

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.017

· 短篇论著 ·

HIF-1 α 反义寡核苷酸对鼻咽癌细胞乏氧条件下放射敏感性的影响

Effect of hypoxia inducible factor-1 α antisense oligonucleotide on radiosensitivity of anoxia nasopharyngeal carcinoma cells

程惠华¹,傅志超¹,王长楠²(1. 南京军区福州总医院放疗科,福州 350025; 2. 第二军医大学基础部生理教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)在乏氧状态下对鼻咽癌 CNE-1 细胞放射敏感性的影响。**方法:**氯化钴处理 CNE-1 细胞模拟乏氧条件下的培养传代,通过脂质体将不同 HIF-1 α 反义寡核苷酸导入 CNE-1 细胞中,根据转染复合物的不同将 CNE-1 细胞分为反义联合组、正义联合组、脂质体组和单纯放疗组(放疗对照组)。X 射线单次照射,照射条件为照射率 4 Gy/min,共 8 Gy,细胞照射后继续乏氧条件下培养 24 h。MTT 法检测 CNE-1 细胞的存活率,Western blotting 检测 CNE-1 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达。**结果:**在乏氧条件下,反义联合组的鼻咽癌 CNE-1 细胞存活率明显大于正义联合组和单纯放疗组。Western blotting 结果显示,与正义联合组和单纯放疗组相比,反义联合组 CNE-1 细胞中 HIF-1 α 蛋白表达显著下降(0.162 \pm 0.055 vs 0.872 \pm 0.191, 0.768 \pm 0.217, 0.863 \pm 0.245, $P < 0.05$);同时反义联合组 CNE-1 细胞中 VEGF 蛋白的表达量较正义联合组和单纯放疗组明显减少(0.364 \pm 0.078 vs 1.165 \pm 0.346, 1.068 \pm 0.379, 1.087 \pm 0.266, $P < 0.05$)。**结论:**HIF-1 α 反义寡核苷酸能有效抑制 HIF-1 α 的表达,对乏氧状态下的鼻咽癌 CNE-1 细胞具有放射增敏作用。

[关键词] 鼻咽癌;放疗;缺氧诱导因子-1 α ;反义寡核苷酸;放射敏感性;乏氧

[中图分类号] R739.63; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0547-03

放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段,随着放射物理学和计算机科学技术的长足发展,放疗技术和放疗设备取得长足进步,鼻咽癌的疗效明显提高^[1],但仍有少部分鼻咽癌患者表现为肿瘤放射抗拒或在较短时间内出现复发,从而明显影响鼻咽癌的整体疗效^[2]。在前期的实验^[3]中发现,乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)在乏氧条件下鼻咽癌细胞的放射敏感性中起重要作用,并且通过调节 HIF-1 α 下游靶蛋白血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)来实现的。通过反义寡核苷酸技术来封闭 HIF-1 α 基因的表达是提高乏氧肿瘤放化疗敏感性的新思路,但具体的作用与机制仍不清楚。本研究通过 HIF-1 α 反义寡核苷酸抑制 HIF-1 α 的表达,观察 HIF-1 α 反义寡核苷酸对乏氧条件下鼻咽癌放射敏感性的影响及其与 VEGF 的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

按照 1×10^4 /ml 的细胞密度将 CNE-1 鼻咽癌细胞(购自上海艾研生物公司)接种于 0.1% 凝胶处理

后的 6 孔板中,培养液为含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液,其中含有谷氨酰胺、青霉素和链霉素,终浓度分别为 0.3 mg/ml、100 U/ml 和 0.1 mg/ml,置 5% CO₂、37 °C 培养箱内培养。待细胞进入指数生长期后,更换培养液。以含有终浓度为 125 μ mol/L 氯化钴(购自上海酶联生物公司)的培养基培养细胞,模拟缺氧条件。

