

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00504

低氧诱导因子 1 α 在骨肉瘤中的表达及其与血管生成的相关性

杨庆诚,曾炳芳*,张智长,施忠民,董 扬

上海交通大学附属第六人民医院骨科,上海 200233

[摘要] **目的:**探讨低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)在骨肉瘤中的表达及其与肿瘤血管生成的关系。**方法:**低氧及模拟低氧条件下体外培养 MG-63 骨肉瘤细胞,另外收集 30 例骨肉瘤组织石蜡标本及 20 例新鲜冷冻骨肉瘤组织标本,采用 RT-PCR、Western 印迹、ELISA 及免疫组织化学等方法,分别检测骨肉瘤细胞及组织中 HIF-1 α 及其靶基因血管内皮生长因子(VEGF)的 mRNA 及蛋白表达,并计算微血管密度(MVD)。**结果:**在低氧及模拟低氧条件下, MG-63 骨肉瘤细胞 HIF-1 α 的 mRNA 表达无明显变化,但蛋白表达明显增加,而 VEGF 的 mRNA、蛋白表达都增加($P < 0.05$)。20 例新鲜骨肉瘤组织中 HIF-1 α mRNA 总表达率为 90%, VEGF mRNA 总表达率为 100%, 均明显高于瘤旁组织($P < 0.05$)。HIF-1 α 、VEGF 蛋白在骨肉瘤石蜡组织中阳性表达率分别为 86.7%、93.3%, 明显高于瘤旁组织的 6.7%、26.7%($P < 0.05$)。Spearman 等级相关分析 HIF-1 α 蛋白表达与 MVD 明显相关($P = 0.005, r = 0.767$), VEGF 蛋白表达与 MVD 正相关($P < 0.002, r = 0.701$)。**结论:**骨肉瘤中存在 HIF-1 α 的高表达,可能与肿瘤血管生成相关; HIF-1 α 高表达可能提示骨肉瘤患者预后不良。

[关键词] 骨肉瘤; 低氧诱导因子 1 α ; 血管生成

[中图分类号] R 738.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0504-05

Expression of HIF-1 α and its relationship with angiogenesis in osteosarcoma

YANG Qing-cheng, ZENG Bing-fang*, ZHANG Zhi-chang, SHI Zhong-min, DONG Yang

Department of Orthopedics, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of HIF-1 α and its relationship with angiogenesis in osteosarcoma. **Methods:** Osteosarcoma MG-63 cells were cultured *in vitro* under hypoxia and mimic hypoxia conditions. Thirty paraffin-embedded osteosarcoma tissues and 20 fresh frozen osteosarcoma specimens were collected. The mRNA and protein expression of HIF-1 α and VEGF were detected by RT-PCR, Western blotting, ELISA, and immunohistochemistry methods. The mean vessel density (MVD) were also calculated. **Results:** The mRNA level of HIF-1 α had no change under hypoxia and mimic hypoxia conditions, whereas the protein expression was increased dramatically. The mRNA and protein expression of VEGF was significantly increased under hypoxia and mimic hypoxia conditions. The positive rate of HIF-1 α mRNA (90%) and VEGF(100%) in 20 fresh frozen tissues were higher than those of the para-tumor tissues($P < 0.05$). The positive rates of HIF-1 α and VEGF protein in paraffin-embedded osteosarcoma were 86.7% and 93.3%, respectively, significantly higher than those in the para-tumor tissues (6.7%, 26.7%, $P < 0.05$). Spearman related analysis demonstrated that the expression of HIF-1 α ($P = 0.005, r = 0.767$) and VEGF ($P < 0.002, r = 0.701$) had a positive relation with MVD. **Conclusion:** HIF-1 α is overexpressed in osteosarcoma and might be closely associated with tumor angiogenesis. Overexpression of HIF-1 α might indicate a poor prognosis of osteosarcoma.

[KEY WORDS] osteosarcoma; hypoxia-inducible factor-1 α ; angiogenesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5):504-508]

实体肿瘤中广泛存在着低氧微环境,肿瘤细胞对低氧微环境的调节和适应主要是通过提高葡萄糖转运、糖酵解和肿瘤新生血管生成而实现的,这是肿瘤发生、发展过程中克隆性选择的结果,它不仅与肿瘤的侵袭和转移密切相关,而且是导致肿瘤治疗效

果差、易产生放化疗耐受性的重要原因^[1-3]。肿瘤细胞对低氧环境的适应主要由低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 所介导。低氧可激活肿瘤 HIF-1 α 转录活性,从而引起一系列与糖代谢、血管生成及红细胞生成素生成等有关的适

[收稿日期] 2007-12-20 **[接受日期]** 2008-04-02

[基金项目] 上海交通大学医学院博士点基金(BXJ0631). Supported by Doctoral Grant of Medical College of Shanghai Jiaotong University (BXJ0631).

