

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.06.009

## 双歧杆菌对兔 VX2 瘤 HIF-1 $\alpha$ 和 VEGF 表达的影响

蔡晓珊<sup>1</sup>,任瑞美<sup>2</sup>,张式暖<sup>1\*</sup>,李文通<sup>1</sup>,朱洪光<sup>3</sup>,窦建新<sup>1</sup>,刘静<sup>1</sup>(1. 潍坊医学院病理学教研室,山东潍坊 261041; 2. 山东省肿瘤医院放疗二科,山东济南 250117; 3. 山东大学口腔医院种植中心,山东济南 250012)

**[摘要]** 目的:探讨青春型双歧杆菌对兔 VX2 瘤组织 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达的影响。方法:建立兔荷 VX2 瘤模型 20 只,随机分成 2 组,每组 10 只。对照组经耳缘静脉注射生理盐水,实验组经耳缘静脉注射青春型双歧杆菌。处死动物,取出脏器和肿瘤组织粉碎后进行厌氧培养和革兰染色,观察双歧杆菌对肿瘤的靶向性;另取部分肿瘤组织 H-E 染色观察肿瘤组织的形态学变化;应用免疫组织化学方法分别检测肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的表达。结果:青春型双歧杆菌能够靶向定植于肿瘤组织中;经双歧杆菌治疗后实验兔肿瘤组织坏死面积明显增加。免疫组化显示实验兔 VX2 瘤组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 阳性表达细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),且两组中 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 的表达呈显著正相关( $r = 0.86$ )。结论:青春型双歧杆菌能够在兔 VX2 瘤组织中靶向定植,且能下调兔 VX2 瘤中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达。

**[关键词]** 青春型双歧杆菌;兔 VX2 瘤;缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ;VEGF;免疫组化

**[中图分类号]** R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2008)06-0548-04

## Influence of *Bifidobacterium* on expression of HIF-1 $\alpha$ and VEGF in rabbit VX2 tumor

CAI Xiao-shan<sup>1</sup>, REN Rui-mei<sup>2</sup>, ZHANG Shi-nuan<sup>1\*</sup>, LI Wen-tong<sup>1</sup>, ZHU Hong-guang<sup>3</sup>, DOU Jian-xin<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>(1. Department of Pathology, Weifang Medical College, Weifang 261041, Shandong, China; 2. Department of Radiotherapy, Shandong Tumor Hospital, Jinan 250117, Shandong, China; 3. Center of Dental Implantation, Stomatology Hospital, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of *Bifidobacterium* adolescence on the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in rabbit VX2 tumor. **Methods:** Rabbit VX2 tumor models were established and were divided into two groups ( $n = 10$ ). Animals in the experimental group were injected with *Bifidobacterium* adolescence and those in the control group received normal saline via ear vein. Animals were sacrificed and the liver, kidney, spleen, heart, lung and tumor tissues were removed, cultured and Gram stained. The changes of tumor tissue were observed by H-E staining; immunohistochemistry was used to detect the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in tumor tissues. **Results:** *Bifidobacterium* adolescence could target the tumor tissue. H-E staining showed the necrotic area was obviously enlarged after treatment with *Bifidobacterium*. Immunohistochemistry demonstrated that the positive rates of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in the experimental group were significantly lower than those of the control group ( $P < 0.05$ ), and the expression of the HIF-1 $\alpha$  and VEGF in two groups was positively correlated ( $r = 0.86$ ). **Conclusion:** *Bifidobacterium* adolescence can specifically target rabbit VX2 tumors tissues, and decrease the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF.

**[Key words]** *Bifidobacterium* adolescence; rabbit VX2 tumor; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ); VEGF; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 548-551]

由于肿瘤细胞生长迅速而血供相对不足,致使瘤体内部形成相对缺氧状态。缺氧区的存在使得肿瘤细胞对放疗和某些化疗的反应减弱,并且残存的瘤细胞更具有侵袭性和转移性,对各种疗法更具有抵抗性<sup>[1]</sup>,这已成为恶性肿瘤治疗失败、复发和转

**[基金项目]** 山东省科技厅博士基金项目(No. 2006BS03035)。Supporting by the Doctoral Research Foundation from Science and Technology Commission of Shandong Province(No. 2006BS03035)

**[作者简介]** 蔡晓珊(1982-),女,汉族,山东省邹平县人,硕士,主要从事肿瘤病理学的研究。E-mail: caixiaoshan9025@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: blx@wfmc.edu.cn

