

文章编号:1005-6947(2006)06-0423-05

· 基础研究 ·

反义缺氧诱导因子-1 α 对胰腺癌细胞 BxPC-3 化疗敏感性的影响

常青, 秦仁义, 高军, 冯延平, 黄涛

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 观察反义缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)对胰腺癌细胞 BxPC-3 化疗敏感性的影响。方法 实验分组:(1)缺氧条件下(0.5% O₂)体外培养4h,未转染反义 HIF-1 α 质粒的 BxPC-3 细胞设为缺氧对照组;(2)常氧条件下体外培养,未转染反义 HIF-1 α 质粒的 BxPC-3 细胞设为常氧对照组;(3)缺氧条件下(0.5% O₂)体外培养4h,稳定转染反义 HIF-1 α 质粒的 BxPC-3 细胞设为实验组。采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹(Western Blot)检测各组的 HIF-1 α 和 survivin 表达情况。流式细胞术和 MTT 比色法检测不同剂量的化疗药物(5-氟尿嘧啶、阿霉素、吉西他宾)对各组的凋亡率和生长抑制率的影响。结果 实验组 HIF-1 α 和 survivin 的表达明显降低($P < 0.05$),与对照组相比,实验组的凋亡率、抑制率与剂量成正比,高剂量引起高抑制($P < 0.05$)。结论 反义 HIF-1 α 可能通过阻断 survivin 的表达而增强胰腺癌对化疗的敏感性。据此可望通过阻断 HIF-1 α 的表达为胰腺癌基因治疗提供一种新途径。

关键词:胰腺肿瘤/药物疗法;反义缺氧诱导因子-1 α ;化疗敏感性;基因疗法

中图分类号:R735.9;R459.9 **文献标识码:**A

Effect of gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 α on chemosensitivity of human pancreatic cancer cell line BxPC-3

CHANG Qing, QIN Ren-yi, GAO Jun, FENG Yan-ping, HUANG Tao

(Department of Pancreatic-biliary Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of antisense hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) on chemosensitivity of human pancreatic cancer cell line BxPC-3 under hypoxia. **Methods** BxPC-3 cells were divided into 3 groups: (1) BxPC-3 cells were non-transfected with antisense HIF-1 α plasmid and exposed to 0.5% O₂ for 4hr (hypoxia control); (2) normoxic BxPC-3 cells were non-transfected with antisense HIF-1 α plasmid (normoxia control); (3) BxPC-3 cells were transfected with antisense HIF-1 α plasmid and exposed to 0.5% O₂ for 4hr (experimental group). Expression of HIF-1 α and survivin was detected by RT-PCR and Western Blot. Growth inhibition rates and apoptosis rates of BxPC-3 cells under different dosages of chemotherapeutic agents (5-fluorouracil, doxorubicin and gemcitabine) were measured by MTT colorimetric assay and flow cytometry (FCM). **Results** Expression of HIF-1 α was obviously down-regulated and at the same time survivin expression was markedly down-regulated in experimental group ($P < 0.05$). Higher dosages (100 mg/L, 200 mg/L and 400 mg/L of 5-fluorouracil, 0.05 mg/L, 0.075 mg/L and 0.1 mg/L of doxorubicin, 10⁻⁹ mol/L, 10⁻⁸ mol/L and 10⁻⁷ mol/L of gemcitabine) caused a greater increase of inhibition in experimental group than in hypoxia control ($P < 0.05$). **Conclusions** The results demonstrate that antisense HIF-1 α inhibits expression of survivin and enhances chemosensitivity of human pancreatic cancer cell BxPC-3. Blocking HIF-1 α in pancreatic cancer cells may offer an avenue for gene therapy.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471693)。

收稿日期:2005-09-07; **修订日期:**2006-03-07。

作者简介:常青,女,湖北宜昌人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事胆胰恶性肿瘤方面的研究。

通讯作者:秦仁义 电话:027-83662389; E-mail:ryqin@tjh.tjmu.edu.cn

Key words: Pancreatic Neoplasms/durg ther; Antisense Hypoxia inducible factor-1 α ; Chemosensitivity;

