

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.01.002

• 基础研究 •

# 纳米金对裸鼠肝癌HIF-1 $\alpha$ 和VEGF mRNA表达及肿瘤血管的影响

傅岳武<sup>1</sup>, 潘运龙<sup>1</sup>, 覃莉<sup>2</sup>, 赵晓旭<sup>1</sup>, 巫青<sup>1</sup>, 蔡继业<sup>3</sup>, 刘英梅<sup>4</sup>

## Effects of Gold Nano Particles on HIF-1 $\alpha$ and VEGF mRNA Expression and Normalizing Vasculum in Hepatic Tumor of Nude Mice

FU Yuewu<sup>1</sup>, PAN Yunlong<sup>1</sup>, QIN Li<sup>2</sup>, ZHAO Xiaoxu<sup>1</sup>, WU Qing<sup>1</sup>, CAI Jiye<sup>3</sup>, LIU Yingmei<sup>4</sup>

1.Department of General Surgery,The First Affiliated Hospital,School of Medicine, Ji'nan University,510630 Guangzhou,China;2.Department of Histology and Embryology,School of Medicine, Ji'nan University;3. Department of Nato-biotechnology,School of Life Science, Ji'nan University;4.Department of Cardiology,The SUN Yat-sen Memorial Hospital Affiliated SUN Yat-sen University

Corresponding Author: PAN Yunlong, E-mail: tpanyl@jnu.edu.cn



**Abstract: Objective** To observe the effects of GNP (goldnano particles,GNP) on nude mice hepatic tumor vascular morphology and the expression of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA. **Methods** Hepatocellular cancer cell line H22 were injected subcutaneously into the right armpits of 14 Balb/c nude mice. When the diameter of transplanted tumor reached about 7-8 mm,they were randomly divided into 2 groups, and drugs with GNP or normal saline were injected respectively. For 7 days later, the tumor vascular diameter and blood volume were measured by Doppler ultrasound. When the mice were sacrificed, the tumor's size was calculated and the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA were detected by *in situ* hybridization. **Results** (1)The tumor's size in experiment group ( $0.935\pm 0.129\text{ cm}^3$ ) was decreased in comparison with that in control group ( $1.573\pm 0.247\text{ cm}^3$ ), there was significantly difference ( $P<0.05$ ). (2) The tumor's vascular diameter and blood volume in experiment group were ( $0.6397\pm 0.1548$ )mm and ( $1.171\pm 0.241$ ) $\text{cm}^3$  respectively, they were all significantly reduced in comparison with those in control group ( $1.1000\pm 0.3247\text{ mm}$ ,  $2.357\pm 0.408\text{ cm}^3$ )( $P<0.05$ ). (3)The expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA ( $15.3\pm 7.4\%$ ) and VEGF mRNA ( $23.7\pm 9.5$ ), were dramatically attenuated in comparison with those in control group [( $67.2\pm 13.1$ )%, ( $70.3\pm 14.6$ )%] ( $P<0.05$ ). **Conclusion** GNP can make nude mice tumor's vascular morphology better and decrease their blood volume, inhibit the expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA, VEGF mRNA, this situation is benefit to restrain the tumor growth.

**Key words:** Nanogold particles; Hepatic carcinoma; Tumor vascular; VEGF; HIF-1 $\alpha$ 

**摘要: 目的** 观察纳米金(goldnano particles,GNP)对裸鼠H22肝癌缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor, HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达及肿瘤血管的影响。**方法** Balb/c裸鼠14只,肝癌造模后,随机分两组,每组7只实验动物。GNP组:从肿瘤内注入GNP(浓度为500 nmol/L)溶液0.2 ml;对照组:用等量0.9%氯化钠溶液处理,连续用药7d。超声多普勒分析肿瘤血管形态,测量肿瘤血管直径和血液灌注量;处死裸鼠时测量肿瘤体积,原位杂交检测HIF-1 $\alpha$  mRNA及VEGF mRNA表达。**结果** (1)GNP组肿瘤体积( $0.935\pm 0.129$ ) $\text{cm}^3$ 较对照组( $1.573\pm 0.247$ ) $\text{cm}^3$ 下降( $P<0.05$ )。(2)GNP组肿瘤血管直径( $0.6397\pm 0.1548$ ) mm及血液灌注量( $1.171\pm 0.241$ )  $\text{cm}^3$ 较对照组血管直径( $1.1000\pm 0.3247$ ) mm

