

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0357-05

反义 HIF-1 α 基因联合血管抑素基因对人卵巢癌裸鼠移植瘤的抑制作用孙 平¹,董典宁²,孔北华^{1*}(1. 山东大学 齐鲁医院 妇产科,济南 250012; 2. 山东省立医院 血管外科,济南 250021)

[摘 要] 目的: 研究反义缺氧诱导因子-1 α (antisense hypoxia inducible factor-1 α , aHIF-1 α)基因联合血管抑素(angiostatin)基因对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤的协同治疗作用。方法: 使用人卵巢癌细胞株 SKOV3 建立裸鼠皮下移植瘤模型。将荷瘤裸鼠随机分为 4 组, 分别注射空质粒 PcDNA3、PcDNA3-Angiostatin、PcDNA3B-aHIF-1 α 、PcDNA3-Angiostatin + PcDNA3B-aHIF-1 α 。观察各组动物的肿瘤生长曲线, 检测各组肿瘤组织 Angiostatin、血管内皮生长因子(VEGF)、HIF-1 α 的表达和微血管密度(MVD), 利用 TUNEL 染色法行原位细胞凋亡分析。结果: Angiostatin 基因联合 aHIF-1 α 基因治疗组裸鼠的肿瘤生长受到明显抑制, 肿瘤组织中 HIF-1 α 蛋白局部低表达, MVD(13.6 \pm 2.3)明显低于 Angiostatin 基因治疗组(24.5 \pm 2.7), VEGF 表达低于各单独治疗组和对照组, 细胞凋亡指数(5.32 \pm 0.62)高于 Angiostatin 基因治疗组(2.89 \pm 0.45), aHIF-1 α 基因治疗组(2.98 \pm 0.51)和对照组(1.56 \pm 0.41)。结论: Angiostatin 基因联合 aHIF-1 α 基因治疗卵巢癌裸鼠皮下移植瘤可以产生协同抑制作用, 可在一定程度上解决肿瘤的抗血管生成治疗的耐药性问题。

[关键词] 血管抑素; 缺氧诱导因子; 基因治疗; 抗血管生成治疗; 卵巢癌**[中图分类号]** R730.5 **[文献标志码]** A**Inhibitory effects of angiostatin gene combined with antisense hypoxia inducible factor-1 α gene transfection on implanted human ovarian carcinoma in nude mice**SUN Ping¹, DONG Dian-ning², KONG Bei-hua^{1*}(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China; 2. Department of Vascular Surgery, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the synergistic inhibitory effect of angiostatin gene combined with antisense hypoxia inducible factor-1 α (aHIF-1 α) gene on implanted human ovarian carcinoma in nude mice. **Methods:** BALB/C nude mice were subcutaneously transplanted with SKOV3 tumor cells and the tumors were allowed to grow till the diameter reached 0.4 cm, then the mice were randomly divided into 4 groups: PcDNA3 control group, PcDNA3-Angiostatin group, PcDNA3B-aHIF-1 α group and PcDNA3-Angiostatin + PcDNA3B-aHIF-1 α group; plasmids PcDNA3, PcDNA3-Angiostatin, PcDNA3B-aHIF-1 α and PcDNA3-Angiostatin + PcDNA3B-aHIF-1 α were injected intra-tumorally in the above groups, respectively. The tumor samples were harvested on the 7 th day after gene transfer. Angiostatin, HIF-1 α , vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) of tumors were determined by immunohistochemical methods. Tumor cell apoptosis was determined with TUNEL staining. **Results:** The growth of tumors of PcDNA3-Angiostatin + PcDNA3B-aHIF-1 α group was significantly inhibited, with local low expression of HIF-1 α and VEGF (lower than those of the other 3 groups). MVD in combined transfection group(13.6 \pm 2.3) was lower than that of Angiostatin group (24.5 \pm 2.7); the apoptosis index in combined transfection group (5.32 \pm 0.62) was higher than those of Angiostatin group(2.89 \pm 0.45), aHIF-1 α group(2.98 \pm 0.51) and control group(1.56 \pm 0.41). **Conclusion:** Our results suggest a synergistic effect between Angiostatin gene and aHIF-1 α gene in inhibiting implanted human ovarian tumors in nude mice, which may contribute to drug resistance in antiangiogenic therapy of tumors.