[作者简介] 杨庆诚,博士,主治医师, E-mail: tjyqc@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-64369181, E-mail: bingfangz@yahoo.com.cn

应性反应,这些反应大多参与了肿瘤细胞的生长和转移,在维持肿瘤细胞的能量代谢、新生血管形成以及促进肿瘤增殖和转移中起重要作用^[2,4]。HIF-1 α 在许多恶性肿瘤中过表达^[5],而且低氧可诱导体外骨肉瘤细胞 HIF-1 α 的表达^[6],但目前仍缺乏有关骨肉瘤组织 HIF-1 α 及血管生成相关因子表达的研究。

本实验通过低氧骨肉瘤细胞培养及临床骨肉瘤标本收集,采用 RT-PCR、免疫组织化学、Western 印迹、ELISA 等方法,检测 HIF-1 α 及其靶基因血管内皮细胞生长因子(VEGF)在骨肉瘤中的表达,探讨骨肉瘤中 HIF-1 α 表达与肿瘤血管生成的关系。

1 材料和方法

1.1 骨肉瘤细胞的培养 骨肉瘤细胞株 MG-63 购自中国科学院细胞研究所。将冻存的 MG-63 细胞迅速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中复苏,加入 10% 的胎牛血清 DMEM 培养液,放置在 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞孵化箱中培养。待细胞长满培养瓶后传代,80% 贴壁细胞用于实验。将对数生长的 MG-63 细胞换液,在低氧条件(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、1% O₂)或加入去铁胺(DFX)调整浓度至 130 nmol/L,培养 48 h,诱导 HIF-1 α 的表达。同等体积的二甲基亚砜(DMSO)作为对照。

1.2 骨肉瘤组织标本的获取 搜集我院 2005 年 6 月至 2006 年 7 月原发性骨肉瘤患者石蜡组织标本 30 例进行免疫组化检测。其中男 22 例,女 17 例,年龄 5~56 岁,平均(19 \pm 3.5)岁。所有病例均结合临床表现、影像学指标及病理学结果进行明确诊断。以瘤旁组织为阴性对照。收集同期 20 例手术切除的原发性骨肉瘤新鲜标本,男 11 例,女 9 例,年龄 8~35 岁,平均(17 \pm 2.7)岁。术后即刻取部分肿瘤及瘤旁组织深低温冷冻,进行 RT-PCR 检测 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 在骨肉瘤组织及瘤旁组织中的表达。

1.3 RT-PCR 检测骨肉瘤细胞及冰冻骨肉瘤组织中 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 的表达

1.3.1 RNA 提取 TRIzol(Invitrogen 公司)法提取冰冻组织或细胞总 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度,光密度比值 D_{260}/D_{280} 为 1.8~2.0,计算总 RNA 浓度。-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3.2 RT-PCR 应用 Promega 公司 RT-PCR 扩增试剂盒扩增 HIF-1 α 、VEGF 基因,内参照为 GAPDH。各基因引物序列:HIF-1 α 正义 5'-GAA CCT GAT GCT TTA ACT-3';反义 5'-CAA CTG ATC GAA GGA ACG-3';VEGF 正义 5'-TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG-3';反义 5'-

TCT GCA TGG TGA TGT TGG ACT CCT-3';GAPDH 正义 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3',反义 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。以上引物均由上海生工生物工程服务有限公司合成。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。HIF-1 α 扩增片段 564 bp,退火温度 57 $^{\circ}$ C,循环次数 25 次;VEGF 扩增片段 310 bp,退火温度 57 $^{\circ}$ C,循环次数 25 次;GAPDH 扩增片段 258 bp,退火温度 57.5 $^{\circ}$ C,循环次数 30 次。

1.3.3 PCR 产物相对定量 采用凝胶图像分析系统,对电泳条带进行密度扫描,Genesnap SynGene 软件分析。以各组产物的光密度(D)值与 GAPDH 的 D 值的比值计算目的基因的相对表达量。目的基因的 mRNA 相对含量(%)=(目的基因的 D 值/GAPDH 的 D 值) \times 100%。

