

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0298-03

缺氧诱导因子-1——肿瘤治疗的新靶点

张琪 综述; 钱其军, 吴孟超 审阅 (第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因实验室, 上海 200438)

[摘要] 肿瘤细胞的失控生长容易产生肿瘤内缺氧微环境, 进而诱导缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 的形成。HIF-1 为一异源二聚体转录因子, 在多种肿瘤中广泛存在, 且受多种因素调节。它与一系列缺氧反应靶基因上的特定结合位点缺氧反应元件 (HRE) 结合, 从而启动靶基因的转录表达, 同肿瘤的增殖、转移密切相关。以 HIF-1 为靶点可能为肿瘤治疗提供一新的策略。

[关键词] 缺氧诱导因子 1; 缺氧反应元件; 肿瘤; 治疗

[中图分类号] R730.59 **[文献标识码]** A

* 肿瘤的最主要的特征是肿瘤细胞的失控生长, 不断增多的细胞数将导致耗氧量的增加, 造成肿瘤内缺氧微环境的形成, 这在人实体瘤中表现的尤其明显。利用氧电极测量法, 一些研究证实在一系列实体瘤, 包括脑、头、颈、乳腺、子宫的肿瘤和软组织肿瘤中, 氧浓度低下, 在正常组织中平均氧浓度在 40 ~ 60 mmHg (1 mmHg = 133.322 Pa), 而大多实体瘤中平均氧浓度不足 10 mmHg。肿瘤组织的缺氧在肿瘤形成的病理过程中异常重要, 同肿瘤对放疗、化疗耐受及恶性进展、远处转移密切相关^[1]。缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 是在缺氧条件下存在于哺乳动物和人体内一种转录因子, 它最先由 Semenza 等^[2]于 1992 年在缺氧诱导的细胞核抽提物中发现。它广泛存在于人和动物的多种肿瘤细胞中, 可调控一系列靶基因如 VEGF, GLUT1, GLUT3 等的转录, 在肿瘤增殖、转移中起着重要作用。本文就 HIF-1 因子同肿瘤的关系及相应的治疗策略做一综述。

1 HIF-1 的分子结构和细胞生物学活性

HIF-1 是由均含有碱性螺旋-环-螺旋 (basic-helix-loop-helix, bHLH) 结构的 HIF-1 α 和 HIF-1 β 亚单位组成的异源二聚体转录因子, 基因分别定位于 14q21 ~ 24 和 1q21^[2]。人的 HIF-1 α cDNA 全长 3.7 kb, 含 15 个外显子、14 个内显子。不同的外显子编码有不同的功能结构域, 其开放阅读框 2 478 bp, 编码 826 个氨基酸, 它是唯一的 O₂ 调节亚单位, 决定 HIF 的活性^[3]。通常在氧浓度正常时, HIF-1 α 在细胞内表达量维持在较低水平, 易于泛醌化 (ubiquitination) 被蛋白酶水解, 当细胞氧浓度降低时, HIF-1 α 的转录、翻译水平则呈指数增加。HIF-1 β 在常氧和缺氧状态下均可表达, 它是芳烃受体核转位子, cDNA 全长为 2.6 kb, 其开放阅读框有 2 367 bp 和 2 322 bp 2 种, 分别编码 789 个和 774 个氨基酸。它与 HIF-1 α 结合成二聚体形成有活性的 HIF-1, 抵抗蛋白水解酶的降解。

2 HIF-1 的靶基因及调控机制

缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 作为转录因子, 可调控 40 余种

基因的表达^[4], 这些基因表达的蛋白有利于肿瘤在缺氧条件下的能量代谢和氧输送。例如, HIF-1 激活 VEGF 的转录, 该基因编码肿瘤血管生成所必需的血管内皮生长因子; HIF-1 的靶基因还包括编码葡萄糖转运因子 1, 3 (GLUT1, 3), 糖酵解酶 (如醛缩酶 A, C; 烯醇化酶 1; 己糖激酶 1, 3; 乳酸脱氢酶 A; 磷酸果糖激酶 L; 磷酸甘油酸激酶 1 等)。HIF-1 还可调控编码胰岛素样生长因子 2 (IGF2) 的基因, 它可延长肿瘤细胞的生存。HIF-1 活性的丧失将明显抑制肿瘤的生长、血管生成及能量代谢。

