

HIF-1 对人肝癌 Hep G₂ 细胞生长的影响

刘址忠¹, 林菊生^{1*}, 蔡晓坤¹, 李孝生², 黄文英³

Effects of Hypoxia-inducible Factor-1alpha on Human Hepatic Cancer Cell Line HepG₂ in Vivo

LIU Zhi-zhong¹, LIN Ju-sheng^{1*}, CAI Xiao-kun¹, LI Xiao-sheng², HUANG Wen-ying³

1. Hepatic Diseases Department of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Wuhan 430022, China;

2. Department of Neural Surgery, Xiehe Hospital Affiliated Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; 3. The First People's Hospital of Chenzhou City (* Corresponding Author)

Abstract: Objective To study the effect of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1) on hepatic cancer cell line Hep G₂ growth in vivo and its mechanisms. **Methods** Hep G₂ cells (10⁶/mouse) were inoculated subcutaneously into 20 nude mice. The weights of subcutaneous tumor were detected. The resected specimens were made into paraffin-embedded sections. The expressions of HIF-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) proteins were analyzed by Western blot and Immunohistochemistry (ISH). **Results** The growth rates of HIF-1 treating hepatic cancer cells Hep G₂ were significantly increased. **Conclusion** The HIF-1 could promote hepatic cancer cell line Hep G₂ growth in vivo and its mechanism may be due to the fact that it can promote vascular growth.

Key words: Hypoxia-inducible factor-1alpha; Vascular endothelial growth factor; Hepatoma

摘要:目的 研究缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 对人肝癌细胞株 Hep G₂ 体内生长的影响, 并探讨其可能机制。方法 将 HIF-1 转入人肝癌细胞 Hep G₂ 中, 建立人肝癌裸鼠模型, 观察其生长。切除瘤灶、称瘤重。标本用免疫组化和 western-blot 检测 HIF-1 和血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白的表达。结果 Hep G₂ 细胞对 HIF-1 敏感, 细胞生长速度加快。结论 HIF-1 体内可促进肝癌 Hep G₂ 的生长, 其机制可能与其促血管生成有关。

关键词: 缺氧诱导因子-1; 血管内皮生长因子; 肝癌

中图分类号: R735.7; R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)06-0344-02

0 引言

新生血管的生成、糖酵解是肿瘤恶性程度的体现, 也是肿瘤发展、转移所必需的。缺氧激活的 HIF-1 通路在此过程中起着非常重要的作用。本研究建立了一个裸鼠的皮下肝癌模型, 采用外源性 HIF-1 裸基因注射, 以了解 HIF-1 对肿瘤生长转移的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒制备 真核表达质粒 pCR 3.1-FLAG-HIF-1 由美国哈佛大学的 Xiao Zhu 教授惠赠。质粒经 Nde 和 BamH 酶切鉴定。转化入 DH-5 由碱裂解法大量制备并溶解在 0.9% 的生理盐水中备用。

1.2 细胞培养 Hep G₂ 细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心, 用含 10% 小牛血清 (Gibco) 的 DMEM (Gibco) 培养基, 在 5% CO₂ 37 培养箱中培养。当细胞密度达到 70% ~ 80% 时, 胰蛋白酶消化收集计数。

1.3 肿瘤模型 取 20 只一月龄雄性 Balb/c 裸鼠 (同济医学院动物中心提供), 用 1 mL 注射器抽取约 1 × 10⁷ 个细胞共 100 μL 注入其右上肢腋窝皮下, 约一周左右即见圆形小皮丘。待肿瘤长至 2 ~ 3 mm (约 15 天左右) 时, 将裸鼠分为实验组和对照组, 实验组将 HIF-1 质粒均匀注入肿瘤实质内, 每次为 200 μg 共 50 μL, 三天后再重复注射。对照组注入 0.9% 的等体积生理盐水。每次注射前用游标卡尺测量肿瘤大小。待最大的肿瘤表面出现皮肤溃疡时处死并取出肿瘤, 标本分装后分别置入液氮冻存或福尔马林固定石蜡包埋。

