

DOI:10.13350/j.cjpb.240703

• 论著 •

构建慢病毒介导缺氧诱导因子 HIF-1 α 在宫颈癌细胞中的表达及其对裸鼠移植瘤的作用^{*}

阿孜尔古丽·阿布都克日木^{1,2,3}, 马红^{1,2,3}, 白冰¹, 阿瓦汗·吐尔迪⁴, 古丽仙·吐尔逊⁵, 于涛^{6**}

(1. 新疆医科大学基础医学院, 新疆乌鲁木齐 830017; 2. 新疆地方病分子生物学重点实验室; 3. 中亚高发疾病发病机制与防治国家重点实验; 4. 乌鲁木齐市沙依巴克区妇幼保健服务中心; 5. 新疆医科大学附属肿瘤医院; 6. 山东省寄生虫病防治研究所, 山东第一医科大学(山东省医学科学院))

【摘要】 **目的** 探讨使用慢病毒载体介导的 HIF-1 α 对裸鼠宫颈癌移植瘤生长、增殖和转移的影响, 并寻找宫颈癌新的基因治疗靶点。 **方法** 采用慢病毒介导技术, 分别在 SiHa 和 C33a 细胞中提高 C33a 细胞的 HIF-1 α 表达, 同时敲减 SiHa 细胞的 HIF-1 α 表达。通过 qRT-PCR 和 Western blot 技术验证慢病毒转染后 HIF-1 α 表达的效率, 并构建裸鼠移植瘤模型。从而验证 HIF-1 α 表达改变对裸鼠体内肿瘤形成、增殖速度、肿瘤体积和肿瘤重量的影响及 HIF-1 α 表达改变对肿瘤发展过程的影响。 **结果** 敲减和过表达 HIF-1 α 的 SiHa 和 C33a 细胞分别注射于裸鼠左侧腋窝皮下, 1 周后形成肿瘤, 4 周后测量移植瘤体积。干扰 HIF-1 α 的裸鼠移植瘤体积较对照组较小, 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 即干扰 HIF-1 α 对裸鼠瘤体的生长具有抑制作用; 而 HIF-1 α 过表达后, 裸鼠移植瘤体积较对照组较大, 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** HIF-1 α 的表达改变与宫颈癌细胞的增殖和恶化存在一定相关性, HIF-1 α 表达的改变可以调控肿瘤增殖过程。

【关键词】 宫颈癌; 缺氧诱导因子-1 α ; 裸鼠皮下移植瘤模型; 稳定转染

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)07-0756-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jul.; 19(7):756-760, 767.]

To construct lentivirus-mediated expression of hypoxia-inducing factor HIF-1 α in cervical carcinoma and its effect on transplanted tumor in nude mice

AZIERGULI · Abudukerimu^{1,2,3}, MA Hong^{1,2,3}, BAI Bing¹, AWAHAN · Tuerdi⁴, GLIXIAN · Tuerxun⁵, YU Tao⁶ (1. School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases; 3. State Key Experiment of Pathogenesis and Prevention of Highly Prevalent Diseases in Central Asia; 4. Maternal and Child Healthcare Service Centre, Shaybak District; 5. Tumour Hospital, Xinjiang Medical University; 6. Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University) ***

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of HIF-1 α mediated by lentivirus on the growth, proliferation and metastasis of transplanted cervical cancer in nude mice, and to find a new gene therapy target for cervical cancer.

Methods The lavivirus-mediated hypoxia-inducing factor HIF-1 α was constructed to increase the expression of HIF-1 α in cervical cancer cells SiHa and C33a cells, respectively, while knockdown the expression of HIF-1 α in SiHa cells. Verification of the expression efficiency of HIF-1 α after transfection with lentivirus was achieved by means of qRT-PCR and Western blot in a transplanted tumor model from nude mice. Further confirmation of the effects of HIF-1 α expression changes on tumor formation, proliferation rate, volume, and weight were conducted through vivo experiments. The effect of HIF-1 α expression on tumor development was verified. **Results** SiHa and C33a cells with knockdown and overexpression of HIF-1 α were injected subcutaneously into the left axilla of nude mice. Tumor formation was observed 1 week later, and tumor volume was measured 4 weeks later. The findings revealed that interfering with HIF-1 α in subcutaneous grafted nude mice resulted in a significantly lower tumor volume compared to the control group ($P < 0.05$). This suggests that inhibiting HIF-1 α effectively suppresses tumor growth in nude mice. However, upon overexpression of HIF-1 α , the subcutaneous tumor volume in nude mice was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$).

