论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0908-04

RNA干扰缺氧诱导因子-1α对裸鼠结肠癌生长及转移的影响

李尚坤,傅仲学,李明洋 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院普通外科)

[摘要] **目的** 探讨靶向缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)α的RNA干扰(RNA interference,RNAi)对裸鼠结肠癌生长及转移的影响。**方法** 利用结肠癌细胞株SW480对30只6周龄雌性裸鼠进行皮下种植,构建荷人瘤动物模型后按随机数字表法分为生理盐水组、阴性质粒组及干扰组,每组10只。分别注射生理盐水、阴性质粒及转染质粒,并绘制肿瘤生长曲线,观察各组间肿瘤生长及淋巴结转移的变化,采用RT-PCR和Western blot检测HIF-1α基因及蛋白表达的变化。**结果** 转染质粒导入裸鼠皮下移植瘤后15 d,干扰组肿瘤体积为(273.9±14.7)mm^3,与生理盐水组(1 845.5±91.2)mm^3和阴性质粒组(1 842.7±115.7)mm^3相比较,体积明显减小($P<0.05$);干扰组淋巴结转移率为40%(4/10),与生理盐水组(100%,10/10)及阴性质粒组(100%,10/10)相比明显降低($\chi^2=5.952$,$P=0.015$);干扰组淋巴结阳性率为35.7%(5/14),与生理盐水组77.3%(17/22)及阴性质粒组65.2%(15/23)相比明显降低($\chi^2=6.420$, $P=0.040$)。干扰组肿瘤组织中HIF-1α mRNA和HIF-1α蛋白显著下调($P<0.05$)。**结论** 靶向HIF-1α的RNAi可以抑制裸鼠结肠癌的生长及淋巴结转移和裸鼠结肠癌组织内HIF-1α基因的表达,可能成为肿瘤基因治疗的一个靶点。

[关键词] RNA干扰;缺氧诱导因子-1α;裸鼠;SW480

[中图法分类号] R394.2; R730.37; R735.35 **[文献标志码]** A

RNAi-mediated silencing of HIF-1α inhibits growth and metastasis of colon cancer in tumor-bearing mice

Li Shangkun, Fu Zhongxue, Li Mingyang (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To explore the influence of RNAi-mediated hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) silencing on the growth and metastasis of colon cancer in nude mice. **Methods** A total of 30 6-week-old female nude mice were randomly divided into normal saline group (NS group), negative plasmid group and RNA interference group after injected with SW480 subcutaneously to form a colon carcinoma. shRNA-HIF-1α vector was constructed and injected (50 μg/time, once per 2 d, for 7 times) into the tumor mass of nude mice of RNA interference group to induce RNAi. Normal saline or blank vector was injected into the corresponding nude mice. The changes of HIF-1α were detected with RT-PCR and Western blot analysis. The size of tumors, metastasis rate and the positive rate of lymphnode were compared among different groups. **Results** In 15 d after RNAi vector injection, the tumor volume of RNAi group [(273.9±14.7) mm^3] was much smaller than those of NS group [(1 845.5±91.2) mm^3] and negative plasmid group [(1 842.7±115.7) mm^3] ($P<0.05$). Lymph node metastasis rate in RNAi group (40%, 4/10) was lower than those of NS group (100%, 10/10) and negative plasmid group (100%, 10/10) (Chi square=5.952, $P=0.015$). The lymph node positive rate in experimental group (35.7%, 5/14) was significantly lower than those of NS group (77.3%, 17/22) and negative plasmid group (65.2%, 15/23) (Chi square=6.420, $P=0.040$). The mRNA level of HIF-1α and its protein expression of RNAi group also reduced obviously ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of HIF-1α, tumor sizes, metastasis rate and the positive rate of lymphnode in nude mouse have been obviously inhibited by pshRNA-HIF-1α, which may be used as a target for gene therapy.

