



蝎毒多肽提取物对化疗期间再增殖 H22 肿瘤组织 HIF-1 α 和 SDF-1/CXCR4 表达的影响

王兆朋, 张维东*, 武利存, 贾青, 王朝霞, 张月英, 宁云娜

(山东省医学科学院 基础医学研究所 山东省现代医用药物与技术重点实验室, 山东 济南 250062)

[摘要] 目的:研究化疗期间再增殖中 H22 肿瘤组织 HIF-1 α 和 SDF-1/CXCR4 表达的变化及蝎毒多肽提取物 (polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 对其表达的影响,以探讨肿瘤组织再增殖期间新生血管生成发生的机制。方法:以免疫组织化学方法检测化疗期间不同时间点肿瘤组织 HIF-1 α , SDF-1 及 CXCR4 的表达,以 ELISA 方法检测肿瘤组织 SDF-1 的含量,以 Qwin V3 图像分析软件对肿瘤组织 HIF-1 α , SDF-1 及 CXCR4 表达进行分析,并进行相关性分析。结果:模型组肿瘤组织 HIF-1 α 表达在第 14 天和第 21 天无差异性,在第 28 天表达水平显著升高;PESV 低剂量组在 3 个时间点表达无差异性,而 PESV 高剂量组表达在第 21 天最低,在第 14 天最高,ELISA 检测结果显示,荷瘤对照组表达逐渐增多,尤其是在第 14~21 天,增加迅速。模型组, SDF-1 表达在 14~21 d 表达增加缓慢,但在 21~28 d 增加迅速;PESV 高、低剂量组 SDF-1 表达水平增加缓慢,尤其是高剂量组,3 个时间点肿瘤组织表达水平差异无显著性。免疫组织化学检测 SDF-1 结果和 ELISA 一致。对 HIF-1 α 和 SDF-1 灰度值分析结果显示, $r = 0.805$, 两者存在相关性。PESV 低、高剂量组肿瘤组织 CXCR4 下调,但 PESV 低、高剂量组之间无差异性。结论:在化疗期间肿瘤组织产生 HIF-1 α , HIF-1 α 诱导间质组织分泌 SDF-1, HIF-1 α 和 SDF-1 促进 VEGF 的表达上调,从而诱发肿瘤内新生血管的生成。PESV 有效抑制 HIF-1 α 和 SDF-1 的表达。

[关键词] 蝎毒多肽提取物;缺氧诱导因子-1 α ;基质衍生因子-1;CXCR4 趋化因子受体 4;再增殖;化疗

VEGF 是最有效的促血管生成分子,已经证实蝎毒多肽提取物 (polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 对肿瘤组织 VEGF 表达具有显著的抑制作用。前期实验已经证实,VEGF 表达与化疗期间肿瘤组织再增殖加速及微血管密度密切相关^[1],但是再增殖期间肿瘤组织 VEGF 分泌的具体调节机制没有明确。肿瘤组织化疗期间再增殖加速是临床上影响化疗治疗肿瘤治疗效果的重要因素之一,研究化疗期间肿瘤组织再增殖机制意义重大。本实验研究化疗期间再增殖肿瘤组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 和基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 及其受体 (CXCR4) 表达的变化,与 VEGF 的关系及 PESV 对三者表达的影响,以进一步确定 PESV 在化疗期间

肿瘤组织再增殖中抗血管生成的作用机制。

1 材料

1.1 瘤种和动物 H22 小鼠肝癌腹水瘤种,由山东省医学科学院药物所惠赠,腹水瘤种每 7 d 传代 1 次,第 2 代用于实验。动物采用 Balb/c 小鼠,体重 18~20 g,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2007-0001。

1.2 药品、仪器和试剂 PESV 提取见参考文献 [2]。5-Fu 购自天津金耀氨基酸有限公司 (批号 0612022)。HIF-1 α 和 SDF-1 一抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。CXCR4 一抗购自北京博奥森生物技术有限公司。小鼠 SDF-1 的 ELISA 试剂盒购自上海亿欣生物科技有限公司。德国 leicaDM4000B 光学显微镜。德国 leica 公司 Qwin V3 图像分析软件。