* **【基金项目】** 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2022D01C185)。

** **【通讯作者】** 于涛, E-mail: yutao5816@126.com

【作者简介】 阿孜尔古丽·阿布都克日木(1984-), 女(维吾尔族), 新疆和田人, 博士, 副教授, 主要从事宫颈癌及其他妇科肿瘤研究。
E-mail: 953724240@qq.com

Conclusion The change of HIF-1 α expression is related to the proliferation and deterioration of cervical cancer cells, and the change of HIF-1 α expression can regulate the proliferation process of tumor.

【Keywords】 Cervical Carcinoma(CC); Hypoxia inducer factor (HIF-1 α); nude mice subcutaneous xenograft model; stable transfection

颈癌是严重威胁我国女性身心健康的重大妇科肿瘤之一,宫颈鳞癌是主要组织病理类型,占到了宫颈癌的90%以上^[1]。宫颈鳞状细胞癌起病比较缓慢,在宫颈癌早期,患者多无显著的临床症状,晚期患者可能出现肿瘤破裂出血导致休克、盆腔神经被巨大的肿瘤压迫和浸润导致剧烈疼痛、甚至压迫输尿管排尿不畅导致肾积水和尿毒症等^[2]。

缺氧微环境是实体肿瘤微环境的一个重要特征,肿瘤缺氧微环境中高活性 HIF-1 α 是研究热点的癌基因,它通过转录调节基因促进肿瘤转移,使机体产生一系列反应,多种肿瘤类型带有适应代偿性质,与治疗抵抗和转移相关,但也常给机体带来病理性损害^[3]。HIF-1 α 是缺氧适应的主要调节因子,在缺氧环境下其表达上调,与肿瘤细胞增殖、侵袭和转移有关^[4]。HIF-1 α 可以调节缺氧基因表达谱和信号转导网络,是一个潜在的治疗靶点^[5]。因此通过本研究旨在探讨使用慢病毒载体介导的 HIF-1 α 对裸鼠宫颈癌移植瘤生长、增殖和转移的影响,并寻找宫颈癌新的基因治疗靶点。

材料与方法

1 材料

HPV⁺的 SiHa, HPV 的 C33a 宫颈癌细胞系均购自武汉普诺森生命科技有限公司。慢病毒载体的构建均由上海吉凯生物基因公司完成,引物是由上海生工公司合成。HIF-1 α 和 GAPDH 抗体购于美国 Abcam 公司;SPF 雌性 BALB/C 裸鼠年龄为 4~5 周,体重为 14~16 g。实验动物裸鼠购于扬州大学比较医学中心;研究经新疆医科大学临床医学研究所动物实验中心理论审批(审批号:202117813),严格按照 SPF 级实验动物操作规程进行操作。

2 方法

2.1 细胞培养及细胞转染 SiHa、C33a 两种宫颈癌细胞系,在含有 10% 胎牛血清和 1% 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 完全培养基中进行培养,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。经过 48 h 的慢病毒转染后,将细胞悬液收集并转染至贴壁浓度为 60% 的目的肿瘤细胞中,使用嘌呤霉素进行筛选,筛选出稳定的细胞系。当 siha 和 c33a 的宫颈癌细胞在贴壁 80%~90% 时,进行慢病毒转染,并通过胰酶进行消化。然后将其接种到 6 孔板上,孵化 24 h。根据慢病毒转染

说明书配制工作液,工作液中包含 A 液 40 μ L, P 液 40 μ L, SiHa 细胞转染慢病毒 MOI 值为 10、C33a 细胞转染慢病毒 MOI 值为 20 的病毒液。12 h 后移除溶液并替换为常规全营养生长介质持续培养,72 h 后用荧光反向显微镜对荧光表现进行观测。将正常的 SiHa 和 C33a 细胞作为标准对照组,而未被转染的 SiHa 和 C33a 细胞则成为负对照组。

2.2 RNA 提取和 qRT-PCR 检测 采用细胞总 RNA 提取试剂 trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 从宫颈癌细胞株 SiHa, C33a 中提取总 RNA, 用 cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Dalian, China) 逆转录成 cDNA。采用 SYBR 荧光定量 PCR 扩增试剂盒和 ABI 7500 快速检测系统 (Applied Biosystems, CA, USA) qRT-PCR 检测。使用的人 HIF-1 α 引物序列和 GAPDH 引物分别为: HIF-1 α : 5'-RT00018656-F-AAGTTCACCTGAGCCTAAT-3', RT00018656-R-TCTCCAAGTCTAAATCTGT-3'; 5'-GADPH: RT 763F-TGACTTCAACAGCGACACCCART763R-CA CCCTGTTGCTGTAGCCAA-3' 在 qRT-PCR 中, 以 GAPDH 为内参, 标准化基因表达水平。采用 Delta-Delta 循环阈值法进行 3-5 相对量化, 计算平均相对变化。经实时荧光定量 PCR 实验检测, 并通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 HIF-1 α mRNA 相对表达量。

