

## 沉默 HIF-1 $\alpha$ 对人鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的影响\*

向少龙<sup>1</sup>, 赵艳<sup>2</sup>, 刘娟娟<sup>1</sup>, 赵厚育<sup>3\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学附院 耳鼻咽喉科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨沉默缺氧诱导因子-1 $\alpha$  对人鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的影响。方法: 15 只 4~6 周龄雌性裸鼠, 随机均分为 HIF-1 $\alpha$  干扰组、空载组及阴性对照组; 采用脂质体转染法将 HIF-1 $\alpha$  的 microRNA 干扰质粒转染 CNE-2 细胞, RT-qPCR 检测其沉默效应, 将转染 HIF-1 $\alpha$  干扰质粒的 CNE-2 细胞、转染空载质粒的 CNE-2 细胞以及 CNE-2 细胞分别接种于 3 组裸鼠右腋下, 建立鼻咽癌 CNE-2 细胞裸鼠移植瘤模型, 形成肉眼可见的肿瘤后再喂养 16 d, 观察各组成瘤时间及肿瘤体积; RT-qPCR 检测 3 组移植瘤中 HIF-1 $\alpha$  基因的表达, 蛋白质印迹法检测 3 组移植瘤中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达。结果: 成功构建裸鼠移植瘤模型, HIF-1 $\alpha$  干扰组、阴性对照组、空载组裸鼠成瘤时间分别为 (8.60  $\pm$  1.40)、(4.60  $\pm$  0.55)、(4.80  $\pm$  0.84) d, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 肿瘤体积分别为 (128.60  $\pm$  77.70)、(1411.10  $\pm$  212.50)、(1306.80  $\pm$  154.60) mm<sup>3</sup>, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); HIF-1 $\alpha$  干扰组瘤体组织中的 HIF-1 $\alpha$  基因和蛋白的表达量明显降低 ( $P < 0.05$ )。结论: 沉默 HIF-1 $\alpha$  基因能有效抑制人鼻咽癌裸鼠移植瘤成瘤时间和肿瘤的生长。

**[关键词]** 鼻咽肿瘤; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 肿瘤移植; RNA 干扰

**[中图分类号]** R349.6; R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)04-0373-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.04.005

## Influence of HIF-1 $\alpha$ Silencing on Growth of Human Nasopharyngeal Carcinoma Xenografts in Nude Mice

XIANG Shaolong<sup>1</sup>, ZHAO Yan<sup>2</sup>, LIU Juanjuan<sup>1</sup>, ZHAO Houyu<sup>3</sup>

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Otorhinolaryngology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the influence of silencing hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) on growth of human nasopharyngeal carcinoma xenografts in nude mice. **Methods:** Respectively 15 female nude mice aged 4 to 6 weeks were randomly and equally divided into HIF-1 $\alpha$  interference group (group H), vector group (group V), and negative control group (group C). CNE-2 cells were transfected with microRNA interference plasmids of HIF-1 $\alpha$  by using lipofection. RT-qPCR was used to detect the silencing effect. CNE-2 cells that transfected by HIF-1 $\alpha$  interference plasmids, that by blank plasmids, and that non-transfected were used to inoculate subcutaneously into the right underarm of the nude mice in 3 groups respectively to establish xenografts model. In 16 days after the carcinoma appeared, the tumor forming time was observed, and tumor volume was measured and calculated. The mRNA and protein expression levels of HIF-1 $\alpha$  in xenografted tumors were detected by using RT-qPCR and Western blotting. **Results:** the nasopharyngeal carcinoma xenografts nude mice models were successfully established. The macroscopic tumor forming time in groups H, C, and V were (8.6  $\pm$  1.4)

\* [基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81260353)

\*\* 通信作者 E-mail: zhaohouyujia@163.com

网络出版时间: 2017-04-19 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170419.1515.003.html>

d,  $(4.6 \pm 0.55)$  d, and  $(4.8 \pm 0.84)$  d respectively, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The final tumor volumes of these groups were  $(128.6 \pm 77.7)$  mm<sup>3</sup>,  $(1411.1 \pm 212.5)$  mm<sup>3</sup>, and  $(1306.8 \pm 154.6)$  mm<sup>3</sup> respectively. The mRNA and protein expression levels of group H were significantly lower than those of groups V and C ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** silencing HIF-1 $\alpha$  gene can effectively inhibit the growth of human nasopharyngeal carcinoma xenografts in nude mice.