在缺氧条件下, 肿瘤细胞内的诸多靶基因的转录、表达发生变化, 对缺氧做出应激反应。这些靶基因的启动子或增强子内含有一个或多个缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE), 典型的核苷酸序列为 5'-ACGTGC-3', 又称反式作用 DNA 序列, 是 HIF-1 的 DNA 结合位点^[5]。活化的 HIF-1 与靶基因上的 HIF-1 的结合位点相结合, 形成转录起始复合物从而启动靶基因的转录, 该转录复合物除含有 HIF-1 外还含有 P300/CBP 环腺苷酸反应元件结合蛋白 (cAMP response elements binding protein, CREB) 及其他转录因子。HIF-1 β 亚基与靶基因上的 5'-ACGTGC-3' 序列即 HRE 结合, P300/CBP 则通过其 CH1 区与 HIF-1 α 发生作用。当 5'-ACGTGC-3' 发生点突变或甲基化时, HIF-1 就不能与靶基因结合。

有必要提出的是, 最新的研究表明, 多药耐受基因 (MDRI) 也是 HIF-1 作用的靶基因, 它所表达的 P-糖蛋白 (P-Glycoprotein) 为 17 kD 的跨膜蛋白, 可受缺氧诱导, 同肿瘤对化疗抵抗相关^[5]。早先的研究利用 RNA 定量微阵分析发现上皮细胞暴露于缺氧条件下, MDRI 可提高 7 倍, 这些发现在 mRNA 和蛋白水平也得到证实。缺氧还可使 P-糖蛋白的活性增加 7 倍。随后的研究证实 MDRI 启动子内含有功能性的 HIF-1 结合位点, 经典的 HIF 结合位点位于转录起始点-

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作重大项目资助; 国家“863”高技术研究发展计划基金资助 (2001A217031); 上海市青年科技启明星计划基金资助项目 (99QB14046)

49 到-45,另一 HIF-1 辅助序列位于 3'端的核苷酸-37 到-33 的位置。用反义寡核苷酸阻遏 HIF-1 表达,可明显阻遏缺氧诱导的 MDRI 的表达,甚至完全丧失。当 HIF-1 结合位点缺失或出现突变时,亦可出现类似的现象。值得一提的是,通过反义寡核苷酸封闭 HIF-1 α ,或破坏 5'启动子及 HIF-1 结合位点突变同样可以降低 MDRI mRNAs 在非缺氧细胞中的表达,提示 HIF 可能对 MDRI 的基本表达起作用。

表 1 HIF-1 α 表达调节因素

HIF-1 α 表达调节因素	举例
上调(激活)	
氧浓度	$\leq 1\% O_2$
二价阳离子可以模拟低氧诱导 HIF-1 α 表达	铁、镍、钴二价化合物
癌基因	如胰岛素样生长因子 1,2; V-Src 等
细胞因子	IL-1, EGF
下调(抑制)	
一氧化碳化合物,可以阻止 HIF 与 DNA 结合活性	CO, NO
某些抑癌基因促进 HIF-1 α 降解,降低其活性	如 P53, PTEN, VHL 等

