

· 基础研究 ·

HIF-1 α 基因沉默联合丹参酮 II A 抑制低氧人肝癌 HepG2 细胞增殖及其机制

李国平 蒲泽锦 刘丽璇 项梦琦 胡敏敏 黄聪武 吴灵飞

摘要 目的 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)基因沉默联合丹参酮 II A(Tanshinone II A, Tan II A)对低氧条件下人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响及其机制。**方法** 依据人 HIF-1 α 基因信息筛选 RNAi 有效靶序列,设计慢病毒载体引物并构建质粒,包装慢病毒表达载体,转染 HepG2 细胞,沉默低氧条件下 HepG2 细胞株中 HIF-1 α 基因表达。将细胞分为正常对照组(野生型 HepG2 细胞)、干扰对照组(HepG2 细胞转染 NC-shRNA)、干扰组(HepG2 细胞转染 HIF-1 α -shRNA),应用化学缺氧法(150 μ mol/L CoCl₂)加入培养液模拟肿瘤细胞低氧微环境,采用 Western Blot 检测各组细胞 HIF-1 α 蛋白表达证实基因沉默效果,采用 CCK-8 检测 5 mg/L Tan II A 处理对低氧条件下各组细胞增殖活性的影响,采用 Western Blot 检测 Tan II A 处理对各组细胞内 p53 和 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白表达的影响。**结果** (1)HIF-1 α -shRNA 慢病毒载体包装成功且转染效率高,低氧培养各组细胞 24 h 后,与正常对照组及干扰对照组比较,干扰组细胞中 HIF-1 α 蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。(2)Tan II A 能时间依赖性抑制低氧条件下各组细胞增殖,与正常对照组及干扰对照组比较,干扰组细胞增殖明显活性下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。(3)低氧培养各组细胞 24 h,与正常对照组及干扰对照组比较,干扰组细胞中 p53 和 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白表达水平明显增高($P < 0.05$)。**结论** HIF-1 α 基因沉默可增强 Tan II A 对低氧 HepG2 细胞的增殖抑制作用,其机制可能与 p53 和 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白水平上调有关。

关键词 短发卡 RNA; 丹参酮 II A; 缺氧诱导因子-1 α ; HepG2 细胞; 低氧; 细胞增殖

Effect of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene Silencing and Tanshinone II A Administration on Proliferation of Human Hepatoma HepG2 Cells under Hypoxia LI Guo-ping, PU Ze-jin, LIU Li-xuan, XIANG Meng-qi, HU Min-min, HUANG Cong-wu, and WU Ling-fei Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Guangdong (515041)

ABSTRACT Objective To observe the effects of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) gene silencing and Tanshinone II A (Tan II A) administration on the proliferation in human hepatoma HepG2 cells and its molecular mechanism under hypoxic condition. **Methods** The effective target sequence for RNAi based gene HIF-1 α , human (Genbank NM_181054) were chosen, a pair of oligonucleotides were synthesized and annealed to form double strands, and non-homology shRNA sequence as negative control (NC-shRNA), then the double strands were inserted into the lentivirus vector GV248 and the recombinant plasmid were transiently transfected into 293T cells, and finally the recombinant virus. Then HepG2 cells were infected with the recombinant virus and screened by puromycin. CoCl₂ (150 μ mol/L) was used to simulate the hypoxia environment for HepG2 cells. The cultured HepG2 cells were divided into 3 groups: normal control group (wild type HepG2 cells), negative control group (transfection with NC-shRNA), and interfered group (HIF-1 α -shRNA transfection group). The protein level of HIF-1 α were assayed by Western Blot to observe the effect of HIF-1 α gene silencing under hypoxic condition, CCK-8 assay was

基金项目:广东省高水平大学重点学科建设项目子课题(No. 2015033);广东省汕头市科技计划项目(No. 汕府科[2015]132号)

作者单位:汕头大学医学院第二附属医院消化内科(广东 515041)