1.4 免疫组化 取实验组、对照组和转移肿瘤石蜡包埋组织分别进行连续切片, 检测 HIF-1、VEGF 和 FLAG 的表达。采用 SABC 法 (北京中山公司)

收稿日期: 2004-05-13; 修回日期: 2004-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30330680)

作者单位: 1. 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科; 3. 湖南省郴州市第一人民医院 (华中科技大学同济医学院附属协和医院硕士) (* 通讯作者)

根据操作说明进行。切片常规 3% H₂O₂ 封闭,在柠檬酸缓冲液中进行微波抗原修复,沸腾 15 分钟。一抗工作浓度 mAb-HIF-1 为 1:500 (Novus 公司), mAb-VEGF 为 1:100 (购自北京中山公司), mAb-FLAG 为 1:800 (Sigma 公司)。一抗在不同的湿盒中 4℃ 孵育过夜,二抗在 37℃ 孵育 15 分钟。DAB 显色,苏木素复染,脱水透明封片。

1.5 Western Blot 提取蛋白时,都在冰上操作。提取细胞蛋白时先用冷的 PBS 洗 3 遍,然后在培养瓶内加入细胞裂解液,放置 20 分钟;肿瘤组织则在细胞裂解液存在下进行匀浆。4℃ 离心 12 000g ×3 分钟,取上清液作蛋白电泳。在 7.5% SDS-PAGE 中蛋白分离后,电转移至硝酸纤维素膜,在约 70kd 处将硝酸纤维素膜横断,分别分析 HIF-1 和 VEGF 蛋白。一抗稀释 HIF-1 为 1:1 000, VEGF 为 1:100,用 5% 脱脂奶粉-TBST 封闭,洗膜采用 TBST 10 分钟 ×3 次,二抗采用辣根过氧化物酶(北京中山公司)标记的单抗小鼠抗体 1:10 000 室温孵育 3 小时,按操作说明用化学发光法 ECL 显影 (Pierce 公司)。

1.6 统计学方法 免疫组化结果采用 HPIAS-100 彩色图像分析系统进行分析,表达强度用平均吸光度 ($\bar{x} \pm s$) 表示。在统计学处理方法上,两组间比较采用配对资料 *t* 检验,检验两组资料的相关性采用相关分析方法。P < 0.05 为有统计学显著差异。

2 结果

2.1 HIF-1 裸基因注射促进了肿瘤的生长 注射 Hep G₂ 细胞后,所有动物 (100%) 均于 7 天左右有肉眼可见的皮下小结节,约 15 天左右长成 2~3mm³ 大小的肿瘤。注入裸基因 HIF-1 后,实验组较对照组生长显著加快 (P < 0.05),图略;免疫组化显示实验组 HIF-1 和 VEGF 的表达明显强于对照组 (P < 0.05),见图 1~4。

2.2 HIF-1 裸基因注射可能导致肿瘤的转移 实验组一只裸鼠在两次质粒注射后在臀部皮下出现一肿瘤结节。HE 染色病理学证实与来源于 Hep G₂ 的原发肿瘤一致,为一转移灶,未见其他脏器的转移。用抗细菌鞭毛蛋白 FLAG 的单克隆抗体进行免疫组化显色,质粒注射的实验组可见 FLAG 的表达,有意思的是,未予任何处理的转移灶 FLAG 抗原也为阳性。

2.3 HIF-1 的表达与 VEGF 呈相关性 Western Blot 结果提示,蛋白电泳后比较分析 Hep G₂ 细胞在对照组、实验组和转移灶 HIF-1 和 VEGF 的表达发现,在正常氧分压时 Hep G₂ 细胞 HIF-1 和

VEGF 表达为阴性。在肿瘤组织中,对照组、实验组和转移灶表达依次增强 (P < 0.05),而且 HIF-1 与 VEGF 表达明显相关 (r = 0.912),见图 5。

