

HIF-3 α 在线粒体的表达及意义*

李露^{1,2}, 周彦妮^{1,2}, 李胜富², 龙丹², 李鸿生², 冯莉^{1,2}, 李幼平^{2,3 Δ}

1. 四川大学华西医院 再生医学中心(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 卫生部移植工程与移植免疫重点实验室(成都 610041);
3. 四川大学华西医院 中国循证医学中心(成都 610041)

【摘要】 目的 探究低氧诱导因子-3 α (HIF-3 α)定位至线粒体的现象及其生理、病理意义。方法 ①低氧(1%O₂)或脯氨酸羟化酶抑制剂——二甲基乙二酰甘氨酸(DMOG)、氯化钴(CoCl₂)模拟低氧处理人宫颈癌细胞系HeLa和人肾癌细胞系ACHN后,蛋白质免疫印迹(Western blot)和免疫荧光(IF)检测 HIF-3 α 在细胞中的分布及其在线粒体中的表达;②通过酶敏感实验观察 HIF-3 α 的线粒体亚结构定位;③采用 Western blot 检测 HIF-3 α 在正常小鼠不同器官组织、人肝癌组织线粒体中的表达情况。结果 ①在检测的2种细胞系(HeLa和ACHN细胞)中,HIF-3 α 在常氧及缺氧条件下均可定位至线粒体,且缺氧组 HIF-3 α 在线粒体中的表达高于常氧组;②HIF-3 α 的消化模式与线粒体外膜蛋白一致;③HIF-3 α 在小鼠多种器官组织中均可定位线粒体,HIF-3 α 在人肝癌组织线粒体中的表达高于正常及癌旁组织。结论 HIF-3 α 在常氧及缺氧条件下均可定位至线粒体外膜,低氧可促进其线粒体定位;该现象可能与肝癌的发生发展相关。

【关键词】 HIF-3 α 线粒体 低氧 常氧

Expression and Significance of HIF-3 α in Mitochondria LI Lu^{1,2}, ZHOU Yan-ni^{1,2}, LI Sheng-fu², LONG Dan², LI Hong-sheng², FENG Li^{1,2}, LI You-ping^{2,3 Δ} . 1. Regenerative Medicine Research Centre, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Transplant Engineering and Immunology of the Ministry of Health, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Chinese Cochrane Centre, Chinese Evidence-Based Medicine Centre, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: yzmylab@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the mitochondrial translocation of hypoxia inducible factor-3 α (HIF-3 α) under normoxia and hypoxia and its physiological and pathological meanings. **Methods** ①After hypoxic (1%O₂) or DMOG,CoCl₂ treatments mimicking the hypoxic treatment, Western blot and immunofluorescence were used to examine the HIF-3 α expression in mitochondria of HeLa and ACHN cells, respectively. ②The protease sensitivity experiment was used to explore the sub-organelle localization of HIF-3 α in mitochondria. ③Western blot was used to examine mitochondrial HIF-3 α in the normal mouse tissues and human liver carcinoma tissues. **Results** ①In HeLa and ACHN cells, HIF-3 α translocated to mitochondria under normoxia and hypoxia, and its mitochondrial expression was higher under hypoxia; ②The protease sensitivity of HIF-3 α was similar to proteins locating in the mitochondrial outer membrane; ③ Mitochondrial HIF-3 α expressed in multiple normal mouse tissues; The expression of mitochondrial HIF-3 α was higher in human liver carcinoma tissues than the normal and adjacent tissues. **Conclusion** HIF-3 α translocated to mitochondrial outer membrane under both normoxia and hypoxia, and hypoxia could up-regulated HIF-3 α mitochondrial translocation. Meanwhile, the phenomenon may be involved in the process of liver carcinoma.

【Key words】 HIF-3 α Mitochondria Hypoxia Normoxia

低氧是常见的生理和病理现象,而低氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)作为一类重要的转录因子,在机体及细胞适应低氧环境过程中发挥重要作用。实质肿瘤的浸润与迁移均伴随着低氧

条件,因此肿瘤细胞本身存在低氧适应反应。

研究表明:HIFs在许多癌症中表达,并可调控血管生成、细胞存活、代谢等过程^[1]。HIFs是由氧依赖型的 α 亚基以及组成型表达的 β 亚基〔又称芳香烃受体核转运蛋白(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)〕组成的异质二聚体。目前已知 α 亚基有3种:HIF-1 α , HIF-2 α 和HIF-

