学　　号：B030743

四 川 大 学

临床医学博士专业学位论文

题 目　低氧诱导因子-1a 受体的小干扰 RNA 对
人脊髓星形胶质瘤细胞凋亡的影响

作　　者　肖　睿

学科专业　外 科 学

指导教师　宋 跃 明

二 OO 六年四月二十五日

声　明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得四川大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本学位论文成果是本人在四川大学读书期间在导师指导下取得的，论文成果归四川大学所有，特此声明。

申 请 人：肖蕾

指导教师：宋振川

低氧诱导因子-1α受体的小干扰RNA对人脊髓星形胶质瘤细胞凋亡的影响

研　究　生：肖　睿

导　　　师：宋跃明　教　授

指导小组成员：屠重琪　副教授

　　　　　　李　涛　讲　师

二零零六年四月二十五日

目　　录

主要中英文缩写词一览表

缩 写	英 文 全 称	中 文 全 称
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1	低氧诱导因子-1
si RNA	Small interfering RNA	小片段干扰 RNA
EPO	erythropoietin	红细胞生成素
dsRNA	double-stranded RNA	双链RNA
RNAi	RNA interference	RNA干扰
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamat	吡咯烷二硫氨基甲酸酯
RISC	RNA induceds ilencingcomplex	RISC 复合体
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocation	芳香烃核转运蛋白
TAD	transactivation domain	反式激活结构域
TNF-α	tumor necrosis factor-α	肿瘤坏死因子-α
ODDD	oxygen-dependent degradation domain	氧依赖降解结构域
PI-3K	phosphatidylinosital 3-kinase	磷酸肌醇-3 激酶
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase	蛋白激酶
Dicer	Dicer ribbonuclease，DicerRNase，	多结构的 RnaseIII蛋白
snoRNA	small nucleolar RNA	小核仁 RNA
DMSO	dimethylsu lphoxid	二甲基亚砜
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	四氮噻唑蓝
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix	螺旋-环-螺旋区域
DBD	DNA-binding domain	转录因子DNA 结合结构域
ID	inhibitory domain	抑制结构域
PtdIns	Phosphatidylinositol	磷脂酰肌醇
MAPK	mitogen-activated Protein kiase	蛋白激酶
HO-1	hemeoxygenase 1	血红素加氧酶
GLUT1	glucose transporter 1	葡萄糖载体蛋白 1
iNOS	inducible nitric oxide s ynthase	诱导型一氧化氮合酶

低氧诱导因子-1α受体的小干扰RNA对人脊髓星形胶质瘤细胞凋亡的影响

研究生： 肖 睿
导 师： 宋跃明 教 授
指导小组： 屠重琪 副教授
李 涛 讲 师

摘 要

目的 研究低氧诱导因子-1α（HIF-1α）受体的小干扰RNA对人星形胶质瘤细胞（U251）凋亡的影响，小干扰RNA对HIF-1α的调控作用；探讨肿瘤细胞凋亡的分子机制及调控。

方法 构建靶向低氧诱导因子-1α（HIF-1α）受体的小干扰RNA（si RNA）真核表达载体pSUPER EGFP1。培养成熟的U251细胞株随机分成：①、载体（载体中转染HIF-1α基因）缺氧组（U251在1%氧，无糖和血清的培养基中分别培养12h、24h和48h）；②、载体常氧组（U251在常氧，无糖和血清的培养基中分别培养12h、24h和48h）；③、空载体（载体中未转染HIF-1α基因）缺氧组（U251 在 1%氧，无糖和血清的培养基中分别培养 12h、24h 和48h）；④、空载体常氧组（U251 在常氧，无糖和血清的培养基中分别培养12h、24h和48h）；⑤、对照缺氧组（U251 在1%氧，无糖和血清的培养基中分别培养12h、24h和48h）；⑥、对照常氧组（U251 在常氧，无糖和血清的培养基中分别培养12h、24h和48h）。每一个样品采用real time PCR 测定HIF-1α mRNA表达水平；Western Blot和免疫组织化学测定HIF-1α蛋白表达水平；光镜和电镜分别观察细胞、细胞线粒体和足突改变；荧光显微镜观察细胞荧光；

MTT 法测定细胞的生长。

结果 ①、载体缺氧组 HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平较空载体缺氧组、对照缺氧组显著降低（P 均<0.05），载体缺氧组 HIF-1α mRNA 和蛋白表达随着缺氧时间的延长而逐渐减少；②、空载体缺氧组、对照缺氧组 24h HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平显著高出常氧组（大约 2 倍多）。③、载体常氧组、空载体常氧组、对照常氧组 HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平无显著差异（P 均>0.05），④、载体缺氧组细胞线粒体和足突较空载体缺氧组、对照缺氧组明显肿胀、凋亡细胞明显增加。

结论 ①、肿瘤细胞在缺氧时 HIF-1α 基因表达增加，细胞凋亡减少。提示 HIF-1α 参与缺氧细胞的凋亡过程，HIF-1α 可能是缺氧时抗细胞凋亡的靶基因；HIF-1α 的激动剂可能作为临床多种病因所致细胞凋亡的治疗方向。②、体内转录生成的小干扰 RNA（si RNA）能够使星形胶质瘤细胞低氧诱导因子-1α（HIF-1α）基因沉默。

关键词： 低氧诱导因子-1α，人星形胶质瘤细胞，缺氧，基因沉默，表达，凋亡

The small interfering RNA of hypoxia-inducible factor-1 α receptor effect the apoptosis of human U251 cell

Postgraduate: Xiao Rui
Tutor: Prof. Song Yue Ming
Direct group: Associate Prof Tu Chong Qi
Associate Prof Li Tao

Abstract

Objective To investigate the small interfering RNA of HIF-1α receptor effects the human U251 cell apoptosis, and regulation of HIF-1α expression by small interfering RNA, and use of PDTC(PDTC group), and to explore the molecular mechanism of tumor cell apoptosis and its regulation.

Methods The small interfering RNA(siRNA) eukaryotic expression vector targeting HIF-1α gene, named pSUPER EGFP1, was constructed and identified with sequencing.After the siRNA expression vector was transfected into the human U251 cells, The cultured human U251 cells were randomly assigned to six group:①vector hypoxia group(HIF-1α gene transfect into the vector)(the human U251 cells was exposed to 1%O_2, without FBS and glucose for 12h,24h and 48h respectively);②vector nomal O_2 group(HIF-1α gene transfect into the vector)(the human U251 cells was exposed to nomal O_2, without FBS and glucose for 12h,24h and 48h respectively);③empty vector hypoxia group(HIF-1α gene nontransfected

into the vector)(the human U251 cells was exposed to 1%O_2, without FBS and glucose for 12h,24h and 48h respectively); ④empty vector nomal O_2 group(HIF-1α gene nontransfected into the vector)(the human U251 cells was exposed to nomal O_2, without FBS and glucose for 12h,24h and 48h respectively); ⑤control hypoxia group (the human U251 cells was exposed to 1%O_2, without FBS and glucose for 12h,24h and 48h respectively);⑥control nomal O_2 group (the human U251 cells was exposed to nomal O_2, without FBS and glucose for 12h,24h and 48h respectively). HIF-1α mRNA expression was detected in astrocytes of all groups by real time PCR and HIF-1α protein expression by Western Blot and immunohistochemical. The changes of mitochondria and foot processes of human U251 cells were obverved by light microscopy and electron microscopy and cell fluorescence expression by immunofluorescence . The in vitro cellular growth activities were assayed by MTT colorimetry.

Results ① The HIF-1α mRNA and protein expression was significantly decreased in vector hypoxia group compared with the empty vector hypoxia group and control hypoxia group during hypoxia(from 12h ,24h to 48h)($P<0.05$) , and it was down-regulated gradually with the hypoxia time in vector hypoxia group. ② The HIF-1α mRNA and protein expression was significantly increased in the empty vector hypoxia group and control hypoxia group, The HIF-1α mRNA and protein expression level was much more high at 24h of two hypoxia group than that in the nomal O_2 group(more than two times) ,③ and there was no statistical difference among the vector nomal O_2 group and empty vector nomal O_2 group and control nomal O_2 group group ($P>0.05$).④ The mitochondria and foot processes of human U251 cells in the vector hypoxia group were markedly edematous compare with the empty vector hypoxia group and control hypoxia group during hypoxia(12h, 24h, 48h).

Conclusions ① The HIF-1α gene expression increase and cell apoptosis decrease under tumor cell hypoxia condition, and HIF-1α may play a key role in the cell hypoxia under cell hypoxia condition. These results demonstrate that

HIF-1α is responsible for modulating of cell apoptosis, suggesting that HIF-1α gene may be a potential target for drug in treatment of cell apoptosis, and activator of HIF-1α gene may provide a new therapeutic option for reducing cell apoptosis in a wide variety disorders.② The reduction of siRNA expression may be associated with decreased activity of HIF-1α gene in the human U251 cells. the results strongly suggest that the small interference RNAs vector targeting HIF-1α gene could suppress the gene expression in human U251 cell.

Key words: HIF-1α, human U251 cell, hypoxia, gene suppression, expression, apoptosis

低氧诱导因子-1α受体的小干扰RNA对人脊髓星形胶质瘤细胞凋亡的影响

研究生：肖 睿
导 师：宋跃明 教 授
指导小组：屠重琪 副教授
李 涛 讲 师

前 言

脊髓胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤。目前尽管采用手术、放疗和化疗等综合治疗手段，但总体预后不理想。研究发现脊髓胶质瘤是多基因突变疾病。常常有较多的微血管或因为供血供养不足不能满足肿瘤组织迅速增长的需要而出现坏死、囊性变。因此，把脊髓胶质瘤赖以生存的微环境作为研究、治疗的方向是目前该肿瘤研究、治疗的难点和热点。

低氧诱导因子1与肿瘤的生长密切相关。HIF-1是bHLHH-PAS家族的成员。由α和β两个亚基构成的异二聚体蛋白。其中HIF-1α蛋白水平的高低决定了HIF-1同DNA结合的水平和转录活性。随着细胞氧浓度的下降，HIF-1α表达水平呈指数增加。HIF-1α作为转录因子能够反作用于氧调节基因的顺式调控序列，发挥多方面的效应，从而诱导糖酵解基因的表达，促进无氧代谢。通过诱导血管内皮生长因子（VEGF）的表达促进血管的形成。还可以诱导一氧化氮合酶（iNOS）、血红素氧化酶（HO-1）的表达引起扩血管的作用。它能够激活EPO基因的表达使红细胞的生成增加。提高携带氧的能力，从而使缺氧的组织细胞保持氧稳态及耐受低氧状态。同时HIF-1α与细胞凋亡调控基因bc12，P21和P53等的表达有明显的相关性。肿瘤缺氧细胞的存在不仅使肿瘤对放化疗的抗拒性增强[1-2]，而且使肿瘤细胞侵袭性表型表达上升从而导致肿瘤的转移[3]。在缺氧诱导肿瘤基因表达的信息通路上，缺氧诱导因子

-1α(HIF-1α)起着中枢纽带的作用[4]。因此，研究 HIF-1α 在调控脊髓胶质瘤的生长、凋亡及其微循环的改变，阐明其分子机理，阻断 HIF-1α 的表达成为治疗脊髓胶质瘤缺氧耐受的关键。同时，通过对脊髓胶质瘤缺氧耐受的研究，为缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)对脊髓胶质细胞缺氧耐受的研究打下基础，从而为脊髓疾病的研究创造条件。

基于上述问题，本实验通过构建靶向低氧诱导因子-1α（HIF-1α）小干扰 RNA（si RNA）真核表达载体。体外培养成熟的人星形胶质瘤细胞——U251 细胞株，观察在不同处理条件下，U251 细胞的 HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平的改变与细胞凋亡、细胞足突和线粒体水肿程度改变之间的关系以及 HIF-1α 基因对 HIF 的调控作用是否有调控作用，观察 HIF-1α 基因沉默对脊髓胶质瘤的治疗作用，探讨缺氧条件下，HIF-1α 对减少肿瘤细胞发生细胞凋亡的作用及其调控机制，为临床从分子水平上探索肿瘤的治疗方案寻找实验依据，为临床治疗脊髓疾病提供新的方法。

第 一 部 分

靶向低氧诱导因子-1α（HIF-1α）小干扰 RNA（si RNA）真核表达载体的构建

前 言

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术，是近两年在功能基因组学研究中兴起的一项新技术。RNAi 是一种转录后的基因沉默现象[5-7]，与反义技术相比，RNAi 具有特异、持久、高效的特点。能够作为一种简单、有效的代替基因敲除的遗传工具，适用于后基因组时代基因功能学的研究[8-9]。

目前在哺乳动物细胞中介导 RNAi 效应的 dsRNA 主要应用的是 siRNA 分子，当它导入细胞后与 Dicer 结合形成 RISC 复合体[10-17]，siRNA 作为引导序列，识别靶基因转录出的 mRNA，并引导 RISC 复合体与 mRNA 结合，核酸酶 Dicer 将 mRNA 切割成 21～23nt 的片段，从而特异性地抑制靶基因的表达。而新产生的双链 RNA 可再次形成 RISC 复合体，继续降解 mRNA，从而产生级联放大效应。应用表达载体的方法通过转染到细胞内的 DNA 模板在体内转录得到 siRNA[18-19]。不但效率大大提高，而且可以排除 RNA 酶的干扰，延长 siRNA 的半衰期；更重要的是，随着载体质粒的复制、扩增，RNAi 扩散至整个机体[20-23]。

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1，HIF-1)是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子，能激活许多低氧反应性基因的表达，是在低氧条件下维持氧稳态的关键性物质。目前认为，HIF-1是细胞在低氧条件下产生的蛋白性调节因子，它与靶基因结合，促进其转录，使机体产生一系列低氧适应反应。当细胞氧分压降低或者受到其他刺激时，HIF-1α在胞浆中积累、活化，转移到细胞核，与HIF-1β形成HIF-1分子，结合相应的靶序列，调节基因表达。

肿瘤的病理生理学特性表明，在低氧情况下，肿瘤细胞的生长却不受影响，这可能与肿瘤细胞内HIF-1的高表达有关。而抑制HIF-1的高表达，促进肿瘤细

胞的凋亡是治疗恶性肿瘤理想的分子生物学方法。

本研究构建了 HIF-1α siRNA 表达质粒，采用 Oligoengine 公司生产的以 DNA 为模板的 siRNA 表达载体 pSUPER EGFP1 载体，将设计合成的 HIF-1α dsRNA 装入该载体中，并经酶切鉴定和测序证实。

材 料 和 方 法

一、主要试剂和仪器设备

（一）、主要试剂

1、E. coli DH5α 感受态细胞（10 次，大连宝生生物公司，中国）

2、T4 DNA Ligase, Cloning Qualified，500 U（华美生物工程公司，中国）

4、质粒提取试剂盒（20 次， OMEGA 公司，美国）

5、琼脂糖凝胶回收试剂盒（20 次， OMEGA 公司，美国）

6、产物纯化试剂盒（OMEGA 公司，美国）

7、Marker（50 次，北京清华大学天为时代，中国）

8、琼脂粉、琼脂糖，100g（北京鼎国生物技术发展中心，中国)

9、pSUPER EGFP1 空载体，带 neo，Kan，带 EGFP 绿色荧光蛋白 (Oligoengine 公司，美国)（由罗凤鸣博士惠赠）

10、HIF-1α 寡核苷酸片段 (Oligoengine 公司，美国)

11、限制性内切酶 Bgl II，Hind III， EcoR I、T_4DNA 连接酶和 T_4DNA 连接酶缓冲液(华美生物工程公司，中国)

12、一次性培养瓶（75cm^2，25cm^2）、离心管、培养皿（直径分别为 3.5cm，5cm，10cm 等），40 目、100 目不锈钢筛网。

（二）、仪器设备

1、超净工作台(Sanyo 公司，日本) 、超净工作台 HB2460(Holten，美国)

2、高速离心机（Bechman 公司，美国)、低温高速台式离心机（Heraeus 公司，德国）

3、SH2-82 恒温水浴箱（江苏太仓医疗器械厂，中国）

4、微量移液器（Nichiryog 公司，日本）

5、紫外分光光度仪（PE 公司，美国）

6、电泳仪（Bio-rad 公司，美国）

7、凝胶成像系统（Bio-rad 公司，美国）

8、纯水器（Barnstead 公司，美国）

9、电子天平（Strtorius 公司，美国）

10、制冰机（Cole-porue 公司，美国）

11、PTC-2000PCR 合成仪（MJ Reasearch Inc，美国）

12、1.5ml 离心管(eppendorf 管)，15ml 离心管，15ml 离心管架，玻璃平板

13、二氧化碳培氧箱（MCD-17A，SANYO，日本）

14、低氧培养箱（INCUB IG750 230V，JOUAN，法国）

15、倒置相差显微镜（IX50 ，OLYPUS，日本）

16、OLYMPUS 显微镜(OLYMPUS BX51，OLYMPUS ，日本)。

（三）、主要液体的配制

1、LB 液体及固体培养基，100ml

LB 液体培养基：

蛋白胨(Tryptone)	10 g
酵母提取物(Yeast extract)	5 g
NaCl	10 g

溶于 800ml 去离子水中，用 NaOH 调 pH 至 7.5，加去离子水至总体积 1 升，高压下蒸气灭菌 20 分钟。

LB 固体培养基：液体培养基中每升加 15g 琼脂粉，高压灭菌。

2、TE 缓冲液：10 mmo/L T ris·Cl (pH8.0)，1 mmol/L EDTA (pH8.0)，高压灭菌后储存于 4℃冰箱中。

3、氨苄青霉素(Ampicillin)母液：配成 100mg/ml 水溶液， －20℃保存备用

卡那霉素母液：配成 30mg/ml 水溶液，－20℃保存备用

4、电泳用 TBE 缓冲液 (5×)：称取 Tris 54g，硼酸 27.5g，并加入 0. 5M EDTA (pH8.0) 20ml，定溶至 1000ml

三、方法

（一）、设计合成双链：

1、siRNA 序列的设计原则

①、在基因的 AUG 起始密码子后，以 AA 开头长度为 21 个碱基的序列都可以作为 siRNA。实验发现在 siRNA 的 3’端带有 2 个 U 时，其基因抑制效率最高。使用其他碱基（除 G 外，因为 RNase 会降解以 G 为末尾的 RNA 单链）也可作为 3’的突出端；

