

# 缺氧诱导因子及其抑制因子调控肾癌细胞生长的实验研究<sup>\*</sup>

邓 实, 杨 博, 任正举, 董 强<sup>△</sup>

四川大学华西医院 泌尿外科 泌尿外科研究所(成都 610041)

**【摘要】** 目的 检测缺氧诱导因子抑制因子(FIH-1)在肾癌细胞中的基因和蛋白表达情况,以进一步了解FIH-1对肾癌细胞生长调控的机制。**方法** 选取人肾癌细胞株786-0及OS-RC-2,运用real-time PCR(RT-PCR)和Western blot方法检测细胞株中FIH-1、缺氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、缺氧诱导因子2 $\alpha$ (HIF-2 $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平。并人工构建FIH-1过表达质粒,将其转入上述的两种细胞株中,运用RT-PCR和Western blot方法观察转染后FIH-1、HIF及VEGF的表达情况;同时运用MTT方法分析转染后两种肿瘤细胞的增殖情况。**结果** RT-PCR和Western blot检测结果都显示,786-0和OS-RC-2细胞中都能检测到FIH-1和VEGF的表达;OS-RC-2细胞中同时存在HIF-1 $\alpha$ 和HIF-2 $\alpha$ 表达,而786-0细胞中只有HIF-2 $\alpha$ 的表达;786-0细胞中FIH-1表达比OS-RC-2细胞高,VEGF的表达比OS-RC-2低;转染FIH-1过表达质粒后,OS-RC-2细胞内的FIH-1表达量明显升高,下游蛋白HIF-1 $\alpha$ 的表达量降低,VEGF的表达量也降低,而HIF-2 $\alpha$ 的表达量前后不变;在786-0细胞内的FIH-1表达量明显升高时,HIF-2 $\alpha$ 的表达量不变,VEGF的表达量也不变。在OS-RC-2细胞中,转染FIH-1过表达质粒后细胞的增殖变缓,而786-0细胞的增殖则没有明显的变化。**结论** 在肾癌细胞中存在FIH-1/HIF-1 $\alpha$ /VEGF信号通路,FIH-1反向调节HIF-1 $\alpha$ 的表达,HIF-1 $\alpha$ 正向调节VEGF的表达。在HIF-1 $\alpha$ 及HIF-2 $\alpha$ 都存在时,FIH-1可通过对HIF-1 $\alpha$ 调控影响HIF-1 $\alpha$ 下游基因表达,抑制肾癌细胞的增殖。

**【关键词】** 肾细胞癌 缺氧诱导因子抑制因子 缺氧诱导因子 RNA干扰

**Growth Regulation of Factor Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor in Renal Carcinoma Cells** DENG Shi, YANG Bo, REN Zheng-ju, DONG Qiang<sup>△</sup>. Department of Urology, Institute of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: dongqianghxi@163.com

**【Abstract】** **Objective** To detect the expression and growth regulation effects of the factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH-1) in renal carcinoma cells. **Methods** The expressions of FIH-1, hypoxia inducible factor (HIF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were examined in OS-RC-2 and 786-0 cell lines via real-time PCR (RT-PCR) and Western blot. Overexpression plasmid of FIH-1 were designed and constructed as EX-V1104-M45-FIH-1. After the transfection of the plasmid into OS-RC-2 and 786-0 cells, the expression levels of FIH-1, HIF and VEGF were measured by RT-PCR and Western blot, while cell proliferation was tested by MTT. **Results** The expressions of FIH-1, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and VEGF were detected in OS-RC-2 cells, and FIH-1, HIF-2 $\alpha$  and VEGF were detected in 786-0 cells. After the transfection of EX-V1104-M45-FIH-1, the level of FIH-1 was increased in OS-RC-2, while the levels of HIF-2 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  and VEGF were decreased. MTT showed that FIH-1 plasmid transfection decreased the cell proliferation of OS-RC-2, but did not show inhibition on 786-0 cells proliferation. **Conclusion** FIH-1/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway exists in renal carcinoma cell lines.