* 国家自然科学基金(No. 81270552, No. 81273255)资助

Δ 通信作者, E-mail: yzmylab@hotmail.com

3 α 。前2种 α 亚基研究较多,对HIF-3 α 的研究较少。且与前2种不同的是HIF-3 α 有多种剪切体,如:老鼠中包括全长的鼠HIF-3 α (mHIF-3 α),抑制性PAS结构域蛋白(inhibitory PAS domain protein, IPAS),新生儿和胚胎PAS蛋白(neonatal and embryonic PAS protein, NEPAS)^[2-4],人体中的剪切体有hHIF-3 α 1~10^[5-9]。其中,HIF-3 α 1通过与HIF-1/2 α 竞争性结合到HIF-1 β ,从而抑制HIF-1 α 和HIF-2 α 调控的靶基因表达,且可抑制HIF-1/2 α 的表达水平^[5]。HIF-3 α 4可与HIF-1/2 α 和HIF-1 β 结合,从而抑制HIF-1/2 α 调控的靶基因的转录活化^[8-9]。HIF-3 α 9可上调低氧相关靶基因如LC3C、REDD1、SQRDL等的表达^[10]。在人Hep3B细胞中,HIF-3 α 2、HIF-3 α 7或HIF-3 α 8与HIF-1 β 共表达可上调低氧反应基因如促红细胞生成素(EPO)、葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)等基因的mRNA水平^[6]。因此,在调控内源性基因表达时,不同的HIF-3 α 剪切体具有不同的功能。

线粒体不仅是能量供给的重要细胞器,还参与细胞中多个低氧相关反应。SNYDER等^[11]综述了在低氧条件下,线粒体可调控细胞死亡或通过活化相关基因如HIFs来促进细胞存活。已有研究发现:线粒体活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)可稳定HIF-3 α 表达^[12]。且IPAS可定位至线粒体^[13]。XUE等^[14]发现,HIF-3 α 1在直肠癌来源细胞中过表达并定位至胞质,并通过活化酪氨酸激酶(JAK)-信号转导和转录活化因子3(STAT3)通路(JAK-STAT3)促进直肠癌细胞生长。TANAKA等^[15]也通过免疫荧光检测到HIF-3 α 蛋白常氧下定位至细胞核和胞质。本课题组前期研究发现,低氧条件下,另一种 α 亚基HIF-1 α 可转运至线粒体并定位至线粒体外膜,调控线粒体功能,最终对细胞凋亡起到一定的拮抗作用^[16]。因此我们推测HIF-3 α 在细胞质中的定位可能是线粒体。为探讨HIF-3 α 是否可定位线粒体,本研究通过提纯线粒体蛋白等方法分析HIF-3 α 在线粒体中的表达及可能的临床意义。为区分定位在细胞核和细胞质的HIF-3 α ,将定位至线粒体的HIF-3 α 用mtHIF-3 α 表示。

1 材料和方法

1.1 动物、细胞系和主要试剂

雄性C57小鼠(8~12周龄)6只,购于四川达硕公司。人正常肝癌组织、癌旁以及癌组织来自于

四川大学华西医院肿瘤组织样本库。人宫颈癌细胞系(HeLa)购于中科院上海细胞库;人肾癌细胞系(ACHN)购于ATCC;MEM培养基、RMPI-1640培养基(Gibico公司);10%胎牛血清(Biological Industries);氯化钴(CoCl₂,科龙);脯氨酸羟化酶抑制剂——二甲基乙二酰甘氨酸(DMOG)、蛋白酶K(Sigma-Aldrich);Triton(Amresco);线粒体分离试剂盒、蛋白提取试剂(Thermo Fisher);蛋白酶抑制剂(Roche);所有蛋白免疫印迹的设备和试剂均购于Bio-Rad公司;所用抗体分别为:HIF-3 α (Novus);增殖细胞核抗原(PCNA)(Santa);线粒体外膜转位酶70A(TOMM70A)、线粒体外膜转位酶34(TOMM34)、线粒体内膜转位酶17A(TIMM17A)均购于Abclonal公司;组蛋白脱乙酰酶1(HDAC1)、葡萄糖调节蛋白75(Grp75)、线粒体ATP合酶 β 亚基(ATPB)、线粒体外膜转位酶40(TOMM40)、细胞色素C(Cyt-C)、凋亡调节蛋白Bel-X_L、山羊抗小鼠IgG(H+L)(DyLight[®] 550)、驴抗兔IgG(H+L)(Alexa Fluor[™] 488)均购于Abcam公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、 β -微管蛋白(β -tubulin)、山羊抗小鼠IgG(H+L)-HRP、山羊抗兔IgG(H+L)-HRP均购于康为世纪。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HeLa细胞用含10%胎牛血清的MEM培养基,ACHN细胞用含10%胎牛血清的RMPI-1640培养基,并在常氧(21%O₂)或缺氧(1%O₂)条件下置于37℃培养。CoCl₂(终浓度0.1 mmol/L)和DMOG(终浓度0.5 mmol/L)处理则是将试剂按终浓度加入到相应培养基。

1.2.2 分离细胞组分 按照线粒体提取试剂盒说明书操作,提取细胞完整线粒体;加入裂解液后超声破碎获得线粒体蛋白;收集细胞加入蛋白提取试剂后通过超声破碎仪(宁波新芝)提取全蛋白。

1.2.3 Western blot检测 HeLa 细胞常氧、缺氧下 HIF-3 α 在线粒体中的表达 采用Western blot检测HeLa细胞在常氧(0 h)及缺氧(4 h、8 h、16 h、24 h)下HIF-3 α 在线粒体中的表达情况。取生长良好的HeLa细胞接种于T75培养瓶。当细胞密度达到90%~100%,按1.2.1条件常氧或缺氧处理细胞,按1.2.2方法分离获取细胞全蛋白和线粒体蛋白。蛋白样品通过恒压80 V电泳分开后,通过恒流300 mA,2 h将蛋白条带转移到活化的PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭蛋白条带,然后分别孵育一抗和相应二抗(抗体滴度参照说明书),采用化学