Gene therapy

CLC number: R735.9; R459.9

Document code: A

缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在胰腺癌中广泛表达,对胰腺癌的血管生成、发生发展起着重要作用^[1]。已有实验表明, survivin 在胰腺癌中高表达,且与化疗敏感性有关^[2-3]。本研究旨在观察反义 HIF-1 α 对胰腺癌化疗敏感性的影响及其与 survivin 的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞株 BxPC-3 购自中科院上海细胞生化所。人 pCR3.1-FLAG-HIF-1 α 质粒由哈佛大学朱浩教授惠赠。HIF-1 α 兔抗人多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。survivin 兔抗人多克隆抗体购自 Neomarkers 公司。Dospers liposomal 转染试剂购自 Roche 公司。过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司。总 RNA 纯化试剂盒购自 V-Gene 公司。M-MLV 逆转录酶、随机引物、Taq 聚合酶、质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。内切酶 (BamH I, Xba I)、T4 连接酶及引物合成于大连宝生物公司。凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司。DMEM 培养基和新生牛血清均购自 Gibco 公司。四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 及 G418 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建及转染 以人 pCR3.1-FLAG-HIF-1 α 质粒为模板,反义 HIF-1 α 引物上游为 5'-GTC GTG TCT AGA AAC TTC TGG ATG CTG GTG-3',下游为 5'-CAT ATT GGA TCC TCC TGT GGT GAC TTG TCC-3'。95℃ 变性 45s, 56℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s; 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。扩增片段大小为 721bp。扩增片段经 BamH I 和 Xba I 双酶切后插入到 pcDNA3.1(+) 的 BamH I 和 Xba I 位点,获得重组质粒 pcDNA3.1(+)-反义 HIF-1 α 。酶切鉴定得到含反义 HIF-1 α 的质粒 pcDNA3.1(+)-反义 HIF-1 α ,大量扩增及提取质粒。常规培养 BxPC-3 细胞。基因转染按 Dospers liposomal 转染试剂的使用说明进行,600mg/L G418 筛选。

1.2.2 细胞处理及分组 缺氧条件下 (0.5%

O₂) 体外培养 4h,未转染反义 HIF-1 α 质粒的 BxPC-3 细胞设为缺氧对照组;常氧条件下体外培养,未转染反义 HIF-1 α 质粒的 BxPC-3 细胞设为常氧对照组;缺氧条件下 (0.5% O₂) 体外培养 4h,转染反义 HIF-1 α 质粒的 BxPC-3 细胞设为实验组。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 HIF-1 α 及 survivin mRNA 的表达 应用总 RNA 纯化试剂盒提取 BxPC-3 细胞内的总 RNA, RNA 样本经 RT 反应合成 cDNA 第 1 链,然后进行 PCR 扩增 (PCR 扩增仪为美国 PT-100 型)。RT-PCR 扩增 HIF-1 α 引物上游为 5'-GAC AAG CCA CCT GAG GAG AG-3',下游为 5'-GGC CTT ATC AAG ATG CGA AC-3'。95℃ 变性 45s, 56℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s; 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。扩增片段大小为 383bp。survivin 引物上游为 5'-CCC CAT AGA GAA CAT AAA-3',下游为 5'-GGA ATA AAC CCT GGA AGT G-3'。95℃ 变性 45s, 50℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s; 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。扩增片段大小为 273bp。 β -actin 引物上游为 5'-GTG CGT GAC ATT AAG GAG-3',下游为 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT-3'。95℃ 变性 45s, 56℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s; 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。扩增片段大小为 520bp。反应体系: 50 μ L 反应体系中各引物终浓度为 0.1 μ mol/L, dNTP 各 50 μ mol/L, MgCl₂ 1.5mmol/L, Taq 酶 2.5U。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下观察结果。

