



实体瘤细胞中低氧诱导因子-1 蛋白的活性调控

唐斌^①, 周秀梅^①, 钱其军^{①②*}

① 浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

② 中国人民解放军第二军医大学/东方肝胆外科医院病毒与基因治疗实验室, 上海 200433

* 联系人, E-mail: qianqj@sino-gene.cn

2009-07-16 收稿, 2009-08-19 接受

浙江省重中之重学科开放基金资助项目(批准号: SWYX0820)

摘要 实体肿瘤内部广泛存在着缺氧现象, 缺氧与肿瘤的远处转移、不良预后以及放化疗的耐受性关系密切。低氧诱导因子-1 (HIF-1) 在细胞缺氧信号途径中处于核心位置, 它能增强细胞在缺氧环境下的生存能力, 促进血管的增生及肿瘤的恶性转化。HIF-1 所起的核心作用使其成为治疗人类恶性肿瘤时一个非常好的靶点。HIF-1 在体内的调控途径异常复杂, 主要有氧浓度、葡萄糖代谢途径、原癌基因和抑癌基因的突变、PI3K-MAPK-mTOR 通路、自由基以及抗氧化剂等, 其中研究最透彻的是氧浓度的调节。而近年来自由基、DNA 的突变以及葡萄糖代谢的调节成为研究的热点。本文将围绕近年来这几方面的研究进展进行一个综合的回顾, 这有助于针对 HIF-1 这一重要靶点进行抗肿瘤药物的研究。

关键词

低氧诱导因子 1
缺氧
肿瘤
调控

实体瘤中存在许多不同于正常体细胞的肿瘤细胞, 它可以在缺氧的极端环境下存活。这是由于缺氧激活了许多细胞信号途径来适应缺氧环境。在众多信号途径中, HIF-1 起着中枢纽带的作用。目前对于 HIF-1 调控的下游信号途径, 已有很多文献报道, 本文将重点阐述位于 HIF-1 上游的多种调控因素, 有助于人们深入认识恶性肿瘤的发生机制, 并可通过多种方法降低 HIF-1 的表达水平, 使以 HIF-1 为靶点治疗恶性肿瘤成为肿瘤治疗的有效手段。

1 缺氧与肿瘤

缺氧是实体肿瘤组织内广泛存在的现象。肿瘤细胞因生长失控使其增殖、代谢异常旺盛, 耗氧量随之大幅增加, 而肿瘤内部的血管并没有因为肿瘤组织的快速增长而相应增多。因此, 随着肿瘤的生长, 其内部组织细胞处于缺氧状态。肿瘤血管畸形、血流改变、肿瘤组织水肿、高凝血状态都是造成肿瘤微环境缺氧的原因^[1]。

1955 年, Thomlinson 和 Gray^[2]发现恶性肿瘤内存在缺氧细胞。缺氧在研究中受到重视是因为其对放疗具有抗性作用, 放疗通过产生氧自由基来杀死癌细胞。研究表明, 由于在缺氧状态下氧自由基减少, 造成肿瘤细胞对放疗不敏感。Vaupel 等人^[3,4]首先通过实验将缺氧和肿瘤治疗联系起来, 他们使用氧电极研究肿瘤中氧供情况。结果显示, 在头颈癌、宫颈癌和乳腺癌中, 肿瘤低氧浓度预示着病人更高的肿瘤恶性程度和更低的生存率。其中对宫颈癌的研究最为详尽, 连续测定 103 例进展期宫颈癌组织后发现, 与非缺氧癌组织相比, 缺氧癌组织内癌细胞沿淋巴血管间隙浸润的比例明显增高, 而且缺氧肿瘤患者的无病存活期和总的存活期均较非缺氧的肿瘤患者短。到目前为止, 所有关于宫颈癌组织缺氧程度与预后关系的研究均证实, 癌组织中的缺氧是肿瘤预后不良的指标, 而且可能是导致肿瘤细胞发生恶性转化的因素。许多研究已证实, 低氧是多数实体瘤微环境的特征之一, 与肿瘤的发展、恶性侵袭和远处转

引用格式: 唐斌, 周秀梅, 钱其军. 实体瘤细胞中低氧诱导因子-1 蛋白的活性调控. 科学通报, 2009, 54: 3157~3165

Tang B, Zhou X M, Qian Q J. Regulation of HIF-1 activity in tumor cells (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2009, 54: 3157—3165, doi: 10.1360/972009-495

