维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0250-03

低氧诱导因子 1α 对小鼠宫颈癌放射敏感性的影响

刘方欣[1],张玉诺[2],李晓愚[1],任庆兰[1],彭志平[1],李少林[1]

(1.重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016;2.解放军第 181 医院妇幼中心,广西 541002)

【摘 要】目的:探讨低氧诱导因子 1α(HIF-1α)对小鼠宫颈癌皮下移植瘤放射敏感性的影响,探讨其可能的机制。方法:建立宫颈癌皮下移植瘤模型,随机分为对照组、单次 γ 射线大剂量照射组、小剂量分次照射组、大剂量照射联合高压氧组、小剂量分次照射联合高压氧组,采用不同的方案进行体外放射治疗。免疫组化法测定放射治疗后移植瘤内的 HIF-1α、bcl-2 的表达水平,观察各 γ 射线处理组照射后移植瘤的抑瘤率,并对 HIF-1α 与 bcl-2 的表达及抑瘤率进行相关性分析。结果:HIF-1α 的表达与移植瘤抑瘤率呈负相关($r=-0.514$, $P<0.05$);与 Bcl-2 表达无明显相关关系。结论:抑制 HIF-1α 的表达可提高肿瘤对放射治疗的敏感性,该效应可能与 Bcl-2 表达无关。

【关键词】低氧诱导因子 1α;放射敏感性;宫颈癌

【中国图书分类法分类号】R737.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-07-10

Effect of Hypoxia-inducible factor-1 alpha on the radiosensitivity of rat cervical carcinoma

LIU Fangxin, et al

(*Department of Radiation Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of Hypoxia-inducible factor-1 alpha(HIF-1α)on the radiosensitivity of rat cervical carcinoma and discuss the possible mechanism. *Methods*: The transplantation tumor model of cervical carcinoma was established. 77 rats were randomly divided into five groups: control group, the large fraction irradiation group, the small fraction irradiation group, the large fraction irradiation combining HBO group and the low dose irradiation combining HBO group. Expressions of HIF-1α and bcl-2 in transplantation tumor after treatment were detected by immunohistochemical staining, and the tumor inhibitory rate by the change of tumor volume. The correlation between expressions of HIF-1 α and bcl-2 (and tumor inhibitory rate)was also observed. *Results*: Expression of HIF-1 α and carcinoma growth inhibitory rate showed a reverse correlation($r=-5.147$, $P<0.05$). No correlation was found between the expression of HIF-1 α and bcl-2. *Conclusions*: Inhibiting the HIF-1α expression could effectively promote the radiosensitivity of rat cervical carcinoma without impacting the expression of Bcl-2.

【Key words】Hypoxia-inducible factor-1α(HIF-1α); Radiosensitivity; Cervical carcinoma

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,在宫颈癌治疗中放射治疗占有十分重要的地位,其适应范围较广,可用于各期宫颈癌的治疗。但肿瘤细胞乏氧等原因导致的肿瘤细胞对放射线敏感性降低和放疗副反应限制了有效治疗剂量的增加,影响了放射治疗的疗效。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)1α 是肿瘤细胞在乏氧条件下产生的一种转录激活因子,参与低氧性反应的调节过程,是细胞低氧应答的关键因子。本研究采用免疫组化方法检测不同放疗方案照射后及在高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)条件下 HIF-1α 以及与放射敏感性密切相关的 bcl-2 在宫颈癌细胞中的表达情况,探讨 HIF-1α 与肿瘤细胞放射敏感性之间的关系。

作者介绍:刘方欣(1971-),女,实验师,主要研究方向:妇科肿瘤。

1 材料与方法

1.1 动物和肿瘤细胞株

动物:昆明种小鼠购自重庆医科大学实验动物中心。小鼠皆为雌性,平均体重 20.5±2.5g。鼠源性宫颈癌细胞株 U14 购自重庆医科大学超声研究所。

1.2 肿瘤动物模型的建立和分组

将宫颈癌细胞株 U14 用细胞计数板计数,取 7×10^6 个

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞接种到小鼠腹腔内,进行腹腔保种。密切观察腹水生成情况。1 周左右见腹腔接种小鼠腹部明显膨隆,抽取腹水,1000r/min 离心 5min,弃上清,加入生理盐水。细胞计数板计数,以 5×10^6 个细胞 / 只将癌细胞接种于预先已脱毛和消毒的小鼠右后肢大腿背侧。用游标卡尺测量肿瘤的 3 个相互垂直的直径,取其平均值(MD),待肿瘤直径达 6mm 时进行实验。

