

缺氧诱导因子抑制剂 YC-1 对口腔鳞癌 Glut1、VEGF 表达的抑制效应*

王 芳 王静静 李建卫 马向瑞 牛文娟
滨州医学院附属医院口腔颌面外科 滨州 256603

【摘要】 目的 探讨缺氧诱导因子抑制剂 YC-1 对口腔鳞癌 (OSCC) 中葡萄糖转运蛋白-1 (Glut1)、血管内皮生长因子 (VEGF) 基因的调控作用。方法 (1) 应用免疫组织化学法检测 60 例 OSCC 患者和 12 例癌旁正常组织中的缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、Glut1、VEGF 的表达。(2) 人舌癌 Tca8113 细胞在体外进行培养,将其分成缺氧组、常氧组。将浓度为 0、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 HIF-1 α 抑制剂 YC-1 分别加入二组后,通过 RT-PCR 技术检测 OSCC 细胞中 HIF-1 α 、Glut1、VEGF mRNA 的转录水平。结果 免疫组化发现:OSCC 癌中 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 的阳性表达明显多于正常组织,其中 HIF-1 α 的阳性表达与 Glut1 的阳性表达、VEGF 的阳性表达均呈正相关。RT-PCR 结果表明,加入 YC-1 后,HIF-1 α 的表达在缺氧组和常氧组中均降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HIF-1 α 的表达在缺氧组随着 YC-1 浓度不同无剂量依从性,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 YC-1 作用下,缺氧组和对照组 Glut1、VEGF 在人舌癌 Tca8113 细胞中的表达均显著 ($P < 0.05$) 降低,缺氧组内 Glut1、VEGF 的表达随着 YC-1 浓度增加有剂量依从性 ($P < 0.05$)。结论 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 高表达于 OSCC 组织中。YC-1 显著抑制人舌癌 Tca8113 细胞 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 分子的表达;YC-1 可能通过下调 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 的表达来抑制 OSCC 的生长。

【关键词】 YC-1; 低氧诱导因子-1 α ; 口腔鳞癌

【中图分类号】 R739.8 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-9510(2018)06-0450-05

Inhibitory effect of YC-1 on induction of Glut1 and VEGF genes in Oral squamous cell carcinoma

WANG Fang WANG Jingjing LI Jianwei MA Xiangrui NIU Wenjuan

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, P. R. China

【Abstract】 Objective To study the function and mechanism of YC-1 on activity of Glut1 and VEGF genes in Oral squamous cell carcinoma. **Methods** (1) HIF-1 α , Glut1 and VEGF proteins were detected by immunohistochemical methods in 60 cases of oral squamous cell carcinoma and 12 cases of normal tissue adjacent to tumor. (2) Human tongue squamous cancer cell line Tca8113 were incubated under hypoxic or normoxia conditions and were divided into the hypoxia group and the normoxic group. Different concentrations of YC-1 (0, 10, and 100 $\mu\text{mol/L}$) were added to both groups. RT-PCR was used to detect the HIF-1 α , Glut1 and VEGF mRNA. **Results** The positive expression rate of HIF-1 α , Glut1 and VEGF in OSCC was higher than that in normal tissue. Positive correlation was found between HIF-1 α and Glut1, VEGF expression ($P < 0.05$). RT-PCR results showed that after the adding of YC-1, the expression of HIF-1 α in both groups decreased, with statistical significant difference ($P < 0.05$). With different YC-1 concentration, the expression of HIF-1 α in the hypoxia group had no dose dependence, with no statistical significant difference ($P > 0.05$). Glut1 and VEGF molecular expressions in human tongue squamous cancer cell line Tca8113 decreased significantly in different YC-1 concentrations ($P < 0.05$). The expressions of Glut1 and VEGF had dose dependence in the hypoxia group with the increase of YC-1 concentrations ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of HIF-1 α , Glut1 and VEGF in oral squamous cell carcinoma are higher than those in the normal tissues. YC-1 inhibits HIF-1 α , Glut1 and VEGF expressions in Tongue squamous cancer cell line Tca8113. YC-1 inhibits the growth of OSCC possibly through down-regulating the expressions of HIF-1 α , Glut1 and VEGF.