移、不良预后、放化疗耐受性的产生等有着极其密切的关系。

2 HIF-1 与肿瘤

肿瘤细胞暴露在低氧环境中会启动一系列缺氧反应以维持自身的生存与发展。HIF-1 是一个普遍存在于哺乳动物细胞内的缺氧应答调控因子, 位于缺氧反应信号途径中核心位置。HIF-1 是在研究缺氧诱导的红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因表达时发现的一种 DNA 结合蛋白。1995 年, Wang 等人^[5]利用 *Epo* 基因启动子内部的缺氧反应元件(hypoxia-responsive elements, HREs)及其亲和力第一次纯化出 HIF-1。近年来大量的研究表明, 转录因子 HIF-1 在肿瘤的生长、血管生成、转移及凋亡等方面起着十分重要的作用。HIF-1 是一种由异源二聚体组成的转录因子, 由 HIF1 α 和 HIF1 β 两个亚单位构成。其中 HIF1 α 是主要的功能亚基, 受多种因素的调控; HIF1 β 是一种组成型表达的亚基, 主要起结构性作用, 在细胞内稳定表达。组织学检测发现, HIF1 α 在很多人类癌症中过量表达, HIF1 α 过量表达和病人死亡率之间存在重要的联系, 这一点在脑癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、咽癌和子宫癌得到了证实^[6]。研究发现, 缺氧诱导后 HIF-1 可以识别许多基因启动子内部的 HREs, 从而控制基因的表达, 如可以调控糖分解代谢途径中涉及的酶类、葡萄糖转运子以及生长因子(包括在血管生成中起关键作用的基因 VEGF-A 和 Ang-2)等的表达。参与糖分解代谢的酶类以及葡萄糖转运子对保证肿瘤细胞在快速分裂增殖过程中的能量供应至关重要, 是肿瘤发生恶性转化的生物能量学基础。HIF-1 调控的基因和蛋白以不同方式参与了肿瘤细胞对缺氧的适应过程, 从而增强肿瘤细胞在缺氧环境下的生存能力, 促进肿瘤细胞的恶性转化。

HIF1 α 在许多恶性肿瘤中过表达, 其积累往往和病人的低生存率相关, 如早期的宫颈癌^[7]、卵巢癌^[8]等。然而在头颈癌^[9]和非小细胞肺癌^[10]病人中 HIF1 α 的过表达往往意味较低的死亡率。这说明 HIF1 α 对于肿瘤恶性程度的影响可能具有组织特异性。

3 影响 HIF-1 活性的因素

由于 HIF-1 在肿瘤生长、发展及其治疗效果中起着至关重要的作用, 因此了解 HIF-1 活性在机体内受哪些因素的调控显得尤为重要。HIF-1 的活化是一个异常复杂的多步骤过程, 包括 HIF1 α 的表达、蛋白的

稳定、转录功能的激活以及与其他蛋白的互相作用。

目前的研究认为 HIF-1 活性主要受以下几种因素的调控。

3.1 组织内氧浓度的调节

常氧浓度下, HIF-1 在体内通过泛素蛋白酶体途径降解。HIF-1 本身不能直接感应氧浓度的变化, 真正感知氧浓度并控制缺氧应答反应的是一类依赖于 α -酮戊二酸的氧化酶。这类氧化酶分为两大类: 脯氨酸羟化酶(PHDs)和天冬酰胺羟化酶(FIH)。

人体内的 PHDs 有 3 种, 分别是 PHD1, PHD2, PHD3。PHD1 只存在于细胞核, PHD2 主要位于细胞质, PHD3 在细胞质和核中分布均衡。PHD2 是降解 HIF1 α 的关键性限速酶, PHD1 与 PHD3 的作用还有待进一步的研究, 也有研究认为, PHD2 与 PHD3 活性类似, 而 PHD1 的活性最低^[11]。PHDs 均属于 Fe^{2+} 和 α -酮戊二酸依赖的双加氧酶超基因家族, 以氧作为底物, 使氧浓度和 HIF-1 之间发生联系。在常氧条件下, PHDs 羟化 HIF1 α 分子 402 位和 564 位的脯氨酸。3 种 PHDs 都可以羟化 HIF1 α 第 564 位的脯氨酸, 但仅 PHD1 和 PHD2 可以羟化 402 位的脯氨酸。当两个位点都被脯氨酸羟化后, HIF1 α 很快与肿瘤抑制蛋白 VHL 相作用, VHL 第 98~112 位的氨基酸形成一个 β 构象, 介导 VHL 与 HIF1 α 稳定结合, 接下来 HIF1 α 被多聚泛素链标记, 进而启动 HIF1 α 经泛素蛋白酶体途径降解^[12]。

第 2 种类型氧化酶 FIH 在常氧时羟化 HIF1 α 分子 C 末端 803 位的天冬酰胺酸, 从而使含有该天冬酰胺酸的转录活化区不能与转录共活化因子 p300 和 CBP 相互作用, 最终使 HIF-1 失去转录因子的活性^[13]。

在缺氧时 PHDs 和 FIH 的酶活性受到极大的抑制, 不能修饰 HIF1 α 上的氨基酸, 使 HIF1 α 在体内大量积累并激活了其转录活性。然而最近 Ginouvès 等人^[14]发现, 长期缺氧(对线粒体呼吸功能健全的细胞缺氧处理 3~5 d)反而会导致 HIF1 α 在细胞内的降解。长期缺氧会抑制线粒体的呼吸功能, 导致细胞内部用于 HIF1 α 分解的可供氧增加, 引起 PHDs 活性显著升高。这是因为在正常生理状态下, 线粒体通过氧化磷酸化消耗 90% 的氧, 而其余 10% 的氧用于其他的生理活动, 如 HIF1 α 和 HIF2 α 的分解, 此时酶的 K_m 值甚至达到了正常氧浓度时的水平。同时研究人员认为,

FIH 对长期缺氧也会做出类似反应, 与 PHDs 合作共同使 HIF-1 失去行使转录因子的功能. 研究中使用了一种线粒体呼吸功能缺陷的 GSK3 细胞, 对其进行长期缺氧处理, 仍维持了高浓度的 HIF-1, 结果细胞全部死亡. 而其他线粒体呼吸功能正常的细胞在 HIF1 α 被降解后, 依然存活, 此时 HIF-1 是一种致死因子. 而在短期缺氧时, 则是一种促使细胞适应环境的生存因子. 小鼠体内实验发现, 短期缺氧会抑制 PHDs 的活性而积累 HIF1 α . 一旦长期缺氧, PHDs 受到激活导致 HIF1 α 被降解. 当用 RNAi 沉默 PHD 时, HIF1 α 又开始积累.