将 77 只已建立肿瘤模型的昆明种小鼠随机分为 5 组:I 组 11 只为空白对照组;II 组 17 只为单纯 γ 射线大分割单次照射组;III 组 15 只为大分割 γ 射线照射 + HBO 组;Ⅳ组 16 只为小分割 γ 射线分次照射组; Ⅴ组 18 只为小分割 γ 射线分次照射 + HBO 组。

1.3 ^{60}Co γ 射线照射和 HBO 联合 γ 射线照射

^{60}Co 治疗机 FCC-800 为山东新华医疗设备厂产品。高压氧舱 DWC150/300 型为山东烟台冰轮集团高压氧舱有限公司产品。γ 射线照射 + HBO 组每次照射前均进行高压氧曝露:0.25MPa,100%O_2,60min。照射前,按 1.0ml/kg 给予速眠新肌肉注射,待药物显效后,将小鼠装入固定盒中,将其右后肢拉出,只照射荷瘤小鼠的带瘤腿,肿瘤表面覆盖 2cm 的等效物,处方剂量按 2cm 深度计算。^{60}Co γ 射线大分割单次照射量为 4Gy,剂量率为 39.37cGy/min;小分割多次照射组照射剂量为每次 1Gy,分 4 次照射,每次照射后间隔 1 天进行下次照射,平均照射剂量率为 38.24Gy/min。照射后通过观察皮下移植瘤的体积变化,计算抑瘤率来研究 HIF-1α 对小鼠宫颈癌皮下移植瘤的放射治疗效果的影响。照射后第 10 天、15 天、20 天,用游标卡尺测量瘤体最长径(a)与最短径(b),肿瘤体积为 $V(mm^3)=\frac{\pi ab^2}{6}$,肿瘤体积抑瘤率 $=\frac{V_{对}-V_{观}}{V_{对}}\times100\%$。

1.4 HIF-1α 的表达

照射后第 21 天脱颈处死小鼠,尽可能地完整剥离瘤体。切成 0.5cm^3 大小的组织块,常规取病理切片进行免疫组化检测 HIF-1α 和 Bcl-2 的表达。

鼠抗人 HIF-1α 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司;Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体为福州迈新生物技术开发公司产品。二抗生物素标记兔抗鼠 IgG 及二氨基联苯(di-aminobenzidine,DAB) 酶底物显色试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品。染色方法为免疫组化 SP 法,实验步骤按试剂盒说明书进行。

结果判定:结果判定采用双人双盲法用显微镜观察,以细胞核黄色或棕黄色为阳性标记。随机选择 10 个视野,高倍镜下观察 500~800 个细胞,计数阳性细胞。表达强度标准如下:阴性(-):没有阳性细胞;弱阳性(+):阳性细胞数占所观察细胞数的 20%以下;强阳性(++):阳性细胞数占所观察细胞数的 20%~50%。

1.5 统计学分析

用 SPSS 10.0 for windows 统计软件处理。检测数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 q' 检验,$P>0.05$ 表示无显著性差异,$P<0.05$ 则表示有显著差异性,$P<0.01$ 表示有极显著差异性。HIF-1α 和 bcl-2 表达、抑瘤率之间的关系采用 Spearman 直线相关分析。

2 结 果

2.1 各组射线照射后的抑瘤率

各组小鼠宫颈癌体外移植瘤受到 γ 射线照射后肿瘤生长均受到抑制。与单次 γ 射线大分割照射相比,γ 射线与 HBO 联合应用对肿瘤的抑制作用更明显,均具有明显的放射增敏作用,具有明显的统计学差异($P<0.05$)。