【Keywords】 YC-1, HIF-1 α , oral squamous cell carcinoma

口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC, 口腔鳞癌)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,好发于舌部、牙龈、颊部等,其发病率高,侵袭性强,术后易复发,并且容易发生淋巴结转移及远处转移,

预后不良,严重影响着人类的口颌系统功能及生命安全。

肿瘤生长过程中普遍存在着缺氧现象。肿瘤细胞缺氧可出现无氧糖酵解的增强、相关蛋白的表达

* 基金项目:滨州市科技发展计划(2014ZC0111)
王芳: E-mail: wfbz2005@126.com

增加等一系列适应性和代偿性改变。研究发现,缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor1 α , HIF-1 α) 在许多动物及人体组织肿瘤细胞中的表达较高,其在肿瘤的生长、转移、血管形成、细胞凋亡及耐药等多方面具有调控作用^[1-3]。位于 HIF 的下游基因之一的葡萄糖转运蛋白-1 (Glucose1, Glut1) 参与调节组织缺氧时的能量代谢。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 参与调控肿瘤血管的发生发展。

本研究探讨在 OSCC 中 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 的表达及其之间的关系,研究缺氧诱导因子抑制剂 3-(5'-羟甲基-2'-咪喃基)-1-甲苯 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole, YC-1] 对 OSCC 细胞中 HIF-1 α 、Glut1、VEGF mRNA 表达的作用效果,探讨缺氧参与 OSCC 发生发展的调节机制,为 OSCC 靶向治疗提供新的实验基础和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 采用免疫组织化学 (IHC) 方法检测手术切除的 OSCC 组织中 HIF-1 α 、Glut1、VEGF、CD34 的表达。

表 1 细胞染色分级标准

	阴性 (-)	弱阳性 (+)	中度阳性 (++)	强阳性 (+++)
HIF-1 α	没有染色或 <1% 的细胞染色	细胞数染色 1% ~ 10%	细胞数染色 11% ~ 50%	细胞数染色 >50%
Glut-1	无着色或细胞数染色 <1%	细胞数染色 <10%	11% ~ 50% 的细胞染色	>50% 的细胞染色
VEGF	无着色或细胞数染色 <10%	11% ~ 25% 的细胞染色	26% ~ 50% 的细胞染色	>50% 的细胞染色

1.1.4 统计学分析 用 SPSS21.0 软件包进行分析,所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, t 检验确定组间组内数据是否有差异,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2 以人舌鳞癌 Tca8113 细胞为研究对象,用 RT-PCR 方法检测应用不同浓度的 YC-1 后, HIF-1 α 、Glut1、VEGF 的 mRNA 在 Tca8113 细胞中的表达水平。

1.2.1 材料 人舌癌 Tca8113 细胞 (中科院上海细胞所); 胎牛血清 (美国 Sigma 公司); YC-1 (瑞士 Alexis biochemicals 公司); Taq DNA 聚合酶 (美国 Promega 公司); GAPDH 多克隆抗体 (兔抗人) (上海博雅生物技术有限公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 氯化钴 (CoCl₂) (北京中杉金桥有限公司公司); MMLV 逆转录酶试剂 (美国 Promega 公司)。HIF-1 α 、VEGF、Glut1 引物序列由上海生工公司合成 (表 2)。

1.1.1 材料及试剂 HIF-1 α 多克隆抗体 (兔抗人) (武汉博士德生物公司), Glut-1 多克隆抗体 (兔抗人) (武汉博士德生物公司), VEGF 单克隆抗体 (鼠抗人) (武汉博士德生物公司), CD34 单克隆抗体 (鼠抗人) (武汉博士德生物公司)。

收集 2008 至 2018 年滨州医学院附属医院病理科保存石蜡标本,各标本的患者术前均未行抗肿瘤治疗,其中 60 例为 OSCC 组织,12 例为癌旁正常口腔组织,分 OSCC 组、癌旁正常组织组。

1.1.2 实验方法 利用切片机将石蜡标本制成厚度为 4 μ m 的切片,于恒温 (60 $^{\circ}$ C) 烤箱中烤片 20 min,脱蜡脱水后进行免疫组织化学法染色试验。采用 CD34 抗体标记血管内皮细胞。

1.1.3 观察结果指标 染色后在高倍显微镜下观察平均分布在 5 个视野内的 1 000 个细胞,依照 Zhong 等^[4]的报道, HIF-1 α 阳性表达于细胞质或细胞核,依照 Cooper 等^[5]的报道, Glut-1 阳性表达于细胞质或细胞核 (表 1)。作为血管内皮细胞特异标志物之一的 CD34 被染成棕色,分布在血管最高区域。本研究中采用积分光密度值进行分析。