常氧下不仅可以通过羟基化 HIF1 α 特定位点的氨基酸来调控其活性, 还可以通过乙酰化修饰来影响 HIF1 α 的稳定性. 常氧下 HIF1 α 第 532 位的赖氨酸在 ARD1 乙酰转移酶催化下发生乙酰化, 乙酰化的赖氨酸与羟基化的脯氨酸共同招募 VHL, 降解 HIF1 α . 研究发现, 缺氧时 ARD1 表达量减少, 随着缺氧时间的延长, 乙酰化的 HIF1 α 含量逐渐降低, 而 HIF1 α 的蛋白水平增加^[15].

以上的蛋白酶降解途径都必需依赖 VHL 蛋白, 也有人发现了 HIF1 α 非 VHL 依赖的蛋白降解途径. Isaacs 等人^[16]发现, 热休克蛋白 90 (HSP90) 可以结合到 HIF1 α 上增加其稳定性, 用 HSP90 的抑制剂会导致在缺乏 VHL 功能的细胞中 HIF1 α 进入蛋白酶体降解途径. Liu 等人^[17]发现, 活性蛋白 C 激酶受体(RACK1) 和 HSP90 竞争结合到 HIF1 α 的 81~200 位点, RACK1 诱导 HIF1 α 发生降解依赖于蛋白酶体降解途径, 但不依赖 O₂, 脯氨酸羟基化和 VHL 功能.

3.2 自由基

自由基指含有未配对电子的原子团, 生物体内存在的主要是氧自由基(ROS). 氧自由基是线粒体上电子传递的产物, 由分子氧得到一个电子形成, 是具有高反应活性的一类自由基或分子. 在细胞中最初以过氧化物的形式出现, 被超氧化物歧化酶催化后生成 H₂O₂, 然后在过氧化氢酶或谷胱甘肽过氧化物酶催化下分解为 H₂O. 体内活性氧自由基具有许多功能, 如免疫和信号传导过程. 然而过多的氧自由基会使 DNA 发生突变, 引起多种疾病, 如心脏病、肿瘤、帕金森症和老年痴呆症. 氧自由基对 HIF-1 活性的调节至少与氧浓度调节一样重要, 其调控的复杂程度更是远远超过氧浓度^[18].

常氧条件下添加外源的 H₂O₂ (0.1~1 mmol/L),

在细胞中没有检测到稳定的 HIF1 α . 随后的研究发现, H₂O₂ 即使在无血清培养基中也会被细胞快速降解, 改变添加方法, 如在 Hep3B 细胞中每隔 15 min 添加 H₂O₂ 1 次, 共处理 2 h, 会观察到 HIF1 α 蛋白的积累; 此外用 40 μ mol/L H₂O₂ 处理 293 细胞, 15 min 处理一次, 共处理 10 h, 也会得到类似的结果. 这些结果表明低水平的过氧化氢足以稳定 HIF1 α ^[19].

Chandel 等人^[19]认为, 缺氧状态下的氧感知分子是依赖于线粒体产生的 ROS 而非 PHDs. 线粒体缺失的 ρ^0 细胞缺氧时并没有增加 HIF1 α 的含量. 此外, 过氧化氢酶过量表达会降低缺氧下 HIF1 α 的稳定性, 而用 H₂O₂ 处理细胞后, 会重新观察到 HIF1 α 表达的增加. Guzy 等人^[20]采用 RNAi 下调线粒体呼吸链复合物 III 的一个组分, 结果显示, 缺氧下 HIF1 α 的稳定性以及 ROS 的产生都受到极大的影响, 再加入 H₂O₂ 后发现, 细胞恢复了稳定 HIF1 α 的功能. 细胞色素 C 负责在复合物 II 和 III 之间传递电子, 将鼠胚纤维原细胞中的细胞色素 C 失活, 缺氧后不能引起 HIF1 α 的稳定, 加入 H₂O₂ 后, 恢复了 HIF1 α 的稳定性. 其他的一些减少 ROS 生成的实验, 如下调线粒体转录因子 A, 或过表达线粒体 MnSOD, 都出现了抑制 HIF1 α 的现象^[21,22].

NO 也是一类自由基, 是哺乳动物内源性胞内氧调节因子, 具有多种生物学功能. 在肿瘤中由巨噬细胞内可诱导性 NO 合成酶合成分泌, NO 合成酶在许多肿瘤以及浸润的巨噬细胞中均过量表达, 提示 NO 在肿瘤的发生发展过程中起着重要作用.

