

# 下调缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 表达对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

王理, 姚敏, 顾星, 时运, 邱历伟, 陆少林, 姚登福

王理, 姚敏, 顾星, 时运, 邱历伟, 陆少林, 姚登福, 南通大学附属医院临床医学研究中心 江苏省南通市 226001  
王理, 博士后, 副教授, 主要从事临床医学及信息管理的研究。  
中国博士后科学基金资助项目, No. 2012M521108  
国家自然科学基金项目, No. 2013DFA32150  
作者贡献分布: 方法研究、数据整理及文章起草由王理完成; 临床资料与病例选择由姚敏完成; 顾星与时运参加完成部分研究工作; 统计分析由邱历伟完成; 设计、论文修改及审阅由姚登福与陆少林完成  
通讯作者: 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床医学研究中心. yaodf@ahnmc.com  
电话: 0513-85052413 传真: 0513-85052297  
收稿日期: 2013-04-23 修回日期: 2013-05-28  
接受日期: 2013-09-09 在线出版日期: 2013-10-08

## Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ expression inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Li Wang, Min Yao, Xing Gu, Yun Shi, Li-Wei Qiu, Shao-Lin Lu, Deng-Fu Yao

Li Wang, Min Yao, Xing Gu, Yun Shi, Li-Wei Qiu, Shao-Lin Lu, Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China  
Supported by: the Chinese Postdoctoral Science Foundation No. 2012M521108; and the International S and T Cooperation Program of China, No. 2013DFA32150  
Correspondence to: Deng-Fu Yao, Professor, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com  
Received: 2013-04-23 Revised: 2013-05-28  
Accepted: 2013-09-09 Published online: 2013-10-08

### Abstract

**AIM:** To detect the expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in human hepatocellular carcinoma and to observe the effect of silencing HIF-1 $\alpha$  gene on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells.

**METHODS:** Hepatocellular carcinoma tissue samples and matched tumor-adjacent tissue samples were collected to detect the expression and cellular distribution of HIF-1 $\alpha$  by immuno-

histochemistry. HIF-1 $\alpha$ -specific miRNAs were synthesized and screened. After HepG2 cells were transfected with a miRNA, the expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein was determined by real time-PCR and Western blot, respectively. Cell cycle progression and apoptosis were quantitatively analyzed by flow cytometry and annexin V-FITC/PI double dyeing assay.

**RESULTS:** HIF-1 $\alpha$  was distributed mainly in the cytoplasm and less in the nucleus, which was especially prominent around the central vein. The positive rate of HIF-1 $\alpha$  expression was significantly lower in hepatocellular carcinoma than in tumor-adjacent tissue (80% vs 100%,  $\chi^2 = 22.35$ ,  $P < 0.001$ ). HIF-1 $\alpha$  expression was correlated with tumor size and differentiation degree. After HepG2 cells were transfected with a miRNA, HIF-1 $\alpha$  expression was down-regulated in a time-dependent manner, the apoptosis rate increased significantly ( $P < 0.01$ ), and HepG2 cells were significantly arrested at G<sub>1</sub> phase (proportion of cells in G<sub>1</sub> phase: 61.49%  $\pm$  1.12%,  $P < 0.01$ ). In the presence of doxorubicin, the apoptosis rate and the proportion of cells in G<sub>1</sub> phase were increased to 36.99%  $\pm$  0.88% and 65.68%  $\pm$  0.91%, respectively.

**CONCLUSION:** Abnormal HIF-1 $\alpha$  expression is associated with the development of hepatocellular carcinoma. Silencing HIF-1 $\alpha$  gene efficiently inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells possibly by regulating cell cycle progression and apoptosis.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; HIF-1 $\alpha$ ; miRNA; Gene silencing; Proliferation inhibition

Wang L, Yao M, Gu X, Shi Y, Qiu LW, Lu SL, Yao DF. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(28): 2937-2944 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2937.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i28.2937>

### ■背景资料

缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是介导生理性和病理性低氧反应的关键转录因子,在缺氧环境中表达相对显著,在转录水平调控细胞增殖,调控血管新生“开关基因”,与肿瘤的生长、转移和预后等密切相关。肝癌演变过程中,正常脉管系统破坏,共同导致局部缺氧,激活HIF-1 $\alpha$ ,从而增强血管新生,促进癌细胞增殖及转移。

### ■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科; 庄林, 主任医师, 昆明市第三人民医院肝病科

## ■ 研发前沿

近年来对肿瘤血管新生的研究表明, 血管新生在肝癌的恶变、生长、转移等方面是至关重要的。VEGF是肿瘤诱导产生新生血管的最主要的细胞因子之一, 而HIF-1 $\alpha$ 则在基因水平上直接调控VEGF表达, 是恶性肿瘤诱导新生血管形成的一个主要调控因子。目前对HIF-1 $\alpha$ 调控肝癌新生血管机制的分析是研究热点, 但如何利用这种机制来治疗肝癌尚缺乏深入研究。

## 摘要

**目的:** 观察肝癌缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )表达及靶向其基因转录对肝癌细胞增殖的影响。

**方法:** 以自身配对法收集术后肝癌及癌周组织, 免疫组织化学染色法分析HIF-1 $\alpha$ 胞内表达及分布; 按照HIF-1 $\alpha$ 基因序列合成miRNA, 筛选干扰效率最佳者转染肝癌(HepG2)细胞, 以荧光定量-PCR和Western blot分别检测HIF-1 $\alpha$ 转录和蛋白表达; 并以miRNA转染联合阿霉素后, 流式细胞仪检测沉默细胞中HIF-1 $\alpha$ 对HepG2细胞增殖的影响。