[Key words] RNA interference; hypoxia-inducible factor 1α; nude mice; SW480 cells

Supported by the 2009 Annual Medical Research Projects of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-1-49). Corresponding author: Fu Zhongxue, Tel:86-23-68894420, E-mail: fzx990521@sina.com

[基金项目] 重庆市卫生局2009年度医学科研计划项目重点项目(2009-1-49)

[通信作者] 傅仲学,电话:(023)68894420, E-mail: fzx990521@sina.com

缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)α是一种广泛表达于结肠癌、肺癌、乳腺癌及前列腺癌等大部分肿瘤组织中的转录因子。它包括HIF-1α和HIF-1β 2种亚型,其中HIF-1α在HIF-1活性方面起主要作用,被认为是HIF-1的功能亚单位,在肿瘤的发生、发展、转移中起着非常重要的作用[1]。尤其是随着其以血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)为代表的下游靶基因在肿瘤的生长、淋巴转移过程中关键作用的发现,HIF-1α渐渐也成为目前肿瘤发生、发展、诊断、治疗等方面研究中的热点。本研究拟通过在裸鼠体内靶向HIF-1α的RNA干扰(RNA interference, RNAi)来观察其对裸鼠结肠癌肿瘤生长、淋巴结转移及裸鼠肿瘤组织HIF-1α表达的影响,旨在为进一步的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠癌细胞株SW480,购自重庆医科大学病理生理学教研室。6周龄雌性裸鼠30只购自重庆医科大学实验动物中心,体质量为(18.1±0.9)g。靶向HIF-1α的shRNA质粒载体由本实验小组合成,经由武汉晶赛生物工程公司测序;质粒提取试剂盒(TaKaRa公司)、胶回收试剂盒(Promega公司)、DNA连接试剂盒(Omiga公司)、总RNA提取试剂盒(Toyobo公司);载玻片、盖玻片、解剖动物用手套、无菌口罩、帽子及器械由重庆医科大学设备科提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的SW480细胞株复苏后常规培养于含10%灭活的新生小牛血清RPMI1640和青链霉素(PS)培养液中,培养条件为37 ℃, CO_2浓度为5%,每2~3天用0.25%胰酶消化传代培养。

1.2.2 结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型的构建、分组 培养SW480细胞至对数生长期,加入0.25%胰蛋白酶消化后,800 r/min离心,弃上清,PBS洗2次,再离心,弃上清,加PBS重悬。将单细胞悬液调整为细胞数4×10^7/ml,每只BALB/c裸鼠接种0.1 ml于一侧爪垫皮下,细胞接种后1周可见肿瘤形成于接种部。接种后15 d将荷瘤裸鼠进行编号后应用随机数字表法分成生理盐水组、空白质粒对照组、干扰组3组,每组10只,各组间肿瘤体积差异无统计学意义($P>0.05$)。分别于瘤体内注射生理盐水、空白质粒、含靶向HIF-1α的shRNA质粒,50 μg/次,隔天1次,共7次,接种后30 d取材,氯胺酮麻醉后(1~2 mg/kg),分离出瘤组织及腹股沟的淋巴结组织,进行以下实验。

1.2.3 RT-PCR检测HIF-1α mRNA表达水平的变化 提取肿瘤组织总RNA后,利用RT-PCR一步法试剂盒,反应条件为50 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,27个循环(94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s),最后72 ℃延伸10 min。以试剂盒内的内参引物扩增GAPDH,并设相应的阴性对照和空白对照。HIF-1α引物序列为:上游5′-AGAAACCACCTATGACCTGC-3′,下游5′-TGAGTTTCAACCCAGACATA-3′,目标片段长度为320 bp;GAPDH上游5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,目标片段长度为450 bp。取PCR产物2.5 μl在3%琼脂糖凝胶上电泳(100 V 20 min),凝胶图像分析仪上观察结果。凝胶数字扫描成像系统照相并测定条带积分光密度值,以待检基因条带与内参条带GAPDH的积分光密度比值作为目的基因的相对表达量。RT-PCR产物比值=HIF-1α mRNA灰度值/内参照mRNA灰度值。