发光法通过显色液进行蛋白条带显色,用凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值。线粒体 HIF-3 α 的相对表达以 TOMM34 为内参照,细胞全蛋白中细胞质 HIF-3 α 的相对表达以 GAPDH 为内参照,细胞核 HIF-3 α 的相对表达以 PCNA 为内参照,以 HIF-3 α /内参照灰度值的比值为 HIF-3 α 蛋白的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 CoCl₂ 和 DMOG 模拟缺氧对 HIF-3 α 在线粒体中表达的影响 同 1.2.3 取生长良好的 HeLa 细胞接种于 T75 培养瓶,当细胞密度达到 90%~100%,按 1.2.1 用 CoCl₂ 和 DMOG 模拟缺氧条件处理细胞。前者的二价钴离子可置换脯氨酸羟化酶(PHD)辅助因子二价铁离子,阻止 HIF- α 被羟基化,并影响 PHD 与 HIF- α 的氧依赖型降解域(ODD)域结合,从而促进 HIF- α 的稳定^[17];后者可抑制 PHD 的活性从而稳定 HIF- α 的表达^[18]。CoCl₂ 和 DMOG 处理细胞 4 h 后同 1.2.3 检测线粒体 HIF-3 α 的表达(在 CoCl₂ 处理组,线粒体 HIF-3 α 的相对表达以 β -tubulin 为内参照)。

1.2.5 免疫荧光染色观察 HIF-3 α 定位 HeLa 细胞在常氧和缺氧 16 h,CoCl₂(终浓度 0.1 mmol/L)和 DMOG(终浓度 0.5 mmol/L)处理 4 h 后用体积分数为 4%多聚甲醛固定,0.1% Triton X-100 通透后,1%BSA 在 37 °C 下封闭 30 min,用 HIF-3 α 抗体、Gp75(主要存在于细胞线粒体的分子伴侣)抗体混合液 4 °C 过夜孵育,然后用山羊抗小鼠 IgG 和驴抗兔 IgG 二抗(抗体滴度参照说明书)混合液孵育 1 h,DAPI 染色后封片。使用共聚焦显微镜(Nikon)观察 HIF-3 α 与线粒体的共定位。

1.2.6 HIF-3 α 在 ACHN 细胞线粒体中的表达及定位 为探究 HIF-3 α 在线粒体定位是否为 HeLa 细胞中特有的现象,我们选取了另一种肾癌细胞系 ACHN 细胞进行验证。ACHN 细胞在常氧(0 h)及缺氧(30 h)下,以及用 CoCl₂(终浓度 0.1 mmol/L)和 DMOG(终浓度 0.5 mmol/L)模拟缺氧条件处理细胞 4 h,分别同上方方法用 Western blot 检测线粒体 HIF-3 α 的表达和免疫荧光染色观察 HIF-3 α 定位。

1.2.7 蛋白酶敏感性实验检测 HIF-3 α 在线粒体的亚结构定位 线粒体可分为 4 个亚结构:外膜、内膜、膜间隙和基质,线粒体蛋白所处的亚结构与其功能直接相关。为探究 HIF-3 α 在线粒体的亚结构定位,我们采用了经典的酶敏感性实验。该实验中,线粒体外膜蛋白会被蛋白酶 K 降解,而膜内蛋白只有

在加入洗涤剂后才能被蛋白酶 K 降解^[19]。提取常氧或缺氧 16 h 处理后 HeLa 细胞的完整线粒体,并各均分成 3 组:未处理组、蛋白酶 K 处理组和蛋白酶 K 和 10% Triton 处理组。除未处理组外其它 2 组需在室温下孵育 10~15 min,然后收集沉淀提取线粒体蛋白,用 Western blot 检测。

1.2.8 正常小鼠各器官组织及人肝癌组织线粒体 HIF-3 α 的表达 以往的研究往往关注 HIF-3 α 对转录的调控,对定位线粒体的 HIF-3 α 知之甚少,对其临床意义也尚不明确。为探究 HIF-3 α 定位至线粒体的生理及病理意义,我们在正常小鼠及人肝癌组织中进行了检测。常规提取 C57 小鼠各器官组织(包括心、肝、脾、肺、肾、脑组织)及人肝癌组织的总蛋白及线粒体蛋白,用 Western blot 检测 HIF-3 α 在线粒体和组织全蛋白中的表达。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 常氧及缺氧下 HIF-3 α 在 HeLa 细胞线粒体中的表达及定位

Western blot 结果显示,HeLa 细胞在常氧及缺氧下线粒体中均有 HIF-3 α 表达,且在缺氧 16 h 和 24 h 后其在线粒体的表达增加($P < 0.001$,图 1A)。而在全蛋白中,HIF-3 α 在常氧及缺氧条件下也均有表达,且缺氧 16 h 和 24 h 后其全蛋白中的表达也增加。