②、目前还没有发现 siRNA 在 mRNA 上的具体位置与干扰效率的联系，一般在 mRNA 全长范围内都可以选择，除了某些与蛋白质具有相互作用的 mRNA 区域。对于每个基因，一般可在 4 个 siRNA 序列中筛选得到一个能高效率抑制表达的序列；

③、siRNA 的 GC 含量一般需要控制在 30～50%以内；

④、将设计得到的 siRNA 序列进行 BLAST 分析，避免抑制其他蛋白的表达；

⑤、设立阳性对照与阴性对照；

⑥、可通过公司提供的在线软件设计。

常用的设计软件有：

1、http://www.genesil.com/ 武汉市晶赛生物工程技术有限公司

2、http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html Ambion 公司

3、http://www.dharmacon.com/sidesign Dharmacon 公司

4、http://www.sirnawizard.com/ invivogen 公司

2、样本采集：

Gene Bank 查找缺氧诱导因子 HIF-1α mRNA 序列，设计出针对 HIF-1α 进行 RNA 干扰作用的靶点：AAAGAGGTGGATATGTCTGGG。根据 siRNA 靶位点，人工合成一对互补并编码短发夹状 siRNA 的寡核苷酸链(上海生工生物工程技术服务有限公司) 。

3、合成长序列

在上海生工生物工程技术服务有限公司合成，片段长 64 个碱基。

pSUPRE 载体设计如下：

Oligo 1

Bgl II 19nt loop 19nt T末端

5' gatcccc 设计的19个碱基的序列ttcaagaga 设计的19个碱基的序列 tttttggaaa 3'

Oligo 2

5' agcttttccaaaaa 设计的 19 个碱基的序列 tctcttgaa 设计的 19 个碱基的序列

ggg 3'

Hind III 19nt loop 19nt

把设计好的自己的引物序列写上，一般是二条有意链，一条无意对照链。

（二）、稀释：

溶解合成的寡核苷酸，用 TE 将各组稀释为 100uM。

注： 64 ul TE		→ 25 uM
HIF 1470-1	16 nmol/OD＋16 ul TE	→ 100 uM
HIF 1470-2	16 nmol/OD＋16 ul TE	→ 100 uM
HIF 1nos-1	16 nmol/OD＋16 ul TE	→ 100 uM
HIF 1nos-2	16 nmol/OD＋16 ul TE	→ 100 uM
SCR 13387-1	16 nmol/OD＋16 ul TE	→ 100 uM
SCR 13387-2	16 nmol/OD＋16 ul TE	→ 100 uM

（三）、引物退火：

将 2μl (1μg/μl)正、反义寡核苷酸链等比混合，退火形成发夹状 siRNA DNA 双链。

寡核苷酸 1 （25um）		1ul
寡核苷酸 2 （25um）		1ul
10×PCR buffer		3ul
补水	total	30ul

程序：

95℃	2min
90℃	2min
82℃	2min
72℃	2min
62℃	2min
37℃	2min
25℃	2min

再降到室温，－20℃保存。

（四）、pSUPER EGFP1 载体的酶切：

用 Bgl II 和 Hind III双酶切 pSUPER EGFP1 载体，37℃酶切过夜， 65℃ 20 min 停止作用。

50μl 体积反应体系如下：

DNA	5 μg (约 20μl)
10×通用 buffer	5.0 μl
Hind III（10 U /μl ）	1μl
Bgl II（10 U /μl ）	1μl
加 ddH_2O 至 50 μl	

加样时限制性内切酶最后加入，轻轻混匀，稍加离心，放置于 37℃水浴消化。酶切结束时将反应管在65℃ 水浴放置20min以灭活限制性内切酶活性。

（五）、pSUPER EGFP1 载体的酶切产物的回收纯化：

用上海生工生物工程技术服务有限公司的胶回收试剂盒回收纯化。用1.0%的琼脂糖凝胶回收 DNA 片段，50μl 的酶切产物跑电泳之后，在紫外线灯下割下含 DNA 的琼脂糖块，使它尽可能小。按试剂盒步骤进行，具体如下：

1、用琼脂糖胶电泳将目的 DNA 片段与其它 DNA 尽可能分开，然后用干净的手术刀割下含所要回收 DNA 的琼脂块，放入 1.5 ml 离心管中；

2、按每 100mg 琼脂糖胶加入 400μl Binding Buffer II，混匀后置于 50～60℃水浴中 10 分钟，使胶彻底融化。加热融胶时，每 2 分钟混匀一次；

3、将融化的胶溶液全部转移到 UNIQ-10 柱，柱子放入 2.0 ml Collection Tube，室温放置 2 分钟，用台式离心机，8000 rpm 室温离心 1 分钟；

4、取下 UNIQ-10 柱，弃去离心管中的废液。将柱子放回同一根离心管中，加入 500 μl Wash Solution，10000 rpm 室温离心 30 秒；

5、重复步骤 4 一次；

6、取下 UNIQ-10 柱，弃去离心管中的全部废液。将柱子放回同一根离心管中，10000 rpm 室温离心 30 秒，以除去残留的 Wash Solution；

7、将柱子放入新的干净 1.5ml 或 2.0ml 离心管中，在柱子中央加入 100 μl Elution Buffer，室温放置 2 分钟，提高洗脱液的温度至 55～80℃有利于提高 DNA 的洗脱效率；

8、10000 rpm 室温离心 1 分钟，收集管中的液体即为回收的 DNA 片段，

可立即使用或保存-20℃ 备用。

（六）、退火的双链与酶切后回收的载体连接：

一般在灭菌的0.2ml离心管中进行，用T4 DNA连接酶(T4 DNA ligase)，10μl体积反应体系如下：

双酶切载体DNA	0.1 μg (约1μl)
10×T4 DNA ligase buffer	1.0 μl
T4 DNA ligase（5U /μl ）	1μl
退火的双链	2μl
加 ddH_2O 至 10 μl	

混匀后用微量离心机将液体全部甩到管底，于16℃保温过夜。

（七）、大肠杆菌感受态细胞的制备：

1、从LB平板上挑取新活化的E. coli DH5α单菌落，接种于3～5ml LB液体培养基中，37℃下振荡培养12小时左右，直至对数生长后期。将该菌悬液以1:100～1:50的比例接种于100ml LB液体培养基中，37℃振荡培养2～3小时至OD600 ＝0.5左右。

2、感受态细胞的制备（CaCl2 法）：

①、将培养液转入离心管中，冰上放置10分钟，然后于4℃下3000g离心10分钟；

②、弃去上清，用预冷的0.05mol/L的CaCl2 溶液10ml轻轻悬浮细胞，冰上放置15～30分钟后，4℃下3000g离心10分钟；

③、弃去上清，加入4ml预冷含15%甘油的0.05mol/L的 $CaCl_2$ 溶液，轻轻悬浮细胞，冰上放置几分钟，即成感受态细胞悬液；

④、感受态细胞分装成200μl的小份，贮存于-70℃可保存半年。

（八）、转化大肠杆菌感受态细胞（热击法）：

1、从-70℃冰箱中取200μl感受态细胞悬液，室温下使其解冻，解冻后立即置冰上。

2、加入质粒DNA溶液(含量不超过50ng，体积不超过10μl)，轻轻摇匀，冰上放置30分钟后。

3、42℃水浴中热击 90 秒或 37℃水浴 5 分钟，热击后迅速置于冰上冷却 3～5 分。

4、向管中加入 1ml LB 液体培养基(不含抗生素)，混匀后 37℃振荡培养 1 小时，使细菌恢复正常生长状态。

5、将上述菌液摇匀后取 100μl 涂布于含抗生素的筛选平板上，正面向上放置半小时，待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37℃培养 16～24 小时。

6、同时做两个对照：

①、对照组 1：以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液，其它操作与上面相同。此组正常情况下在含抗生素的 LB 平板上应没有菌落出现。

②、对照组 2：以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液，但涂板时只取 5μl 菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板上，此组正常情况下应产生大量菌落。

（九）、菌落 PCR 验证阳性克隆：

取出平板，挑大小均匀的单菌落，一半放于水中，一半放于 LB 液体培养基中。

具体做法为：在灭菌的 0.2ml 离心管中，分别加入 25μl 的 ddH2O，100 的 LB 液体培养基，用枪尖挑取菌落一半放于水中。95℃裂解后，取 5μl 当作 PCR 的模板，用枪尖挑取菌落一半放于 LB 液体培养基中，摇菌备用。

在 pSUPER 载体上设计 PCR 的引物，上游设计在插入片段之前，下游设计在插入片段之后，如果是空载体，扩增片段为 246bp，如果是阳性克隆，即插入了 64 个碱基，则扩增片段为 310bp，设计的引物如下：

pSUPERF 5’-gcgtgaattcgaacgctgac-3’

pSUPERR 5’-acgcttacaatttacgcgtaagc-3’

小心在冰上预混下列溶液于 PCR 反应管中：

10×buffer（Mg^{++} free）	3μl
25mM dNTPs	0.36μl
Taq 酶 (5U)	0.3μl
25mM MgCl2	3μl
pSUPERF (10uM)	1μl
pSUPERR (10uM)	1μl

DNA 模板	5μl
补 ddH_2O 到	30μl

扩增条件:

① 94℃ 2min

② 94℃ 10sec，54℃ 30sec，72℃ 1min，30 cycles

③ 72℃ 5min

④ 4℃ 保温

将反应产物取 8μl 作 2.0%琼脂糖凝胶电泳，如果片段为 246bp 则为阴性，如果片段为 310bp，则为阳性克隆。

1、将 HIF 1470-1，non，SCR 13387-1 各挑取 6 个克隆。

2、涂 5ml LB/Amp⁺平板，220 rpm 过夜。

3、重组质粒鉴定，选用 MIu Ⅰ酶切。

4、MIu Ⅰ　5′……A↓CGCG T……3′

　　　　　3′ T GCGC↑A 5′

B	G	O	R	Tango™	2×Tango™
0-20	20-50	50-100	100	20-50	-50-100

将以下液体进行分装，每管 5ul。

10×buffer R⁺	1ul×18＝18
MIU Ⅰ (10u)	1ul×18＝18
水	5ul×18＝90
DNA 各	3ul

将分装好的培养管放在培养箱中 37℃ 培养 2 小时。

（十）酶切验证:

提取质粒，测序法鉴定重组质粒。应用 MIu Ⅰ酶切验证。

10×buffer R^{+}	1ul
MIU I (10u)	9ul
水	45ul
DNA 各	3ul

37℃过夜，电泳时和质粒一起进行。

（十一）电泳：

将反应产物取 8μl 作 2.0%琼脂糖凝胶电泳。

上排

SRC-3 质 SRC-6 质 质 non-3 M

下排

质 non-4 质 non-5 质 1470-2 质 M 1470-5 质

1470-6 质

全切开，选 SRC-3，SRC-6，non-3，non-4，1470-5，1470-6 共 6 个进行测序。

构建 HIF-1α siRNA 的表达质粒称为 pSUPER EGFP1-dsRNA。

结　果

1、下图为商品化的 pSUPER 载体：

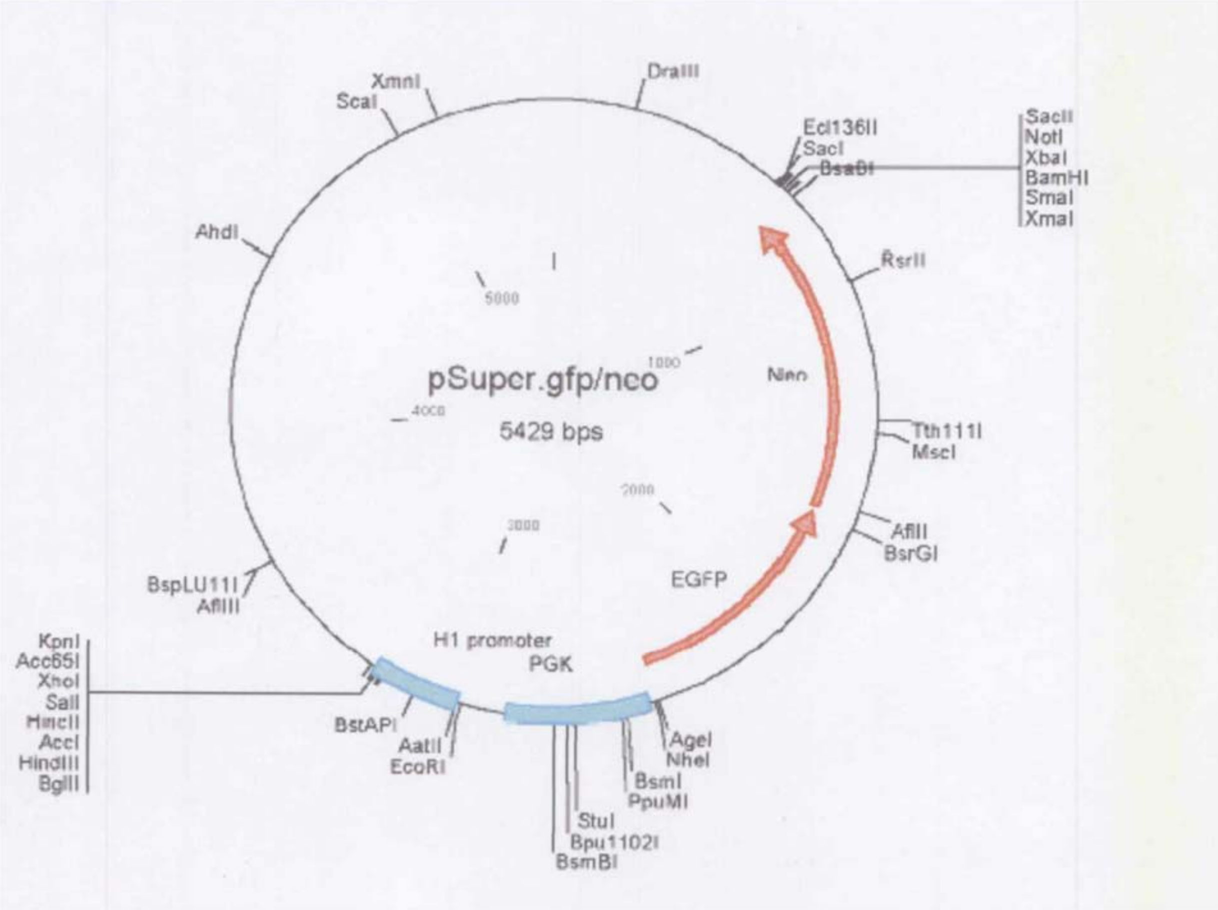


图 1-1　商品化的 pSUPER 载体

2、下图为改造后的 pSUPER 载体，本实验用的即此载体 pSUPER EGFP1，由罗凤鸣博士惠赠：

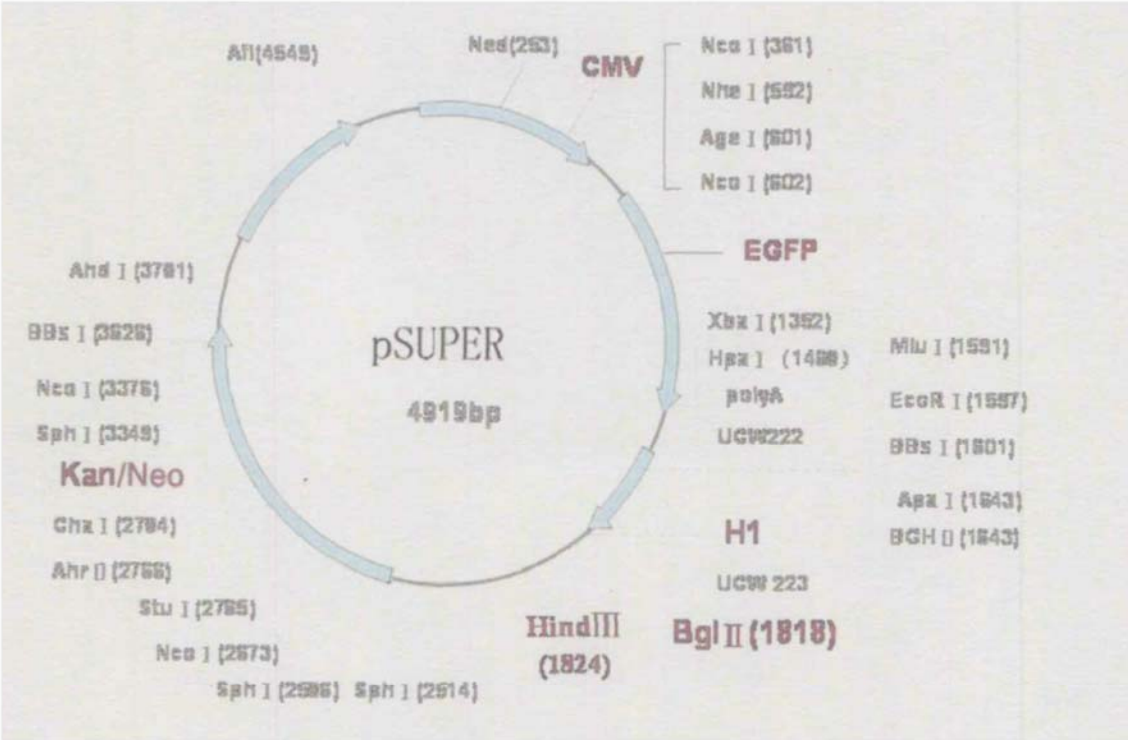


图 1-2 本实验用的改造后的 pSUPER 载体

3、pSUPER EGFP1 载体的短发夹状结构（图 1-3）：

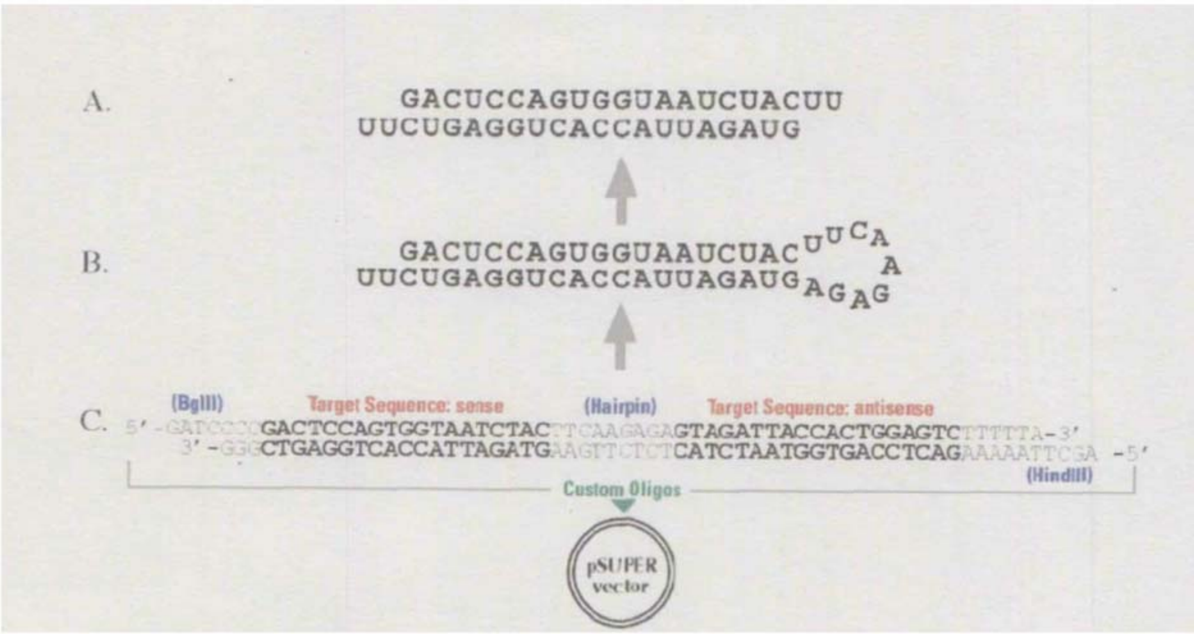


图 1-3 pSUPER 载体的短发夹状结构

4、siRNA真核表达载体的测序鉴定结果：

sense

5'

gatccccGATCAGCATCGCCAAGTCTttcaagagaAGACTTGGCGATGCTGATCttt

ttggaaa 3'

antisense

5'

agcttttccaaaaaGATCAGCATCGCCAAGTCTtctcttgaaAGACTTGGCGATGCTGA

TCggg 3'