**【Key words】** Renal cell carcinoma Factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 Hypoxia inducible factor RNA interference

Von-Hippel-Lindau 基因(VHL)是目前肿瘤领域方面研究较为成熟的抑癌基因,其表达缺失是大多数肾癌中一个共同的遗传学改变<sup>[1-2]</sup>。VHL表达的失活在肾透明细胞癌中主要表现为缺氧诱导

因子(HIF)的过量表达。作为稳定肾癌细胞并发挥其侵袭能力的重要蛋白<sup>[3]</sup>,HIF在细胞氧含量正常时主要受到两种调节机制的影响,即脯氨酰羟化结构域酶类(PHD)对HIF-1 $\alpha$ 的氨基末端转录激活结构域中特殊脯氨酸残基可羟基化<sup>[4]</sup>和缺氧诱导因子抑制因子(FIH-1)所介导的细胞信号通路<sup>[5]</sup>。目前针对FIH-1为靶点的研究还较为缺乏,为进一步明确FIH-1在肾透明细胞癌中的作用,本研究运用real-

<sup>\*</sup> 四川省科技厅科研课题(No. 2014SZ0210、No. 2017SZ0149)、四川省卫生厅科研课题(No. YN20140030)和四川省中医药管理局课题(No. 2016Q042)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: dongqianghxi@163.com

time PCR(RT-PCR)和 Western blot 方法,对人肾癌细胞株 786-0 及 OS-RC-2 中的 *FIH-1*、*HIF*、血管内皮生长因子(VEGF)在基因转录及蛋白表达进行检测。并构建了 *FIH-1* 过表达质粒,将其转染 OS-RC-2 细胞及 786-0 细胞,观察 *FIH-1*、*HIF*、VEGF 在 mRNA 水平和蛋白水平上的表达是否有改变,进一步观察过表达 *FIH-1* 后对肾癌细胞增殖的影响程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人肾透明细胞腺癌细胞 786-0 和人肾癌细胞 OS-RC-2 源自 ATCC;细胞培养液 DMEM、胎牛血清(FBS)、胰酶消化液购自 Gibco BRL;转染试剂 Lipofectamine 2000、总 RNA 提取试剂(Trizol Reagent,15596026)购自 Invitrogen;反转录试剂盒(iScriptcDNA Synthesis Kit,170-8891)和 RT-PCR 荧光定量试剂盒(Sso Advanced SYBR Green Supermix,172-5260)购自 Bio-Rad;*HIF-1 $\alpha$*  抗体 sc-10790、*HIF-2 $\alpha$* (EPAS-1)抗体 sc-32146、*FIH-1* 抗体 sc-48813 和 VEGF 抗体 sc-507 购自 Santa Cruz;小鼠抗人 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司 ECL 显色试剂盒和 PVDF 膜购自 Millpore;蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵、甘氨酸、TEMED 和蛋白酶抑制剂 cocktail 购自 Sigma 公司;其他化学试剂为进口或国产分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞复苏与培养** 从液氮中取出冻存保种的 786-0 细胞和 OS-RC-2,2~3 d 传代 1 次。取处于对数生长期状态良好的细胞进行保种。待细胞长至 90%左右时,将细胞悬液吸取到无菌离心管中,1 000 r/min 离心 3 min,去掉上清,PBS 重悬清洗 3 次。收集的细胞装入培养瓶(底面积 75 cm<sup>2</sup>),置 -20 °C 冻存待用。

**1.2.2 Western blot 检测细胞中 *FIH-1*、*HIF* 和 VEGF 蛋白的表达** 将收集好的细胞,每瓶细胞用 50  $\mu$ L RIPA 裂解液裂解,同时加入蛋白酶抑制剂 cocktail(体积比,RIPA:cocktail=100:1),吹打混匀。裂解混合物于 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min。吸取上清于新的离心管中,-80 °C 保存备用。采用蛋白定量试剂盒测定蛋白样品浓度(Bradford 法)。通过 SDS-PAGE 电泳、转膜,封闭,信号放大与曝光显影测定相关蛋白的表达。*FIH-1*、*HIF-1 $\alpha$* 、

