

· 专题报道 ·

RNA 干扰对比观察 HIF1 α 和 HIF2 α 在人肾癌细胞中的作用及机制

王 丽¹, 王素霞², 梅长林^{2*}

(1. 上海武警总队医院肾内科, 上海 201103; 2. 第二军医大学长征医院肾内科, 解放军肾脏病研究所, 上海 200003)

[摘要] **目的:**运用 RNA 干扰(RNAi)方法对比观察 HIF1 α 和 HIF2 α 在人肾癌细胞的作用并探讨相关机制。**方法:**分别将化学合成的 HIF-1 α 和 HIF-2 α 小片段寡核苷酸脂质体瞬时转染人肾癌细胞(A498), 人正常肾小管上皮细胞(HK-2)和 A498 分别加入培养基和脂质体作为对照组。用 RT-PCR 或免疫印迹等观察 RNAi 24 h 后一些基因如 VEGF、ET-1、bcl-2 和 Ki67 的改变, 并用流式细胞仪和荧光显微镜观察细胞的凋亡情况。**结果:**与 HK-2 相比, A498 高表达 HIF-1 α 和 HIF-2 α , RNAi 后两基因基本被沉寂。HIF-1 α 干扰后 ET-1、bcl-2 和 Ki67 均下调, 伴随凋亡或坏死细胞增多, 而 HIF2 α 干扰后, 仅 VEGF 下调较为明显。**结论:**HIF-1 α 和 HIF-2 α 均有一定程度调节血管生成基因的作用, 但 HIF-1 α 尚具备一定的调节肿瘤细胞增殖功能, 可能通过调节凋亡抑制基因实现。提示 HIF-1 α 和 HIF-2 α 可能存在不同的转录调控功能和基因结合位点。

[关键词] 低氧诱导因子; 肾肿瘤; 细胞凋亡; RNA 干扰

[中图分类号] R 737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0590-04

Effect of HIF1 α and HIF2 α on human renal cell carcinoma and their mechanisms: an RNAi approach comparison

WANG Li¹, WANG Su-xia², MEI Chang-lin^{2*} (1. Department of Nephrology, Shanghai General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Shanghai 201103, China; 2. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Kidney Disease Research Institute of PLA, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate and compare the effect and the possible mechanisms of 2 hypoxia-inducible factors (HIF) 1 α and 2 α on renal cell carcinoma (RCC) by RNA interference (RNAi) method. **Methods:** Chemically synthesized HIF-1 α and HIF-2 α RNAi were transfected into RCC cell line A498 by liposome transient transfection. Normal proximal tubule cell line HK-2 and A498 were separately treated with medium and liposome as controls. The expressions of VEGF, ET-1, bcl-2 and Ki67 were observed by RT-PCR or Western blot 24 h after RNAi. Cell apoptosis was detected by flow cytometry and fluorescence microscopy. **Results:** Expressions of HIF-1 α and HIF-2 α RNAi were higher in A498 than those in HK-2, and the 2 genes were successfully blocked after RNAi. HIF-1 α RNAi resulted in a significant decrease of ET-1, bcl-2 and Ki67 expression, with increased apoptosis and necrosis of cells. HIF-2 α RNAi only resulted in a decrease of VEGF. **Conclusion:** Both HIF-1 α and HIF-2 α play important roles in regulation of angiogenesis; moreover, HIF-1 α might also regulate proliferation of tumor cells, possibly through regulating anti-apoptotic genes. It is implied the existence of different transcription regulation functions and gene combining sites between HIF-1 α and HIF-2 α .

[KEY WORDS] hypoxia-inducible factor; kidney neoplasms; apoptosis; RNA interference

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 590-593]

低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)在数种肾细胞癌中过度表达,其活性对维持肾细胞癌的能量代谢、新血管的形成、促进肾细胞癌生长和转移起重要作用,且受多种因子调节^[1~3]。HIF中的重要成员 HIF-1 α 和 HIF-2 α 在肾细胞癌中均有一定表达^[4],但两者具体作用方面颇有争议,尤其在血管生成和细胞生长方面。本文拟通过 RNA 干扰(RNAi)方法进一步探讨两者的作用及相关机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 正常人近端肾小管上皮细胞系 HK-2 和人肾癌细胞系 A498 均购自 ATCC,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂

的条件下培养,细胞贴壁生长,每 3~4 d 传代 1 次。
1.2 siRNA 合成 HIF1 α siRNA 寡核苷酸,参照 Nelson^[5]人 HIF1 α RNAi 序列(antisense: 5'-ACA CAC UGU GUC CAG UUA G-3'; sense: 5'-CUA ACU GGA CACAGU GUG U-3', gi:44890067),针对 HIF2 α mRNA (antisense: 5'-ACU GCU AUC AAA GAU GCU G-3'; sense: 5'-CAG CAU CUU UGA UAG CAG U-3', gi:189681),由 Invitrogen

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30271523). Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (30271523).

