

• 短篇论著 •

缺氧诱导因子-1 抑制剂与紫杉醇联合使用治疗大鼠卵巢癌的研究*

李 欣,王 波[△],安仲武,李海英,薄维波,关 辉

连云港市东方医院检验科,江苏连云港 222000

摘 要:**目的** 探讨缺氧诱导因子-1(HIF-1)抑制剂与紫杉醇联合使用治疗大鼠卵巢癌的研究。**方法** 构建荷卵巢癌 SD 大鼠模型,应用 HIF-1 抑制剂 LW6 和紫杉醇对荷瘤大鼠进行分别干预和联合干预。干预后,观察大鼠的精神状态,分离肿瘤组织,对肿瘤重量进行称重统计;酶联免疫吸附试验法检测肿瘤组织中肿瘤坏死因子(TNF)及 HIF-1 水平;化学发光法检测大鼠血清中人附睾蛋白 4(HE4)、癌抗原 125(CA125)水平;荧光定量 PCR 技术检测肿瘤组织中原癌基因细胞周期素 D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)表达量。**结果** HIF-1 抑制剂组及联合治疗组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量明显低于常规治疗组及模型治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$);HIF-1 抑制剂组和联合治疗组肿瘤组织中 TNF 及 HIF-1 水平明显低于模型对照组和常规治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$);HIF-1 抑制剂组和联合治疗组 HE4 及 CA125 水平明显低于模型对照组和常规治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$);联合治疗组 Cyclin D1 及 PCNA 表达量明显低于模型对照组及常规治疗组和 HIF-1 抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 抑制 HIF-1 的表达能明显抑制肿瘤生长,而常规紫杉醇化疗与 HIF-1 抑制剂联合使用,可能更有利于阻止肿瘤的进展,可为临床治疗肿瘤提供新的思路。

关键词: 卵巢癌; 缺氧诱导因子-1; 紫杉醇

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.16.024

文章编号:1673-4130(2023)16-2039-04

中图法分类号:R737.31

文献标志码:A

机体的功能和生存依赖于细胞可获得的充足的氧气供应,动物在有氧状态下利用糖酵解、氧化磷酸化等途径来分解体内的糖。在这些过程中,氧被用作电子受体,低效的电子转移会导致氧物种的产生,电子逸出会导致超氧阴离子和/或羟基自由基的产生,这些物质都被称为活性氧物质(ROS)^[1]。研究表明,ROS 的增加与电子传递链中生理氧分压的偏离有关^[2]。因此,通过动态平衡机制严格调节细胞内氧浓度是非常必要的。所有实体肿瘤的特点都是缺氧,缺氧可通过病理性或非病理性条件在生物体中诱导应激,后果包括 DNA 链断裂、DNA 氧化损伤以及阻碍细胞生长甚至细胞死亡^[3]。缺氧诱导因子 1(HIF-1)是一种异源二聚体蛋白,由缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和缺氧诱导因子-1 β (HIF-1 β)两个亚基组成^[4]。其中 α 亚基为氧敏感亚基,受缺氧诱导因子脯氨酸羟化酶(PHD)的严格调控,PHD 能够羟基化 α 亚基上的特定脯氨酸残基,在缺氧过程中,PHD 活性的降低稳定了 HIF-1 α ,导致其移位到细胞核,与 HIF-1 β 结合形成复合物,该复合体与含有缺氧反应元件的靶基因结合,激活不同信号通路的基因表达^[5]。HIF-1 可以被认为是一种信使,它向细胞核迁移,激活对缺氧的转录反应,参与肿瘤的转移、生长、发生、血管生成

和侵袭等基因调控。在缺氧条件下,HIF-1 α 解离并在细胞内快速积聚,然后移位到细胞核内,并与 HIF-1 α 调控基因启动子区域的缺氧反应元件结合。过表达的 HIF-1 α 通过增强血管生成、侵袭和糖酵解等途径促进癌细胞存活。HIF-1 α 被认为是控制肿瘤生长和转移的重要因素,因此,抑制 HIF-1 α 活性可能在癌症治疗中具有广泛的临床应用^[6-7]。紫杉醇是一种天然抗癌物,它能够使微管蛋白和微管蛋白二聚体失去动态平衡,促进微管蛋白聚合,防止解聚,使微管稳定,从而抑制癌细胞的有丝分裂,触发癌细胞凋亡,进而有效阻止癌细胞的增殖,起到抗癌作用,目前在临床上已经广泛用于乳腺癌、卵巢癌的治疗。LW6 是新型的 HIF-1 抑制剂,抑制作用强,因此选取该抑制剂。本研究将常规紫杉醇化疗与 HIF-1 抑制剂联合使用,观察其在荷实体瘤大鼠中的作用,以探讨两者联合使用是否更有利于阻止肿瘤的进展,为临床治疗肿瘤提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞 40 只雌性 SPF 级 SD 大鼠,日龄 30~35 d,体重 100~120 g,由连云港市东方医院实验转化中心提供;卵巢癌 NUTU-19 细胞株购自上海美轩生物科技有限公司。