2.3 蛋白质印迹法 用 Western blot 法检测提取 $\geq 1 \times 10^6$ 个细胞, 加入 100 μ L RIPA 裂解液, 1 μ L PMSF, 充分混合。将混合物放在冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min (离心半径 8 cm) 离心 15 min, 收集上清液, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测试细胞内总蛋白浓度。将蛋白浓度按比例稀释后进行煮蛋白处理。蛋白在 Tris 凝胶上进行电泳分离, 电压为 100 V, 持续 90 min, 然后转移到 PVDF 膜上, 使用封闭液在室温封闭 30 min, 进行一抗孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜 (HIF-1 α 抗体稀释比为 1:1 000, GAPDH 抗体稀释比为 1:5 000), 随后进行二抗孵育 30 min, 使用 AP 法进行显色, 在化学发光仪上拍照并扫描蛋白质的灰度值, 与内参 GAPDH 进行比较, 计算出 HIF-1 α 蛋白的相对表达量。

2.4 动物模型建立 裸鼠模型的建立为 HIF-1 α 敲减的 SiHa 细胞组和 HIF-1 α 过表达的 C33a 细胞组。两组细胞根据慢病毒转染情况分 6 组: 1) 注射正常 SiHa 细胞的裸鼠组; 2) 注射敲减组阴性对照 sh-

NON 细胞的裸鼠组;3)注射敲减 HIF-1 α 的 SiHa 细胞的(shHIF-1 α)裸鼠组;4)注射正常 C33a 细胞的裸鼠组;5)注射过表达组阴性对照 LV-NON 细胞的裸鼠组;6)注射过表达的 C33a 细胞(LV-HIF-1 α)的裸鼠组),每组有 6 只共 36 只裸鼠。制备 6 组宫颈癌细胞 SiHa, C33a 的 5×10^6 细胞悬液 0.2 mL,将每只裸鼠在小鼠的左侧腋窝处皮下注射 0.2 mL 细胞悬液,建立裸鼠宫颈癌移植瘤模型。4 周后,裸露老鼠均处死,取出了体内的肿瘤组织,进行照片拍摄和数据记录。测定肿瘤的大小和质量。通过测量其最大的长度(a)和宽度(b)来确定肿瘤大小, $y(\text{mm}^3) = a \times b^2 / 2$ 计算。后用多聚甲醛固定,备用。

2.5 统计学分析 利用 SPSS19.0 和 Prism 统计工具对数据进行了处理与统计分析。定量资料以平均值加减标准偏差的形式表示($\bar{x} \pm s$)。运用 t 检验对比两个或多个样本之间的差别。如果所有样本的方差相等,通过单因素方差分析来检测不同群体间的差异并进一步用 LSD- t 检验进行双侧比较。假如存在非均衡分布的情况,以 Mann-Whitney U 检验来完成后续的多组比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 用 HIF-1 α 敲减及过表达的慢病毒感染 SiHa, C33a 细胞结果

构建稳定过表达 hif-1 α 的 C33a 细胞(LV-HIF-1 α),该细胞最初相对低水平表达 HIF-1 α 。同时构建 HIF-1 α 敲除 SiHa 细胞(Sh-HIF-1 α),慢病毒转染后转染效率(图 1)。

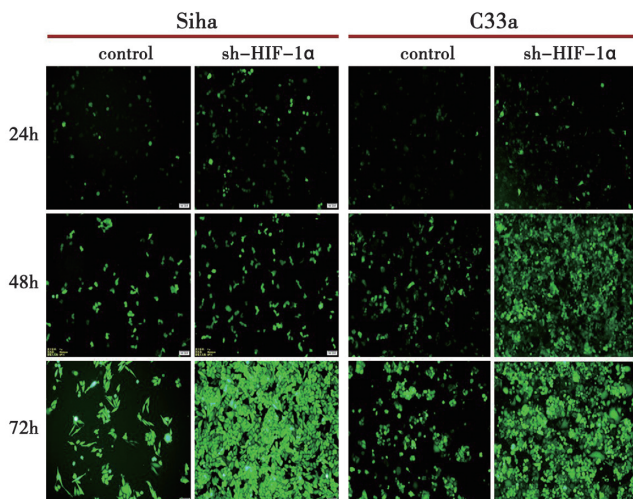


图 1 感染慢病毒后 SiHa, C33a 细胞的绿色荧光表达情况(40 $\times$)
Fig. 1 SiHa, C33a cells in fluorescence after transfection(40 $\times$)

