

1 缺氧诱导因子-1 α 反义寡核苷酸对新生血管形成的抑制作用

陈 治, 郑兴学, 黄宗海, 潘玉先

陈治, 郑兴学, 黄宗海, 潘玉先, 中国人民解放军252中心医院普通外科
河北省保定市 071000

通讯作者: 陈治, 071000, 河北省保定市, 中国人民解放军252中心医院普通外科.

收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 研究缺氧诱导因子-1 α 反义寡核苷酸对肿瘤血管形成的影响.

方法: 通过将腺病毒包装的反义HIF-1 α (Ad-antiHIF-1 α)和腺病毒包装的lacZ标志基因(Ad-lacZ)注射入人大肠癌鸡胚移植模型的鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)中, 观察他们对鸡胚移植瘤新生血管形成的影响.

结果: 注射Ad-antiHIF-1 α 组血管稀疏、纤细, 一级血管数(16.8 ± 1.6 vs 45.2 ± 2.8 , $t = 2.42$, $P = 0.02 < 0.05$)及二级血管数(34.8 ± 3.6 vs 58.4 ± 5.3 , $t = 2.97$, $P = 0.005 < 0.01$)均明显少于注射Ad-lacZ组.

结论: Ad-antiHIF-1 α 能有效抑制鸡胚移植瘤新生血管的形成.

陈治, 郑兴学, 黄宗海, 潘玉先. 1 缺氧诱导因子-1 α 反义寡核苷酸对新生血管形成的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(16):2043-2044
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2043.asp>

0 引言

恶性肿瘤从单一细胞生长成为实体肿瘤的过程中, 肿瘤微环境内的氧张力逐渐下降, 处于缺氧状态下的肿瘤细胞仍能不断增殖、浸润, 主要依赖于两方面的调节: 首先是肿瘤血管生成: 肿瘤生长直径超过几毫米, 就必须生成血管, 而VEGF在肿瘤血管生成调控方面起着重要作用; 其次, 肿瘤细胞在缺氧状态下通过增加糖酵解酶活性, 加速糖酵解来获得能量^[1-5]. 研究表明, VEGF基因和糖酵解过程中多种关键酶基因都是受HIF-1 α 调控的, 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^[6-10]. 我们通过设计HIF-1 α 的反义寡核苷酸, 研究他对鸡胚移植瘤的生长及诱发血管生成反应的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 含目的基因重组腺病毒的包装: 含反义HIF-1 α 重组腺病毒由第一军医大学实验中心提供, 鉴定正确的重组腺病毒大量扩增后, 经221 250 g超速离心18 h、纯化浓缩, 透析去除CsCl, 然后测定病毒浓度, 最后加同等体积的2倍浓度储存缓冲液于-70℃以下储存备用. 大肠癌LOVO细胞由第一军医大学消化实验室传代培养. 白皮受精鸡卵购买自北京农大种鸡厂, 每蛋52-64 g.

1.2 方法 参考付生法^[11]的方法制备CAM模型, 并加以改进, 新鲜受精鸡卵以1%新洁尔灭清洗后放入37℃, 60%相对湿度的孵箱内孵育, 每天翻蛋2次. 孵育至7 d在照蛋器指示下距胚头右下方1.5 cm处做标记, 用碘酒、酒精消毒后, 以标记处为中心开出1 cm × 1 cm的小窗, 滴加2滴生理盐水使鸡胚绒毛尿囊膜下塌, 与卵壳膜分离, 去除卵壳膜, 暴露鸡胚绒毛尿囊膜, 制成假气室, 用无菌贴膜封口, 窗口朝上继续孵育, 不再翻蛋. 癌细胞接种方法: 收集指数生长期的癌细胞, 用RPMI1640培养液作为稀释液将其浓度调整至 6×10^{10} /L, 吹打均匀后, 用微量加样器准确吸取0.1 mL的细胞悬液, 接种至CAM相对无血管区, 立即用无菌透明胶带封闭, 放入孵箱中继续孵育. 上述操作均在无菌超净台上进行. 将接种后鸡胚随机分为2组, 每组10个, 注射Ad-反义HIF-1 α 组为实验组, 注射Ad-lacZ的鸡胚为对照组. 于接种癌细胞后第2 d, 揭开贴膜, 用1 mL一次性注射器将预先制备的重组腺病毒0.2 mL注射入癌细胞接种区周围的绒毛尿囊膜中, 然后以贴膜覆盖后继续孵育5 d, 揭去贴膜, 向假气室内加入等量甲醇、丙酮配成的固定液, 固定15 min, 剪下鸡胚绒毛尿囊膜, 平铺于滤纸上, 在肉眼及显微镜下观察鸡胚血管生长情况, 并用近摄相机摄影, 在显微镜下计数移植瘤边缘血管数, 以移植瘤边缘1 mm为一级血管, 移植瘤边缘5 mm为二级血管分别计数.