4 人类肿瘤中 HIF-1 α 过度表达的后果

对人类肿瘤标本的免疫组化分析显示,在大多肿瘤中 HIF-1 α 呈过度表达,这是由细胞内缺氧和遗传变异共同作用的结果^[6]。在脑肿瘤、卵巢癌和乳腺原位导管癌中, HIF-1 α 的过度表达同血管密度有关,提示 HIF-1 的活性是血管生成的开关^[6,7]。在一些不同种类的肿瘤中, HIF-1 α 过度表达也是高度侵袭性疾病的一个生物标志。在早期宫颈癌和淋巴结转移阳性的乳腺癌, HIF-1 α 过表达同较高的死亡率相关联。因此,在乳腺癌和宫颈癌中,纵使肿瘤组织的病理分级较低,如免疫组化 HIF-1 α 阳性,病人仍会面临着较高的治疗无效率和死亡率^[7,8]。Monika 等对 206 例淋巴结转移阳性的乳腺癌标本的 HIF-1 α 表达进行分析,免疫组化显示 48 例(23.3%)浸润性癌细胞中 HIF-1 α 核内表达呈强阳性, 74 例(35.9%)呈中度表达, 35 例(17%)呈弱阳性,另 49 例(23.7%)标本未检测 HIF-1 α 的表达^[9]。HIF-1 α 蛋白的过表达同较短的总生存期及无病生存期相关,是进展期乳腺癌的一个独立预后因素。在此组病人中, HIF-1 α 过表达组的病人同无 HIF-1 α 表达或表达呈弱阳性的病人相比,无病生存期和总生存期明显缩短。Bos 等^[10]在早期的研究中认为 HIF-1 α 的表达同原位导管癌的组织学分级相关联,提出 HIF-1 α 在早期乳腺癌形成中可能起到一定的作用。但 Monika 在研究中却并未得出这一结论。在口咽部鳞状细胞癌, HIF-1 α 高表达的患者接受放疗要比未检测到 HIF-1 α 高表达或 HIF-1 α 过表达在肿瘤细胞中 <10% 的病人达到完全缓解率的可能性低 3 倍, Kaplan-Meier 生活曲线也存在明显差异。

3 HIF-1 表达的调节

HIF-1 的生理活性是由 HIF-1 α 亚基的活性和表达决定的。HIF-1 α 的表达和活性调节可体现在多级水平,包括基因转录、蛋白表达、核内定位及激活。HIF-1 α 表达的调节因素有以下几种(如表 1 所示)。

在小突胶质细胞癌 HIF-1 α 过表达的病人,无论肿瘤分级如何,预后不容乐观^[4]。在脑肿瘤中的多形角质细胞瘤中, HIF-1 α 的过表达水平最高,病人一旦出现这种情况,即使治疗,平均生存时间一般不会超过一年。在一些癌前病变,如结肠腺瘤、乳腺原位导管癌、前列腺上皮内瘤样形成, HIF-1 α 蛋白亦呈过度表达,提示 HIF-1 α 过表达在癌发生早期便出现了,早于组织学上的血管形成和浸润。

在肿瘤组织中, HIF-1 α 阳性细胞簇在肿瘤浸润边缘、坏死区及新生血管的周围最为密集^[7,11]。一些淋巴结中含有转移癌细胞的淋巴细胞 HIF-1 α 免疫组化染色亦呈阳性,但在未恶变的体细胞中则未检测到其表达。

在实验中表明,移植缺乏 HIF-1 表达的突变大鼠肝癌细胞同移植表达 HIF-1 的来自亲代或回复突变的癌细胞相比,生长速率及血管形成明显降低。相反,人结肠癌细胞转染 HIF-1 α 表达载体后,裸鼠种植瘤的生长速率同亲代癌细胞相比,生长速率明显提高^[12]。

5 HIF-1 在肿瘤诊治上的意义

5.1 HIF-1 在诊断中的作用

HIF 在肿瘤进展中的作用的系列研究对临床有着重要的意义。首先,对肿瘤标本的 HIF-1 α 表达的免疫组化分析可能为预后提供有用信息,由此可鉴定出一组病人,他们需要有别于一般病人的进一步的治疗方案。在脑肿瘤中,多形胶质瘤 HIF-1 α 表达水平最高。这类病人预后极差,纵使治疗,平均生存时间不超过 1 年。因此,对于这种情况,迫切需要新的治疗方案^[4,13],而利用 HIF-1 的基因生物治疗可能会

为这类难治性肿瘤提供新的途径。

5.2 针对 HIF-1 的化疗药

目前进行临床试验的几种新的化疗药的抗肿瘤作用部分可能来自于它们对 HIF-1 α 表达的抑制^[14]。如, rapamycin 通过抑制 serine/theonine 激酶 FRAP 使 P13K-AKT-FRAP 诱导的 HIF-1 α 表达丧失, 从而阻止肿瘤血管的生成和肿瘤转移。