和血液灌注量( $2.357\pm 0.408$ )  $\text{cm}^3$ 减少( $P<0.05$ )。(3)GNP组裸鼠肝癌组织HIF-1 $\alpha$  mRNA ( $15.3\pm 7.4$ )%、VEGF mRNA ( $23.7\pm 9.5$ )%,均较对照组[( $67.2\pm 13.1$ )%, ( $70.3\pm 14.6$ )%]明显降低( $P<0.05$ )。**结论** GNP可以使裸鼠肝癌血管形态趋于正常,降低肿瘤血液灌注;抑制HIF-1 $\alpha$  mRNA、VEGF mRNA表达,抗肿瘤生长。

收稿日期: 2012-09-25; 修回日期: 2013-01-15

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30772131); 国家973计划资助项目(2010CB8033603); 暨南大学附属第一医院科研培育项目资助课题(511005004)

**作者单位:** 1. 510630广州,暨南大学医学院附属第一医院普外科; 2. 暨南大学医学院组织学与胚胎学教研室; 3. 暨南大学生命科学技术学院纳米生物技术实验室; 4. 中山大学附属孙逸仙纪念医院心内科心脏超声室

通信作者: 潘运龙, E-mail: tpanyl@jnu.edu.cn

**作者简介:** 傅岳武(1972-),男,博士,副主任医师,主要从事腹部外科临床与腔镜技术研究

**关键词:** 纳米金; 肝细胞癌; 肿瘤血管; 血管内皮细胞生成因子; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$

**中图分类号:** R363; R735.7 **文献标识码:** A

## 0 引言

缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor, HIF-1 $\alpha$ ) 存在于缺氧条件下, 在多种肿瘤细胞中表达, 能促进血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的转录, 加速肿瘤血管形成, 与肿瘤的生长、浸润密切相关<sup>[1]</sup>。纳米金(gold nano particles, GNP)是金的微细颗粒, 直径多在1~100 nm之间, 具有抗氧化性强、生物相容性好, 能与多种生物大分子结合无细胞毒性, 被广泛用于药物的载体<sup>[2]</sup>。既往实验证实, GNP能促进微血管外壁的周细胞表型成熟, 使肿瘤血管壁结构趋于正常化<sup>[3]</sup>。它的作用能否改善肿瘤内缺氧微环境、影响HIF-1 $\alpha$ 表达, 目前还不甚了解。为此, 我们选用血管丰富的裸鼠肝癌动物模型, 观察用GNP处理后, 肿瘤组织中HIF-1 $\alpha$  mRNA、VEGF mRNA的表达及肿瘤血管形态变化, 探讨GNP的抗肿瘤作用及可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及主要试剂

Balb/c裸小鼠(nu/nu)14只, 6周龄, 体质量为15~17 g, SPF级, 由暨南大学实验动物中心提供。肝癌H22细胞株购自中山大学医学院细胞冻藏中心。HIF-1 $\alpha$  mRNA原位分子杂交试剂盒和VEGFmRNA原位分子杂交试剂盒(MK1142-)购自武汉博士德公司。HIF-1 $\alpha$ 靶基因的mRNA序列为: 5'-GGAAGTGGCAACTGACAAGCTCATAA-3'; 5'-ACACACTGTGTCCAGTTAGTTCAAACCTGAG-3'; 5'-AGCATGATAATATTCATAAATTGAGCGGCC-3'。VEGF靶基因mRNA序列为: 5'-ACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGCACC-3'; 5'-ATTGAGACCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACCC-3'; 5'-ATCACCATGCAGATTATGCGGATCAACCTCACCA-3'。探针为地高辛标记。DAB酶底物显色试剂盒, 购自北京中杉金桥生物技术公司。GNP合成原料氯金酸、枸橼酸钠购于国药集团化学试剂有限公司。采用氯金酸还原法自行合成GNP。

