

# HIF-1 $\alpha$ 在卵巢癌中的表达及与化疗耐药相关性研究 \*

刘莉霞 刘国美 孙宇辉 何秀萍 $\Delta$

(哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150000)

**摘要** 目的 探讨缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )在卵巢癌中的表达及其在卵巢癌化疗耐药中的作用。方法 采用免疫组化方法 检测 96 例卵巢癌组织 45 例良性卵巢肿瘤和 30 例正常卵巢组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达, 分析其表达与临床病理特征及化疗耐药的相关性。结果 卵巢癌中 HIF-1 $\alpha$  的表达高于正常卵巢及良性卵巢肿瘤组织, 且临床分期越晚其表达越高( $P<0.001$ ), 而与肿瘤组织类型、病理分级及患者年龄无显著相关性。HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌化疗耐药组阳性率明显高于化疗敏感组( $P<0.001$ )。结论 卵巢癌中 HIF-1 $\alpha$  高表达与卵巢癌的发生、发展、浸润和转移有关, 与卵巢癌化疗耐药密切相关, HIF-1 $\alpha$  可成为卵巢癌化疗新的分子治疗靶点。

**关键词** 卵巢癌; HIF-1 $\alpha$ ; 免疫组织化学; 化疗耐药

中图分类号 R737.31 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)02-276-04

## Analysis of the Relationship between HIF-1 $\alpha$ gene Expression and Drug Resistance of Chemotherapy in Ovarian Cancer\*

LIU Li-xia, LIU Guo-mei, SUN Yu-hui, HE Xiu-ping $\Delta$

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the expression of HIF-1 $\alpha$  in ovarian cancer and its the relationship with chemotherapy drug resistance. **Methods:** The expression of HIF-1 $\alpha$  in ovarian tumours was detected and the results in related with drug resistance was studied. **Results:** The expression of HIF-1 $\alpha$  in ovarian cancer positive rate was higher than that in normal tissues and benign tumours( $P<0.001$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$  and FIGO stage were relevant ( $P<0.001$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$  with histopathological type, pathology classification and age of patients had no relationship. The expression of HIF-1 $\alpha$  in drug resistance group was higher than in sensitive group ( $P<0.001$ ). **Conclusion:** HIF-1 $\alpha$  expression may be related with the growth of ovarian cancer, lymph node metastasis and drug resistance. HIF-1 $\alpha$  can become the new molecular therapeutic targets.

**Key words:** Ovarian cancer; HIF-1 $\alpha$ ; Drug resistance; Immunohistochemical

**Chinese Library Classification(CLC):** R737.31 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)02-276-04

### 前言

卵巢癌缺乏早期诊断,呈高发趋势<sup>[1]</sup>尽管大多数患者通过手术及规范化化疗控制疾病进展,但仍有 90% 的患者癌症复发<sup>[2]</sup>。其中化疗耐药是导致卵巢癌治疗失败的主要原因,目前缺氧微环境在肿瘤化疗耐药中的作用受到研究者的重视,缺氧诱导因子(HIF-1)是在缺氧状态下发挥活性的重要核转录因子,有研究者证实 HIF-1 可调控 MDR 基因<sup>[3]</sup>,其靶基因对肿瘤细胞的能量代谢、血管生成、肿瘤转移、细胞耐药等发挥重要作用<sup>[4]</sup>。下调 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌组织中的表达后,其对顺铂敏感性也显著增强<sup>[5]</sup>。因此研究 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌中的耐药机制,为逆转化疗耐药提供依据。但 HIF-1 $\alpha$  与卵巢癌耐药方面尚鲜见报道,本研究应用免疫组织化学方法检测正常卵巢、卵巢良性肿瘤及卵巢癌患者卵巢组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达,探讨 HIF-1 $\alpha$  在各种卵巢组织中的表达及对卵巢癌化疗耐药的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 标本来源