[Key words] angiostatin; hypoxia inducible factor-1 α ; gene therapy; antiangiogenic therapy; ovarian cancer

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 357-361]

[基金项目] 山东省中青年科学家科研奖励基金资助(No.2006BSB14028)。Supported by Science Fund for Distinguished Young Scholars of Shandong Province(No.2006BSB14028)**[作者简介]** 孙 平(1977-), 女, 山东省济南市人, 主治医师, 主要从事妇产科疾病的临床诊疗及基础研究工作, E-mail: sp77223@sina.com

* Corresponding author. E-mail: kongbeihua@sdu.edu.cn

卵巢癌一向是妇科肿瘤研究的热点和难点。随着外科手术和放、化疗技术的发展,卵巢癌的病死率已有所下降,但晚期卵巢癌的5年存活率仍低于15%~30%,因此探索治疗卵巢癌的新方法显得尤为重要。

1971年Folkman^[1]首先提出通过抑制肿瘤血管生成来治疗肿瘤的理论。血管生成抑制剂的作用靶点是机体基因相对稳定的正常血管内皮细胞,所以一直以来被认为能够避免或者明显延迟耐药性的产生^[2]。然而,一些新的研究结果^[3]提示肿瘤也可对抗血管生成药物逐渐失去反应即获得耐药性,尤其在单独给药时最为明显。目前的资料显示,对抗血管生成治疗产生耐药性的关键因素之一是肿瘤自身的缺氧适应途径,故本课题拟在应用血管抑素(Angiostatin)基因抑制卵巢癌血管生成的同时,用反义缺氧诱导因子-1 α (antisense hypoxia inducible factor, aHIF-1 α)基因阻断肿瘤组织的缺氧适应途径来治疗人卵巢癌裸鼠移植瘤,并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人卵巢上皮浆液性囊腺癌细胞株(SKOV3)由山东大学齐鲁医院中心实验室保存。BALB/c遗传背景的雌性裸小鼠,共48只,4~6周龄,体重17~19g,购自中国科学院上海实验动物中心[动物质量合格证号:SCXK(沪)2003-0003]。质粒PcDNA3、含血管抑素基因的质粒PcDNA3-Angiostatin、含反义缺氧诱导因子基因的质粒PcDNA3B-aHIF-1 α 由新西兰奥克兰大学孙学英博士惠赠^[4,5]。

1.2 质粒制备和细胞培养

真核表达质粒用分子生物学的方法扩增制备,经酶切、测序鉴定。人卵巢癌细胞株SKOV3用含有10%小牛血清的1640培养液在37℃、5%CO₂条件下培养。细胞生长至对数生长期,用0.25%胰蛋白酶消化,用PBS制成细胞悬液,调整细胞密度至 3×10^7 /ml,用于建立动物模型。

1.3 动物模型的建立及实验分组

每只裸鼠背部皮下注射细胞悬液0.1ml,待裸鼠肿瘤长径为0.4cm时,将荷瘤裸鼠随机分为4组,分别为PcDNA3对照组、PcDNA3-Angiostatin治疗组、PcDNA3B-aHIF-1 α 治疗组、PcDNA3-Angiostatin + PcDNA3B-aHIF-1 α 治疗组,每组12只裸鼠,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。

1.4 移植瘤的基因治疗

基因转染液^[3]总体积为100 μ l,常温下配制,其中纯化的真核表达质粒50 μ l(浓度约为2 mg/ml),DOTAP 40 μ l,50% Glucose 10 μ l,1% Triton X-100 1 μ l。基因转染液直接瘤体内多点注射。各实验组分别注射PcDNA3、PcDNA3-Angiostatin、PcDNA3B-aHIF-1 α 、PcDNA3-Angiostatin + PcDNA3B-aHIF-1 α (药物质量浓度均为为1 μ g/ μ l,总量为100 μ l)。其中联合治疗组先注射PcDNA3-Angiostatin,24h后注射PcDNA3B-aHIF-1 α 。