1.2.4 免疫印迹 (Western Blot) 检测 HIF-1 α 及 survivin 蛋白的表达 用三去污剂法提取 BxPC-3 细胞内总蛋白, 6%, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 100V, 5h;电转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭;加入 1: 1 000 稀释兔抗多克隆抗体, 4℃ 孵育过夜;加入过氧化物酶标羊抗兔二抗, 室温孵育 1h, 洗膜, 化学发光显影, 测定光密度值。

1.2.5 MTT 比色法检测 BxPC-3 细胞抑制率 接种 BxPC-3 细胞至 96 孔细胞培养板,分别加入不同浓度的 5-氟尿嘧啶 (5-FU), 阿霉素, 吉西他宾。其中 5-FU 浓度分别为 10, 25, 50, 100, 200, 400mg/L;阿霉素浓度分别为 0.025, 0.05, 0.075,

0.1 mg/L; 吉西他滨分别为 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} mol/L。每板均设立空白孔和未加药物孔。培养 48h 结束后加入 MTT (5 mg/mL) 20 μ L/孔, 孵育 4h (实验组和缺氧对照组均置于 0.5% O_2 环境培养 4h), 小心吸弃培养上清液; 加入 DMSO 150 μ L/孔, 振荡 10 min; 酶标仪 490 nm 波长检测吸光度 (A 值)。以下列公式计算细胞抑制率。细胞抑制率 = [(未加药物孔 A 值 - 空白孔 A 值) - (加药物孔的 A 值 - 空白孔 A 值)] / (未加药物孔 A 值 - 空白孔 A 值) \times 100%。

1.2.6 流式细胞术 (FCM) 测凋亡 各组 BxPC-3 细胞制成单细胞悬液, 80% 冰乙醇悬浮细胞, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 上机前磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗去乙醇, 加碘化丙啶 (PI), 4 $^{\circ}$ C 避光 30 min, 即进行 FCM 检测。应用软件进行数据分析, 低于 G_0/G_1 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞, 其所占细胞总数的比例为凋亡率。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 SAS8.1 统计软件包进行

t 检验分析。 $P < 0.05$ 表明差异有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1 (+) - 反义 HIF-1 α 的鉴定

用 BamH I 和 Xba I 双酶切, 获线性质粒和反义 HIF-1 α 片断, 大小为 5.4 kb 和 721 bp (图 1)。

2.2 HIF-1 α 及 survivin mRNA 的表达

实验组 HIF-1 α 及 survivin mRNA 的表达显著降低 (图 2-3)。据 HPIAS-1000 及统计学分析, 实验组 HIF-1 α / β -actin mRNA 为 0.2367 ± 0.0094 显著低于缺氧对照组的 0.9638 ± 0.0203 ($P < 0.05$); 而实验组与常氧对照组的 0.3167 ± 0.0163 差异无统计学意义 (图 4a)。同样, 实验组 survivin/ β -actin mRNA 为 0.4601 ± 0.0122 , 显著低于缺氧对照组的 0.9883 ± 0.0167 和常氧对照组的 0.8981 ± 0.0109 ($P < 0.05$); 而缺氧对照组和常氧对照组差异无统计学意义 (图 4b)。

1: DNAMarker DL2000; 2: pcDNA3.1 (+) - 反义 HIF-1 α 质粒 BamH I 和 Xba I 双酶切; 3: pcDNA3.1 (+) 质粒 BamH I 和 Xba I 双酶切; 4: Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers

图 1 重组质粒 pcDNA3.1 (+) - 反义 HIF-1 α 的鉴定

1: DNA Marker DL2000; 2: 缺氧对照组; 3: 常氧对照组; 4: 实验组

图 2 实验组、常氧对照组和缺氧对照组 HIF-1 α mRNA 表达电泳图

1: DNA Marker DL2000; 2: 实验组; 3: 常氧对照组; 4: 缺氧对照组

图 3 实验组、常氧对照组和缺氧对照组 survivin mRNA 表达电泳图

a

b

图 4 反义 HIF-1 α 下调 HIF-1 α 及 survivin mRNA 的表达

2.3 HIF-1 α 及 survivin 蛋白的表达

实验组 HIF-1 α 及 survivin 蛋白的表达显著降低(图 5)。据 HPIAS-1000 及统计学分析,实验组 HIF-1 α / β -actin 蛋白为 0.1798 ± 0.0063 , 显著低于缺氧对照组的 0.6442 ± 0.0151 ($P < 0.05$); 而实验组与常氧对照组的 0.2573 ± 0.0135 差异无统计学意义(图 6a)。同样,实验组 survivin/ β -actin 蛋白为 0.3659 ± 0.0117 , 显著低于缺氧对照组的 0.8539 ± 0.0192 和常氧对照组的 0.7324 ± 0.0098 ($P < 0.05$); 而缺氧对照组和常氧对照组

差异无统计学意义(图 6b)。

1: 实验组; 2: 常氧对照组; 3: 缺氧对照组

图 5 3 组 HIF-1 α 及 survivin 蛋白的表达

a b
图 6 反义 HIF-1 α 下调 HIF-1 α 及 survivin 蛋白的表达

2.4 不同剂量化疗药物对 BxPC-3 细胞增殖活性的抑制

5-FU 作用 48h 后的实验组在 100, 200, 400mg/L 时的生长抑制率分别为 33.70%, 45.78%, 58.89%, 与缺氧对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 7a)。阿霉素作用 48h 后的实验组在 0.05, 0.075, 0.1mg/L 时的生长抑制率分别为 12.57%, 21.45%, 31.00%, 与缺氧对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 7b)。吉西他宾作用 48h 后的实验组在 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7}

mol/L 的生长抑制率分别为 32.08%, 39.47%, 48.15%, 与缺氧对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 7c)。

2.5 不同剂量化疗药物对 BxPC-3 细胞凋亡的影响

与缺氧对照组相比,5-FU 作用 48h 后的实验组在 100, 200, 400mg/L 时,阿霉素作用 48h 后的实验组在 0.05, 0.075, 0.1mg/L 时,吉西他宾作用 48h 后的实验组在 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} mol/L 时分别引起更高的凋亡率($P < 0.05$)(表 1-3)。

a b c
图 7 不同剂量各化疗药物对各组生长抑制率的影响

表 1 不同剂量 5-FU 作用的各组 BxPC-3 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

5-FU 剂量 (mg/L)	各组 BxPC-3 细胞凋亡率(%)		
	实验组	缺氧对照组	常氧对照组
10	3.65 \pm 0.94	2.78 \pm 0.73	3.81 \pm 1.26
25	5.67 \pm 0.91	4.88 \pm 0.84	5.22 \pm 0.72
50	8.06 \pm 0.79	5.94 \pm 1.12	7.26 \pm 1.31
100	15.11 \pm 1.76 [†]	6.17 \pm 0.88	13.75 \pm 1.42
200	27.12 \pm 1.48 [†]	8.23 \pm 1.21	20.96 \pm 2.02
400	31.26 \pm 0.73 [†]	10.15 \pm 1.64	26.77 \pm 1.38

注: [†] 与缺氧对照组相比

表 2 不同剂量阿霉素作用的各组 BxPC-3 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

阿霉素剂量 (mg/L)	各组 BxPC-3 细胞凋亡率(%)		
	实验组	缺氧对照组	常氧对照组
0.025	4.55 \pm 1.22	3.58 \pm 0.71	4.06 \pm 0.85
0.05	10.12 \pm 1.30 [†]	4.95 \pm 0.68	7.42 \pm 0.79
0.075	16.43 \pm 0.84 [†]	9.47 \pm 0.76	12.52 \pm 1.18
0.1	23.09 \pm 1.61 [†]	11.82 \pm 1.42	18.31 \pm 0.97