病例标本来自于哈尔滨医科大学附属第一医院 2008 年 05 月至 2011 年 01 月手术切除组织标本 171 例。患者年龄 28~75 岁,平均 51 岁。病理标本包括:正常卵巢 30 例,为子宫肌瘤行子宫全切加一侧附件切除术的卵巢组织;良性卵巢组织 45 例,卵巢癌 96 例。96 例卵巢癌再分组:组织类型:浆液性囊腺癌 45 例、粘液性囊腺癌 28 例、子宫内膜癌 15 例、透明细胞癌 8 例;病理分级:高分化 24 例、中分化 40 例、低分化 32 例;临床分期:- 期 30 例、- 期 66 例;年龄分组: $\leq 50$  岁 40 例、 $>50$  岁 56 例。96 例卵巢癌患者手术前均未接受任何治疗,术后接受 6-7 个以上疗程规范化疗,化疗方案为铂类加紫杉醇类药物静脉化疗,全部患者能可靠跟踪随访,96 例卵巢癌病人分为化疗耐药组 68 例和化疗敏感组 28 例。

\* 基金项目 黑龙江省科技攻关资助项目(编号:GB07C32303) 哈尔滨市科技人才研究资助项目(编号:2007RFQXS091); 教育部春晖计划资助项目(编号:Z2009-1-15006)

作者简介:刘莉霞(1981-),女,硕士研究生,主要从事妇科肿瘤临床研究。电话:18946166716;E-mail:pipihou@126.com

$\Delta$ 通讯作者:何秀萍,E-mail:xiuping\_he@live.cn

(收稿日期:2011-07-25 接受日期:2011-08-18)

## 1.2 主要试剂

兔抗人 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 购自武汉博士德生物工程有限公司。

## 1.3 免疫组化 SP 法检测

1.3.1 染色步骤 171 例标本经 10% 福尔马林液固定、石蜡包埋 5 $\mu$ m 连续切片。3% 过氧化氢溶液浸泡 20 分钟, 蒸馏水冲洗, PBS 液浸泡 5 分。将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液, 微波修复 15 分钟, 凉至室温, 加兔多抗 HIF-1 $\alpha$  抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜, 滴加标记二抗, 放入湿盒, 水浴 30 分钟, PBS 液冲洗 3 次, DAB 显色, 镜下观察 3-5 分钟, 阳性者出现棕黄色颗粒。流水充分冲洗后苏木复染, 依次脱水, 中性树胶封片。

1.3.2 结果判定 HIF-1 $\alpha$  阳性细胞定位为胞核和 / 或胞浆着棕黄色。HIF-1 $\alpha$  染色结果判断: 按阳性细胞率评分: 阳性细胞数占 10%-50% 为 2 分; 占 51%-80% 为 3 分; >80% 为 4 分。按显色程度评分: 无着色为 0 分; 着色弱但明显强于阴性对照者为 1 分; 染色清晰者为 2 分; 强染色为 3 分。然后将两种评分结合起来分为 4 级: 无论染色强度如何, 细胞阳性率 <10% 为阴性; 2-3 分为弱阳性 (+); 4-5 分为中度阳性 (++); 6-7 分为强阳性 (+++)。

## 1.4 化疗疗效评定

术后, 卵巢癌患者完成 6~8 个疗程化疗后, 通过盆腔检

查、B 超影像学检查、CA125 检测或二次探查术所见评估化疗疗效。化疗疗效评定标准: (1) 化疗敏感性卵巢癌: 初期获得临床证实的完全缓解, 停药 6 个月以上未复发者; (2) 耐药性卵巢癌: 初期达临床完全缓解, 但 6 个月以内出现复发者 (CA125 升高、体检发现肿块、胸腹水、不明原因肠梗阻等); (3) 持续性卵巢癌: 初期对化疗有反应, 但进一步检查有残余病灶; (4) 难治性卵巢癌: 对化疗无效, 包括在化疗期间肿瘤稳定或进展。我们将 (1) 定义为化疗敏感, (2)、(3)、(4) 定义为化疗耐药。

## 1.5 统计数据分析

采用 SPSS11.0 软件进行分析, 数据为阳性率的比较, 采用卡方检验, 不满足卡方检验条件的应用 Fisher 确切概率法;  $P < 0.001$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HIF-1 $\alpha$ 的表达

2.1.1 免疫组化结果 HIF-1 $\alpha$  蛋白在正常卵巢组织中不表达, 图 1 图 2 分别为 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌组织, 正常卵巢组织中的染色情况。HIF-1 $\alpha$  在卵巢良性肿瘤、卵巢癌中阳性表达率分别为 22.2%、72.9%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 正常卵巢和良性卵巢肿瘤组织, 卵巢癌组织中 HIF-1 $\alpha$  表达情况见表 1。