1.2.4 Western blot检测HIF-1α蛋白表达 分别收集生理盐水对照组、空载体对照组和干扰组的肿瘤组织,胰酶消化,离心去上清,沉淀用PBS洗2遍,细菌裂解液处理,混匀,-20 ℃保存备用。配制10% SDS-PAGE分离胶和5% SDS-PAGE浓缩胶。取保存的样品,上样10 μl,90 V恒压电泳约60 min,120 V恒压电泳约2 h。电泳完毕后取出凝胶,4 ℃ 25 V恒压电转过夜。次晨取出NC膜,加1∶500稀释的一抗溶液,4 ℃过夜。加1∶100的辣根过氧化物酶标记稀释二抗溶液,37 ℃,轻轻振荡2 h后弃反应液。用D心染色试剂盒染色,数码相机照相。Western blot产物比值=HIF-1α灰度值/β-actin内参照灰度值。

1.2.5 肿瘤生长曲线及淋巴结转移 按公式$V=ab^2/2$计算肿瘤体积(V代表瘤体积,a为长径,b为短径),绘制肿瘤生长曲线,对所得淋巴结组织进行病理切片HE染色,以发现肿瘤细胞为阳性,分别计算转移率及阳性率。

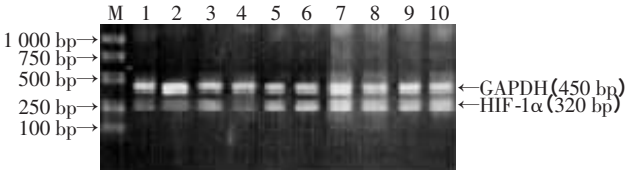
1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,运用方差分析、χ^2检验、Fisher精确概率法对结果进行分析。

2 结果

2.1 HIF-1α mRNA在裸鼠肿瘤组织中的表达

干扰组、生理盐水组及阴性质粒对照组HIF-1α mRNA相对表达值分别为(28.7±3.5)、(87.8±3.1)、(81.6±3.0)(图1)。与阴性质粒对照组相比较,干扰组HIF-1α mRNA表达明显减少($P<0.05$),生理盐水组及阴性质粒对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

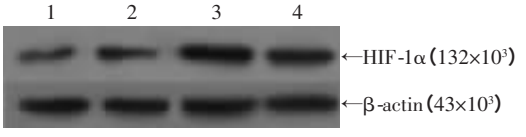


M:DNA标准(DL 2000);1~4:干扰组;5~8:阴性质粒组;9、10:生理盐水组

图1 RT-PCR检测裸鼠皮下移植瘤中HIF-1α mRNA的表达

2.2 HIF-1α蛋白在裸鼠肿瘤组织中的表达

HIF-1α蛋白在生理盐水组及阴性质粒对照组相对值分别为(81.1±3.9)、(84.4±4.5),干扰组HIF-1α蛋白(41.0±3.4)表达显著减少($P<0.05$),生理盐水组及阴性质粒对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$,图2)。

