

文章编号:1005-6947(2006)07-0520-05

· 基础研究 ·

# 反义 HIF-1 $\alpha$ 基因治疗人肝癌裸鼠移植瘤的实验研究

董典宁<sup>1</sup>, 孙平<sup>2</sup>, 智绪亭<sup>3</sup>, 寿楠海<sup>3</sup>, 孙学英<sup>3</sup>

(1. 山东省立医院 血管外科, 山东 济南 250021; 山东大学齐鲁医院 2. 妇产科 3. 普通外科, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨反义 HIF-1 $\alpha$  基因对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的影响及其相关机制。方法 使用人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤动物模型。待肿瘤生长至直径约 0.4 cm 时, 将荷瘤裸鼠随机分为 3 组, 分别注射生理盐水、质粒 PcDNA3 和 HIF-1 $\alpha$ /PcDNA3B, 质粒用脂质体 DOTAP 介导转染细胞。观察各组动物的肿瘤生长曲线; 取肿瘤标本作免疫组织化学检查 (SABC 法) 及蛋白质印迹检查, 检测各组肿瘤的 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  表达及微血管密度 (MVD) 和细胞凋亡。结果 HIF-1 $\alpha$ /PcDNA3B 治疗组各时点的肿瘤体积, 以及肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白、MVD, VEGF 表达均低于对照组, 而细胞凋亡指数高于对照组, 差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。结论 通过阻断癌细胞的缺氧适应途径, 反义 HIF-1 $\alpha$  基因治疗肝癌有抑制肿瘤生长、抑制肿瘤血管生成及诱导细胞凋亡的作用。

**关键词:** 反义缺氧诱导/治疗应用; 肝肿瘤/药物疗法; 细胞凋亡; 肿瘤移植

**中图分类号:** R735.7; R459.9 **文献标识码:** A

## Experimental study of treating implanted human primary hepatic carcinoma of nude mice by antisense HIF-1 $\alpha$ gene in-vivo

DONG Dian-ning<sup>1</sup>, SUN Ping<sup>2</sup>, ZHI Xu-ting<sup>3</sup>, SHOU Nan-hai<sup>3</sup>, Sun Xue-ying<sup>3</sup>

(1. Department of General Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China; 2. Department of Gynecology, 3. Department of General Surgery, Julu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effects and mechanism of antisense HIF-1 $\alpha$  gene on implanted human primary hepatic carcinoma of nude mouse. **Methods** Tumors were established by subcutaneous injection of  $3 \times 10^6$  tumor cells, named SMMC-7721, into the back of nude mice. Once the tumor grew to 0.4 cm in diameter, the mice were divided randomly into three groups with injected respectively with NS, empty plasmid PcDNA3, and antisense HIF-1 $\alpha$  plasmid. Half group of the nude mice were used to observe the tumor growth curve, and the other half were to obtain the tumor samples to be used in the examinations of the expression of angiostatin, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, MVD and cell apoptosis. **Results** Tumors grew rapidly in the control group than that in the antisense HIF-1 $\alpha$  group. In antisense HIF-1 $\alpha$  gene therapy resulted in low expression of HIF-1 $\alpha$ , MVD and VEGF than those in 2 control groups ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ); but in HIF-1 $\alpha$  group. AI was higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Antisense HIF-1 $\alpha$  gene therapy is a promising approach to treat human liver cancer by suppression of tumor growth and tumor angiogenesis and by induction of cell apoptosis.