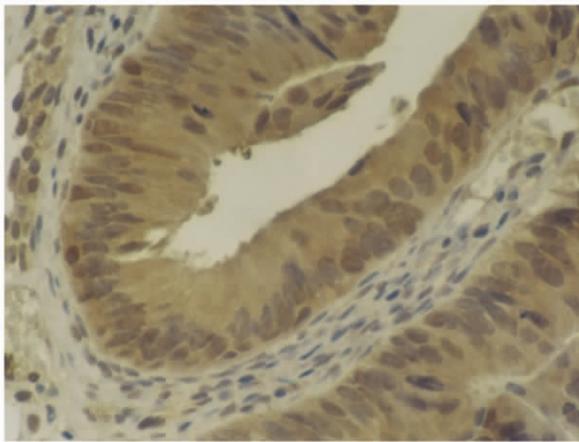


图 1 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌中的表达 (H&E  $\times$  100)

Fig.1 The expression of HIF-1 $\alpha$  in ovarian cancer. Cytoplasm staining of the carcinomas cells (original magnification,  $\times$  100)

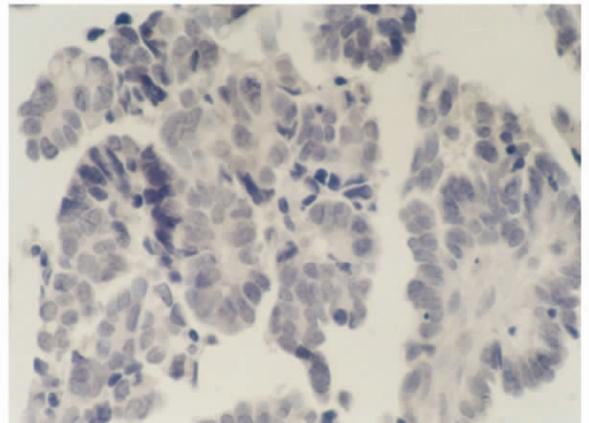


图 2 HIF-1 $\alpha$  在正常卵巢中的表达 (H&E  $\times$  400)

Fig.2 The expression of HIF-1 $\alpha$  in normal ovarian tissues. Cytoplasm staining of the normal (original magnification,  $\times$  400)

2.1.2 HIF-1 $\alpha$  与卵巢癌临床病理特征关系 如表 1 所示, HIF-1 $\alpha$  的表达与肿瘤的 FIGO 临床分期有关, 分期越晚表达越高 ( $P < 0.01$ ), 而与肿瘤组织类型、病理分级、及患者年龄均无关 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 HIF-1 $\alpha$ 与化疗疗效

96 例卵巢癌中, 28 例化疗有效, 取得临床缓解, 68 例发生耐药。化疗有效组和化疗耐药组 HIF-1 $\alpha$  蛋白阳性表达率分别为 35.7% 和 88.2%, 分析显示化疗耐药组 HIF-1 $\alpha$  蛋白阳性率显著高于化疗有效组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ) (见表 2)。

## 3 讨论

多药耐药 (multi-drug resistance, MDR) 是卵巢癌癌细胞免受化疗药攻击的重要防御机制, 是耐药的主要机制<sup>[6]</sup>。卵巢癌早期因癌组织增生过快超过血管生成的速度, 必然造成局部缺血、缺氧。而实体肿瘤的缺氧可诱导缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 表达增高<sup>[7]</sup>, 进而促进肿瘤生物学行为。低氧诱导因子-1 (HIF-1) 是由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚单位组成的异源二聚体, 正常氧浓度状态下, 细胞内 HIF-1 $\alpha$  会迅速被蛋白酶降解, 在氧浓度低于 6% 时 HIF-1 $\alpha$  才表达<sup>[8]</sup>, 所以 HIF-1 $\alpha$  决定 HIF-1 的活性。缺氧使 HIF-1 $\alpha$  获得稳定增多, 与 HIF-1 $\beta$  形成二聚体<sup>[9]</sup>。大部分肿瘤组织内都存在缺氧的微环境, 除缺氧外某些癌基因的激活, 肿瘤抑制基因的缺失及生长因子也可增加