1.4 Western 印迹检测低氧下骨肉瘤细胞 HIF-1 α 的蛋白表达 2×10^6 个细胞低氧或模拟低氧培养后收集,加入细胞裂解液,12 000 $\times g$,4 $^{\circ}$ C 离心 2 min,提取上清核蛋白。常规电泳、转膜,封闭,加入一抗 HIF-1 α 67(1:500),杂交。以 α -tubulin 为内参照。化学发光法 X 线曝光显影。

1.5 ELISA 法检测细胞悬液中 VEGF 蛋白的表达 收集细胞培养上清液,参照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测待测样品中 VEGF 的含量。

1.6 免疫组化检测骨肉瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达及其微血管密度(MVD) 石蜡标本 4 μ m 厚,连续切 5 张,分别做 H-E 染色,HIF-1 α 、VEGF、CD31 免疫组化检测(SABC 法),PBS 液代替一抗为阴性对照,已知染色阳性的乳腺癌组织切片为阳性对照。兔抗人 HIF-1 α 67 单克隆抗体(Santa Cruz)、兔抗人 VEGF 多克隆抗体、兔抗人 CD31 单克隆抗体及相应试剂盒均购于博士德公司。按说明书进行操作。以细胞核或胞质出现棕黄色颗粒为阳性。用 IMS 图像分析系统软件分析。肿瘤细胞的染色活性根据阳性细胞的相对数量和染色强度来计分。MVD 根据 CD31 表达量采用 Weidner 法^[7]计算。

1.7 统计学处理 数据录入及统计采用 SPSS 11.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 t 检验及 ANOVA 分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。HIF-1 α 的表达与 VEGF、CD31 表达的关系采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 低氧状态下骨肉瘤细胞 HIF-1 α 、VEGF 的表

达 MG-63细胞在正常氧浓度、正常氧浓度+对照(DMSO)、低氧(1%)和正常氧浓度+低氧模拟物(DFX)条件下培养 48 h, HIF-1 α mRNA 的表达无统计学差异(图 1);而 VEGF mRNA 在正常氧浓度下有表达,在低氧和低氧模拟物条件下表达更明显($P < 0.05$,图 2)。Western 印迹(图 3)显示,在常氧条件下,HIF-1 α 的蛋白不表达,而在低氧和低氧模拟物条件下,HIF-1 α 的蛋白表达明显增加。ELISA 结果(图 4)显示,VEGF 蛋白在常氧条件下表达,在低氧和低氧模拟物条件下表达更加明显($P < 0.05$)。

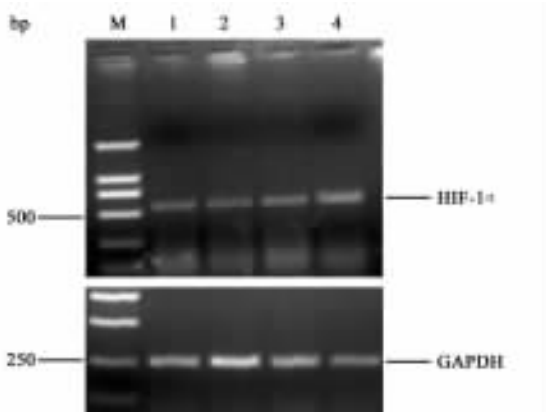


图 1 不同氧浓度下骨肉瘤 MG-63 细胞 HIF-1 α mRNA 的表达
Fig 1 Expression of HIF-1 α mRNA in osteosarcoma MG-63 cells under different oxygen conditions

1: Normoxia; 2: Normoxia + DMSO; 3: Hypoxia; 4: Normoxia + DFX

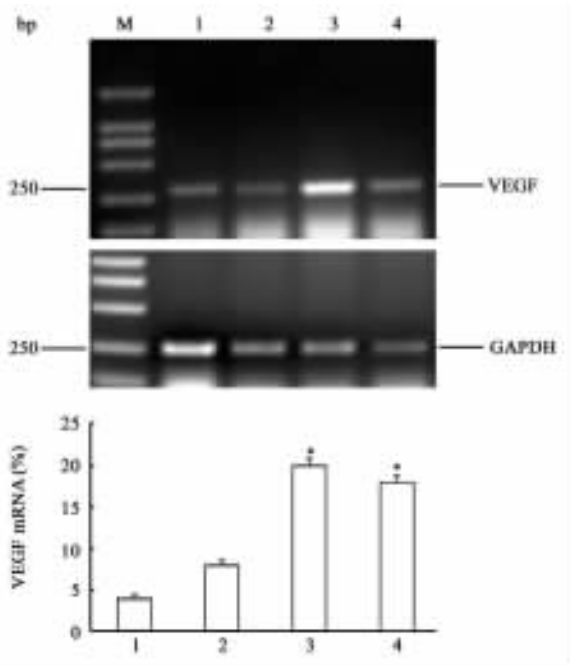


图 2 不同氧浓度下骨肉瘤 MG-63 细胞 VEGF mRNA 的表达
Fig 2 Expression of VEGF mRNA in osteosarcoma MG-63 cells under different oxygen conditions