2 转染后细胞中 HIF-1 α 转录水平的变化

转染后检测了慢病毒感染后 HIF-1 α mRNA 的变化,慢病毒感染后,转染成功后分别提取对照组 SiHa

细胞,慢病毒空载的 SiHa(sh-NON)和 SiHa HIF-1 α 敲减组(sh-HIF-1 α)的细胞总 RNA。实时荧光定量 PCR 检测表明,sh-HIF-1 α 中 HIF-1 α mRNA 水平相对表达量显著低于 sh-NON 组和 SiHa 中 HIF-1 α 的 mRNA 相对表达量($F = 5.253, P < 0.05$,图 2,表 1)。且 sh-HIF-1 α 慢病毒转染能使 HIF-1 α 在细胞中的 mRNA 水平降低。

表 1 SiHa 敲减 HIF-1 α 基因后的 mRNA 水平
Table 1 The mRNA levels of HIF-1 α down expression in SiHa cells

分组	均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)	F	P
shHIF-1 α	0.20 $\pm$ 0.08	5.253	0.048
Sh-NON	0.86 $\pm$ 0.27		
SiHa	1.13 $\pm$ 0.56		

通过在宫颈癌细胞 C33a 中转染过表达 LV-HIF-1 α 慢病毒后,提取 C33a 细胞,慢病毒空载 LV-NON 和过表达 LV-HIF-1 α 的 C33a 3 组细胞的 RNA 后经 qRT-PCR 实验检测,并通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 HIF-1 α mRNA 相对表达量结果表明,LV-HIF-1 α 中 HIF-1 α mRNA 水平相对表达量与 LV-NON 组和 C33a 组中 HIF-1 α 的 mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义($F = 25.05, P < 0.05$,表 2,图 2)。LV-HIF-1 α 慢病毒转染能够使 HIF-1 α 在细胞中的 mRNA 水平上升。

表 2 C33a 中过表达 HIF-1 α 基因后的 mRNA 水平
Table 2 The mRNA levels of HIF-1 α over expression in C33a cells

分组	均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)	F	P
LV-HIF-1 α	6.55 $\pm$ 1.95	25.08	0.001
LV-NON	0.97 $\pm$ 0.43		
C33a	0.58 $\pm$ 0.18		

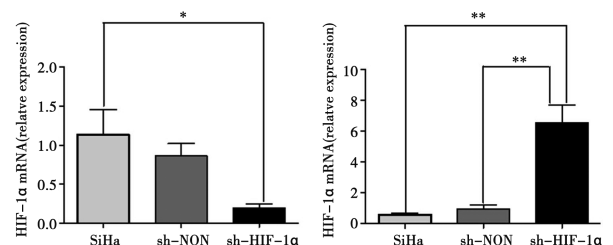


图 2 SiHa 和 C33a 中 HIF-1 α 过表达和下调的 qRT-PCR 结果
Fig. 2 The result of qRT-PCR HIF-1 α overexpression and downexpression in SiHa and C33a

3 转染后细胞中 HIF-1 α 蛋白水平的变化

通过慢病毒稳定转染 shHIF-1 α , LV-HIF-1 α 细胞,通过流式无菌分选,筛选出稳定转染的 SiHa, C33a 细胞株,经过 Western blot 实验检测 HIF-1 α 蛋白的表达结果表明,在 shHIF-1 α 组细胞 HIF-1 α 蛋白的相对表达量与 shNON 组(0.86 ± 0.04)和 SiHa 组(1.10 ± 0.06)中 HIF-1 α 蛋白的相对表达量比较差异有统计学意义($F = 143, P < 0.05$)(表 3,图 3),慢病毒转染

细胞成功构建。在 C33a 细胞中, LV-HIF-1 α 组中 HIF-1 α 蛋白的相对表达量(1.03 ± 0.01)显著高于 LV-NON 组(0.70 ± 0.03)和 C33a(0.58 ± 0.04)中 HIF-1 α 的蛋白相对表达量($F=40.17, P<0.05$)(表 4, 图 3), 慢病毒转染细胞成功构建。

表 3 SiHa 敲减 HIF-1 α 基因后的蛋白水平
Table 3 The protein levels of HIF-1 α down expression in SiHa cells

分组	均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)	F	P
shHIF-1 α	0.32 ± 0.07	143	0.001
Sh-NON	0.86 ± 0.04		
SiHa	1.10 ± 0.06		

表 4 C33a 过表达 HIF-1 α 基因后的蛋白表达水平
Table 4 The protein levels of HIF-1 α over expression in C33a cells

分组	均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)	F	P
LV-HIF-1 α	1.03 ± 0.01	40.17	0.003
LV-NON	0.70 ± 0.03		
C33a	0.58 ± 0.04		