统计学处理 所有数据均用mean \pm SD表示, 采用SAS统计软件对组间数据进行t检验.

2 结果

2.1 肉眼观察 注射Ad-反义HIF-1 α 组鸡胚绒毛尿囊膜中的血管稀疏、纤细, 血管分支及新生血管形成较少, 移植瘤周围放射状走行的微血管极不明显(图1A); 注射Ad-lacZ组从癌细胞接种后3 d开始, 鸡胚绒毛尿囊膜中的血管密度增加, 血管分支及新生血管形成较多, 大量宿主血管早放射状向瘤体集中, 形成血管辐聚现象, 移植瘤周围放射状走行的微血管非常明显(图1B).

2.2 微血管计数 注射Ad-反义HIF-1 α 组一级血管数及二级血管数均明显少于注射Ad-lacZ组(表1).

表1 注射Ad-反义HIF-1 α 及Ad-lacZ对CAM血管生成的影响(mean \pm SD)

| 分组 | 一级血管数(条) | 二级血管数(条) |
|-----------------------|------------------|------------------|
| Ad-反义HIF-1 α 组 | 16.8 ± 1.6^a | 34.8 ± 3.6^b |
| Ad-lacZ组 | 45.2 ± 2.8 | 58.4 ± 5.3 |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Ad-lacZ组.

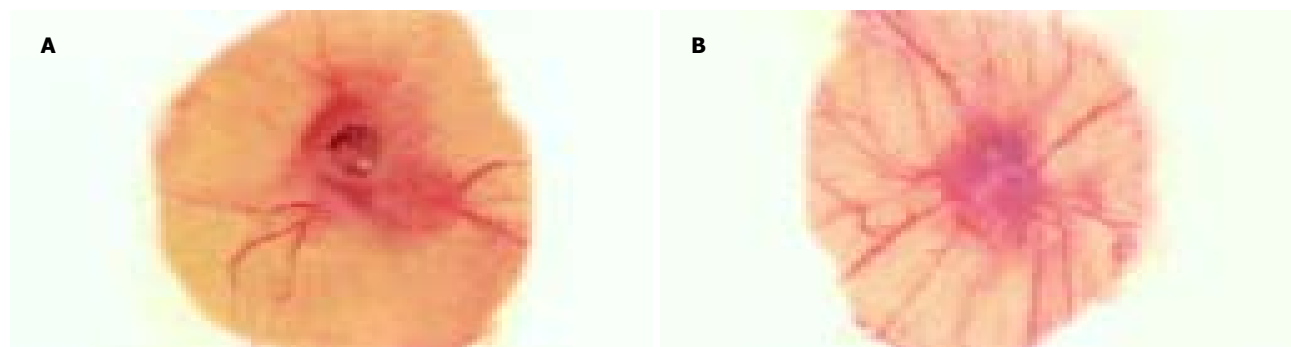


图1 注射药物后的鸡胚绒毛尿囊膜. A: Ad-反义HIF-1 α ; B: Ad-lacZ.

3 讨论

应用反义寡核苷酸封闭基因表达是基因治疗肿瘤的重要方法之一,反义技术的关键是选择合适的靶基因,最理想的靶点是肿瘤细胞生长所必需,而又不存在于正常细胞的成分.HIF-1是调节细胞内氧代谢的关键因子,对HIF-1 α 的体内功能研究发现,HIF-1 α 是血管生长信号途径的关键上游转录因子.在含氧量正常的条件下,HIF-1 α 被羟基化,而与泛肽连接酶复合物的成分V蛋白相结合,最终导致HIF-1 α 的泛肽化而降解.在缺氧条件下,HIF-1 α 的羟基化被抑制从而被激活,进一步与缺氧反应元件中的增强子结合,激活相应缺氧反应基因的转录和表达,这些缺氧反应基因包括众多血管生成因子基因.一旦新的血管生成,他们会把至关重要的氧输送给肿瘤,甚至允许癌细胞进入血液并转移至其他组织,这个过程就是肿瘤的转移.由此分析,选择HIF-1作为肿瘤治疗的靶点显然比以单一或数个血管生长因子为靶点更有价值^[12-13].