**结果:** 肝癌及癌周组织HIF-1 $\alpha$ 表达呈棕黄色颗粒状, 位于胞浆和部分胞核, 呈均匀表达, 中央静脉周围明显; 其阳性率癌组织为80%, 低于癌旁100%表达( $\chi^2 = 22.35, P < 0.001$ ); 与瘤体大小和分化程度相关; HepG2细胞经miRNA干扰后, HIF-1 $\alpha$ 在RNA和蛋白水平分别下降87%和56%, 发生细胞凋亡(22.46% $\pm$ 0.61%)和G<sub>1</sub>期阻滞(61.49% $\pm$ 1.12%,  $P < 0.01$ ); 加入阿霉素后细胞凋亡率和G<sub>1</sub>期细胞分别增至36.99% $\pm$ 0.88%和65.68% $\pm$ 0.91%。

**结论:** HIF-1 $\alpha$ 过表达与肝癌密切相关, 以特异性miRNA靶向HIF-1 $\alpha$ , 可调控细胞周期, 通过加速凋亡的机制抑制癌细胞增殖。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 肝癌; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; miRNA; 基因沉默; 增殖抑制

**核心提示:** 肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma)血供丰富, 传统疗法易耐受, 预后极差。肝癌细胞增殖失控导致局部缺氧, 激活缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ), 进而增强血管新生、促进癌细胞增殖及转移, 抑制细胞凋亡和分化。本研究分析了肝癌及癌周组织HIF-1 $\alpha$ 表达, 并以miRNA或联合阿霉素在体外干扰细胞中HIF-1 $\alpha$ 表达, 观察肝癌细胞凋亡和增殖周期的变化, 发现肝癌组织内HIF-1 $\alpha$ 表达水平异常升高, 其表达增强与癌周围组织的增生生活密切相关。沉默HIF-1 $\alpha$ 可逆转缺氧引起的HIF-1 $\alpha$ 升高, 控制癌细胞增殖, 可作为一种辅助策略应用于肝癌的治疗。

王理, 姚敏, 顾星, 时运, 邱历伟, 陆少林, 姚登福。下调缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 表达对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。世界华人消化杂志 2013; 21(28): 2937-2944 URL: <http://www.wjgnet.com>

[com/1009-3079/21/2937.asp](http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2937.asp) DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i28.2937>

## 0 引言

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一多基因、多阶段发生、血供丰富、传统疗法易耐受、预后极差、高度恶性的实体瘤<sup>[1,2]</sup>。肝癌细胞增殖失控导致无效或畸形血供增加, 在慢性肝损伤、肝硬化、肝癌演变过程中, 正常脉管系统破坏, 共同导致局部缺氧<sup>[3]</sup>。肝组织缺氧微环境, 激活缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ), 促使其进入细胞核内与HIF- $\beta$ 异二聚体化, 结合于百余种下游靶基因, 发挥一系列细胞适应性调节, 从而增强血管新生、癌细胞增殖及转移、对放化疗耐受、抑制细胞凋亡和分化<sup>[4,5]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 是介导生理性和病理性低氧反应的关键转录因子, 在缺氧环境中表达相对显著, 在转录水平调控细胞增殖, 调控血管新生“开关基因”, 激活许多缺氧反应性基因表达, 与肿瘤的生长、转移和预后等密切相关<sup>[6,7]</sup>。本文分析了肝癌及癌周组织HIF-1 $\alpha$ 表达, 并以miRNA在体外干扰肝癌细胞HIF-1 $\alpha$ 表达, 或联合阿霉素观察对肝癌细胞凋亡和增殖周期的变化, 以探讨干扰HIF-1 $\alpha$ 活化对肝癌细胞的增殖抑制作用与机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 35例肝癌组织取自南通大学附属医院2012-03/2012-12肝癌手术标本, 标本切下后经40 g/L甲醛溶液固定、取材、石蜡包埋保存, 均经病理学检查证实为肝细胞癌, 其中高分化8例、中分化22例、低分化5例; 男30例, 女5例; 年龄35-69岁, 平均51岁 $\pm$ 9.19岁。癌灶直径为1.0-12.0 cm, 中位数4.65 cm $\pm$ 2.96 cm。肿瘤单发者28例,  $\geq 2$ 个者7例。所有病例均有完整随访资料, 按全国肝癌防治协作组制定的标准核实诊断。鼠抗人HIF-1 $\alpha$ 单克隆抗体(Abcam, 英国); 双荧光素酶报告基因、pGL3及pRL-TK(Promega, 美国); Annexin-V FITC凋亡检测试剂盒、FuGENE HD转染试剂(Roche, 德国); Premix Taq酶、DNA Marker、T4连接酶、Xho-I、Hind-III及SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa, 日本); RevertAid<sup>TM</sup>第一链cDNA合成试剂盒(Fermentas, 立陶宛); pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFPmiR载体、载体构建盒BLOCK-iT<sup>TM</sup>含EmGFP的Pol II miR RNAi表达