**Key words:** Antisense HIF/ther use; Liver Neoplasms/drug ther; Apoptosis; Neoplasms Transplantation

**CLC number:** **Document code:** A

收稿日期:2005-03-25; 修订日期:2005-12-26。

作者简介:董典宁,男,山东阳谷人,山东省立医院主治医师,主要从事血管外科常见疾病的临床诊治及基础研究方面的研究。

通讯作者:智绪亭 E-mail:zhixuting@hotmail.com。

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,且有逐年增高的趋势。目前肝癌的治疗主要采用以手术、放疗、化疗以及免疫治疗为主的综合疗法,尽管有多种治疗方案,但是其总体疗效仍不理想,仍是最难治愈的恶性肿瘤之一。基因治疗是近年来兴起的一种新的热点,被认为是治疗恶性肿瘤最有希望的治疗方案之一。本文旨在研究反义 HIF-1 $\alpha$  基因对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的影响并探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验动物为 BALB/C 裸小鼠,36 只,雌雄各半,4~5 周龄,体重 18~20 g,购自中国科学院上海实验动物中心。人原发性肝癌细胞系 SMMC-7721,购于中国科学院上海细胞生物学研究所。真核表达质粒 pcDNA3, HIF-1 $\alpha$ /pcDNA3B,由新西兰奥克兰大学孙学英博士惠赠。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人原发性肝癌细胞系 SMMC-7721 用含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。待细胞生长至对数生长期,用 0.25% 胰蛋白酶消化,用磷酸盐缓冲液(PBS)制成细胞悬液,调整细胞密度至  $3 \times 10^7$ /mL,用于建立动物模型。

1.2.2 动物模型的建立及实验分组 每个裸鼠背部取一点皮下种植细胞悬液 0.1 mL。荷瘤裸鼠随机分为 3 组,分别为空白对照组、PcDNA3 对照组、HIF-1 $\alpha$ /PcDNA3B 治疗组(简称治疗组),每组 12 只,其中 6 只观察生长曲线,另外 6 只切取肿瘤标本供实验室检查用。

#### 1.2.3 肿瘤基因治疗及观察指标

1.2.3.1 肿瘤的基因治疗 目的基因在阳离子脂质体 DOTAP 介导下转染细胞。基因转染液直接多点注射于瘤体内。基因转染液配方<sup>[1]</sup>:总体积为 100  $\mu$ L,其中纯化的真核表达质粒 50  $\mu$ L(约为 2 mg/mL), DOTAP 40  $\mu$ L, 50% 葡萄糖 10  $\mu$ L, 1% triton X-100 1  $\mu$ L。各实验组分别注射生理盐水(NS)、pcDNA3 和 HIF-1 $\alpha$ /PcDNA3B。

#### 1.2.3.2 观察指标

(1) 肿瘤生长曲线 注射药物后,每天观察肿瘤生存状态,第 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 和 21 d 用游标卡尺测量肿瘤长、短径,计算肿瘤的体积,各组荷

瘤裸鼠均于注射药物后 21 d 处死;取各组肿瘤体积的平均值,绘制皮下肿瘤生长曲线。肿瘤体积 =  $\pi/6 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$ <sup>[2]</sup>,  $\pi$  值取 3.14。

(2) 蛋白质印迹(Western blot)和免疫组织化学(免疫组化)检查 注射后 4 d 切取标本,检测各实验组中血管内皮生长因子(VEGF)和 HIF-1 $\alpha$  的表达情况。用 CD31 抗体 MEC13.3 标记微血管,检测微血管密度(MVD)。免疫组化结果判定见参考文献<sup>[3]</sup>:胞浆内棕黄色颗粒为 Angiostatin, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , 结合 Mias-2000 型病理图像分析系统,由 2 名病理科医师采用盲法阅片的方式,进行结果评价。评价标准:随机选择 5 个高倍镜视野(400 倍)进行判断,细胞浆着色成棕黄色为阳性表现,Angiostatin、VEGF、HIF-1 $\alpha$  的表达以染色强度和阳性细胞率的得分之和进行判断:无染色计为 0 分,弱染色(浅黄色)计 1 分,中等染色(棕黄色)计 2 分,强染色(黄褐色)计为 3 分;阳性细胞率  $\leq 5\%$  记 0 分,5%~25% 计 1 分,25%~50% 计 2 分, > 50% 计 3 分。上述两项得分相加,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中等阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。微血管密度计数方法见参考文献<sup>[4]</sup>。扫描仪扫描蛋白质印迹的曝光胶片,应用美国 Amersham Pharmacia Biotec 公司的图像处理系统扫描定量,进行半定量分析。

(3) TUNEL 法原位细胞凋亡的检测 细胞凋亡检测试剂盒购于德国的 Boehringer Mannheim 公司,按说明书操作。计算凋亡指数(AI)的方法:在荧光显微镜下,随机选择 10 个高倍镜视野,计数凋亡细胞,计算凋亡细胞的百分比作为 AI。AI = 凋亡细胞数目  $\times 100$  / 有核细胞的总数<sup>[1]</sup>。

