

·基础研究·

# 低氧对小鼠缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 、P53和血管内皮生长因子表达的影响\*

鲍永霞<sup>1,2</sup> 吕福祯<sup>1</sup> 马迎军<sup>1</sup>

**摘要 目的:**研究低氧时小鼠肺组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、P53及血管内皮生长因子(VEGF)表达的变化,探讨三者之间的关系,以及低氧与血管新生的关系。**方法:**实验用雄性昆明小鼠,分为低氧组与对照组,低氧仓浓度分别为10%、7%、5%。低氧时间分别为3天、6天、9天。用免疫组织化学技术检测小鼠在低氧条件下肺组织中的HIF-1 $\alpha$ 、P53和VEGF蛋白表达的变化及微血管密度(MVD)。**结果:**低氧组HIF-1 $\alpha$ 、P53和VEGF蛋白表达均增加,并且随低氧时间的延长及低氧浓度的降低而增强,而对照组HIF-1 $\alpha$ 无表达,P53和VEGF有少量表达( $P<0.05$ );低氧组的MVD也高于对照组;P53、VEGF表达与MVD均与HIF-1 $\alpha$ 表达呈正相关( $r$ 分别为0.609、0.730与0.691)。**结论:**HIF-1 $\alpha$ /VEGF通路在低氧致小鼠肺组织血管新生过程中起重要作用,P53基因的失活可能经HIF-1 $\alpha$ /VEGF通路促进血管新生。

**关键词** 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ;P53;血管内皮生长因子;血管生成;肺组织;小鼠

**中图分类号:**R493,R73,R459.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-05-0408-04

**Effect of hypoxia on the expression of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ,P53 and vascular endothelial growth factor in lung of mice/BAO Yongxia, LU Fuzhen, MA Yingjun//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(5): 408—411**

**Abstract Objective:**To investigate the expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ,p53 and VEGF in lung of mice during hypoxia and its relationship with angiogenesis.**Method:**The mice were divided into two group (hypoxia group and control group).The hypoxia group mice were placed in a hypoxia chamber with 10%,7%,or 5% O<sub>2</sub> respectively for 3,6,9 days. The immunohistochemical staining technique was used to examine HIF-1 $\alpha$ ,P53,VEGF and MVD.**Result:** HIF-1 $\alpha$ proteins did not express,and p53 and VEGF proteins expressed weakly in control group mice. Compared with the controls,the expression of HIF-1 $\alpha$ ,p53 and VEGF increased markedly. There was significant difference between the hypoxia group and the control group. The positive relationships were found between the expression of HIF-1 $\alpha$ , p53, VEGF and MVD. **Conclusion:**HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway may play an important role in angiogenesis of hypoxia in the lung of mice. Loss of p53 function may facilitate angiogenesis via HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway.

**Author's address** Dept. of Respiratory,the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University,Harbin,150086

**Key words** HIF-1 $\alpha$ ;P53;VEGF;angiogenesis;lung;mice

目前认为低氧是实质性肿瘤微环境的基本特征之一<sup>[1]</sup>,肿瘤缺氧微环境是导致肿瘤发生、恶性转化甚至转移的重要因素,一系列基因参与了低氧的调节。缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1,HIF-1)是目前发现的唯一的一个特异性低氧状态下发挥活性的转录因子,由HIF-1 $\alpha$ 和HIF-1 $\beta$ 组成,其中HIF-1 $\alpha$ 水平主要依赖于细胞间的氧供,决定了HIF-1的活性<sup>[2]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor,VEGF)是最关键的血管生长促进因子,其在低氧环境下的表达受HIF-1 $\alpha$ 的调控<sup>[3]</sup>。低氧是P53最强的生理性诱导剂,P53可促进MDM2(murine double minute 2)基因介导的HIF-1 $\alpha$ 降解,肿瘤细胞野生型P53缺失或突变使

HIF-1水平升高及HIF-1依赖的VEGF基因转录激活增加<sup>[4]</sup>。国内尚未见到低氧条件下HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、P53和微血管密度(microvessel density,MVD)关系的文献报道,我们采用免疫组织化学S-P法检测小鼠在低氧条件下肺组织中的HIF-1 $\alpha$ 、P53和VEGF蛋白表达的变化,并用CD34抗体标记MVD,旨在探讨HIF-1 $\alpha$ 、P53和VEGF三者之间的关系,以及低氧与血管新生的关系。