常氧条件下 NO 与 O₂ 竞争位于氧化酶活性位点的铁离子, 因此也是 PHD 和 FIH 的抑制剂, 向细胞中加入 NO 供体 S-亚硝基谷胱甘肽, 导致 HIF1 α 的积累和活化^[23]. Yasinska 等人^[24]发现, NO 亚硝基化 HIF1 α 第 800 位 Cys 上的巯基后, 增加 HIF1 α 与 CREB/p300 的亲和力而刺激 HIF-1 的转录活性. 肿瘤在进行放疗时通常会产生不依赖于缺氧的 HIF-1 活性激活, 研究该种情况下 HIF-1 的调控机制对于肿瘤的治疗相当重要. Li 等人^[25]发现, 在治疗期间, NO 作为主要的 HIF-1 活性调节因子直接亚硝基化 HIF1 α 氧降解结构域(ODD)上的 Cys⁵³³. 这是一种新的不依赖于 PHD 途径的 HIF-1 调节机制. NO 也可以促进 HIF-1 与转录共刺激因子 HAS 结合, 提高其转录活性^[26]. 另外, 据报道, NO 也可通过激活 PI3K-MAPK 途径来上调 HIF1 α 蛋白的合成速度^[27].

Hagen 等人^[28]发现,在缺氧条件下,NO 通过抑制细胞色素 c 氧化酶来抑制线粒体呼吸.氧被重新分配到细胞质中,PHDs 活性的大幅度提高,引起 HIF1 α 的降解.使用 NO 可以在 HIF-1 与 PHD2 之间产生一个反馈调节,向细胞中第一次添加 NO,会引起 HIF1 α 的暂时增加,刺激 PHD2 的表达,PHD2 水平的提高反过来又抑制了 HIF1 α 的表达水平^[29].

3.3 磷脂酰 3-激酶(PI3K)或有丝分裂原蛋白激酶(MAPK)信号途径

Jiang 等人^[30]发现,胰岛素可以通过 PI3K 途径诱导 VEGF 的表达,推测它可能也会调节 HIF1 α 的表达.接下来的研究发现,在骨肉瘤细胞 U2-OS,肾癌细胞 ACHN 和前列腺癌细胞 DU145 中,分别加入 200 μ mol/L 胰岛素 6 h 后,检测到高水平的 HIF1 α ,而对于 HIF1 β 的表达水平无影响.进一步的研究发现,当分别添加 PI3K 抑制剂 LY294002 和渥曼青霉素后,均会抑制胰岛素对 HIF1 α 的诱导,如果提高抑制剂的浓度,将减少 HIF1 α 至本底水平以下.上述实验证明,胰岛素上调 HIF1 α 需要 PI3K 途径的参与.另外,表皮生长因子(EGF),IGF1 和 IGFII 对于 HIF1 α 的诱导效应和胰岛素类似,也依赖于 PI3K 途径^[31].考虑到蛋白酶体的降解过程由蛋白的磷酸化所调节,推测 PI3K 可能通过抑制蛋白激酶或活化磷酸(酯)酶从而干扰 HIF1 α 和 VHL 之间的相互作用^[32].

Laughner 等人^[33]研究发现,用 heregulin 生长因子刺激人乳腺癌细胞 MCF-7 后,活化了 PI3K-AKT-mTOR 通路,大幅度提高了 HIF1 α 的蛋白合成速度,而非影响其稳定性上调 HIF1 α 浓度,这种调节需要 HIF1 α 的 mRNA 5'端非翻译区的一段序列.mTOR 磷酸化的许多下游蛋白都参与蛋白质合成的调节.Fukuda 等人^[34]研究了胰岛素样生长因子-1(IGF-1)对于结肠癌细胞 HCT16 中 HIF1 α 的调节,发现其调节机制也是通过增加 HIF1 α 的合成速度,而非影响其稳定性.IGF-1 刺激 HCT16 细胞中 HIF1 α 的增加依赖于 PI3K 和 MAPK 途径,其机制是激活 MAPK 途径来解除蛋白合成抑制(磷酸化 4E-BP1)和激活蛋白质合成(通过磷酸化 eIF-4E 和 p70^{S6K}).

生长因子刺激 HIF1 α 的水平增加与缺氧刺激的有所不同.缺氧调控 HIF1 α 可以发生在任何细胞中,而生长因子的刺激具有细胞特异性.另外,缺氧是减

少 HIF1 α 的降解,而生长因子等刺激是通过激活 PI3K 或 MAPK 来增加 HIF1 α 的合成.

除了影响 HIF1 α 的合成,RAF-MEK-ERK 途径还激活了 HIF1 α 的转录激活结构域.例如,已发现 p42/p44 MAPK 可以磷酸化 HIF1 α 并且提高 HIF-1 转录活性^[35].Sang 等人^[36]研究了提高转录活性的机理,发现一旦抑制 MAPK 途径,就会干扰 HIF1 α 的磷酸化以及与 p300 的相互作用,抑制 p300 的转录活性,并且认为 HIF1 α 与 p300 的相互作用并不需要 HIF1 α 的磷酸化.

很多癌基因的信号通路都有 PI3K 的参与.Christine 等人^[37]利用 LY29400,一种 PI3K 的特异抑制剂,测试了一系列含有不同遗传突变背景的乳腺癌细胞,这些细胞有的转染了突变的 RAS 基因或者 AKT 基因,有的是 *erbB2* 基因大量扩增的细胞,还有 PTEN 突变和 EGF 受体大量扩增或者是针对 EGF 有反应的细胞,同时也测定了 pVHL 缺陷的肾癌细胞.结果显示,在缺氧下,LY29400 会抑制 HIF1 α 的表达和磷酸化,使用 PI3K 抑制剂下调 HIF1 α 蛋白表达不依赖于 VHL 途径,因此也不会引起泛素化的增加和蛋白酶体的降解.这些结果证明,使用 PI3K 抑制剂抑制癌基因和生长因子对于 HIF1 的活化,有一定的治疗意义,这些抑制剂也可用于 pVHL 缺陷导致的 HIF1 α 组成型激活的肾癌.