* 基金项目:连云港市妇幼保健科研项目(F202006)。

[△] 通信作者,E-mail:2499411890@qq.com。

1.2 主要试剂 紫杉醇注射液购自深圳万乐药业有限公司;HIF-1 抑制剂 LW6 购自北京百奥莱博科技有限公司;TNF 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、HIF-1 ELISA 试剂盒购自上海江莱实业股份有限公司;10%中性甲醛购自北京索莱宝科技有限公司;组织 RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录合成试剂盒及 PCR 反应液均购买于上海江莱实业股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 构建卵巢癌 SD 大鼠模型 将卵巢癌 NUTU-19 细胞进行培养,通过离心法收集细胞,将收集后的细胞用完全培养液重悬,密度调节至 2×10^7 个/mL。取 40 只雌性 SPF 级 SD 大鼠,于右侧腋窝皮下注射 0.2 mL 已预先准备好的人卵巢腺癌 NUTU-19 肿瘤细胞悬液(约含 2×10^7 个活细胞),皮肤隆起为注射有效。在结节形成后每天用游标卡尺记录其最长径(a)及最短径(b),待出现大鼠体重减轻、毛发干枯、活动能力下降,并且当右下腋窝处肿瘤大小成长到 0.4 cm×0.4 cm 时认为造模成功。

1.3.2 分组及给药 取造模成功的 SPF 级 SD 大鼠 40 只,分 4 组,每组 10 只,分别为模型对照组、常规化疗组、HIF-1 抑制剂组及联合治疗组,其中模型对照组腹腔注射生理盐水,每天注射 2 次,每次 0.2 mL,连续注射 4 d,间隔 3 d 后,再连续注射 4 d;常规化疗组注射紫杉醇注射液,20 mg/kg,腹腔注射,每天注射 2 次,每次 0.2 mL,连续注射 4 d,间隔 3 d 后,再连续注射 4 d;HIF-1 抑制剂组注射 HIF-1 抑制剂 LW6,2.5 mg/mL,腹腔注射,每次 0.2 mL,连续注射 4 d,间隔 3 d 后,再连续注射 4 d;联合治疗组同时注射紫杉醇和 LW6,紫杉醇及 LW6 给药剂量同上,腹腔注射,每天注射 2 次,每次 0.2mL,连续注射 4 d,间隔 3 d 后,再连续注射 4 d。

1.3.3 检测指标 (1)称重。停药后每天观察大鼠的精神状态,每隔 2 天称重 1 次,停药 1 周后,处死大鼠,分离肿瘤组织,对肿瘤的重量进行称重统计。(2)TNF 及 HIF-1 检测。取肿瘤组织 100 mg,按重量体积比加 PBS 900 μ L,通过研磨法制备成 10%组织匀浆液,3 000 r/min,离心 20 min,收集上清,冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用,通过 ELISA 法检测肿瘤坏死因子(TNF)和 HIF-1 水平。(3)HE-4 及 CA125 水平检测。心脏采血,收集血液,3 000 r/min,离心 10 min,收集血清,保存到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用,通过化学发光法检测大鼠血清中 HE4、CA125 水平。(4)原癌基因细胞周期素 D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)表达量的检测。按照试剂盒说明书进行操作,利用荧光定量 PCR 技术检测肿瘤组织中 Cyclin D1、PCNA 表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布资料经数