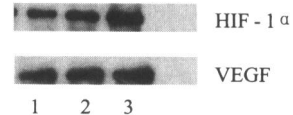


图 5 HIF-1 和 VEGF 的表达

3 讨论

HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成的异物二聚体,能和多种蛋白质结合而共同发挥作用^[1]。HIF-1 α 是一种缺氧依赖性的蛋白质,为胚胎发育所必需,其 mRNA 在细胞内普遍存在,而蛋白质则不稳定^[2]。在正常氧分压时抑癌基因 VHL 的产物 pVHL 直接引导 HIF-1 多聚泛素化从而被泛素依赖的蛋白水解酶水解。缺氧时 HIF-1 在细胞内很快稳定下来,激活参与维持细胞、组织、机体氧平衡的各种基因的转录,如糖酵解酶、EPO、VEGF 及其受体 Flt-1、血红素氧化酶 1、转铁蛋白等^[3,4]。

HIF-1 普遍表达在多种实体肿瘤中,如胃癌、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌等,并可能与肿瘤的发生、发展和转移相关^[5-7]。本研究中我们通过注射裸基因 HIF-1 来主动增加来源于 Hep G₂ 的肿瘤中的 HIF-1,发现 HIF-1 能促进肿瘤的生长,并伴 VEGF 的表达增强,与以往的研究结果一致^[8]。Hep G₂ 细胞中的 HIF-1 与 VEGF 蛋白用常规方法不能检测出,而在 Hep G₂ 形成的肿瘤结节中为阳性表达,说明 HIF-1 与 VEGF 的表达是肿瘤缺氧的结果,是对缺氧产生适应性保护的基础。增加 HIF-1 的表达能主动激活 HIF-1 通路,增加血供和能量代谢促进其生长。

肿瘤的转移是一多步骤、多基因参与的过程,机制仍不清楚。一般认为,肿瘤的转移具有其特定的分子基础,如 PDGF,MMIP 等。有人发现具有转移能力的前列腺癌细胞株 HIF-1 表达升高,以及 HIF-1 细胞靠近血管的边缘等,提示 HIF-1 可能参与了肿瘤的转移^[7]。但至今未能有确切的证据表明 HIF-1 与转移有关。我们以前的调查提示,在肝癌组织中 HIF-1 与 VEGF 仅受肝癌组织结构特点等情况的影响,与肝癌的血管浸润、肝内外转移无关。

Hep G₂ 是一株来源于肝母细胞瘤的细胞系,Hep G₂ 形成的肿瘤并不具有转移的特性。在本实验中肿瘤行裸基因注射两次后发现,一只裸鼠出现了一个来源于 Hep G₂ 细胞的转移灶,而且该转移肿瘤

(下转第 363 页)

胞内 bax 过表达能直接诱导卵巢癌细胞凋亡,且能加强化疗敏感性^[8],故本实验结果显示 bax 基因表达的增高可能是 TPT 诱导卵巢癌顺铂耐药细胞凋亡的分子机制之一。

半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(cysteinyI aspartate specific protease, Caspase)的级联活化是细胞凋亡程序的主要运行方式。其中,以反应链下游的 Caspase-3(CPP32)较为重要。本实验结果显示,在 TPT 作用后,卵巢癌顺铂耐药细胞中 Caspase-3 基因转录水平和 Caspase-3 活性的 17 KD 亚单位含量均明显增加,提示 Caspase-3 被激活,而活性测定实验亦显示 Caspase 活性随着药物浓度和暴露时间的增加呈逐步增加趋势,进一步说明 TPT 诱导卵巢癌顺铂耐药细胞 COC1/DDP 凋亡可能是通过激活特异性的 Caspase-3 依赖的信号途径。

参考文献:

[1] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.
 [2] Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death [J]. Blood, 1999, 93(3): 1075-1085.