2 方法

2.1 模型的建立、分组及给药 无菌抽取第 7 天 H22 小鼠腹腔肿瘤细胞,加入生理盐水调整肿瘤细胞密度至 4×10^6 个/mL 后,于每只小鼠的右腋下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液 (第 0 天),第 6 天将成瘤之小鼠随机分为荷瘤对照组、模型组、PESV 高、低

[稿件编号] 20100704015

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30873408);山东省自然科学基金项目 (ZR2010HQ003);山东省科技攻关基金项目 (2008GG30002067)

[通信作者] *张维东,研究员,硕士生导师, Tel: (0531) 82919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com

[作者简介] 王兆朋,助理研究员,研究方向为中西医结合抗肿瘤转移, E-mail: charle92003@163.com

剂量组($40, 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 18 只。模型组: 5-Fu 腹腔注射, 注射剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 注射时间为第 7, 14, 21 天。PESV 组: PESV 灌胃给药和 5-Fu 腹腔注射, 灌胃时间第 11, 12, 13, 18, 19, 20, 25, 26, 27 天, 5-Fu 注射剂量和时间同模型组。荷瘤对照组: 只对荷瘤小鼠进行生理盐水腹腔注射, 共进行 28 d。

2.2 取材和体积测量 于第 14, 21, 28 天每组各随机处死小鼠 6 只。取肿瘤组织, 分别 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存和中性福尔马林固定。

2.3 免疫组织化学检测 HIF-1 α 和 SDF-1/CXCR4 表达 3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶活性, 热修复后, 分别加入一抗, 工作浓度为 1:100, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, DAB 显色, 显微镜下观察结果。结果判断: HIF-1 α 主要表达于肿瘤组织坏死区周围肿瘤细胞的胞核中, 判断标准参见文献[3]。CXCR4 主要表达于肿瘤细胞胞浆中, SDF-1 表达于肿瘤组织中肿瘤细胞和间质细胞的细胞膜及细胞浆中, 结果判断参见文献[4]。结果分析不同之处是以 Qwin V3 图像分析软件对免疫组织化学切片进行分析, 采用灰度值进