据处理,组间比较采用单因素方差分析,根据方差分析结果,进行 LSD-*t* 检验或 Games-Howell 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量比较 模型对照组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量为 (0.91 ± 0.06) g,常规治疗组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量为 (0.68 ± 0.03) g,HIF-1 抑制剂组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量为 (0.49 ± 0.03) g,联合治疗组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量为 (0.32 ± 0.04) g,常规治疗组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);HIF-1 抑制剂组及联合治疗组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量明显低于常规治疗组及模型治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 两组肿瘤组织中 TNF 及 HIF-1 水平比较 常规治疗组肿瘤组织中 TNF 及 HIF-1 水平明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);HIF-1 抑制剂组和联合治疗组肿瘤组织中 TNF 及 HIF-1 水平明显低于模型对照组和常规治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$);联合治疗组肿瘤组织中 TNF 及 HIF-1 水平显著低于 HIF-1 抑制剂组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组肿瘤组织中 TNF、HIF-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF(pg/mL)	HIF-1(pg/mL)
模型对照组	10	107.70±17.62	181.23±25.71
常规治疗组	10	70.92±16.73 *	67.20±10.21 *
HIF-1 抑制剂组	10	43.73±13.10 * #	41.57±10.71 * #
联合治疗组	10	32.99±9.87 * # &	35.86±6.89 * # &

注:与模型对照组相比,* $P < 0.05$;与常规治疗组相比,# $P < 0.05$;与 HIF-1 抑制剂组相比,& $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠血清中 HE-4 及 CA125 水平比较 常规治疗组大鼠血清中 HE4 及 CA125 水平明显低于模型对照组,HIF-1 抑制剂组和联合治疗组 HE4 及 CA125 水平明显低于模型对照组和常规治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$);联合治疗组 HE4 及 CA125 水平明显低于 HIF-1 抑制剂组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 HE4 及 CA125 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HE-4(pmol/L)	CA125(IU/mL)
模型对照组	10	91.32±8.24	49.7±10.50
常规治疗组	10	69.10±6.95 *	34.8±3.42 *
HIF-1 抑制剂组	10	45.18±3.98 * #	21.1±2.56 * #
联合治疗组	10	33.87±6.87 * # &	18.8±2.60 * # &

注:与模型对照组相比,* $P < 0.05$;与常规治疗组相比,# $P < 0.05$;与 HIF-1 抑制剂组相比,& $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠血清中 Cyclin D1 及 PCNA 表达量比

较 联合治疗组 Cyclin D1 及 PCNA 表达量明显低于模型对照组及常规治疗组和 HIF-1 抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.05$);常规治疗组和 HIF-1 抑制剂组 Cyclin D1 及 PCNA 表达量明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 Cyclin D1 及 PCNA 表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Cyclin D1	PCNA
模型对照组	10	1.28±0.14	1.36±0.17
常规治疗组	10	1.01±0.08 [*]	1.12±0.11 [*]
HIF-1 抑制剂组	10	0.99±0.06 [*]	0.97±0.09 [*]
联合治疗组	10	0.52±0.04 ^{* &}	0.64±0.07 ^{* &}

注:与模型对照组相比,^{*} $P<0.05$;与常规治疗组和 HIF-1 抑制剂组相比,[&] $P<0.05$ 。

3 讨 论

卵巢癌目前是女性癌症相关死亡的第五大原因,卵巢癌在早期并无明显症状,当被确诊时多为中晚期,错过了治疗的最佳时间,因此病死率高^[8]。由于确诊困难,使得治疗难度增加,因此需要在卵巢癌的治疗上寻求新的突破。

有研究表明,缺氧是实体瘤的共同特征,在肿瘤的恶性病变中有着至关重要的作用,在缺氧的状态下,HIF-1 通过上调致癌基因的转录,在肿瘤细胞适应低氧和营养缺乏的条件中发挥关键作用,HIF-1 的过表达促进了肿瘤的发生发展^[9]。本研究结果表明,HIF-1 抑制剂组及联合治疗组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量明显低于模型组及常规治疗组,说明抑制 HIF-1 的表达,能够抑制卵巢癌的进展。联合治疗组荷卵巢癌大鼠肿瘤重量明显低于 HIF-1 抑制剂组,说明 HIF-1 抑制剂及紫杉醇的联合使用更有利于阻止卵巢癌的进展。

此外,本研究结果显示,常规治疗组肿瘤组织中 HIF-1 水平明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明在肿瘤组织中 HIF-1 确实过表达,HIF-1 参与了肿瘤的发生发展。TNF 可通过与细胞膜表面的 TNF 受体直接结合介导对肿瘤细胞的直接杀伤作用、抑制肿瘤细胞生长或诱导肿瘤细胞凋亡,在肿瘤的发生发展中起着重要作用^[10]。本研究常规治疗组肿瘤组织中 TNF 水平明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明随着卵巢癌的进展,TNF 水平逐步升高,与卵巢癌的发生、发展过程密切相关。HIF-1 抑制剂组和联合治疗组肿瘤组织中 TNF 水平明显低于模型对照组和常规治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$),表明 HIF-1 抑制剂组及联合治疗组干预了卵巢癌的发病过程,能够抑制肿瘤组织的发生与发展。