### 1.2 纳米金的制备和表征

用改进的氯金酸柠檬酸三钠还原法制备GNP, 操作方法参照文献<sup>[4]</sup>。制备GNP原液粒径为25 nm左右, 用透射电子显微镜表征及紫外可见分光光度计(UV-Vis)鉴定后, 取部分原液稀释至浓度为500 nmol/L, 置4℃冰箱保存。

### 1.3 动物模型建立

6周龄Balb/c裸鼠(nu/nu)14只, 称重。将H22肝癌细胞 $1 \times 10^6$ 个(0.2 ml)种植到小鼠的右腋下。移开针头后, 按压注射部位约30 s, 以防细胞稀释液从针孔渗出。肿瘤最长径形成约7~8 mm大小, 随机分为两组。GNP组: 从肿瘤周围及瘤内注入GNP(浓度为500 nmol/L)溶液0.2 ml; 对照组: 用0.2 ml的0.9%氯化钠溶液替代, 其余处理方法同实验组。各组每天用药1次, 连续7 d。

### 1.4 超声观察肿瘤血管形态

超声多普勒血流测定仪观察每只裸鼠用药7 d后的肿瘤血管形态, 肿瘤血管通透性。测量肿瘤血管直径; 检测肿瘤区血流频率和阻抗系数, 计算肿瘤内血液灌注量。

### 1.5 肿瘤体积检测

处死裸鼠, 收集肿瘤标本。测量肿瘤长径和短径, 应用公式: 长径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 $\times 0.52$ , 计算肿瘤体积。肿瘤称重, 10%福尔马林溶液固定标本。

### 1.6 肿瘤组织中HIF-1 $\alpha$ mRNA和VEGF mRNA测定

HIF-1 $\alpha$  mRNA和VEGF mRNA测定采用原位杂交方法。实验步骤如下: (1)取已石蜡包埋的肿瘤标本。常规制备5~6  $\mu$ m厚连续切片多张, 切片脱蜡至水洗, 3% $H_2O_2$ 甲醇液室温下处理10 min后, 蒸馏水冲洗。(2)室温下, 滴加3%胃蛋白酶消化20 min后, 取pH值为7.2的PBS液洗3次, 每次5 min。(3)滴加杂交液孵育, 37℃过夜。(4)滴加封闭液, 室温下20 min。滴兔抗地高辛, 37℃孵育60 min, 0.5 mol/L PBS缓冲液洗3次, 每次2 min。(5)滴加生物素化羊抗兔IgG, 37℃孵育30 min, 0.5 mol/L PBS液洗4次, 每次5 min。DAB显色20 min, 充分水洗。脱水透明, 中性树胶封固。以细胞中染成棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片中选取着色最丰富的5个区域, 200倍显微镜下计数阳性标记的细胞数, 取平均值, 计算HIF-1 $\alpha$  mRNA和VEGF mRNA阳性表达的百分比。

### 1.7 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件进行统计分析, 以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用方差分析的SNK- $q$ 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GNP的鉴定及透射电子显微镜表征

透射电子显微镜观察下GNP颗粒呈圆形、分散, 粒径稳定, 未见到明显团聚, 颗粒长径大小

为25 nm左右；UV-Vis吸收光谱显示GNP的最大吸收峰在520 nm处，见图1。

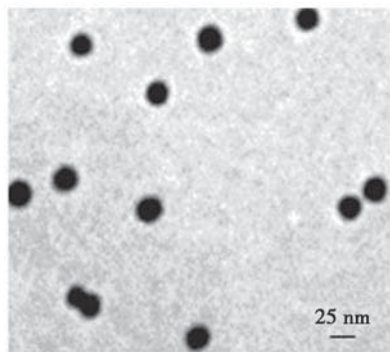


图1 纳米金的电子显微镜图像 (×18 000)

Figure1 The image of gold nano particles(GNP) observed by electron microscope (×18 000)