### 1.3 统计分析

采用 SPSS11.5 统计分析软件进行数据处理。免疫组化的统计分析采用  $\chi^2$  检验。其他实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,方法采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  示有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤生长曲线

治疗组的肿瘤生长受到一定程度的抑制,治疗组与 PcDNA3 及 NS 对照组比较差异均有显著性(均  $P < 0.05$ );而 NS 组及 PcDNA3 组间无显著差异( $P > 0.05$ )(表 1, 图 1)。

表1 不同时间3组裸鼠肿瘤体积的变化

治疗后 天数(d)	NS 对照组	PcDNA3 对照组	HIF-1 $\alpha$ /PcDNA3B 治疗组
0	33.28 $\pm$ 5.2	33.2 $\pm$ 5.0	33.24 $\pm$ 5.4
3	70.2 $\pm$ 10.2 <sup>†</sup>	69.4 $\pm$ 5.9 <sup>†</sup>	36.2 $\pm$ 5.6
6	124.1 $\pm$ 18.6 <sup>†</sup>	121.1 $\pm$ 7.5 <sup>†</sup>	47.2 $\pm$ 6.4
9	171.2 $\pm$ 24.2 <sup>†</sup>	171.8 $\pm$ 17.4 <sup>†</sup>	81.5 $\pm$ 12.6
12	256.6 $\pm$ 45.8 <sup>†</sup>	250.9 $\pm$ 42.3 <sup>†</sup>	105.8 $\pm$ 18.6
15	325.4 $\pm$ 61.4 <sup>†</sup>	324.5 $\pm$ 64.8 <sup>†</sup>	164.2 $\pm$ 32.3
18	428.8 $\pm$ 80.2 <sup>†</sup>	430.8 $\pm$ 85.6 <sup>†</sup>	205.3 $\pm$ 36.4
21	536.2 $\pm$ 101.2 <sup>†</sup>	524.2 $\pm$ 123.6 <sup>†</sup>	249.2 $\pm$ 38.5

注: <sup>†</sup> 与治疗组比较,  $P < 0.05$

图1 各实验组裸鼠移植瘤的肿瘤生长曲线

## 2.2 蛋白质印迹分析

治疗组中 HIF-1 $\alpha$  表达低于 PcDNA3 对照组(图 2a)。

## 2.3 免疫组化结果

治疗组 HIF-1 $\alpha$  的表达明显低于 PcDNA3 对照

组( $\chi^2 = 8.95, \nu = 3, P < 0.05$ )(表 2, 图 2b, c)。VEGF 表达 PcDNA3 对照组高于治疗组(表 3, 图 2d, e)。

表2 免疫组化检查两组肿瘤标本 HIF-1 $\alpha$  表达的分析结果

实验分组	(-)	(+)	(++)	(+++)
PcDNA3	4	7	1	0
aHIF-1 $\alpha$	1	3	6	2

表3 免疫组化检查两组肿瘤标本 VEGF 表达的分析结果

实验分组	(-)	(+)	(++)	(+++)
PcDNA3	4	7	1	0
aHIF-1 $\alpha$	0	2	7	3

MVD 注射药物后 4d 取标本检测 MVD, 治疗组的 MVD 为  $20.2 \pm 2.5$ , 明显低于 PcDNA3 对照组的  $29.8 \pm 4.0$ , 差异有显著性( $P < 0.01$ )(图 2f, g, 图 3)。

## 2.4 细胞凋亡

治疗组肿瘤细胞的凋亡率为  $2.98 \pm 0.51$ , 明显高于 PcDNA3 对照组的  $1.75 \pm 0.43$ , 差异均有显著性(均  $P < 0.01$ )(图 2h, i, 图 4)。

a 依次为 PcDNA3 对照组和治疗组中 HIF- $\alpha$  的表达(Western Blot); b, c 依次为 PcDNA3 对照组和治疗组中 HIF- $\alpha$  的表达(SABC  $\times$  200); d, e 依次为 PcDNA3 对照组和治疗组中 VEGF 的表达(SABC  $\times$  400); f, g 依次为 PcDNA3 对照组和治疗组中 MVD 的表达(SABC  $\times$  40); h, j 依次为 PcDNA3 对照组和治疗组的细胞凋亡(TUNEL  $\times$  400)