通讯作者:李国平, Tel: 0754-88915605, E-mail: guopingli8@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190211.123

used to detect the effect on HepG2 cells proliferation by HIF-1 α gene silencing and Tan II A administration under hypoxia. The expression levels of p53 and p21^{CIP1/WAF1} protein were determined by Western Blot. Results (1) The HIF-1 α -shRNA lentivirus has been packaged successfully. Compared with the normal control group and the negative control group, the relative expression level of HIF-1 α protein were significantly down-regulated in the interfered group at 24 h under hypoxia ($P < 0.01$). (2) The proliferation of HepG2 cells in three groups were inhibited significantly by Tan II A administration in time-dependent manner from 8 h to 48 h under hypoxia. The proliferation in the interfered cells was even less than that in the normal control and the negative control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). (3) Compared with the normal control group and the negative control group, the relative expression levels of p53 and p21^{CIP1/WAF1} protein in the interfered group were increased by Tan II A administration under hypoxia at 24 h ($P < 0.05$). Conclusion RNAi targeting HIF-1 α enhanced the effect of inhibition proliferation of HepG2 cells induced by Tan II A under hypoxia, and its mechanism might be related to up-regulating the expressions of p53 and p21^{CIP1/WAF1} protein.

KEYWORDS shRNA; Tanshinone II A; hypoxia-inducible factor 1 α ; HepG2 cell; hypoxia; cell proliferation

缺氧或低氧是实体肿瘤如原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)微环境特征之一,肿瘤细胞在缺氧微环境下缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)高度表达,而 HIF-1 由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 2 个亚基组成,其中, HIF-1 α 亚基决定 HIF-1 的活性, HIF-1 α 是肿瘤细胞对缺氧适应反应的中心环节,在肿瘤细胞耐受缺氧并保持增殖活力中发挥重要作用^[1]。丹参酮 II A (tanshinone II A, Tan II A)是从传统中药丹参中提取的二萜醌类化合物,广泛应用于治疗缺血性心脏病,保护神经系统和肝细胞,抑制骨质疏松等。近年来研究表明 Tan II A 具有潜在的抗肿瘤效果,对多种肿瘤细胞(如乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肺癌、肝癌、白血病、胃癌等)有抑制增殖及诱导凋亡作用^[2,3]。笔者先前研究表明,5 mg/L Tan II A 能够显著抑制低氧 HepG2 肝癌细胞增殖并诱导其凋亡,其机制可能与 Tan II A 抑制 HIF-1 α 蛋白表达及上调野生型 p53 蛋白表达等有关^[4]。为进一步探讨 Tan II A 的抗癌机制,本研究采用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术沉默 HIF-1 α 基因,探讨沉默 HIF-1 α 基因对 Tan II A 抑制低氧条件下 HepG2 肝癌细胞增殖的影响及其机制。

材料与方 法

1 细胞株 人 HepG2 肝癌细胞(中国科学院上海细胞库)和 293T 细胞上海吉凯基因化学技术有限公司。

2 主要试剂及仪器 Tan II A (批号: Y0001560)、化学性缺氧诱导剂氯化钴(CoCl_2 , 批号: V900021)、二甲基亚砜(DMSO, 批号: D8418)购自

美国 Sigma 公司, DMEM 培养基(批号: 0446)、0.25% Trypsin-EDTA 胰酶(1 \times , 批号: 1297729)购自美国 Invitrogen 公司,青霉素和链霉素混合液(青霉素 100 U/mL + 链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$, 批号: 15140122)、胎牛血清(批号: 16000044)购自美国 Gibco 公司,慢病毒包装试剂盒购自中国上海吉凯基因化学技术有限公司(批号: lpk001), CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司(批号: CK04),兔抗人 p53 抗体(批号: 2527s)、兔抗人 p21^{CIP1/WAF1} 抗体(批号: 2947)、鼠抗 β -actin 抗体(批号: 58169)、羊抗兔 IgG(批号: 14708)和羊抗鼠 IgG(批号: 14708)均购自美国 CST 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: P1511-1)、ECL 化学发光试剂盒(批号: abs920)购自北京普利莱基因技术公司,荧光显微镜(型号 N-STORM&A1, 日本 Nikon 公司),多功能酶标仪(型号 550, 美国 BIO-RAD 公司),电泳仪(型号 EPS300)、转膜仪(型号 VE-186)、电泳槽(型号 VE-180),购自上海天能科技公司。

3 细胞培养 将 HepG2 细胞和 293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中常规培养。低氧培养: 终浓度 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 模拟低氧环境。