载体(Invitrogen, 美国); DYEnamic ET Dye测序(Amersham Biosciences, 美国); Top10感受态细胞(百奥生物); 鼠抗人 $\beta$ -actin一抗、HRP-羊抗鼠二抗、SDS-PAGE、彩色预染蛋白标准、PVDF膜、BCA蛋白、质粒抽提盒(碧云天生物技术有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 肝总RNA制备与浓度分析:** 称取肝组织50 mg, 置于无RNase的匀浆器中, 加入RNA快速制备试剂(TRIzol)1.0 mL匀浆2 min, 在匀浆液中加入氯仿混匀冻存, 高速离心, 上清液中加入等量异丙醇混匀, 再离心并经预冷乙醇洗涤, 弃上清至室温5 min, 加入TE缓冲液置60 °C水浴10 min, 取出置于-85 °C冰箱保存备用。取RNA提取液置微量比色皿中, 于岛津UV-2201型紫外分光光度计上检测RNA吸光度 $A_{260}$ , 并换算总RNA浓度( $\mu\text{g}/\text{mg}$ 组织)。

**1.2.2 免疫组织化学分析:** 采用二步法免疫组织化学检测法, 按照操作说明进行。组织切片常规脱蜡及水化后, 以EDTA缓冲液冲洗后微波修复10 min。加入HIF-1 $\alpha$ 一抗, 室温孵育1 h, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次后加入聚合体增强剂, 室温孵育20 min, PBS清洗切片3次后再加入二抗, 室温孵育30 min, PBS洗涤3次后经0.1% DAB显色5 min, 自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。实验以PBS代替一抗作阴性对照。阳性标准以已知表达HIF-1 $\alpha$ 的乳腺癌组织作阳性对照, 以组织中显示棕黄色颗粒为HIF-1 $\alpha$ 染色阳性。阳性细胞计数: 每份标本切片选取5个高倍镜视野( $\times 400$ )作阳性细胞计数, 按阳性细胞(清晰棕黄色染色)所占比例数分为: HIF-1 $\alpha$ 染色阴性(-), 阳性细胞数 $<10\%$ ; HIF-1 $\alpha$ 染色弱阳性(+),  $10\%-25\%$ ; HIF-1 $\alpha$ 染色中等阳性(++), 阳性细胞数在 $26\%-50\%$ ; HIF-1 $\alpha$ 染色呈强阳性(+++), 阳性细胞数 $>50\%$ 。

**1.2.3 细胞培养:** 肝癌细胞株(HepG2, 南京凯基)常规复苏后, 以RPMI 1640完全培养液(含1%非必需氨基酸), 37 °C, 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 及100%湿度的条件下培养, 传代, 取对数生长期细胞分析。设空白、阴性和干扰组, 检测细胞凋亡及周期时, 另加两组分别为阿霉素组(0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )和干扰联合阿霉素组(0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 每组均设3个复孔。空白组常规培养; 阴性组添加阴性质粒和转染试剂培养; 干扰组加靶向HIF-1 $\alpha$ 载体和转染培养。于转染后24、48和72 h收集细胞。

**1.2.3 miRNA设计:** 人HIF-1 $\alpha$  mRNA序列(NM\_001530), 用Invitrogen miRNA设计系统软件设计4对miRNA寡聚单链DNA。将4对oligo各自退火成双链。然后用载体构建试剂盒BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP(Invitrogen公司)进行重组克隆, 将双链的miRNA oligo各自插入到miRNA表达载体pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR中, 构建miRNA质粒, 筛选干扰效率最佳一对序列为5'-TGCTGTAAAGCATCAGGTTCTTCTTGT TTGGCC ACTGACTGACAAGAAGGACTGATGCTTTA-3'和5'-CCTGTAAAGCATCAGTC CTCT TGTCAGTCAGTGCCAAAA-CAAGAAGGAACCTGATGCTTT AC-3', 其中加下划线部分为靶区序列, 其上下游为茎环结构。

**1.2.4 细胞转染:** FuGENE HD转染试剂转染HepG2细胞。转染前24 h每孔接种2 mL细胞悬液, 浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 使转染时细胞密度达80%-90%。每孔加转染试剂和干扰载体, RPMI 1640完全培养液补至100  $\mu\text{L}$ , 室温静置15 min, 以形成干扰载体与转染试剂稳定复合物。吸弃培养液, PBS洗两遍, 加入干扰载体与转染试剂稳定复合物, 加完全培养液补至2 mL, 晃匀, 培养, 于转染后24、48和72 h取细胞备用。

**1.2.5 干扰效率检测:** 以QuickGene RNA culture cell试剂盒于核酸自动提取仪(Fujifilm, 日本)提取总RNA。利用第一链cDNA合成试剂盒(ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)经RT-PCR生成相应的cDNA。以各组cDNA作为模板, 利用染料法进行Real-time PCR, 目标片段扩增引物HIF-1 $\alpha$ -F和HIF-1 $\alpha$ -R的序列分别为5'-CCACTGCCACCACTGATGAA-3'(nt 2254-2273)和5'-TTGGTGA GGCTGTCC-GACTT-3'(nt 2412-2431), 产物大小178 bp, 退火温度为60 °C, 延伸循环数为40。根据相对定量法计算目标片段的扩增比例, mRNA的相对变化量公式为:  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。以GAPDH作为内参, 各样本重复3次。

**1.2.6 Western blot分析:** 制作10%分离胶, 蛋白40  $\mu\text{g}$ , 加上样缓冲液, 沸水浴后上样, 恒压80 V $\times$ 35 min, 后100 V $\times$ 60 min。结束后转膜, 封闭。取膜用TBS-T漂洗, 加鼠抗人HIF-1 $\alpha$ (1:500), 4 °C过夜, 漂洗, 加入HRP标记羊抗鼠 IgG(1:1000)二抗, 孵育2 h, 漂洗、DAB显色并摄相。