移的重要原因之一。缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 在肿瘤细胞对缺氧的适应和肿瘤血管生成的过程中起了重要的作用,已成为近年来的研究热点。

瘤体内部的相对乏氧使得采用厌氧菌对肿瘤进行基因治疗成为可能,而双歧杆菌独有的专性厌氧的生物学特性,使得它无论在自身抗肿瘤还是肿瘤的基因治疗方面都具有独特的优势<sup>[2-3]</sup>。本实验注射青春型双歧杆菌到荷 VX2 瘤兔中,应用免疫组化方法检测了 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 在瘤组织中的表达,并探讨其对两者表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和主要材料

荷 VX2 瘤兔由第四军医大学提供。新西兰大白兔 25 只,每只重约 2.5 kg,雌雄不限,购自山东省农科院(实验动物合格证为 sxk-鲁-2004-0013)。青春型双歧杆菌选用丽珠肠乐胶囊(由丽珠集团丽珠制药厂生产),经过培养纯化,通过形态学和生化鉴定确定为青春型双歧杆菌<sup>[4]</sup>。抗兔 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 多克隆抗体、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。PYG 培养液基础(蛋白胨 20.0 g、葡萄糖 5.0 g、酵母浸粉 10.0 g、氯化钠 0.08 g、盐酸半胱氨酸 0.5 g、氯化钙 0.008 g、硫酸镁 0.008 g、磷酸氢二钾 0.04 g、磷酸二氢钾 0.04 g、碳酸氢钠 0.4 g)由本实验室制备。

### 1.2 青春型双歧杆菌的培养与计数

将丽珠肠乐胶囊粉末约 0.2 g(含青春型双歧杆菌活菌 >0.25 亿)加入到盛有 PYG 培养液的无菌培养皿后置于厌氧带中,37 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后,1500 r/min 离心 15 min,弃上清,pH7.4 的 PBS 洗涤 3 次,加入 1 ml PBS 混匀,85 $^{\circ}$ C 水浴 15 min,细菌计数板计数。

### 1.3 荷瘤兔模型的建立

戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉全麻腿部携有 VX2 肿瘤的种兔后,无菌条件下剥离肿瘤,在生理盐水中反复清洗,剔除坏死组织,将肿瘤组织尽量剪碎。制成大小约 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm 的肿瘤组织备用。实验用大白兔同前述方法全麻后,常规无菌手术下取 4 小块制备好的肿瘤组织植入左大腿肌肉内,2 周左右实体瘤形成用于研究。

### 1.4 实验分组

挑选状态好的荷瘤模型新西兰兔 20 只,随机分成 2 组:一组为生理盐水组(对照组)10 只,另一组为双歧杆菌注射组(实验组)10 只。待实体瘤长到

直径达 1 cm 后,第 1 天在实验组兔的耳缘静脉内注射青春型双歧杆菌<sup>[5]</sup>0.5 ml,杆菌液密度为  $1.5 \times 10^7$  个/ml。第 2~4 天每天从耳缘静脉注射 1.0 ml,杆菌密度为  $5.0 \times 10^8$  个/ml。对照组注射相同体积的生理盐水。

### 1.5 荷瘤兔脏器和肿瘤组织的培养和组织切片的制备

注射后第 6 天处死实验兔,分别取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏及肿瘤组织,其中一部分加 PBS 分别匀浆,匀浆质量分数为 10%,取 100  $\mu$ l 匀浆液加入到加有备用培养液的培养皿中,混匀后置于厌氧带中,37 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后,分别收集各培养皿中的液体于离心管中静止 5 min,取上清液,1 500 r/min 离心 15 min,弃上清,加入冷 PBS(pH7.4)混匀,1 500 r/min 离心 15 min,弃上清,取沉渣涂片,进行革兰染色。另取部分脏器和肿瘤组织甲醛固定后石蜡包埋,切片后做常规 H-E 染色和革兰染色。

### 1.6 免疫组化染色检测肿瘤组织 HIF-1 $\alpha$ 及 VEGF 的表达

处死各组荷瘤兔后,取出肿瘤组织,经固定、包埋,切成 5  $\mu$ m 切片,进行免疫组织化学染色检测 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 在肿瘤组织中的表达。免疫组织化学采用 SABC 法,热修复抗原采用微波炉加热,之前用 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 10 min,以去除内源性过氧化物酶活性,之后用 5% BSA 封闭液封闭;一抗 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 稀释浓度均为 1:100,二抗为生物素化山羊抗兔 IgG,在显色之前滴加试剂 SABC(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物);DAB 室温显色,镜下控制反应时间,一般在 1~15 min 之间;苏木精轻度复染后显微镜下观察结果。具体步骤按试剂盒说明书进行。