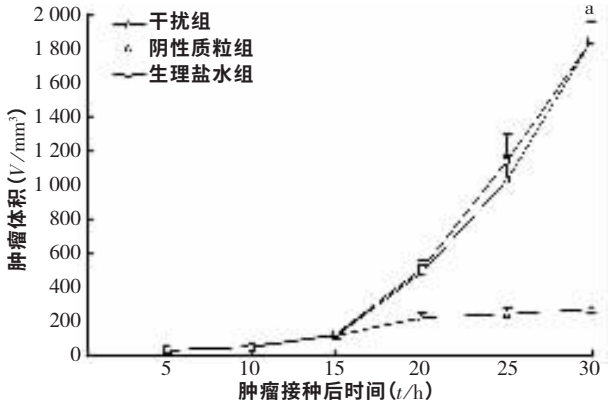


1、2:干扰组;3:生理盐水组;4:阴性质粒组

图2 Western blot检测裸鼠结肠癌组织中HIF-1α蛋白的表达

2.3 裸鼠皮下移植瘤体积比较

转染质粒导入裸鼠皮下移植瘤后15 d(即接种肿瘤细胞后30 d),干扰组肿瘤体积为(273.9±14.7)mm^3,生理盐水组及阴性质粒对照组分别为(1 845.5±91.2)、(1 842.7±115.7)mm^3(图3)。与生理盐水组和阴性质粒组相比较,干扰组移植瘤体积明显减小($P<0.05$),生理盐水组及阴性质粒对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。



a:$P<0.05$,与干扰组比较

图3 各组裸鼠皮下移植瘤生长曲线

2.4 淋巴结转移比较

干扰组淋巴结转移率为40%(4/10),与生理盐水组(100%,10/10)及阴性质粒组(100%,10/10)相比,差异具有统计学意义($\chi^2=5.952$,$P=0.015$)。干扰组淋巴结阳性率为35.7%(5/14),与生理盐水组77.3%(17/22)及阴性质粒组65.2%(15/23)相比,差异具有统计学意义($\chi^2=6.420$,$P=0.040$)。

3 讨论

HIF-1是近年发现的,对肿瘤细胞能量代谢、血管生成、肿瘤转移、离子代谢和儿茶酚胺代谢有重要影响的调控因子[2-4]。HIF-1活性主要依靠HIF-1α调节,在非缺氧细胞核和细胞质中,不能检测到HIF-1α[5]。目前针对HIF-1α的研究范围广泛,糖尿病、高原缺氧、肿瘤等存在缺氧状态的疾病均在研究之列。其对肿瘤的影响主要表现在:在缺氧数小时内,HIF-1α的表达迅速增加,进而肿瘤细胞分泌大量促血管生成因子如VEGF等,从而使血管内皮细胞大量增殖,肿瘤组织中新生血管生成,同时细胞内无氧代谢增加以使其在恶劣环境下得以生存并保持增殖活性[6,7]。

结肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,而高达50%淋巴道转移率也成为了影响结肠癌预后最主要的因素。目前,很多学者都致力于结肠癌淋巴道转移规律和机制方面的研究[8]。研究发现,有淋巴转移者HIF-1α阳性率较无淋巴转移者显著增高,HIF-1α表达水平与肿瘤患者的预后呈负相关[9]。作为HIF-1α的下游靶基因VEGF,也已通过动物实验证明它不仅可以诱导并促进肿瘤新血管的生成,同样也可以诱导肿瘤内新生淋巴管生成,进而促进肿瘤淋巴结的转移[10,11]。

本课题组近年来对HIF-1α在组织水平、细胞水平进行了持续性的研究:宋炯等[11]证实了HIF-1α在人结直肠组织中表达增高;李明洋等[12,13]研究了HIF-1α在人结肠癌细胞株中的表达情况,而涂经楷等[14,15]已证实通过建立裸鼠爪垫的皮下移植瘤模型,可以更直观、更精确地观察、记录移植瘤的淋巴结转移途径及时间,为本实验的设计、实施提供了前期的实验基础。

本研究在上述理论及实践的基础上,进一步进行动物实验。在构建了结肠癌SW480细胞的裸鼠皮下移植瘤模型后,进行靶向HIF-1α的RNA干扰,观察肿瘤生长、淋巴结转移率、阳性率及肿瘤组织内HIF-1α表达变化。我们发现,与生理盐水组及阴性质粒对照组相比,干扰组的肿瘤体积显著缩小,淋巴结转移率、阳性率显著降低,HIF-1α蛋白及mRNA表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$),说明靶向HIF-1α的RNA干扰可显著抑制裸鼠结肠癌的生长、淋巴转移。尤其是在淋巴结转移方面,接种肿瘤细胞30 d后(也即采取干扰后15 d),生理盐水组与阴性质粒对照组的荷瘤裸鼠淋巴结转移率为100%,而干扰组的淋巴结转移率为40%,这说明抑制HIF-1α的表达可以降低结肠癌肿瘤的侵袭性。