*HIF-2 $\alpha$* 、VEGF 和 GAPDH(内参)一抗稀释度均为 1:1 000。碱性磷酸二抗稀释度为 1:10 000。定性比较组间蛋白的条带浓度,代表表达量的高低。

**1.2.3 RT-PCR 检测细胞中 *FIH-1*、*HIF* 和 VEGF 基因的表达** 按照总 RNA 提取试剂说明分别提取 786-0 和 OS-RC-2 细胞总 RNA。

在 NCBI 数据库中查询人 *FIH-1*、*HIF-1 $\alpha$* 、*HIF-2 $\alpha$* 、VEGF 和 GAPDH 的 mRNA 序列,设计 RT-PCR 引物,所有引物由 Invitrogen 公司合成,具体序列:人 *FIH-1* 上游引物 5'-AACTGGGCCT ACAAGCTCAA-3',下游引物 5'-CTTGCACCCC TAGTGTGGAT-3';人 *HIF-1 $\alpha$*  上游引物 5'-CGG CGGAACGACAAGAAAAAGAT-3',下游引物 5'-TCGTTGGGTGAGGGGAGCATTACA-3';人 *HIF-2 $\alpha$*  上游引物 5'-GGATCAGCGCACAGAGT TC-3',下游引物 5'-GTACTGGGTGGCGTAGCA CT-3';人 VEGF 上游引物 5'-ACACATTGTTGG AAGAAGCAGCCC-3',下游引物 5'-AGGAAGG TCAACCACTCACACACA-3';人 GAPDH 上游引物 5'-TGGAAGGACTCATGACC ACA-3',下游引物 5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'。

PCR 扩增循环参数:95 °C 2 min 预变性 95 °C 10 s 变性,反应 40 个循环,60 °C 30 s 退火延伸。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因的相对表达量。

**1.2.4 *FIH-1* 过表达质粒构肾癌细胞生长的调控**

**1.2.4.1 *FIH-1* 过表达质粒的构建及验证** 载体 EX-V1104-M45,由广州复能基因有限公司提供,插入 *FIH-1* 序列的开放阅读框(ORF),以表达 *FIH-1* mRNA 并翻译为 *FIH-1* 蛋白,基因编码号 NM\_017902.2,质粒由广州复能基因有限公司构建。使用 Lipofectamine 2000 作为转染试剂转染 OS-RC-2 细胞。转染前 1 d,接种适当数量的细胞(约 4 $\times$ 10<sup>5</sup>)至 6 孔板中,每孔加入完全培养基 DMEM 2 mL,使转染时细胞密度为 70%~80%。在细胞生长到 80%融合度时,分别进行空载体和载体质粒的转染。具体转染体系参照说明书进行。以转染空载体的 OS-RC-2 细胞为对照组,转染 24 h、48 h、72 h 后,通过 Western blot 检测细胞中 *FIH-1* 蛋白的表达量,以表达量最高的时点作为后续实验检测时间。

**1.2.4.2 转染后细胞中 *FIH-1* 及下游相关蛋白的检测** 以 1.2.4.1 中选择的时间为正式实验转染时间。转染前 1 d,接种适当数量的细胞(约 4 $\times$ 10<sup>5</sup>)至 6 孔板中,每孔加入完全培养基 DMEM 2 mL,使转染时的细胞密度为 70%~80%。在细胞生长到

80%融合度时,分别进行空载体和载体质粒的转染。具体转染体系参照说明书进行。转染结束后,同时收集未处理的 OS-RC-2 和 786-0 细胞、转染 EX-V1104-M45 空载体后的两种细胞、转染 EX-V1104-M45-*FIH-1* 后的两种细胞,参照 1.2.2 和 1.2.3 分别进行 Western blot 和 Real-time PCR 检测。

**1.2.5 MTT 检测细胞的增殖** 收集转染 EX-V1104-M45-*FIH-1* 一定时间后的 OS-RC-2 细胞和 786-0 细胞,均以转染 EX-V1104-M45 空载体的细胞为相应对照组,调整细胞悬液浓度,使 96 孔板每孔的细胞个数为  $5 \times 10^3$ ,每孔加入 200  $\mu$ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养基,边缘孔用无菌 PBS 填充,于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中分别培养 24 h、48 h、72 h,倒置显微镜下观察细胞生长状态;每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h;终止培养,每孔加入 50  $\mu$ L 20% SDS,37  $^{\circ}$ C,过夜;置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值。以处理组吸光值与对照组吸光值比值的百分比计算细胞增殖率。