M: Marker; 1: Normoxia; 2: Normoxia + DMSO; 3: Hypoxia; 4: Normoxia + DFX. * $P < 0.05$ vs normoxia group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

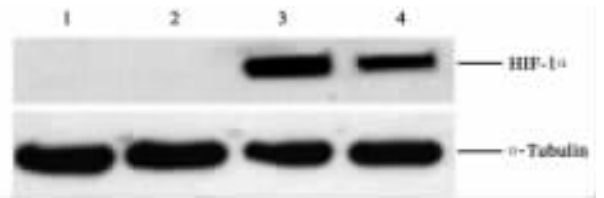


图 3 不同氧浓度下骨肉瘤 MG-63 细胞 HIF-1 α 蛋白的表达
Fig 3 Expression of HIF-1 α protein in osteosarcoma MG-63 cells under different oxygen conditions

1: Normoxia; 2: Normoxia + DMSO; 3: Hypoxia; 4: Normoxia + DFX

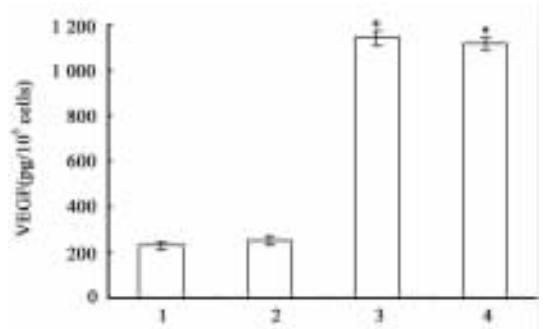


图 4 不同氧浓度下骨肉瘤 MG-63 细胞 VEGF 蛋白的表达
Fig 4 Expression of VEGF protein in osteosarcoma MG-63 cells under different oxygen conditions

1: Normoxia; 2: Normoxia + DMSO; 3: Hypoxia; 4: Normoxia + DFX. * $P < 0.05$ vs normoxia; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 骨肉瘤组织中 HIF-1 α 、VEGF mRNA 的表达

RT-PCR结果(图 5)显示,骨肉瘤组织 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 高表达,而瘤旁组织未检测到 HIF-1 α mRNA 的表达,VEGF mRNA 表达亦较低。20 例骨肉瘤标本中,18 例检测到 HIF-1 α mRNA 表达,总表达率为 90%;所有骨肉瘤标本均有 VEGF 的表达,总表达率为 100%。瘤旁组织中,仅 1 例出现 HIF-1 α mRNA 表达,表达率为 5%;15 例出现 VEGF mRNA 表达,表达率为 75%。

2.3 骨肉瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达及其与 MVD 的关系

HIF-1 α 染色主要位于细胞核中,而 VEGF 染色主要位于细胞质及细胞膜。HIF-1 α 在骨肉瘤组织中强阳性表达(图 6A),阳性表达率为 86.7%(26/30);而瘤旁组织表达率仅为 6.7%(2/30,图 6B),两者具有统计学差异($P < 0.05$)。VEGF 在骨肉瘤组织中高表达(图 6C),阳性表达率为 93.3%(28/30),瘤旁组织表达率为 26.7%(8/30),两者具有统计学差异($P < 0.05$)。连续切片染色定位显示,在 HIF-1 α 、VEGF 高表达的肿瘤区域,MVD 也明显升高(图 6D)。Spearman 等级相关分

析 HIF-1 α 表达与 MVD 明显相关($P=0.005, r=0.767$); VEGF 表达与 MVD 正相关($P<0.002, r=0.701$)。