**1.2.7 Annexin V-FITC/PI法分析:** 常规消化, 接种,

## ■ 相关报道

已有的研究表明, HIF-1 $\alpha$ 可调控VEGF和Ang-2, 影响血管生成; 而干扰HIF-1 $\alpha$ 后下调VEGF、Ang等, 显著抑制血管新生, 阻断肿瘤进展。新近研究显示斯钙素(STC-2)启动子序列含有2个HIF-1 $\alpha$ 的结合位点, HIF-1 $\alpha$ 介导STC-2过表达可上调cyclin D的表达, 推动细胞G<sub>1</sub>/S期转变, HIF-1 $\alpha$ 下调后STC-2表达也随之下调。



## ■创新盘点

本研究发现在人肝细胞性肝癌组织中, HIF-1 $\alpha$ 癌周组织表达明显强于癌灶组织, 提示HIF-1 $\alpha$ 表达增强与癌周组织的增生活跃密切相关。而通过miRNA或联合阿霉素沉默HIF-1 $\alpha$ , 可逆转缺氧引起的HIF-1 $\alpha$ 升高, 控制癌细胞增殖。

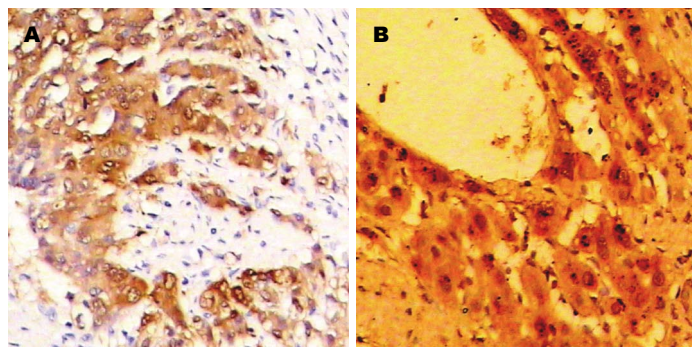


图1 肝癌及癌旁组织HIF-1 $\alpha$ 表达的免疫组织化学分析( $\times 200$ )。A: 肝癌; B: 癌旁。HIF-1 $\alpha$ : 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 。

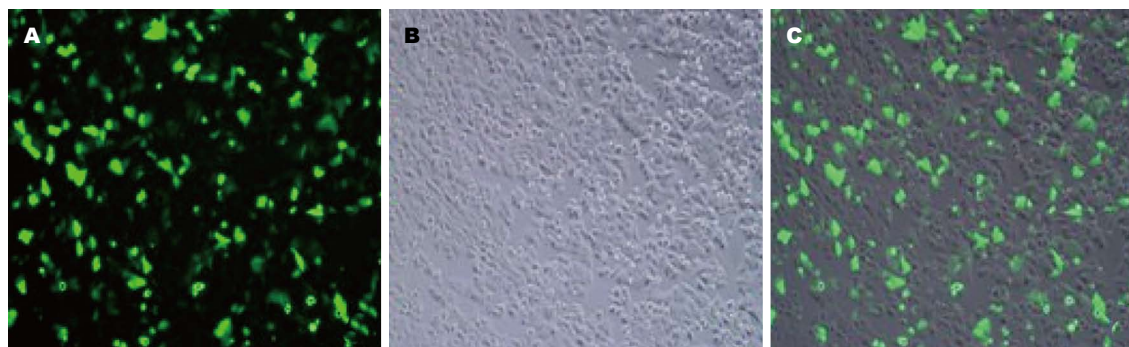


图2 HIF-1 $\alpha$  miRNA转染HepG2细胞荧光显微镜观察( $\times 10$ )。A: 荧光显微镜图; B: 同一视野普通光镜图; C: 融合图。HIF-1 $\alpha$ : 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 。

表1 肝癌及癌周组织总RNA及HIF-1 $\alpha$ 表达的分析 ( $n = 35$ )

分组	总RNA( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) (mean $\pm$ SD)	HIF-1 $\alpha$ (强度)				阳性 $n$ (%)
		-	+	++	+++	
癌灶	12.4 $\pm$ 7.3	7	21	7	0	28(80.0)
癌旁	53.8 $\pm$ 52.0 <sup>b</sup>	0	10	18	7	35(100) <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 癌灶。HIF-1 $\alpha$ : 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 。

培养, 根据设计加入相应试剂。转染加阿霉素, 分别于48、72 h后, 收集细胞, 离心, 洗涤。加入Annexin V-FLUOS/PI混合液, 重悬细胞, 避光, 流式细胞仪进行检测。

1.2.8 细胞周期: 常规消化细胞, 接种, 培养后弃培养基, 根据设计加入相应试剂, 转染后加阿霉素, 收集细胞, 固定, 洗涤, 加碘化丙啶混合液, 避光, 过300目筛网, 以488 nm波长为激发光检测, Macquig软件分析细胞周期。

**统计学处理** 数据以mean  $\pm$  SD表示, 样本均数间的比较采用方差分析, 两两比较采用 $q$ 检验。用SPSS13.0统计软件包处理、分析数据。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝癌组织HIF-1 $\alpha$ 表达与定位 免疫组织化学