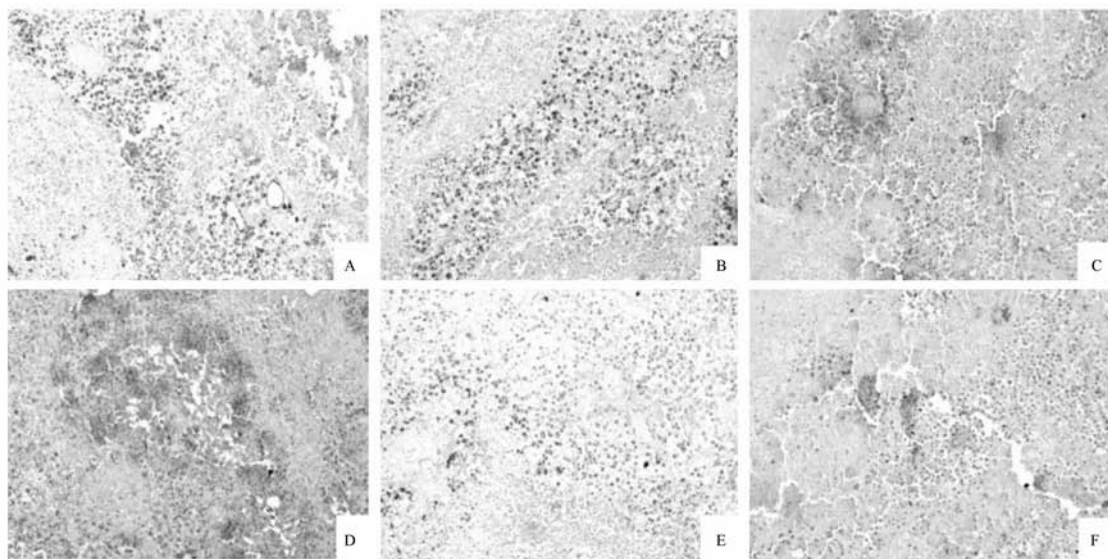
行半定量分析, 数值在 0~255。

2.4 ELISA 检测肿瘤组织 SDF-1 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 取出所有肿瘤组织, 制作匀浆, 取上清, 进行 ELISA 方法检测, 操作步骤严格按照说明书进行。

2.5 统计方法 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表达, 以 SPSS 11.5 软件统计处理, 多组资料的比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行检验, 关联分析采用 Pearson 相关分析。

3 结果

3.1 免疫组织化学方法检测 H22 肿瘤组织 HIF-1 α 表达 4 组在第 14 天表达差异无显著性。荷瘤对照组肿瘤组织在第 14, 21, 28 天表达逐渐增多, 模型组表达在第 14 天和第 21 天无差异性, 在第 28 天表达水平显著升高, PESV 低剂量组在 3 个时间点表达无差异性, 而 PESV 高剂量组表达在第 21 天最低, 在第 14 天最高。表明模型组肿瘤组织随着化疗进展, 处于缺氧的肿瘤细胞逐渐增多, 而 PESV 可以抑制坏死区域肿瘤细胞 HIF-1 α 的表达, 以高剂量组在第 21 天抑制作用最为显著 ($P < 0.01$), 见图 1。



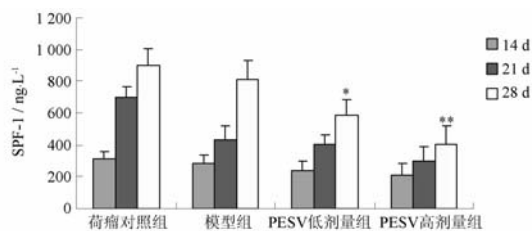
A, B, C. 模型组第 14, 21, 28 天; D. 荷瘤对照组第 28 天; E. PESV 低剂量组在第 28 天; F. PESV 高剂量组在第 21 天。

图 1 PESV 对化疗期间再增殖过程中 H22 肿瘤 HIF-1 α 表达的影响

3.2 免疫组织化学和 ELISA 法检测肿瘤 SDF-1

荷瘤对照组表达逐渐增多, 尤其是在第 14~21 天增加迅速; 模型组, SDF-1 表达在 14~21 d 表达增加缓慢, 但在 21~28 d 增加迅速; PESV 高、低剂量组 SDF-1 表达水平增加缓慢, 尤其是

高剂量组, 3 个时间点肿瘤组织表达水平差异无显著性, 见图 2。免疫组织化学检测结果和 ELISA 一致。对 HIF-1 α 和 SDF-1 灰度值分析结果显示, $r = 0.829$, 两者存在相关性。SDF-1 表达见图 3。



