

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 08. 011

YC-1 对人肝细胞癌裸鼠移植瘤的影响及其机制

吴晓慧,王顺祥,杨永江,李建坤

Mechanism of Effects of YC-1 on Human Primary Hepatic Carcinoma Loaded in Nude Mice

WU Xiao-hui, WANG Shun-xiang, YANG Yong-jiang, LI Jian-kun

Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding Author: WANG Shun-xiang, E-mail: gdwangsx@163. com

Abstract: Objective To research the mechanism of effects of HIF-1 α (YC-1) on implanted human primary hepatic carcinoma in nude mice. **Methods** A total of 16 male nude mice were inoculated subcutaneously with 1 million SMMC-7721 cells. Once the tumor grew to (100~150)mm³, the mice were divided randomly into two groups and injected with YC-1 or DMSO respectively. Tumor size and weight were measured. Levels of HIF-1 α and VEGF expressions in tumor tissue were detected by RT-PCR, Western blot or immunohistochemical respectively. **Results** Tumors grew rapidly in the control group than those in the YC-1 treatment group. In YC-1 group therapy resulted in low expression of HIF-1 α and VEGF than those in control groups ($P<0.05$). **Conclusion** YC-1 therapy was a promising approach to treat human liver cancer by suppression of HIF-1 α and VEGF expression, which might contribute to inhibit tumor growth and angiogenesis.

Key words: YC-1; HIF-1 α ; VEGF; Hepatocellular carcinoma; Nude mice

摘要:目的 探讨缺氧诱导因子抑制剂(YC-1)对人肝癌细胞裸鼠皮下移植瘤的影响及其相关机制。**方法** 用人肝癌细胞株 SMMC-7721 建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型,待肿瘤生长至约(100~150)mm³时,将荷瘤裸鼠随机分为两组:实验组和对照组,分别给予 YC-1 和二甲基亚砷,观察两组裸鼠肿瘤生长情况;应用 RT-PCR、Western blot 及免疫组织化学方法检测移植瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 表达。**结果** YC-1 治疗组各时点肿瘤体积显著低于对照组($P<0.05$);与对照组比较,实验组移植瘤组织 HIF-1 α mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$),而 HIF-1 α 蛋白的表达显著降低($P<0.05$);移植瘤组织 VEGF mRNA 及蛋白表达均显著低于对照组($P<0.05$)。**结论** YC-1 可能通过下调 HIF-1 α 和 VEGF 的表达来抑制肝癌的生长。

关键词: YC-1; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 肝细胞癌; 裸鼠

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)08-0895-04

0 引言

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,且有逐年增高的趋势。手术切除是肝癌的首选治疗方法,但手术后复发、转移率仍很高,其机制尚不清楚。血管内皮生长因子 VEGF 是肿瘤血管形成过程中最重要的刺激因子,同时又是缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)重要的靶基因,通过调

节 VEGF 的表达、增加肝细胞癌新生血管的生成,从而促进肝细胞癌的侵袭转移。3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole (YC-1)是一种具有抗血管新生活性及肿瘤治疗活性的新物质,能不依赖 NO 而直接激活鸟苷酸环化酶,参与癌细胞系列信号转导。本研究应用 HIF-1 α 抑制剂 YC-1 作用于人肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤,观察裸鼠移植瘤的生长,检测移植瘤组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和蛋白的表达,明确 YC-1 对裸鼠移植瘤的生长及 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响,从而探讨以 HIF-1 α 为治疗靶点的可行性。

基金项目:河北省卫生厅基金资助课题(05012)
收稿日期:2010-08-02;修回日期:2011-01-20
作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院肝胆外科
通信作者:王顺祥, E-mail: gdwangsx@163. com
作者简介:吴晓慧(1979-),女,博士,主治医师,主要从事肝癌侵袭转移及其机制的研究

1 材料和方法

1.1 细胞株和实验动物

人肝癌细胞系 SMMC-7721 购于中国科学院上海细胞生物研究所。BALB/C nu/nu 裸鼠购自中国医学科学院实验动物研究所(动物合格证号: 0140198)。4~5 周龄,雌性鼠,体重(16~20)g。

1.2 药品与试剂

YC-1 购自美国 Alexis biochemicals 公司。羊抗人 HIF-1 α 多克隆抗体,鼠抗人 VEGF 抗体,鼠抗人 β -actin 均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。RT-PCR 引物序列如下: HIF-1 α (460 bp)引物序列:上游 5'-TCAAAGTCGGACAGCCTCA-3';下游 5'-CCCTGCAGTAGG TTTCTG CT-3'。VEGF121 (541 bp) 165 (408 bp): 上游: 5'-GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC-3';下游 5'-CGATCGTTCTGTATCAGTCTTTCC-3'。辣根酶标记的兔抗山羊二抗、山羊抗鼠二抗,SP 免疫组织化学染色试剂盒,DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 动物模型的建立及实验分组