1.2 HIF-1 α 反义寡核苷酸的合成

参考文献[3]合成 HIF-1 α 反义寡核苷酸:5'-GCCGGCGCCCTCCAT-3',并设置了 HIF-1 α 正义寡脱氧核苷酸:5'-ATGGAGGGCGCCGCCGC-3'作为对照。全部碱基进行硫代修饰,委托福州迈新生物技术公司合成。

1.3 脂质体介导 HIF-1 α 反义寡核苷酸转染

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. 2007J0284)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2007J0284)

[作者简介] 程惠华(1958-),男,福建省福州市人,主任医师,主要从事肿瘤放射治疗的基础与临床研究。E-mail: chenghuihua@hotmail.com

[通信作者] 傅志超(FU Zhi-chao, corresponding author), E-mail: fuzhichao@gmail.com

CNE-1 细胞

阳离子脂质体 Dospers 购自 Roche 公司。CNE-1 细胞分 4 组:反义联合组(*HIF-1α* 反义寡核苷酸 + radiation)、正义联合组(*HIF-1α* 正义寡核苷酸 + radiation)、脂质体组和单纯放疗组。置于 6 孔板上培养,每孔细胞密度为 2×10^5 /ml,24 h 后,用无血清培养基 DMEM 清洗 2 次,每孔重新加入 DMEM 800 μ l,轻轻混匀。取出 20 μ mol/L 的 *HIF-1α* 反义寡核苷酸 10 μ l、脂质体 5 μ l 分别稀释于 175、10 μ l 的 DMEM 无血清培养基中,将稀释后的 *HIF-1α* 反义寡核苷酸和脂质体混匀,室温下孵育 20 min。每孔加入 200 μ l *HIF-1α* 反义寡核苷酸-脂质体混合物(*HIF-1α* 反义寡核苷酸和脂质体终浓度为 5.0 μ mol/L)。置于孵箱内孵育 4 h。最后,用含 15% 胎牛血清和氯化钴(终浓度为 125 μ mol/L)的 DMEM 完全培养液继续培养 20 h。

1.4 X 射线对 CNE-1 细胞进行单次照射

CNE-1 细胞悬液直接种至 6 孔培养板内培养,转染时取对数生长期细胞,细胞融合度达 50% ~ 60%,每种处理设 3 孔。照射采用瓦里安(Varian)直线加速器 6 MVX 射线进行单次照射,剂量率为 4 Gy/min,吸收剂量 8 Gy,照射后 24 h 收集细胞。

1.5 MTT 法检测 CNE-1 细胞存活率

收集照射后的 4 组 CNE-1 细胞,调整细胞数为 5×10^4 /ml,200 μ l/孔接种于 96 孔板,每组设 8 ~ 10 个复孔。加入培养 48 h,各组进行 MTT 比色实验。每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μ l,37℃ 继续孵育 4 h,终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)200 μ l,振荡 10 min,DU640 分光光度仪测定各孔 D_{490} 值,每组重复 6 次,计算细胞存活率(cell survival rate, SR)。SR(%) = 实验组 D_{490} /对照组 $D_{490} \times 100\%$

1.6 Western blotting 检测 CNE-1 细胞中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的表达

取样品总蛋白 40 μ g,加入等体积的 2 × SDS 凝胶上样缓冲液,100℃ 变性 4 min。上清加入上样孔,10% SDS-PAGE 电泳。用槽式转膜仪将蛋白转移到 PVDF 膜(Whayman 公司)上,该膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液 4℃ 封闭过夜,用封闭液稀释的兔抗 HIF-1α 及 VEGF 抗体(稀释度为 1:600)与膜蛋白结合后,再与羊抗兔的 IgG-HRP 结合,最后经 ECL 化学发光试剂盒显影,X 线片记录结果。以 β -actin 为内参计算 HIF-1α 或 VEGF 与 β -actin 灰度的比值进行定量分析。