\* 基金项目:黑龙江省科技厅攻关课题(GC03C604-1)

1 哈尔滨医科大学附属第二医学院呼吸科,哈尔滨,150086

2 通讯作者:鲍永霞(哈尔滨医科大学附属第二医学院呼吸科,哈尔滨,150086)

作者简介:鲍永霞,女,博士在读,主治医师

收稿日期:2005-10-11

**1 材料与方**

**1.1 材料**

选用雄性昆明小鼠 84 只, 体重 15—25g, 哈尔滨医科大学附属二院动物室提供, 其中随机抽出 48 只, 随机分为 4 组: 10%低氧组 12 只、7%低氧组 12 只、5%低氧组 12 只和对照组 12 只; 另外 36 只小鼠随机分为 3 组: 10%低氧 3 天组 12 只、10%低氧 6 天组 12 只、10%低氧 9 天组 12 只。氮气与压缩空气购于黑龙江省医用氧气总公司; HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体、鼠抗鼠 VEGF、CD34 单克隆抗体, 兔抗鼠 P53 多克隆抗体均购于美国 Santa Cruze 公司; PowerVision<sup>TM</sup> 免疫组化检测试剂及 SP 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

用有机玻璃制成三个低氧仓, 体积均为 40cm $\times$ 40cm $\times$ 40cm, 有机玻璃厚 4mm, 三氯甲烷封其侧面, 石蜡封底面, 以便开仓换取食物、水及取鼠, 仓体上面开一直径为 1cm 的出气孔, 侧面开一直径为 1cm 的进气孔, 进气孔通过三通管分别接氮气和压缩空气, 用减压器(上海荣华仪表厂)调节气体压力, 用玻璃转子流量计(LZB3 型, 沈阳市正兴流量仪表有限公司)控制流量, 用 RSS-5100 型测氧仪(杭州高新电子有限公司)监测仓内氧浓度, 用 DSW-881C 型数字湿度仪(东北传感技术研究所)监测仓内湿度, 仓内温度控制在 22—28 $^{\circ}$ C, 湿度控制在 50%—60%。

**1.2 方法**

三个低氧仓保持仓内氧浓度分别为 10%(N<sub>2</sub> 及 O<sub>2</sub> 各为 110ml/min); 7%(N<sub>2</sub> 为 140ml/min, O<sub>2</sub> 为 70ml/min); 5%(N<sub>2</sub> 为 170ml/min, O<sub>2</sub> 为 55ml/min)。48 只小鼠随机分为 4 组: 10%低氧组 12 只、7%低氧组 12 只、5%低氧组 12 只和对照组 12 只, 每个仓内的 12 只小鼠均在第 4d 取出处死。另外, 3 个低氧仓保持仓内氧浓度均为 10%, 36 只小鼠随机分为 3 组: 10%低氧 3 天组 12 只、10%低氧 6 天组 12 只、10%低氧 9 天组 12 只, 分别第 4 天、第 7 天、第 10 天取出处死。仓内的小鼠取出后, 立即 10%乌拉坦(7ml/kg)麻醉, 取材。

免疫组织化学实验步骤按两步法试剂盒说明书进行。HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体的工作浓度 1:100, P53 多

克隆兔抗鼠 IgG 的工作浓度 1:200, VEGF 单克隆抗体的工作浓度 1:100。

**1.3 结果判定**

HIF-1 $\alpha$  表达的阳性判断标准按 Zhong 等<sup>[5]</sup>的报道:(-): 没有染色或<1%的细胞核染色;(+):1%—10%的细胞核染色, 或/和较弱的胞浆染色;(++):10%—50%的细胞核染色, 或/和明显的胞质染色;(+++):>50%的细胞核染色, 或/和较强的胞浆染色。对于 VEGF、P53, 根据阳性细胞所占比例及着色强度综合制定免疫组化半定量记分标准为: 阳性细胞计分: 0 分:<1%;1 分:1%—10%;2 分:11%—50%;3 分:51%—80%;4 分:>80%。着色强度记分:1 分:弱;2 分:中;3 分:强。两个分值相加为最终判定结果:(-):1 分;(+):2—3 分;(++):4—5 分;(+++):6—7 分。任何被 CD34 抗体染成棕黄色孤立的内皮细胞或内皮细胞簇团, 只要与邻近微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开, 就将其作为一个微血管; 只要结构不相连, 其分支结构也视为一血管。MVD 计数参照 Weidner<sup>[6]</sup>报道的方法, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**1.4 统计学分析**