4 携带表达 HIF-1 α -shRNA 慢病毒干扰载体的构建及细胞转染

4.1 HIF-1 α 基因 shRNA 片段设计与合成 依据 GenBank 提供的人 HIF-1 α 基因全长信息(Genbank NM_181054), 筛选出能够有效沉默 HIF-1 α 基因的靶点序列 5'-GTTACGTTCTTCGATCAG-3', 设

计合成一对互补的短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 序列 (DNA oligo), 正义链: 5'-CCGGGTACGTTCTTCGATCAGCTCGAGCTGATCGAAGGAACGTAAC-3', 反义链: 5'-AAT-TCAAAAAGTTACGTTCTTCGATCAGCTCGAGCTGATCGAAGGAACGTAAC-3'。同时以一段不针对任何基因的无关序列作为阴性对照 (negative control, NC)。将 DNA oligo 退火配对产生双链, 通过其两端所含酶切位点 (Age I 和 EcoR I) 采用 T4 连接酶与酶切后的慢病毒载体 GV248 进行连接, 构建重组慢病毒质粒 (HIF-1 α -shRNA-GV248 和 NC-shRNA-GV248), 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经 PCR 鉴定及测序验证其正确性。由上海吉凯基因化学技术有限公司合成并构建重组质粒。

4.2 慢病毒的包装浓缩及滴度测定 将 293T 细胞培养至对数生长期, 参照上海吉凯基因化学技术有限公司转染试剂盒说明书, 分别将 20 μ g HIF-1 α -shRNA-GV248 质粒或 20 μ g NC-shRNA-GV248 质粒与 25 μ g 慢病毒包装体系 (pHelper 1.0 载体质粒 15 μ g, pHelper 2.0 载体质粒 10 μ g) 用转染试剂混匀并补足至 1 mL, 室温孵育 15 min, 缓慢将混合液均匀滴加至培养于 10 cm 细胞培养皿的 293T 细胞中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h, 更换为完全培养基培养, 观察细胞形态和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达, 48 h 后收集培养瓶内上清液, 4 $^{\circ}$ C、4 000 \times g 离心 15 min, 上清液 0.45 μ m 滤器过滤, 再次 4 $^{\circ}$ C、4 000 \times g 离心 15 min, 收集瓶内上清液即为病毒浓缩液, 分装后 -80 $^{\circ}$ C 冻存, 并应用有限稀释法计算病毒滴度。病毒滴度测定, 根据公式: 病毒滴度 = 活细胞数/病毒原液量。

4.3 重组慢病毒转染 HepG2 细胞 取处于对数生长期的 HepG2 细胞于转染前 1 d 接种于 6 孔板, 每孔接种 5×10^4 个细胞, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养, 转染当天按 MOI (multiplicity of infection) 1, 10, 20, 50, 100 感染细胞, 加入终浓度为 5 μ g/mL 的转染增敏剂凝聚胺 (polybrene)。12 h 后更换为完全培养基, 72 h 后用倒置荧光显微镜观察 GFP 表达情况。每 2 d 更换 1 次培养液, 当转染率超过 70% 时, 加入嘌呤霉素进行压力筛选, 获得稳定转染的细胞株。

4.4 Western Blot 检测 HIF-1 α 沉默后目的蛋白 HIF-1 α 表达情况 实验分 3 组, 正常对照组 (未转染的野生型 HepG2 细胞)、干扰对照组 (HepG2 细胞转染 NC-shRNA)、干扰组 (HepG2 细胞转染 HIF-1 α -shRNA)。取对数生长期生长状态良好的 3 组

细胞, 常氧或低氧培养 24 h, 细胞裂解液于 4 $^{\circ}$ C 裂解细胞, 最大转速离心 1 min, 蛋白定量后各取 50 μ g 蛋白样品加上样缓冲液煮沸 10 min, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 半干转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶封闭 1 h, 加 I 抗体 (1:1 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加 II 抗 (1:2 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 化学发光显影。

5 CCK-8 检测 Tan II A 处理对低氧 HepG2 细胞增殖的影响 分组如上。取 3 组细胞制成 5×10^4 个/mL 的单细胞悬液, 种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μ L。分别于加药 (CoCl₂、5 mg/L Tan II A) 8、12、24、48 h 后, 弃去旧培养基, 更换为含有 CCK-8 的培养基混合液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后用酶联免疫检测仪测定 OD₄₅₀ 处的吸光值。每组设 6 个复孔, 实验重复 3 次。