注: [†] 与缺氧对照组相比

表 2 不同剂量吉西他滨作用的各组 BxPC-3 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

吉西他滨剂量 (mol/L)	各组 BxPC-3 细胞凋亡率(%)		
	实验组	缺氧对照组	常氧对照组
10 ⁻¹²	5.81 \pm 0.95	4.56 \pm 1.34	4.98 \pm 1.06
10 ⁻¹¹	7.96 \pm 1.81	6.42 \pm 0.87	7.04 \pm 0.93
10 ⁻¹⁰	11.85 \pm 1.74	9.67 \pm 1.59	12.61 \pm 2.04
10 ⁻⁹	25.41 \pm 1.43 [†]	11.03 \pm 1.21	23.75 \pm 1.62
10 ⁻⁸	30.65 \pm 1.84 [†]	14.46 \pm 2.14	28.72 \pm 1.57
10 ⁻⁷	38.54 \pm 2.66 [†]	20.57 \pm 1.67	34.86 \pm 2.09

注: [†] 与缺氧对照组相比

3 讨论

虽然目前术前放疗化疗用于晚期胰腺癌患者,但效果并不尽人意。缺氧是影响化疗效果而且干扰肿瘤对放疗反应的一个重要因素^[4]。即使早期胰腺癌,很多患者术后在很短时间内即有局部复发和远处转移。胰腺癌预后差,目前寻找新的治疗途径已成为胰腺癌的研究热点^[5-6]。

胰腺癌血供很差,在严重缺氧时还能继续增殖的原因可能与持续缺氧状态诱导了胰腺癌中 HIF-1 α 的表达有关^[1]。近年的研究表明,血管内皮生长因子(VEGF)和糖酵解过程中多种关键酶基因均受 HIF-1 α 的调控;HIF-1 α 通过促进肿瘤组织的血管生成和能量代谢加速肿瘤组织的生长,同

时也促进了肿瘤的侵袭和转移。

化疗药物杀死肿瘤细胞的机制在于诱导细胞凋亡。对化疗药物耐药的肿瘤细胞,其耐药机制除了肿瘤细胞能过度表达 mdrl 编码的 P 糖蛋白增加化疗药物的排除外,还在于能抵抗药物诱导的凋亡。Xiang 等^[7]的体内外实验结果提示,survivin 靶向治疗是选择性杀死癌症细胞的可行的途径。Tamm 等^[8]曾报道,通过分子处理抑制 survivin 的表达可增加化疗效果,还对放疗有一定影响。已有证据表明,HIF-1 α mRNA 的表达与 survivin 的表达有一定关系^[9]。本组实验结果提示缺氧时胰腺癌 BxPC-3 细胞转染反义 HIF-1 α 能下调 survivin 的表达,而且,在缺氧状态下,抑制 HIF-1 α 的表达将增加 BxPC-3 细胞对化疗的敏感性。

综上所述,反义 HIF-1 α 可能通过阻断 HIF-1 α 和 survivin 的表达而增强胰腺癌对化疗的敏感性。据此,可望通过阻断 HIF-1 α 的表达为胰腺癌基因治疗提供一种新的途径。

参考文献:

- [1] Shibaji T, Nagao M, Ikeda N, *et al.* Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(6C): 4721 - 4727.
- [2] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, *et al.* Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(6): 886 - 892.
- [3] 王宇令,刘源,张建勋,等. Survivin 在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌增殖活性的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(11): 817 - 819.
- [4] Moulder JE, Rockwell S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy [J]. *Cancer Metast Rev*, 1987, 5(4): 313 - 341.
- [5] 东星,周卫东. 胰腺癌的分子生物学研究进展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(6): 454 - 456.
- [6] 黄涛,高军,冯延平,等. β 1 整合素反义寡核苷酸对人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤的治疗作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(11): 809 - 812.
- [7] Xiang R, Mizutani N, Luo Y, *et al.* A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(2): 553 - 561.
- [8] Tamm I, Wang Y, Sausville E, *et al.* IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5315 - 5320.
- [9] 魏海燕,陈立波,王春友. 低氧诱导因子-1 α mRNA 在胰腺癌组织中的表达与胰腺癌生物学特征的关系 [J]. *癌症*, 2005, 24(2): 184 - 188.