[3] Bookman MA, Malmstrom H, Bolis G, et al. Topotecan for the treatment of advanced epithelial ovarian cancer: an open label phase study in patients treated after prior chemotherapy that contained cisplatin or carboplatin and paclitaxel [J]. J Clin Oncol, 1998, 16(10): 3345-3352.
 [4] McGuire Wp, Blessing JA, Bookman MA, et al. Topotecan has substantial antitumor activity as first-line salvage, therapy in platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(5): 1062-1067.
 [5] Yang QF, Sakurai T, Yoshimura G, et al. Expression of bcl-2 but not bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma [J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 61(3): 211-216.
 [6] Mese H, Sasaki A, Alcalde RE, et al. Regulation of apoptosis reduction in the cisplatin-resistant A431 cell line by bcl-2 and CPP32 [J]. Chemotherapy, 2000, 46(1): 69-76.
 [7] Thielmann HW, Popanda O, Staab HJ. Subnuclear distribution of DNA topoisomerase and bax protein in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts after irradiation with UV light and gamma rays or treatment with topotecan [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1999, 125(3-4): 193-208.
 [8] Xiang J, Gomez-Navarro J, Ararat W, et al. Proapoptotic treatment with an adenovirus encoding bax enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer [J]. J Gene Med, 2000, 2(2): 97-106.

[编辑:贺文;校对:杨卉]

(上接第 345 页)

含有异种鞭毛蛋白 FLAG,而 FLAG 只能来自于外来质粒的一个报告基因。由于例数太少、未见其他脏器转移而且在后来的重复试验中未见此现象,因此是偶然现象还是被转染了 HIF-1-FLAG 质粒的 Hep G₂ 获得了远处转移的能力还需作进一步的研究。

本研究还发现,伴随 HIF-1 的表达增强, VEGF 也明显增强。在我们原先的报告中,也发现 HIF-1 与 VEGF 表达密切相关,说明在肿瘤中 HIF-1 VEGF 是最经典的传导通路之一。

总之,在我们的研究中,肿瘤组织缺氧促进了细胞内 HIF-1 和 VEGF 的表达;主动增加肿瘤中的 HIF-1 促进了肿瘤的生长和可能转移, HIF-1 通路是细胞在缺氧条件下生存和维持生长的基础。

(本文图 1~4 见封 2)

参考文献:

[1] S Morwenna Wood, Jonathan M Gleadle, Christopher W Pugh. The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression [J]. The

Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(25): 15117-15123.
 [2] Ryan H, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization [J]. EMBO J, 1998, 17(11): 3005-3015.
 [3] Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation [J]. J Exp Biol, 2000, 203(8): 1253-1263.
 [4] Hao Zhu, H. Franklin Bunn. How do cells sense oxygen [J]. Science, 2001, 29(2): 449-451.
 [5] Hua Zhong, Kelly Chiles, David Feldser. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 expression by the epidermal growth prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics [J]. Cancer Res, 2000, 60(6): 1541-1545.
 [6] Blancher C, Moore JW, Talks KL, et al. Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF-1) and HIF-2 expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer lines [J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 7106-7113.
 [7] Hua Zhong, Angelo M, De Marxo, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 in common human cancers and their metastases [J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5830-5835.
 [8] Ryan HE, Poloni M, McNulty W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 is a positive factor in solid tumor growth [J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4010-4015.

[编辑校对:刘红武]

HIF-1 α 对人肝癌 HepG₂ 细胞生长的影响

(正文见 344 页)