[作者简介] 王 丽, 博士生.

* Corresponding author. E-mail: chlmei1954@126.com

上海分公司根据 BLOCK-iT™ RNAi Designer 软件合成,于细胞对数生长期将正、反义寡核苷酸以 200 nmol/L 与 LipofectAMINE2000 混合 1 h 后加入 24 孔板细胞培养基(A组:A498+HIF2 α siRNA;B组:A498+HIF1 α siRNA;C组:HK-2+培养基;D组:A498+LipofectAMINE2000),瞬时转染 24 h 后收集细胞,正义寡核苷酸应该不起作用。

1.3 RT-PCR PCR 引物用 Primer Premier 5.0 设计并由博亚生物有限公司合成,参照人 HIF1 α 、HIF2 α 、VEGF、bcl-2、Ki67、ET-1 和 β -actin GenBank 上的序列设计引物(表 1)。用小量柱离心式组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)按说明书分别抽取总 RNA,取 5 μ l 总 RNA 进行 1% 甲醛变性凝胶电泳,电泳结果可见 28S、18S、5S 3 条清晰完整的带,证实所提取的总 RNA 完整可靠。将总 RNA 用适量 dH₂O 稀释后于紫外分光光度计扫描测定,其 D_{260}/D_{280} 稳定在 1.8~2.0 之间,表明所提取之总 RNA 质量较好,同时读取其浓度并使细胞 RNA 浓度调至一致。两步法 RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司,反应体系按说明书,扩增 30 个循环。各细胞 RT-PCR 实验重复 6 次。

表 1 PCR 引物序列
Tab 1 Sequence of PCR primer

Gene	P1(5'-3')	P2(5'-3')	Fragment length(bp)
HIF1 α	tgctggatcacagacagctc	gcaattgtggctaccacgta	280
HIF2 α	gccaccacgtaccaggacta	tcagaaaaaggccactgctt	362
VEGF	acaccatcaccatcgacaga	tgttcccaaaactgggctcat	582
bcl-2	gttgggcaacagagaacat	atggaaggccacatctgaac	450
Ki67	ccccaccagaactaacaga	ttccctgatgtttgtgtga	480
ET-1	gaccatgagaacacgcgcta	ttgggggaactccttaacct	274
β -actin	gaaaatctggcaccacacct	aggaaggaaggctggaagag	552

1.4 流式细胞仪分析细胞凋亡 细胞以 70% 乙醇固定成细胞悬液,离心,去固定液;室温下加入 PI 染色($10^5 \sim 10^6$ 个细胞/ml)30 min,然后上流式细胞仪(Becton-Dickinson-FACS Calibur, Germany)分析。

1.5 荧光显微镜观察细胞凋亡形态 接各组细胞,消化悬浮后行 DAPI(4,6-二脒基-2-苯吡啶)染色,按南京凯基生物发展科技有限公司凋亡检测试剂盒(KGA-211)说明书操作,荧光显微镜下观察凋亡细胞。

1.6 免疫印迹分析 兔抗人 bcl-2 和内参照 β -actin 单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司,接各组细胞,低温匀浆提取蛋白,按检测各组细胞中 bcl-2 蛋白的量,根据文献^[5]方法进行免疫印迹操作(BioRad 电泳及转膜装置),各细胞免疫印迹实验重复 5 次。