### 1.7 免疫组化染色阳性结果判定标准

HIF-1 $\alpha$  以细胞核或细胞质呈棕黄色为阳性,VEGF 以细胞质或胞膜呈棕黄色作为阳性表达。HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 染色阳性切片分别以 16D 目镜测微网在 400 倍放大下计数网格中的阳性细胞数,每例计数 10 个网格,取其均值作为阳性细胞数。

### 1.8 统计学处理

数据采用 SAS 8.2 软件进行统计学分析。采用 *t* 检验和 Pearson 相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 双歧杆菌治疗后荷瘤兔各器官组织和肿瘤组织的革兰染色结果

实验组肿瘤组织中可见革兰阳性菌落, 组织培养涂片后革兰染色细菌呈蓝色短杆状, 切片后革兰染色肿瘤组织中可见蓝染的短杆状细菌, 且多数聚集在坏死区域。各正常脏器中未查见或仅见极少量( 图 1 )。结果说明双歧杆菌能靶向性定植于肿瘤组织。

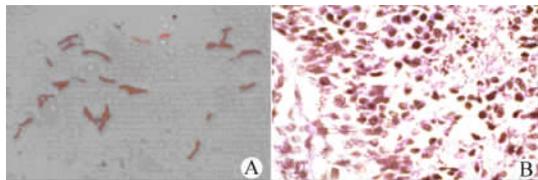


图 1 双歧杆菌治疗后肿瘤组织革兰染色结果  
Fig.1 Gram staining results of tumor tissue after treatment with *Bifidobacterium*

A: Tumor tissue cultured and observed with oil lens( ×1 000 ),  
B: Paraffin section of tumor tissue ( ×400 )

2.2 双歧杆菌治疗后肿瘤组织病理形态学改变

H-E 染色结果显示: 对照组 VX2 肿瘤细胞核质比例大, 核呈圆形或卵圆形, 核仁数目多, 核分裂多见, 肿瘤细胞排列紧密且紊乱; 实验组肿瘤组织出现片状坏死, 肿瘤细胞排列有序, 核质比例缩小( 图 2 ), 说明双歧杆菌能抑制肿瘤的生长、促进肿瘤细胞的坏死。

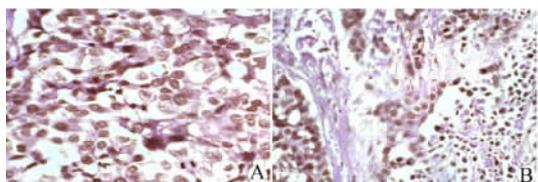


图 2 双歧杆菌治疗对肿瘤组织病理形态的影响 ( ×400 )

Fig. 2 Pathological morphology of tumor tissues after treatment with *Bifidobacterium* ( ×400 )

A: Without *Bifidobacterium* treatment,  
B: With *Bifidobacterium* treatment

2.3 双歧杆菌治疗对肿瘤组织 HIF-1α 和 VEGF 表达的影响

HIF-1α 阳性颗粒定位于肿瘤细胞胞核和( 或 ) 胞质, 且在肿瘤坏死明显的区域也有表达, 而正常组织中无表达。VEGF 阳性颗粒表达于肿瘤细胞胞质内, 在瘤周正常组织中无显色或有极弱显色( 图 3 )。实验组 HIF-1α、VEGF 的阳性细胞密度低于对照组 (  $P < 0.05$ , 表 1 ), 说明经双歧杆菌治疗后, 瘤组织中 HIF-1α 和 VEGF 的表达明显减少了。

2.4 HIF-1α 和 VEGF 表达的相关性

与对照组相比, 实验组的 HIF-1α 的阳性细胞数降低, 且 VEGF 的阳性细胞数也降低, 应用 Pearson 相关分析, 模型兔各组 HIF-1α 与 VEGF 的表达呈显著正相关(  $r = 0.86$  )。