## 2.2 GNP抗肿瘤生长作用

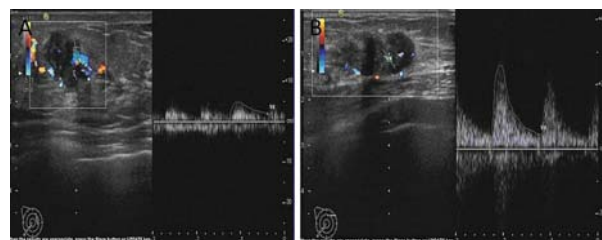
肿瘤体积测量结果显示,对照组肿瘤体积为(1.573±0.247)cm<sup>3</sup>, 实验组为(0.935±0.129)cm<sup>3</sup>, 两组比较其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 GNP对肿瘤血管形态的影响

超声多普勒显示：实验组肿瘤血流分布均匀，血管形态趋于正常。实验组与对照组相比肿瘤血管直径[(0.6397±0.1548)mm vs. (1.1000±0.3247)mm]及肿瘤血液灌注量[(1.171±0.241)cm<sup>3</sup> vs. (2.357±0.408)cm<sup>3</sup>]均有所下降，两者之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见图2。

## 2.4 GNP对肿瘤组织中HIF-1 $\alpha$ mRNA和VEGF mRNA表达的影响

原位杂交检测裸鼠肝癌组织中HIF-1 $\alpha$  mRNA和VEGF mRNA表达，其结果显示，GNP组中HIF-1 $\alpha$  mRNA(15.3±7.4)和VEGF mRNA (23.7±9.5)表达较对照组HIF-1 $\alpha$  mRNA(67.2±13.1)和VEGF mRNA(70.3±14.6)均有所下降，两者之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见图3。



A: control group;B: GNP group; GNP: nangold particles

GNP inhibited mice tumor microvessel growth. The diameter and volume of tumor vessel in GNP group was significantly less than that in the control group ( $P < 0.05$ )

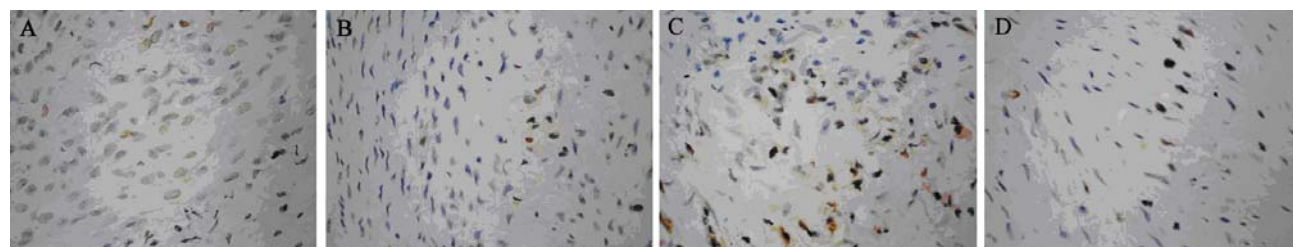
图2 超声检测裸鼠肝癌血管分布及血液灌注

Figure2 Diameter and volume of tumor vessel detected by Doppler ultrasound

## 3 讨论

HIF-1 $\alpha$ 是机体在缺氧条件下诱导的一种核转录因子，它在细胞缺氧信号途径中处于核心位置。HIF-1 $\alpha$ 高表达能增强细胞在缺氧环境下的生存能力，使肿瘤细胞分泌更多VEGF，促进血管生长和肿瘤细胞恶性转化，与肿瘤不良预后密切相关<sup>[5]</sup>。在本研究中，我们发现GNP组HIF-1 $\alpha$  mRNA、VEGF mRNA表达量较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ )，并且肿瘤体积亦较对照组亦明显缩小 ( $P < 0.05$ )。这说明GNP能通过抑制HIF-1 $\alpha$  mRNA、VEGF mRNA表达，抗裸鼠肝癌生长。

既往细胞实验证实GNP能与VEGF结合，使VEGF促血管生成作用失效，抑制内皮细胞增殖及血管生成<sup>[6]</sup>。在本实验中，GNP组裸鼠HIF-1 $\alpha$  mRNA表达低于对照组；GNP组裸鼠肝癌血管直径及血液灌注量分别为(0.6397±0.2548)mm、(1.671±0.741)mm<sup>3</sup>；亦较对照组明显减少 ( $P < 0.05$ )。GNP能使裸鼠肝癌血管分布减少，降低肿瘤内滋养血管直径，减少肿瘤组织内异常血流灌注。超声观察到此时裸鼠肝癌血管形态较均匀，趋于正