2 结果

2.1 *HIF-1α* 反义寡核苷酸转染联合放疗对 CNE-1 鼻咽癌细胞存活率的影响

各组鼻咽癌细胞存活率检测结果显示,反义联合组细胞存活率明显高于正义联合组、脂质体组和单纯放疗组[(18.35 ± 6.23)% vs (36.29 ± 5.71)% , (37.42 ± 6.85)% , (38.86 ± 5.49)% ; $P < 0.01$]。表明 *HIF-1α* 反义寡核苷酸能明显提高 CNE-1 鼻咽癌细胞在乏氧下的放射敏感性。

2.2 *HIF-1α* 反义寡核苷酸转染联合放疗对 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图 1,表 1)表明,*HIF-1α* 蛋白在正义联合组、脂质体组和单纯放疗组 CNE-1 细胞中高表达,在相对分子质量 120 000 处显示清晰的蛋白条带,在反义联合组 CNE-1 细胞中不表达,在相应位置蛋白条带明显减弱(0.162 ± 0.055 vs 0.872 ± 0.191, 0.768 ± 0.217, 0.863 ± 0.245 ; $P < 0.05$)。VEGF 蛋白表达的变化趋势和 *HIF-1α* 基本一致,在反义联合组中表达明显低于其他 3 组(0.364 ± 0.078 vs 1.165 ± 0.346, 1.068 ± 0.379, 1.087 ± 0.266 ; $P < 0.05$)。

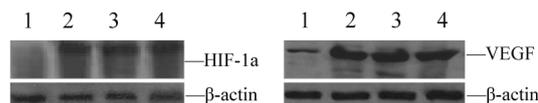


图 1 不同组别 CNE-1 细胞中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的表达

1: 反义联合组; 2: 正义联合组;
3: 脂质体组; 4: 单纯放疗组

表 1 各组 CNE-1 细胞中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组 别	HIF-1α	VEGF
反义联合组	0.162 ± 0.055*	0.364 ± 0.078*
正义联合组	0.872 ± 0.191	1.165 ± 0.346
脂质体组	0.768 ± 0.217	1.068 ± 0.379
单纯放疗组	0.863 ± 0.245	1.087 ± 0.266

* $P < 0.05$ vs 其他各组

3 讨论

放射治疗是肿瘤治疗的重要手段,随着计算机科学技术和放疗的发展,以及同步放化疗综合治疗

水平的不断提高,放射治疗的疗效得到显著的提高,其在临床中的地位也越来越重要^[5]。但是,肿瘤细胞乏氧导致放射治疗效果不佳一直困扰着广大临床医务人员^[6]。研究^[7]发现,肿瘤组织中普遍存在乏氧情况,它是影响放疗疗效的因素之一。乏氧导致肿瘤细胞的一些基因和蛋白表达发生改变,从而使肿瘤细胞在适应乏氧微环境的同时,引起肿瘤自身的侵袭性增加和对放射治疗的抗性,在这个过程中,转录因子 HIF-1 α 发挥着重要作用,并通过与其下游的乏氧反应元件(hypoxia response element, HRE)的结合,调节下游靶蛋白,如氧调节蛋白(oxygen regulated protein, ORP)、血红素加氧酶、糖酵解酶、VEGF、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等的表达^[8-11]。HIF-1 α 与肿瘤组织血管的形成、代谢、增殖和侵袭转移密切相关。目前,应用特异性针对乏氧肿瘤细胞的药物,改善乏氧细胞的放射敏感性成为研究的热点。