图2 各实验组中裸鼠移植瘤的蛋白质印迹、免疫组化、细胞凋亡检查结果

图3 各实验组肿瘤组织的 MVD 示意图

### 3 讨论

Folkman<sup>[5]</sup>于1971年提出“肿瘤血管生成依赖学说”,认为肿瘤生长过程中存在两个阶段即血管前期和血管期,并将两个阶段的转化过程称为血管生成切换。肿瘤的缺氧状态在新生血管形成中起着关键作用。缺氧状态激活了缺氧诱导基因,促进肿瘤细胞分泌血管生成刺激因子 VEGF,它促进不同来源的内皮细胞分裂增殖和血管构建以及升高血管尤其是微血管的渗透性<sup>[6]</sup>,从而促进肿瘤血管系统的形成;同时增加了促红细胞生成素(EPO),葡萄糖载体蛋白-1(GLUT-1),醛缩酶A(ALDA),乳酸脱氢酶A(LDHA)等生物活性物质,参与肿瘤细胞的糖代谢,以维持肿瘤细胞的能量代谢<sup>[2,7]</sup>。Ding等<sup>[8]</sup>报道用 endostatin 基因治疗大鼠 MCa-4 乳腺癌的裸鼠种植瘤,结果提示 Endostatin 基因治疗导致肿瘤缺氧加重而引起局部的 VEGF 和 VEGF 受体 mRNA 的表达反应性升高。大量研究表明,恶性肿瘤的进展、转移、预后以及对放疗、化疗的敏感性均与肿瘤的缺氧状态密切相关<sup>[9-11]</sup>。

1992年 HIF-1 的发现使得调控缺氧诱导基因成为一种新的治疗热点。HIF-1 是细胞在缺氧条件产生的核蛋白,它由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  (Arnt) 组成,正常的非缺氧细胞中无 HIF-1 $\alpha$  表达<sup>[7,12-13]</sup>。HIF-1 连接靶基因的缺氧反应元件(HREs),促进 VEGF 以及糖分解相关蛋白质(如 Glut-1, Glut-3 等)编码基因的转录,促进肿瘤血管形成和细胞能量代谢<sup>[14-17]</sup>。VEGF 在肝癌发展和转移中有重要作用,肝癌组织 VEGF 检测可作为评估肝癌转移的指标<sup>[18]</sup>。邓伟等<sup>[19]</sup>研究证明血管生成素和 VEGF 在人肝细胞癌血管生成和进展中

图4 各实验组的肿瘤细胞 AI 示意图

起重要作用。本文设想应用反义 HIF-1 $\alpha$  基因抑制 VEGF 基因的转录,并探讨相关机制。

本实验结果显示:应用反义 HIF-1 $\alpha$  基因治疗人肝癌裸鼠皮下瘤时,治疗组中 VEGF 的表达明显低于对照组,HIF-1 $\alpha$  呈低表达,提示反义 HIF-1 $\alpha$  基因治疗通过抑制肿瘤细胞的缺氧适应途径可以明显抑制肿瘤生长,降低 MVD,诱导细胞凋亡。但是反义 HIF-1 $\alpha$  基因治疗并没有使肿瘤缩小或者消失,可能与药物的剂量和用法有关,更可能与肿瘤细胞的基因不稳定性有关<sup>[20]</sup>。

对肿瘤进行抗血管生成治疗时,打破了血管生成刺激因子与抑制因子间的平衡状态,血管生成抑制因子占优势,肿瘤血管生成受抑,肿瘤的缺氧加重。通过肿瘤的缺氧适应途径,肿瘤细胞会产生更多的 VEGF, EPO 和 Glut 等生物活性物质,促进肿瘤的血管形成和细胞能量代谢,此时肿瘤即对抗血管生成治疗产生了耐药。设想通过阻断肿瘤细胞的缺氧适应途径来解决抗血管生成治疗的耐药性问题,应能收到较好的治疗效果(图5)。其确切机制尚有待进一步研究。