3.4 抑癌基因和癌基因

随着遗传基因的持续突变,肿瘤细胞不断地适应缺氧环境,在这种适应过程中最重要的是依赖 HIF-1 的活性,因此能够提高 HIF-1 活性的基因突变更有可能被保留下来.肿瘤中的基因突变主要包含两类:癌基因的表达和抑癌基因的失活.

研究得最清楚的是抑癌基因 pVHL 功能丢失对 HIF-1 的调节作用.pVHL 的缺失主要发生在肾癌,缺失 pVHL 的肾癌细胞系表现出 HIF-1 的持续激活,重新表达 pVHL 后,细胞又恢复了对 HIF-1 的调控^[38].pVHL 的 pVHL β 结构域识别并结合到羟基化的 HIF1 α ,其 α 结构域与 elongin B, elongin C, Cul2, Rbx1 和 NEDD8 结合组成 E3 泛素连接酶体复合物,将多聚泛素化尾巴共价结合到 HIF1 α 上^[39].

Blagosklonny 等人^[40]发现,野生型 P53 会抑制 HIF1 α 的转录活性,于是提出了解释 P53 抑制 HIF1 α 的一种机制,HIF1 α 和 P53 分别同时与转录激活因子

P300 的不同部位相结合, 导致 P53 对 HIF/P300 转录激活的干扰. 为了验证这个假设, Blagosklonny 等人设计了只含有 p53 结合位点的 P300 片段, 将其转入细胞后极大地降低了 P53 对 HIF-1 的抑制. 为了确证 P300 在 P53 抑制 HIF-1 中的作用, 突变 P53 第 22 和 23 位氨基酸使其不能结合到 P300 上, 突变体不能抑制 HIF-1 的转录活性, 证明了 p53 必须结合到 p300 上才可以抑制 HIF-1 的活性. 此外 Ravi 等人^[41]发现, P53 在体内可以和 HIF1 α 相互作用, 并且认为 P53 通过招募 E3 泛素蛋白连接酶(Mdm2)介导 HIF1 α 的泛素降解途径. 在许多肿瘤中 P53 的失活会引起 HIF-1 的稳定, 从而诱导下游 VEGF 的表达, 促进肿瘤血管新生, 并且 P53 还会抑制血管新生抑制因子 TSP-1 的活性, 因此 P53 的失活也是一种有效的血管新生的刺激因素. 另一个肿瘤抑制蛋白 p14^{ARF} 是 Mdm2 的负调节因子, 可以与 Mdm2 牢固结合使其从细胞质转移到细胞核, 这种在细胞核内的扣押, 阻止了 Mdm2 降解 P53, 导致 P53 的活性增强^[42]. Fatyol 等人^[43]证明, p14^{ARF} 明显抑制 HIF1 α 的转录活性, HIF-1 和 p14^{ARF} 的结合不需要 P53 和 Mdm2, 二者结合后 HIF1 α 被转移到核仁中, 从而阻止 HIF1 α 到达其靶位点或转录所需要的蛋白, 这是一种新的调节转录因子的方式.

抑癌基因 PTEN 是一种 PI3K/Akt 通路拮抗剂, PTEN 基因的变异或沉默是很多肿瘤的特征. 恶性胶质瘤细胞株 U373 的 PTEN 基因发生缺失, 引起 PI3K/Akt 通路的激活, 增强细胞对于凋亡的抗性, 诱导 HIF-1 和 VEGF 的表达. 将 PTEN 基因重新转入 U373 后, 缺氧处理时发现, 已经检测不到 HIF1 α 的表达, 而 PTEN 突变后则大大增强了 HIF1 α 蛋白的稳定性^[44].

另外, 原癌基因 ERBB2 的表达在常氧下也会增加 HIF1 α 及其下游调控基因的表达, 其蛋白产物是 Her2 受体, 在三分之一的乳腺癌中发现 ERBB2 遗传改变, 而且预后很差. Her2 激活后, 会活化下游的 PI3K-AKT 信号, 最终激活下游的激酶 FRAP, HIF1 α 蛋白的合成速度加快, 而蛋白本身的稳定性没有受到影响^[45].

无论缺氧还是常氧条件下, 原癌基因, 如 H-RAS-V12, SRC 和 AKT 的过量表达, 均导致 HIF1 α 的细胞内积累. 常氧下在转入前两个基因的细胞中没有检测到 564 位的脯氨酸羟基化的 HIF1 α , 该结果证明这两个癌基因在常氧下通过抑制 HIF1 α 的羟基化而起到稳定 HIF1 α 蛋白的作用, 同时也解释了常氧条件下

许多 VHL 基因正常的实体瘤中仍然具有高水平 HIF1 表达的原因. 值得注意的是转入 AKT 的细胞中检测到了 564 位脯氨酸被羟基化的 HIF1 α , 这说明还存在另一种常氧下不依赖于 PHD 可以稳定 HIF1 α 的机制^[46].