1.3 统计学方法

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  两组比较采用 *t* 检验,多组间的差异通过单因素方差分析和 LSD-*t* 检验进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾癌细胞系 786-0 和 OS-RC-2 中 *FIH-1*、*HIF-1 $\alpha$*  和 *VEGF* 的表达

Western blot 结果显示人肾癌细胞系 786-0 和 OS-RC-2 中都能检测到 *FIH-1* 的表达,OS-RC-2 细胞中同时存在 *HIF-1 $\alpha$*  和 *HIF-2 $\alpha$* ,786-0 细胞中只有 *HIF-2 $\alpha$*  的表达,没有检测到 *HIF-1 $\alpha$*  的表达,786-0 细胞中的 *FIH-1* 的表达比 OS-RC-2 细胞的高,*VEGF* 的表达量较 OS-RC-2 细胞的低(图 1)。RT-PCR 的结果和 Western blot 结果一致(图 2)。

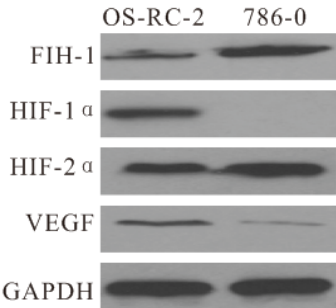


图 1 786-0 和 OS-RC-2 中相关蛋白的表达

Fig 1 Expressions of related proteins in 786-0 and OS-RC-2 cell lines

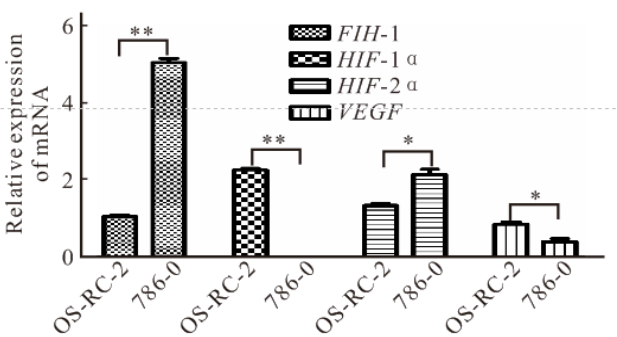


图 2 786-0 和 OS-RC-2 中相关基因 mRNA 的表达

Fig 2 Expressions of related mRNAs in 786-0 and OS-RC-2 cell lines

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2.2 构建的 *FIH-1* 过表达质粒在细胞内的验证

经过 Western blot 的验证,发现构建的 EX-V1104-M45-*FIH-1* 质粒转染入 OS-RC-2 细胞 48 h 后细胞 *FIH-1* 蛋白的表达量达到最高,与 72 h 时条带无明显区别(图 3)。故在后续实验中选择 48 h 作为质粒转染细胞后的检测时间。

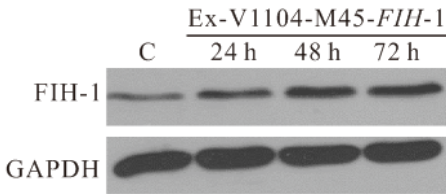


图 3 转染 *FIH-1* 过表达质粒后 OS-RC-2 细胞中 *FIH-1* 蛋白表达量

Fig 3 Expression of *FIH-1* in OS-RC-2 cells after being transfected with Ex-V1104-M45-*FIH-1*