表 2 引物序列

引物名称	引物序列	片段长度/bp
HIF-1 α		
上游	5'-GATGTAATGCTCCCCTCAC-3'	
下游	5'-GCTGGAATACTGTAAGTGTGC-3'	514
VEGF		
上游	5'-GAGGGCAGAATCATCAGGAAG-3'	
下游	5'-AGGGAACGCTCCAGGACTTAT-3'	402
Glut1		
上游	5'-TCATCGTGGCTGAACTCTTCAG-3'	
下游	5'-TCACACTTGGGAATCAGCCCC-3'	231

1.2.2 实验分组和方法 在缺氧 (1% O₂) 和常氧 (20% O₂) 培养箱中培养人舌鳞癌 Tca8113 细胞 48 h 后,缺氧组加入 300 μ mmol/L 的 CoCl₂ 以加重缺氧微环境。

将浓度为 0、10、100 μ mmol/L 的缺氧诱导因子抑制剂 YC-1 分别加入缺氧组、常氧组中。共分为 6 组,即:常氧对照组、常氧-YC-1-10 组、常氧-YC-1-100 组;缺氧对照组、缺氧-YC-1-10 组、缺氧-YC-1-100 组。

培养 24 h 后按照 Trizol 试剂盒说明提取各组细胞总 mRNA ,逆转录成 cDNA ,进行实时定量 PCR 反应 ,读吸光值 ,以 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 与 GAPDH 的灰度比值作为 HIF-1 α 、Glut1、VEGF mRNA 的相对表达量 ,实验重复 3 次。

1.2.3 采用 SPSS21.0 软件包进行统计分析 ,单因素方差分析(One-Way ANOVA)确定各组数据是否有差异 ,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

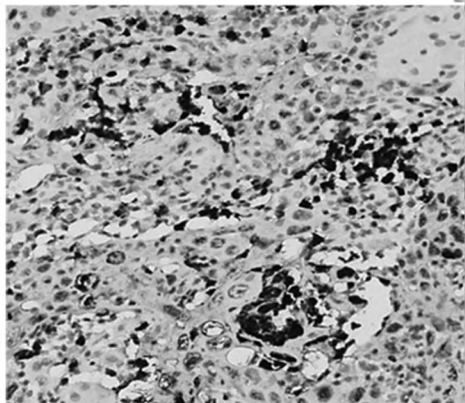


图 1 OSCC 中 HIF-1 α 的阳性表达(IHC , $\times 200$)

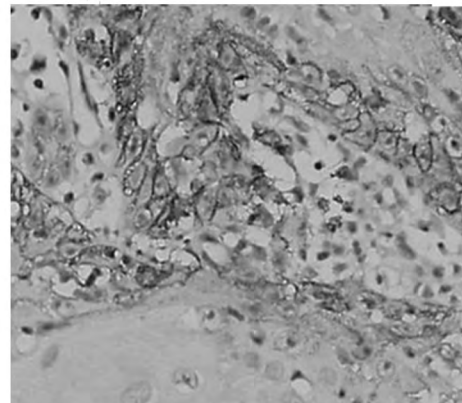


图 2 OSCC 中 Glut1 的阳性表达(IHC , $\times 200$)

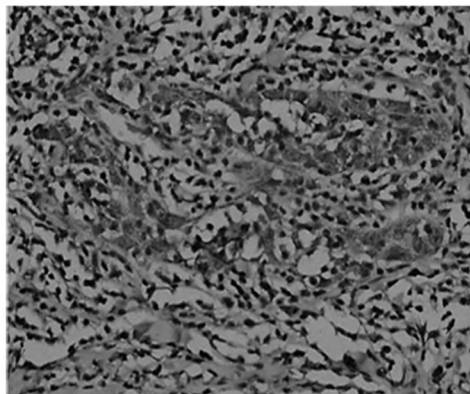


图 3 OSCC 中 VEGF 的阳性表达(IHC , $\times 200$)

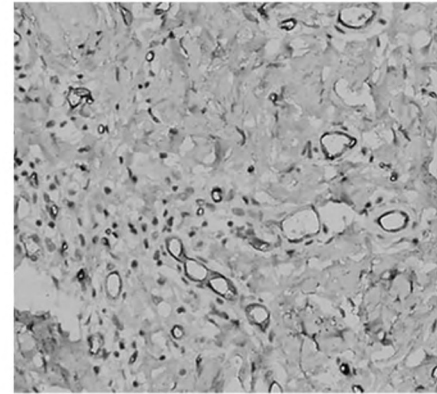


图 4 OSCC 中 CD34 的阳性表达(IHC , $\times 200$)