3.5 葡萄糖代谢

HIF-1 可以驱动葡萄糖的有氧糖酵解, 葡萄糖代谢物也可以通过正反馈来调节 HIF1 α . 研究发现, 抑癌基因琥珀酸脱氢酶(SDH)突变后引起恶性嗜铬细胞瘤, 而延胡索酸酶(FH)基因突变后会引发乳突状肾癌, 平滑肌瘤和子宫纤维瘤的分化^[47]. SDH 和 FH 蛋白位于线粒体上, SDH 是电子传递链复合物 II 的组分之一, 两种酶都参与 TCA 循环. SDH 和 FH 基因发生突变后, 分别引起琥珀酸和延胡索酸的积累.

高水平的琥珀酸和延胡索酸使 PHD 酶失去活性, 最终导致 HIF1 α 在常氧下稳定存在. 有人推测, 二者对 PHD 活性的抑制是通过和 PHD 的底物 α -酮戊二酸竞争来实现的. MacKenzie 等人^[48]通过实验证明, 琥珀酸与延胡索酸对 PHD 产生抑制, 而 α -酮戊二酸在体外实验中可逆转这一抑制过程. α -酮戊二酸是一种亲水性物质, 通过细胞膜的效率很低, 膜通透性好的类似物可以重新激活 PHD 的活性. 这种 α -酮戊二酸类似物对于一些 SDH 突变或下调的肿瘤有潜在的治疗潜力, 可以重新恢复 HIF1 α 在正常组织中的低水平状态.

许多其他内源性葡萄糖代谢产物, 如丙酮酸、草酰乙酸和乳酸, 在常氧下也起到稳定 HIF1 α 的作用^[49].

胶质母细胞瘤中异柠檬酸脱氢酶-1(IDH1)在 R132 位发生了突变, 但是发生突变后的蛋白如何引起肿瘤的发生却不为人所知. 最近复旦大学 Zhao 等人^[50]发现, 突变后的蛋白会抑制野生型 IDH1 酶的活性, 从而导致产物 α -酮戊二酸减少, 引起 HIF1 α 水平上升; 而 α -酮戊二酸类似物可以逆转这一过程, 阻止 HIF 信号通路的激活.

3.6 抗氧化剂

抗坏血酸, N-乙酰半胱氨酸等抗氧化剂是一种有效的抗癌药物, 传统的观点认为抗癌机制是可以减少基因组 DNA 的氧化性损伤, 但尚未完全确定. Dang 等人^[51]通过体内实验证实二者确实产生显著的抗肿瘤效应, 认为此效应高度依赖 HIF-1 而不是因为

减少了基因组的损伤. 对临床而言, Dang 等人指出, 在针对 HIF-1 依赖的肿瘤复发时可以将抗氧化剂应用于联合治疗, 另外 Dang 等人认为, 在小鼠实验中的使用剂量超过目前临床上使用的量, 因此有必要提高抗氧化剂在临床上的使用量.

4 结语

肿瘤放疗后, 往往出现 HIF-1 活性增强, HIF-1 活化的主要原因是 ROS 的产生增加和“stress granules”的裂解. 缺氧是动态过程, 缺氧的细胞会由于供氧条件的改善而进入常氧状态, 细胞的氧环境改变会导致细胞损伤, 产生一种副产物——氧自由基; 缺氧肿瘤内的“stress granules”是蛋白与 mRNA 的复合物, 主要是 HIF-1 下游调控基因的 mRNA, 放疗后随着一些肿瘤细胞的死亡, 肿瘤内部的氧供情况将会大大好转, 此时“stress granules”发生裂解, 而释放的下游基因 mRNA 开始翻译. 此外, 肿瘤细胞死亡后, 吸引巨噬细胞进入肿瘤, 激活 NO 合成酶, 分泌 NO. 就目前所知, 放疗后通过以上 3 种途径共同激活 HIF-1 的活性^[18], 而 HIF-1 调控的下游基因表达又直接引起肿瘤对于放疗的抗性, 因此放疗或化疗后, 结合 HIF-1 的抑制将是非常有吸引力的策略.

MicroRNAs 通过翻译抑制或降解 mRNA 来调控绝大多数基因的表达, 因此在许多生命活动中起着重要的作用. 最近发现缺氧可以诱导一系列 microRNAs 的产生, 也可以下调另外一些 MicroRNA 的表达. 而 HIF1 α 可以和其中的一些 MicroRNA 启动子结合从而调控其表达^[52]. 未来的研究方向可考虑集中探究这些 MicroRNA 有哪些下游调控基因, 以及这些基因在肿瘤发生方面的作用. 笔者推测, 或许存在可以调控 HIF1 α 表达的 MicroRNA, 通过对这些 MicroRNA 进行调控将会对 HIF-1 活化的肿瘤治疗提供新视野.

靶向 HIF-1 信号通路有很多优势, 一个很重要的原因是可以选择性地靶向缺氧的肿瘤细胞. 抑制 HIF-1 通路的策略可以直接针对 HIF-1, 如抑制其翻译或促进其降解, 也可以抑制 HIF-1 的关键性下游靶基因, 如 VEGFA, TGF- α 和 MicroRNA 等. 已经有一些针对

HIF-1 关键性下游靶基因的药物进入临床使用, 如专门针对 VEGF 的单抗 bevacizumab (avastin, Genentech), 目前在转移性的结肠癌中已广泛应用.