鸡胚移植模型是研究肿瘤生物学特性特别是肿瘤诱导血管生成的良好模型.本研究结果显示,在CAM移植瘤模型中,注射Ad-lacZ组鸡胚绒毛尿囊膜中的血管新生符合肿瘤血管的特点,接种区血管密度增加,血管分支及新生血管形成较多,移植瘤周围放射状走行的微血管非常明显.而注射Ad-反义HIF-1 α 组鸡胚绒毛尿囊膜中的血管稀疏、纤细,血管分支及新生血管形成较少,移植瘤周围放射状走行的微血管极不明显.说明反义HIF-1 α 基因对鸡胚移植肿瘤的血管新生有明显抑制作用.其作用机制可能是通过抑制VEGF基因的表达,减少VEGF的合成,从而使VEGF对肿瘤血管生成的特异性作用受到抑制,同时,可以通过抑制糖酵解过程中多种相关酶基因的活性,抑制肿瘤细胞代谢,从而达到抑制肿瘤生长的目的^[14-15].

4 参考文献

1 Mousa SA, Mohamed S, Wexler EJ, Kerr JS. Antiangiogenesis

and anticancer efficacy of TA138, a novel alphavbeta3 antagonist. *Anticancer Res* 2005;25:197-206

2 Gao F, Cao ML, Wang L. Brain hyaluronan binding protein inhibits tumor growth. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1072-1078

3 裘正军, 蒋弈, 胡文慧, 孙红成. HIF-1 α 、VEGF在胰腺癌组织中的表达及其与血管新生的关系. *肿瘤* 2005;25:155-158

4 Su SJ, Yeh TM, Chuang WJ, Ho CL, Chang KL, Cheng HL, Liu HS, Cheng HI, Hsu PY, Chow NH. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:307-318

5 Olsson AK, Johansson I, Akerud H, Einarsson B, Christofferson R, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L. The minimal active domain of endostatin is a heparin-binding motif that mediates inhibition of tumor vascularization. *Cancer Res* 2004;64:9012-9017

6 王燕, 丘剑世, 乔慧, 梁惠珍, 罗灿桥, 汪睿. 骨肉瘤中HIF-1 α 、VEGF、p53表达与血管生成和预后的关系. *临床与实验病理学杂志* 2004;20:182-184

7 黄耿文, 杨连粤, 鲁伟群, 杨建青, 刘合利. VEGF、HIF-1 α 、EGF在肝癌组织中的表达及其临床意义. *中华普通外科杂志* 2004;19:358-360

8 樊利芳, 夏东, 江从庆, 卢路明, 钱群, 刘志苏. HIF-1 α 和iNOS在肺癌组织血管形成中的作用. *实用癌症杂志* 2004;19:265-270

9 Martinez A, Zudaire E, Portal-Nunez S, Guedeaz S, Libutti SK, Steler-Stevenson WG, Cuttitta F. Proadrenomedullin NH2-terminal 20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumor growth. *Cancer Res* 2004;64:6489-6494

10 Hahm ER, Gho YS, Park S, Park C, Kim KW, Yang CH. Synthetic curcumin analogs inhibit activator protein-1 transcription and tumor-induced angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:337-344

11 余继海, 许文良, 汪建, 樊卫东, 傅斌生. 人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定. *安徽医学* 2003;24:4-6

12 Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, Bikfalvi A. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1643-1648

13 Yi EY, Jeong EJ, Song HS, Lee MS, Kang DW, Joo JH, Kwon HS, Lee SH, Park SK, Chung SG, Cho EH, Kim YJ. Anti-angiogenic and anti-tumor apoptotic activities of ST-8002, a topoisomerase II inhibiting agent SJ-8026. *Int J Oncol* 2005;26:1613-1620

14 邓爱军, 姜德咏. HIF-1 α 反义寡核苷酸脂质体的制备和对牛视网膜血管内皮细胞HIF-1 α 表达的影响. *医学临床研究* 2005;22:296-299

15 袁响林, 丁世英, 夏曙, 胡健莉, 胡国清, 许三鹏. 低氧对人肺腺癌A549细胞HIF-1 α 、P53和Cyclin D1表达的影响. *癌症* 2004;23:1031-1035