表 3 HIF-1 α 、Glut1、VEGF、CD34 的平均光密度值($P < 0.01$)

	HIF-1 α	Glut1	VEGF	CD34
OSCC 组	1.46 \pm 0.064	1.10 \pm 0.117	1.14 \pm 0.105	1.07 \pm 0.104
癌旁组织组	0.10 \pm 0.061	0.19 \pm 0.035	0.20 \pm 0.041	0.13 \pm 0.064
t 值	26.674	12.130	6.496	13.398
P 值	0.00	0.00	0.00	0.00

2.2 Tca8113 细胞经不同浓度的 YC-1 作用后 ,其 HIF-1 α 、Glut1、VEGFmRNA 的表达模式。

2.2.1 HIF-1 α mRNA 的表达水平 YC-1 浓度为 0 时 ,常氧组 HIF-1 α mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.05$,与缺氧组相比较) ,* 表示差异有统计学意义。YC-1 浓度为 10、100 μ mmol/L 时 ,各组 HIF-1 α mRNA 表达均降低 ,F 值为 3339191.922 ($P < 0.05$) ,差异有统计学意义。缺氧-YC-1-10 组与缺

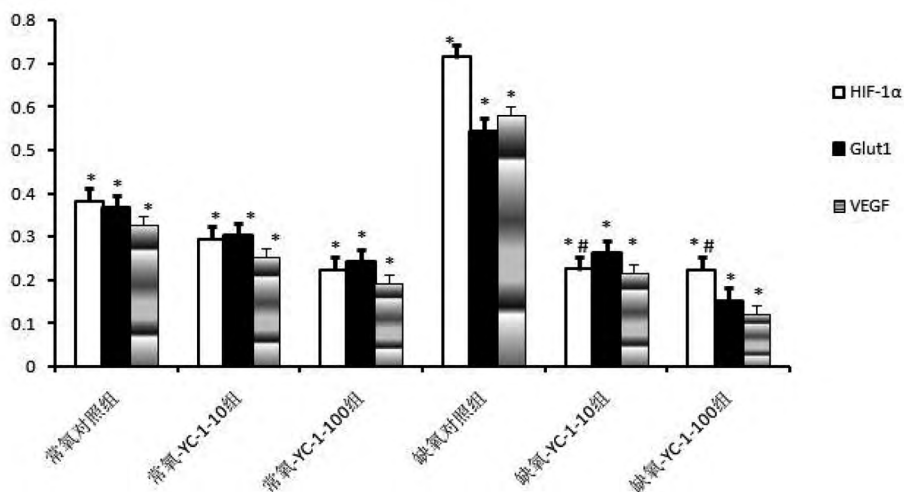
2.1 HIF-1 α 、Glut1、VEGF、CD34 在 OSCC 中的表达 HIF-1 α 、Glut1、VEGF、CD34 在 OSCC 组织中的表达明显增高 ($P < 0.01$,与癌旁正常口腔组织组比较) (图 1、2、3、4 ,表 3) 。HIF-1 α 的表达与 Glut1 的表达呈正相关 ($r = 0.975$, $P = 0.001$) ,HIF-1 α 的表达与 VEGF 的表达呈正相关 ($r = 0.979$, $P = 0.001$) ,HIF-1 α 的表达与 CD34 的表达呈正相关 ($r = 0.976$, $P = 0.001$) 。

氧-YC-1-100 组比较 ,P 值为 0.155 ,差异无统计学意义 ,表示 HIF-1 α mRNA 的表达随着 YC-1 浓度不同无剂量依从性(图 5) 。

2.2.2 Glut1、VEGF mRNA 表达水平 YC-1 浓度为 10、100 μ mmol/L 时 ,缺氧组、常氧组中 Glut1mRNA 的表达均明显降低 ($P < 0.05$) ,F 值为 1625564.971 ,差异有统计学意义 ,VEGF mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.05$) ,F 值为 2862988.650 ,差

异有统计学意义。实验表明在缺氧组内 Glut1、VEGF mRNA 的表达随着 YC-1 浓度的增高而显著降低,且存在有剂量依从性($P < 0.05$) (图 5)。HIF-1 α mRNA 与 Glut1mRNA 表达的降低趋势一致,

呈正相关($r = 0.947, P < 0.05$),HIF-1 α mRNA 与 VEGF mRNA 的表达同样呈正相关($r = 0.979, P < 0.05$)。



注: * 表示差异有统计学意义 #表示差异无统计学意义。

图 5 不同浓度 YC-1 处理 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 的 mRNA 的表达比值