为进一步验证该现象,用 CoCl₂ 和 DMOG 模拟缺氧条件,结果显示:CoCl₂ 和 DMOG 处理 HeLa 细胞 4 h 后,HIF-3 α 在线粒体及全蛋白中表达增加(图 1B、图 1C)。

免疫荧光染色结果(图 2)显示,常氧下,HIF-3 α 在细胞核中表达,同时也在线粒体表达,即 HIF-3 α 与线粒体共定位,且缺氧 16 h,或 CoCl₂/DMOG 处理 4 h 后,线粒体出现核周聚集,HIF-3 α 与线粒体的共定位显著增加。提示:常氧下 HIF-3 α 可定位至线粒体,缺氧进一步促进其线粒体定位。

2.2 常氧及缺氧下 HIF-3 α 在 ACHN 细胞线粒体中的表达及定位

Western blot 结果显示,ACHN 细胞中,HIF-3 α 在常氧(0 h)及缺氧(30 h)条件下也在线粒体和全蛋白表达,且缺氧后其线粒体表达增加(图 3A)。

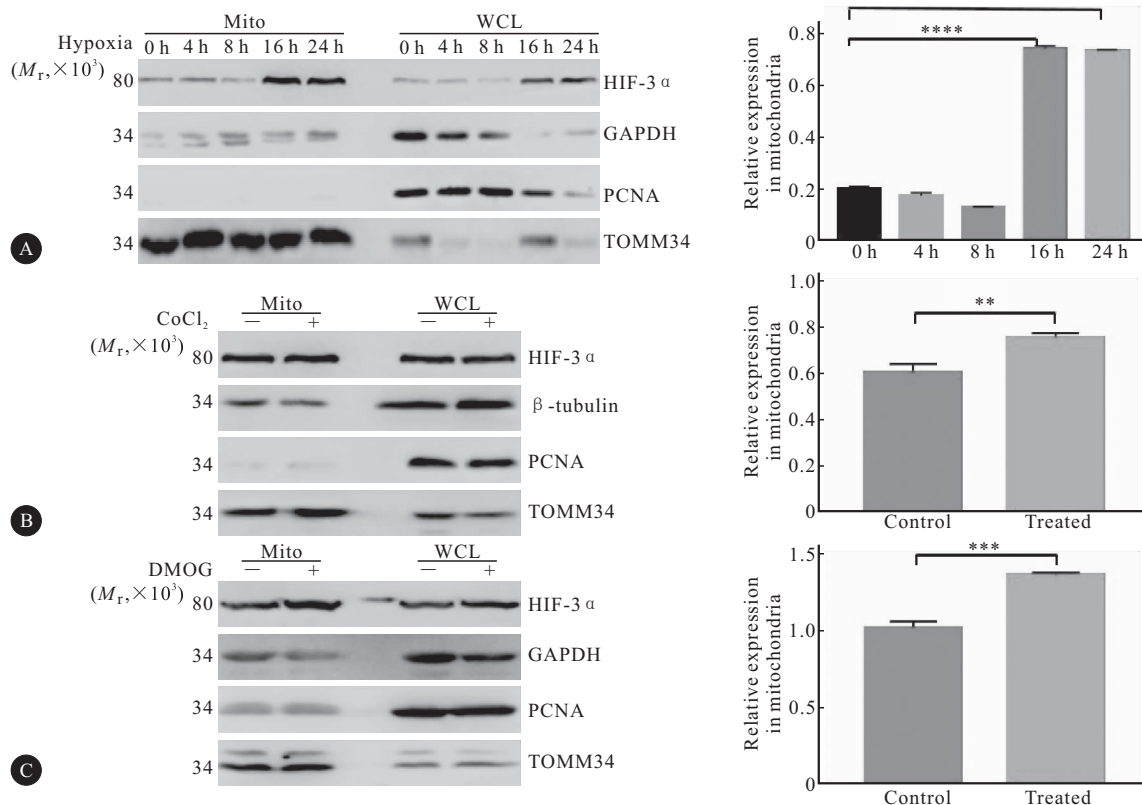


图 1 HIF-3 α 在 HeLa 细胞线粒体中的表达

Fig 1 HIF-3 α expressed in HeLa mitochondria

Mito: Mitochondrial protein; WCL: Whole cell lysate. A: Normoxia (0 h) and hypoxia (4 h, 8 h, 16 h, 24 h); B: CoCl₂ treated for 4 h; C: DMOG treated for 4 h. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