1.5 基因治疗后移植瘤生长的观察

注射药物后,每天观察肿瘤生长状况,每3d用游标卡尺测量肿瘤长、短径,计算肿瘤的体积,肿瘤体积 $= \pi/6 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$ ^[6], π 值取3.14。绘制皮下移植瘤生长曲线。

1.6 免疫组织化学(SABC法)检测瘤组织中Angiostatin、aHIF-1 α 、VEGF的表达

注射药物后7d切取肿瘤组织标本,10%甲醛液固定,石蜡包埋、4 μ m厚连续切片,检测各实验组组织中Angiostatin、VEGF、aHIF-1 α 的表达情况。免疫组化的结果结合Mias-2000型病理图像分析系统,由两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^[8]:随机选择5个高倍镜视野(400倍)观察,细胞质着色成棕黄色为阳性,Angiostatin、VEGF、aHIF-1 α 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(+++)。

1.7 免疫组织化学法检测瘤组织中的微血管密度

取1.6中制备的瘤组织病理切片,应用CD31抗体NEC13.3标记微血管检测微血管密度(MVD)。MVD计数方法参见文献^[7]。

1.8 TUNEL法原位细胞凋亡的检测

石蜡切片经脱蜡后,按细胞凋亡检测试剂盒说明操作。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凋亡指数(AI);即 $AI(\%) = \text{凋亡细胞数} / \text{有核细胞的总数} \times 100\%$ ^[5]。

1.9 统计学处理

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 χ^2 检验。其他实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析检验。

2 结果

2.1 基因治疗对移植瘤生长的抑制作用

由肿瘤生长曲线可知,进行基因治疗后,Angiostatin 和 aHIF-1 α 单基因治疗组肿瘤的生长在早期受到一定程度的抑制,大约 1 周以后生长速度变快,并且很快赶上 PcDNA3 对照组。联合基因治疗组肿瘤的生长在观察期中始终明显受到抑制。联合治疗组与 PcDNA3 对照组、PcDNA3-Angiostatin 治疗组、PcDNA3B-aHIF-1 α 治疗组比较均有统计学意义(治疗 6 d 后比较, $P < 0.05$)。

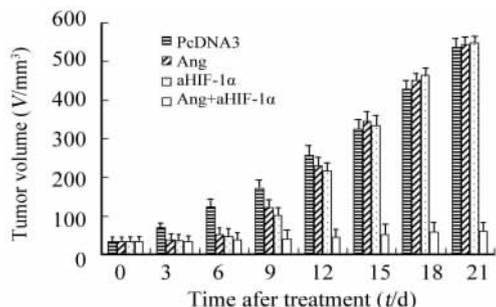


图 1 基因治疗对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of gene therapy on tumor growth

2.2 基因治疗对肿瘤组织中 Angiostatin、HIF-1 α 、VEGF 表达和 MVD 的影响

进行基因治疗后,由图 2A、B、C 和表 1 可见, PcDNA3-Angiostatin 治疗组、联合治疗组 Angiostatin 的表达均高于 PcDNA3 对照组 ($P < 0.01$);联合治疗组的 HIF-1 α 的表达低于 PcDNA3 对照组 ($P < 0.05$)和 PcDNA3-Angiostatin 治疗组 ($P < 0.01$);联合治疗组的 VEGF 表达低于 PcDNA3-Angiostatin 治疗组 ($P < 0.01$), PcDNA3-Angiostatin 治疗组 VEGF 表达高于对照组 ($P < 0.05$)。

进行基因治疗后,由图 2D、E、F 可见,联合治疗组的 MVD 为 (13.6 ± 2.3),明显低于 PcDNA3-Angiostatin 治疗组的 MVD (24.5 ± 2.7) ($P < 0.01$),以上两组均低于 PcDNA3 对照组的 MVD (31.2 ± 4.3) ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3 基因治疗对人卵巢癌细胞凋亡的影响