C: Control group, transfection of blank plasmids

2.3 *FIH-1* 过表达对肾癌细胞中下游信号通路蛋白的影响

**2.3.1 *FIH-1* 过表达对 OS-RC-2 细胞相关蛋白的影响** Western blot 实验结果显示,与空白对照相比,转染 EX-V1104-M45 空载体对 *FIH-1* 的表达并没有明显的影响,下游蛋白 *HIF-1 $\alpha$*  的表达不变,*HIF-1 $\alpha$*  作用的靶标蛋白 *VEGF* 的表达也不变,而转染 EX-V1104-M45-*FIH-1* 48 h 后 OS-RC-2 细胞内的 *FIH-1* 表达量明显升高,下游蛋白 *HIF-1 $\alpha$*  的表达量降低,*HIF-1 $\alpha$*  的下游蛋白 *VEGF* 的表达量也降低,而 *HIF-2 $\alpha$*  的表达量在转染前后不变(图 4A)。RT-PCR 实验在 mRNA 水平验证了这个结果(图 5A)。

**2.3.2 *FIH-1* 过表达对 786-0 细胞相关蛋白的影响** Western blot 实验结果显示,与空白对照相比,转染 EX-V1104-M45 空载体对 *FIH-1*、*HIF-2 $\alpha$*  和

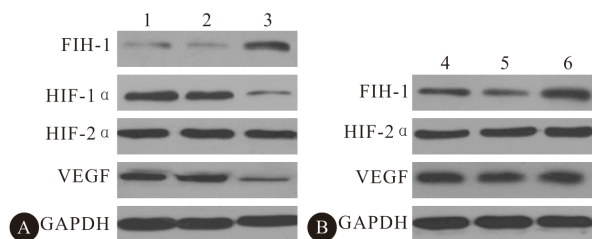


图 4 过表达 *FIH-1* 后 OS-RC-2(A)和 786-0(B)细胞内 HIF 及下游蛋白的表达变化

Fig 4 The effect of *FIH-1* overexpression plasmid on the expression level of HIF and downstream proteins in OS-RC-2 (A) and 786-0 (B) cell lines

1: OS-RC-2 cell samples unsettled; 2: OS-RC-2 cell samples after 48 h transfection of blank plasmids; 3: OS-RC-2 cell samples after 48 h transfection of EX-V1104-M45-*FIH-1*; 4: 786-0 cell samples unsettled; 5: 786-0 cell samples after 48 h transfection of blank plasmids; 6: 786-0 cell samples after 48 h transfection of EX-V1104-M45-*FIH-1*

VEGF 的表达并没有明显的影响,而转染 EX-V1104-M45-*FIH-1* 48 h 后 786-0 细胞内的 *FIH-1* 表达量明显升高, *HIF-2α* 的表达量不变, VEGF 的

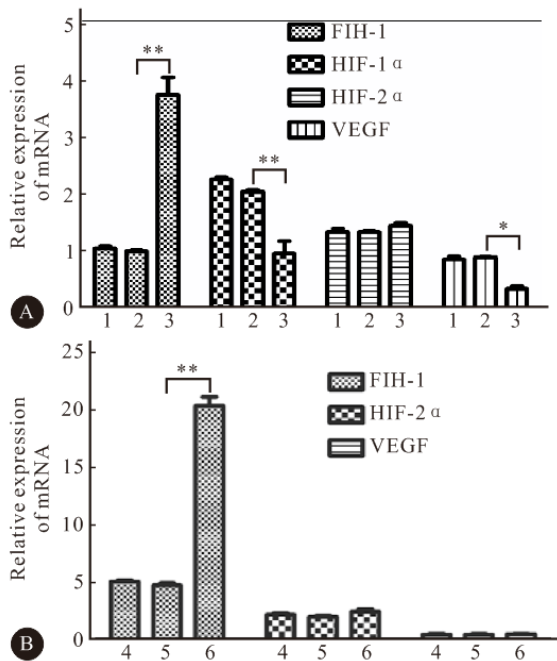


图 5 过表达 *FIH-1* 后 OS-RC-2(A)和 786-0(B)细胞内 HIF 及下游蛋白转录水平的表达变化

Fig 5 The effect of *FIH-1* overexpression plasmid on the mRNA expression levels of HIF and downstream proteins in OS-RC-2 (A) and 786-0 (B) cell lines

1-6: Denote the same as those in fig 4. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