2.2 HIF-1α 与 bcl-2 的表达

空白对照组宫颈癌移植瘤模型存在一定的 HIF-1α 阳性表达,其中强阳性(++)仅 1 例。采用大分割 γ 射线照射后阳性表达率明显增加,且强阳性(++)例数增多,共 6 例(35.2%)。联合 HBO 治疗能够明显降低 HIF-1α 的阳性表达,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。分割射线照射也能降低 HIF-1α 的阳性表达, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

bcl-2 的阳性表达除大剂量 γ 射线照射组表达稍有上升外,其他组表达水平无明显差异。

2.3 HIF-1α 与肿瘤抑瘤率及 bcl-2 的相关性分析

Spearman 直线相关分析显示,HIF-1α 表达与肿瘤抑瘤率呈负相关关系 ($r=-0.514$,$P<0.05$);HIF-1α 表达与 bcl-2 的表达无明显相关关系,可能与样本量过少有关。

表 1 各组射线照射后的抑瘤率比较

组别	抑瘤率 (%)		
	10d	15d	20d
I	-	-	-
II	16.21 ± 1.61	19.63 ± 1.54	12.38 ± 1.37
III	28.45 ± 2.42*	37.73 ± 2.46*	24.93 ± 3.32*
Ⅳ	29.38 ± 3.85*	34.97 ± 3.14*	23.21 ± 2.14*
Ⅴ	43.34 ± 5.02*	52.71 ± 4.16*	40.23 ± 6.03*

*vs II group, $P<0.05$

表 2 各组 HIF-1α 与 bcl-2 的表达情况

组别	总例数	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)
I	11	5	45.4	4	36.3
II	17	11	64.7	10	58.8
III	15	4	26.7*	6	40
Ⅳ	16	7	43.8*	7	43.8
Ⅴ	18	5	27.8*	7	38.9

*vs II group, $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

HIF-1 由 α、β 两个亚基组成。HIF-1β 为基础表达蛋白,HIF-1α 为氧调节蛋白。HIF-1α 在常氧状态下极不稳定,而在细胞处于低氧条件时,HIF-1α 在多种组织细胞中表达水平增高,其稳定性和活性也相应增加。对于实体肿瘤来说,肿瘤内部乏氧细胞的存在是广泛存在的现象,因此在多种实体肿瘤中都存在 HIF-1α 的高表达。目前的研究表明,HIF-1α 与多种肿瘤的发生、发展关系密切。在多种实体肿瘤中均有 HIF-1α 的表达如前列腺癌、肠癌、宫颈癌、肺癌等。在肿瘤缺氧的微环境中,肿瘤细胞通过 HIF-1α 的高表达来维持其氧和代谢的稳定,促进自身的生长和转移。另外,一些癌基因的突变活化或抑癌基因的失活也可以增加 HIF-1α 的表达[1]。同时,放射线的生物学效应也受到局部组织氧浓度的影响,细胞在有氧条件下照射时放射敏感性约为乏氧时的 3 倍左右。研究表明,乏氧细胞的存在是肿瘤细胞放射敏感性下降的重要原因[2]。

本研究结果表明,HIF-1α 在宫颈癌体外移植瘤模型中存在着一定的表达,且其表达水平与肿瘤的放射敏感性密切相关。HIF-1α 表达水平越高,肿瘤放射敏感性越低,说明 HIF-1α 在肿瘤放射抗拒性产生的过程中起到了重要作用,可能是乏氧诱导的放射线抗拒的关键因子。γ 射线照射后,肿瘤细胞内 HIF-1α 的表达水平明显增加,表达强度增强,可能与射线照射后肿瘤细胞大量凋亡坏死,进一步加重肿瘤内部的乏氧水平有关。小剂量分割次数照射可以增加照射晚期反应组织的耐受性及降低氧增强比,对正常组织的保护作用大,是临床常用的放射增敏的手段。本研究中小剂量分割次数照射可以使 HIF-1α 的表达降低,增加肿瘤的放射敏感性。在照射间隔时间内,凋亡、坏死细胞的清除可以改善肿瘤组织内的乏氧条件。目前研究认为,乏氧细胞对放射治疗敏感性降低,与细胞内的自由基产生有关。细胞内的介质受到射线照射后能产生大量的自由基对生物组织产生进一步的损伤,而氧分子的存在能与自由基快速作用产生过氧化物自由基,造成 DNA 损伤,最终引起细胞凋亡。该过氧化物自由基在细胞内是一种不可修复的形式,使细胞在受到射线照射后内部物质成分发生变化,在射线诱导细胞调亡的过程中起到重要的作用。而乏氧条件下该过氧化物自由基存在时间过短甚至无法产生,电离辐射引起的细胞损伤则可以在射线作用的间歇自行修复[3]。