HIF-1 $\alpha$  在肿瘤组织内的表达<sup>[10]</sup>。本实验发现 HIF-1 $\alpha$  在正常卵巢组织中不表达,而在卵巢癌组织中 HIF-1 $\alpha$  表达率显著高于卵巢良性肿瘤组织,提示 HIF-1 $\alpha$  的高表达可能在卵巢癌的发生发展过程中起重要作用,HIF-1 $\alpha$  可以作为卵巢癌筛查的早期诊断指标。HIF-1 $\alpha$  被激活后进入胞核与低氧反应元件结合,继而调控下游靶基因,诱导多种靶基因产物的表达,介导细胞缺氧适应性反应。其中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor,VEGF) 是 HIF-1 $\alpha$  调控的靶基因之一,VEGF 是

刺激肿瘤血管形成最关键的因子,具有微血管通透性,增强血管内皮细胞的增殖并形成血管作用,进而促进肿瘤生长和转移<sup>[11]</sup>。本实验发现 HIF-1 $\alpha$  的高表达与卵巢癌的手术病理分期相关,I- 期的卵巢癌组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平低于 II- 期的卵巢组织,这表明 HIF-1 $\alpha$  可能参与卵巢癌的发展、浸润及转移,可以作为卵巢癌患者预后不良的有效指标,因此阻断该通路或抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达可能可以阻断肿瘤发展。

表 1 各种卵巢组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达

Table 1 Clinico-pathological characteristics of the patients in the whole series

Group	Number	Positive number	Percentage	P-value
Normal tissue	30	0		
Benign tissue	45	10	22.20%	P<0.001
Ovarian cancer	96	70	72.90%	
Age				
≤ 50	40	30	75%	
>50	56	40	71.40%	P=0.698
FIGO stage				
I 期	30	12	40%	
II- 期	66	58	87.90%	P<0.001
Histological grade				
G1	24	15	62.50%	
G2	40	30	75%	P=0.397
G3	32	25	78.10%	
Histological type				
Serous	45	33	73.30%	
Mucinous	28	20	71.40%	
Endometrioid	15	11	73.30%	P=0.983
Clear cell carcinoma	8	6	75%	

表 2 HIF-1 $\alpha$  表达与卵巢癌化疗疗效关系

Table 2 Response to chemotherapy

Group	Number	Positive number	Positive percentage	P-value
Drug resistance	68	60	88.20%	
Srsnsitive group	28	10	35.70%	P<0.001

MDR 基因是卵巢癌耐药中发现较早的基因,其编码的 p-糖蛋白为能量依赖型药泵,其生理功能是将胞内的毒性代谢产物泵出细胞,对组织细胞起保护作用,也可以直接由细胞膜排除药物,使细胞内的药物浓度维持低水平,从而阻碍化疗药物作用的发挥,其表达水平与耐药程度正相关<sup>[12]</sup>。目前肿瘤细胞

微环境的改变 - 缺氧是导致化疗产生耐药性的重要原因。

本实验发现卵巢癌化疗耐药组中 HIF-1 $\alpha$  表达率较化疗敏感组显著增高,这表明 HIF-1 $\alpha$  对卵巢癌耐药形成有重要作用,多药耐药是卵巢癌耐药的主要机制,可推测卵巢癌中 HIF-1 $\alpha$  参与多药耐药机制的形成。近几年国内外研究表明,HIF-1 $\alpha$  与

肿瘤多药耐药的形成有关,胃癌组织中有学者研究发现 HIF-1 $\alpha$  参与肿瘤多药耐药机制的形成<sup>[13]</sup>,从而引发"药泵"发挥耐药作用。因此 HIF-1 $\alpha$  可能通过刺激 P-糖蛋白的表达来降低化疗药物在肿瘤细胞内的浓度而导致卵巢癌化疗耐药。肿瘤细胞凋亡的抑制在耐药方面也发挥了重要作用,本实验化疗耐药组中 HIF-1 $\alpha$  表达显著增高,可推测 HIF-1 $\alpha$  可能显著抑制卵巢癌细胞的凋亡。当野生型 P53 基因缺失或 P53 基因突变时 HIF-1 $\alpha$  P53 之间的调馈环路中断, HIF-1 $\alpha$  不能诱导突变型 P53 肿瘤细胞凋亡,而且突变型 P53 还导致 HIF-1 $\alpha$  水平进一步升高,增强其转录活性,从而促进肿瘤的血管生成、抑制肿瘤细胞的凋亡<sup>[14]</sup>。因此 HIF-1 $\alpha$  可能通过 P53 抑制卵巢癌细胞的凋亡,与化疗药物的促进细胞凋亡相抵抗,进而产生耐药。最近也有学者运用 MTT 法研究发现激活 HIF-1 $\alpha$  后显著增强了卵巢癌对紫杉醇化疗药物的耐受性<sup>[15]</sup>,与本实验研究得出结果一致。所以 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌化疗耐药的形成中发挥重要作用。