表达量也不变(图 4B)。RT-PCR 实验在 RNA 水平验证了这个结果(图 5B)。

## 2.4 *FIH-1* 过表达对肾癌细胞增殖的印象

实验结果(图 6)显示,在 OS-RC-2 细胞中,转染 *FIH-1* 过表达质粒后,细胞的增殖减缓,且在转染后 48 h 时达到最低,这与 *FIH-1* 过表达效果在 48 h 最强的结果一致。而 786-0 细胞的增殖则没有明显的差别。

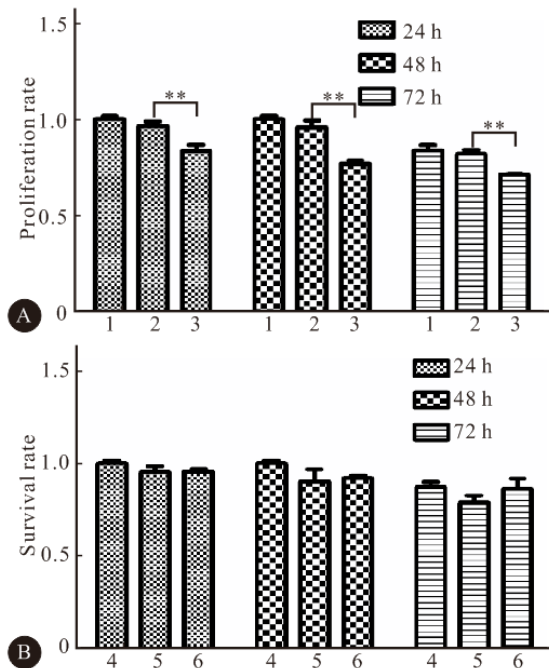


图 6 OS-RC-2 细胞(A)和 786-0(B)细胞转染 *FIH-1* 过表达质粒不同时间后的细胞增殖情况

Fig 6 The effect of *FIH-1* overexpression plasmid on the cell proliferation level after transfection in different time in OS-RC-2 (A) and 786-0 (B) cell lines

1-6: Denote the same as those in fig 4. \*  $P < 0.01$

## 3 讨论

肾细胞癌为泌尿系统常见的一种恶性肿瘤,由于肾癌细胞的自身特性决定了其对于传统的放化疗并不敏感。早期以细胞因子[如干扰素  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )]及免疫干扰[白细胞介素-2 (IL-2)]为代表的治疗手段效果欠佳,效率低,且治疗有效时间较短。虽然能改善患者部分的临床症状,但同时也会对患者造成严重的副作用。如今对于转移性肾癌的治疗已经进入了分子靶向治疗时代。目前临床医生常用的靶向治疗药物分为两大类,分别为多靶点酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)与雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂。但由于肾癌发生的分子机制较为复杂,使用其中任何一种药物所获得的治疗效果仍不满意,因此,在现

有已知的肾癌发生、发展的机制上探寻新的治疗靶点,必将为转移性肾癌患者的治疗带来新的曙光。

1992 年首次在 HeP3B 细胞中发现 HIF。通过一系列研究,人们观察到 HIF 具有影响肿瘤发生、进展的一系列生物学效应,如通过增强其下游蛋白 VEGF、GLuTI 等的表达,促进肿瘤血管生成及能量代谢等<sup>[6-7]</sup>。HIF 由  $\alpha$  与  $\beta$  两个不同的亚基所组成, $\alpha$  亚基在细胞中的水平并不稳定,在其他因素的影响之下,其含量始终处于一种动态的变化之中。较  $\alpha$  亚基而言, $\beta$  亚基则相对稳定。研究表明,只有当这两种亚基完美结合时,其结合体 HIF 才能发挥其应有的作用。因此从这个层面上而言, $\alpha$  亚基水平表达的高低直接影响了 HIF 所能产生的效应的大小<sup>[8-9]</sup>。 $\alpha$  亚基具有两个亚型,即 HIF-1 $\alpha$  与 HIF-2 $\alpha$ <sup>[10]</sup>。这两种蛋白同系物不仅具有接近 48% 的相同氨基酸序列,同样具有类似的 DNA 识别位点<sup>[11-12]</sup>。