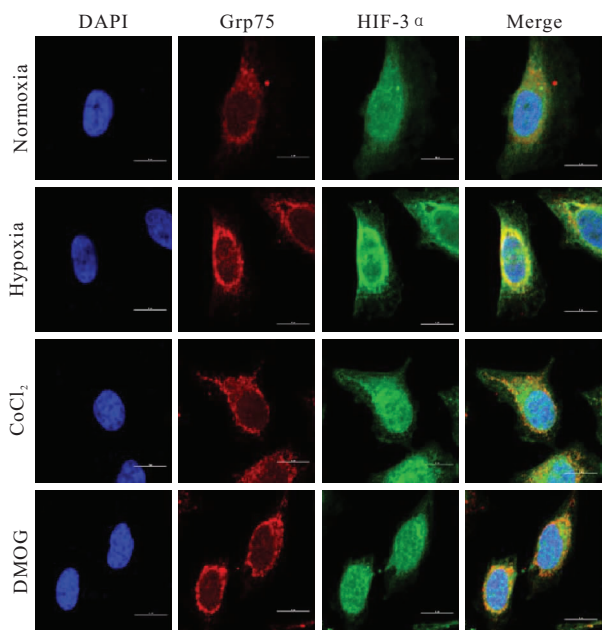


图 2 HeLa 细胞中 HIF-3 α 与线粒体共定位的免疫荧光染色。×600

Fig 2 HIF-3 α co-located with mitochondria in HeLa with normoxia, hypoxia (16 h) or CoCl₂/DMOG treatment (4 h). ×600

免疫荧光染色检测到与 HeLa 细胞相似结果(图 3B)。此外,使用 CoCl₂ 或 DMOG 处理后同样可增加 ACHN 细胞中 mtHIF-3 α 的定位(图 3B)。

2.3 蛋白酶敏感性实验检测 HIF-3 α 在线粒体的亚结构定位

结果(图 4)显示,HeLa 细胞常氧或缺氧 16 h 处理后提取完整线粒体,在加入蛋白酶 K 后,HIF-3 α 和其它线粒体外膜蛋白如 Bcl-X_L、TOMM34 等均未检测到,而内膜蛋白、膜间隙蛋白或基质蛋白仍可以检测到,如 TIMM17A、Cyt-C 等,提示 HIF-3 α 在常氧或缺氧条件下可能定位至线粒体外膜。

2.4 正常小鼠各器官组织及人肝癌组织线粒体 HIF-3 α 的表达

Western blot 结果显示,在正常小鼠的肝、脾、肺、肾、脑组织中均有 mtHIF-3 α 表达,但在心脏组织未检测到 mtHIF-3 α 表达(图 5A),提示 HIF-3 α 的线粒体定位现象具有组织特异性。

在人肝癌组织中,mtHIF-3 α 的表达相较于正常及癌旁组织明显增多(图 5B)。

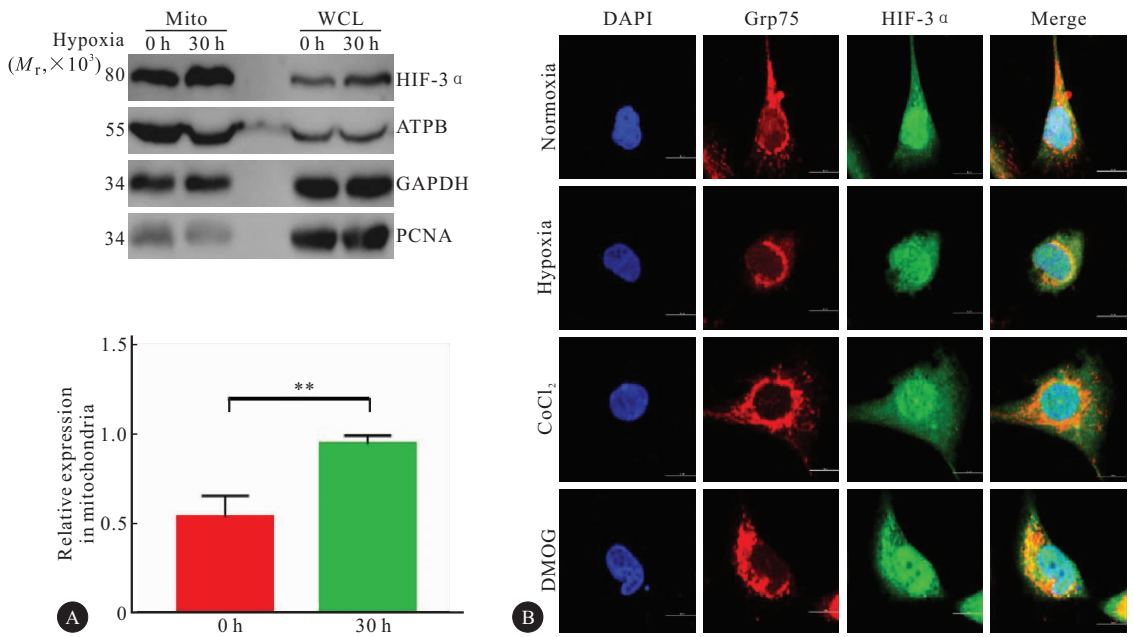


图 3 HIF-3 α 在 ACHN 细胞线粒体中的表达及定位

Fig 3 HIF-3 α expressed in ACHN mitochondria

Mito: Mitochondrial protein; WCL: Whole cell lysate. A: Normoxia (0 h) and hypoxia (30 h). * * $P < 0.01$; B: HIF-3 α co-located with mitochondria in ACHN with normoxia, hypoxia (30 h) or $\text{CoCl}_2/\text{DMOG}$ treatment (4 h). $\times 600$