5.3 针对 HIF-1 的基因治疗

肿瘤基因治疗的主要困阻在于缺乏一种有效的肿瘤特异性运载系统, 以达到在肿瘤组织中特异性表达治疗基因的目的^[15]。由于缺氧可以刺激许多靶基因包括 Epo、VEGF、糖酵解途径中的酶、葡萄糖转运蛋白 1 等基因的转录, 因而利用实体瘤独特的缺氧微环境来调控治疗基因在肿瘤内的特异性表达是合理的。其中的一个策略是研制出对 HIF-1 高度反应的启动子, 从而启动治疗基因在肿瘤中的特异性表达。利用受缺氧反应启动子调控的前药物转化酶基因, 将无毒性前药转化成对肿瘤有毒性的药物。这一观点已得到证实, Shibata^[16]构建了受缺氧反应启动子调控的硝基还原酶的载体, 在缺氧条件下能将无毒性的 CB1954 转化成毒性形式, 在体外和体内实验中都显示出了抗肿瘤的疗效。还有研究用缺氧启动子来调控腺病毒或腺相关病毒载体, 达到特异性溶解肿瘤细胞或运输治疗基因的目的^[17-18]。我们课题组已成功构建了由人端粒酶逆转录酶启动子和缺氧启动子双调控的增殖腺病毒载体, 并在动物移植瘤模型中观测到明显抑瘤效果。

此外尚有人提出用反义 RNA 或结构域失活的策略来抑制 HIF-1 的活性以杀伤癌细胞, 降低它对放疗、化疗的抵抗。另外, 还可通过阻断 HIF-1 α 与 P300/CREB CH1 区之间的相互作用使 HIF-1 基因表达减弱, 抑制靶基因的转录激活从而抑制肿瘤生长^[19-20]。

总之, 尽管人肿瘤中缺氧的存在是肿瘤治疗中的一个不良预后指标, 但它同时也为选择性肿瘤治疗提供了重要靶向。类似的以缺氧为基础的选择性治疗方案尚未应用于临床, 但显示潜在前景的治疗策略正在实验室和临床研究之中, 它极有可能为肿瘤治疗提供一条新的出路。

[参考文献]

- [1] Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(15): 8104-8109.
- [2] Gassmann M, Chilov D, Wenger RH. Regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha. ARNT is not necessary for hypoxic induction of HIF-1 alpha in the nucleus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 475: 87-99.
- [3] Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, *et al.* Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension[J]. *J Biol Chem*, 1997,

272(31): 19253-19260.

- [4] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics[J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8(4 Suppl): S62-67.
- [5] Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12): 3387-3394.
- [6] Birner P, Schindl M, Obermair A, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: Its impact on prognosis and on response to chemotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(6): 1661-1668.
- [7] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5830-5835.
- [8] Birner P, Schindl M, Obermair A, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4693-4696.
- [9] Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(6): 1831-1837.
- [10] Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, *et al.* Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(4): 309-314.
- [11] Talks KL, Turley H, Gatter KC, *et al.* The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages[J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(2): 411-421.
- [12] Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(15): 8104-8109.
- [13] Vukovic V, Haugland HK, Nicklee T, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20): 7394-7398.
- [14] Workman P, Kaye SB. Translating basic cancer research into new cancer therapeutics[J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8(4 Suppl): S1-S9.
- [15] Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: Mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Mol Med Today*, 2000, (6): 157-162.
- [16] Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy[J]. *Neoplasia*, 2002, 4(1): 40-48.
- [17] Post DE, Van Meir EG. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy[J]. *Oncogene*, 2003, 10, 22(14): 2065-2072.
- [18] Ruan H, Su H, Hu L, *et al.* A hypoxia-regulated adeno-associated virus vector for cancer-specific gene therapy[J]. *Neoplasia*, 2001, 3(3): 255-263.
- [19] Ratcliffe PJ, Pugh CW, Maxwell PH. Targeting tumors through the HIF system[J]. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1315-1316.
- [20] Kung AL, Wang S, Klco JM, *et al.* Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription[J]. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1335-1340.

[收稿日期] 2003 - 05 - 29

[修回日期] 2003 - 07 - 20