现有的研究表明共有两种机制参与了 HIF-1 $\alpha$  的调控,即上游 PHD 与 FIH-1。当细胞内氧含量正常时,PHD 可通过使 HIF-1 $\alpha$  的氨基末端转录激活结构域的保守的脯氨酸残基(p402 与 p564)羟基化<sup>[4]</sup>,使其被 VHL 蛋白所识别,随后 HIF-1 $\alpha$  被泛素连接酶所分解<sup>[13]</sup>。与 PHD 的作用机制不同,在细胞内氧含量正常的情况下,FIH 可通过使 HIF-1 $\alpha$  的羧基末端转录激活结构域的天冬酰胺残基 Asn803 羟基化,减少其表达。由此可见,两种调节机制在抑制 HIF-1 $\alpha$  的作用方面殊出同归,第一种方式为调节其降解,而第二种方式则与抑制其转录有关。

在本研究中,我们选用两种常用的人肾癌细胞株 786-0 及 OS-RC-2,运用 RT-PCR 和 Western blot 方法对细胞株中的 FIH-1、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、VEGF 在基因转录及蛋白表达的水平上进行检测。发现人肾癌细胞株 OS-RC-2 中,FIH-1、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、VEGF 都有表达,而在人肾癌细胞株 786-0 中,只有 FIH-1、HIF-2 $\alpha$ 、VEGF 的表达。与既往文献报道一致<sup>[14]</sup>。进一步的 *FIH-1* 过表达实验表明在 OS-RC-2 细胞中,*FIH-1* 的过量表达能使 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 的表达下降,而 HIF-2 $\alpha$  基本不受影响;在 786-0 细胞中,*FIH-1* 的过量表达对 HIF-2 $\alpha$  和 VEGF 的表达则没有明显的影响。MTT 实验验证表明过表达 *FIH-1* 后,OS-RC-2 细胞增殖变缓,786-0 细胞增殖未见明显变化。这说明在 OS-RC-2 细胞中,由于 *FIH-1* 的过量表达阻止了 HIF-1 $\alpha$  的

表达,VEGF 作为 HIF-1 $\alpha$  的下游蛋白,表达量同样下降。而在 786-0 细胞中,*FIH-1* 的过量表达对其 HIF-2 $\alpha$  和 VEGF 的表达没有影响,这和 OS-RC-2 细胞系中得到的过表达结果有差异,这说明不论 *FIH-1* 的表达是升高还是降低,都不能作用于 HIF-2 $\alpha$  和 VEGF,而 786-0 细胞中没有 HIF-1 $\alpha$ ,故不存在着对 VEGF 的间接调节。

综上所述,本研究发现肾癌细胞中 FIH-1 与血管生成的重要信号调节枢纽 HIF-1 $\alpha$  之间存在关系,FIH-1 反向调节 HIF-1 $\alpha$  及其下游 VEGF 的表达。在 HIF-1 $\alpha$  及 HIF-2 $\alpha$  都存在的情况下,FIH-1 可通过对 HIF-1 $\alpha$  调控,从而对肾癌细胞产生影响。

## 参 考 文 献

- [1] GNARRA JR, TORY K, WENG Y, *et al.* Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*, 1994,7(1):85-90.
- [2] COPPIN C, PORZSOLT F, AWA A, *et al.* Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(1):CD001425.
- [3] MAXWELL PH. Oxygen homeostasis and cancer: insights from a rare disease. *Clin Med*, 2002,2(4):356-362.
- [4] EPSTEIN AC, GLEADLE JM, MCNEILL LA, *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 2001, 107(1):43-54.
- [5] KOIVUNEN P, HIRSILA M, GUNZLER V, *et al.* Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*, 2004, 279 (11): 9899-9904.
- [6] SEMENZA GL, WANG GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1992,12(12):5447-5454.
- [7] CARMELIET P, DOR Y, HERBERT JM, *et al.* Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998,394(6692):485-490.
- [8] CREWS ST. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev*, 1998, 12 (5):607-620.
- [9] HARRIS AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2002,2(1):38-47.
- [10] KHAN MN, BHATTACHARYYA T, ANDRIKOPOULOS P, *et al.* Factor inhibiting HIF (FIH-1) promotes renal cancer cell survival by protecting cells from HIF-1 $\alpha$ -mediated apoptosis. *Br J Cancer*, 2011,104(7):1151-1159.
- [11] WIESENER MS, TURLEY H, ALLEN WE, *et al.* Induction of endothelial PAS domain (下转第 58 页)