我们实验室利用缺氧启动子调控腺病毒 E1b 基因, 构建了选择性增殖腺病毒 CNHK500, 缺氧启动子由 5 个重复的 HREs 和一个最小的 CMV 核心启动子构成, HepG2, Hep3B 等癌细胞与正常细胞 BJ, L02 在缺氧处理后, 由缺氧启动子调控的 Luciferase 表达量比常氧条件下增加 6.7~10.8 倍, 证实了缺氧启动子的有效性. 腺病毒 CNHK500 的 E1b 基因在 HIF-1 阳性肿瘤细胞中的选择性表达, 保证了病毒在肿瘤细胞中的有效复制, 其复制效率甚至超过了野生型腺病毒. 而正常细胞中, CNHK500 的复制效率比无缺氧启动子调控的腺病毒 CNHK300 低 90% 以上. 体内实验证明, 小鼠肝癌模型中肿瘤出现显著地消退, 生存时间大大延长, 对照组, 低剂量 CNHK500 治疗组, 高剂量 CNHK500 治疗组小鼠的平均生存时间分别为 71, 107 和 127 天^[53]. 为了进一步增强病毒对于肿瘤的杀伤效果, 将一些治疗基因(如 p53, endostatin)插入到病毒基因组中, 治疗基因随着病毒的复制, 拷贝数及表达量会大大增加. 病毒基因组内插入 p53 基因, 我们发现向 NCI-H1299 肿瘤小鼠模型中注射 2×10^9 pfu 病毒时, 肿瘤生长被完全抑制^[54,55].

我们还设计了另外一种专门靶向 HIF-1 阳性细胞的溶瘤腺病毒 VT100, 将 HIF1 α 的一段 ODD_{557~574} (oxygen degradation domain, 氧降解结构域)与腺病毒增殖关键基因 E1A 融合, 从而使腺病毒在缺氧的癌细胞中增殖, 而在正常组织中不复制, 降低溶瘤腺病毒对正常组织的毒性, 目前的数据证实 VT100 在正常细胞中几乎不增殖.

HIF-1 对于肿瘤生物学功能的影响极其复杂, 随着控制 HIF-1 的上游信号途径以及下游靶基因研究的不断进展, 以 HIF-1 为靶点治疗肿瘤有望成为靶向杀伤缺氧肿瘤细胞的重要策略. 目前以 HIF-1 α 为靶点的抗肿瘤治疗正成为许多基础和临床研究的热点, 已出现的靶向 HIF-1 的治疗药物展现了诱人的前景.

参考文献

- 1 Brown J M, Giaccia A J. The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*, 1998,

- 58: 1408—1416
- 2 Thomlinson R H, Gray L H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*, 1955, 4: 539—49
- 3 Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 266—276[[doi](#)]
- 4 Hockel M, Schlenger K, Hockel S, et al. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res*, 1999, 18: 4525—4528
- 5 Wang G L, Semenza G L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 1995, 270: 1230—1237[[doi](#)]
- 6 Semenza G L. Targeting Hif-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 721—732[[doi](#)]
- 7 Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1a is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*, 2000, 60: 4693—4696
- 8 Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1a in epithelial ovarian tumors: Its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 1661—1668
- 9 Beasley N J, Leek R, Alam M, et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1a and HIF-2a in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res*, 2002, 62: 2493—2497
- 10 Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res*, 2000, 20: 1527—1533
- 11 Tuckerman J R, Zhao Y, Hewitson K S, et al. Determination and comparison of specific activity of the HIF prolyl hydroxylases. *FEBS Lett*, 2004, 576: 145—150[[doi](#)]
- 12 Epstein A C, Gleadle J M, McNeill L A, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 2001, 107: 43—54[[doi](#)]
- 13 Lando D, Peet D J, Whelan D A, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 2002, 295: 858—861[[doi](#)]
- 14 Ginouvès A, Ilc K, Macías N, et al. PHDs overactivation during chronic hypoxia ‘desensitizes’ HIF α and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4745—4750[[doi](#)]
- 15 Jeong J W, Bae M K, Ahn M Y, et al. Regulation and destabilization of HIF-1a by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 2002, 111: 709—720[[doi](#)]
- 16 Isaacs J S, Jung Y J, Mimnaugh E G, et al. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem*, 2002, 277: 29936—29944[[doi](#)]
- 17 Liu Y, Baek J, Zhang H, et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*, 2007, 25: 207—217[[doi](#)]
- 18 Dewhirst M W, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 425—437
- 19 Chandel N S, McClintock D S, Feliciano C E, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*, 2000, 275: 25130—25138[[doi](#)]
- 20 Guzy R D, Hoyos B, Robin E, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*, 2005, 1: 401—408[[doi](#)]
- 21 Bell E L, Klimova T A, Eisenbart J, et al. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol*, 2007, 177: 1029—1036[[doi](#)]
- 22 Venkataraman S, Jiang X, Weydert C, et al. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene*, 2005, 24: 77—89[[doi](#)]
- 23 Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, et al. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell*, 2003, 14: 3470—3481[[doi](#)]
- 24 Yasinska I M, Sumbayev V V. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett*, 2003, 549: 105—109[[doi](#)]
- 25 Li F, Sonveaux P, Rabbani Z N, et al. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*, 2007, 26: 63—74[[doi](#)]
- 26 Kimura H, Weisz A, Ogura T, et al. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, 2001, 276: 2292—2298
- 27 Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem*, 2004, 279: 2550—2558[[doi](#)]
- 28 Hagen T, Taylor C T, Lam F, et al. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 α . *Science*, 2008, 302: 1975—1978[[doi](#)]
- 29 Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, et al. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor

- 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *J Biol Chem*, 2007, 282: 1788—1796[[doi](#)]
- 30 Jiang B H, Zheng J Z, Aoki M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1749—1753[[doi](#)]
- 31 Feldser D, Agani F, Iyer N V, et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, 1999, 59: 3915—3918
- 32 Jiang B H, Jiang G, Zheng J Z, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ*, 2001, 12: 363—369
- 33 Laughner E, Taghavi P, Chiles K, et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 3995—4004[[doi](#)]
- 34 Fukuda R, Semenza G L. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 38205—3821[[doi](#)]
- 35 Richard D E, Berra E, Gothie E, et al. P42/p44 mitogenactivated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, 1999, 274: 32631—32637[[doi](#)]
- 36 Sang N, Stiehl D P, Bohensky J, et al. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem*, 2003, 278: 14013—14019[[doi](#)]
- 37 Blancher C, Moore J W, Robertson N, et al. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res*, 2001, 61: 7349—7355
- 38 Maxwell P H, Wiesener M S, Chang G W, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 1999, 399: 271—275[[doi](#)]
- 39 Tuckerman J R, Zhao Y, Hewitson K S, et al. Determination and comparison of specific activity of the HIF prolyl hydroxylases. *FEBS Lett*, 2004, 576: 145—150[[doi](#)]
- 40 Blagosklonny M V, An W G, Romanova L Y, et al. p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem*, 1998, 273: 11995—11998
- 41 Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala Z M, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev*, 2000, 14: 34—44
- 42 Weber J D, Taylor L J, Roussel M F, et al. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 20—26[[doi](#)]
- 43 Fatyol K, Szalay A A. The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and inhibits HIF-1-mediated transcription. *J Biol Chem*, 2001, 276: 28421—28429[[doi](#)]
- 44 Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, 2000, 14: 391—396
- 45 Laughner E, Taghavi P, Chiles K, et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 3995—4004[[doi](#)]
- 46 Chan D A, Sutphin P D, Denko N C, et al. Role of Prolyl Hydroxylation in Oncogenically Stabilized Hypoxia-inducible Factor-1 α . *J Biol Chem*, 2002, 277: 40112—40117[[doi](#)]
- 47 Gottlieb E, Tomlinson I P. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 857—866[[doi](#)]
- 48 MacKenzie E D, Selak M A, Tennant D A, et al. Cell-permeating α -ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 3282—3289[[doi](#)]
- 49 Lu H, Dalgard C L, Mohyeldin A, et al. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem*, 2005, 280: 41928—41939[[doi](#)]
- 50 Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*, 2009, 324: 261—265[[doi](#)]
- 51 Gao P, Zhang H, Dinavahi R, et al. HIF-dependent anti-tumorigenic effect of anti-oxidants *in vivo*. *Cancer Cell*, 2007, 12: 230—238[[doi](#)]
- 52 Kulshreshtha R, Davuluri R V, Calin G A, et al. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 667—671[[doi](#)]
- 53 Zhang Q, Chen G, Peng L, et al. Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 6523—6531[[doi](#)]
- 54 Wang X, Su C, Cao H, et al. A novel triple-regulated oncolytic adenovirus carrying p53 gene exerts potent antitumor efficacy on common human solid cancers. *Mol Cancer Ther*, 2008, 6: 1598—1603[[doi](#)]

- 55 Su C, Na M, Chen J, et al. Gene-viral cancer therapy using dual-regulated oncolytic adenovirus with antiangiogenesis gene for increased efficacy. *Mol Cancer Res*, 2008, 4: 568—575[[doi](#)]

Regulation of HIF-1 activity in tumor cells

TANG Bin¹, ZHOU XiuMei¹ & QIAN QiJun^{1,2}

¹ Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

² Laboratory of Gene and Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, The Second Military and Medical University, Shanghai 200433, China

Hypoxia regions, which have been demonstrated to widely exist in various solid tumors, are associated with remote metastasis, bad prognosis and resistance to radiation and chemotherapy. Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) plays a crucial role in the hypoxia signaling pathway. It not only increases the viability of tumor cells under the hypoxia condition, but also stimulates angiogenesis and malignant transformation. Therefore, HIF-1 is regarded as a very attractive target in cancer treatment. The regulating pathways of HIF-1 are extremely complex, including oxygen concentration, glucose metabolism, mutations in proto-oncogenes and cancer suppressor genes, the PI3K-MAPK-mTOR signaling pathway, free radicals, antioxidants, etc. The regulation of oxygen concentration has been well studied, while the regulations of free radicals, DNA mutation and glucose metabolism are the current hot spots. This paper reviews the elaborate progress in the regulation of HIF-1 activity, which is expected to be helpful to research on anti-tumor drugs targeting HIF-1.

HIF1, hypoxia, tumor, regulation

doi: 10.1360/972009-495