总之 HIF-1 $\alpha$  与卵巢癌的发生、发展、浸润、转移、耐药等密切相关,且正常人体组织中氧分压基本正常,因此 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌治疗中具有较高的靶向性,抑制 HIF-1 $\alpha$  的形成,以 HIF-1 $\alpha$  为靶点的卵巢癌治疗,为克服卵巢癌化疗抵抗提供新的分子治疗靶点

#### 参考文献(References)

- [1] 项永兵,张薇,高立峰.恶性肿瘤发病率的时间趋势分析方法[J].中华流行病学杂志,2004,2(25):137-142  
Xiang Yong-bing, Zhang Wei, Gao Li-feng. The analysis of time-trend in incidence of Malignant tumor [J]. Chinese Journal of Epidemiology,2004,2(25):137-142
- [2] Bookman MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. International Journal of Gynecological Cancer, 2005,15(6):212-220
- [3] Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, et al. Hypoxia inducible, factor 1-dependent regulation of the multidrug resistance(MDR1)gene[J]. Cancer Res, 2002, 62(12) 3387-3394
- [4] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2003,3(10):721-732
- [5] 葛红雨,吴维光,韩建秋等. RNAi 抑制 HIF-1 $\alpha$  基因逆转卵巢癌多药耐药的实验研究[J].中国癌症防治杂志,2010,2(1):8-11  
Ge Hong-yu, Wu Wei-guang, Han Jian-qiu, et al. Study of HIF-1 $\alpha$  antisense oligodeoxynucleotides on reversal of cisplatin resistance in ovarian cancer [J]. Journal of Chinese Medical Abstracts,2010,2(1): 8-11
- [6] 马丁. 卵巢癌多药耐药机制的探讨 [J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2007,3(4):184-186  
Ma Ding. The mechanism of multidrug resistance in ovarian cancer [J]. Chinese Journal of Obstetrics & Gynecology and Pediatrics,2007,3 (4): 184-186
- [7] Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 cancer therapy [J]. Mol Cancer Res, 2006,4(9):601-605
- [8] Schumacker PT. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)[J]. Crit Care Med, 2005,33(12): 423-425
- [9] Caro J. Hypoxia regulation gene transcription [J]. High Alt Med Biol, 2001,2(2):145-154
- [10] O'Donnell JL, Joye MR, Shannon Am, et al. Oncological implications of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) expression. Cancer Treat Tew, 2006,32(6):407
- [11] Haitao L, Rankin GO, Liu LZ, et al. Kempferol Inhibits. Angiogenesis and VEGF Expression Through Both HIF Dependent and Independent Pathways in Human Ovarian Cancer Cells [J]. Nutr Cancer,2009,61 (4):554-563
- [12] Marzolini C, Buclin T. Polymorphisms in human MDR1 recent advances and clinical[J]. Clin Pharmacol Ther,2004,75(1):13-33
- [13] 李大卫,吴晴,彭志海等.缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 和P-糖蛋白、多药耐药相关蛋白1、肺耐药相关蛋白在胃癌中的表达及意义[J].中华实验外科杂志,2007,24:537-539  
Li Da-wei, Wu Qing, Peng Zhi-hai, et al. The expression and significant of HIF-1 $\alpha$ , P-gp, MDR1 and LRP in gastric cancer [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery,2007,24:537-539
- [14] Khromova NV, Kopnin PB, Stepanova EV, et al. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway[J]. Cancer Lett, 2009,276: 143-151
- [15] Huang L, Ao Q, Zhang Q, et al. Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancer via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  [J]. Cancer Res Clin Oncol, 2010mar;136(3):447-456