HE4 是参与精子成熟过程的蛋白酶抑制剂,有研究表明 HE4 在血清和组织中的高表达与多种癌症类

型有关,这预示着 HE4 或许能够为临床诊断及治疗肿瘤提供参考^[11]。CA125 是肿瘤标志物糖类抗原之一,能够用于辅助诊断卵巢癌^[12]。本研究卵巢癌模型大鼠 HE4 及 CA125 水平均呈高表达,抑制 HIF-1 的表达后,HE4 及 CA125 水平显著降低,与紫杉醇联合使用后,大鼠血清中的 HE4 及 CA125 水平降低更为显著,表明抑制 HIF-1 的表达能够有效控制卵巢癌的进展,与紫杉醇联合使用后,对卵巢癌的发展有更明显的抑制作用。

有研究表明 Cyclin D1 及 PCNA 与卵巢癌进展直接相关,Cyclin D1 能够加速癌细胞周期,PCNA 能够加速 DNA 复制,共同促进细胞增殖^[13]。本研究联合治疗组 Cyclin D1 及 PCNA 表达量明显低于其他 3 组,表明 HIF-1 抑制剂及紫杉醇的联合使用对肿瘤组织中的癌基因具有调控作用,能够减少原癌基因的表达,从而达到抑制肿瘤生长的目的。

综上所述,抑制 HIF-1 的表达能够抑制肿瘤的生长,降低肿瘤组织中 TNF 的表达,降低大鼠血清中 HE4 及 CA125 水平,同时也降低了 Cyclin D1 及 PCNA 的表达,而常规紫杉醇化疗法与 HIF-1 抑制剂联合使用,更有利于阻止卵巢癌的进展,可为临床治疗卵巢癌提供新的思路。

参考文献

[1] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine[J]. Cell,2012,148(3):399-408.

[2] SEMENZA G L. Regulation of metabolism by hypoxia inducible factor 1 [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011,76(1):347-353.

[3] FUHRMANN D C, BRÜNE B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia [J]. Redox Biology,2017,12(8):208-215.

[4] YEWALKAR N, DEORE V, PADGAONKAR A, et al. Development of novel inhibitors targeting HIF-1α towards anticancer drug discovery [J]. Bioorg Med Chem Lett,2010,22(20):6426-6429.

[5] KIM J, TCHERNYSHYOV I, SEMENZA G L, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase;a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia [J]. Cell Metabolism,2006,3(3):177-185.

[6] CHALLAPALLI A, CARROLL L, ABOAGYE E O. Molecular mechanisms of hypoxia in cancer [J]. Clin Transl Imaging,2017,5(3):225-253.

[7] SINGH D, ARORA R, KAUR P, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer [J]. Cell Biosci,2017,7(11):62-70.

[8] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world-wide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,2021,71(3):209-249.

[9] CHEN K, ZENG J, SUN Y, et al. Junction plakoglobin

regulates and destabilizes HIF2 α to inhibit tumorigenesis of renal cell carcinoma [J]. Cancer Communications, 2020, 41(1):316-332.

[10] 丁凯宏. 肿瘤坏死因子在肿瘤研究中的进展[J]. 吉林医学, 2012, 33(4):823-824.

[11] 耿欣冉, 梁洪陆, 王振浩, 等. HE4 在良恶性肿瘤早期诊断、治疗和预后方面的现状分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(5):87-90.

[12] 南永刚, 王晓敏, 陆建荣, 等. CA125 在肿瘤患者细胞和血

• 短篇论著 •

清中表达相关性的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(17):2798-2800.

[13] SHAN K Z, WANG Y L, HUA H Q, et al. Ginsenoside Rg3 combined with oxaliplatin inhibits the proliferation and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via downregulating PCNA and Cyclin D1[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(6):900-905.