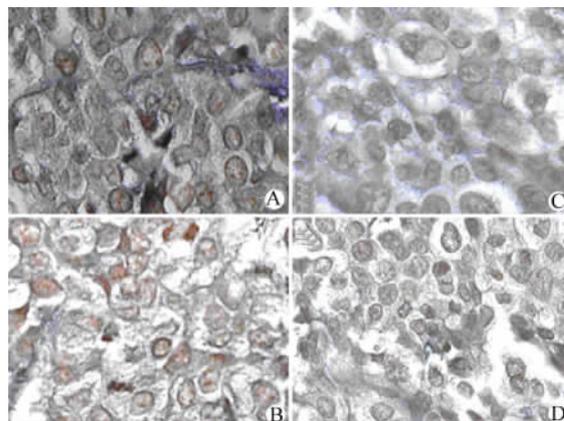


图 3 双歧杆菌治疗对肿瘤组织中 HIF-1α 与 VEGF 表达的影响( ×400 )

Fig. 3 Effect of *Bifidobacterium* on expression of HIF-1α and VEGF in tumor tissue( ×400 )

A: Expression of HIF-1α in tumor tissue after *Bifidobacterium* treatment; B: Expression of HIF-1α in tumor tissue without *Bifidobacterium* treatment; C: Expression of VEGF in tumor tissues after treatment with *Bifidobacterium*; D: Expression of VEGF in tumor tissue without *Bifidobacterium* treatment

表 1 双歧杆菌治疗对瘤组织 HIF-1α 与 VEGF 表达的抑制(  $\bar{x} \pm s$  )

Tab. 1 Inhibitory effect of *Bifidobacterium* on expression of HIF-1α and VEGF in tumor tissue

Group	Positive cells of HIF-1α	Positive cells of VEGF
Control group	135.5 ± 9.0	147.9 ± 13.6
Experimental group	90.6 ± 9.1*	92.2 ± 10.2*

\*  $P < 0.05$  vs control group

3 讨论

恶性肿瘤在生长过程中, 由于瘤细胞生长过快必然会造成局部组织严重缺氧, 供能与耗能之间的不平衡而造成肿瘤的乏氧。研究<sup>[6-7]</sup>表明, 在缺氧的肿瘤细胞中, HIF-1α 过度表达。HIF-1α 可导致肿瘤细胞对放化疗敏感性降低<sup>[8-9]</sup>。HIF-1α 还可以通过诱导 VEGF 及参与糖摄取糖酵解有关的酶和分子的表达, 增加肿瘤细胞的血供、氧供及能量供应, 以调节缺氧造成的这一失衡<sup>[10-11]</sup>。

双歧杆菌是专性厌氧的生理性菌群,且具有靶向性好、安全性高等优点<sup>[12-13]</sup>。研究<sup>[14-15]</sup>表明,双歧杆菌可以刺激全身免疫器官加强其免疫监视功能;还可以增强各种细胞因子和抗体的产生,提高自然杀伤细胞和巨噬细胞的功能活性,从而达到抗肿瘤的作用。

本实验建立荷 VX2 瘤兔模型,注射青春型双歧杆菌到荷 VX2 瘤兔体内。前期实验证明,双歧杆菌并没有引起荷瘤兔的任何后遗症。处死荷瘤兔后,通过革兰染色发现细菌仅定植于肿瘤组织中,而未在其他正常组织中查见,表明青春型双歧杆菌对肿瘤具有良好的安全性和靶向性。H-E 染色结果表明,注射双歧杆菌后正常脏器无明显的异常改变,肿瘤组织中坏死区域增多。免疫组织化学结果显示,HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 在肿瘤组织中普遍表达,实验组肿瘤组织中表达明显降低,表明双歧杆菌在肿瘤中的定植生长能降低肿瘤 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达,同时相关性分析表明两组中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达呈显著正相关,与 Liang<sup>[16]</sup>等的研究结果相符。

有研究者发现双歧杆菌脂磷壁酸(LTA)能上调 BGC823 细胞中 c-fos、P53 蛋白的表达,使 bcl-2、c-myc 的表达下降,从而诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[17]</sup>。Schmid<sup>[18]</sup>等通过 Western blotting 检测结肠癌细胞中 HIF-1 $\alpha$  和 P53 蛋白的表达,结果显示 HIF-1 $\alpha$  和 P53 能够与 p300 竞争性结合,P53 蛋白表达增高能够抑制 HIF-1 $\alpha$  蛋白的活性,从而抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达。杨晓军<sup>[19]</sup>等发现 HIF-1 $\alpha$  和抑癌基因 PTEN、P53 之间呈负相关,大肠癌中抑癌基因 PTEN、P53 的缺失突变可致 HIF-1 $\alpha$  表达水平增高。因此,实验中青春型双歧杆菌能够降低肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达,其机制可能是通过上调 c-fos、P53 蛋白的表达,下调 bcl-2、c-myc 的表达而引起。