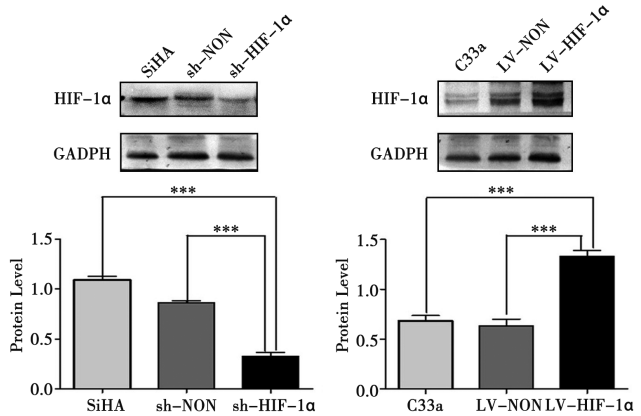


图 3 SiHa 和 C33a 下调和上调后 HIF-1 α 的 Western blot 结果及相对表达情况
Fig. 3 Western blot results of HIF-1 α after down-regulation and up-regulation in cells

4 HIF-1 α 在裸鼠异种移植瘤模型中的作用

观察 HIF-1 α 在体内对肿瘤细胞增殖的影响, HIF-1 α 过表达的 C33a 细胞和 HIF-1 α 敲除的 SiHa 细胞注射到裸鼠体内, HIF-1 α 对肿瘤的作用。细胞接种后 7 d 左右, 裸鼠腋窝可见肿瘤组织形成。18 只裸鼠均成瘤, 表明移植瘤模型均获得成功。所有实验组都成功地诱导了肿瘤生长, 并且每个小组的裸露老鼠都在第 7 d 被观察到有显著的肿瘤增长。与对照组小鼠相比, 过表达 HIF-1 α C33a 细胞的小鼠肿瘤显著增大(表 7)。相比转染 HIF-1 α 敲除 SiHa 细胞的裸鼠肿瘤显著变小(图 4)。表明 HIF-1 α 在体内可以促进肿瘤的增殖。28 d 后裸鼠进行安乐死处理, 表明 hiF-1 α 的表达影响肿瘤的增殖。裸鼠每隔 1 周观察 1 次, 记录每周测量的肿瘤体积(图 5), 每周测量肿瘤重量(图 6)。

表 5 注射细胞后在不同时间点的肿瘤体积
Table 5 Tumor volumes at different time points after injection of cells

分组	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
SiHa	-	123.54 ± 13.28	300.30 ± 44.37	483.80 ± 19.83	675.50 ± 36.54
shNON	-	101.78 ± 15.48	272.80 ± 23.47	425.80 ± 16.94	570.40 ± 24.74
shHIF-1 α	-	90.20 ± 35.28	171.60 ± 64.47	216.80 ± 74.37	354.37 ± 88.78
C33a	-	102.88 ± 16.59	283.41 ± 46.32	423.37 ± 89.91	632.82 ± 89.09
LV-NON	-	82.38 ± 21.45	245.82 ± 44.59	398.82 ± 89.77	598.64 ± 76.39
LV-HIF-1 α	-	128.38 ± 25.76	389.82 ± 19.88	692.53 ± 109.59	889.82 ± 130.47

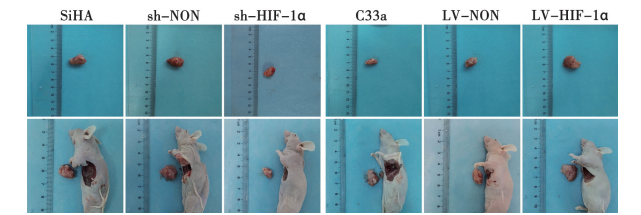


图 4 裸鼠解剖肿瘤移植后的代表性图像
Fig. 4 A representative image of an anatomical tumor after transplantation in a nude mouse

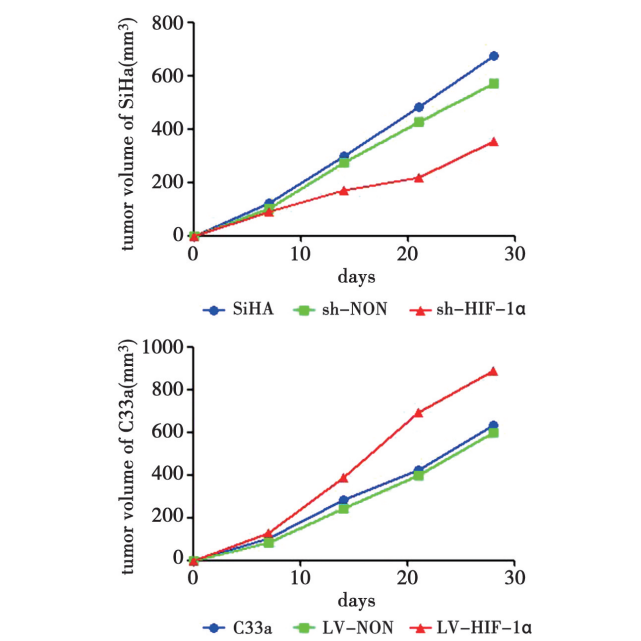


图 5 不同组小鼠皮下肿瘤体积生长曲线
Fig. 5 The volume growth curves of subcutaneous tumors in different groups of mice

