine [J]. Mitochondrion, 2012, 12(1):77-85.
- [3] 杨月霞, 黄文新. HIF-1 $\alpha$  在缺血缺氧性疾病中的研究进展 [J]. 山东医药, 2010, 50(20):111-114.
- [4] 郝卫刚, 张海蓉, 段丽平. 人类斯钙素与肿瘤相关性研

- 究进展 [J]. 重庆医学, 2011, 40(36):3725-3727.
- [5] 张延涛, 王静蓉, 李晓燕. 人类斯钙素生物学特性的相关研究 [J]. 医学综述, 2009, 15(19):2926-2928.
- [6] Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, et al. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787(11):1395-1401.
- [7] Sailaja R, Setty OH. Protective effect of *Phyllanthus fraternus* against allyl alcohol-induced oxidative stress in liver mitochondria [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105(1):201-209.
- [8] 罗湘建, 曹亚. 肿瘤能量代谢机制研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(7):585-592.
- [9] 孟文彤, 羊裔明, 邓承祺, 等. 丹参酮 II A 诱导 NB4 细胞凋亡与线粒体跨膜电位关系的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2002, 6(23):297-300.
- [10] 陈兰兰, 孟明, 万琪, 等. 辅酶 Q<sub>10</sub> 能有效抑制鱼藤酮诱导的细胞毒性作用 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2008, 28(5):646-649.
- [11] Neumann AK, Yang J, Biju MP, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47):17071-17076.
- [12] Callinan L, McCarthy TV, Maulet Y, et al. Atypical L-type channels are down-regulated in hypoxia [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(5):1137-1139.
- [13] Ellard JP, McCudden CR, Tanega C, et al. The respiratory effects of stannocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 264(1):90-101.

(收稿日期: 2013-08-23)