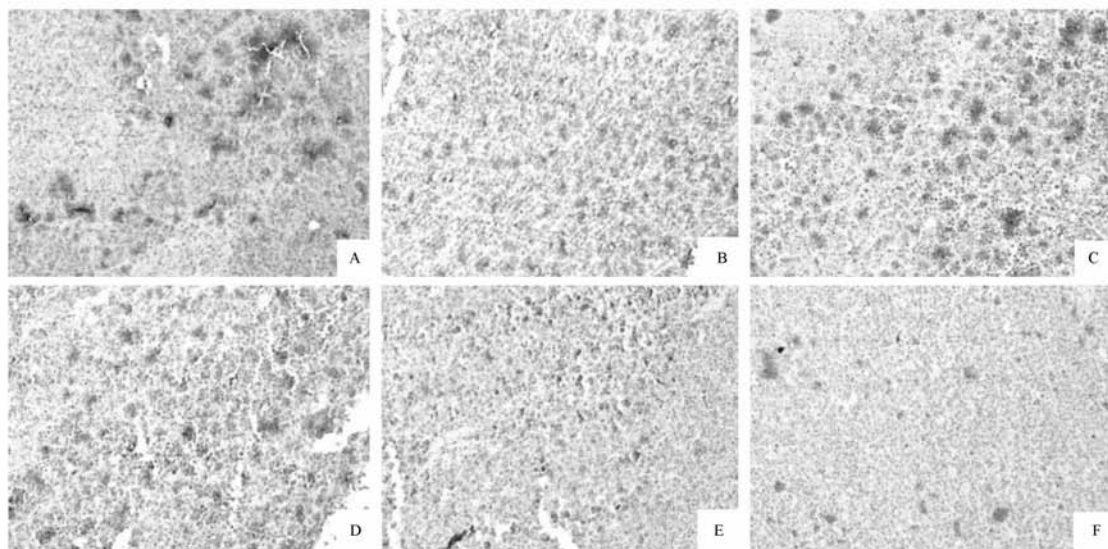
与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 PESV对化疗期间再增殖过程中H22肿瘤组织SDF-1含量的影响

3.3 H22 肿瘤组织免疫组织化学检测 CXCR4 表达
模型组在第14~21天表达无显著性差异,在第28天表达显著上调。PESV低、高剂量组肿瘤组织在同组的不同时间,其表达均无显著性差异,但是模型组和PESV低、高剂量组之间存在显著性差异,但PESV低、高剂量组之间差异无显著性差异,见图4。