培养 SMMC-7721 细胞,待细胞生长至对数生长期,用 0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞悬液,调整细胞密度至 5×10^7 /ml,每个裸鼠右腋部皮下种植细胞悬液 0.2 ml。待肿瘤生长至约 (100~150) mm³ 时,将荷瘤裸鼠随机分为两组,每组 8 只,分别注射 YC-1 (DMSO 溶解)10 mg/(kg·d)^[1] 和二甲基亚砷,用药三周后处死。

1.4 观察指标

注射药物后,每天观察肿瘤生存状态,并用游标卡尺测量肿瘤长、短径,计算肿瘤的体积,21 天处死;测量移植瘤长径、短径,并称瘤重,肿瘤体积(V) = 长径 $\times$ 短径²/2,重量抑瘤率 = (对照组瘤重 - 实验组瘤重)/对照组瘤重 $\times$ 100%;体积抑瘤率 = (对照组体积 - 实验组体积)/对照组体积 $\times$ 100%。

1.5 RT-PCR 检测 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达

称取肿瘤组织 50 mg,按 Trizol 说明书提取组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性,紫外分光光度计检验纯度并定量,所得 RNA 的吸光度(A₂₆₀/A₂₈₀)均在 1.8 至 2.0 范围内。HIF-1 α 反应条件为:95℃预变性 3 min;94℃变性 45 s;52℃复性 1 min;72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 5 min。VEGF 反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 45 s;55℃复性 45 s;72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 5 min。以 GAPDH(342 bp)为内参照,基因扩增产物经用 1.2%琼脂糖凝胶电泳,电泳结果用 DNA 凝胶成像扫描仪(美国 Fotodyne 公司)摄像,

Gel-Pro Analysis 图像分析软件测定条带吸光度,以(条带灰度 $\times$ 面积)/(参照物的灰度 $\times$ 面积)作为目的基因表达水平的参数,对产物相对定量。

1.6 Western blot 检测 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达

取 1 ml 细胞裂解液加入匀浆器中,取 50 mg 肿瘤组织加入匀浆器中冰上进行匀浆。静置 1 h,4℃离心 12 000 r/min,15 min,取上清液作蛋白电泳。在 7.5%和 12% SDS-PAGE 中蛋白分离后,电转移至硝酸纤维素膜,分别分析 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白。用 5%脱脂奶粉 PBS-T 封闭 1 h,一抗稀释 HIF-1 α 为 1:100,VEGF 为 1:50,4℃过夜。洗膜采用 PBS-T 10 min $\times$ 3 次,二抗采用辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗(1:1 000 稀释)、山羊抗鼠二抗(1:1 000 稀释),37℃温箱培养 1 h,按说明操作 DAB 显色。

1.7 免疫组织化学 SP 法检测 HIF-1 α 和 VEGF 的表达

实验组和对照组以染色为浅黄色至棕褐色为阳性表达。

1.8 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计分析软件进行数据处理。RT-PCR、Western blot 及两组裸鼠重量、体积间的比较,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤生存状态及抑瘤率

实验过程中小鼠生长、饮食、活动等情况良好。实验结束时,实验组肿瘤的体积为 (0.20 $\pm$ 0.04) cm³,对照组为 (0.30 $\pm$ 0.03) cm³,体积抑瘤率为 33.3%。实验组肿瘤的重量为 (0.39 $\pm$ 0.08) g,对照组为 (0.70 $\pm$ 0.13) g,重量抑瘤率为 44.3%。实验组肿瘤的体积及重量均显著小于对照组 (*P* < 0.05)。解剖裸鼠,两组均未见肝及肺转移灶。

2.2 RT-PCR 结果分析

RT-PCR 检测裸鼠移植瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达时发现,实验组和对照组 HIF-1 α mRNA 表达差异无统计学意义 (*P* > 0.05),说明 YC-1 对 HIF-1 α mRNA 的表达无影响;实验组和对照组比较 VEGF mRNA 的表达显著下降,差异有统计学意义,说明 YC-1 能够抑制裸鼠移植瘤 VEGF mRNA 的表达 (*P* < 0.05),见表 1、图 1。

2.3 蛋白质印迹分析

Western blot 检测裸鼠移植瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达,实验组 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达均显著低于对照组 (*P* < 0.05),见表 2、图 2。