总之,荷瘤兔体内注射青春型双歧杆菌能抑制肿瘤的生长、促进肿瘤的坏死,其可能是通过抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达,下调肿瘤细胞 VEGF 的表达而发挥抑制作用的,但其中的详细机制尚需进一步研究。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [ J ]. Nature, 2000, 407( 6801 ): 249-257.
- [ 2 ] Coakley M, Johnson MC, McGrath E, et al. Intestinal bifidobacteria that produce trans-9, trans-11 conjugated linoleic acid: a fatty acid with antiproliferative activity against human colon SW480 and HT-29 cancer cells[ J ]. Nutr Cancer, 2006, 56( 1 ): 95-102.
- [ 3 ] Xu YF, Zhu LP, Hu B, et al. A new expression plasmid in

*Bifidobacterium longum* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy[ J ]. Cancer Gene Ther, 2007, 14( 2 ): 151-157.

- [ 4 ] 王立生,潘令嘉. 双歧杆菌对实验性大肠癌增殖与凋亡的原位观察[ J ]. 肿瘤, 2000, 20( 1 ):28-30.
- [ 5 ] 马永平,刘革力,钟 贞,等. 双歧杆菌在家兔实验性肝坏死模型中的靶向增殖研究[ J ]. 中国微生物学杂志, 2005,17( 6 ): 408-410.
- [ 6 ] Mecller BJ, Cao Y, Li CY, et al. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumours: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules[ J ]. Cancer Cell, 2004, 5( 5 ): 429-441.
- [ 7 ] Semenza GL. Intratumoral, hypoxia, radiation resistance, and HIF-1[ J ]. Cancer Cell, 2004, 5( 5 ): 405-406.
- [ 8 ] Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1( HIF-1 ) in cancer[ J ]. Eur J Surg Oncol, 2004, 30( 5 ): 465-468.
- [ 9 ] Weinmann M, Marini P, Jendrossek V, et al. Influence of hypoxia on TRAIL-induced apoptosis in tumor cells[ J ]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58( 2 ):386-396.
- [ 10 ] Wada H, Nagano H, Yamamoto H, et al. Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1 alpha[ J ]. Liver Int, 2006, 26( 4 ): 414-423.
- [ 11 ] Ding L, Chen X, Jing K, et al. Inhibition of the VEGF expression and cell growth in hepatocellular carcinoma by blocking HIF-1 alpha and Smad3 binding site in VEGF promoter[ J ]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2006, 26( 1 ): 75-78.
- [ 12 ] Fujimori M. Anaerobic bacteria as a gene delivery system for breast cancer therapy [ J ]. Nippon Rinsho, 2008, 66( 6 ): 1211-1218.
- [ 13 ] Hidaka A, Hamaji Y, Sasaki T, et al. Exogenous cytosine deaminase gene expression in *Bifidobacterium breve* I-53-8w for tumor-targeting enzyme/prodrug therapy[ J ]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71( 12 ): 2921-2926.
- [ 14 ] 宋文刚,曲 迅,张彬彬,等. 双歧杆菌 DNA 对小鼠腹腔巨噬细胞分泌和杀瘤功能的影响[ J ]. 肿瘤学杂志, 2002, 8( 2 ): 89-91.
- [ 15 ] 黄红莹,黄汉菊. 双歧杆菌对小鼠黑素瘤 B16 细胞增殖和细胞周期的影响[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14( 3 ): 284-286.
- [ 16 ] Liang X, Yang D, Hu J, et al. Hypoxia inducible factor-alpha expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma[ J ]. Anticancer Res, 2008, 28( 3A ): 1659-1666.
- [ 17 ] 王 跃,程 磊,刘明方,等. 双歧杆菌脂磷壁酸体外诱导胃癌细胞凋亡的研究[ J ]. 实用肿瘤学杂志, 2005, 20( 5 ): 400-403.
- [ 18 ] Schmid T, Zhou J, Köhl R, et al. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 ( HIF-1 )[ J ]. Biochem J, 2004, 15, 380( Pt 1 ): 289-295.
- [ 19 ] 杨晓军,高 鹏,车团结,等. HIF-1 $\alpha$ 、PTEN 和 P53 在大肠癌中的表达和意义及其相关性的研究[ J ]. 中国现代医学杂志, 2006, 16( 9 ): 1326-1330, 1334.

[ 收稿日期 ] 2008 - 09 - 08

[ 修回日期 ] 2008 - 10 - 01

[ 本文编辑 ] 王 莹