4 讨论

化疗期间存在肿瘤细胞再增殖加速,是治疗肿瘤过程中肿瘤细胞产生耐药的重要原因之一。前期



A, B, C. 模型组第14, 21, 28天; D. 荷瘤对照组第28天; E, F. PESV低、高剂量组第28天(图4同)。

图3 PESV对化疗期间再增殖过程中H22肿瘤组织SDF-1表达的影响

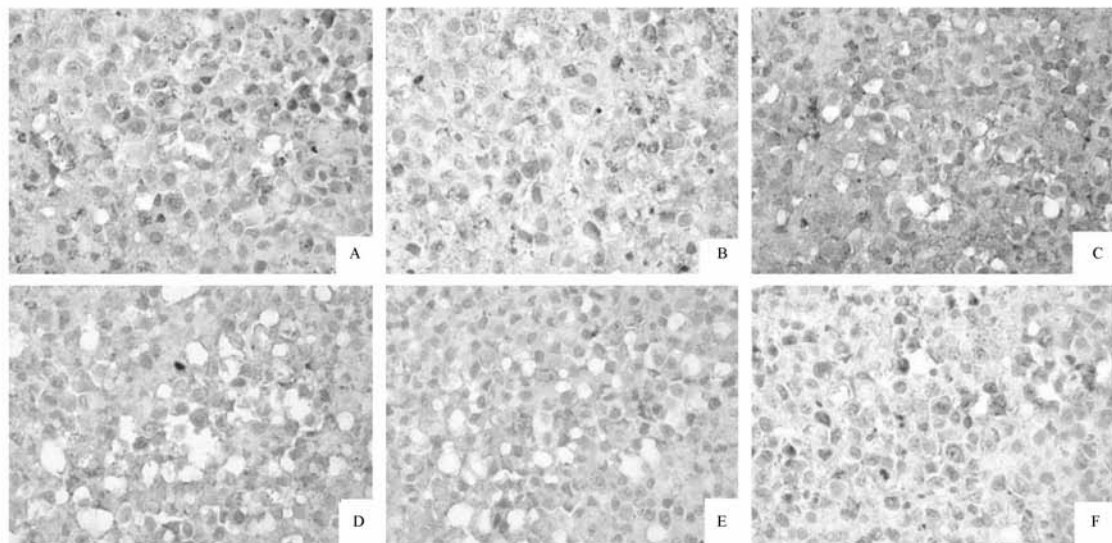


图4 PESV对化疗期间再增殖过程中H22肿瘤组织CXCR4表达的影响



实验已经证实,以2-Fu对H22皮下种植肿瘤进行化疗过程中,存在再增殖加速现象,且与肿瘤血管生成及肿瘤组织VEGF表达密切相关,但具体VEGF调控机制不详。肿瘤细胞在以肿瘤血管为中心的一定范围内生长,此范围以外的肿瘤细胞则因缺氧而变性坏死,化疗过程中大量肿瘤细胞变性坏死,造成缺氧环境,缺氧的环境可诱发肿瘤细胞表达促血管生成因子,诱发肿瘤血管生成,这其中最重要的因子是HIF-1 α 。HIF-1 α 在肿瘤血管生成中起着重要的作用,但是HIF-1的激活十分复杂。抑癌基因突变(如p53)可以HIF-1 α 激活。如缺乏肿瘤抑制蛋白VHL,可以过量表达HIF-1 α ^[5];但最重要的是细胞外微环境缺氧激活^[6]:当肿瘤组织体积超过2 mm³时,O₂渗透不能满足细胞代谢要求,引起HIF-1激活。HIF-1激活后,通过调控其他生长因子(如VEGF)的表达^[7],而直接参与血管生成的全过程。在血管生成启动阶段,如通过上调VEGF及其相应受体表达使血管通透性增加,在进展阶段,通过上调金属蛋白水解酶而降解细胞外基质等^[8]。本实验证明,在化疗期间再增殖过程中,HIF-1 α 在不同时间表达存在差异,与前期实验肿瘤组织VEGF表达变化一致,且发现PESV可有效的抑制化疗期间再增殖肿瘤组织表达HIF-1 α ,从而抑制血管生成,达到抑制再增殖目的。

肿瘤组织HIF-1 α 还可以促进间质组织SDF-1的表达^[9-10],SDF-1可诱导内皮细胞表达VEGF,VEGF又可促进血管内皮细胞SDF-1的表达^[11-12],SDF-1和VEGF在促进血管产生过程中有协同作用,SDF-1与VEGF之间就构成了一条旁分泌环路,二者间相互影响,对各自生物学功能起到加强作用。本实验发现,在化疗期间再增殖中,SDF-1在21~28d增加迅速,且发现PESV可抑制肿瘤SDF-1分泌的增加,尤其是PESV高剂量组。对本实验HIF-1 α 和SDF-1灰度值分析结果显示,两者密切相关,说明在化疗期间肿瘤组织产生HIF-1 α ,HIF-1 α 诱导肿瘤细胞分泌VEGF,同时诱导间质组织分泌SDF-1,SDF-1又促进了VEGF的表达上调,从而诱发肿瘤内新生血管的生成,为肿瘤组织在化疗期间发生再增殖加速提供了O₂和营养物质,且证明PESV可有效的抑制此血管生成的分子调控过程。

CXCR4是含有7个跨膜区的G蛋白偶联受体,SDF-1是其唯一配体。SDF-1与CXCR4广泛表达

于多种细胞和组织中,在多个生理病理过程中发挥重要作用。其中SDF-1/CXCR4生物轴在多种恶性肿瘤的生长、浸润及转移中起关键作用^[13]。Salvucci等^[14]研究发现,通过阻断SDF-1/CXCR4轴可以起到抑制VEGF依赖的血管形成作用。本实验发现,在化疗期间肿瘤组织再增殖过程中,CXCR4与SDF-1表达变化并不平行,CXCR4在模型组中仅在第28天表达明显上调,而在PESV低、高剂量组,表达差异不显著,表明在肿瘤组织再增殖过程中CXCR4未参与VEGF调节。结合再增殖过程HIF-1 α 和SDF-1表达变化,说明PESV主要是通过抑制HIF-1 α 和SDF-1表达,抑制肿瘤组织再增殖期间VEGF分泌及新生血管生成。