综上所述,本研究通过靶向HIF-1α的RNAi,发现其可以抑制裸鼠结肠癌的生长、淋巴转移,并可使肿瘤组织内HIF-1α蛋白及mRNA表达下调。成功将RNA干扰技术应用于活体的肿瘤治疗,这将为RNA干扰技术用于肿瘤防治提供新的理论依据。靶向HIF-1α的RNA干扰对肿瘤的生长及淋巴结转移的抑制作用使HIF-1α很可能成为结肠癌基因治疗的一个新的靶点。

参考文献:

[1] Smith T G, Robbins P A, Ratcliffe P J. The human side of hypoxia-inducible factor[J]. Br J Haematol, 2008, 141(3): 325-334.

[2] Carmeliet P, Dor Y, Herbert J M, *et al*. Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. Nature, 1998, 394(6692): 485-490.

[3] Maxwell P H, Pugh C W, Ratcliffe P J. Activation of HIF pathway in cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(3): 293-299.

[4] Mottet D, Ruys S P, Demazy C, *et al*. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity[J]. Int J Cancer, 2005, 117(5): 764-774.

[5] Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, *et al*. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha [J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 8): 1203-1212.

[6] Mizukami Y, Li J, Zhang X, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in

colon cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(5):1765 - 1772.
[7] Harris A L. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1):38 - 47.
[8] 梁后杰, 李建军. 重视恶性肿瘤淋巴管生成的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(24):2179 - 2181.
[9] Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G, *et al*. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7(2):192 - 198.
[10] Stacker S A, Caesar C, Baldwin M E, *et al*. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells *via* the lymphatics[J]. Nat Med, 2001, 7(2):186 - 191.
[11] 宋炯, 傅仲学, 李明星. HIF-1α 在直肠癌中的表达和血管生成的关系[J]. 肿瘤, 2005, 25(6):604 - 608.
[12] 李明洋, 傅仲学, 吴星烨, 等. 间歇性缺氧对 SW480 细胞生长及 HIF-1α 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7):873 - 876.
[13] 李尚坤, 傅仲学, 李明洋. 结直肠肿瘤中缺氧诱导因子-1α 表达的 Meta 分析[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7):934 - 937.
[14] 涂经楷, 傅仲学, 叶晓莉, 等. 人大肠癌裸小鼠直肠黏膜原位种植癌及转移模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(8):1071 - 1072.
[15] 涂经楷, 傅仲学, 叶晓莉, 等. 人结肠癌细胞系裸小鼠淋巴结转移的观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17):1650 - 1653.

(**收稿**:2010-01-31;**修回**:2010-03-03)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2010)09-0911-01

个案与短篇

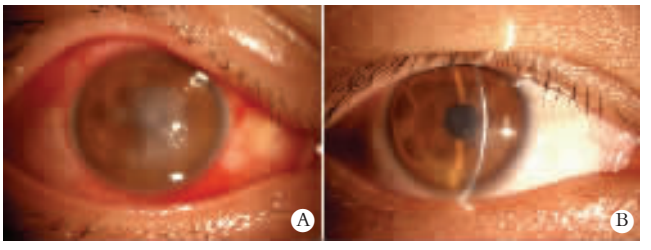
准分子激光原位角膜磨镶术术后角膜瓣下绿脓杆菌感染1例

张辰星,谢汉平 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心)