[ **Key words** ] nasopharyngeal neoplasms; hypoxia inducible factor 1-alpha; neoplasm transplantation; RNA interference

鼻咽癌是中国常见的恶性肿瘤之一,以南方地区发病为主,发病率居头颈部恶性肿瘤的首位。低氧微环境在实体肿瘤中普遍存在,肿瘤细胞通过调控自身多种基因表达适应低氧环境并提高耐受力,缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1-alpha, HIF-1 $\alpha$ ) 在肿瘤细胞对低氧微环境的适应过程中起着中枢纽带作用<sup>[1]</sup>。目前研究表明,HIF-1 $\alpha$  在鼻咽癌组织中高表达,与肿瘤发生进展及治疗抵抗等恶性行为密切相关,亦提示 HIF-1 $\alpha$  可作为一个新的治疗靶点<sup>[2-4]</sup>。本研究通过建立裸鼠移植瘤模型,观察沉默 HIF-1 $\alpha$  是否能抑制鼻咽癌 CNE-2 细胞移植瘤的生长,为临床治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

3~4 周 BALB/C-nu/nu 雌性裸鼠 15 只,体重 18~20 g,购自贵州医科大学实验动物中心。鼻咽癌细胞株 CNE-2 (低分化鼻咽鳞状细胞癌细胞系) 由上海复旦大学亓立峰教授实验室赠与,胎牛血清 (gibco, 美国), Trizol 试剂、逆转录试剂盒及 Real-time PCR SYBER Green 试剂盒购于 Roche, HIF-1 $\alpha$  miRNA 干扰质粒 (pPG/miR/eGFP/Basticidin-HIF-1 $\alpha$ ) 由上海吉玛公司合成构建; Lipofectamine TM 2000. Opti-MEM 低血清培养基 (Invitrogen) Western blot 相关试剂及蛋白提取试剂盒购于 Solarbio, BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo, 美国), 兔抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体、鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体及羊抗兔二抗均购于 Abcam 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人鼻咽癌细胞 CNE-2 用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养液,于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 恒温培养箱中常规培养,每 2 d 传代 1 次。

**1.2.2 分组** 15 只雌性裸鼠,随机均分为 HIF-1 $\alpha$  干扰组、空载体组及阴性对照组,每组 5 只,分别

采用转染 pPG/miR/eGFP/Basticidin-HIF-1 $\alpha$  质粒、转染 pPG/miR/eGFP/Basticidin 空载体及未转染的 CNE-2 细胞构建裸鼠皮下移植瘤模型。

**1.2.3 脂质体法转染鼻咽癌 CNE-2 细胞** 制备鼻咽癌 CNE-2 单细胞悬液,按  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔培养板,待细胞完全贴壁生长到 60%~70% 融合状态时进行转染,HIF-1 $\alpha$  干扰组及空载体组分别转染 pPG/miR/eGFP/Basticidin-HIF-1 $\alpha$  质粒及 pPG/miR/eGFP/Basticidin 的空载体,转染 6 h 后,更换无双抗的培养基,继续培养 48 h 后,采用 RT-qPCR 法检测各组细胞中 HIF-1 $\alpha$  基因的沉默效应,计算细胞的干扰效率。引物委托上海生工合成,HIF-1 $\alpha$  上游引物为 5'-CCATTAGAAAGCAGT-TCCGC-3',下游引物为 5'-TGGGTAGGAGATG-GAGATGC-3';内参基因 GAPDH 上游引物为 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3',下游引物为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'; HIF-1 $\alpha$  基因产物长度 194 bp,内参 GAPDH 产物长度 247 bp。