对所得数据  $\chi^2$  检验、F 检验和 Spearman 等级相关检验等用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学分析,  $P < 0.05$  定为差异有显著性意义。

**2 结果**

**2.1 低氧浓度与 HIF-1 $\alpha$ 、P53、VEGF 的表达的关系**

HIF-1 $\alpha$ 、P53 阳性信号主要位于细胞核, 胞浆也有表达, VEGF 阳性信号主要位于细胞质, 血管内皮细胞也可见表达。低氧组 HIF-1 $\alpha$ 、P53 和 VEGF 蛋白表达均增加, 并且在 10%、7%、5%低氧浓度下随低氧浓度的降低而表达增强, 而对照组 HIF-1 $\alpha$  无表达, P53 和 VEGF 有少量表达( $P < 0.05$ )。见表 1 和图 1—4(见后置彩色插页 1)。

**2.2 低氧时间与 HIF-1 $\alpha$ 、P53、VEGF 的表达的关系**

如表 2 所示, 在 10%低氧浓度下, HIF-1 $\alpha$ 、P53、VEGF 在低氧 3 天、6 天、9 天时的表达呈现递增趋势, 随低氧时间的延长而表达增强, 且 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的  $P < 0.05$ , 差异有显著性意义。

表 1 不同氧浓度 HIF-1 $\alpha$ 、P53、VEGF 的表达

(例)

组别	例数	HIF-1 $\alpha$					P53					VEGF				
		-	+	++	+++	阳性率(%)	-	+	++	+++	阳性率(%)	-	+	++	+++	阳性率(%)
空白对照组	12	12	0	0	0	0.00	11	0	1	0	8.33	11	1	0	0	8.33
10%氧浓度组	12	4	5	1	2	66.67	3	4	4	1	75.00	2	3	4	3	83.33
7%氧浓度组	12	3	5	2	2	75.00	3	2	5	2	75.00	2	1	5	4	83.33
5%氧浓度组	12	2	3	5	2	83.33	2	2	4	4	83.33	3	1	4	4	75.00
<i>r</i>						-0.57025					-0.53280					-0.48615
<i>P</i>						<0.0001					<0.0001					0.0005

表2 不同低氧时间 HIF-1 $\alpha$ 、P53、VEGF 的表达

组别	例数	HIF-1 $\alpha$					P53					VEGF				
		-	+	++	+++	阳性率 (%)	-	+	++	+++	阳性率 (%)	-	+	++	+++	阳性率 (%)
10%低氧 3 天组	12	4	5	1	2	66.67	3	4	4	1	75.00	2	3	4	3	83.33
10%低氧 6 天组	12	3	5	2	2	75.00	3	5	2	2	75.00	2	1	5	4	83.33
10%低氧 9 天组	12	2	1	4	5	83.33	2	4	3	3	83.33	1	0	3	8	91.67
<i>r</i>		0.33216					0.12446					0.36158				
<i>P</i>		<0.01					<0.01					<0.01				

### 2.3 低氧与 MVD 的关系

MVD, 对照组为  $11.95 \pm 3.90$ , 10% 低氧组为  $18.02 \pm 3.71$ , 7% 低氧组为  $23.67 \pm 3.22$ , 5% 低氧组为  $30.85 \pm 7.63$ , 低氧组的 MVD 高于对照组, 并且随着氧浓度的降低 MVD 的值升高, 各组间比较差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 HIF-1 $\alpha$ 与 P53、VEGF、MVD 的关系

Spearman 等级相关分析结果显示, 10% 低氧浓度下小鼠肺组织中的 HIF-1 $\alpha$  的表达与 P53、VEGF 表达之间呈显著正相关 (分别为  $r = 0.609$ ,  $P < 0.05$  和  $r = 0.730$ ,  $P < 0.01$ ); HIF-1 $\alpha$  表达与 MVD 之间也呈正相关 ( $r = 0.691$ ,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