[参考文献]

- [1] 王兆朋,张维东,武利存,等. 蝎毒多肽提取物抑制肝癌H22细胞化疗期间再增殖实验研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(1):108.
- [2] 张维东,崔亚洲,姚成芳,等. 蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用的实验研究[J]. 中国药理学通报,2005,21(6):708.
- [3] 彭启宇,温儒民,薛松,等. HIF21 α 与CAIX在肾细胞癌中的表达及临床意义[J]. 徐州医学院学报,2008,28(4):229.
- [4] 高振军,赵严,吴恺,等. SDF-1/CXCR4在胰腺癌中的表达及与临床病理特征的关系[J]. 中国肿瘤,2009,18(3):243.
- [5] Sikora S,Godzik A. Combination of multiple alignment analysis and surface mapping paves a way for a detailed pathway reconstruction-the case of VHL (von hippel-lindau) protein and angiogenesis regulatory pathway[J]. Protein Sci,2004,13(5):786.
- [6] Hirota K. Hypoxia-inducible factor 1, a master transcription factor of cellular hypoxic gene expression[J]. J Anesth,2002,16:150.
- [7] Dominador J,Manalo A R,Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1[J]. Blood,2005,105(2):659.
- [8] Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression[J]. Oncologist,2004,9(Suppl 5):10.
- [9] David Z,Balaji K, Herman Y, et al. Stromal cell-derived factor-1A and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma; von hippel-lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor[J]. Cancer Res, 2005, 65(14):6178.
- [10] Daniel J C, Anita R K, Matthew J C, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1[J]. Nat Med,2004,10(7):858.
- [11] Harvey J R, Mellor P, Eldaly H, et al. Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids[J]. Clin Cancer Res,2007,13(5):1562.
- [12] Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, et al. Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant

- metastasis of human oral squamous cell carcinoma [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(7): 685.
- [13] Luker K E, Luker G D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer [J]. Cancer Lett, 2006, 238 :30.
- [14] Salvucci O, Lei Y, Villalba S, et al. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor 21 [J]. Blood, 2002, 99 (8) :2703.

Effect of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on expression of HIF-1 α and SDF-1/CXCR4 in repopulating H22 tumour tissue during chemotherapy treatment

WANG Zhaopeng, ZHANG Weidong*, WU Licun, JIA Qing, WANG Zhaoxia, ZHANG Yueying, NING Yunna
(Department of Pathology, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science,
Key Laboratory for Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Jinan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of HIF-1 α and SDF-1/CXCR4 in repopulating H22 tumor tissue and the mechanism of angiogenesis of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) during chemotherapy treatment. **Method:** The expression of HIF-1 α and SDF-1/CXCR4 in H22 tumor tissue was monitored by immunohistochemistry, and the expression level was determined by Qwin V3 image analyzing software. The correlation between HIF-1 α and SDF-1 was analyzed. SDF-1 content was detected by ELISA. **Result:** HIF-1 α expression was found no difference in model group between 14 d and 21 d, and up-regulated in 28 d. There was no change of HIF-1 α expression was observed in low-dose PESV group. In high-dose PESV group, the level of HIF-1 α expression was high in 14 d and low in 21 d. ELISA detecting showed SDF-1 content increased slowly from 14 d to 21 d, highly from 21 d to 28 d. But in high-dose PESV groups, the content increased slowly all the time. The immunohistochemistry method got the same result with ELISA. Correlation analysis showed $r=0.805$. CXCR4 expression down-regulated in two PESV treated groups, and no difference was found between these two groups. **Conclusion:** HIF-1 α and SDF-1 participated in VEGF expression and angiogenesis in tumor tissue during chemotherapy, while PESV could inhibit the expression of HIF-1 α and SDF-1.

[Key words] polypeptide extract from scorpion venom; HIF-1 α ; SDF-1; CXCR4; repopulation; chemotherapy

doi:10.4268/cjcm20111324

[责任编辑 张宁宁]