实验结果^[12]表明,乏氧能够使肿瘤细胞的 HIF-1 α 高表达,并且导致肿瘤细胞呈现出放射抗性,这种放射抵抗可能是通过调节 HIF-1 α 下游靶蛋白 VEGF 来实现的。通过反义寡核苷酸技术来封闭 *HIF-1 α* 基因的表达是提高乏氧肿瘤放疗敏感性的新思路^[13-14]。李震等^[15]研究表明,*HIF-1 α* 反义寡核苷酸结合放疗可以抑制喉癌异体移植瘤的生长,增加肿瘤细胞凋亡率和对放疗的敏感性。但在乏氧情况下的疗效仍不清楚。本课题通过脂质体转染的方法,将 *HIF-1 α* 反义寡核苷酸导入乏氧鼻咽癌 CNE-1 细胞中,观察 *HIF-1 α* 对乏氧状态下鼻咽癌细胞放射敏感性的影响。结果显示,反义联合组的鼻咽癌 CNE-1 细胞存活数明显大于正义联合组和单纯放疗组。VEGF 在反义联合组中无或少表达,而正义联合组和单纯放疗组中呈高表达,表明 *HIF-1 α* 反义寡核苷酸可能通过降低乏氧下 CNE-1 细胞中 VEGF 蛋白的表达来提高其对放疗的敏感性,这一结果与李震的体内实验结果基本一致。

总之,本研究显示 *HIF-1 α* 反义寡核苷酸与放疗结合,提高了乏氧条件下鼻咽癌 CNE-1 细胞的放疗敏感性,为针对提高乏氧肿瘤细胞的放疗疗效的研究提供了一条新思路。

[参考文献]

[1] 殷蔚伯,余子豪,徐国镇,等. 肿瘤放射治疗学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,2008:737-738.

- [2] Su J, Xu XH, Huang Q, et al. Identification of cancer stem-like CD44⁺ cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. Arch Med Res, 2011, 42(1): 15-21.
- [3] 傅志超,程惠华,王凤玫. 缺氧条件下电离辐射对鼻咽癌细胞 HIF-1 α 及 P53 表达的影响 [J]. 中国医师杂志, 2009, 11(2): 188-191.
- [4] 邓守恒,孙各琴,周有利,等. HIF-1 α 反义寡核苷酸增强胃癌细胞对顺铂的敏感性 [J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(5): 340-342.
- [5] Noordhuis MG, Eijssink JJ, Roosink F, et al. Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (chemo) radiation: A systematic review [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 79(2): 325-334.
- [6] Bernhard EJ. Interventions that induce modifications in the tumor microenvironment [J]. Cancer Radiother, 2011, 15(5): 376-382.
- [7] Zeng L, Ou G, Itasaka S, et al. TS-1 enhances the effect of radiotherapy by suppressing radiation-induced hypoxia-inducible factor-1 activation and inducing endothelial cell apoptosis [J]. Cancer Sci, 2008, 99(11): 2327-2335.
- [8] Nam SY, Ko YS, Jung J, et al. A hypoxia-dependent upregulation of hypoxia-inducible factor-1 by nuclear factor- κ B promotes gastric tumour growth and angiogenesis [J]. Br J Cancer, 2011, 104(1): 166-174.
- [9] Fu L, Wang G, Shevchuk MM, et al. Generation of a mouse model of Von Hippel-Lindau kidney disease leading to renal cancers by expression of a constitutively active mutant of HIF-1 α [J]. Cancer Res, 2011, 71(21): 6848-6856.
- [10] Farha S, Asosingh K, Xu W, et al. Hypoxia-inducible factors in human pulmonary arterial hypertension: A link to the intrinsic myeloid abnormalities [J]. Blood, 2011, 117(13): 3485-3493.
- [11] Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy [J]. Mol Cancer Res, 2006, 4(9): 601-605.
- [12] 程惠华,傅志超,王凤玫. 缺氧条件下电离辐射与肝癌细胞 HIF-1 α 及 VEGF 表达的关系 [J]. 肿瘤, 2007, 27(7): 545-548.
- [13] Huang LJ, Chuang IC, Dong HP, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IFI) in rat liver [J]. Shock, 2011, 36(1): 90-96.
- [14] Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, et al. Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster [J]. Cancer Res, 2008, 68(14): 5540-5545.
- [15] 李震,屈永涛,李晓明等. 缺氧诱导因子 1-a 反义寡核苷酸对喉鳞状细胞癌的放疗增效作用 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2010, 17(11): 586-589.

[收稿日期] 2012-06-02

[修回日期] 2012-08-16

[本文编辑] 韩丹,周玲琳