**1.2.4 裸鼠皮下移植瘤模型** 实验用裸鼠在无特殊病原菌 (special pathogenfree, SPF) 级条件下饲养,于每只裸鼠右腋下分别注射经不同方法处理的处于对数生长期的鼻咽癌 CNE-2 细胞 0.2 mL,细胞数为  $1.5 \times 10^7$  /mL,观察成瘤情况,待长出瘤块后每隔 3 d 量 1 次瘤块的长径 (a)、短径 (b),按  $\frac{1}{2}ab^2$  计算瘤块的体积,第 16 天时处死动物。

**1.2.5 Western Blot 检测 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达** 取各组瘤体组织,制作细胞裂解液提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒定量蛋白浓度后,取 25  $\mu$ g 总蛋白上样,用 10% 十二烷基酸-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳 100~120 min 分离 HIF-1 $\alpha$  蛋白,切胶转 PVDF 膜 2 h,5% 脱脂奶封闭 2 h;兔抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体 (1:2 000) 为一抗,4 °C 孵育过夜,二抗用羊抗兔 (1:7 500),以 GAPDH (一抗 1:2 000,二抗 1:10 000) 为内参,二抗室温孵育 1 h,1  $\times$  TBST 洗涤;用 ECL 试剂行化学发光法曝光,结

果用 image-J 图像分析系统测定各条带的灰度值,以目的条带与内参条带的平均灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计分析。所有资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间结果实验数据符合正态分布和总体方差相等时组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RNA 干扰对 HIF-1 $\alpha$ 的沉默效果

转染后, HIF-1 $\alpha$  干扰组、阴性对照组和空载组 CNE-2 细胞 HIF-1 $\alpha$  基因相对表达量分别为  $(0.08 \pm 0.02)$ 、 $(0.88 \pm 0.05)$ 、 $(0.85 \pm 0.05)$ ,  $P < 0.01$ , 提示 HIF-1 $\alpha$  干扰质粒能沉默鼻咽癌 CNE-2 细胞中 HIF-1 $\alpha$  基因表达, 可以进一步用于鼻咽癌移植瘤模型的构建。在 HIF-1 $\alpha$  干扰组、阴性对照组和空载组的瘤体中 HIF-1 $\alpha$  基因相对表达量分别为  $(0.12 \pm 0.03)$ 、 $(0.86 \pm 0.04)$ 、 $(0.81 \pm 0.05)$ ,  $P < 0.05$ 。HIF-1 $\alpha$  基因在 HIF-1 $\alpha$  干扰组中表达水平较其他两组均明显降低, 抑制率为 88%。

### 2.2 HIF-1 $\alpha$ 沉默对移植瘤中 HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的影响

HIF-1 $\alpha$  干扰组 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的相对值为  $(0.42 \pm 0.04)$ , 明显低于空载组  $(0.82 \pm 0.05)$  及阴性对照组  $(0.88 \pm 0.05)$ ,  $P < 0.05$ , 见图 1。

### 2.3 移植瘤成瘤时间

3 组裸鼠成瘤率均为 100%, 成瘤时间 HIF-1 $\alpha$  干扰组  $(8.60 \pm 1.40)$  d, 阴性对照组  $(4.60 \pm 0.55)$  d 以及空载组为  $(4.80 \pm 0.84)$  d, HIF-1 $\alpha$  干扰组与阴性对照组和空载组比较, HIF-1 $\alpha$  干扰组成瘤时间最长, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示沉默 HIF-1 $\alpha$  可延长 CNE-2 细胞移植瘤的成瘤时间。