3 讨论

肿瘤缺氧表现在以下方面:一是通过诱导细胞基因表达、改变能量代谢等方式使肿瘤细胞适应缺氧环境;二是促进新生血管的增多,从而使血供增多,渗透性增强,肿瘤细胞的外渗率增加,表现为转移及侵袭能力增强。

缺氧环境下 HIF-1 α 介导肿瘤缺氧活性并调节基因的转录表达。HIF-1 α 参与超过 100 种适应缺氧环境相关的基因(VEGF、Glut1、转铁蛋白、内皮素-1、iNOS 等)的转录,在肿瘤细胞增殖、凋亡、能量代谢方面起作用,同时还调节肿瘤的血管发生、肿瘤侵袭等。HIF-1 α 蛋白在细胞核及胞浆内的表达随着细胞的氧浓度降低而表达增加,二者呈负相关,表明 HIF-1 α 的表达有氧依赖性。因而,通过抑制 HIF-1 α 和下游基因的表达达到抑制肿瘤细胞的增生的目的。Duffy 等^[6] 发现,在缺氧条件下 HIF-1 α 参与调节启动了 VEGF 的信号传导途径,并发挥重要作用。HIF-1 α 在 VEGF 的 mRNA 稳定性中起促进作用,增强了 VEGF 的阳性表达,增加了血管的数目,并增多其通透性和血管外纤维性凝胶,肿瘤细胞的血供丰富,生长加快。缺氧组织中 HIF-1 α 能升高与糖及能量代谢有关的包括 Glut1 在内的靶基因的表达,促使糖酵解酶的产生,促进糖酵解和糖吸收,调节能量代谢,利于肿瘤细胞在缺氧环境的适应及生长。本研究发现在 OSCC 组织中 HIF-1 α 、Glut1、

VEGF、CD34 的表达明显高于癌旁正常组织,提示缺氧上调了 OSCC 组织中 HIF-1 α 、Glut1、VEGF、CD34 的表达,同时 HIF-1 α 的表达与 Glut1、VEGF、CD34 的表达呈正相关。组织缺氧,血管生成增加,葡萄糖转运和糖降解增加,加强了组织细胞对缺血、缺氧的耐受性,从而使肿瘤得以生长。

学者发现,由人工合成的低氧诱导因子抑制剂 YC-1 具有很好的抗血管新生活性及肿瘤治疗活性,能抗血管内血栓形成,激活鸟苷酸环化酶,舒张动脉,阻断细胞缺氧信号通路,抑制 HIF-1 α 、Glut1、VEGF 的表达,抑制肿瘤血管生成,降低肿瘤血管密度,抑制肿瘤细胞增殖,从而发挥抗肿瘤的作用^[7-9]。有研究表明,YC-1 抑制转录因子的活性与抑制 HIF-1 α 的效应可能相关,具体机制仍有待于进一步研究。许静等^[10] 发现,YC-1 在缺氧环境下可调控生物钟基因和蛋白的表达,减弱了细胞增殖和克隆能力。本研究中,缺氧条件下, HIF-1 α 、Glut1、VEGF 为强表达,明显高于 YC-1 作用于 HIF-1 α 、Glut1、VEGF mRNA 的表达,呈抑制趋势,且 HIF-1 α mRNA 与 Glut1mRNA、VEGF mRNA 表达的降低趋势一致,呈正相关。进一步证实 YC-1 抑制 HIF-1 α 的转录活性而降低 HIF-1 所介导的部分靶基因包括 Glut1、VEGF mRNA 的表达水平^[11],抑制 OSCC 血管生成和转移。杨宝明等^[12] 发现,YC-1 在肝细胞中能够抑制 HIF-1 α 蛋白表达量,但不影响 HIF-1 α mRNA

的表达量,这表明 YC-1 是在蛋白质的水平对 HIF-1 α 蛋白发挥抑制作用;因而猜测,HIF-1 α 蛋白的表达量减少,下调了 HIF-1 α 二聚体的形成,使得 HIF-1 α 蛋白从胞核到胞浆的转移减少。而在 OSCC 中 YC-1 对 HIF-1 α 蛋白水平的下调作用尚需进一步研究。

综上所述,本研究提示可通过抑制 HIF-1 α , 寻求治疗 OSCC 的新靶点。OSCC 肿瘤细胞发生发展的通路、机制较为复杂,尤其在缺氧环境中,肿瘤细胞的生物学行为受多种因素、经多种途径的影响。因此,可从抑制多种分子以及多种异常信号通路方面着手,通过靶向药物或者联合的治疗方法成为 OSCC 的新的治疗方向。