(收稿日期:2023-04-13 修回日期:2023-08-03)

胶体金法检测粪便钙卫蛋白在炎症性肠病中的临床价值*

李云豪, 卢晴晴[#], 彭欢子, 许莹芊, 彭嘉琪, 谢小兵[△]

湖南中医药大学第一附属医院医学检验与病理中心, 湖南长沙 410007

摘要:目的 探讨胶体金法检测粪便钙卫蛋白(FC)在炎症性肠病(IBD)临床诊断中的价值。方法 收集 2021 年 9 月至 2022 年 8 月湖南中医药大学第一附属医院的 60 名 IBD 患者(IBD 组)、60 名大肠癌患者(大肠癌组)、60 例肠炎患者(肠炎组)、60 名非消化系统疾病患者(非消化系统疾病组)、60 名其他消化系统疾病患者(其他消化系统疾病组)及 60 名健康体检者(无炎症体检者组)的粪便标本共计 360 份。用胶体金法检测各组 FC 水平,并记录各组性别及年龄、血浆、尿、粪便情况。结果 IBD 组 FC 水平显著高于其他组,而无炎症体检者组 FC 水平显著低于其他组,差异有统计学意义($P<0.05$)。胶体金法检测 FC 诊断 IBD 的曲线下面积为 0.733,当 FC 取截断值为 409.0 $\mu\text{g/g}$ 时,灵敏度为 60.0%,特异度为 80.3%。FC 水平与患者年龄、血浆白细胞计数和尿隐血、尿白细胞酯酶无相关性($P>0.05$);但 FC 水平与超敏 C 反应蛋白($r=0.278, P<0.001$)、粪便颜色($r=0.139, P=0.015$)、粪便隐血($r=0.335, P<0.001$)呈正相关,与粪便性状($r=-0.139, P=0.015$)呈负相关。结论 胶体金法检测 FC 在判断 IBD 病情的严重程度具有一定的临床意义,且由于该方法所需标本数少,操作简便,耗时较短,可能更适用于基层医疗单位。

关键词:粪便钙卫蛋白; 胶体金法; 炎症性肠病; 粪便颜色; 粪便隐血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.16.025 **中图法分类号:**R473.5

文章编号:1673-4130(2023)16-2042-04 **文献标志码:**A

炎症性肠病(IBD)是一种由慢性炎症介导的肠道疾病,可严重影响患者生活质量^[1-2]。粪便钙卫蛋白(FC)属于 S100 蛋白家族,是 S100A8/A9 形成的二聚体, S100A8 和 S100A9 在健康人体内具有抗炎作用,而在自身免疫性炎症中会过度表达。FC 可作为 IBD 临床症状辅助诊断的有效指标之一^[3],因其具有不易被肠道细菌分解、理化性质稳定等特点^[4-5],可用于指导 IBD 的治疗策略制定^[6]。胶体金法是以胶体金为标志物,依据层析作用检测抗原抗体反应,已广泛应用于医学检验领域^[7],胶体金法检测 FC 具有价格低廉、敏感、特异、快速,检测无侵入性等优势^[8],因此基于胶体金法检测 FC 的应用与推广对肠道疾病患者而言十分有益,更适用于县级医院、社区卫生服务中心和乡镇卫生院等基层医疗单位。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2021 年 9 月至 2022 年 8 月湖南中医药大学第一附属医院 60 名 IBD 患者 (IBD

组)、60 名大肠癌患者(大肠癌组)、60 例肠炎患者(肠炎组)、60 名非消化系统疾病患者(非消化系统疾病组)、60 名其他消化系统疾病患者(其他消化系统疾病组)及 60 名健康体检者(无炎症体检者组)的粪便标本共计 360 份。所有受试者中男性 206 例、女性 154 例,年龄 5~92 岁。IBD 组为经临床诊断确诊为炎症性肠病的 60 例患者,大肠癌组为经临床诊断确诊为大肠癌的 60 例患者,肠炎组为经临床诊断确诊为肠炎的 60 例患者,非消化系统疾病组为患有心血管系统、呼吸系统、泌尿系统疾病 60 例患者,其他消化系统疾病组为患有肠梗阻、胰腺炎、胃炎、息肉、消化道溃疡疾病 60 例患者,无炎症体检者组为血浆白细胞计数(WBC)为 $(4\sim10)\times10^9/\text{L}$ 、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP) $<5\text{ mg/L}$ 的 60 例体检者。纳入标准:均符合文献[9]相关诊断标准。排除标准:(1)临床资料不完整;(2)合并其他严重器质性疾病或肿瘤。受试者年龄、粪便颜色、粪便性状、粪便隐血、血浆 WBC、血浆

* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(2020JJ4481);湖南中医药大学双一流学科建设开放基金项目(2018YXJS02)。

[#] 共同第一作者。 [△] 通信作者, E-mail: xxiaobing888@163.com。