[关键词] 准分子激光原位角膜磨镶术;角膜;绿脓杆菌
[中图法分类号] R772.206 **[文献标志码]** B

1 临床资料

患者,男性,22岁。外院行双眼准分子激光原位角膜磨镶术(laser *in situ* keratomileusis, LASIK),术后第2天患者感右眼强烈异物感、疼痛、流泪、视力下降,无头昏、头痛,无恶心、呕吐,无意识障碍,外院取角膜表面分泌物培养后诊断为"绿脓杆菌感染"。予妥布霉素眼液点眼、庆大霉素结膜下注射及左氧氟沙星片口服治疗1 d后,患者自感症状无明显缓解来我院治疗。入院时查体:右眼视力为眼前手动(眼前40 cm),光定位准;左眼视力为0.4。右眼结膜充血(+++),右眼角膜可见约7 mm大小环行角膜瓣边缘,角膜瓣未见移位,角膜瓣下见直径约5 mm大小不规则角膜基质层浸润,角膜瓣雾状水肿、混浊(++),角膜下沉积物(-)(图1A)。右眼角膜可见约7 mm大小环行角膜瓣边缘,余角膜透明,角膜下沉积物(-)。双眼前房轴深约3 CT,房水清,虹膜纹理清。右眼内眼结构窥不进,左眼内眼结构检查未见异常。双眼眼压:右眼:正常眼压(指测),左眼:14.2 mmHg(非接触式眼压计)。角膜表面分泌物涂片后提示未查见细菌或真菌,诊断为右眼LASIK术后角膜瓣下感染(绿脓杆菌)。因其右眼角膜瓣下无脓液形成,仅有浸润,故未进行角膜瓣下冲洗,予以加替沙星眼液点右眼1次/h,利福平眼液点右眼6次/d,妥布霉素眼膏点右眼1次/晚。局部抗感染治疗2周后右眼视力提升至0.1,自觉疼痛以及异物感症状明显减轻,裂隙灯下见角膜瓣下基质层浸润较前明显减轻,角膜瓣水肿明显消退。确认感染控制后加用醋酸泼尼松龙眼液点右眼6次/d、妥布霉素地塞米松眼膏点右眼1次/晚。治疗1个月后患者自觉右眼视力提高,右眼异物感、疼痛、流泪症状消失,要求出院。出院时情况:右眼视力0.2,右眼结膜充血(+),角膜可见约7 mm大小环行角膜瓣边缘,角膜瓣未见移位,角膜瓣下可见直径约3 mm大小不规则云翳,其余角膜透明(图1B)。右眼内眼前后节检查未见异常。



A:治疗前;B:治疗后

图1 LASIK术后角膜瓣下绿脓杆菌感染患者治疗前后右眼眼前节观察

2 讨论

准分子激光原位角膜磨镶术(LASIK)技术日趋成熟,并发症也逐渐减少。但LASIK手术使角膜正常的解剖屏障破坏,致病菌可直接侵入到角膜层间引发感染。LASIK术后角膜感染是影响患者视力的严重并发症,Chang等[1]综合文献的研究表明LASIK术后感染的发病率为0.02%~1.50%,其中绿脓杆菌感染为最严重的LASIK术后感染并发症。绿脓杆菌为一种条件致病菌[2,3],在角膜上皮和前弹力层受损的情况下进入角膜基质层后导致宿主感染发病[4]。绿脓杆菌感染后早期症状是剧烈的角膜刺激症状,在角膜中央形成小面积灰黄色的浸润、隆起,继而形成灰白色坏死区,角膜基质可迅速遭到破坏和穿孔。本病例中患者在院外很快得到确诊并使用抗生素眼液治疗,来我院时病情已得到基本的控制,故基质层内未形成脓液和坏死灶。绿脓杆菌感染中导致角膜结构破坏除了绿脓杆菌毒性产物外,还有嗜中性白细胞侵入释放炎性因子所致[5,6],因此在感染得到控制的前提下使用激素以及抑制炎症的药物配合

(下转916页)

[通信作者] 谢汉平,E-mail:xiehanping@yahoo.com.cn