测序的结果：

GGGcccAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCA

GGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC

GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAA

CGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTAT

AAGTTCTGTATGAGACCACAGATCCCCGATCAGCATCGCCAAGTCTTTC

AAGAGAAGACTTGGCGATGCTGATCTTTTTG

GAAAAGCTTACGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGC

GTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTT

AACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAG

ACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTG

GAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCG

AAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTAC

GTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGC

ACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGA

测序结果为：SRC-3，SRC-6，non-3，non-4，1470-5，1470-6 共 6 个序列完全正确。

5、2.0%琼脂糖凝胶电泳结果：

如果片段为 246bp 则为阴性，如果片段为 310bp，则为阳性克隆。见图 1-3，第 1 和第 7 泳道为阳性克隆。

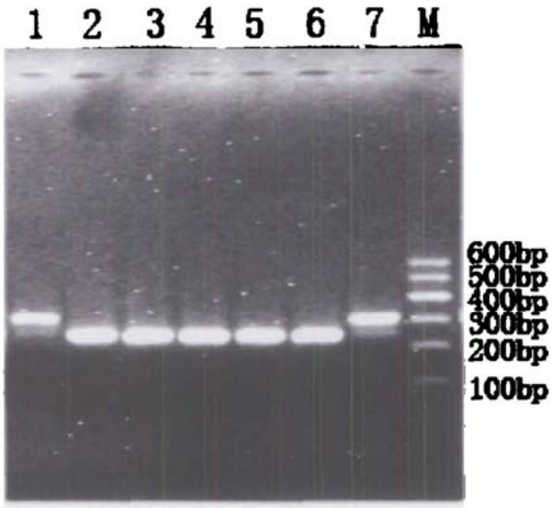


图 1-4 本实验所得到的阳性克隆

6、siRNA真核表达载体的测序图：

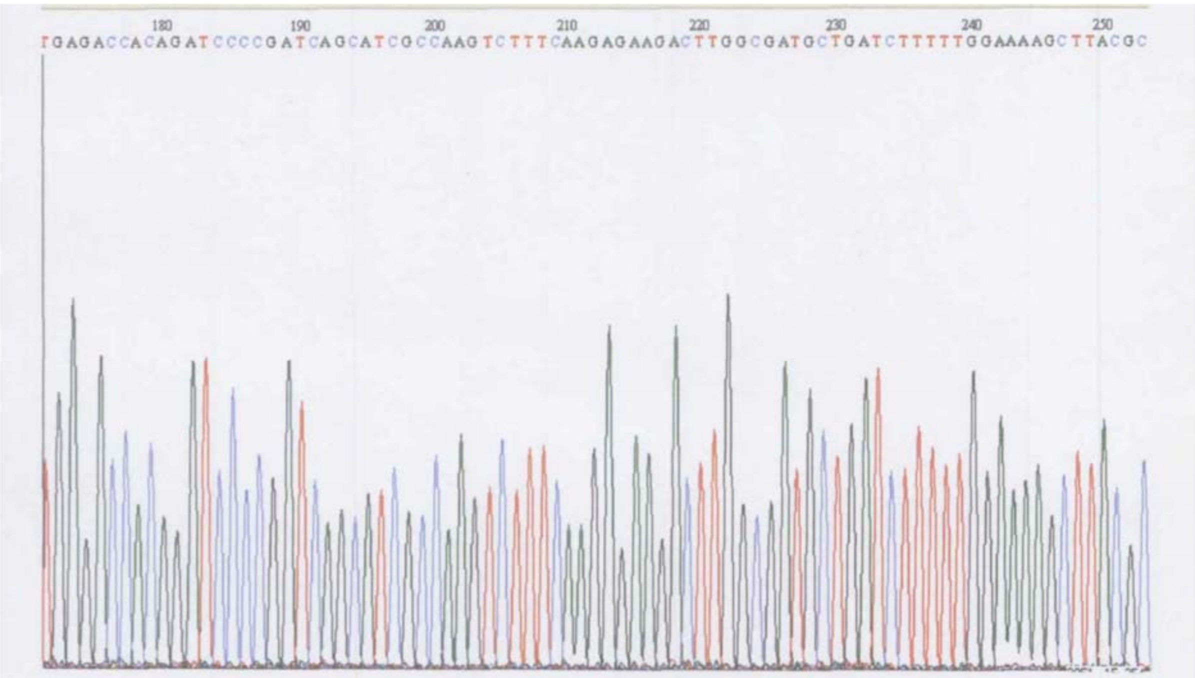


图 1-5 siRNA 真核表达载体的测序图

讨　论

多数的 siRNA 表达载体依赖三种 RNA 聚合酶 III 启动子(pol III)中的一种，操纵一段小的发夹 RNA(short hairpin RNA， shRNA)在哺乳动物细胞中的表达。这三类启动子包括大家熟悉的人源和鼠源的 U6 启动子和人 H1 启动子。之所以采用 RNA pol III 启动子是由于它可以在哺乳动物细胞中表达更多的小分子 RNA，而且它是通过添加一串（3 到 6 个）U 来终止转录的，并且转录产物在第二个尿嘧啶处被切下来，非常精确[24]。转录出的 RNA 形成发夹样结构后，会在 3'端形成两个突出的尿嘧啶，这类似于天然的 siRNA，因而有利于双链 RNA 诱发 RNAi。要使用这类载体，需要订购 2 段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链，退火、克隆到相应载体的 pol III 启动子下游。由于涉及到克隆，这个过程需要几周甚至数月的时间，同时也需要经过测序以保证克隆的序列是正确的。siRNA 表达载体的优点在于可以进行较长期研究，带有抗生素标记的载体可以在细胞中持续抑制靶基因的表达，持续数星期甚至更久。

我们采用的 pSUPER　EGFP1 载体（带 neo，Kan，带 EGFP 绿色荧光蛋白）有以下特点[25-32]：①、采用 RNA pol III 启动子；②、通过添加一串（3 到 6 个）U 来终止转录；③、在体内转录出发夹样产物 RNA，其在在第二个尿嘧啶处被切下来，3'端形成两个突出的尿嘧啶，这类似于天然的 siRNA，因而有利于双链 RNA 诱发 RNAi。转录出的 RNA 形成发夹样结构后，会在 3'端形成两个突出的尿嘧啶，这类似于天然的 siRNA，因而有利于双链 RNA 诱发 RNAi；④、当 dsRNA 克隆。siRNA 如载体后，Bgl Ⅱ酶切位点被破坏消失。研究表明，发夹结构中环（相当于间隔）上的碱基序列与沉默效果有关。图 1-2 所示为 pSUPER　EGFP1 载体工作原理，将 HIF-1α 克隆入 pSUPER EGFP1 载体后形成 HIF-1α siRNA 表达质粒，其进入细胞后被转录成为短发夹状 RNA，并进一步被加工形成 siRNA[33-35]。

将重组质粒进行测序分析(图 1-5)，证实已将针对 HIF-1α mRNA 序列设计的寡核苷酸双链克隆入 pSUPER　EGFP1 真核表达载体，重组质粒构建成功，符合预期设计，能够表达短发夹状 siRNA。

通过DNA 重组技术我们构建HIF-1α siRNA 表达质粒 pSUPER　EGFP1-dsRNA，为进一步研究其对 HIF-1α mRNA 的基因沉默作用提供了基础。

小　结

本实验通过 DNA 重组技术构建 HIF-1αsiRNA 表达质粒 pSUPER EGFP1，为进一步研究其对 HIF-1α mRNA 的基因沉默作用提供了基础。

结果发现：

1、pSUPER 载体具有短发夹状结构，带 neo，Kan，带 EGFP 绿色荧光蛋白。

2、将 HIF-1α 克隆入 pSUPER　EGFP1 载体后形成 HIF-1α siRNA 表达质粒，其进入细胞后被转录成为短发夹状 RNA，并进一步被加工形成 siRNA。

3、重组质粒进行测序证实：已将针对 HIF-1αmRNA 序列设计的寡核苷酸双链克隆入 pSUPER　EGFP1 真核表达载体，重组质粒构建成功，符合预期设计，能够表达短发夹状 siRNA。

第 二 部 分

HIF-1α小干扰RNA（si RNA）真核表达载体的人U251细胞稳定转染

前　言

目前在哺乳动物细胞中介导 RNAi 效 应的 dsRNA 主要应用的是 siRNA 分子，当它导入细胞后与 Dicer 结合形成 RISC 复合体[10-17]，siRNA 作为引导序列，识别靶基因转录出的 mRNA，并引导 RISC 复合体与 mRNA 结合，核酸酶 Dicer 将 mRNA 切割成 21～23nt 的片段，从而特异性地抑制靶基因的表达。而新产生的双链 RNA 可再次形成 RISC 复合体，继续降解 mRNA，从而产生级联放大效应。应用表达载体的方法通过转染到细胞内的 DNA 模板在体内转录得到 siRNA[18-19]。不但效率大大提高，而且可以排除 RNA 酶的干扰，延长 siRNA 的半衰期；更重要的是，随着载体质粒的复制、扩增，RNAi 扩散至整个机体[20-23]。

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1，HIF-1)是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子，能激活许多低氧反应性基因的表达，是在低氧条件下维持氧稳态的关键性物质。目前认为，HIF-1是细胞在低氧条件下产生的蛋白性调节因子，它与靶基因结合，促进其转录，使机体产生一系列低氧适应反应。当细胞氧分压降低或者受到其他刺激时，HIF-1α在胞浆中积累、活化，转移到细胞核，与HIF-1β形成HIF-1分子，结合相应的靶序列，调节基因表达。

肿瘤的病理生理学特性表明，在低氧情况下，肿瘤细胞的生长却不受影响，这可能与肿瘤细胞内HIF-1的高表达有关。而抑制HIF-1的高表达，促进肿瘤细胞的凋亡是治疗恶性肿瘤理想的分子生物学方法。

我们将人脊髓胶质瘤细胞作为研究对象，观察缺氧对细胞凋亡的影响。本实验通过对人脊髓胶质瘤细胞——U251 细胞的培养，脂质体介导的 HIF-1α mRNA 表达质粒 pSUPER　EGFP1-dsRNA 转染入人 U251 细胞，为下一步实验作好准备。

材 料 和 方 法

一、主要材料

1、人 U251 细胞株（由四川大学华西医院移植与免疫实验室提供，中国）

2、一次性培养瓶（$75cm^2$，$25cm^2$）

3、一次性离心管

4、一次性培养皿（直径分别为 3.5cm,5cm, 10cm 等）

5、一次性培养 6 孔板、24 孔板、96 孔板。

二、主要试剂和仪器设备

（一）、药品与试剂

1、新生胎牛血清（FBS）（成都哈里生物有限公司，中国）

2、EDTA(四川大学华西临床医学院眼疾病实验室提供，中国)

3、PCR 引物(上海生工生物工程有限公司，中国)

3、质粒提取试剂盒（上海生工生物工程技术服务有限公司，中国）

4、阳离子脂质体：Lipofectamine™ 2000 (LF2000， Invitrogen 公司，美国)

5、琼脂糖（北京鼎国生物技术发展中心，中国)

6、D-Hanks 液(四川大学华西临床医学院眼疾病实验室提供，中国)

7、胰蛋白酶(四川大学华西临床医学院眼疾病实验室提供，中国)

8、PRMⅠ1640(四川大学华西临床医学院眼疾病实验室提供，中国)

9、DEPC 水(北京鼎国生物技术发展中心，中国)

10、Trizol 提取液(Invitrogen 公司，美国)

11、DEL2000 标准物(华美生物工程有限公司，中国)

12、逆转录试剂盒(Promega 公司，美国)

13、PCR 试剂盒(华美生物工程有限公司，中国)

14、CO_2、N_2、O_2 由四川大学华西医院氧气组提供。

15、DMEM（成都哈里生物有限公司，中国）

（二）、仪器设备

1、超净工作台（NUAIRE-600E， NUAIRE，美国）

2、二氧化碳培养箱（MCD-17A，SANYO，日本）

3、低氧培养箱（INCUB IG750 230V，JOUAN，法国）

4、倒置相差显微镜（IX50 ，OLYPUS，日本）

5、OLYMPUS 显微镜(OLYMPUS BX51，OLYMPUS ，日本)

6、水平式低温离心机（Heraeus, Varifuge 3.0RS，德国）

7、恒温水浴器（HZS-H，哈尔滨市东联电子技术开发有限公司，中国）

8、高速台式离心机（eppendorf centrifuge 5810R，美国）

9、荧光显微镜（OLYMPUS，日本）

10、H-600IV型透射电镜（日立，日本）

三、方法

（一）、人 U251 细胞的培养

1、样本采集：

将冻存的人 U251 细胞株在恒温水浴器中解冻，加入完全培养液，然后将其放到 5%二氧化碳培氧箱中复苏培养 24 小时。

2、细胞培养：

取出复苏培养后的细胞，观察外观整洁，培养液正常，更换完全培养液后培养 24 小时。24 小时后将培养瓶中贴壁细胞，用 0.125%胰蛋白酶，0.02%EDTA 再消化，用 FBS 终止消化，加 DMEM 重复清洗，将 1 瓶人 U251 细胞消化作 1:2 传代。于二氧化碳培氧箱中 37℃，5%CO_2，饱和湿度培氧，每周更换完全培养液两次；培养 7～10 天后，将 1 瓶人 U251 细胞作 1:4 传代。

取消化 2 瓶人 U251 细胞消化计数 $3.21\times10^6/75cm^2$ ，取 $1.8\times10^6/75cm^2$ 用完全培养液稀释为 12ml，以 2 ml/孔接种 6 孔板。

（二）、细胞稳定转染

1、质粒的小量抽提：

把阳性克隆的菌用 LB 液体培养基过夜培养，提取质粒，具体如下：

①、将过夜培养的 1～2ml 细菌高速离心 15 秒，彻底去除上清；

②、加入 100μl Solution I，用枪头或振荡器充分悬浮细菌；

③、加入 200μl Solution II，立即温和混匀（倾斜 45 度角，顺一个方向，慢慢旋转离心管），使细菌裂解，室温放置 2 分钟；

④、加入 350μl Solution III，立即上下颠倒 5～10 次，使之充分中和，室

温放置 3 分钟；

⑤、12000rpm 高速离心 5 分钟；

⑥、将 UNIQ-10 柱放入收集管，吸取上清，加到 UNIQ-10 柱中，室温放置 2 分钟，5000rpm 离心 1 分钟；

⑦、去掉收集管中的废液，将 UNIQ-10 柱放入同一支收集管中，吸取 500 μl Wash Solution 到 UNIQ-10 柱，8000rpm 离心 30 秒；

⑧、重复步骤 7；

⑨、去掉收集管中的废液，将 UNIQ-10 柱放回收集管中，10000rpm 离心 30 秒；

⑩、将 UNIQ-10 柱放入新的洁净 1.5 ml 离心管中，加 50 μl Elution Buffer，室温下放置 2 分钟，10000rpm 高速离心 1 分钟，即得 DNA 样品。

2、细胞转染：

(1)、按下表配制转染体系：

编号	1640	L2000	Super-HIF-siRNA	Super-HIF-NonsiRNA
1	3000	/	35ul-（12ug）	/
2	3000	/	/	40ul-（12ug）
3	6000	60	/	/