图5 aHIF-1 $\alpha$  基因治疗作用靶点示意图

注:aHIF-1 $\alpha$  基因治疗是通过阻断肿瘤细胞的缺氧适应途径而发挥作用。

## 参考文献:

- [1] Sun X, Kanwar JR, Leung E, *et al.* Angiostatin enhances B7. 1-mediated cancer immunotherapy independently of effects on vascular endothelial growth factor expression [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(10): 719-727.
- [2] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 86(3): 353-364.
- [3] Gohji K, Katsuoaka Y, Okamoto M, *et al.* [Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer [J]. *Hinyokika Kyo*, 2000, 46(10): 757-762.
- [4] Araya M, Terashima M, Takagane A, *et al.* Microvessel count predicts metastasis and prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 1997, 65(4): 232-236.
- [5] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [6] Ferrara N, Houck K, Jakeman L, *et al.* Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins [J]. *Endocr Rev*, 1992, 13(1): 18-32.
- [7] Blancher C, Harris AL. The molecular basis of the hypoxia response pathway: tumour hypoxia as a therapy target [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1998, 17(2): 187-194.
- [8] Ding I, Sun JZ, Fenton B, *et al.* Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCA-4 murine mammary carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 526-531.
- [9] Zhong H, Agani F, Baccala AA, *et al.* Increased expression of hypoxia inducible factor-1 alpha in rat and human prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5280-5284.
- [10] Hockel M, Schlenger K, Aral B, *et al.* Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(19): 4509-4515.
- [11] Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, *et al.* Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation [J]. *Nat Med*, 1997, 3(2): 177-182.
- [12] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(12): 5510-5514.
- [13] Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(9): 4304-4308.
- [14] Dachs GU, Stratford IJ. The molecular response of mammalian cells to hypoxia and the potential for exploitation in cancer therapy [J]. *Br J Cancer Suppl*, 1996, 27: S126-S132.
- [15] Jiang BH, Rue E, Wang GL, *et al.* Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(30): 17771-17778.
- [16] Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, *et al.* Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201 (Pt 8): 1153-1162.
- [17] Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, *et al.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(51): 32529-32537.
- [18] 常实, 汤恢焕, 龚学军, 等. 原发性肝癌组织 VEGF 与外周血 AFP mRNA 检测的临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(3): 205-208.
- [19] 邓伟, 梁力建. 血管生成素和 VEGF 在人肝细胞癌血管生成作用机制的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(6): 436-440.
- [20] 王英, 崔忠, 李开宗, 等. 肝细胞肝癌中 p15 基因产物的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(7): 540-542.

## 欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》(原《中国临床康复》)杂志

2007 年《中国组织工程研究与临床康复》杂志组稿重点:

生物材料研究:组织工程支架材料、材料与宿主的关系、材料与组织的相容性、血液-材料相互作用评价、组织工程材料学特征。

康复工程研究:医学假体、人工器官、器官移植、骨关节植入物与人的生物相容性、脊柱脊髓植入物与人的生物相容性、血管内介入物与人的生物相容性、医用电子仪器设备、人体组织器官的三维有限元应力分析、人体组织器官的生物力学特征。

组织构建研究:各器官的组织构建、组织工程与干细胞的相容性、组织工程生物活性因子、组织工程分子生物学、组织器官构建相关因素。

种子细胞研究:干细胞生物学特征、干细胞移植实验、干细胞因子、干细胞实验技术方法、干细胞移植治疗非血液系统疾病。

欢迎上述研究的英文稿件和应用中医药方法研究的相关稿件投稿。

本刊出版周期:一般稿件修回后 6 个月出版,“绿色特快通道”承诺修回稿件 3 个月内出版。咨询电邮:szb100@zgckf.com,电话:024-23389106,024-23384352,传真:024-23381085。投稿电邮:kf23385083@sina.com, kf22838105@sina.com。国内订阅邮发代号:8-584;本社订阅:辽宁省沈阳 1200 邮政信箱,邮编:110004。更多信息详见 www.zgckf.com。