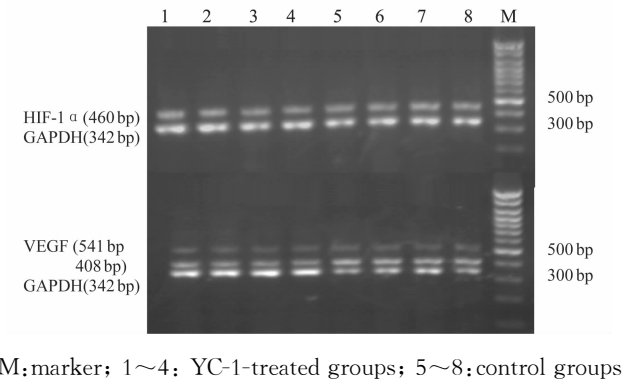


图 1 HIF-1α 和 VEGF mRNA 在实验组和对照组移植瘤中的表达

Figure 1 Expression of HIF-1α and VEGF mRNA in YC-1-treated and control group

表 1 HIF-1α 和 VEGF mRNA 在实验组和对照组移植瘤中的表达(̄x±s)

Table 1 The expression of HIF-1α and VEGF mRNA in YC-1 treated and control group (̄x±s)

Groups	HIF-1α	VEGF	
		VEGF ₁₆₅	VEGF ₁₂₁
YC-1	0.37±0.05*	0.35±0.05▲	0.11±0.02△
Control	0.38±0.08	0.86±0.18	0.29±0.06

Note:compared with control, *:t=0.44, P=0.67; ▲:t=7.669, P<0.05; △:t=7.623, P<0.05

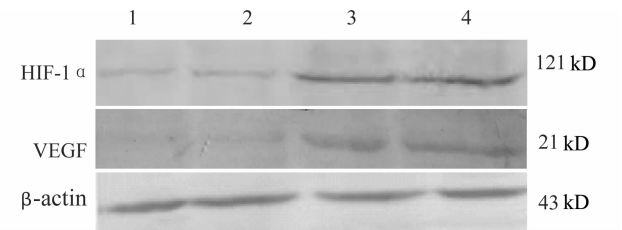


图 2 HIF-1α 和 VEGF 蛋白在实验组和对照组移植瘤中的表达

Figure 2 Expression of HIF-1α and VEGF protein in YC-1-treated and control group

2.4 免疫组织化学结果

HIF-1α 阳性着色主要分布于细胞质,小部分胞

表 2 HIF-1α 和 VEGF 蛋白在实验组和对照组移植瘤中的表达(̄x±s)

Table 2 The expression of HIF-1α and VEGF protein in tumors of nude mice in YC-1-treated and control group (̄x±s)

Groups	HIF-1α	VEGF
YC-1	0.31±0.16▲	0.89±0.24*
Control	0.87±0.10	2.09±0.39

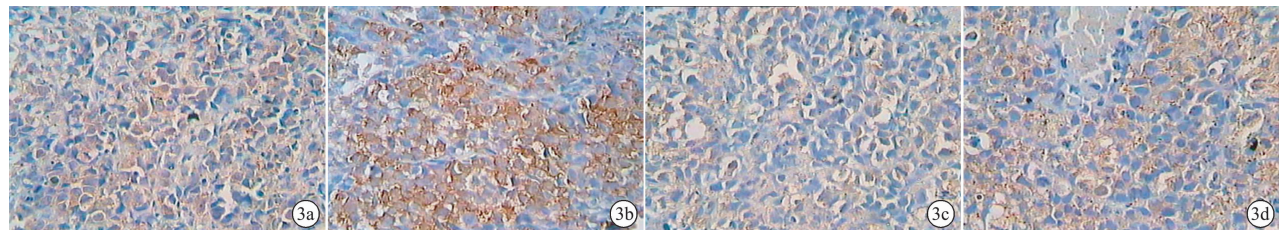
Note:compared with control, ▲:t=8.625, P<0.05; *:t=7.442, P<0.05

核中也有表达,染色呈浅黄色至棕褐色,小片状或弥漫性分布;VEGF 主要定位在胞质,呈棕黄或棕褐色颗粒。实验组 HIF-1α 及 VEGF 着色强度均弱于对照组,见图 3。

3 讨论

研究证实缺氧是恶性肿瘤微环境的基本特征之一[2]。肿瘤的缺氧不仅是发生恶性转化的始动因素,还可以诱导肿瘤细胞对放疗及化疗的耐受,促进肿瘤的侵袭和转移等恶性生物学行为的发生,缺氧导致的一系列基因和蛋白的表达正是这些现象发生的根本原因[3]。HIF-1 是缺氧诱导基因表达的中心调节因子,与肿瘤的发生、发展密切相关,其表达受缺氧、肿瘤基因及多种因子的调节,可调控有关肿瘤血管生成、糖类代谢等多种靶基因的转录、促进肿瘤生长、侵袭及转移。HIF-1 通过与其靶基因上的缺氧反应元件(hypoxia responsible element, HRE)结合而发挥其转录活性,从而调控肿瘤细胞的缺氧效应。VEGF 是目前发现肿瘤诱导产生血管网的最重要的细胞因子,也是 HIF-1 的主要靶基因。最近发现, HIF-1 在基因水平上直接调控 VEGF 的表达,是恶性肿瘤诱导血管形成的重要调控因子[4]。因此,研究 HIF-1 与肿瘤的关系,以及 HIF-1 的调控基因可以为掌握肿瘤生物学行为,探索肿瘤预防及治疗提供新的思路和途径,具有重要的临床实用价值。