参 考 文 献

[1] Karetzi E ,Joannou M G ,Kerenidi T ,et al. Differential expression of hypoxia-inducible factor 1 α in non-small cell lung cancer and small cell lung cancer [J]. Clinics (Sao Paulo) ,2012 ,67 (12) : 1373-1378.
 [2] Sun L ,Liu Y ,Lin S ,et al. Early growth response gene-1 and hypoxia-inducible factor-1 α affect tumor metastasis via regulation of tissue factor[J]. Acta Oncol 2013 52(4) : 842-851.
 [3] Pietras A ,Johnsson AS ,Pahlman S. The HIF-2 α -driven pseudo-hypoxic phenotype in tumor aggressiveness ,differentiation ,and vascularization[J]. Curr Top Microbiol Immunol 2010 345: 1-20.

[4] Zhong H ,DeMarzo A M ,Laughner E ,et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in common human cancers and their metastases [J]. Cancer Res ,1999 59(22) : 5830-5835.
 [5] Cooper R ,Sario lu S ,S kmen S ,et al. Glucose transporter-1 (GLUT-1) : a potential marker of prognosis in rectal carcinoma? [J]. Br J Cancer 2003 89(5) : 870-876.
 [6] Duffy J P ,Eibl G ,Reber H A ,et al. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer [J]. Mol Cancer 2003 , 2(2) : 12.
 [7] Lee T Y ,Leu Y L ,Wen C K. Modulation of HIF-1 and STAT3 signaling contributes to anti-angiogenic effect of YC-1 in mice with liver fibrosis [J]. Oncotarget 2017 8(49) : 86206-86216.
 [8] Lee M R ,Lin C ,Lu C C ,et al. YC-1 induces G0 /G1 phase arrest and mitochondria-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells [J]. Biomedicine 2017 7(2) : 12.
 [9] 李明星 ,蒋德旗 ,王艳 ,等. YC-1 对低氧诱导人肺动脉平滑肌细胞增殖和 P53 表达的影响 [J]. 基础医学与临床 2015 35(10) : 1303-1307.
 [10] 许静 ,孙诚谊 ,喻超 ,等. 缺氧诱导因子抑制剂 YC-1 对缺氧肝癌细胞生物钟基因和蛋白表达及增殖的影响 [J]. 山东医药 , 2018 58(7) : 5-8.
 [11] 黄金玲 ,洪莉 ,洪莎莎 ,等. YC-1 体外调控卵巢癌化疗敏感性 [J]. 医药导报 2015 34(7) : 871-875.
 [12] 杨宝明 ,王顺祥 ,黄宁 ,等. HIF-1 α 抑制剂 YC-1 对肝癌细胞增殖凋亡的影响及机制 [J]. 河北医科大学学报 2011 32(11) : 1268-1274.

(收稿日期:2018-10-07)

(上接第 432 页)

质量,有了安全感才能有自尊和自信^[6]。因此家长在与孩子的相处过程中应充分尊重孩子,能与孩子进行良好的沟通,对其行为进行正确的引导。父母的关爱和情感交流会提高儿童的安全感和信任感,改善他们的社会心理功能,从而提高他们的生命质量。

参 考 文 献

[1] 卢奕云 ,田 琪 ,郝元涛 ,等. 儿童生存质量测定量表 PedsQL4. 0 中文版的信度和效度分析 [J]. 中山大学学报 (医学科学版) ,

2008 29(3) : 328-331.

[2] 谢鸿翔 ,林波 ,刘楠 ,等. 脑瘫儿童与健康儿童生命质量的对比 [J]. 中华物理医学与康复杂志 2015 37(4) : 306-307.
 [3] 石彩虹 ,赵玉英. 菏泽市中小学独生子女心理健康现状及教育对策 [J]. 科教文汇 2014(6) : 208-209.
 [4] 方拴锋 ,经承学 ,王琳琳. 独生子女与非独生子女心理健康状况分析 [J]. 临床合理用药 2010 3(10) : 49-50.
 [5] 詹启生 ,程诺 ,李 秒 ,等. 独生子女与非独生子女大学生心理健康比较 [J]. 中国健康心理学杂志 2017 25(9) : 1414-1418.
 [6] 马丽娟 ,马颖 ,陈任. 基于社会资本理论的老年心理健康问题探讨 [J]. 医学与社会 2012 25(4) : 81-83.

(收稿日期:2018-07-30)