PcDNA3-Angiostatin 治疗组中肿瘤细胞的 AI 为 (2.89 ± 0.45),联合治疗组肿瘤细胞的 AI 为 (5.32 ± 0.62),两者均明显高于 PcDNA3 对照组的 (1.56 ± 0.41),均存在显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。联合治疗组的 AI 又明显高于 PcDNA3-Angiostatin 治疗组 ($P < 0.01$, 图 2G、H、I)。

表 1 基因治疗对移植瘤组织 Angiostatin、HIF-1 α 、VEGF 表达的影响

Tab. 1 Effects of gene therapy on expression of Angiostatin, HIF-1 α , and VEGF

Groups	Angiostatin				HIF-1 α				VEGF			
	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)
PcDNA3	2	8	2	0	1	3	6	2	4	7	1	0
Angiostatin	0	2	4	6	0	1	2	9	0	2	5	3
aHIF-1 α	2	9	1	0	4	7	1	0	10	1	1	0
Angiostatin + aHIF-1 α	0	3	3	7	5	6	1	0	10	1	1	0

3 讨论

血管生成抑制剂是一种新型的抗肿瘤药物,其中血管抑素因其显著的抗新血管生成作用而备受瞩目^[9-12]。血管抑素是血纤溶酶原的一部分,可以通过诱导血管内皮细胞凋亡及特异性改变血管内皮细胞的基因表达来抑制血管的形成。Yokoyama 等^[13]的实验表明,用酵母表达的重组血管抑素能明显抑制人卵巢癌细胞株诱导的裸鼠皮下移植瘤的生长,降低 MVD,增加细胞凋亡。血管生成抑制剂的作用靶点是机体的正常血管内皮细胞,基因相对稳定,过去曾普遍认为能够避免耐药性的产生^[2]。然而,新

近研究结果提示,肿瘤也可对抗血管生成药物逐渐失去反应即获得耐药性。本研究结果显示血管抑素并不能持续抑制肿瘤生长,在治疗后期皮下移植瘤生长加速,肿瘤对其产生了耐药性。为解决抗血管生成治疗的耐药性问题,很多学者^[5, 14-15]尝试联合抗血管生成治疗与化疗、放疗或免疫治疗进行实验研究,取得了较好疗效。目前的资料提示,对抗血管生成治疗产生耐药性的关键因素正是肿瘤自身的缺氧适应途径。

研究表明,恶性肿瘤的进展、转移、预后以及对放化疗的敏感性均与肿瘤的缺氧状态密切相关^[16-17],这是因为缺氧状态激活了缺氧诱导因子

HIF-1,促进肿瘤细胞分泌血管生成刺激因子如 VEGF,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)、GLUT-1 等生物活性物质以维持肿瘤细胞的能量代谢。Hale 等^[18]研究表明,重组 EPO 治疗可以降低卵巢癌细胞 aHIF-1 α 蛋白质的表达水平和 VEGF 的转录,但是并不影响癌细胞

生长,提示 EPO 和 aHIF-1 α 之间的信号通路系统需要进一步探讨。目前,越来越多的资料显示缺氧和 HIF 在肿瘤新生血管形成中起着重要的调节作用^[14, 19-22]。aHIF-1 α 基因可以作为重要的基因治疗靶点,通过阻断肿瘤细胞的缺氧适应途径达到治疗目的。