构建宫颈癌皮下移植瘤裸鼠模型 1 周后, 发现腋窝皮下注射部位出现的肿瘤大小 >5 cm, 证明肿瘤模型构建成功。接种 28 d 后, 比较 6 组裸鼠剥离肿瘤并测量瘤体大小及称量瘤体重量, 结果显示, shHIF-1 α 组的瘤体体积和肿瘤重量显著小于 shNON 组和 SiHa 组($F=20.17, P<0.05$); 与 LV-HIF-1 α 组相比, LV-NON 组和 C33a 组肿瘤大小及重量显著增大肿瘤生长速度也快($F=59.74, P<0.05$)(图 5), 且部分肿瘤组织有出血坏死, 与周围结构组织相连较为紧密, 不易分离, 并出现淋巴结转移。

剥离裸鼠皮下移植瘤进行称重, 分析比较各组瘤

体重量, HIF-1 α 敲减组瘤重较空白对照组、慢病毒阴性对照组显著变轻, ($F = 29.52, P < 0.05$) 差异有统计学意义。HIF-1 α 高表达组瘤重较空白对照组、慢病毒阴性对照组显著变重, 差异有统计学意义 ($F = 31.49, P < 0.05$, 图 6)。

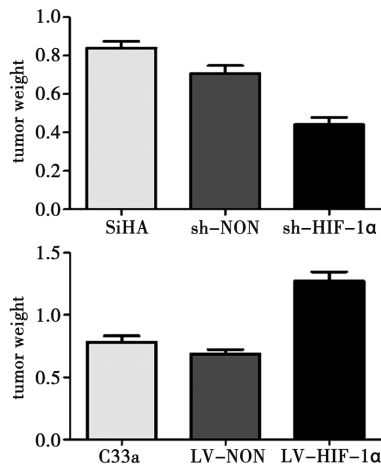


图 6 实验组动物的平均肿瘤重量
Fig. 6 Describes the average tumor weight of the animals in the experimental group

讨论

宫颈癌是全球第四大最常见的女性癌症^[7]。随着专性致病感染因子高危人乳头瘤病毒(HPV)的发现,对其自然史中关键步骤的阐明,以及高效的一级和二级预防技术的可用性,宫颈癌是一种可预防的恶性肿瘤^[8-9]。世界卫生组织关于宫颈癌筛查和治疗的新指南,建议使用 HPV DNA 检测作为主要的宫颈癌筛查检测。发达国家已经组织了疫苗接种和筛查项目,对于部分资源和基础设施的匮乏国家和地区使得宫颈癌的发病率降低不显著^[10]。

缺氧诱导因子-1 (Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1 α) 已被认为是一种重要的抗癌靶点^[11-14]。近年来,研究表明 HIF-1 α 的表达水平升高与肿瘤的侵袭转移、肿瘤血管形成、肿瘤患者病变恶化及预后不良、肿瘤细胞对治疗出现耐药性等方面有关^[15-16]。

通过慢病毒转染建立敲减和过表达 HIF-1 α 基因的宫颈癌细胞系,并注射于裸鼠腋下皮内,观察对裸鼠成瘤能力的影响,对裸鼠注射 SiHa 正常宫颈癌细胞和 C33a 正常宫颈癌细胞, HIF-1 α SiHa 中敲减的 sh-HIF-1 α 及在 C33a 中过表达 HIF-1 α 的 LV-HIF-1 α 细胞,以各组慢病毒空载对照 sh-NON 和 LV-NON 注入裸鼠体内从而获得皮下植瘤,成瘤后通过动态观察成瘤情况,比较过表达组和敲减组成瘤速度,检测瘤体的体积和重量,增殖速度,对裸鼠生物学行为的影响进行评价, HIF-1 α 基因表达的改变对裸鼠成瘤的影响。

HIF-1 α 在体内对宫颈癌增殖的影响保证了肿瘤

组织遗传背景的统一,该方法试验周期短、可重复性好、操作简单方便。本研究结果显示,各组细胞注射 1 周后发现各组裸鼠均在皮下形成不同大小的瘤体,在第 1~4 周对裸鼠体内形成的瘤体进行测量,注射敲减 HIF-1 α 的 sh-SiHa 细胞组分别与注射 SiHa 细胞、sh-NON 细胞组以及过表达组比较瘤体体积小,增殖速度慢,差异显著。注过表达 LV-HIF-1 α 的 C33a 细胞组与 C33a 与 LV-NON 组比较,在各时段两组裸鼠的体重无显著差异;敲减和过表达 HIF-1A 均不影响裸鼠体重的变化。