1.7 图像分析和数据处理 PCR 产物及免疫印迹电泳后的成像以 pImage 软件分析,结果以目的基因与 β -actin 的灰度值之比表示表达强度,进行方差分析(ANOVA)。对各组细胞中上述基因的表达进行相关分析。流式细胞及荧光显微镜下各组细胞中的凋亡比例进行 ANOVA。统计软件为 SPSS 11.0。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果 肾癌细胞 A498 经 HIF-1 α 干扰前后及对照的 HK-2 细胞中 HIF-1 α mRNA 的表达强度分别为 1.86 ± 0.05 、 0.05 ± 0.02 、 0.25 ± 0.03 ,对应 HIF-2 α mRNA 的表达强度则分别为 1.89 ± 0.06 、 0.04 ± 0.02 、 0.27 ± 0.03 。统计学分析显示,同一组 HIF-1 α mRNA 和 HIF-2 α mRNA 的表达强度无显著差异,而两基因的表达强度在不同组间均有显著差异($P < 0.01$),见图 1。各组 VEGF、Bcl-2、ET-1、Ki-67 基因的表达强度见表 2。

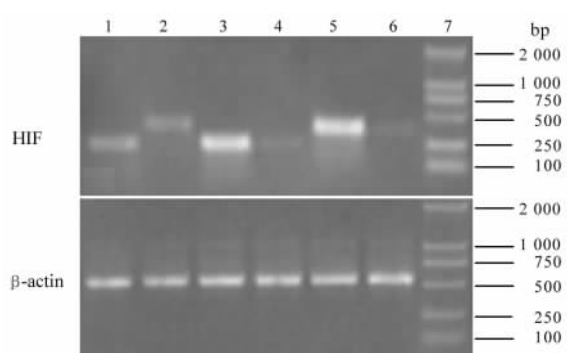


图 1 RT-PCR 法检测 HIF 基因表达
Fig 1 HIF expression detected by RT-PCR

1: HIF-1 α (282 bp) expression in HK-2+medium; 2: HIF-2 α (358 bp)expression in HK-2+medium; 3: A498+LipofectAMINE2000; 4: A498+HIF1 α siRNA; 5: A498+LipofectAMINE2000; 6: A498+HIF2 α siRNA; 7: Marker

2.2 流式细胞术结果 A、B、C、D 组凋亡细胞阳性率(%)分别为 3.47 ± 0.05 、 16.07 ± 0.10 、 3.80 ± 0.04 、 0.74 ± 0.03 。统计分析显示, B 组阳性率明显高于 A 组($P < 0.01$), A、C 两组间无明显差别, D 组明显较低($P < 0.05$),见图 2。

2.3 凋亡细胞形态观察 B 组依次可见不同状态的细胞,如凋亡前、凋亡、坏死细胞,而其余 3 组细胞生长状态良好,未见染色或核形态异常细胞,见图 3。

2.4 bcl-2 免疫印迹分析结果 A、B、C、D 各组的相对表达强度(bcl-2/ β -actin)依次为 0.74 ± 0.05 、 0.19 ± 0.03 、 0.76 ± 0.04 、 0.98 ± 0.06 ,统计学分析显示, B 组 bcl-2 的表达较其他各组明显降低($P <$

0.01), A组与C组无明显差别, D组则明显较高 ($P < 0.05$), 见图4。

表2 VEGF、Bcl-2、ET-1 和 Ki-67 基因表达强度比较
Tab 2 VEGF, Bcl-2, ET-1 and Ki-67 gene expression

Group	VEGF	Bcl-2	ET-1	Ki-67
A498+HIF2 α siRNA	0.07 \pm 0.02*	0.63 \pm 0.02	0.54 \pm 0.03	1.52 \pm 0.06
A498+HIF1 α siRNA	0.23 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02**	0.04 \pm 0.02**	1.03 \pm 0.04*
HK-2+medium	0.78 \pm 0.05	0.72 \pm 0.04	0.62 \pm 0.04	1.43 \pm 0.05
A498+LipofectAMINE2000	1.66 \pm 0.06**	1.88 \pm 0.06	1.17 \pm 0.05	2.58 \pm 0.06