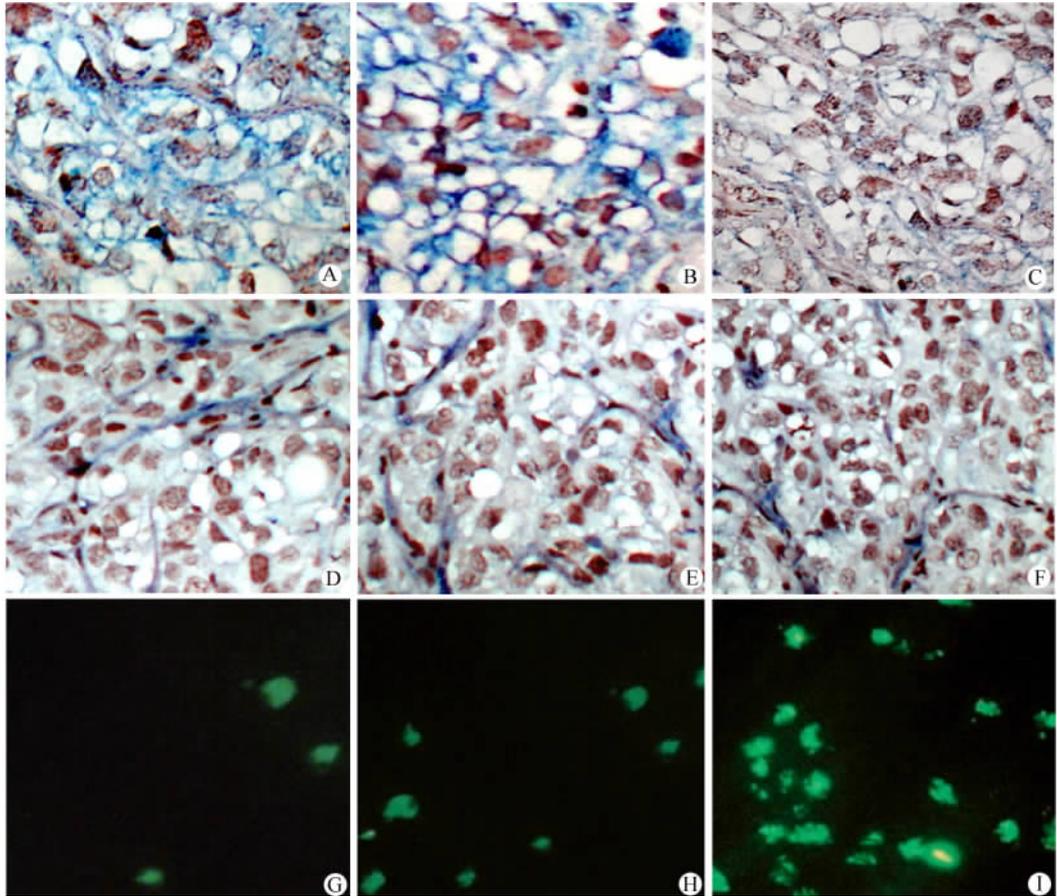


图2 基因治疗后裸鼠移植瘤组织的 VEGF 表达、微血管密度(MVD)和细胞凋亡结果

Fig. 2 VEGF, MVD and cell apoptosis in implanted tumor tissue of nude mice after gene therapy

A, B, C: VEGF expression in group-PcDNA3, group-PcDNA3-Angiostatin, group-Angiostatin + aHIF-1 α , respectively(SABC, $\times 200$);
 D, E, F: MVD of group-PcDNA3, group-PcDNA3-Angiostatin, group-Angiostatin + aHIF-1 α , respectively(SABC, $\times 200$);
 G, H, I : Cell apoptosis of group-PcDNA3, group-PcDNA3-Angiostatin, group-Angiostatin + aHIF-1 α , respectively(TUNEL, $\times 400$)

本实验联合应用 Angiostatin 和反义 aHIF-1 α 基因治疗人卵巢癌裸鼠皮下瘤,并设立 3 个对照组,以研究联合治疗是否能产生更好的效果。考虑到裸鼠瘤体较小,瘤体内注射药物不宜过多,故联合治疗组首先瘤体内注射 Angiostatin 基因,24 h 后再次注射反义 aHIF-1 α 基因。实验中虽然仅瘤体内注射转染液 1 次,但是经免疫组织化学检查证实,目的基因的表达产物是升高的,能够达到实验目的。本实验结果显示:单独使用 Angiostatin 基因时,早期可以取得抑制肿瘤生长的效果,但是随之激活了缺氧适应途