显示肝癌及癌周组织HIF-1 $\alpha$ 阳性表达呈棕黄色, 颗粒状, 主要定位于胞浆中, 部分位于胞核。癌周组织HIF-1 $\alpha$ 表达均匀, 坏死区周围及浸润边缘HIF-1 $\alpha$ 表达增多(图1A)。癌旁近肿瘤边缘被压扁的组织条索中及中央静脉周围HIF-1 $\alpha$ 表达明显(图1B)。肝癌HIF-1 $\alpha$ 呈阳性表达28例占总数80%(+)-(++), 20%(7/35)未见表达; 癌周组织HIF-1 $\alpha$ 全数表达, 中等以上强度(++)-(+++), 占71.4%(25/35), 癌周表达明显高于癌组织( $\chi^2 = 22.35$ ,  $P < 0.001$ , 表1)。HIF-1 $\alpha$ 表达强度与分化程度负相关, 高分化<中分化<低分化( $P < 0.05$ ), 与肿瘤数目、HBsAg感染间均未见明显相关。

2.2 HIF-1 $\alpha$  miRNA转染与鉴定 HIF-1 $\alpha$  miRNA干扰质粒转染HepG2细胞, 于转染后24 h镜下观察, 成功转染的HepG2细胞发绿色荧光, 转染效率达45%(图2)。

表 2 HIF-1 $\alpha$ 干扰后基因的Ct与 $\Delta$ Ct值变化与比较 ( $n=3$ )

分组	24 h			48 h			72 h		
	Ct <sub>HIF-1<math>\alpha</math></sub>	Ct <sub>GAPDH</sub>	$\Delta$ Ct	Ct <sub>HIF-1<math>\alpha</math></sub>	Ct <sub>GAPDH</sub>	$\Delta$ Ct	Ct <sub>HIF-1<math>\alpha</math></sub>	Ct <sub>GAPDH</sub>	$\Delta$ Ct
空白	19.20	14.70	4.50	16.30	13.20	3.10	16.80	13.60	3.20
	19.30	14.80	4.50	16.00	12.90	3.10	16.80	13.20	3.60
	19.50	14.80	4.70	16.20	12.70	3.50	17.00	13.40	3.60
阴性	17.90	13.50	4.40	16.60	13.50	3.10	18.80	15.20	3.60
	18.30	13.30	5.00	16.70	13.00	3.70	18.80	15.00	3.80
	18.10	13.40	4.70	16.50	13.30	3.20	19.20	15.40	3.80
干扰	18.90	13.60	5.30	18.50	13.80	4.70	23.10	16.80	6.30
	18.90	13.80	5.10	18.30	13.60	4.70	23.50	16.70	6.80
	18.90	14.00	4.90	18.00	13.60	4.40	23.20	17.10	6.10

$\Delta$ Ct = Ct(HIF-1 $\alpha$ )-Ct(GAPDH). HIF-1 $\alpha$ : 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ .

表 3 miRNA干扰后HIF-1 $\alpha$ 基因相对定量与效率 ( $n=3$ )

分组	24 h			48 h			72 h		
	$\Delta$ Ct <sub>均值</sub>	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$\Delta$ Ct <sub>均值</sub>	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	$\Delta$ Ct <sub>均值</sub>	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
空白	4.57	0.00	1.00	3.23	0.00	1.00	3.47	0.00	1.00
阴性	4.70	0.13	0.91	3.30	0.10	0.93	3.73	0.27	0.83
干扰	5.10	0.53 <sup>a</sup>	0.69	4.60	1.37	0.39 <sup>ac</sup>	6.40	2.93	0.13 <sup>ace</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 组内空白组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 24 h干扰组; <sup>e</sup> $P<0.05$  vs 48 h干扰组.  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct<sub>样本</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>空白</sub>,  $2^{-\Delta\Delta$ Ct即为各组相对于空白组的干扰效率. HIF-1 $\alpha$ : 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ .

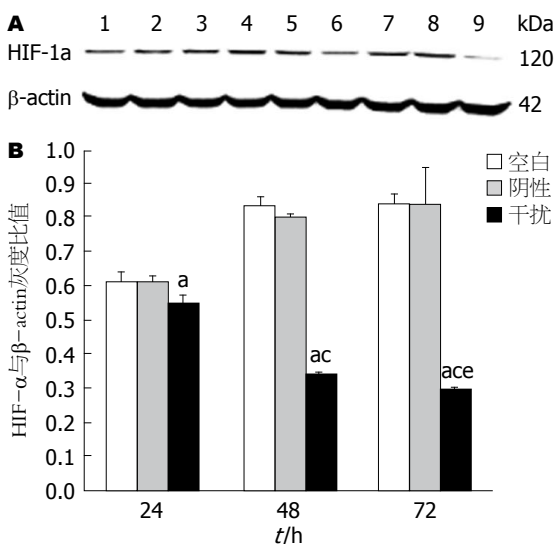


图 3 miRNA转染HepG2细胞HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达. A: 24 h(1、2、3)、48 h(4、5、6)和72 h(7、8、9)的空白、阴性和干扰组; B: HIF-1 $\alpha$ 与 $\beta$ -actin灰度扫描比值, <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 空白组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 24 h组; <sup>e</sup> $P<0.05$  vs 48 h组. HIF-1 $\alpha$ : 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ .

2.3 miRNA抑制HIF-1 $\alpha$ 基因转录 miRNA干扰HepG2细胞在转录水平上对HIF-1 $\alpha$ 表达抑制如表2. 与空白组相比, 转染HIF-1 $\alpha$  miRNA后24、

48和72 h, HepG2细胞中HIF-1 $\alpha$  mRNA表达量( $2^{-\Delta\Delta$ Ct)分别减少为0.69, 0.39和0.13, 抑制率分别为31%, 61%和87%( $P$ 值分别为0.007, 0.000和0.000); 且干扰效率依次递增( $P<0.001$ ). miRNA干扰后HIF-1 $\alpha$ 基因相对定量与效率如表3. 阴性组抑制率未见明显统计学差异. 阴性组抑制率分别为9%、7%和17%, 与空白组相比未见统计学明显差异( $P$ 值分别为0.297, 0.356和0.060).

2.4 miRNA抑制HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达 miRNA对HepG2细胞HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的抑制作用如图3. 与空白组比, 转染HIF-1 $\alpha$  miRNA干扰载体 48、72 h后HepG2细胞中HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达明显减少(图3A), HIF-1 $\alpha$ 与 $\beta$ -actin灰度扫描比值显示HIF-1 $\alpha$ 表达量分别减少为空白组的0.85、0.41、0.35, 抑制率为15%、59%、65%( $P$ 值分别为0.024、0.000和0.000); 且蛋白表达率依次递减( $P<0.05$ ). 阴性组与空白组间未见明显统计学差异(图3B).

2.5 miRNA联合阿霉素对癌细胞增殖的影响

2.5.1细胞周期改变: miRNA转染HepG2细胞48和72 h后, HepG2细胞周期时相均发生改变(表

#### 应用要点

TAE或TACE是晚期不可手术肝癌患者的疗法, 可阻断肿瘤血供引起坏死、萎缩, 但因造成缺氧, 诱导HIF-1 $\alpha$ 、VEGF等过表达, 导致侧支循环建立, 癌细胞逃逸, 残余癌迅速膨胀, 终使治疗失败. 联合HIF-1 $\alpha$ 沉默, 可逆转TAE致缺氧引起的HIF-1 $\alpha$ 、VEGF和增殖核抗原升高, 控制血管新生和癌细胞增殖, 抑制残余癌生长, 加强TAE疗效. 且HIF-1 $\alpha$ 沉默, 可逆转放化疗耐受, 可作为一种辅助策略应用于肝癌的治疗, 有应用前景.

## ■同行评价

本文结果可靠, 科学结论较明确, 实验证据较充足, 具有一定指导意义。

表 4 miRNA转染HepG2细胞周期时相的影响 (%)

分组	空白	阴性	miRNA	阿霉素	阿霉素+miRNA
48 h					
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	37.91 ± 2.05	40.12 ± 1.64 <sup>a</sup>	54.78 ± 1.64 <sup>a</sup>	57.48 ± 0.71 <sup>a</sup>	60.32 ± 1.20 <sup>ade</sup>
S	46.48 ± 2.44	43.75 ± 2.10 <sup>a</sup>	28.43 ± 0.76 <sup>a</sup>	27.31 ± 1.32 <sup>a</sup>	24.24 ± 1.88 <sup>ace</sup>
G <sub>2</sub> /M	15.61 ± 0.72	16.13 ± 0.68	16.79 ± 1.93	15.21 ± 0.77	15.44 ± 1.13
72 h					
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	56.75 ± 1.13	57.43 ± 1.27 <sup>a</sup>	61.49 ± 1.12 <sup>a</sup>	61.95 ± 0.42 <sup>a</sup>	65.68 ± 0.91 <sup>adf</sup>
S	26.14 ± 0.78	25.56 ± 1.21 <sup>a</sup>	22.40 ± 0.58 <sup>a</sup>	21.62 ± 1.19 <sup>a</sup>	19.47 ± 1.34 <sup>ace</sup>
G <sub>2</sub> /M	17.11 ± 0.36	17.01 ± 0.26	16.11 ± 1.41	16.43 ± 1.61	14.85 ± 2.07

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白组,  $G_0/G_1$ 期 $q_{48h} = 4.47$ ,  $q_{72h} = 5.50$ ; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs miRNA组, S期 $q_{48h} = 3.51$ ,  $q_{72h} = 3.48$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs miRNA组,  $G_0/G_1$ 期 $q_{48h} = 3.54$ ,  $q_{72h} = 4.50$ ; <sup>f</sup> $P < 0.01$ , S期 $q_{48h} = 2.24$ ,  $q_{72h} = 2.48$ ; <sup>g</sup> $P < 0.05$  vs 阿霉素组。

表 5 miRNA转染促进HepG2细胞凋亡

分组	48 h凋亡(%)	$q$ 值	$P$ 值	72 h凋亡(%)	$q$ 值	$P$ 值
空白	3.80 ± 0.12			8.01 ± 0.71		
阴性	4.84 ± 0.23	2.10	0.062	9.38 ± 0.44	1.34	0.081
miRNA	15.49 ± 0.99 <sup>a</sup>	23.65	0.000	22.46 ± 0.61 <sup>a</sup>	14.44	0.000
阿霉素	15.91 ± 0.37 <sup>a</sup>	24.50	0.000	27.52 ± 1.31 <sup>a</sup>	19.51	0.000
阿霉素+miRNA	27.33 ± 0.94 <sup>abd</sup>	47.40	0.000	36.99 ± 0.88 <sup>abd</sup>	28.98	0.000

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白组;  $q_{48h} = 23.75$ ,  $q_{72h} = 21.10$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs miRNA组;  $q_{48h} = 22.90$ ,  $q_{72h} = 13.74$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 阿霉素组。