高压氧(hyperbaric oxygenation,HBO)是利用机体吸入高压氧时所产生的各种反应,对某些急、慢性缺血缺氧性疾病或因缺氧引起的继发性疾病产生有效的治疗作用。过去认为 HBO 能够促进肿瘤的增殖和转移,因此肿瘤是 HBO 的禁忌症。而最近的研究表明,HBO 能够提高肿瘤组织内的氧分压,增加组织氧含量,促进氧扩散,使乏氧细胞转变为富氧细胞[4,5],并且对多种肿瘤细胞的生长和转移有抑制作用,同时可以提高放射治疗的敏感性。本研究利用 HBO 来提高肿瘤组织氧合、降低肿瘤组织内乏氧细胞数量,可以显著降低 HIF-1α 的表达,增加肿瘤的放射敏感性,显示了良好的应用前景。

Bcl-2 是调控细胞凋亡的关键元件,与肿瘤组织放射敏感性关系密切。许多研究证实,电离辐射可调控 bcl-2 家族基因表达。有报道,电离辐射能诱导 Bcl-2 的活化[6]。Kariya S[7]等指出,Bcl-2 的表达可以使放射抗性增加。也有报道称在人乳腺癌细胞株 MCF7 中 bcl-2 的过度表达可以与乏氧协同作用,促进 VEGF 的表达和体内血管生成,从而诱导肿瘤的转移[8]。但本研究中 HIF-1α 表达与 bcl-2 的表达无明显相关关系,可能是由于样本量较少,尚不能肯定 bcl-2 在 HIF-1α 调控肿瘤放射敏感性作用中是否发挥作用。

虽然目前 HIF-1α 影响肿瘤放射敏感性的具体机制尚不明确,但无疑在其中发挥了极其重要的作用,也成为肿瘤治疗和放射增敏剂研究的重要靶点。Sun 等[9]利用反义 HIF-1α(antisense HIF-1α)与免疫基因治疗联合应用,发现反义 HIF-1α 能够提高免疫基因治疗的疗效。反义 HIF-1α 能够抑制内源性 HIF-1α 的活性,并使肿瘤血管密度明显降低。通过反义技术阻断 HIF-1α 的表达与放射治疗联合应用的研究目前较少,尚需做进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Brune B,Zhou J.The role of Nitric Oxide (NO)in stability regulation of hypoxia inducible factor I alpha (HIF-I alpha)[J].Curr Med Chem,2003;10(10):845.

[2] 周厚清,邢 成,李伯南.肿瘤放射增敏剂及增敏机制研究进展[J].国外医学·肿瘤学分册,2001;28(6):432.

(下转第 278 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

ARIMA 模型是将预测对象随时间推移而形成的数据序列视为一个随机序列，除去个别偶然因素影响观察值外，时间序列是一组依赖于时间 t 的随机变量。这组随机变量所具有的依存关系或自相关性表征了预测对象发展的延续性，而这种自相关性被相应的 ARIMA 模型描述出来，就能从时间序列的过去值、现在值预测其未来的值。ARIMA 模型不需要对时间序列的发展模式作先验假设，方法的本身保证可通过反复识别修改，直至获得满意模型，故 ARIMA 模型适用于各种类型的时间序列数据；在预测时，不仅考察预测变量的过去值与现在值，而且模型拟合产生的误差也作为重要因素进入模型，有利于提高模型的精确度。其缺点是要求较大的样本量，高阶模型中的变量系数在实际工作中无从解释，适合短期预测。

在生物医学的研究中，医学本身提供的信息很多，它可分为三大系统，信息完全明确的称为白色系统，信息完全不明确的称为黑色系统，介于白与黑之间称为灰色系统。灰色理论认为影响结核病发病率的各种因素，一些因素如结核菌素(BCG)的接种水平、综合性医疗机构诊断能力、病人对结核病的认知水平等是可知的，另外一些因素的影响则是未知的，结核病的发展趋势存在白色和黑色参数，由灰色理论可预测结核病发病率的发展趋势。