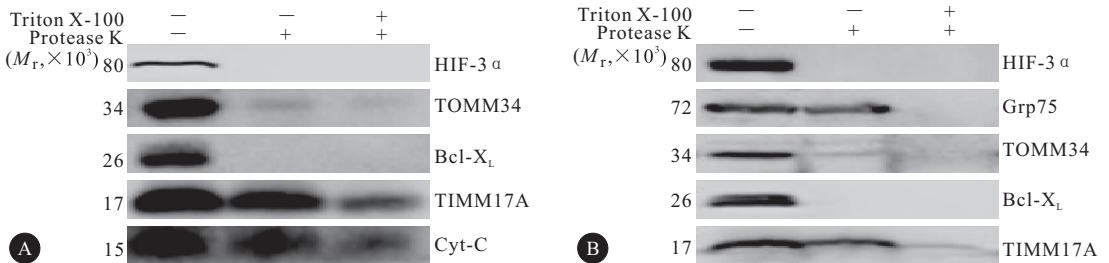


图 4 HIF-3 α 在线粒体的亚结构定位

Fig 4 Substructural localization in mitochondria of HIF-3 α

A: Normoxia; B: Hypoxia (16 h)

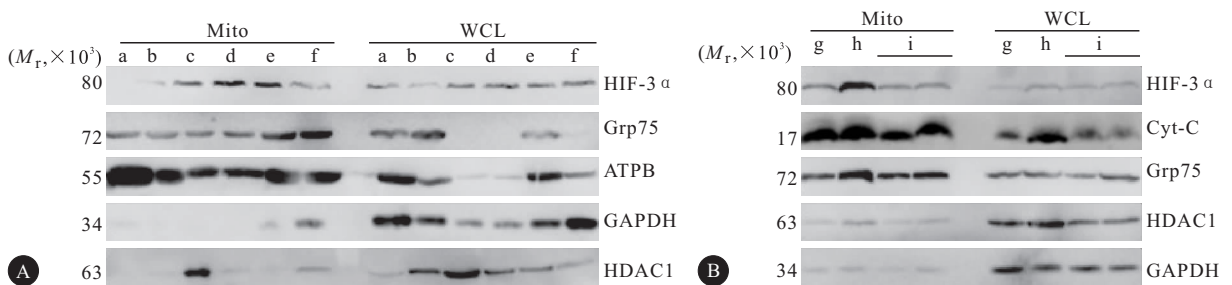


图 5 HIF-3 α 在小鼠不同器官组织及人肝癌组织的线粒体中表达

Fig 5 HIF-3 α expressed in mouse tissues and human liver carcinoma mitochondria

A: Normal mouse tissues; B: Human liver tissues; Mito: Mitochondrial proteins; WCL: Whole cell lysate. a: Heart; b: Liver; c: Spleen; d: Lung; e: Kidney; f: Brain; g: Normal liver; h: Liver carcinoma; i: Tissues adjacent to cancer; GAPDH were used as cytosolic markers, HDAC1 as nuclear markers, Grp75, ATPB and Cyt-C as mitochondrial markers

3 讨论

HIFs 是一类重要的转录因子,在低氧适应反应中发挥重要作用。众所周知,HIF- α s 在低氧条件下稳定并进入细胞核,与 HIF-1 β 形成异质二聚体,并调控其靶基因表达。但有研究报道 HIF-3 α 在胞质中的定位,如 HEIKKILA 等^[6]研究发现在仓鼠卵巢巢细胞 Chok1 细胞中,HIF-3 α 4 定位至胞质和核周,且在低氧条件下并不会转运至细胞核;大鼠肝细胞中,免疫荧光染色显示:HIF-3 α 在常氧下定位至细胞核,而在缺氧再复氧后从细胞核转运至过氧化物酶体,并可能影响到肝脏的氧化还原微环境^[20];在大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 细胞中,IPAS 可定位至线粒体并促进凋亡^[13]。本研究利用线粒体分离试剂盒提取得到纯度较高的线粒体,并通过 Western blot 检测了 HIF-3 α 在线粒体中的表达情况,结果发现:HIF-3 α 在常氧及缺氧条件下确实定位线粒体,缺氧可诱导其线粒体表达增加。免疫荧光的结果也佐证了该结果。

本研究发现,HIF-3 α 不仅定位至细胞核(该现象与已有研究一致^[15]),还可定位线粒体。关于细胞核-线粒体双定位蛋白以往也有报道,如 APE1 和 P53 蛋白。而关于线粒体定位的机制研究大部分围绕线粒体定位序列 MTS 的检测及线粒体膜转运蛋白如 TOM 家族的协作。APE1 的 MTS 软件预测分数很低,但有研究发现它可与 TOMM20 互作定位线粒体^[21],且很可能是通过 Mia40 蛋白进入线粒体内膜^[22]。而关于 P53 定位线粒体的机制目前认为有 3 种^[23]:① P53 与 RECQL4 结合(N 端具有 MTS 序列),再通过结合 TOMM20 进而转运进入线粒体^[24];②蛋白酶识别丝氨酸内切酶序列位点,活化 P53 从而暴露 MTS 序列^[25];③ CHCHD4 蛋白作为导入受体,共价结合 P53 的二硫键从而穿越线粒体外膜^[26-27]。目前已知 IPAS 蛋白的相对分子质量约为 60×10^3 ,而本研究检测到的 HIF-3 α 相对分子质量约 80×10^3 ,因此排除 IPAS 可能,推测可能是 HIF-3 α 1、HIF-3 α 2、HIF-3 α 3、HIF-3 α 7、HIF-3 α 9。首先,我们通过 Mitoprot ii 软件对上述可能的剪切体序列进行分析,发现以上剪切体的 MTS 的预测值均较低,推测可能是通过其它机制如 TOM 家族的协作定位线粒体,后续将参考已有研究对具体机制展开研究。