低氧是实体肿瘤组织内部普遍存在的现象。目前, 针对低氧的靶向治疗已成为肿瘤治疗和康复研究的一个新方向。低氧状态诱导一系列特异性的与血管新生、能量代谢、肿瘤转移等密切相关的基因, 帮助自身调节和适应低氧微环境, 在此过程中起关键作用的是 HIF-1。HIF-1 最先由 Semenza 于 1992 年在研究低氧诱导的基因表达时发现, 它是低氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的转录因子, 调控着下游众多基因, 如 VEGF、胰岛素样生长因子 (IGF-II)、内皮素-1 (ET-1)、促红细胞生成素 (E-PO) 等的转录和表达, 是低氧诱导基因转录信息传递的最主要途径<sup>[7]</sup>。HIF-1 是一种异源二聚体转录因子, 它由两个亚单位组成: HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$ 。其中 HIF-1 $\alpha$  是唯一的氧调节亚单位, 决定 HIF-1 的活性。本研究采用免疫组织化学 S-P 法检测小鼠在低氧条件下肺组织中的 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的变化, 结果表明对照组 HIF-1 $\alpha$  无表达, 低氧时 HIF-1 $\alpha$  表达增加, 而且随着低氧浓度的降低及低氧时间的延长, HIF-1 $\alpha$  表达递增, 差异具有显著性意义。关于低氧激活 HIF-1 $\alpha$  的分子机制意见不一, 大多数学者的观点是: 常氧条件下, 肿瘤抑制蛋白 (von Hippel-Lindau, VHL) 结合于 HIF-1 $\alpha$  氧依赖的结构域 ODD, 通过泛素和蛋白酶途径降解, 因此常氧条件下

HIF-1 $\alpha$  极不稳定, 很难检测到 HIF-1 $\alpha$  表达。然而上述降解途径在缺氧环境被阻断, HIF-1 $\alpha$  蛋白稳定表达, 继而引发肿瘤细胞对缺氧微环境的一系列生物效应。

VEGF 是内皮细胞特异性有丝分裂剂, 是肿瘤诱导产生新生血管的最主要的细胞因子之一。VEGF 基因表达受多种细胞因子、癌基因、抑癌基因产物及缺氧等因素的调控<sup>[8]</sup>。Liu 等<sup>[9-10]</sup>的研究最早表明缺氧导致肿瘤高表达 VEGF 主要是通过缺氧诱导因子 HIF-1 实现的。VEGF 是缺氧环境中接受缺氧诱导因子 HIF-1 调控的主要靶分子<sup>[11]</sup>。在 VEGF 5' 端增强子内存在 HIF-1 $\alpha$  结合位点 HRE, 低氧条件下, 一方面, HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 5' 端增强子结合后使 VEGF 的转录和表达增强, 诱导 VEGF 对缺氧的反应, 增加血管生成, 使血液到达缺氧部位。另一方面, HIF-1 还可增加缺氧情况下 VEGF mRNA 的稳定性<sup>[12]</sup>。早期研究发现, VEGF 具有增加血管通透性的作用。故 VEGF 又称血管通透因子。现已认识到 VEGF 为特异的血管内皮细胞刺激因子, 能够促进内皮细胞的增殖、分裂, 促进新的血管生成。VEGF 在促进血管内皮细胞增殖和增加血管通透性方面的作用恰是肿瘤血管新生所必须的<sup>[13-14]</sup>。可以认为, VEGF 在诸多促进肿瘤血管生成的因素中, 起着最基础、最关键的作用<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 低氧条件下 VEGF 蛋白表达增加, 并且随低氧时间的延长及低氧浓度的降低而增强, 低氧组的 MVD 也高于对照组。更重要的是, HIF-1 $\alpha$  表达与 VEGF 表达、MVD 均呈正相关。结论表明, HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路在低氧致小鼠肺组织血管新生过程中起重要作用。

缺氧是 P53 最强的生理性诱导剂<sup>[16]</sup>, 国外有学者认为, 低氧环境下产生两种形式的 P53: 野生型 P53 和突变型 P53, 分别在细胞凋亡和血管生长过程中发挥重要作用。在相同的低氧环境下, 体外培养细胞与整体动物细胞相比, 突变型 P53 能够更迅速地占据主导作用, 促进组织血管的生长<sup>[17]</sup>。本实验对肺细胞内 P53 蛋白的研究表明, P53 在正常时有少量表达, 随氧浓度的降低和低氧时间的延长, 该蛋白