按上表分别稀释质粒及脂质体。

注：

①、Super-HIF-siRNA（浓度为 350 ng/ul）

A_{260}=0.123，　A_{280}=0.059，　A_{260} ：A_{280}=2.0682

Cone=306.40ng/ul

②、Super-HIF-NonsiRNA（浓度为 300 ng/ul）

A_{260}=0.103，　A_{280}=0.056，　A_{260} ：A_{280}=1.9341

Cone=252.0078ng/ul

(2)、转染前 24 小时以 5×10^5/ml 密度接种细胞于 6 孔细胞培养板，待传代培养的细胞长满 90%后进行转染。

其他操作步骤：

①、用含 15%胎牛血清的 1640 加满 2ml，培养 24 小时；

②、换无血清 1640 2ml，培养 24 小时；

③、A 液：10ul 脂质体 L2000 加入 250ul 的无血清 1640 中，室温 5 分钟；

④、B 液：4ug 用 Tip-500 抽提纯化并无菌的 pSUPER EGFP1-dsRNA 或空载体加入到 250ul 的无血清 1640 中，室温 5 分钟；

⑤、C 液：A 液和 B 液混合，室温 25 分钟

⑥、6 孔细胞培养板换新鲜无血清 1640 2ul

⑦、将 C 液加入相应的孔中；

⑧、6 小时后换含 15%胎牛血清的 1640 2ml，培养 24 小时；

⑨、培养 24 小时后换含 15%胎牛血清的 1640 2ml，培养 48 小时；

⑶、转染后 4 小时换为完全培养液。

（三）、细胞的分组和建立缺氧、常氧模型

1、载体组（Super-HIF-siRNA）：

①、缺氧组（载体组-1）（Super-HIF-siRNA-1）（A：12h 组；B：24h 组；C：36h 组）：

按细胞培养方法，应用 HIF-1α 基因受体 siRNA 转染后的人 U251 细胞（细胞生长于 $75cm^2$ 的培养瓶）常氧培养 4 小时换为完全培养液，进行低氧培养（置入低氧培养箱中，氧浓度调为 1%，培养基为无糖，无血清，其它培养条件同常氧细胞培养），分别培养 12h、24h 和 48h，得到缺氧 12h、24h 和 48h 细胞。

②、常氧组（载体组-2）（Super-HIF-siRNA-2）（D：12h 组；E：24h 组；F：48h 组）：

按细胞培养方法，将应用 HIF-1α 基因受体 siRNA 转染后的人 U251 细胞（细胞生长于 $75cm^2$ 的培养瓶）常氧培养 4 小时换为完全培养液，进行常氧培养，分别培养 12h、24h 和 48h，得到常氧 12h、24h 和 48h 组细胞。

2、空载体组（Super- HIF- NonsiRNA）：

①、缺氧组（空载体组-1）（Super- HIF- NonsiRNA-1）（G：12h 组；H：24h 组；I：48h 组）：

按细胞培养方法，将未应用 HIF-1α 基因受体 siRNA 转染后的人 U251 细胞（细胞生长于 $75cm^2$ 的培养瓶）常氧培养 4 小时换为完全培养液，进行低氧培养（置入低氧培养箱中，氧浓度调为 1%，培养基更为无糖，无血清，其它

培养条件同常氧细胞培养），分别培养 12h、24h 和 48h，得到缺氧 12h、24h 和 48h 细胞。

②、常氧组（空载体组-2）（Super- HIF- NonsiRNA-2）（J：12h 组；K：24h 组；L：48h 组）：

按细胞培养方法，将未应用 HIF-1α 基因受体 siRNA 转染后的人 U251 细胞（细胞生长于 75cm^2 的培养瓶）常氧培养 4 小时换为完全培养液，进行常氧培养，分别培养 12h、24h 和 48h，得到常氧 12h、24h 和 48h 细胞。

3、对照组：

①、缺氧组(control-1) （M：12h 组；N：24h 组；O：48h 组）：

按细胞培养方法，将未经过转染的人 U251 细胞（细胞生长于 75cm^2 的培养瓶）常氧培养 4 小时换为完全培养液，进行低氧培养（置入低氧培养箱中，氧浓度调为 1%，培养基更为无糖，无血清，其它培养条件同常氧细胞培养），分别培养 12h、24h 和 48h，得到缺氧 12h、24h 和 48h 组细胞。

②、常氧组(control-2)（P：12h 组；Q：24h 组；R：48h 组）：

按细胞培养方法，将未经过转染的人 U251 细胞（细胞生长于 75cm^2 的培养瓶）常氧培养 4 小时换为完全培养液，进行常氧培养，分别培养 12h 、24h 和 48h，得到常氧 12h 、24h 和 48h 细胞。

（四）、观察分组培养的细胞常氧、缺氧模型

第一种方法：吖啶橙染色光学显微镜观察常氧、缺氧人 U251 细胞模型

将培养的人 U251 细胞爬片，用 PBS 清洗 3×5min；固定：丙酮固定 20 分钟、干燥后放－20℃贮存备用；取出爬片用 PBS 清洗 3×5min 后，直接加入鲜配制的吖啶橙，室温下显色，光学显微镜下观察，适时终止。

第二种方法： 电镜观察常氧、缺氧人 U251 细胞模型

1、细胞固定方法

用胰蛋白酶消化常氧、缺氧组细胞，用 1×PBS 清洗两次，水平式低温离心机离心 1200rpm×5min，弃上清；用吸管沿壁缓慢加入 0.3%戊二醛（原液 1:9）固定液，静置 30 min，4℃，再用高速台式离心机离心，12000rpm×10min，弃上清；用吸管沿壁缓慢加入 3%戊二醛固定液。

2、操作过程

样本经3%戊二醛预固定，1%四氧化锇再固定；丙酮逐级脱水，Epon812包埋，半薄切片光学定位；超薄切片，醋酸铀及枸橼酸铅双重染色，H-600Ⅳ型透射电镜观察。

结　果

由于质粒带有荧光标记，一旦转染进入人 U251 细胞，经过培养后在荧光显微镜下可以看到荧光。

将经过转染后的人 U251 细胞经过培养后放在光学显微镜下和荧光显微镜下进行观察，并且进行照相，其结果如下：

一、光学显微镜观察培养的人 U251 细胞（见图 1.1, 1.2）

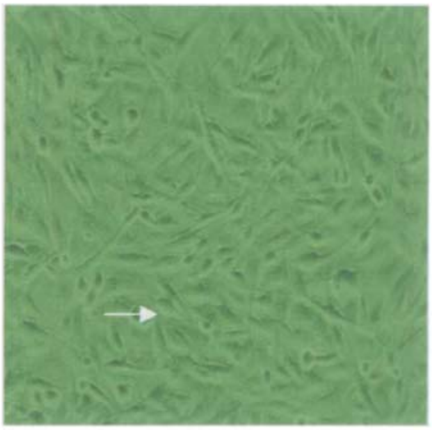


图 1.1 放大倍数 ×100

接种细胞密度为 $3\times10^{6}/25cm^{2}$

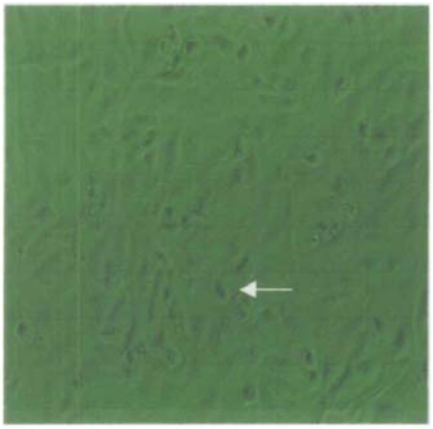


图 1.2 放大倍数 ×100

接种细胞密度为 $1\times10^{6}/25cm^{2}$

结果显示：所培养的细胞可见大量围绕胞体分布的足突，具有 U251 细胞的外型特征。

二、电镜及光镜观察常氧、缺氧组 U251 细胞：

（见图 1.3，1.4, 1.5，1.6）

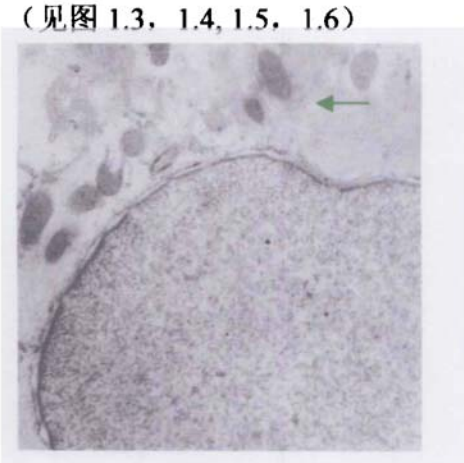


图 1.3 常氧组 ×1.4 万

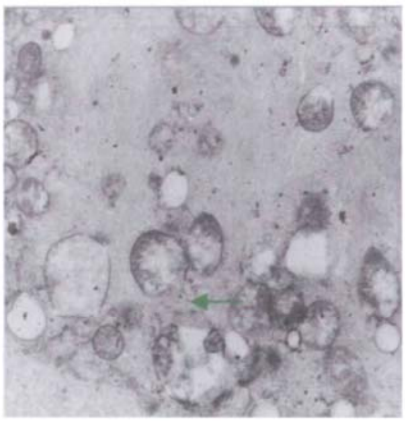


图 1.4 缺氧组 ×1.4 万

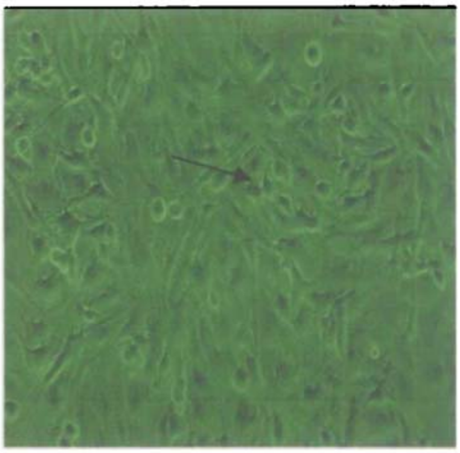


图 1.5 常氧组 ×100

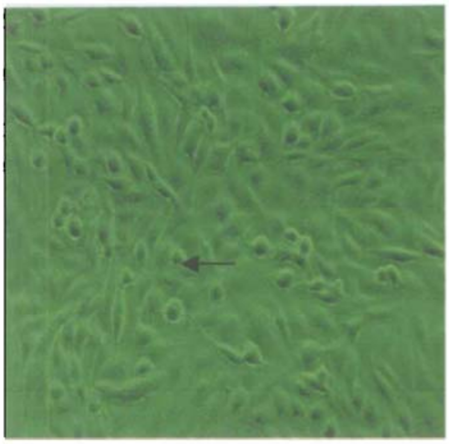


图 1.6 缺氧组 ×100

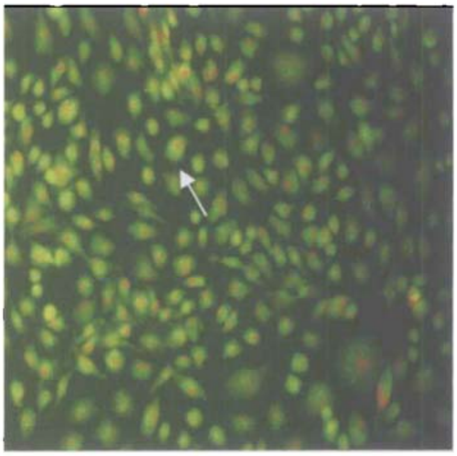


图 1.7 常氧组 ×100

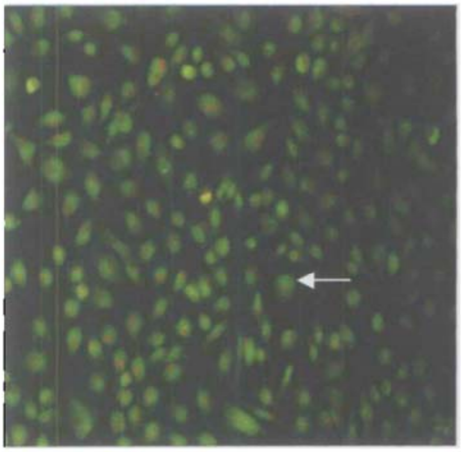


图 1.8 缺氧组 ×100

三、转染后的人 U251 细胞

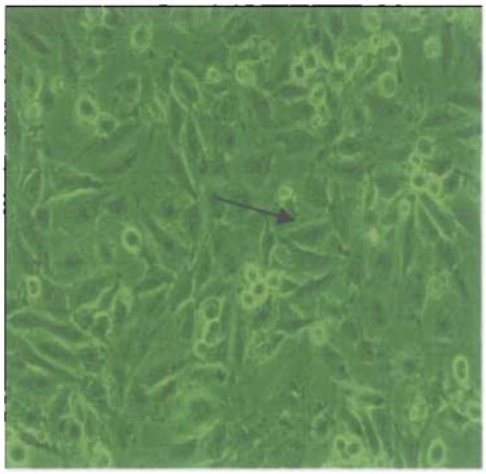


图 1.9 常氧组 ×100

Super- HIF -siRNA 24 小时光镜

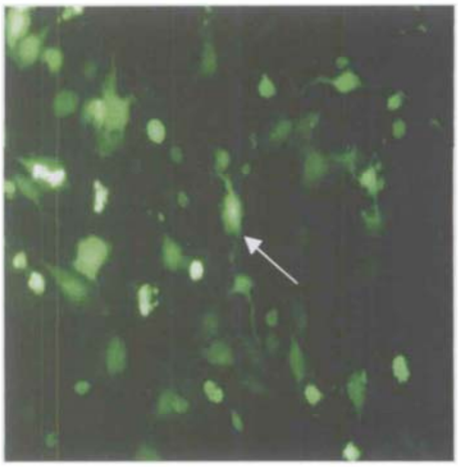


图 1.10 常氧组 ×100

Super- HIF -siRNA 24 小时荧光

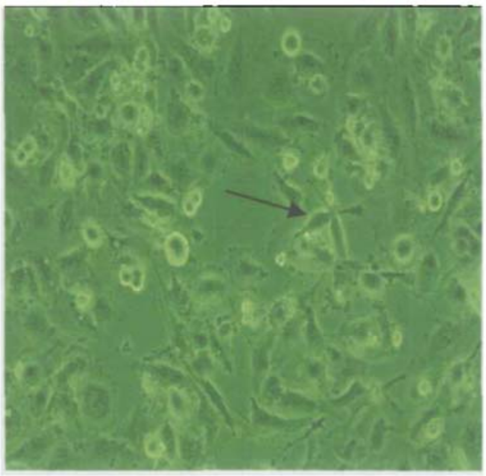


图 1. 11　常氧组 ×100

Super-HIF-NonsiRNA 24 小时光镜

图 1. 12　常氧组 ×100

Super-HIF-NonsiRNA24 小时荧光

结果：

1、图 1.3，1.4 中电镜所示，常氧、缺氧组细胞可见胶质丝，证明培养的细胞为人 U251 细胞。

2、图 1.3，1.4 电镜所示，缺氧组较常氧组细胞线粒体肿胀，嵴溶解，甚至消失；图 1.5，1.6，1.7，1.8 光镜所示，缺氧较常氧组细胞胞体，尤其足突肿胀；说明本实验 U251 细胞缺氧细胞模型制作成功。

3、图 1.9，1.10，1.11，1.12 光镜所示，转染后细胞的形态有少许改变，经过培养后在荧光显微镜下可以看到荧光。说明本实验质粒转染进入人 U251 细胞，U251 细胞质粒转染模型制作成功。

讨 论

脊髓胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤。目前尽管采用手术、放疗和化疗等综合治疗手段，但总体预后不理想。研究发现脊髓胶质瘤是多基因突变疾病。常常有较多的微血管或因为供血供养不足不能满足肿瘤组织迅速增长的需要而出现坏死、囊性变。因此，把脊髓胶质瘤赖以生存的微环境作为研究、治疗的方向是目前肿瘤研究、治疗的难点和热点。

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1，HIF-1)是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子，能激活许多低氧反应性基因的表达，是在低氧条件下维持氧稳态的关键性物质[36-39]。低氧诱导因子1是bHLHH-PAS家族的成员。由α和β两个亚基构成的异二聚体蛋白。其中HIF-1α蛋白水平的高低决定了HIF-1同DNA结合的水平和转录活性。随着细胞氧浓度的下降，HIF-1α表达水平呈指数增加。HIF-1α作为转录因子能够反作用于氧调节基因的顺式调控序列，发挥多方面的效应。从而诱导糖酵解基因的表达，促进无氧代谢；通过诱导血管内皮生长因子（VEGF）的表达促进血管的形成。还可以诱导一氧化氮合酶（iNOS）、血红素氧化酶（HO-1）的表达引起扩血管的作用。它能够激活EPO基因的表达使红细胞的生成增加。提高携带氧的能力，从而使缺氧的组织细胞保持氧稳态及耐受低氧状态。同时HIF-1α与细胞凋亡调控基因bcl2，P21和P53等的表达有明显的相关性[40-44]。

肿瘤的病理生理学特性表明，在低氧情况下，肿瘤细胞的生长却不受影响，这可能与肿瘤细胞内HIF-1α的高表达有关。而抑制HIF-1α的高表达，促进肿瘤细胞的凋亡是治疗恶性肿瘤理想的分子生物学方法。

在体外细胞培养体系中，缺氧模型能较好地模拟缺血对细胞造成的损害，人U251细胞对缺氧的耐受体现了恶性肿瘤的病理生理学特性。本研究通过建立人U251细胞缺氧模型，模拟脊髓胶质细胞瘤在缺氧情况下的病理生理学模型。结果显示，缺氧组较常氧组细胞线粒体肿胀，嵴溶解，甚至消失（电镜所示），细胞胞体肿胀，尤其足突肿胀（光镜所示），说明本实验所采用的模拟脊髓胶质细胞瘤缺氧模型制作成功。