cadherin 蛋白的低表达时患者生存率明显较低,与乳腺癌的组织学分级以及淋巴结转移相关,通常认为与细胞间黏附功能紊乱等分子事件相关联<sup>[12]</sup>。我们发现 E-cadherin 蛋白阴性表达中的甲基化率为 32.5% (13/40),阳性表达中的甲基化率为 58.8% (30/51)。E-cadherin 蛋白的表达可能促进 ASPH 基因启动子甲基化。我们将继续研究 ASPH 基因在乳腺癌中的功能与机制以及钙稳态在乳腺癌发生发展中扮演的角色。对于钙离子在乳腺癌起源和进程中作用的深入了解,或许我们能够找到针对乳腺癌预防、早期诊断和治疗的有效方法。

综上所述,ASPH 基因启动子甲基化阳性率与 E-cadherin 阳性和肿瘤大小相关,这可能在乳腺癌的发生发展过程中发挥了不可低估的作用,或许可能作为乳腺癌潜在的分子标记物。

### 参 考 文 献

- [1] DOU QH, CHEN HN, WANG K, *et al.* Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res*, 2016, 76(15): 4457-4469.
- [2] 张雪梅, 李宏江, 王 达, 等. 自噬相关基因 ATG2B、ATG4D、ATG9B 在浸润性乳腺癌中的表达及临床意义. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(2): 184-188.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADDE PD, *et al.* Cancer statistics in China 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] XUE T, SU J, LI H, *et al.* Evaluation of HAAH/humbug quantitative detection in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2015, 33(1): 329-337.
- [5] LEE JH. Overexpression of humbug promotes malignant progression in human gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 2008, 19(3): 795-800.
- [6] DONG X, LIN Q, AIHARA A, *et al.* Aspartate $\beta$ -hydroxylase expression promotes a malignant pancreatic cellular phenotype. *Oncotarget*, 2015, 6(2): 1231-1248.
- [7] 王 达, 刘秋均, 张雪梅, 等. 侵袭性乳腺癌 GATA5 基因启动子甲基化的临床意义. *基础医学与临床*, 2014, 34(6): 753-756.
- [8] 魏于全, 吴 扬. 乳腺癌生物治疗进展. *中国普外基础与临床*, 2004, 11(1): 3-5.
- [9] KORIOTH F, GIEFFERS C, FREY J. Cloning and characterization of the human gene encoding aspartyl beta-hydroxylase. *Gene*, 1994, 150(2): 395-399.
- [10] 宋 凯, 薛小平, 王 伟, 等. ASPH 在肿瘤细胞和肿瘤组织中的分布及检测. *细胞与分子免疫学*, 2010, 26(2): 141-144.
- [11] STURLA LM, TONG M, HEBDA N, *et al.* Aspartate- $\beta$ -hydroxylase (ASPH): a potential therapeutic target in human malignant gliomas. *Heliyon*, 2016, 2(12): e00203 [2016-11-21]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00203>.
- [12] DEBIES MT, WELCH DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6(4): 441-451.

(2017-07-29 收稿, 2017-10-12 修回)

编辑 沈 进

(上接第 33 页)

- protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood*, 1998, 92(7): 2260-2268.
- [12] TIAN H, MCKNIGHT SL, RUSSELL DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 1997, 11(1): 72-82.
- [13] IVAN M, KONDO K, YANG H, *et al.* HIF1 $\alpha$  targeted

for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, 2001, 292(5516): 464-468.

- [14] MAXWELL PH, WIESENER MS, CHANG GW, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 1999, 399(6733): 271-275.

(2017-06-06 收稿, 2017-10-15 修回)

编辑 汤 洁