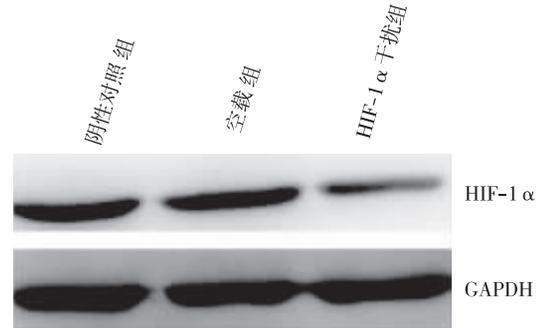


图 1 各组瘤体中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达  
Fig. 1 Expression of HIF-1 $\alpha$  protein in tumors of each group

### 2.4 移植瘤体积

如表 1 所示, 自第一只裸鼠成瘤后, 每 3 d 测量移植瘤体积, 共 6 次。3 组裸鼠在 6 个时间点移植瘤体积均符合正态分布, 采用单因素方差分析显示, 方差齐, HIF-1 $\alpha$  干扰组肿瘤体积受到明显抑制 ( $P < 0.05$ )。HIF-1 $\alpha$  干扰组、阴性对照组以及空载组最终瘤体体积分别为  $(128.60 \pm 77.70)$ 、 $(1411.10 \pm 212.50)$ 、 $(1306.80 \pm 154.60)$  mm<sup>3</sup>, HIF-1 $\alpha$  干扰组的肿瘤体积明显小于阴性对照组 (图 2), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 3 组裸鼠移植瘤体积

Tab. 1 Tumor volumes in mice of the 3 groups

组别	移植瘤体积 (mm <sup>3</sup> )					
	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天	第 16 天
空载组	34.30 $\pm$ 13.50	96.90 $\pm$ 18.90	186.40 $\pm$ 32.60	358.10 $\pm$ 69.00	738.90 $\pm$ 132.40	1306.80 $\pm$ 154.60
阴性对照组	44.20 $\pm$ 22.80	102.60 $\pm$ 28.80	206.80 $\pm$ 54.90	461.60 $\pm$ 97.20	850.40 $\pm$ 157.50	1411.10 $\pm$ 212.50
HIF-1 $\alpha$ 干扰组	0 <sup>(1)(2)</sup>	15.60 $\pm$ 8.40 <sup>(1)(2)</sup>	33.70 $\pm$ 12.80 <sup>(1)(2)</sup>	50.50 $\pm$ 21.80 <sup>(1)(2)</sup>	87.60 $\pm$ 37.70 <sup>(1)(2)</sup>	128.60 $\pm$ 77.70 <sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> 与空载组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup> 与阴性对照组比较,  $P < 0.05$

## 3 讨论

HIF-1 是目前所发现的介导正常细胞以及肿瘤细胞低氧反应最关键的核转录因子, 由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  两种亚基聚合而成, 活性由 HIF-1 $\alpha$  决定。大多的实体肿瘤都存在局部低氧区, HIF-1 $\alpha$

在肿瘤细胞缺氧耐受机制中起主导作用, 在缺氧时可以通过增加 HIF-1 $\alpha$  的稳定, 使肿瘤能在缺氧的情况下存活与生长<sup>[5]</sup>。目前研究表明 HIF-1 $\alpha$  高表达导致肿瘤的侵袭、转移能力和对放、化疗的抗拒性增强<sup>[6]</sup>, 在鼻咽癌的研究中, HIF-1 $\alpha$  高表达与致瘤性与不良预后有关, 高表达的 HIF-1 $\alpha$  蛋白可

能与鼻咽癌的发生、发展有关<sup>[7-8]</sup>。沉默 HIF-1 $\alpha$  可有效的降低鼻咽癌 CNE-2 细胞的增殖、黏附和侵袭能力<sup>[9-10]</sup>。在裸鼠体内沉默 HIF-1 $\alpha$  的表达对宫颈癌、肝癌具有抑瘤作用<sup>[11-12]</sup>。但 HIF-1 $\alpha$  对鼻咽癌的体内实验研究并不多,本实验旨在构建鼻咽癌裸鼠移植瘤模型,初步探讨沉默 HIF-1 $\alpha$  对其生长的影响,为进一步研究 HIF-1 $\alpha$  与鼻咽癌的关系奠定基础。