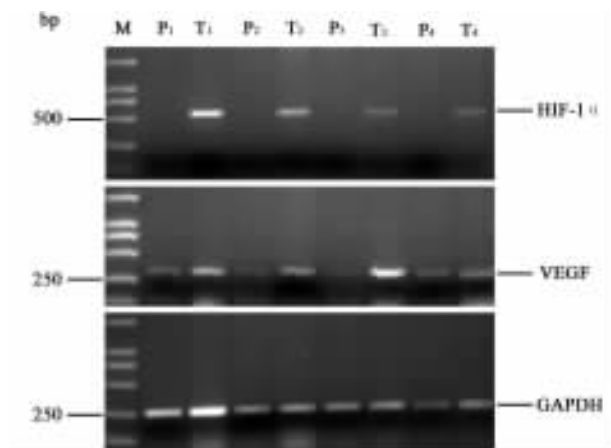


图5 骨肉瘤组织及瘤旁组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 的表达

Fig 5 Expression of HIF-1 α and VEGF mRNA in osteosarcoma and para-tumor tissues

M:Marker; P: Para-tumor tissue; T:Tumor tissue

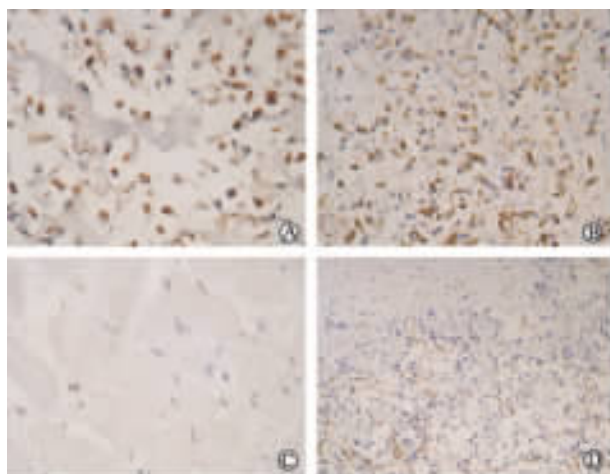


图6 骨肉瘤组织 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达

Fig 6 Localization of HIF-1 α and VEGF protein in human osteosarcoma specimens (Immunohistochemistry)

A: HIF-1 α nuclear immunopositivity was detected in most osteosarcoma cells. Original magnification: $\times 200$. B: No immunopositivity was found in non-cancerous adjacent tissues. Original magnification: $\times 200$. C: Strongly positive VEGF staining was localized in the cytoplasm of osteosarcoma tumor cells. Original magnification: $\times 200$. D: Osteosarcoma tissue with high MVD was assessed by immunostaining for CD31. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

肿瘤细胞对低氧的适应是许多实体瘤的共同特征。肿瘤微环境的低氧可激活依赖 HIF-1 的靶基因的表达,上调一系列涉及糖代谢、血管生成(angio-

genesis)、细胞生存和促红素生成的相关因子^[2,8-9]。HIF-1 是缺氧条件下存在于哺乳动物体内的一种转录因子,包括 α 和 β 两个亚单位,HIF-1 α 是唯一的 O₂ 调节亚单位,决定 HIF-1 的活性。在常氧状态下,HIF-1 α 不稳定,容易被降解。而在低氧状态下,HIF-1 α 进入细胞核,与 β 亚单位结合形成二聚体,转录活性增加,促进相应靶基因的表达^[1,10]。本研究发现,常氧条件下,骨肉瘤细胞 HIF-1 α mRNA 的水平没有增加;而低氧和模拟低氧可诱导 HIF-1 α 的活性,诱导其蛋白的表达,这提示 HIF-1 α 的低氧调节在蛋白质水平;VEGF 作为 HIF-1 α 的下游基因,其 mRNA 和蛋白的表达随 HIF-1 α 的转录活性增加而增加。

骨肉瘤作为一种血运丰富的实体瘤,肿瘤内部也存在不同程度的缺氧^[11]。组织缺氧即可诱导 HIF-1 α 的蛋白表达。本研究中石蜡标本的免疫组化及新鲜组织的 RT-PCR 均证实骨肉瘤组织中确实存在 HIF-1 α 的高表达。在大多数(86.7%)骨肉瘤组织中 HIF-1 α 表达明显高于瘤旁组织。HIF-1 α 表达区域主要位于肿瘤内部及肿瘤浸润区,如浸润肌层的区域。新鲜骨肉瘤组织的 RT-PCR 也证实 HIF-1 α 在肿瘤组织中的表达明显高于瘤旁组织。两种结果均提示骨肉瘤组织中存在 HIF-1 α 的高表达。连续切片免疫组化的蛋白定位显示,在 HIF-1 α 阳性表达的骨肉瘤组织中,HIF-1 α 的表达区域与 VEGF 表达区域及高 MVD 区域基本一致,某区域既有 HIF-1 α 的表达,也有 VEGF、MVD 的表达,说明 HIF-1 α 的表达与肿瘤血管生成密切相关。相关分析结果也表明,HIF-1 α 和 VEGF 的表达与 MVD 呈正相关。VEGF 是已知的在骨肉瘤组织中高表达的因子,且是骨肉瘤预后不良的指标之一^[12]。本研究结果提示 HIF-1 α 高表达对骨肉瘤患者预后有一定的影响。