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HK-2+medium group

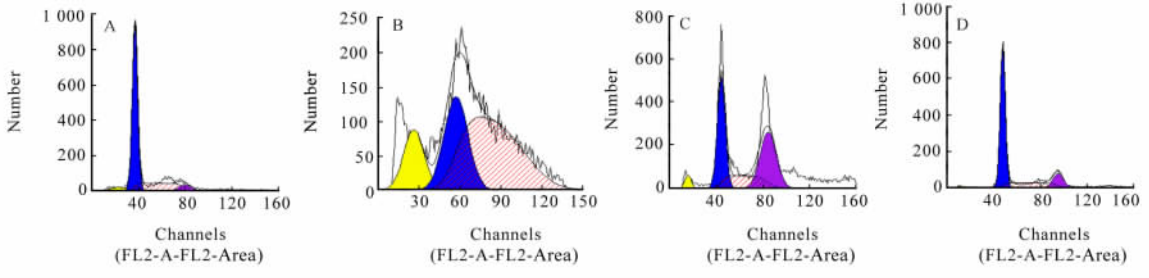


图2 流式细胞术PI染色检测4组细胞凋亡

Fig 2 Apoptosis detected by flow cytometry in 4 groups

A: A498+HIF2 α siRNA; B: A498+HIF1 α siRNA; C: HK-2+medium; D: A498+LipofectAMINE2000

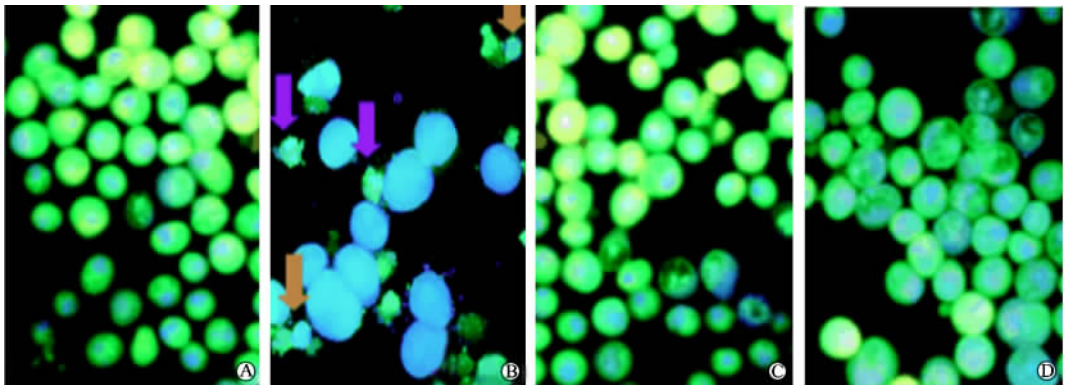


图3 DAPI染色荧光显微镜下观测4组细胞形态

Fig 3 Apoptosis under fluorescence microscope

A: A498+HIF2 α siRNA; B: A498+HIF1 α siRNA; C: HK-2+medium; D: A498+LipofectAMINE2000. Red arrows representing apoptotic cells; blue arrows representing necrotic cells; and cells in orange were pre-apoptotic cells

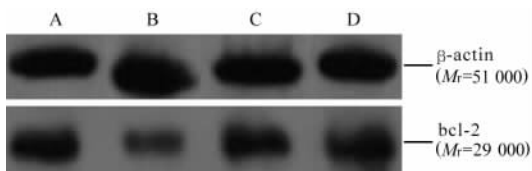


图4 Western印迹检测 bcl-2 表达

Fig 4 Bcl-2 expression by Western blot

A: A498+HIF2 α siRNA; B: A498+HIF1 α siRNA; C: HK-2+medium; D: A498+LipofectAMINE2000

3 讨论

HIF 是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子。HIF 受缺氧或低糖的调节,通过与靶基因特定序列 DNA 结合而调控它们的转录,这些基因涵盖能量代谢、血管生成、细胞生长等^[6],这在肿瘤,尤其是乏氧肿瘤的发病及发展中起着重要的作用。在 HIF 众成员中, HIF-1 α 和 HIF-2 α