YC-1 即 3-(5'-羟甲基-2'-呋喃基)-1-苯甲基吲



3a,3c:YC-1 treated group;3b,3d:control group;3a,3b:expression of HIF-1α;3c,3d:expression of VEGF

图 3 实验组和对照组移植瘤中 HIF-1α 和 VEGF 的表达(IHC ×400)

Figure 3 The expressions of HIF-1α and VEGF in tumors of nude mice (IHC ×400)

唑,是一种治疗循环系统紊乱、抑制血小板聚集和抑制血管收缩的可溶性鸟苷酸环化酶抑制药物, Chun 等^[5]于 2001 年首次报道 YC-1 具有抑制 HIF-1 活性的作用。Yeo 等^[6]在一些移植瘤模型试验中发现, YC-1 能通过降低 HIF-1 α 蛋白水平、减少微血管密度、抑制 VEGF mRNA 表达而表现出显著的抗肿瘤作用。本实验结果显示:应用 YC-1 治疗人肝癌裸鼠皮下瘤时,可以显著抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤的生长。通过 RT-PCR 及 Western blot 结果显示, YC-1 在蛋白水平对 HIF-1 α 有明显的抑制作用,然而对 HIF-1 α mRNA 无明显抑制作用,说明 YC-1 在转录后水平抑制 HIF-1 α 的表达。Yeo 等^[6]研究也认为 YC-1 在 mRNA 水平对 HIF-1 α 无影响,但明显下调 HIF-1 α 蛋白表达,考虑 YC-1 对 HIF-1 α 的抑制在转录后,与本研究结果一致。Kim 等^[7]更为深入的研究发现, YC-1 能促进 HIF-1 α 的蛋白降解,通过与 HIF-1 α 的氨基酸 720~780 位的结合发挥其降 HIF-1 α 的作用,从而进一步下调 HIF-1 靶基因的表达。Li 等^[8]发现, YC-1 能下调 HIF-1 α 的 CAD 调节区域活性,同时能阻断 HIF-1 α 与 p300 的结合,从而下调 HIF-1 α 及其靶基因。本研究结果还显示 YC-1 对 HIF-1 α 靶基因 VEGF 在基因及蛋白水平都有明显的抑制作用,说明 HIF-1 α 可能通过 VEGF 依赖途径发挥作用。目前研究表明在缺氧时调节 VEGF 的信号转导途径中, HIF-1 功能首先是增强 VEGF 的转录活性,其次是增加 VEGF mRNA 的稳定性。

总之, HIF-1 α 和 VEGF 与肝细胞癌的关系密切,在肝细胞癌的发生发展过程中起重要作用, YC-

1 可能通过抑制 HIF-1 α 的表达,进一步下调 VEGF 的表达,从而抑制肿瘤生长,说明以 HIF-1 α 为靶点的治疗是可行的。YC-1 有望成为治疗肝癌的药物,其临床实用价值尚待我们去进一步研究。

参考文献:

[1] Shin DH, Kim JH, Jung YJ, et al. Preclinical evaluation of YC-1, a HIF inhibitor, for the prevention of tumor spreading [J]. Cancer Lett, 2007, 255(1): 107-116.

[2] Marx J. Cell biology. How cells endure low oxygen[J]. Science, 2004, 303(5663): 1454-1456.

[3] Giaccia AJ, Simon MC, Johns R. The biology of hypoxia the role of oxygen sensing regulator in development normal function and disease[J] Genes Dev, 2004, 18 (18): 2183-2194.

[4] Majeesh NJ, Amir S. Hypoxia-inducible factor(HIF) in human tumorigenesis [J]. Histol Histopathol, 2007, 22 (5): 559-572.

[5] Chun YS, Yeo EJ, Choi E, et al. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(8): 947-954.

[6] Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, et al. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(7): 516-525.

[7] Kim HL, Yeo EJ, Chun YS, et al. A domain responsible for HIF-1 alpha degradation by YC-1, a novel anticancer agent [J]. Int Oncolo, 2006, 29(1): 255-260.

[8] Li SH, Shin DH, Chun YS, et al. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1 alpha[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7 (12): 3729- 3738.

[编辑校对:黄国玲]