径,肿瘤组织中 HIF 表达增多,调控 VEGF 分泌,因此大约 1 周后肿瘤的生长速度开始加快。联合应用 Angiostatin 和反义 aHIF-1 α 基因时,肿瘤的生长明显受到持续抑制,肿瘤组织中的微血管密度显著降低,肿瘤细胞的凋亡指数明显高于其他 3 组,说明联合应用 Angiostatin 和反义 aHIF-1 α 基因在抗肿瘤血管生成过程中可以起到协同抑制作用,阻断肿瘤细胞的缺氧适应途径在一定程度上解决了卵巢癌抗血管生成治疗时的耐药性问题。本研究中肿瘤并没有缩小或消失,估计与药物的治疗剂量及给药方法有

关,更有可能与卵巢肿瘤细胞基因组的不稳定性有关^[23],相关问题有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [2] Folkman J, Hahnel P, Hlatky L. Cancer: looking outside the genome[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, 1(1): 76-79.
- [3] Kerbel RS, Yu J, Tran J, *et al.* Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches[J]. Cancer Metastasis Rev, 2001, 20(1-2): 79-86.
- [4] Sun X, Kanwar JR, Leung E, *et al.* Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy[J]. Gene Ther, 2001, 8(8): 638-645.
- [5] 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.
- [6] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [7] 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.
- [8] Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, *et al.* Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer[J]. Hinyokika Kyo, 2000, 46(10): 757-762.
- [9] Isayeva T, Ren C, Ponnazhagan S. Recombinant adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic prevention in a mouse model of intraperitoneal ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3): 1342-1347.
- [10] Yang H, Xu Z, Iuvone PM, *et al.* Angiostatin decreases cell migration and vascular endothelium growth factor(VEGF) to pigment epithelium derived factor (PEDF) RNA ratio *in vitro* and in a murine ocular melanoma model[J]. Mol Vis, 2006, 12: 511-517.
- [11] Yang DZ, He J, Zhang JC, *et al.* Expression of angiostatin cDNA in human gallbladder carcinoma cell line GBC-SD and its effect on endothelial proliferation and growth[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(17): 2762-2766.
- [12] Schmitz V, Raskopf E, Gonzalez-Carmona MA, *et al.* Plasminogen fragment K1-5 improves survival in a murine hepatocellular carcinoma model[J]. Gut, 2007, 56(2): 271-278.
- [13] Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, *et al.* Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth[J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2190-2196.
- [14] Jiang H, Feng Y. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) correlated with tumor growth and apoptosis in ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(Suppl 1): 405-412.
- [15] Rashid HH, Nelson J, Koehnman KS. Anti-angiogenic and cytotoxic targeted systemic therapy for high-risk prostate cancer[J]. Urol Oncol, 2006, 24(3): 243-245.
- [16] Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2004, 30(5): 465-468.
- [17] Horiuchi A, Imai T, Shimizu M, *et al.* Hypoxia-induced changes in the expression of VEGF, HIF-1 alpha and cell cycle-related molecules in ovarian cancer cells[J]. Anticancer Res, 2002, 22(5): 2697-2702.
- [18] Hale SA, Wong C, Lounsbury KM. Erythropoietin disrupts hypoxia-inducible factor signaling in ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(1): 14-19.
- [19] 蒋红元, 丰有吉. 卵巢上皮性癌组织中缺氧诱导因子 1 α 的表达及其与血管内皮生长因子的相关性[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(11): 767-770.
- [20] Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, *et al.* Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers[J]. PLoS Med, 2006, 3(3): e47.
- [21] 罗军, 彭芝兰, 杨开选, 等. 应用组织芯片技术研究卵巢癌组织中缺氧诱导因子 1 α 与血管生成的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(1): 38-41.
- [22] Wong C, Wellman TL, Lounsbury KM. VEGF and HIF-1alpha expression are increased in advanced stages of epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2003, 91(3): 513-517.
- [23] Yu JL, Rak JW, Coomber BL, *et al.* Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy[J]. Science, 2002, 295(5559): 1526-1528.

[收稿日期] 2007-04-01

[修回日期] 2007-08-03

[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358-93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X, 也不用 Mean 或 M; (2)标准差用英文小写 s , 不用 SD; (3)标准误用英文小写 s_x , 不用 SE; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ; (7)相关系数用英文小写 r ; (8)自由度用希腊小写 ν ; (9)样本数用英文小写 n ; (10)概率用英文大写 P ; (11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)