的生物学作用可能更为重要和突出,两者均为 DNA 结合蛋白,受缺氧诱导^[7~9]。

HIF-1 α 和 HIF-2 α 能在肿瘤低氧区被激活,但它们在肿瘤发生过程中的作用仍存在争议,HIF-1 α 被认为具有肿瘤生长启动子和抑制子的双重功效,而 HIF-2 α 的功能还研究较少^[10,11]。对于肾癌,邵志强等用免疫组织化学 SABC 法检测 42 例肾细胞癌组织中 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达,发现 HIF-1 α 在肾细胞癌组织中呈高表达,其与 VEGF 有相关性,并推测有望成为判断肾细胞癌转移和预后等生物学行为的重要参考指标,提示 HIF-1 α 是 VEGF 表达的调控因子之一^[12]。龚侃等^[13]发现散发性肾透明细胞癌组织中希佩尔林道(VHL)基因突变者中 HIF-1 α 和 HIF-2 α 的阳性率(98%和 93%)均高于无突变者。陈波等^[14]采用 RT-PCR 方法发现,HIF-1 α mRNA 在肾透明细胞癌标本组织中的表达较在对照组织中略有增高,且与 VEGF 无明显相关性;而所有肾透明细胞癌标本和部分对照肾脏组织中均有显著的 HIF-2 α mRNA 表达,与 VEGF 高度相关。

通过多种方法将 siRNAs 导入到哺乳动物细胞中而发挥基因沉默效应技术即 RNA 干扰(RNAi)已经成熟,RNAi 被证明具有快速、高效和便于操作的特点,且基因沉寂后的效果较反义基因(anti-sense)和基因敲除(gene knockouts)等技术有明显优势^[15,16]。本研究即应用 RNA 干扰技术反面论证 HIF-1 α 和 HIF-2 α 对肾癌细胞的影响,发现 HIF-1 α 可能主要调节 ET-1 以及 bcl-2 和 Ki67 等细胞增殖调控基因,间接刺激血管生成及细胞生长,而 HIF-2 α 可能主要通过调节 VEGF 以促进血管生成,这在相关文献鲜有报道。ET-1 是比较强烈的缩血管介质,在血管发育、发生中具有一定的刺激作用,其机制可能与 MAPK 信号通路中的 ERK 通路之 AKT 信号分子密切相关^[17]。本研究提示 HIF-1 α 和 HIF-2 α 可能存在不同的转录调控功能和基因结合位点,至于 HIF-1 α 和 HIF-2 α 在肾癌中表现出的作用及其差别机制以及可能参与的信号分子等尚有待于进一步的探讨。此外,若能尽可能多的选用不同肾癌细胞株进行研究,可能会对 HIF 的作用及机制有更进一步且全面的了解。

[参考文献]

[1] Sufan RI, Jewett MA, Ohh M. The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287: F1-F6.

- [2] Peter JR, Christopher WP, Rabson DR, et al. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 677-684.
- [3] Maynard MA, Ohh M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer[J]. *Am J Nephrol*, 2004, 24: 1-13.
- [4] Berchner-Pfannschmidt U, Petrat F, Doege K, et al. Chelation of cellular calcium modulates hypoxia-inducible gene expression through activation of hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 44976-44986.
- [5] Nelson DA, Tan TT, Rabson AB, et al. Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis[J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 20095-20107.
- [6] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions[J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36: 1-12.
- [7] O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, et al. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 2060-2071.
- [8] Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, et al. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 40112-40117.
- [9] Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, et al. Perivascular expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF1alpha, HIF2alpha and HIF3alpha, in rat liver[J]. *Biochem J*, 2001, 354: 531-537.
- [10] Acker T, Diez-Juan A, Aragonés J, et al. Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2 α [J]. *Cancer Cell*, 2005, 8: 131-141.
- [11] Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 10479-10491.
- [12] 邵志强,郑少斌,肖 耀,等. 缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子在肾细胞癌组织中的表达及意义[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25: 120-122.
- [13] 龚 侃,张 宁,那 熙,等. 散发性肾透明细胞癌组织中希佩尔林道基因突变与缺氧诱导因子 1 α 、2 α 的测定[J]. *中华外科杂志*, 2005, 55: 28.
- [14] 陈 波,王 忠,张 宁,等. HIF-1 α 和 HIF-2 α mRNA 在肾透明细胞癌中的表达及临床意义[J]. *复旦学报(医学版)*, 2005, 49: 78-80.
- [15] Zender L, Hutker S, Lietke C, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7797-7802.
- [16] Wojcik C, Fabunmi R, Demartino GN. Modulation of gene expression by RNAi[J]. *Methods Mol Med*, 2004, 108: 381-394.
- [17] Liu S, Premont RT, Kontos CD, et al. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase *via* heterotrimeric G-protein beta gamma subunit signaling to protein kinase B/Akt[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 49929-49935.

[收稿日期] 2006-03-01

[修回日期] 2006-05-28

[本文编辑] 孙 岩