现有研究显示,线粒体和 HIF-3 α 可互相调控,如 KUMAR 等^[12]研究发现,ROS 可稳定 HIF-3 α

表达。TORII 等^[13]研究报道:PC12 细胞中,IPAS 与线粒体共定位,并诱导线粒体去极化,线粒体核周聚集,Cyt-C 释放,caspase 3 通路活化,最终导致细胞凋亡。本研究发现,在缺氧或用 $\text{CoCl}_2/\text{DMOG}$ 处理后,线粒体出现核周聚集现象,而该现象是凋亡的标志之一^[28-29]。因此我们推测:本研究发现的 mtHIF-3 α 可能同样通过调控线粒体功能影响细胞凋亡。已有研究发现 HIF-3 α 可作为转录因子调控其靶基因的功能^[3, 30-31],因此不排除 HIF-3 α 也可作为转录因子调控线粒体基因的可能。

HIF-3 α 广泛表达于人和动物体内,其 mRNA 主要在心脏、肺组织中表达,而在肝脏和肾脏组织中表达量较低^[7]。本研究发现:HIF-3 α 在小鼠不同组织的线粒体及全蛋白中的表达情况存在差异,而关于 HIF-3 α 在其它组织中表达的研究报道也有很多,如:ZOLK 等^[32]发现 HIF-3 α mRNA 在心脏衰竭患者的心脏中的表达高于正常组;HIF-3 α 的开放阅读框在成人的胸腺、肺、脑、心脏、肾脏中表达,在脾、肝、胃中不表达^[2]。HIF 蛋白表达受低氧诱导,且调控过程主要发生在转录后阶段,而低氧诱导的转录后调控在心脏中只维持几分钟^[32],而线粒体蛋白提取过程需要一定时间,这可能是 mtHIF-3 α 在心脏中未检测到的原因之一。

已有研究报道 HIF-3 α 与肝脏疾病及肝癌相关。HIF-3 α 在多发肝囊肿中表现出不正常的表达^[33]。MAKINO 等^[3]研究发现,过表达 IPAS 的肝细胞癌细胞生长速度慢于对照组。杨盛力等^[34]研究发现 HIF-3 α 在肝癌组织中表达高于正常肝组织,且其表达主要位于细胞胞浆。张晓岚等^[35]研究发现肝动脉插管化疗栓塞治疗可增强肝脏栓塞周围组织 HIF-3 α 的表达,且 HIF-3 α 可能与肝癌患者肿瘤直径、TNM 分期有关,HIF-3 α 可作为评估肿瘤进展的标志分子。因此,本研究选取了人肝癌组织探究 mtHIF-3 α 的表达是否与其有关。结果发现 HIF-3 α 在肝癌组织中表达较高,这与已有研究一致,且在肝癌线粒体中的表达较正常及癌旁组织中线粒体高,提示 mtHIF-3 α 可能参与肝癌的发生发展,这可能为肝癌的诊断及治疗提供新的思路与靶点。

参 考 文 献

- [1] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci Stke*, 2007, 2007 (407): cm8 [2019-01-12]. <https://stke.sciencemag.org/content/2007/407/cm8>. doi:

- 10.1126/stke.4072007cm8.
- [2] GU Y Z, MORAN S M, HOGENESCH J B, *et al.* Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*,1998,7(3):205-213.
- [3] MAKINO Y, CAO R, SVENSSON K, *et al.* Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*,2001,414(6863):550-554.
- [4] YAMASHITA T, OHNEDA O, NAGANO M, *et al.* Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Mol Cell Biol*,2008,28(4):1285-1297.
- [5] HARA S, HAMADA J, KOBAYASHI C, *et al.* Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001,287(4):808-813.
- [6] HEIKKILA M, PASANEN A, KIVIRIKKO K I, *et al.* Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci*,2011,68(23):3885-3901.
- [7] MAYNARD M A, QI H, CHUNG J, *et al.* Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 2003,278(13):11032-11040.
- [8] MAYNARD M A, EVANS A J, HOSOMI T, *et al.* Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J*, 2005, 19(11):1396-1406.
- [9] MAYNARD M A, EVANS A J, SHI W, *et al.* Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle*,2007,6(22):2810-2816.
- [10] ZHANG P, YAO Q, LU L, *et al.* Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep*, 2014,6(6):1110-1121.
- [11] SNYDER C M, CHANDEL N S. Mitochondrial regulation of cell survival and death during low-oxygen conditions. *Antioxid Redox Signal*,2009,11(11):2673-2683.
- [12] KUMAR H, LIM J H, KIM I S, *et al.* Differential regulation of HIF-3alpha in LPS-induced BV-2 microglial cells: comparison and characterization with HIF-1alpha. *Brain Res*, 2015, 1610: 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.03.046>.
- [13] TORII S, GOTO Y, ISHIZAWA T, *et al.* Pro-apoptotic activity of inhibitory PAS domain protein (IPAS), a negative regulator of HIF-1, through binding to pro-survival Bcl-2 family proteins. *Cell Death Differ*,2011,18(11):1711-1725.
- [14] XUE X, JUNGLES K, ONDER G, *et al.* HIF-3alpha1 promotes colorectal tumor cell growth by activation of JAK-STAT3 signaling. *Oncotarget*,2016,7(10):11567-11579.
- [15] TANAKA T, WIESENER M, BERNHARDT W, *et al.* The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem J*,2009,424(1):143-151.
- [16] LI H S, ZHOU Y N, LI L, *et al.* HIF-1alpha protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox Biol*, 2019; 101109 [2019-01-12]. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101109>.
- [17] YUAN Y, HILLIARD G, FERGUSON T, *et al.* Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem*,2003,278(18):15911-15916.
- [18] BISHOP T, RATCLIFFE P J. HIF hydroxylase pathways in cardiovascular physiology and medicine. *Circ Res*,2015,117(1):65-79.
- [19] LORENZ H, HAILEY D W, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Fluorescence protease protection of GFP chimeras to reveal protein topology and subcellular localization. *Nat Methods*, 2006,3(3):205-210.
- [20] KHAN Z, MICHALOPOULOS G K, STOLZ D B. Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia-inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Pathol*,2006,169(4):1251-1269.
- [21] LI M, ZHONG Z, ZHU J, *et al.* Identification and characterization of mitochondrial targeting sequence of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *J Biol Chem*,2010,285(20):14871-14881.
- [22] BARCHIESI A, WASILEWSKI M, CHACINSKA A, *et al.* Mitochondrial translocation of APE1 relies on the MIA pathway. *Nucleic Acids Res*,2015,43(11):5451-5464.
- [23] PARK J H, ZHUANG J, LI J, *et al.* p53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS Lett*,2016,590(7):924-934.
- [24] DE S, KUMARI J, MUDGAL R, *et al.* RECQL4 is essential for the transport of p53 to mitochondria in normal human cells in the absence of exogenous stress. *J Cell Sci*, 2012,125(Pt 10):2509-2522.
- [25] BOOPATHI E, SRINIVASAN S, FANG J K, *et al.* Bimodal protein targeting through activation of cryptic mitochondrial targeting signals by an inducible cytosolic endoprotease. *Mol Cell*,2008,32(1):32-42.
- [26] RIEMER J, FISCHER M, HERRMANN J M. Oxidation-driven protein import into mitochondria: Insights and blind spots. *Biochim Biophys Acta*,2011,1808(3):981-989.
- [27] ZHUANG J, WANG P Y, HUANG X, *et al.* Mitochondrial disulfide relay mediates translocation of p53 and partitions its subcellular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(43):17356-17361.
- [28] PUCCI B, BERTANI F, KARPINICH N O, *et al.* Detailing the role of Bax translocation, cytochrome c release, and perinuclear clustering of the mitochondria in the killing of

- HeLa cells by TNF. *J Cell Physiol*,2008,217(2):442-449.
- [29] KASAI S, RICHARDSON M J E, TORII S, *et al.* Increase in proapoptotic activity of inhibitory PAS domain protein via phosphorylation by MK2. *Febs J*,2017,284(23):4115-4127.
- [30] HAASE V H. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev*,2013,27(1):41-53.
- [31] AIRLEY R E, MOBASHERI A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*,2007,53(4):233-256.
- [32] ZOLK O, SOLBACH T F, ESCHENHAGEN T, *et al.* Activation of negative regulators of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in human end-stage heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*,2008,376(2):315-320.
- [33] YOSHIDA T, KUWAHARA M, MAITA K, *et al.* Immunohistochemical study on hypoxia in spontaneous polycystic liver and kidney disease in rats. *Exp Toxicol Pathol*,2001,53(2/3):123-128.
- [34] 杨盛力, 陈孝平, 张万广, 等. HIF-3 α 在肝癌组织中的表达及临床意义. *肝胆外科杂志*,2008,16(3):229-231.
- [35] 张晓岚, 龚卉. 肝动脉插管化疗栓塞后肝癌 HIF3 α 的表达与患者临床病理特征及新生微血管密度的相关性. *浙江医学*, 2016,38(12):936-939.

(2019-03-19 收稿, 2019-07-01 修回)

编辑 沈进

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖,首届国家期刊奖提名奖,第二、三届全国期刊奖百种重点期刊,四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2016年度中国高校百佳科技期刊,2016中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS, BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS, CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。

本刊在线投稿网址:<http://scdx.cnjournals.com>

地址:四川省成都市人民南路三段17号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部