6 Western Blot 检测 p53、p21^{CIP1/WAF1} 蛋白表达 分组如上。3 组细胞于加药 (CoCl₂、5 mg/L Tan II A) 24 h 后, 收集细胞, Western Blot 检测 p53 蛋白及其下游 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白表达。

7 统计学方法 用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 one-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 携带表达 HIF-1 α -shRNA 慢病毒干扰载体的沉默效果

1.1 慢病毒包装及滴度测定 (图 1) NC-shRNA 和 HIF-1 α -shRNA 重组慢病毒转染 293T 细胞后 48 h, 普通白光和荧光显微镜下见 293T 细胞生长状态良好, 呈圆形, 大小均匀, 细胞排列致密整齐, 呈现明显绿色荧光, 其表达率超过 90%, 证明慢病毒包装成功。计算得到病毒滴度为 5×10^8 (TU/mL)。

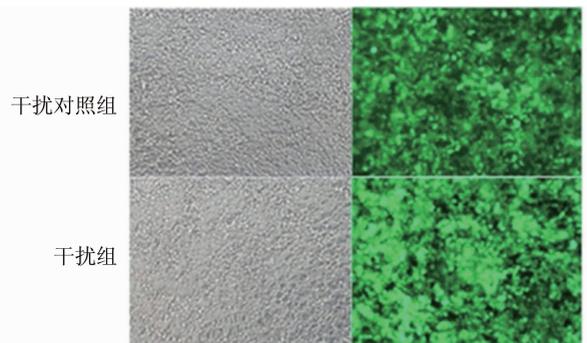


图 1 白光及荧光显微镜观察重组慢病毒转染 293T 细胞 ($\times 400$)

1.2 重组慢病毒转染 HepG2 细胞及干扰效果的检测(图 2、3) 经观察当慢病毒 MOI = 50 时转染效率高且细胞状态良好。经 Western Blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达情况结果,常氧条件下正常对照组的 HepG2 细胞几乎无 HIF-1 α 蛋白表达,低氧培养 24 h 后,正常对照组和干扰对照组 HIF-1 α 蛋白表达均明显上升,两者之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而干扰组细胞 HIF-1 α 蛋白条带明显减弱,与正常对照组和干扰对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

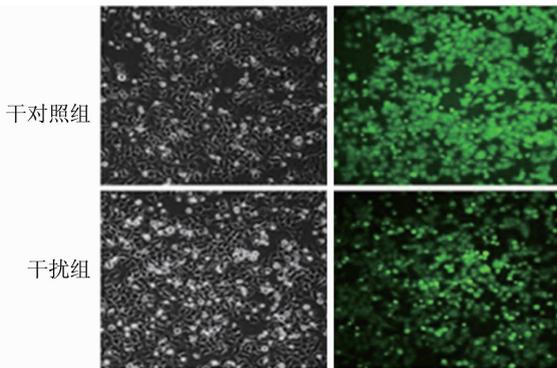
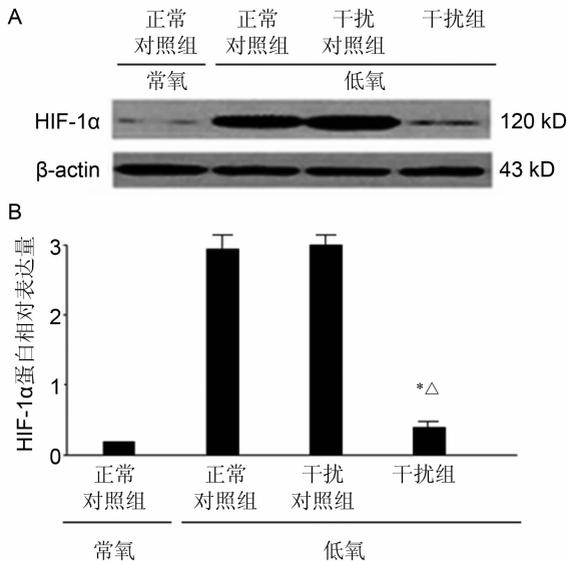
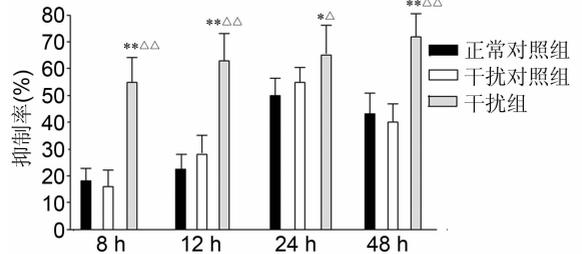