图 2 成瘤第 16 天时的小鼠

Fig. 2 Mice of groups C and H in 16 days after the tumor node appeared

本研究结果表明沉默 HIF-1 $\alpha$  后人鼻咽癌裸鼠移植瘤的生长受到明显的抑制( $P < 0.01$ ),瘤体组织中的 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),从体内验证了 HIF-1 $\alpha$  与鼻咽癌发生与生长有关,当抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达后肿瘤的发生时间延迟并且瘤体体积明显变小,但是其具体作用机制还需进一步研究。据目前的多种研究表明阻断 HIF-1 $\alpha$  表达能靶向杀伤乏氧肿瘤细胞,抗 HIF-1 $\alpha$  在肿瘤治疗中具有一定的应用前景,而本次研究也为 HIF-1 $\alpha$  可用于鼻咽癌的综合治疗提供了一定的临床基础与依据。

#### 4 参考文献

[1] Hong B, Lui VWY, Hashiguchi M, et al. Targeting tumor

hypoxia in nasopharyngeal carcinoma[J]. Head & Neck, 2013 (1):133 - 145.

[2] 钟启龙,王双乐,李创伟,等. 乙酰肝素酶、蛋白激酶 CK2 $\beta$  与缺氧诱导因子 - 1 $\alpha$  在鼻咽癌组织中的表达及其相关性研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014 (3):157 - 161.

[3] Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, et al. Expression of seven - in - absentia homologue 1 and hypoxia - inducible factor 1 alpha; novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Lett, 2013(1):52 - 57.

[4] Chen Y, Li X, Wu S, et al. Expression of HIF - 1 $\alpha$  and CAIX in nasopharyngeal carcinoma and their correlation with patients' prognosis [J]. Medical Oncology, 2014 (12):1 - 7.

[5] Berchner U, Yamac H, Trinidad B, et al. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia - inducible factor 1 - dependent induction of prolyl hydroxylase 2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007(3):1788 - 1796.

[6] Sasabe E, Zhou X, Li D, et al. The involvement of hypoxia - inducible factor - 1alpha in the susceptibility to gamma - rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells [J]. International Journal of Cancer, 2007(2):268 - 277.

[7] 景绍武,赵志军,景尚华,等. 低氧诱导因子 - 1 $\alpha$  与鼻咽癌临床病理特征相关性 Meta 分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015(7):548 - 554.

[8] 陈荣梅. 鼻咽癌中 HIF-1 $\alpha$  和 GLUT-1 的表达及临床意义[D]. 哈尔滨:哈尔滨医科大学, 2014.

[9] 景绍武,徐庆,景尚华,等. RNA 干扰沉默 HIF-1 $\alpha$  对人鼻咽癌 CNE-1 细胞黏附和侵袭能力的影响[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015(11):929 - 933.

[10] 史欣. 缺氧调控端粒酶活性及抑制鼻咽癌细胞增殖的实验研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014.

[11] Cheng YX, Fan W, Li BS, et al. RNA 干扰技术裸鼠体内沉默缺氧诱导因子 1 $\alpha$  的表达对宫颈癌的抑瘤效应[J]. 中德临床肿瘤学杂志, 2010(7):416 - 421.

[12] 杨巍,孙婷,曹建平,等. 沉默乏氧诱导因子 - 1 $\alpha$  和生存素基因联合放疗对裸鼠移植人肝癌的抑瘤效应[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2010(4):239 - 244.

(2017-02-16 收稿,2017-03-12 修回)  
中文编辑:周 凌;英文编辑:苏晓庆