为了达到高的转染效率，在转染实验过程中，需要注意以下几点：①、纯化siRNA。在转染前要确认siRNA的大小和纯度。低纯度的siRNA或siRNA降

解可导致其转染效率下降。为得到高纯度的siRNA，推荐用玻璃纤维结合、洗脱或通过20%丙烯酰胺胶除去反应中多余的核苷酸、小的寡核苷酸、蛋白和盐离子[45]；②、避免RNA酶污染。微量的RNA酶将导致siRNA实验失败。由于实验环境中RNA酶普遍存在[46]，如皮肤、头发，所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等，因此保证实验的每个步骤不受RNA酶污染非常重要；③、健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性。通常健康的细胞转染效率较高。此外，较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验，推荐用50代以下的转染细胞，否则细胞转染效率会随时间明显下降[47]；④、避免使用抗生素。Ambion公司推荐从细胞种植到转染后72小时期间避免使用抗生素。抗生素会在穿透的细胞中积累毒素。有些细胞和转染试剂在siRNA转染时需要无血清的条件[48]。这种情况下，可同时用正常培养基和无血清培养基做对比实验，以得到最佳转染效果；⑤、选择合适的转染试剂。针对siRNA制备方法以及靶细胞类型的不同，选择好的转染试剂和优化的操作对siRNA实验的成功至关重要[49]。目前比较常用的是阳离子脂质体如Lipofectamine 2000或Oligofectaminea。

我们在本实验中应用的脂质体是阳离子脂质体 Lipofectamine^{TM} 2000，通过脂质体介导的 HIF-1α mRNA 表达质粒 pSUPER EGFP1-dsRNA 转染入人U251 细胞，在转染的过程中由于不使用抗生素，而取得了良好的转染效果。而本实验所用的质粒 pSUPER EGFP1 带有荧光，观察转染是否成功十分方便，为下一步实验作好准备。

综上所述，Lipofectamine^{TM} 2000可将体外化学合成的21-nt dsRNA转入哺乳动物细胞，有效抑制靶基因的表达，诱发RNAi效应，其效率尚需在体内实验进一步证实。

小　结

本实验通过体外常氧和缺氧培养人 U251 细胞，采用丫啶橙染色，电镜和光镜分别观察细胞线粒体和细胞胞体、足突肿胀程度。

通过应用脂质体 Lipofectamine ™2000 介导质粒 pSUPER　EGFP1 转染人 U251 细胞，为进一步研究其对 HIF-1α mRNA 的基因沉默作用提供了基础。

结果发现：

1、光镜观察培养的细胞具有人 U251 细胞外型特征，大量围绕胞体分布的足突。电镜可见细胞内存在胶质丝，表明培养的细胞为人 U251 细胞。

2、电镜可见，缺氧组较常氧组细胞线粒体肿胀，嵴溶解，甚至消失；光镜可见，缺氧组较常氧组胞体，尤其足突肿胀。说明本实验所制作的模拟脊髓胶质细胞瘤缺氧模型制作成功。

3、转染了 HIF-1α 和未转染 HIF-1α 的人 U251 细胞，经过培养后在荧光显微镜下可以看到荧光。

第 三 部 分

缺氧前、后人 U251 细胞 HIF-1α 基因表达与细胞凋亡的关系

前 言

低氧诱导因子 1 与肿瘤的生长密切相关。HIF-1 是 bHLHH-PAS 家族的成员。由 α 和 β 两个亚基构成的异二聚体蛋白。其中 β 亚基必然表达，起主要结构性作用。而 HIF-1α 起主要功能性作用，蛋白水平的高低决定了 HIF-1 同 DNA 结合的水平和转录活性。随着细胞氧浓度的下降，HIF-1α 表达水平呈指数增加。HIF-1α 作为转录因子能够反作用于氧调节基因的顺式调控序列，发挥多方面的效应。从而诱导糖酵解基因的表达，促进无氧代谢；通过诱导血管内皮生长因子（VEGF）的表达促进血管的形成[50]。还可以诱导一氧化氮合酶（iNOS）、血红素氧化酶（HO-1）的表达引起扩血管的作用。它能够激活 EPO 基因的表达使红细胞的生成增加。提高携带氧的能力，从而使缺氧的组织细胞保持氧稳态及耐受低氧状态。同时 HIF-1α 与细胞凋亡调控基因 bc12，P21 和 P53 等的表达有明显的相关性[51]。

肿瘤缺氧细胞的存在不仅使肿瘤对放化疗的抗拒性增强[1-2]，而且使肿瘤细胞侵袭性表型表达上升从而导致肿瘤的转移[52-54]。在缺氧诱导肿瘤基因表达的信息通路上，缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)起着中枢纽带的作用。因此，研究 HIF-1α 在调控脊髓胶质瘤的生长、凋亡及其微循环的改变，阐明其分子机理，阻断 HIF-1α 的表达成为治疗脊髓胶质瘤缺氧耐受的关键。

本研究通过脂质体 Lipofectamine ™ 2000 介导质粒 pSUPER EGFP1-dsRNA 转染人 U251 细胞，采用实时定量 RT-PCR 法、吖啶橙染色、MTT 法、免疫组织化学法观察其对 HIF-1α 的基因沉默作用，了解其对人 U251 细胞凋亡的影响。

材料和方法

一、 主要试剂和仪器设备

（一）、主要试剂

1、DEPC（Sigma 公司，美国）
2、PDTC（Sigma 公司，美国）
3、琼脂糖（北京鼎国生物技术发展中心，中国）
4、RT-PCR Kit（上海博彩生物科技有限公司，中国）
5、总 RNA 提取试剂（TRIzol Reagent，GIBCOBRL 公司，美国）
6、DNA Marker (50bp，北京清华大学天为时代，中国)
7、引物（上海捷倍思基因技术有限公司，中国）
8、探针（TaqMan，上海生工生物工程技术服务有限公司，中国）
9、标准 cDNA 模板(cDNA model，上海生工生物工程技术服务有限公司，中国)
10、20×Human GAPDH （PE 公司，美国）
11、2×PCR master mix（PE 公司，美国）
12、丙烯酰胺（华美生物公司，中国）
13、亚甲叉双丙烯酰胺（华美生物公司，中国）
14、TEMED（华美生物公司，中国）
15、SDS（GIBCOBRL，美国）
16、PVDF 膜（Hybond™，P Amersham Pharmacia，美国）
17、Whatman 3MM 滤纸（华美生物公司，中国）
18、考马斯亮蓝 R250（华美生物公司，中国）
19、PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) （Sigma，美国）
20、NonidetP-40（Sigma，美国）
21、Tween-20 （Sigma，美国）
22、Hepes（Sigma，美国）
23、明胶（Sigma，美国）
24、DTT（华美生物公司，中国）

25、兔抗人 HIF-1α 抗体 BA 1361（一抗，武汉博士德生物公司，中国）

26、生物素化兔抗羊 IgG(北京中山公司，中国)

27、辣根酶标记链亲合素(北京中山公司，中国)

28、浓缩型 DAB 试剂盒(北京中山公司，中国)

29、SP 标记的 KIT-9706（二抗、福州迈新生物有限公司，中国）

30、甲醇（华美生物公司，中国）

31、tritonX-100（华美生物公司，中国）

32、DMEM（成都哈里生物有限公司，中国）

33、EDTA（Sigma 公司，美国）

34、新生胎牛血清（FBS）（天津生物制品研究所，中国）

35、MTT(Sigma 公司，美国)

36、吖啶橙(美国，Sigma)。

37、二甲基亚砜（上海生工生物有限公司，中国）

38、CO_2、N_2、O_2 由四川大学华西医院氧气组提供。

（二）、仪器设备

1、FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪（枫岭公司，加拿大）

2、PTC-2000PCR 合成仪（MJ Reasearch Inc，美国）

3、转移电泳槽（Bio-rad 公司，美国）

4、Typhoon 图像处理系统（Pharmacia Typhoon8600，美国）

5、凝胶成像系统（Gel Doc 1000，Bio-rad 公司，美国）

6、紫外分光光度仪（PE 公司，美国）

7、酶联免疫仪（日立，日本）

8、高速台式离心机（Micro Centaur，SANYO，日本）

9、制冰机（SLM-F123，SANYO，日本）

10、纯水仪（Barnstead 公司，美国）

11、垂直电泳槽及电泳仪（Bio-rad 公司，美国）

12、Typhoon 图像处理系统（Pharmacia，美国）

13、水平式低温离心机（Varifuge 3.0RS，Heraeus，德国）

14、杂交箱（SANYO，日本）

15、激光共聚焦显微镜（Laser，美国）
16、超净工作台（NUAIRE-600E， NUAIRE，美国）
17、二氧化碳培氧箱（MCD-17A，SANYO，日本）
18、低氧培养箱（INCUB IG750 230V，JOUAN，法国）
19、倒置相差显微镜（IX50，OLYPUS，日本）
20、H-600Ⅳ型透射电镜（日立，日本）
21、OLYMPUS 显微镜(OLYMPUS BX51，OLYMPUS，日本)

（三）、主要液体配制

1、1×SDS 加样缓冲液：62.5mM Tris.cl(PH6.8)，50mM DTT(临用前配)，2%SDS，0.1%溴酚蓝，10%甘油
2、5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液： 25 mMTris， 25 mM 甘氨酸， 0.1%SDS
3、转移缓冲液：39 mM 甘氨酸，48mM Tris 碱，0.037% SDS，20%甲醇
4、清洗缓冲液（TBST）：1×TBS（8g Nacl,2.42gTris,adjust PH to 7.6 with Hcl），0.1% Tween-20
5、封闭液缓冲液：5%（W/V）脱脂奶，0.1% Tween-20，1×TBS
6、 MTT 溶液的配制：98％噻唑蓝 100mg／瓶，先溶于 D-PBS 20ml，再经 0.22mm 微孔滤器滤过除菌，分装后冰箱内 4℃保存，4 周内有效。

二、方法

（一）、HIF-1α小干扰 RNA（si RNA）真核表达载体的人 U251 细胞稳定转染（见第二部分）

（二）、实时荧光定量 PCR 检测缺氧后人 U251 细胞 HIF-1αmRNA 表达的改变

1、总 RNA 的提取

在载体组、空载体组、对照组进行不同时限培养后：

①、将培养瓶（$25cm^2$）中的人 U251 细胞，用 1×PBS（Rnase free）清洗 2 次，弃 PBS;

②、加入 1ml TRIzol，用枪头反复吹打几次，将细胞溶解液移至 1.5ml Eppendorf 管（Rnase-free）中；

③、室温静置 5min，加入氯仿 200ul，用手振荡混匀 15 秒，室温静置 5min，

离心，12000prm×15min，4℃；

④、收集上层水相，加入异丙醇 500 ul，充分混匀，室温静置 10min，离心 12000 prm×10min，4℃；

⑤、弃上清液，加 75%乙醇（0.1%DEPC 稀释）1 ml，旋涡混匀，离心 7500 prm×5min，4℃；

⑥、弃上清，空气干燥沉淀 30 min，加 8ul 0.1%DEPC 水溶液，－80℃贮存备用。

2、RNA 检测

根据 RNA 在 260nm 和 280nm 的吸光度的比值（≥1.8）和 3%琼脂糖凝胶电泳 28s 和 18s RNA 条带比值（≥2.0）鉴定 RNA 纯度及完整性。

①、RNA 纯度检测

取 5ul RNA 溶液，用 DEPC 处理过的水稀释至 200ul，以紫外分光光度计(SmartSpec3000)分别测定其 260nm 和 280rnn 波长的吸光度值 A_{260} 与 A_{280}，以 A_{260}/A_{280} 的比值判断样品纯度：$1.8<=A_{260}/A_{280}<=2.0$ 表明纯度符合要求。

②、RNA 浓度检测

按以下公式计算 RNA 浓度：C_{RNA}(ug/ml)＝A_{260}×40×稀释倍数。

③、RNA 完整性检测

配制 1%甲醛变性凝胶，取 10ul RNA 溶液与 RNA 上样缓冲液 1:1 混匀，68℃ 20 水浴变性 3 分钟，在 1×MOPS 电泳缓冲液中，电压为 100 伏电泳 1 小时，紫外成像仪下观察，当出现 5S，18S，28S 条完整条带时，说明提取的 RNA 较完整。RNA 溶液分装后保存于－80℃。

3、RT-PCR 扩增目的基因 cDNA 片断

3.1、引物和探针的设计与合成

①、根据人低氧诱导因子-1α（HIF-1α）序列[11]行引物设计如下：

HIF-1α 上游引物（F）：

5’-gatccccATCCAGAGTCACTGGAACTttcaagagaAGTTCCAGTGACTCTGGATtttttggaaa-3’；

HIF-1α 下游引物（R）：

5’-agcttttccaaaaaATCCAGAGTCACTGGAACTtctcttgaaAGTTCCAGTGAC

TCTGGAggg-3’。

HIF-1α TaqMan 探针：

5’- FAM-CAC CTG AGC CTA ATA GTC CCA G -TAMRA-3’；

人工合成标准 DNA 模板：（cDNA model，与待扩增 310bp 片段相同的 DNA）。

②、根据人低氧诱导因子-1β（HIF-1β）序列[11]行引物设计如下：

HIF-1β 上游引物（F）： 5’-GCCAACACAGTGCTGTCT-3’；

HIF-1β 下游引物（R）： 5’-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3’；

HIF-1β TaqMan 探针： 5’-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3’；

人工合成标准 DNA 模板：（cDNA model，与待扩增 175bp 片段相同的 DNA）。

③、引物：开盖前短暂离心，加入经 DEPC 处理的 ddH_2O 稀释至浓度为 25pM，－20℃储存备用。

探针：开盖前短暂离心，加入经 DEPC 处理的 ddH_2O 稀释至浓度为 10pM，避光，－20℃储存备用。

人工合成标准 DNA 模板：（cDNA model，与待扩增 310bp 片段相同的 DNA）

3.2、RT-PCR

采用上海博彩生物科技有限公司的 MmuLV RT/PCR kit，在 PTC-2000PCR 仪上进行扩增，条件如下：

3.2.1、第一步（逆转录步）：cDNA 合成

①、每管中加入下列物品，并小心混匀：

Sample(total RNA)	2μl
DEPC-H_2O	6μl
Rribonuclease inhibitor	0.5μl
Random prime	2μl
总体积	10.5μl

加完后 65℃ 保温 5min，室温放置 10min，高速离心 5sec。将所有溶液收集到瓶底。

②、在上述每管中依次序加入下列试剂：

5×First-Strand Buffer	4μl
Rribonuclease inhibitor	0.5μl
d NTP mix	2μl
DTT	2μl
MmuLV Reverse Transcriptase	1μl
总体积	20μl

反应条件：小心混匀，37℃保温 1h，90℃保温 5min，冰上冷却，室温高速离 5sec。将所有溶液收集到瓶底。用于 PCR 扩增或－20℃保存备用。

3.2.2、第二步：PCR 扩增第一步合成的 cDNA

①、 常规 PCR step：检测模板的存在及样品质量。

每管中依次序加入下列试剂后混匀：

10×PCR Buffer	3μl
d NTP mix	0.36μl
HIF-1α prime(R)	1μl
HIF-1α prime(F)	1μl
dd H_2O	15.34μl
Taq DNA polymerase	0.3μl
cDNA	2μl
总体积	30μl

扩增条件：

A 94℃ 3min

B 94℃ 30sec，50℃ 30sec，72℃ 1min，35 cycles

C 72℃ 5min

D 4℃ 保温

在 PCR 反应过程中，设定无 cDNA 样品的空白管作为阴性对照。

将反应产物取 8μl 做 3%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，检测扩增目的基因 cDNA 片断的质量。

②、琼脂糖凝胶电泳

称取适量琼脂糖放入 1×TBE 电泳缓冲液（浓度 3%），置于微波炉中，使其完全熔化，适度冷却后灌胶，待凝固后拔出梳子，放入电泳槽，倒入 1×TBE 缓冲液；取 PCR 产物与 6×溴酚蓝上样缓冲液按 5:1 混合，加样于凝胶样孔行潜水槽平板电泳，电压 3～6V/cm；电泳结束后用溴化乙锭（0.5ug/ml）染色，紫外光灯观察结果。

4、荧光定量 PCR 检测目的基因在人 U251 中的表达

4.1、标准模板的定量检测

用已知初始拷贝数（x）的人工合成标准 HIF-1α 和内对照 β action cDNA 模板按 10 倍梯度进行稀释，制成标准模板系列，自每个稀释模板中取样 2μl，分别加入 40μl 的反应体系中行 PCR 扩增，行探针实时荧光定量 PCR。具体步骤如下：

10×PCR Buffer	5μl
d NTP mix	1.5μl
HIF-1α prime(R)	1.2μl
HIF-1α prime(L)	1.2μl
Taq DNA polymerase	1μl
dd H_2O	26.6μl
Tmp	1.5μl
$MgCl_2$(25mM)	1μl
cDNA(model)	2μl
总体积	40μl

反应体系在 FTC2000 型荧光定量 PCR 仪上行 PCR，这种仪器较普通的 PCR 仪增加了一套复杂而紧密的荧光强度检测系统及数据分析系统，可对 PCR 反应过程中的每一循环的系统荧光强度进行实时（real-time）检测，通过对荧光强度的分析来达到等量检测的目的。

扩增条件：A　94℃ 2min

B　94℃ 20sec，56℃ 30sec，60℃ 1min，45 cycles

将 PCR 仪检测荧光强度的时相统一设定在扩增反应的退火期，本实验采用 56℃ 30sec 作为退火期。45 循环的扩增反应结束后，系统将采集到的每一循环反应时的各反应管的荧光强度增长指数（DRn）进行分析绘制每一反应管的扩增动力学曲线。根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值（threshold）时的扩增循环数（Ct 值），根据 Ct 值与标准模板初始拷贝的对数值作图，得到该样品的标准曲线。在此反应系统中，荧光强度的增加与模板量的增加成正比，荧光强度的变化可反应模板产物量的变化。

4.2、各时相待测样品中 HIF-1α 与内对照 β action 拷贝数的比值（%control）测定

按上 3.2.1 第一步（逆转录步）方法，将逆转录得到的 cDNA 样品各取 2μl，加入和标准模板的定量检测完全相同的 40μl 反应体系中，在同样的反应条件下行 PCR 扩增，同一样品在 HIF-1α 和 β action 反应体系各取 2μl。收集数据，绘制动力曲线，测定各样品的 Ct 值与标准曲线进行比较，得出各待测样品 HIF-1α 和 β action 拷贝数及二者比值。