A: HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in the control group;B: HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in the GNP group;C:VEGF mRNA expression in the control group;D: VEGF mRNA expression in the GNP group. The effects of GNP inhibiting HIF-1 $\alpha$ mRNA expression in tumor microvessel,it showed that the HIF-1 $\alpha$  mRNA in GNP group was significantly less than in the control group( $P < 0.05$ ). The effects of GNP inhibiting VEGF mRNA expression in tumor microvessel,it showed the VEGF mRNA in GNP group was significantly less than in the control group( $P < 0.05$ )

图3 裸鼠肝癌组织中HIF-1 $\alpha$  mRNA和VEGF mRNA的阳性表达(分子原位杂交技术 ×200)

Figure3 The positive expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA and VEGF mRNA in hepatic tumor of nude mice(in situ hybridization ×200)

常血管。说明GNP可以使裸鼠肝癌血管正常化,改变肿瘤内的代谢微环境。由于肿瘤的特性是表现为肿瘤组织内血流分布不均匀,无效血液循环增加,肿瘤内部呈现渗透压高、缺氧的代谢微环境,刺激HIF-1 $\alpha$ 高表达<sup>[1,7]</sup>。GNP通过对裸鼠肝癌血管的影响,改善肿瘤内部灌注压高、缺氧的代谢微环境,达到抑制HIF-1 $\alpha$  mRNA高表达状态,发挥抗裸鼠肝癌生长作用。这与既往实验证实GNP能促进肿瘤血管外壁周细胞表型成熟,使周细胞间连接相对致密,减少肿瘤血管壁的渗漏性,抑制肿瘤细胞沿血管播散和转移的研究相一致<sup>[3,8]</sup>。

本实验说明,纳米金抗裸鼠肝癌生长不仅能通过抑制肿瘤血管生成来实现,也可以是由于正常化肿瘤血管、改善肿瘤内部缺氧的代谢微环境,延缓肿瘤细胞的恶性转化来实现。GNP的这种生物学特性能否增敏放、化疗抗恶性肿瘤生长作用,还有待课题研究的进一步深入阐明。

#### 参考文献:

[1] Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1 dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 236-42.

[2] Liu WJ, Gu XH, Ding Y, *et al.* Application of gold nanoparticles in anticancer research[J]. Xian Dai Sheng Wu Yi Xue Jin Zhan, 2010, 10(5): 982-5. [刘文佳, 谷小虎, 丁轶, 等. 纳米金在抗肿瘤研究中的应用[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5): 982-5.]

[3] Fu YW, Pan YL, Qin L, *et al.* Inhibition of Ang-2 and RGS-5 expression by nanogold results in normalization of vasculature in hepatic tumor [J]. Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi, 2011, 27(12): 2247-50. [傅岳武, 潘运龙, 覃莉, 等. 纳米金抑制Ang-2和RGS-5表达导致裸鼠肝癌血管正常化[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(12): 2247-50.]

[4] Pan YL, Zhao XX, Qin L, *et al.* The sensitization of gold nanoparticles on epirubicin[J]. Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi, 2011, 20(4): 533-5. [潘运龙, 赵晓旭, 覃莉, 等. 纳米金对表阿霉素的增敏作用[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 20(4): 533-5.]

[5] Kim SE, Shim KN, Jung SA, *et al.* The clinicopathological significance of tissue levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in gastric cancer[J]. Gut Liver, 2009, 3(2): 88-94.

[6] Pan YL, Qiu SY, Qin L, *et al.* Observation of molecular interaction between gold nanoparticle and VEGF165 with atomic force microscope[J]. Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi, 2010, 26(12): 295-300. [潘运龙, 邱思远, 覃莉, 等. 纳米金与VEGF165分子作用的原子力显微镜研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(12): 295-300.]

[7] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(2): 225-39.

[8] Welen K, Jennbacken K, Tesan T, *et al.* Pericyte coverage decreases invasion of tumor cells into blood vessels in prostate cancer xenografts[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2009, 12(1): 41-6.

[编辑: 刘红武; 校对: 周永红]