图 2 白光及荧光显微镜观察重组慢病毒转染 HepG2 细胞 (×400)



注:A 为常氧或低氧培养 24 h 后 HIF-1 α 蛋白电泳图;B 为 HIF-1 α 蛋白相对表达水平;与低氧条件下正常对照组比较, * $P < 0.01$;与低氧条件下干扰对照组比较, $\Delta P < 0.01$;下图同图 3 沉默 HIF-1 α 基因对 HepG2 细胞 HIF-1 α 蛋白的表达影响

抑制率逐渐增加,即 Tan II A 能时间依赖性抑制 HepG2 细胞增殖,与正常对照组及干扰对照组比较,干扰组细胞增殖水平明显受抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),但干扰对照组与正常对照组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与干扰对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

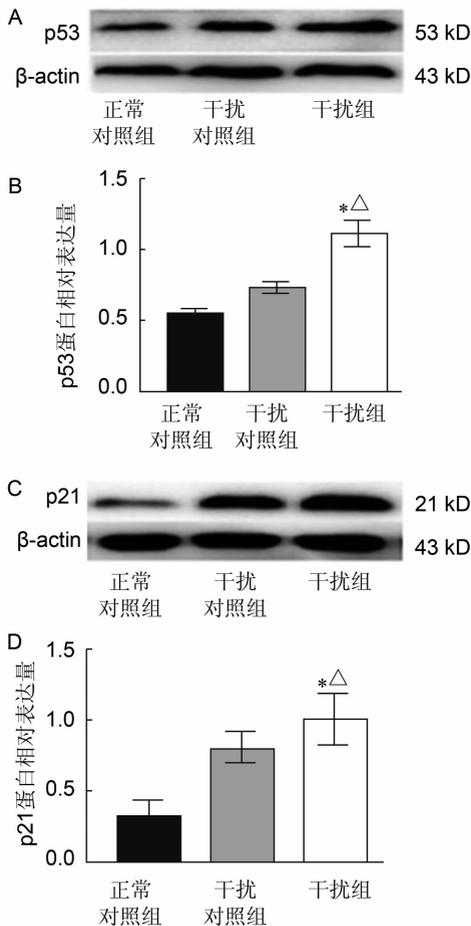
图 4 Tan II A 处理对各组低氧 HepG2 细胞增殖活性的影响

3 Tan II A 处理对低氧 HepG2 细胞 p53 和 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白表达的影响(图 5) p53 和 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白在干扰组表达明显上调,与正常对照组及干扰对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

本实验采用化学缺氧法(即培养液中加入适量浓度铁螯合剂 CoCl_2)来模拟肿瘤细胞缺氧微环境, Co^{2+} 能占据 HIF-1 α 分子中与 VHL 泛素-蛋白酶复合体结合的位点,竞争抑制 HIF-1 α 与 VHL 泛素-蛋白酶复合体结合,阻碍 HIF-1 α 降解从而使细胞内 HIF-1 α 堆积,模拟缺氧对 HIF-1 α 的诱导作用^[4]。HCC 为血供丰富的实体恶性肿瘤,但由于肿瘤细胞增殖、分化和生长的无序性和肿瘤血管生成相对滞后,导致肿瘤组织内部长期处于相对缺氧的微环境,进而诱导 HIF-1 α 的表达,而 HIF-1 α 通过调节与肿瘤细胞的能量代谢、血管生成、细胞增殖、分化和凋亡有关的基因表达来调控细胞对缺氧的反应,促进肿瘤新生血管生成,提高肿瘤细胞存活能力,降低化疗敏感性,增强肿瘤细胞侵袭性和恶性程度等^[1]。因此,阻断缺氧微环境下的 HIF-1 α 基因表达可能为治疗 HCC 等恶性肿瘤提供新的途径^[5],而 RNAi 是抑制基因表达的有力工具,是在进化过程中高度保守并且由双链 RNA 诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的现象,能快速、高效、特异性地抑制靶基因的表达^[6]。目前应用的 RNAi 技术有 siRNA (small interfering RNA)、shRNA 和 stealth RNAi。shRNA 包括两个短反向重复序列,中间由一