4). 干扰组 $G_0/G_1$ 期比例明显高于空白组和阴性组( $P < 0.000$ ), S期比例低于空白组和阴性组( $P < 0.000$ ). 转染后48 h, 联合阿霉素组较阿霉素组 $G_0/G_1$ 期比例增高( $q = 0.10$ ,  $P = 0.045$ ), S期比例减低( $q = 2.24$ ,  $P = 0.049$ ); 转染后72 h, 联合阿霉素组较阿霉素组 $G_0/G_1$ 期比例同样增高( $q = 4.50$ ,  $P = 0.001$ ), S期比例减低( $q = 2.48$ ,  $P = 0.033$ ); 阴性组与空白组间未见统计学明显差异。而 $G_2/M$ 期比例, 各组间均未见统计学明显差异。

2.5.2 促进肝癌细胞凋亡: miRNA转染HepG2细胞48和72 h后, HepG2细胞凋亡率均明显增加(表5); 转染后48 h干扰组凋亡率为15.49% ± 0.99%, 阿霉素组凋亡率为15.91% ± 0.37%, 两者未见显著统计学差异, 而两者联合组凋亡率达27.33% ± 0.94%, 显著高于单用阿霉素组( $q = 22.90$ ,  $P < 0.001$ ); 72 h联合组凋亡率呈现同样改变( $q = 13.74$ ,  $P < 0.001$ ); 阴性组与空白组间未见显著统计学差异。

### 3 讨论

肝癌组织内HIF-1 $\alpha$ 表达水平异常升高, 肝癌组织及其周围组织中HIF-1 $\alpha$ 阳性表达呈棕黄色, 颗粒状, 主要定位于胞浆中, 部分位于胞核。肝癌发生发展的早期阶段, HIF-1 $\alpha$ 在转录和蛋白

水平上过表达, 癌前和癌变阶段在基因和蛋白表达上呈动态梯度增高<sup>[8]</sup>。在人HCC癌灶组织中, 肿瘤坏死区周围及肿瘤浸润边缘HIF-1 $\alpha$ 表达增多; 癌旁组织中靠近肿瘤边缘被压扁的肝组织条索中及中央静脉周围HIF-1 $\alpha$ 表达明显, 癌周组织表达明显强于癌灶组织<sup>[9]</sup>, 提示HIF-1 $\alpha$ 表达增强与癌周围组织的增生活跃密切相关。

HIF-1 $\alpha$ 调控VEGF和Ang-2<sup>[10,11]</sup>。干扰HIF-1 $\alpha$ 后下调VEGF、Ang等, 显著抑制血管新生, 阻断肿瘤进展<sup>[12]</sup>。干扰HIF-1 $\alpha$ 后, 随时间延长, HepG2细胞凋亡率逐渐增加, 且 $G_1$ 期细胞明显增多, S期细胞显著减少, 阻断细胞有丝分裂, 从而抑制细胞增殖。斯钙素(STC-2)启动子序列含有2个HIF-1 $\alpha$ 的结合位点, HIF-1 $\alpha$ 介导STC-2过表达可上调cyclin D的表达, 推动细胞 $G_1/S$ 期转变, HIF-1 $\alpha$ 下调后STC-2表达也随之下调<sup>[13]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 诱导髓样细胞因子、磷酸腺苷反应元件结合蛋白过表达, 降低Bax/Bcl-2比值, 抵抗凋亡; 干扰HIF-1 $\alpha$ 、bcl-2、bcl-xl下调, 抗凋亡能力减弱<sup>[14]</sup>。

HIF-1 $\alpha$ 可诱导癌细胞周围间质成纤维细胞发生自噬, 实体癌内巨噬细胞大量浸润及局部缺氧, 缺氧促使巨噬细胞介导的T细胞功能抑制效应增强, 靶向干扰巨噬细胞中HIF-1 $\alpha$ , 明显抑制了移植瘤的生长<sup>[15]</sup>。丝氨酸/苏氨酸激酶



-15(STK-15)是细胞周期的重要调节因子、HIF-1 $\alpha$ 下游靶基因,可编码一种中心体复制相关激酶,并具高水平的酪氨酸激酶活性,参与调节、G<sub>2</sub>/M期转换等,干扰HIF-1 $\alpha$ 后,STK-15明显减少<sup>[16]</sup>。阻断HIF-1 $\alpha$ 活化,可显著增强化疗敏感性,抑制肿瘤生长。HIF-1 $\alpha$ 可上调多重耐药基因 $mdr1$ ,下调Bax、caspase3表达,抑制P53活性,参与耐药形成;干扰后可增强化疗药物诱导的凋亡,逆转其化疗耐药<sup>[17,18]</sup>。HIF-1下调后,提高化疗敏感性,抑制肿瘤形成<sup>[19]</sup>。阿霉素联合干扰,凋亡率明显比单组高,表明沉默HIF-1 $\alpha$ 可显著提高化疗敏感性。