HIF-1 α 在肿瘤的恶性增殖中起主要作用。本研究从接种肿瘤细胞后 14 d 开始, shHIF-1 α 组瘤体增长速度较 shNON 组与 SiHa 组慢;裸鼠皮下注射 C33a 细胞后,从种瘤后 14 d 开始, LV-HIF-1 α 组的裸鼠肿瘤体积显著大于 LV-NON 和 C33a 组,即 LV-HIF-1 α 组裸鼠的肿瘤增长速度较其他 2 组快,瘤体体积比其他组大,并增殖速度快。观察到第 28 d 时麻醉后用颈椎脱臼法处死裸鼠,从裸鼠腋下皮内剥离出单个植瘤瘤体,本研究 shHIF-1 α 组的瘤体体积和肿瘤重量显著小于 shNON 组、SiHa 和 C33a 过表达组; LV-HIF-1 α 组与 C33a 组, LV-NON 组和敲减基因的 SiHa 组比较,肿瘤大小及重量显著较大,增殖速度快,且部分肿瘤组织有出血坏死,与周围结构组织相连较为紧密,不易分离,并出现淋巴结转移。通过对接种干扰 HIF-1 α 的 SiHa 细胞后的裸鼠平均瘤体体积分析,观察到 SiHa、shNON 和 shHIF-1 α 3 个小组之间的肿瘤体积比较差异有统计学意义,其中 shHIF-1 α 的小型化程度超过了对照组,这表明干扰 HIF-1 α 能够减缓裸鼠皮肤下的肿瘤增长。当使用过表达 HIF-1 α 的 C33a 细胞 LV-HIF-1 α 来处理裸鼠时,也发现了显著的瘤体体积增大的现象,而 C33a、LV-NON 和 LV-NON 三者间的瘤体大小与生长速率显著不同,尤其是 LV-HIF-1 α 组的瘤体尺寸大于对照组,表明 HIF-1 α 的过度表达能刺激裸鼠皮肤下的肿瘤发展。

综上所述,通过体内试验证实 HIF-1 α 的表达改变对宫颈癌细胞的增殖、恶化有一定相关性, HIF-1 α 表达的改变可以调控肿瘤增殖过程。

【参考文献】

- [1] Wang J, Lv H, Xue Z, et al. Temporal trends of common female malignances on breast, cervical, and ovarian cancer mortality in Japan, Republic of Korea, and singapore: application of the age-period-cohort model[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 5307459.
- [2] Liu L, Cai L, Du X, et al. Anti-tumour effect of in situ vaccines combined with VEGFR inhibitors in the treatment of metastatic cervical cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101 (Pt B): 108302.

(下转 767 页)

- [12] 石明亮,王晓磊,申洋,等. 茯苓酸调节 Hippo 信号通路对二乙基亚硝胺诱导的肝癌大鼠的治疗作用研究[J]. 天津中医药, 2024,41(1):99-105
- [13] Bragazzi MC, Venere R, Vignone A, et al. Role of the gut-liver axis in the pathobiology of cholangiopathies: Basic and clinical evidence[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(7):6660.
- [14] Pabst O, Hornef MW, Schaap FG, et al. Gut-liver axis: barriers and functional circuits [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023,20(7):447-461.
- [15] 朱会明,张华,王敏,等. 基于肠肝轴中医药调节肠道菌群治疗肝细胞癌作用机制研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2023,35(4):803-808
- [16] 李莹莹,纪巧荣. 肠道菌群及其代谢物短链脂肪酸与肠黏膜免疫关系的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2023,51(6):67-73
- [17] Hu T, Wu Q, Yao Q, et al. Short-chain fatty acid metabolism and multiple effects on cardiovascular diseases[J]. Ageing Res Rev, 2022,81:101706.
- [18] Kurma K, Manches O, Chuffart F, et al. DEN-induced rat model reproduces key features of human hepatocellular carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2021,13(19):4981.
- [19] 王新璐,李雪莹,易进科,等. 小鼠原发性肝癌模型的建立[J]. 中国应用生理学杂志, 2022,38(6):820-823.
- [20] Zhang M, Xiao B, Chen X, et al. Physical exercise plays a role in rebalancing the bile acids of enterohepatic axis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Acta Physiol (Oxf), 2024, 240 (1): e14065.
- [21] Yin Y, Sichler A, Ecker J, et al. Gut microbiota promote liver regeneration through hepatic membrane phospholipid biosynthesis[J]. J Hepatol, 2023,78(4):820-835.
- [22] You H, Tan Y, Yu D, et al. The therapeutic effect of SCFA-mediated regulation of the intestinal environment on obesity[J]. Front Nutr, 2022,9:886902.
- [23] Agnihotri N, Mohajeri MH. Involvement of intestinal microbiota in adult neurogenesis and the expression of brain-derived neurotrophic factor[J]. Int J Mol Sci, 2022,23(24):15934.
- [24] Liu W, Li X, Zhao Z, et al. Effect of chitooligosaccharides on human gut microbiota and antiglycation[J]. Carbohydr Polym, 2020,242:116413.
- [25] Zietek M, Celewicz Z, Kikut J, et al. Implications of SCFAs on the parameters of the lipid and hepatic profile in pregnant women [J]. Nutrients, 2021,13(6):1749.
- [26] Zhou Q, Gu R, Xue B, et al. Phenyl lactic acid alleviates *Salmonella typhimurium*-induced colitis via regulating microbiota composition, SCFA production and inflammatory responses[J]. Food Funct, 2021,12(12):5591-5606.
- [27] Elias G, Schonfeld M, Saleh S, et al. Sepsis-induced endothelial dysfunction drives acute-on-chronic liver failure through Angiopoietin-2-HGF-C/EBPbeta pathway [J]. Hepatology, 2023,78(3):803-819.
- [28] Siapoush S, Rezaei R, Alavifard H, et al. Therapeutic implications of targeting autophagy and TGF-beta crosstalk for the treatment of liver fibrosis[J]. Life Sci, 2023,329:121894.
- [29] Liao X, Ruan X, Yao P, et al. LncRNA-Gm9866 promotes liver fibrosis by activating TGFbeta/Smad signaling via targeting Fam98b[J]. J Transl Med, 2023,21(1):778.
- [30] Zhang H, Wu J, Li N, et al. Microbial influence on triggering and treatment of host cancer: An intestinal barrier perspective[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023,1878(6):188989.