2 Tan II A 处理对低氧 HepG2 细胞增殖的影响(图 4) 3 组细胞在 5 mg/L Tan II A 处理及低氧培养 8、12、24、48 h,随着作用时间的延长,细胞增殖



注:A、C为3组细胞的蛋白电泳图;B、D为蛋白相对表达水平;与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与干扰对照组比较, $\Delta P < 0.05$

图5 Tan II A处理对各组低氧HepG2细胞p53和p21^{CIP1/WAF1}蛋白表达的影响

茎环序列分隔,组成发夹样结构,由pol III启动子控制,再连上5至6个T作为RNA聚合酶III的转录终止子,在细胞内该发夹序列被表达出来,经Dicer降解后成为siRNA发挥沉默效应,其主要优点是可稳定沉默靶基因^[6]。RNAi技术导入细胞的方法主要有磷酸钙转染法、电穿孔转染法、脂质体转染法、腺病毒转染法、慢病毒转染法等。其中慢病毒转染具有较高的灵敏性以及高效率,操作简单,转染后细胞可以稳定传代,对多种细胞均可适用,是基础实验中将外源性基因导入细胞的最为有效的方法^[7]。因此在本研究中,使用了慢病毒技术和shRNA技术。包装的重组慢病毒表达载体NC-shRNA-GV248和HIF-1 α -shRNA-GV248转染HepG2肝癌细胞后,绿色荧光观察结果显示其能稳定地在HepG2细胞中传代,并未随着细胞的传代而致感染率减弱,经嘌呤霉素进行压力筛选,

获得稳定转染的干扰对照组及干扰组细胞株,采用Western blot检测证实低氧条件下干扰组细胞株HIF-1 α 蛋白表达明显下调,说明采用RNAi技术能高效沉默HIF-1 α 基因。

在肿瘤治疗过程中,临床常用的化疗药物由于严重的不良反应及耐药性,使其运用受到一定限制,而近年来,来源于传统中药的天然成分因其性质温和,不良反应少,逐渐引起关注,部分来源于中药的天然化合物如长春新碱、羟喜树碱等基于其显著的疗效及相对较小的不良反应,已成为一线抗肿瘤药物^[8]。Tan II A作为传统中药丹参的主要有效单体成分,具有广泛的生理活性,除了对心脑血管的作用外,目前还发现其对多种肿瘤细胞具有较好的抗癌活性,其机制涉及抑制肿瘤细胞DNA合成、阻滞细胞周期、上调凋亡相关基因、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制原癌基因和相关酶类表达、逆转多药耐药等^[2-4]。先前的研究证实,Tan II A能够显著抑制低氧HepG2细胞增殖并诱导其凋亡,其机制可能与Tan II A抑制HIF-1 α 蛋白表达及上调野生型p53蛋白表达等有关^[4]。在本研究中,细胞增殖检测结果显示,5 mg/L的Tan II A呈时间依赖性抑制低氧HepG2细胞的增殖,而采用RNAi技术沉默HIF-1 α 后Tan II A对HepG2细胞的抑制增殖能力进一步增强,提示采用RNAi技术阻断缺氧条件下HIF-1 α 蛋白的应答性升高,再联合其他手段,可有效抑制缺氧微环境下的肿瘤细胞增殖,以HIF-1 α 为靶点可能从基因水平为治疗HCC的提供新途径。

p53是迄今为止发现的与肿瘤发生发展关系最为密切的抑癌基因,在调节细胞的增殖及凋亡中发挥重要的作用,它有野生型和突变型2种,其编码的产物位于细胞核,是一种分子量约为53 kD的含磷蛋白,而本实验使用的HepG2细胞株的p53为野生型^[9,10]。正常情况下,野生型p53蛋白在细胞中呈现低水平表达,因为MDM-2(murine double minute 2)通过泛素化与p53蛋白结合而抑制p53的转录活性,而在低氧条件下,上调的HIF-1 α 可诱导p53蛋白的表达,并能通过与p53蛋白竞争与MDM2结合,防止p53蛋白被MDM2途径降解,从而引起p53途径的活化,促进p53依赖的细胞凋亡^[11]。p53对细胞周期的调控主要通过两种途径:一是通过DNA复制启动复合物的组装,阻止细胞入S期,二是p53基因可能是一些抑制细胞增殖基因的反式作用位点,从而对细胞的分裂进行负调控^[12]。p21^{WAF1/CIP1}基因是目前所知的最广泛的细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制因子,同时也是p53基因最重要