TAE或TACE是晚期不可手术肝癌患者的疗法,可阻断肿瘤血供引起坏死、萎缩,但因造成缺氧,诱导HIF-1 $\alpha$ 、VEGF等过表达,导致侧支循环建立,癌细胞逃逸,残余癌迅速膨胀,终使治疗失败<sup>[20]</sup>。联合HIF-1 $\alpha$ 沉默,可逆转TAE致缺氧引起的HIF-1 $\alpha$ 、VEGF和增殖核抗原升高,控制血管新生和癌细胞增殖,抑制残余癌生长,加强TAE疗效。且HIF-1 $\alpha$ 沉默,可逆转放化疗耐受,可作为一种辅助策略应用于肝癌的治疗,具有应用前景<sup>[21]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 Yao DF, Jiang H, Yao M, Li YM, Gu WJ, Shen YC, Qiu LW, Wu W, Wu XH, Sai WL. Quantitative analysis of hepatic hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and its abnormal gene expression during the formation of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 407-413 [PMID: 19666411]
- 2 Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer* 2007; 96: 1127-1134 [PMID: 17406349 DOI: 10.1038/sj.bjc.6603649]
- 3 van Malenstein H, Verslype C, Windmolders P, van Eijdsden R, Nevens F, van Pelt J. Characterization of a cell culture model for clinically aggressive hepatocellular carcinoma induced by chronic hypoxia. *Cancer Lett* 2012; 315: 178-188 [PMID: 22088439 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.09.039]
- 4 Xiang ZL, Zeng ZC, Fan J, Tang ZY, He J, Zeng HY, Chang JY. The expression of HIF-1 $\alpha$  in primary hepatocellular carcinoma and its correlation with radiotherapy response and clinical outcome. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 2021-2029 [PMID: 21647551 DOI: 10.1007/s11033-011-0949-1]
- 5 Jiao M, Nan KJ. Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1 $\alpha$  pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2012; 40: 461-468 [PMID: 21922131]
- 6 Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 537-547 [PMID: 21830968 DOI: 10.1056/NEJMr1011165]
- 7 姚登福, 邱历伟, 吴玮, 姚宁华, 李姗姗, 卞银珠. 血管内皮生长因子动态表达及干预对肝细胞癌变的影响. *中华医学杂志* 2010; 90: 3014-3018
- 8 Li S, Yao D, Wang L, Wu W, Qiu L, Yao M, Yao N, Zhang H, Yu D, Ni Q. Expression characteristics of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and its clinical values in diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2011; 11: 821-828 [PMID: 2224081]
- 9 Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T, Fan J. Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 $\alpha$  to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3042-3053 [PMID: 22512980 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0183]
- 10 Sebastia J, Kieran D, Breen B, King MA, Nettelband DF, Joyce D, Fitzpatrick SF, Taylor CT, Prehn JH. Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1238-1247 [PMID: 19444281 DOI: 10.1038/cdd.2009.52]
- 11 Simon MP, Tournaire R, Pouyssegur J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol* 2008; 217: 809-818 [PMID: 18720385 DOI: 10.1002/jcp.21558]
- 12 Kim TH, Hur EG, Kang SJ, Kim JA, Thapa D, Lee YM, Ku SK, Jung Y, Kwak MK. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 $\alpha$ . *Cancer Res* 2011; 71: 2260-2275 [PMID: 21278237 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3007]
- 13 Chiche J, Rouleau M, Gounon P, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* 2010; 222: 648-657 [PMID: 19957303]
- 14 Torii S, Goto Y, Ishizawa T, Hoshi H, Goryo K, Yasumoto K, Fukumura H, Sogawa K. Pro-apoptotic activity of inhibitory PAS domain protein (IPAS), a negative regulator of HIF-1, through binding to pro-survival Bcl-2 family proteins. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1711-1725 [PMID: 21546903 DOI: 10.1038/cdd.2011.47]
- 15 Thomas S, Harding MA, Smith SC, Overdevest JB, Nitz MD, Frierson HF, Tomlins SA, Kristiansen G, Theodorescu D. CD24 is an effector of HIF-1-driven primary tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2012; 72: 5600-5612 [PMID: 22926560 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3666]
- 16 Klein A, Flügel D, Kietzmann T. Transcriptional regulation of serine/threonine kinase-15 (STK15) expression by hypoxia and HIF-1. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 3667-3675 [PMID: 18562694 DOI: 10.1091/mbc.E08-01-0042]
- 17 Lau CK, Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Yeoh GC, Poon RT, Fan ST. An Akt/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /platelet-derived growth factor-BB autocrine loop mediates hypoxia-induced chemoresistance in liver cancer cells and tumorigenic hepatic progenitor cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3462-3471 [PMID: 19447872 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2127]
- 18 Brökers N, Le-Huu S, Vogel S, Hagos Y, Katschinski DM, Kleinschmidt M. Increased chemoresistance induced by inhibition of HIF-prolyl-hydroxylase domain enzymes. *Cancer Sci* 2010; 101: 129-136 [PMID: 19817749 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01367.x]
- 19 Kasuya K, Tsuchida A, Nagakawa Y, Suzuki M, Abe Y, Itoi T, Serizawa H, Nagao T, Shimazu M,

- Aoki T. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression and gemcitabine chemotherapy for pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2011; 26: 1399-1406 [PMID: 21922147]
- 20 Chen C, Wang J, Liu R, Qian S. RNA interference of hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  improves the effects of transcatheter arterial embolization in rat liver tumors. *Tumour Biol* 2012; 33: 1095-1103 [PMID: 22407533 DOI: 10.1007/s13277-012-0349-8]
- 21 Sun X, Jiang H, Jiang X, Tan H, Meng Q, Sun B, Xu R, Krissansen GW. Antisense hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  augments transcatheter arterial embolization in the treatment of hepatocellular carcinomas in rats. *Hum Gene Ther* 2009; 20: 314-324 [PMID: 19327024 DOI: 10.1089/hum.2008.164]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。