5、统计学分析

对荧光定量 PCR 所得各待测样品 HIF-1α 和 β action 拷贝数的比值，数据以均数±标准差（$\bar{x}$±SD）表示，用 SPSS 软件分别进行方差分析，比较各实验组间差异，$P<0.05$ 为差异有显著性。

（三）、缺氧后人 U251 细胞 HIF-1α 蛋白表达的改变

1、Western Blot

Western blot 是特异性检测蛋白表达最常用的方法，Western blot 技术结合了凝胶电泳分辨率高和固相免疫测定的特异敏感等优点，可检测低至 1～

5ng 水平的靶蛋白。与免疫沉淀法比较，这种方法无须对靶蛋白进行同位素表记。Western blot 具有从混杂抗原中检测出特定抗原的特点，可对转移到固相膜上的蛋白质进行连续分析，具有蛋白质反应均一性，固相膜保存时间长等优点，因此该技术被广泛地用于蛋白质研究。

1.1、标本收集

①、刮取各实验组培养细胞，用 1×PBS（Ca $^{2+}$Mg^{2+}-free）清洗两次，每次离心 1000prm×5min，去上清；

②、沉淀悬浮在细胞裂解液：5 mM Tris-Hcl(pH7.4)，2 mM PMSF，10μM 肽素，10μM 胃酶抑素，2 mM EDTA，0.5% NonidetP-40，用玻璃匀浆器匀浆；

③、匀浆离心 1000 prm×10min，4℃，取上清；上清 10000 prm×60min，4℃，取沉淀为所收集的细胞膜标本，沉淀悬浮到裂解缓冲液中，蛋白浓度采用改良 Lowry 法测定，标本 - 80℃储存备用。

1.2、蛋白质制备

配制新鲜 1×SDS 加样缓冲液，沸水煮 5 min；在细胞膜标本中加入加样缓冲液，沸水煮 10 min。 - 20℃储存备用。

1.3、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

电泳装置，制备分离胶（见下表）；

①、SDS 聚丙烯酰胺凝胶灌注分离胶，用 0.1%SDS 封顶，待分离胶完全聚合后（约 1h），倾出覆层液体，用去离子水洗涤凝胶顶部数次，除去未聚合的丙烯酰胺，用吸水纸吸净残留液体；

②、入梳子，灌注积层胶，待积层胶完全聚合后（约 20 min），拔出梳子；将凝胶固定于电泳装制上，加入 1×Tris-甘氨酸电泳缓冲液，排出凝胶底部玻璃板之间的气泡；

③、加样前先将样品加热，37℃，10 min；

④、按预定顺序加样，20μl/孔，含 50μg 蛋白；

溶液成分	凝胶液中各成分所需体积	
	10%分离胶 （15ml）	5%积层胶(5ml)

去离子水	5.9ml	3.4
1.5M Tris(PH8.8)	3.8ml	
1.0M Tris(PH6.8)		0.625ml
30%Acrylamide	5ml	0.85ml
10%SDS	0.15	0.05ml
10%过硫酸铵	0.15ml	0.05ml
TEMED	0.06ml	0.005ml

⑤、将电泳装制与电源相接，凝胶上所加电压为 80V，当样品电泳至积层胶和分离胶交界处，把电压提高到 150V ，继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部（约 4h）；

⑥、卸下玻璃板，取下分离胶，置于去离子水中漂洗 3×5min。

1.4、蛋白质的半干电转移

①、准备与凝胶大小完全吻合的 PVDF 膜和 6 张 3MM Whatman 滤纸；

②、PVDF 膜浸入 100%甲醇中 10sec，弃甲醇，再将膜放入去离子水中浸泡 5min；

③、将 PVDF 膜，6 张 3MM Whatman 滤纸浸于电泳转移缓冲液中 30 min；

④、按（+）滤纸-PVDF 膜-凝胶-滤纸（—）的顺序逐层安装电泳转移装置，每层之间排除所有气泡；

⑤、在 20V 条件下，电转移 30 min。

结束后将凝胶进行考马斯亮蓝染色，以便检查蛋白质是否转移完全。膜则按以下方法染色。

1.5、染色

①、将膜用 TBST 溶液清洗 3×10min；加入 25ml 封闭液，杂交箱，室温封闭膜 2h；

②、加入用 5ml 封闭液稀释的一抗（1：300），杂交箱，室温孵育膜 1 h，4℃冰箱过夜；

③、 膜用 15ml TBST 清洗 3×10min；加入用 5ml 封闭液稀释的二抗（生物素化兔抗羊 IgG ，5μg/ml），杂交箱，室温孵育膜 1 h；

④、 膜用15ml TBST清洗3×10min；加入用5ml封闭液稀释的三抗（辣根酶标记链亲合素，2.5μg/ml），杂交箱，室温孵育膜1 h；

⑤、膜用15ml TBST清洗3×10min；

⑥、膜用浓缩型DAB试剂盒显色，膜上加入底物混合液（1ml双蒸水，pH约7.0，加入一滴试剂A，混合均匀，然后将试剂B和试剂C各一滴加入其中，再次混匀，避光，30 min内使用。）避光显色20min ，置图像处理系统扫描成像。

1.6、蛋白质条带的图像分析

应用Image Pro Plus 软件进行分析，各样本特异性抗原蛋白表达的平均密度值减除空白对照值来进行比较，实验重复4次。

2、免疫组织化学

①、将各实验组的人U251细胞爬片，用1×PBS（含0.1%明胶）轻轻清洗2×1min；

②、用90%酒精固定30 min，用1×PBS（含0.1%明胶）清洗3×5min；

③、用0.3%H_2O_2/甲醇固定3min， 0.1%tritonX-100处理5min，1×PBS（含0.1%明胶）清洗3×5min；放湿盒，4℃冰箱；

④、滴加5%BSA封闭液，室温封闭20 min；加兔抗人HIF-1α抗体 BA 1361 IgG（一抗，0.4μg/ml）37℃孵箱孵育1h，4℃冰箱过夜；

⑤、1×PBS（含0.1%明胶）清洗3×2min；

⑥、加用FITC标记的兔抗羊IgG（二抗，1：25）及DAPI（1：800），37℃ 孵箱孵育30 min；

⑦、1×PBS（含0.1%明胶）清洗3×2min；滴加试剂HRP/S-A 30 min ，1×PBS（含0.1%明胶）清洗4×5min；

⑧、使用DAB显色试剂盒，取1ml蒸馏水，加试剂盒中A、B、C试剂各1滴，混均后加至切片。室温显色，镜下控制反映时间，一般5～30 min之间，蒸馏水冲洗；

⑨、苏木素轻度复染2 min脱水，透明，用10%甘油封片，在倒置荧光显微镜下观察并照相图像。

3、统计学分析

对 Western Blot 结果所得，各实验样本特异性抗原蛋白表达的平均密度值（应用 Image Pro Plus 软件进行分析，平均密度值越小表示蛋白表达越强，反之则表示蛋白表达越弱）；免疫荧光所得，各实验样本单位面积平均荧光强度，数据以均数±标准差（$\bar{x}$±SD）表示，用 SPSS 软件分别进行方差分析，比较各实验组间差异，$P<0.05$ 为差异有显著性。

免疫组织化学结果判定：以胞浆及胞核中出现棕黄色颗粒为阳性，每张切片在相同放大倍数下，各选取阳性细胞最集中的 10 个视野，每个视野数 100 个细胞，计算出每张切片上阳性细胞的百分熟，并应用显微镜照相。

（四）、电镜、荧光显微镜、免疫荧光及光镜观察人 U251 形态学改变

1、同第二部分吖啶橙染色光学显微镜、电镜观察培养细胞。

2、由于 pSUPER　EGFP1 带有绿色荧光，细胞转染后在荧光显微镜下可以观察到荧光蛋白。

（五）、MTT 法检测人 U251 细胞的活力

1、试验前根据实验所需 MTT 浓度用 DMEM 稀释 5～40 倍。

本实验所用 MTT 溶液：浓度 5mg / ml，溶解在 pH7.4 PBS 溶液中。4℃冰箱避光保存。使用前用 0.22um 滤器过滤除菌。

2、载体组、空载体组和对照组三组细胞进行实验。

①、将培养瓶内对数生长的人 U251 细胞消化，细胞计数，以 100ul(1×10^4 / well)密度接种于 96 孔培养板上每组 3 孔，使各孔细胞数基本相同；

②、将各组 96 孔培养板按缺氧、常氧的不同时限，放在低氧培养箱和二氧化碳培氧箱中培养；

③、12h 组：在培养 8 小时后，取出 96 孔培养板，每孔加入 MTT 10 ul，继续孵育 4 h。弃去上清液，每孔加入二甲基亚砜 150 ul，在平板振荡仪上 37℃振荡 10min，用酶联免疫仪 490 nm 、570 nm 波长检测各孔吸光度(OD 值)；

④、24h 组：在培养 20 小时后，取出 96 孔培养板，每孔加入 MTT 10 ul，继续孵育 4 h。弃去上清液，每孔加入二甲基亚砜 150 ul，在平板振荡仪上 37℃振荡 10min，用酶联免疫仪 490 nm 、570 nm 波长检测各孔吸光度(OD 值)；

⑤、48h 组：在培养 44 小时后，取出 96 孔培养板，每孔加入 MTT 10 ul，

继续孵育 4 h。弃去上清液，每孔加入二甲基亚砜 150 ul，在平板振荡仪上 37℃振荡 10min，用酶联免疫仪 490 nm 、570 nm 波长检测各孔吸光度(OD 值)。

3、统计方法

应用配对 t 检验比较两组计量资料间的差异，以 $P<0.05$ 判断差异显著性。

结　果

一、实时荧光定量PCR检测缺氧后人U251细胞HIF-1α mRNA表达的结果

（一）、人U251细胞总RNA的提取结果（见图3.1）

提取的人U251细胞总RNA经3%琼脂糖凝胶电泳结果见下图，可见28S、18S、5S三条带，无DNA污染条带，无明显降解条带，表明提取的总RNA纯度较高，提取的总RNA其OD_{260}/OD_{280}值分别为：缺氧组1.856，常氧组1.921，对照组1.985。

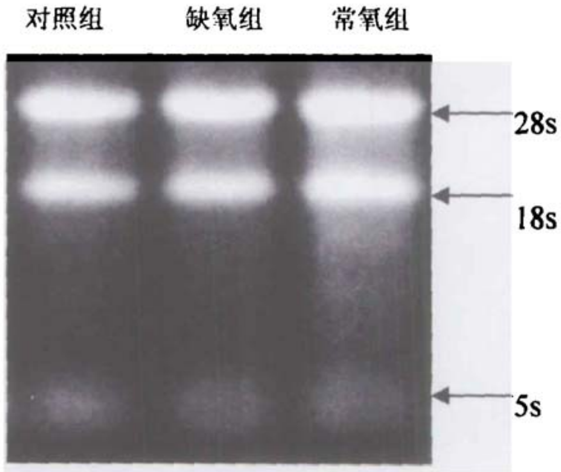


图3.1　人U251细胞总RNA提取物电泳

（二）、常规PCR结果（见图3.2）

HIF-1α扩增产物，3%琼脂糖凝胶电泳结果，可见246bp，310bp清晰亮度不同两条带，说明引物设计合成无误，HIF-1α cDNA模板可用于定量反应。

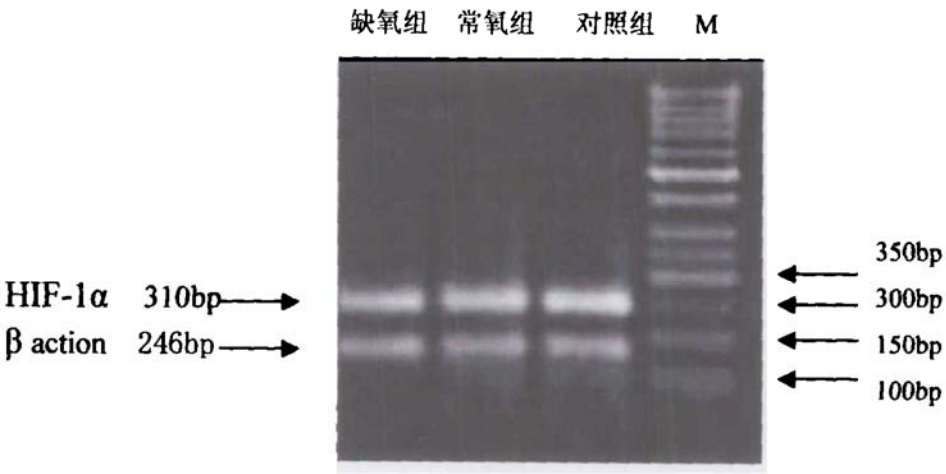


图 3.2 HIF-1α 常规 PCR 产物凝胶电泳图

（三）、HIF-1α的半定量 PCR 结果

重组质粒 pSUPER EGFP1 经脂质体介导转染人 U251 细胞后，采用半定量的 RT-PCR 技术，如图 3.3 所示。HIF-1α 片段大小为 310bp，β action 的片段大小为 175bp，空载体扩增片段为 246bp，转染 pSUPER EGFP1-dsRNA 组（图中 3、4、6）的 HIF-1α 与 β action 的相对比值的均数为 0.2516，与空载体组（图中 7、8，比值为 1.1728）比较有显著性差异（P＜0.001），说明 pSUPER EGFP1-dsRNA 对 HIF-1α mRNA 表达有明显的抑制作用，而对照组（图中 1、2，比值为 1.2708）与空载体组比较无显著性差异（P＝0.661），说明未转染 pSUPER EGFP1-dsRNA 对 HIF-1α mRNA 表达无明显的抑制作用；图中（3、4、6）为 pSUPER EGFP1-dsRNA 在缺氧 12 小时、24 小时、48 小时（比值分别为：0.2471，0.2932，0.3179），与空载体组比较有显著性差异（P＜0.001），说明 pSUPER EGFP1-dsRNA 对 HIF-1α mRNA 表达有明显的抑制作用，并且，随着缺氧时间的延长，抑制作用加强。

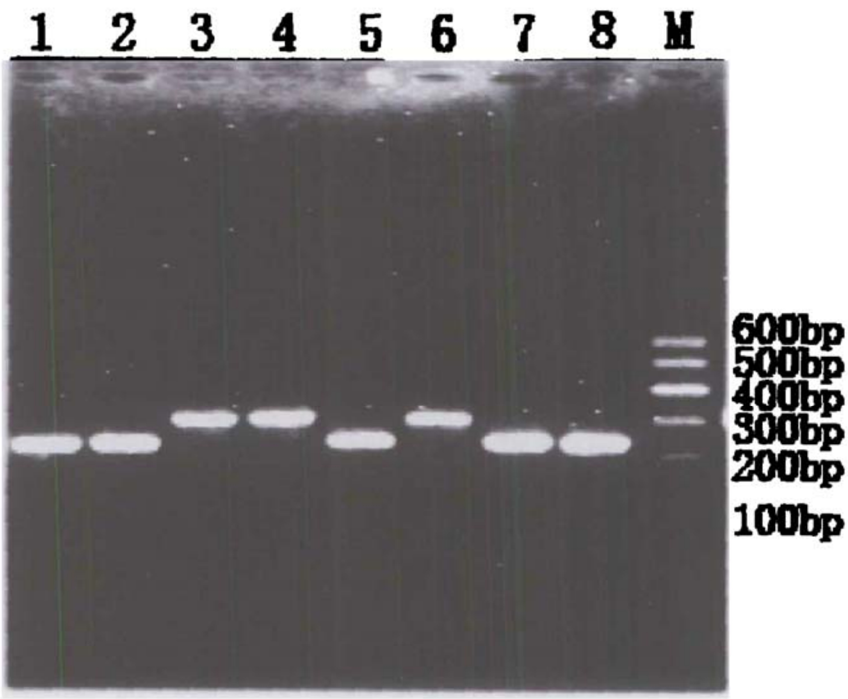


图 3.3 HIF-1α 半定量 PCR 产物凝胶电泳图

1、control-1-24h　　2、control-2-24h

3、Super-HIF-siRNA-1-12h　　4、Super-HIF-siRNA -1-24h

5、Super-HIF-siRNA-2-24h　　6、Super-HIF-siRNA-1-48h

7、Super- HIF- nonsiRNA-1-24h　　8、Super- HIF- nonsiRNA-2-24h

（四）、定量 PCR 结果

1、标准曲线的建立（见图 3.4，3.5，3.6，3.7）

已知标准模板 HIF-1α cDNA 样品每毫升的初始拷贝数分别为 10^6、10^5、10^4、10^3 以样品拷贝数的对数为横坐标，Ct 值为纵坐标，拟合标准曲线，回归方程：y=39.1-3.3x