的下游基因之一,野生型的 p53 蛋白能够激活 p21^{WAF1/CIP1} 基因,使其迅速表达,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白能够与 cyclinD1-CDK4 以及 cyclinE-CDK2 等结合,从而抑制 CDK 的活性,使细胞进入 S 期受阻,进而抑制细胞增殖,p21^{WAF1/CIP1} 也通过与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 结合,抑制 DNA 复制^[13]。总之,p53-p21^{WAF1/CIP1} 蛋白通路的激活不仅具有抑制细胞癌变、阻止肿瘤生长的作用,也能抑制细胞的分化和增殖^[14]。为进一步探讨 Tan II A 抑制低氧 HepG2 细胞增殖与 HIF-1 α 基因的关系,检测了受 HIF-1 α 调控的 p53 及其下游的 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达情况,结果表明沉默 HIF-1 α 可以增强 Tan II A 抑制细胞增殖效果,同时伴有细胞内 p53 蛋白及其下游蛋白 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达上调,由此推测,沉默 HIF-1 α 基因及同时应用 Tan II A 可能通过诱导细胞凋亡的方式及对细胞周期的调控来抑制低氧 HepG2 细胞的增殖,因此将进一步检测相关的凋亡路径、细胞周期及其相关调控蛋白的表达情况。

综上所述,本研究构建了慢病毒表达载体 HIF-1 α -shRNA-GV248,建立了稳定转染 HIF-1 α -shRNA 的人肝癌 HepG2 细胞株,发现其能明显抑制低氧条件下 HIF-1 α 蛋白表达,且 HIF-1 α 基因沉默能显著增强 Tan II A 的细胞增殖抑制作用,其机制可能与上调 p53 及其下游的 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达有关。利用 RNAi 技术有效抑制低氧微环境下肿瘤细胞的 HIF-1 α 表达,同时结合单体中药药物(如 Tan II A) 进行治疗,将有可能是一种高效、特异的肿瘤治疗方法。

利益冲突:无。

参 考 文 献

[1] Wilson GK, Tennant DA, McKeating JA. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: current understanding and future directions[J]. J Hepatol, 2014, 61(6): 1397 - 1406.

[2] Zhang Y, Jiang P, Ye M, et al. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(10): 13621 - 13666.

[3] 楼招欢, 杨波, 沈炜, 等. 丹参二萜醌部位高速逆流谱制备工艺及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 679 - 682.

[4] 刘丽璇, 吴灵飞, 邓巍, 等. 丹参酮 II A 对低氧条件下人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及与 HIF-1 α 、VEGF 和野生型 P53 蛋白表达的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(12): 2155 - 2160.

[5] Xu LF, Ni JY, Sun HL, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α silencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(11): 1749 - 1759.

[6] Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, et al. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA[J]. Int J Biomed Sci, 2017, 13(2): 48 - 57.

[7] Oldham RA, Berinstein EM, Medin JA. Lentiviral vectors in cancer immunotherapy [J]. Immunotherapy, 2015, 7(3): 271 - 284.

[8] 高芸, 王柯, 朱雪, 等. 地榆皂苷 I 诱导人甲状腺乳头状癌细胞 BCPAP 凋亡的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(1): 80 - 84.

[9] Gao SB, Li KL, Qiu H, et al. Enhancing chemotherapy sensitivity by targeting PcG via the ATM/p53 pathway[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(9): 1874 - 1883.

[10] 关姣, 张正筠, 周尊强, 等. SIRT1 差异性调节不同 p53 表型肝细胞肝癌的发生机制[J]. 中华普通外科杂志, 2014, 29(5): 378 - 381.

[11] Obacz J, Pastorekova S, Vojtesek B, et al. Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 93.

[12] Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis [J]. Cancer Res, 2015, 75(23): 5001 - 5007.

[13] Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage[J]. DNA Repair (Amst), 2016, 42: 63 - 71.

[14] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway [J]. Nature, 2009, 460(7259): 1132 - 1135.

(收稿: 2017 - 11 - 12 在线: 2019 - 03 - 27)

责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