【收稿日期】 2024-03-06 【修回日期】 2024-05-26

(上接 760 页)

- [3] 栾雅静,郑旭,仇晓菲. 小细胞肺癌干细胞和肿瘤组织中 HIF-1 α 和 HIF-2 α 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017,33(8):868-874.
- [4] Zhang H, Yang Q, Lian X, et al. Hypoxia-Inducible factor-1 α (hif-1 α) promotes hypoxia-induced invasion and metastasis in ovarian cancer by targeting matrix met allopeptidase 13(MMP13) [J]. Med Sci Monit, 2019,25:7202-7208.
- [5] Wang X, Zhao D, Xie H, et al. Interplay of long non-coding RNAs and HIF-1 α : A new dimension to understanding hypoxia-regulated tumor growth and metastasis[J]. Cancer Lett, 2021,499:49-59.
- [6] 何玉婷,李娟,孙冉冉,等. 靶向 HIF-1 α 基因的 CRISPR/Cas9 基因敲除质粒的构建与鉴定[J]. 郑州大学学报(医学版), 2016,51(3):293-297.
- [7] Vu M, Yu J, Awolude OA, et al. Cervical cancer worldwide[J]. Curr Probl Cancer, 2018,42(5):457-465.
- [8] Sun X, Shu Y, Ye G, et al. Histone deacetylase inhibitors inhibit cervical cancer growth through Parkin acetylation-mediated mitophagy[J]. Acta Pharm Sin B, 2022,12(2):838-852.
- [9] Chakraborty C, Mitra S, Roychowdhury A, et al. Deregulation of LIMD1-VHL-HIF-1 α -VEGF pathway is associated with different stages of cervical cancer[J]. Biochem J, 2018,475(10):1793-1806.
- [10] Zhou TJ, Huang XH, Gong L, et al. Vasculogenic mimicry and hypoxia-inducible factor-1 α expression in cervical squamous cell carcinoma[J]. Genet Mol Res, 2016,15(1):15017396.
- [11] Tang NN, Zhu H, Zhang HJ, et al. HIF-1 α induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(47):17894-904.
- [12] Zhang JG, Zhou HM, Zhang X, et al. Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1 α , RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling [J]. BMC Cancer, 2020,20(1):32.
- [13] 帕热哈提江·依孜木,麦伍兰江·阿卜杜热西提,阿布都克尤木·阿布都吉力力. HIF-1 α 促进恶性脑膜瘤血管发生的分子机制[J]. 医学分子生物学杂志, 2023,20(5):390-396.
- [14] 宋熙雯,唐赓,宋朝卉,等. 低氧状态下 HIF-1 α 对骨细胞凋亡的影响[J]. 口腔颌面外科杂志, 2020,30(6):369-375.
- [15] 岑兴,廖楚航,费伟,等. HIF-1 α RNAi 对口腔鳞癌生长以及血管生成影响的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2021,37(4):482-486.
- [16] Conde ES, Gimenez-Moyano L, Martin-Gomez, et al. HIF-1 α induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p[J]. Sci Rep, 2017,7:41099.

【收稿日期】 2024-01-16 【修回日期】 2024-04-05