表达逐渐增多。

有关实验证实, 低氧诱导产生两种形式的 HIF-1 $\alpha$ : 磷酸化 HIF-1 $\alpha$  和去磷酸化 HIF-1 $\alpha$ , 前者倾向于与 HIF-1 $\beta$  结合, 促进 HIF-1 复合体的转录活性<sup>[18]</sup>; 而去磷酸化的 HIF-1 $\alpha$  通过与野生型 P53 结合可介导缺氧情况下 P53 依赖的凋亡<sup>[19]</sup>。P53 也参加了 HIF-1 $\alpha$  的调节, Ravi 等<sup>[20]</sup>发现, 低氧环境下 P53+/+ 细胞中, 利用基因突变技术使 MDM2 介导的泛素-蛋白酶连接酶活性丧失而仍保持与 P53 结合的功能, 可导致 HIF-1 $\alpha$  蛋白水平升高。提示 P53 与 HIF-1 $\alpha$  结合并引导 HIF-1 $\alpha$  受 MDM2 介导的蛋白酶解系统所降解, 野生型 P53 缺失使 HIF-1 水平提高及 HIF-1 依赖的 VEGF 基因转录激活增加。在 P53 缺失或突变的肿瘤细胞内, HIF-1 $\alpha$  明显积聚。因此, P53 功能失活不仅可以防止肿瘤细胞遭受低氧诱导的凋亡, 并且由于其升高了 HIF-1 $\alpha$ , 从而促进了新生血管生成及糖酵解过程。这在本研究结果中也证实了: P53, VEGF 表达与 MVD 均与 HIF-1 $\alpha$  表达呈正相关 ( $r$  分别为 0.609、0.730 和 0.691)。因此可以推断 P53 基因的失活可能经 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路促进血管新生。

缺氧是肿瘤细胞发生、发展、恶性转化甚至转移的始动因素。本研究观察了低氧时小鼠肺组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ , P53、VEGF 表达及 MVD 的变化, 结果表明 HIF-1 $\alpha$  与 P53、VEGF、MVD 之间均存在一定的关系。这就将肿瘤发展中对缺氧的适应和血管生成过程联系起来。总之, 随着对缺氧研究的深入, 相信以缺氧及 HIF-1 $\alpha$  为靶点的生物治疗必将成为肿瘤治疗和康复研究的又一重要手段。

## 参考文献

- [1] Haris AL. Hypoxia: a key regulatory factor in tumor growth[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 382-47.
- [2] Sutherland RM. Tumor hypoxia and gene expression[J]. Acta Oncol, 1998, 37(3): 567.
- [3] Semenza GL, Agani F, Booth G, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1 [J]. Kidney Int, 1997, 5(4): 553.
- [4] Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53 induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. Genes Dev, 2000, 14(1): 34-44.
- [5] Zhong H, De Marzo AM, Lim M, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 in common human cancers and their metastases[J]. Cancer Res, 1999, 55(24): 5830.
- [6] Weidner N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9-19.
- [7] Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia[J]. J Biol Chem, 1993, 268(29): 21513-21518.
- [8] Neufeld J, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(1): 9-22.
- [9] Liu Y, Cox SR, Morita T, et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5' enhancer[J]. Circ Res, 1995, 77(3): 638-643.
- [10] 朱丛中, 王新允, 郑海燕, 等. EphB4、HIF-1 $\alpha$  在肺癌组织中的表达及其意义[J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(2): 99-102.
- [11] 李启芳, 戴爱国. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  调控血管内皮生长因子对大鼠缺氧性肺动脉高压的作用 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(3): 174-178.
- [12] Lin LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(4): 908-914.
- [13] 刘元标. 血管内皮生长因子与血管新生[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(5): 396-400.
- [14] 张广宇, 赵敏, 徐明党, 等. 血管内皮生长因子及其受体与肺癌血管新生的关系[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(2): 89-93.
- [15] 杨东霞, 项锋钢. 肺癌患者血管内皮生长因子表达与缺氧及肿瘤生物学行为和预后的关系 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(10): 115-117.
- [16] 徐广润, 张东君, 张旻, 等. PC12 细胞缺氧培养后 DNA 损伤和修复相关基因表达的研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(3): 169-171.
- [17] Gammack D, Byrne H, Lewis CE. Estimating the selective advantage of mutant p53 tumour cells to repeated rounds of hypoxia[J]. Bull Math Biol, 2001, 63(1): 135-166.
- [18] Richard D, Berra E, Gothie E, et al. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1[J]. Biol Chem, 1999, 274(46): 32631-32637.
- [19] Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T, et al. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia[J]. Oncogene, 2001, 20(41): 5779-5788.
- [20] Ravi R, Mookerjee B. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha [J]. Genes Dev, 2000, 14(1): 34-44.