大多数理统计方法要求大样本并对样本分布有一定要求，要求样本有较好分布规律，且计算工作量大，有时还可能出现定量结果与定性结果不符的现象。灰色系统对样本量及样本分布要求就不那么严格，因此具有适用性强的特点。

重庆市 1993~2004 年结核病登记发病率的原始数据序列无规律可循，且原始数据数量不多。利用残差 GM(1,1)模型对其进行分析与预测，从检验效果看，模型的拟合令人满意，说明残差 GM(1,1)模型具有预测性能好的优点。

(通讯作者：王润华，E-mail：wzhzyp@163.com)

参 考 文 献

[1] Shimao T.Tuberculosis and its control-lessons from the past and future prospect[J].Kekkaku,2005;80(6):481-489.

[2] Aoki M.Tuberculosis control strategy in the 21st century in Japan-for elimination of tuberculosis in Japan[J].Kekkaku,2001;76(7):549-557.

[3] 许汝福，王文昌，易 东，等.时间序列资料 GM(O,N)预测模型及其应用[J].中国卫生统计，1999;16(3):162-163.

[4] 徐国祥，主编.统计预测与决策[M]，第 1 版，上海：上海财经大学出版社，1998.199-225.

[5] 王黎霞，施鸿生，刘胜安，等.我国结核病流行病学模型及疫情态势浅析[J].中国卫生统计，1994;11(4):18-21.

[6] Dye C,Fengzeng Z,Scheele S,et al.Evaluating the impact of tuberculosis control:number of deaths prevented by short-course chemotherapy in China[J].Int J Epidemiol,2000;29(3):558-564.

[7] Nishiura H,Patanarapelert K,Tang IM.Predicting the future trend of drug-resistant tuberculosis in Thailand: assessing the impact of control strategies[J].Southeast Asian J Trop Med Public Health,2004;35(3):649-656.

[8] Rios M,Garcia JM,Sanchez JA,et al.A statistical analysis of the seasonality in pulmonary tuberculosis[J].Eur J Epidemiol,2000;16(5):483-488.

[9] West RW,Thompson JR.Modeling the impact of HIV on the spread of tuberculosis in the United States[J].Math Biosci,1997;143(1):35-60.

[10] Loytonen M,Maasilta P.Multi-drug resistant tuberculosis in Finland-a forecast[J].Soc Sci Med,1998;46(6):695-702.

[11] Antunes JL,Waldman EA.Tuberculosis in the twentieth century:time-series mortality in Sao Paulo,Brazil,1900-97[J].Cad Saude Publica,1999;15(3):463-476.

(上接第 252 页)

[3] 方女画，杨 波，何俏军.乏氧条件下肿瘤细胞的耐药机制及肿瘤治疗策略[J].中国药学杂志，2005;40(16):1208.

[4] Hartmann KA,van der Kleij AJ,Carl UM,et al.Effects of hyperbaric oxygen and normobaric carbogen on the radiation response of the rat rhabdomyosarcoma R1H[J].Int J Radiat Oncol Biol Phys,2001;51(4):1037.

[5] Kunugita N,Kohshi K,Kinoshita Y,et al.Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models[J].Cancer Lett,2001;164(2):149.

[6] Chendil D,Das A,Dey S,et al.Par-4,a pro-apoptosis gene inhibits radiation-induced NF kappa B activity and Bcl-2 expression leading to induction of radiosensitivity in human prostate cancer cells PC-3[J].Cancer Biol Ther,2002;1(2):152-160.

[7] Kariya S,Ogawa Y,Yoshida S,et al.X-irradiation enhances the expression of Bcl-2 in HL-60 cells:the resulting effects on apoptosis and radiosensitivity[J]. Int J Mol Med,1999;3(2):145-152.

[8] Biroccio A,Candiloro A,Mottolese M,et al.Bcl-2 over-expression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line[J].FASEB J,2000;14(5):652.

[9] Sun X,Kanwar JR,Leung E,et al.Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhance the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy[J].Gene Ther,2001;8(8):638.