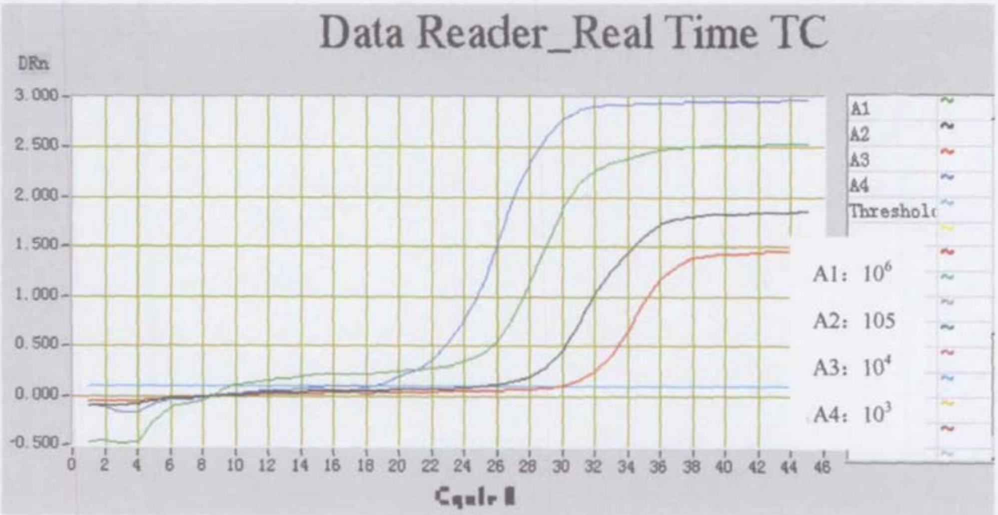


图 3.4　HIF-1α 标准模板的荧光定量 PCR 动力学曲线

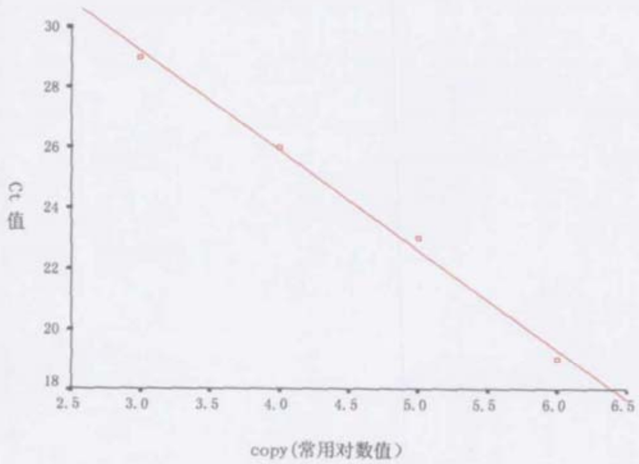


图 3.5　HIF-1α 标准模板的 PCR 标准曲线

已知标准模板β action cDNA样品每毫升的初始拷贝数分别为10^5、10^4、10^3、10^2以样品拷贝数的对数为横坐标，Ct值为纵坐标，拟合标准曲线，回归方程：y=34.9-3.4x

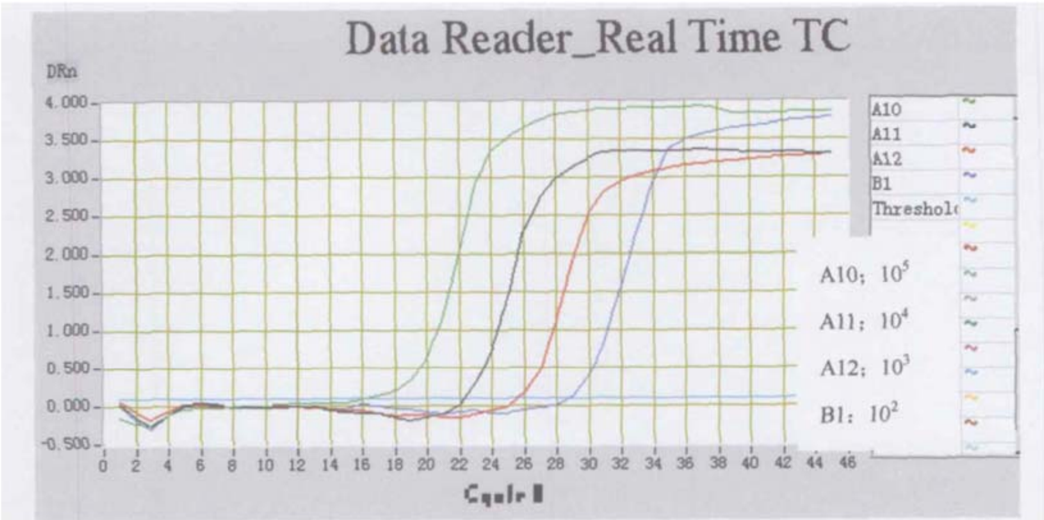


图3.6　β action标准模板的荧光定量PCR动力学曲线

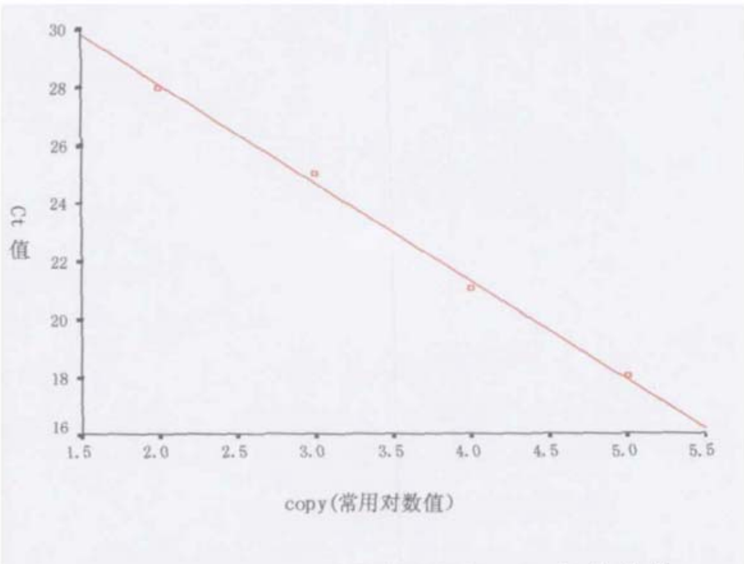


图3.7　β action标准模板的PCR标准曲线

由图中测得，HIF-1α的标准曲线线性相关系数R^2=0.994；β action的标准曲线线性相关系数R^2=0.996（R^2>0.96被认为拟合满意）。

2、HIF-1α荧光定量PCR结果

载体组、空载体组及对照组样品在定量 PCR 仪上进行 HIF-1α 和 β action 的 PCR 反应，采集每一反应管中荧光强度的变化，并绘制动力学曲线，得出样品荧光强度增加到阈值时的循环数（Ct 值），与标准曲线比较即可得出待测样品的初始拷贝数(重复 6 次)，同一样品得到的 HIF-1α 和 β action 拷贝数的比值，代表该样品 HIF-1α mRNA 的表达量。

2.1、载体（Super-HIF-siRNA）组 HIF-1α 荧光定量 PCR 结果（见图 3.8、3.9，表 3.1 ）

以下图中 H 代表缺氧（hypoxia），N 代表常氧(non-hypoxia)

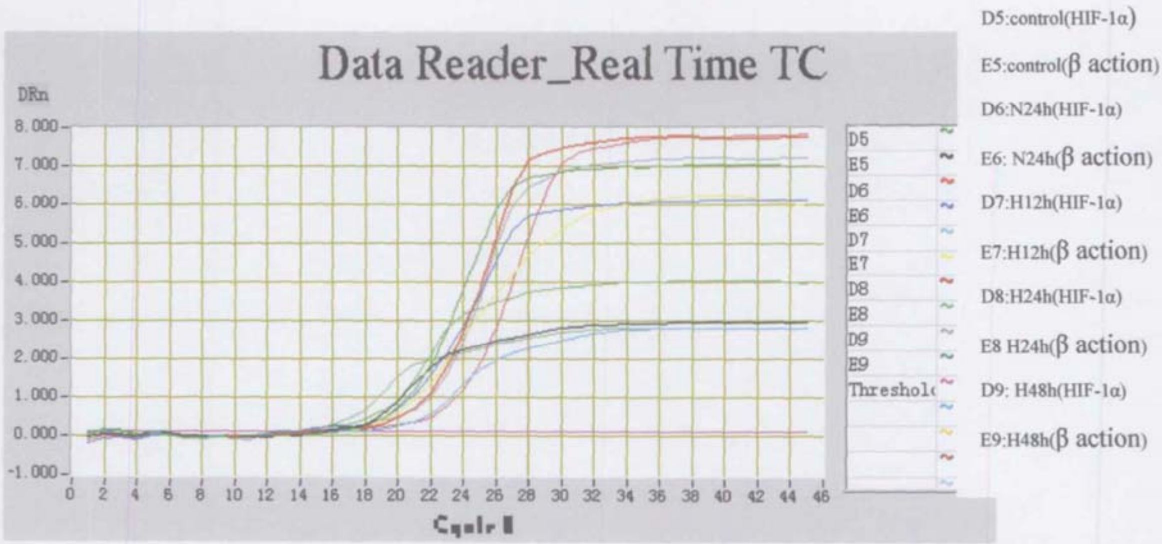


图 3.8 载体（Super-HIF-siRNA）组 HIF-1α 荧光定量 PCR 动力学曲线

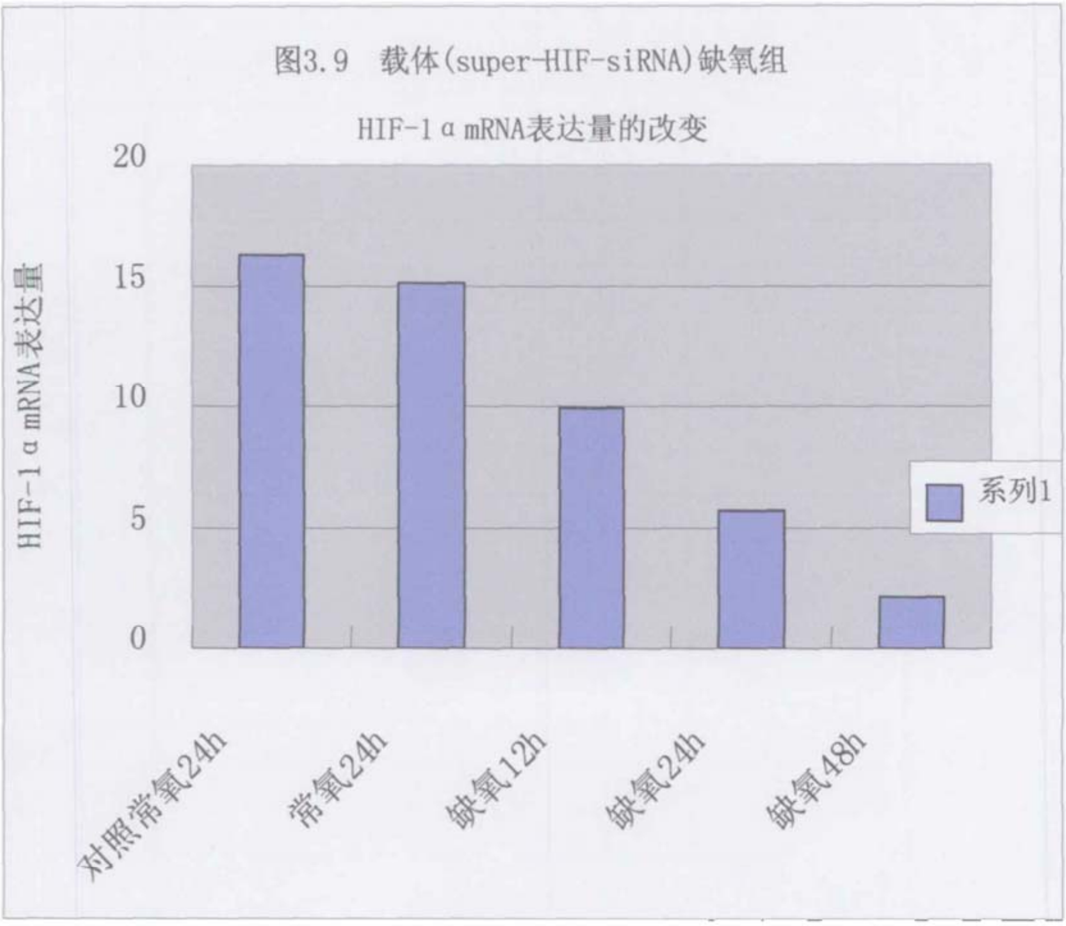
本实验数据经过数值转换，并经内参 β action 校正，结果见表 3-1。

表 3.1 载体（Super-HIF-siRNA）组 HIF-1α mRNA 表达量的改变（%control，$\bar{x}\pm SD$）

组别	对照常氧24h	常氧 24h	缺氧 12h	24h	48h
HIF-1αmRNA	16.25±1.80	15.12±1.17*	9.95±1.01*	5.67±0.69*	2.16±0.58*

*与对照组比较，*与*组间比较，P 均<0.05

结果显示：F=444.65，P<0.05（α=0.05）；对照组和各缺氧组间、缺氧不同时间点之间 HIF-1α mRNA 表达量均有显著性差异（P 均<0.05），随着缺氧时间延长，载体（Super-HIF-siRNA）组 HIF-1α mRNA 表达量的改变不同时间点 HIF-1α mRNA 表达量逐渐下降。



3.2、空载体（Super-non-HIF-siRNA）组 HIF-1α 荧光定量 PCR 结果（见图 3.10、3.11，表 3.2 ）

以下图中 H 代表缺氧（hypoxia），N 代表常氧(non-hypoxia)

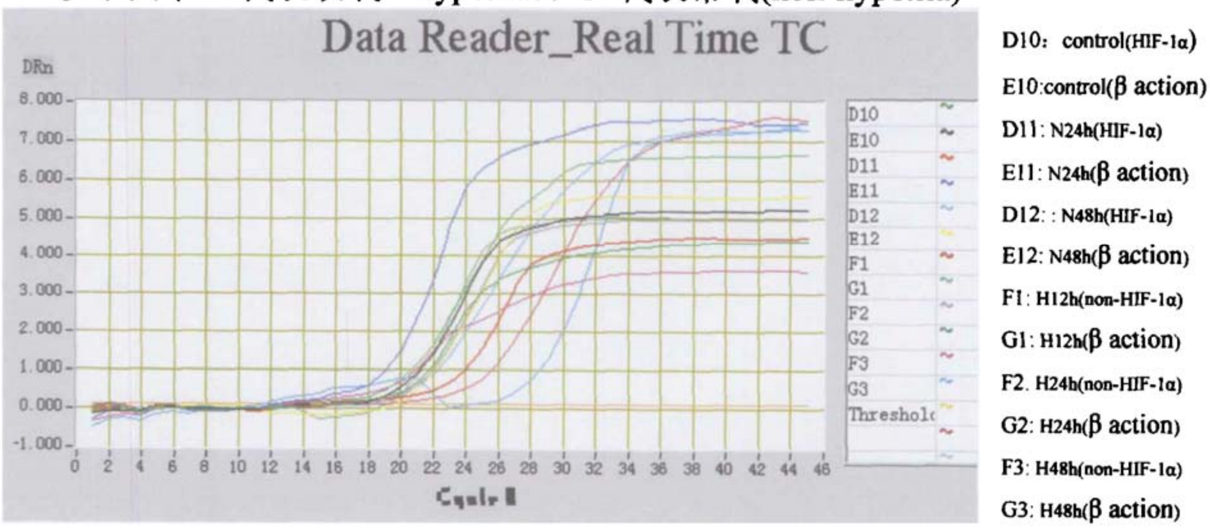


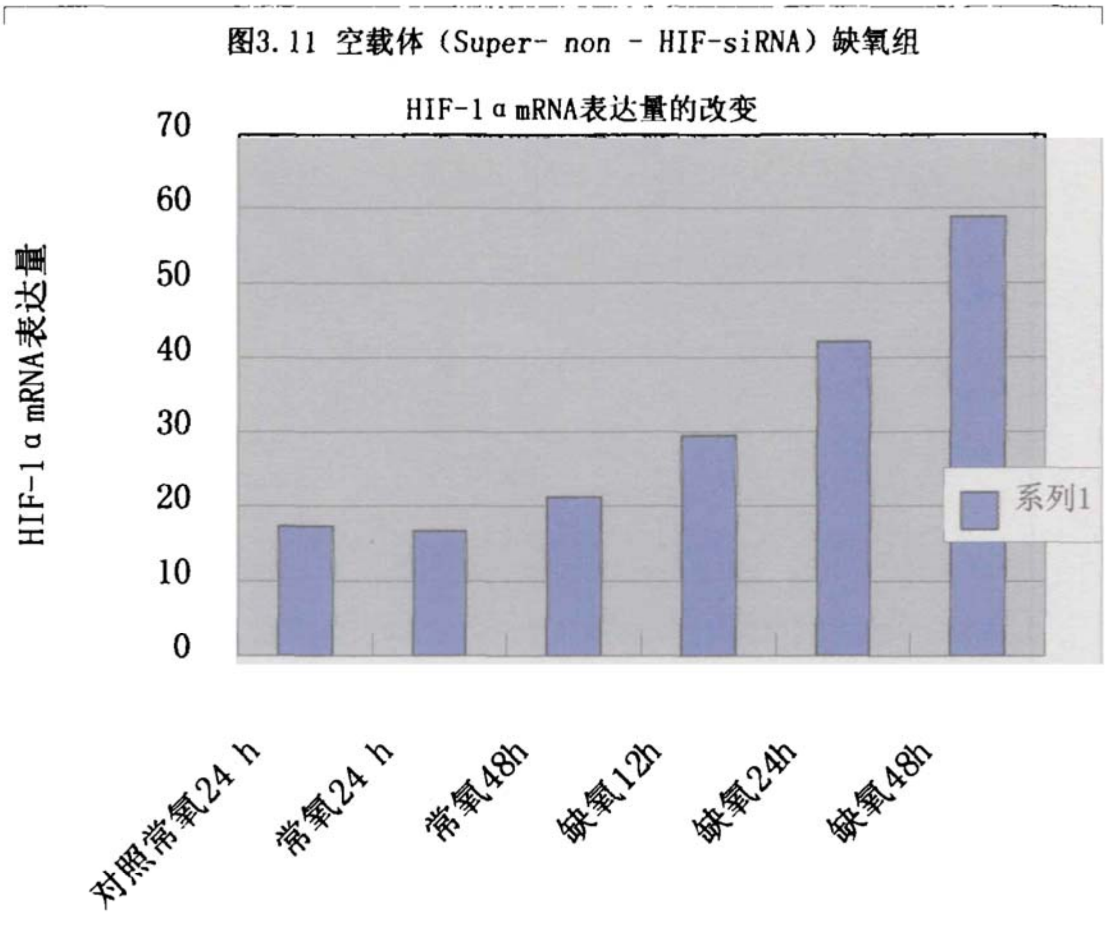
图 3.10 空载体（Super- non - HIF-siRNA）组 HIF-1α 荧光定量 PCR 动力学曲线