本研究表明,骨肉瘤中存在 HIF-1 α 的高表达,且可能与肿瘤血管生成密切相关。HIF-1 α 高表达可作为骨肉瘤患者预后不良的参考指标之一,可能与骨肉瘤的侵袭转移有关。

(志谢 本研究得到上海交通大学附属第六人民医院病理科黄谨医师的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

- [1] Krishnamachary B, Semenza G L. Analysis of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and its effects on invasion and metastasis[J]. Methods Enzymol, 2007, 435: 347-354.
- [2] Breier G, Licht A H, Nicolaus A, Klotzsche A, Wieleckx B.

- Kirsnerova Z. HIF in vascular development and tumour angiogenesis[J]. Novartis Found Symp, 2007, 283: 126-133.
- [3] Höckel M, Schlenger K, Mitze M, Schäffer U, Vaupel P. Hypoxia and radiation response in human tumors[J]. Semin Radiat Oncol, 1996, 6: 3-9.
- [4] Semenza G L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2000, 88: 1474-1480.
- [5] Stoeltzing O, McCarty M F, Wey J S, Fan F, Liu W, Belcheva A, et al. Role of hypoxia-inducible factor 1 alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96: 946-956.
- [6] Wu Q, Yang S H, Wang R Y, Ye S N, Xia T, Ma D Z. Effect of silencing HIF-1 alpha by RNA interference on expression of vascular endothelial growth factor in osteosarcoma cell line SaOS-2 under hypoxia[J]. Ai Zheng, 2005, 24: 531-535.
- [7] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36: 169-180.
- [8] Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion[J]. Bull Cancer, 2006, 93: E73-E80.
- [9] O'Donnell J L, Joyce M R, Shannon A M, Harme J, Geraghty J, Bouchier-Hayes D. Oncological implications of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) expression[J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32: 407-416.
- [10] Jubb A, Hillan K. Expression of HIF-1 alpha in human tumours[J]. J Clin Pathol, 2005, 58: 1344.
- [11] Hutchison G J, Valentine H R, Loncaster J A, Davidson S E, Hunter R D, Roberts S A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia; correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 8405-8412.
- [12] Mankin H J, Hornicek F J, Rosenberg A E, Harmon D C, Gebhardt M C. Survival data for 648 patients with osteosarcoma treated at one institution[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, (429): 286-291.

[本文编辑] 贾泽军

· 消息 ·

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)可在全文数据库 ScienceDirect 检索浏览

由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)合办的《军医大学学报(英文版)》是国内外公开发行(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948)的医药卫生类综合性英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库,已被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼索引》等检索系统收录。

从2007年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行。目前,期刊全文已进入 ScienceDirect(SD)全文数据库,期刊网址 <http://www.elsevier.com/locate/jmcppla>。SD是全球市场占有率最高的科技与医学期刊全文出版平台之一,其上的论文具有和其他世界主流在线科技与医学期刊的“引用文献”及“被引用文献”的链接功能。本刊进入SD全文数据库,不仅可增加刊发论文的可见度和被引频次,帮助作者了解所做工作被国际同行的关注程度,也有助于期刊不断提高学术质量。编辑部热忱欢迎生物医药领域的学者踊跃投稿。

投稿邮箱:

上海市翔殷路800号《第二军医大学学报》编辑部。邮编:200433。

联系人:李丹阳。E-mail: danyanglee55@yahoo.com.cn。电话:021-25074340-818。

重庆市沙坪坝高滩岩《第三军医大学学报》编辑部。邮编:400038。

联系人:郭建秀。E-mail: gangela@mail.tmmu.com.cn。电话:023-68752189-86。

西安市长乐西路169号《第四军医大学学报》编辑部。邮编:710032。

联系人:吴涛。E-mail: helenwt5241@126.com。电话:029-84773804。

《军医大学学报(英文版)》编辑部