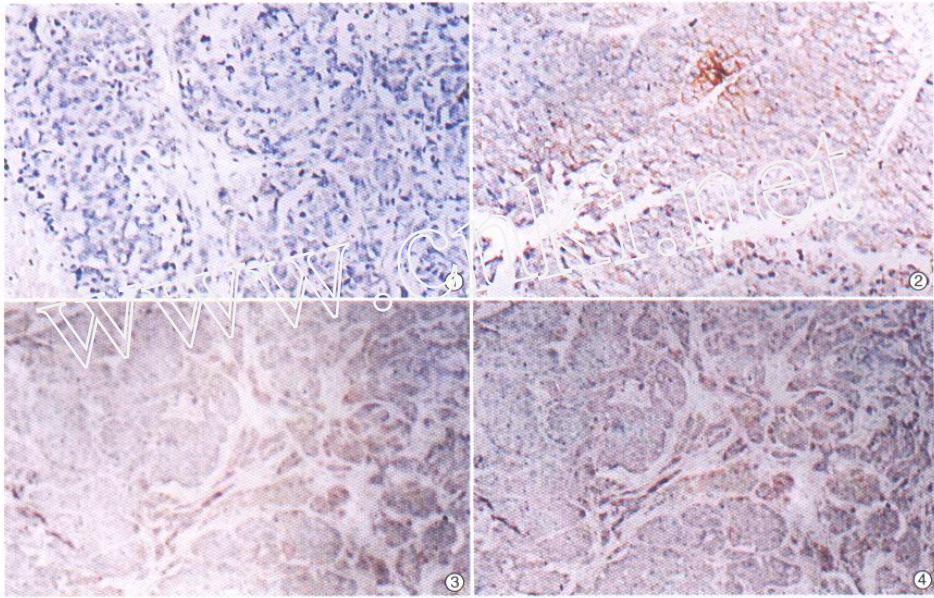


图 1 对照组 HIF-1 的表达

图 2 对照组 VEGF 的表达

图 3 实验组 HIF-1 的表达

图 4 实验组 VEGF 的表达

肾细胞癌 COX-2 及 MMP-2 的免疫组化研究

(正文见 354 页)

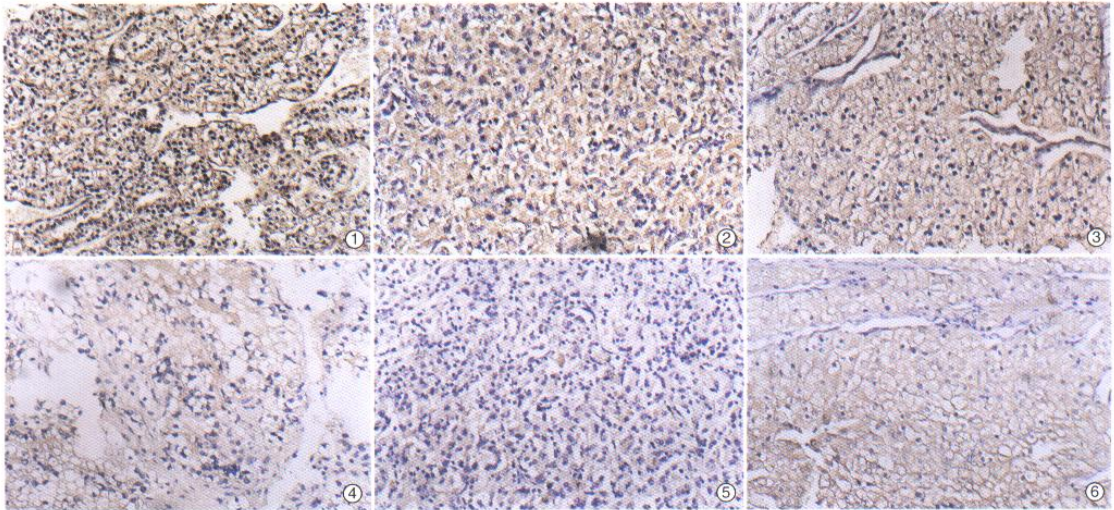


图 1 肾癌(透明型)中 COX-2 的阳性表达 (SP \times 200)

图 2 肾癌(颗粒型)中 COX-2 的阳性表达 (SP \times 200)

图 3 肾癌(混合型)中 COX-2 的阳性表达 (SP \times 200)

图 4 肾癌(透明型)中 MMP-2 的阳性表达 (SP \times 200)

图 5 肾癌(颗粒型)中 MMP-2 的阳性表达 (SP \times 200)

图 6 肾癌(混合型)中 MMP-2 的阳性表达 (SP \times 200)