表 3.2 空载体（Super- non - HIF-siRNA）组 HIF-1α mRNA 表达量的改变（%control, $\bar{x}$ ±SD）

组别	对照常氧24h	常氧 24h	常氧 48h	缺氧 12h	缺氧 24h	缺氧 48h
HIF-1α mRNA	17.42±2.08	16.77±0.86	21.20±0.50*Δ	29.50±1.06*	42.08±2.10*Δ	58.71±3.53*Δ§

*与对照组比较，Δ 与缺氧 24h 组比较，*与*组间比较，P 均<0.05

§的均数是对照组的 2 倍多。



结果显示：F=1082.31，P<0.05（α=0.05）。对照组和各缺氧组间、缺氧不同时间点之间 HIF-1α mRNA 表达量均有显著性差异（P 均<0.05），随着缺氧

缺氧时间延长，空载体（Super- non - HIF-siRNA）组 HIF-1α mRNA 表达量的改变不同时间点 HIF-1α mRNA 表达量逐渐升高，24h 组已明显高于对照组（约是对照组的 2 倍多）。

3.3、对照组 HIF-1α 荧光定量 PCR 结果（见图 3.12、3.13，表 3.3 ）

以下图中 H 代表缺氧（hypoxia），N 代表常氧(non-hypoxia)

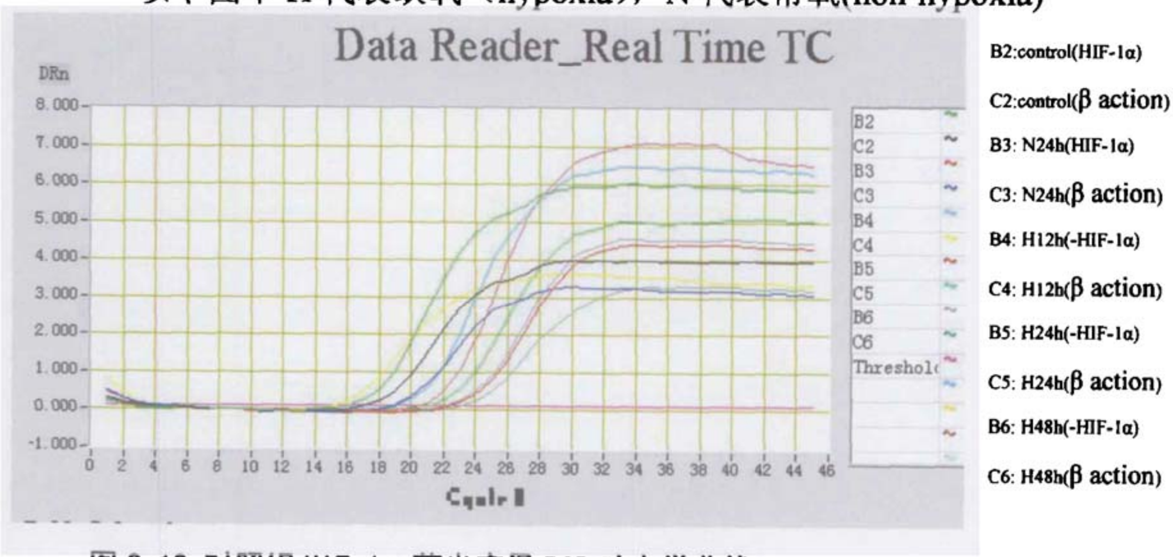


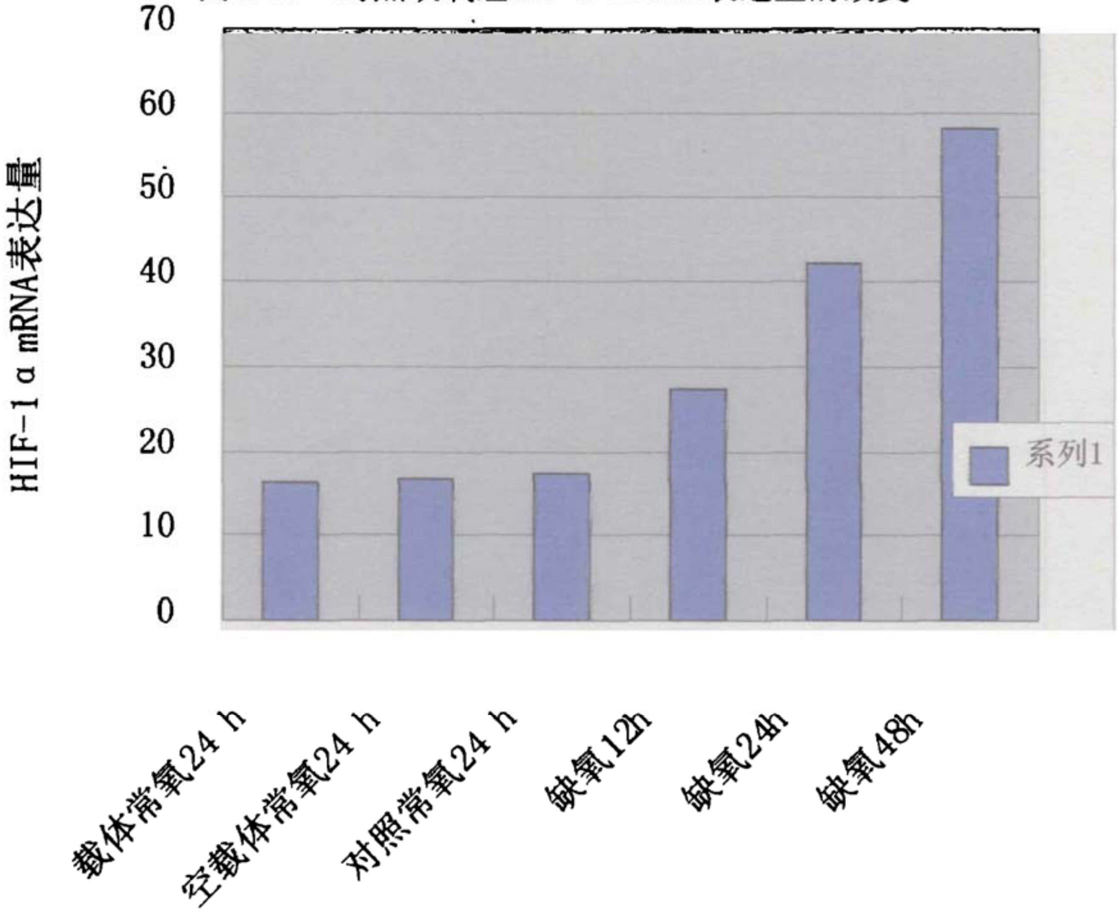
图 3.12 对照组 HIF-1α 荧光定量 PCR 动力学曲线

表 3.3 对照组 HIF-1α mRNA 表达量的改变（%control，$\bar{x}$ ±SD）

组 别	载体常氧24h	空载体常氧24h	对照常氧24h	缺氧 12h	缺氧 24h	缺氧 48h
HIF-1α mRNA	16.32± 1.21*	16．77± 0.85*	17.42± 2.21	27.34± 1.06*Δ	42.13± 2.13*Δ	58.32± 3.26*Δ§

*与对照常氧组比较 P 均>0.05，Δ 与对照常氧 24 h 组比较，Δ 与 Δ 组间比较，P 均<0.05，§的均数是载体常氧 24 h 及对照常氧 24 h 组的 2 倍多。

图3.13 对照缺氧组HIF-1α mRNA表达量的改变



结果显示：F=345.43，P<0.05（α=0.05）。对照缺氧组同对照常氧组间，对照缺氧组同载体常氧组、空载体常氧组间， 对照缺氧组不同时间段间HIF-1α mRNA 表达量均有显著性差异(P 均<0.05)，对照常氧组同载体常氧组、空载体常氧组间 HIF-1α mRNA 表达量无显著性差异（P 均>0.05），对照缺氧组随着缺氧时间的延长，HIF-1α mRNA 表达量随时间延长较对照常氧组逐渐升高（P 均<0.05)，24h 组已明显高于对照常氧组（约是对照常氧组的 2 倍多）。

二、缺氧后人 U251 细胞 HIF-1α 蛋白表达的结果

（一）、Western Blot

以下各图表中 HIF-1α 蛋白表达量，以 Image Pro Plus 软件分析所得 HIF-1α 蛋白表达的平均密度值表示，该值越小表示实际 HIF-1α 蛋白表达量越高，反之则表示实际 HIF-1α 蛋白表达量越低。

越高，反之则表示实际 HIF-1α 蛋白表达量越低。

1、载体（Super-HIF-siRNA）组 HIF-1α Western Blot 结果（见图 3.14、3.15，表 3.4）

图 3.14 载体（Super-HIF-siRNA）缺氧组 HIF-1α 蛋白表达的改变

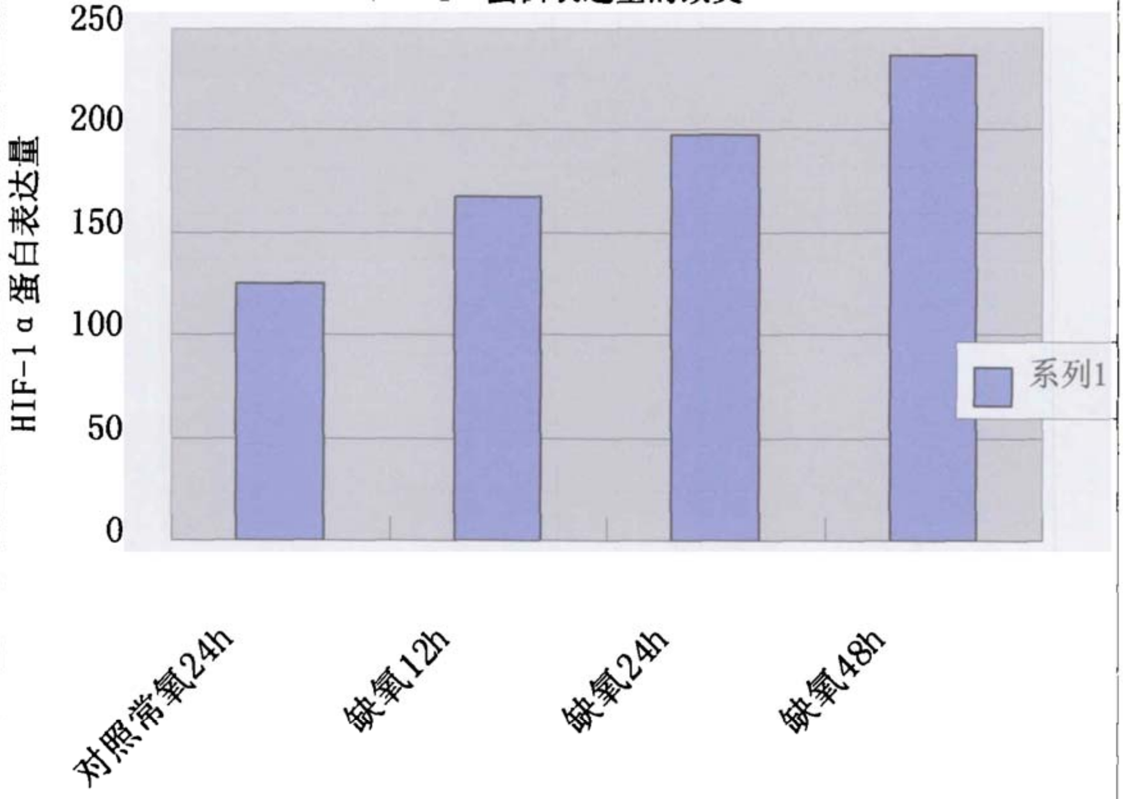
表 3.4 载体（Super-HIF-siRNA）缺氧组 HIF-1α 蛋白表达量的改变（$\bar{x}\pm SD$）

组 别	对照常氧 24 h	缺氧 12h	缺氧 24h	缺氧 48h
HIF-1α 蛋白	125.31±6.29	167.11±4.25*	197.65±3.95*	237.01±4.54*

*与对照组比较，*与*组间比较，P 均<0.05

图3.15 载体(super-HIF-siRNA)缺氧组

HIF-1α 蛋白表达量的改变



结果显示：方差分析 F=223.313, P<0.05（α=0.05）。对照常氧组和缺氧各组间，缺氧不同时间点之间 HIF-1α 蛋白表达量均有显著性差异（P 均<0.05），随着缺氧时间延长，不同时间点 HIF-1α4 蛋白表达水平逐渐下降（P 均<0.05）。

2、空载体（Super-non-HIF-siRNA）组 HIF-1α Western Blot 结果（见图 3.16、3.17，表 3.5）

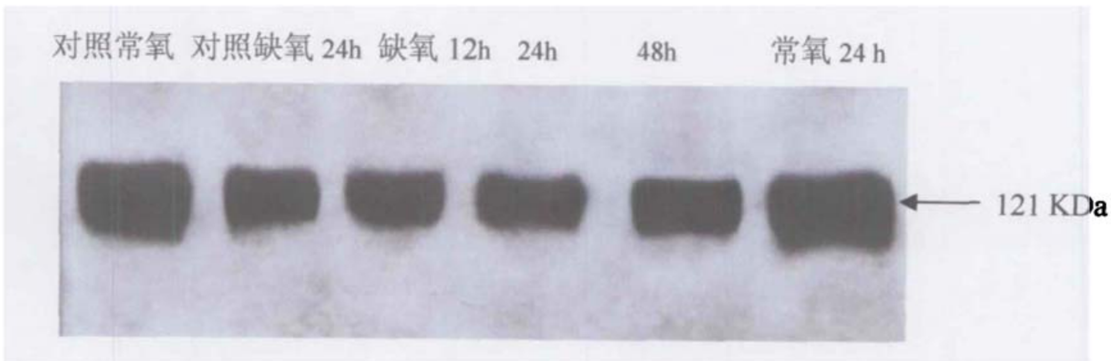


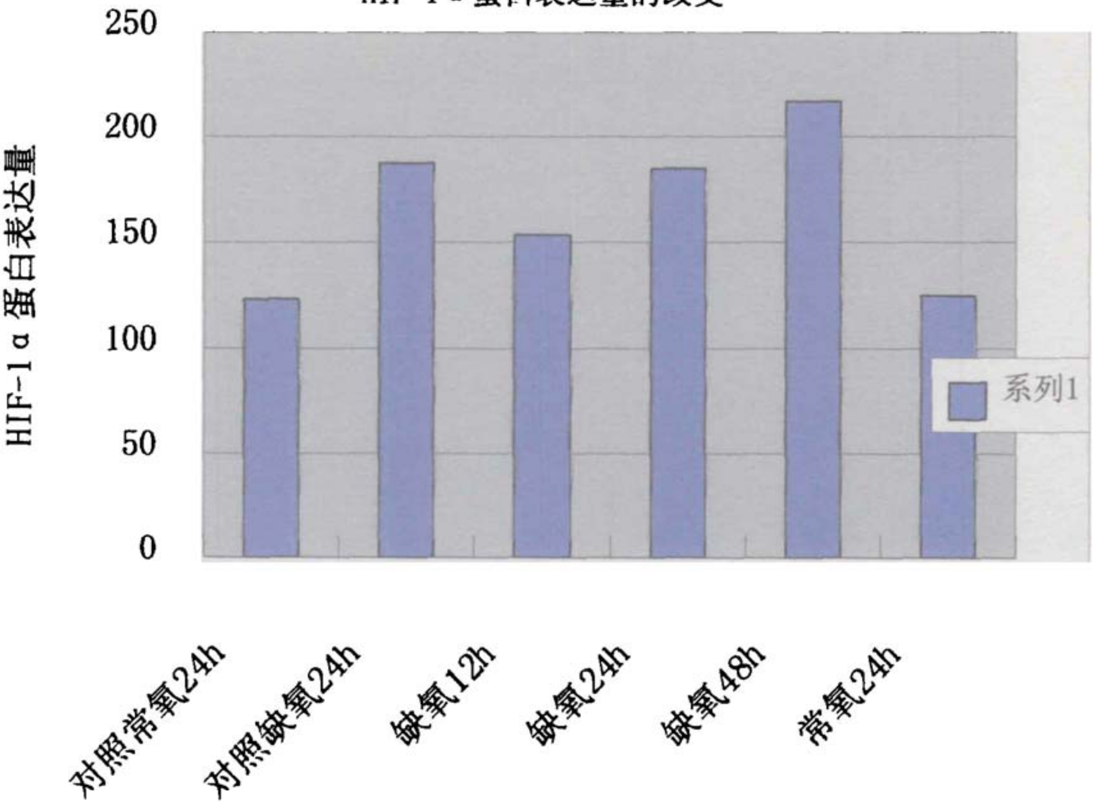
表 3.5 空载体（Super-non-HIF-siRNA）组 HIF-1α 蛋白表达量的改变（$\bar{x}$ ±SD）

组别	对照常氧24h	对照缺氧24h	缺氧 12h	24h	48h	常氧 24h
HIF-1α 蛋白	123.12±8.83	187.21±10.69	153.75±3.45*	185.23±7.57*	217.05±6.95*	125.37±4.79

*与对照组比较，*与*组间比较，P 均<0.05，24h 组较对照常氧组均数值升高。

图3.17 空载体（Super-non-HIF-siRNA）缺氧组

HIF-1α 蛋白表达量的改变



结果显示：方差分析 F=157.875，P<0.05（α=0.05）空载体缺氧组同对照常氧组间，空载体常氧 24h 同缺氧 24h 组间，缺氧组之间 HIF-1α 蛋白表达量均有显著性差异（P 均<0.05）。空载体缺氧组，随着缺氧时间延长 HIF-1α 蛋白表达量逐渐增高；对照常氧 24h 组同空载体常氧 24h 组间，HIF-1α 蛋白表达量无显著性差异（P 均＞0.05），空载体缺氧 24h 组已高于正常对照组水平（P 均<0.05）。

3、对照组 HIF-1α Western Blot 结果（见图 3.18、3.19，表 3.6）

水平（P 均<0.05）。

3、对照组 HIF-1α Western Blot 结果（见图 3.18、3.19，表 3.6）

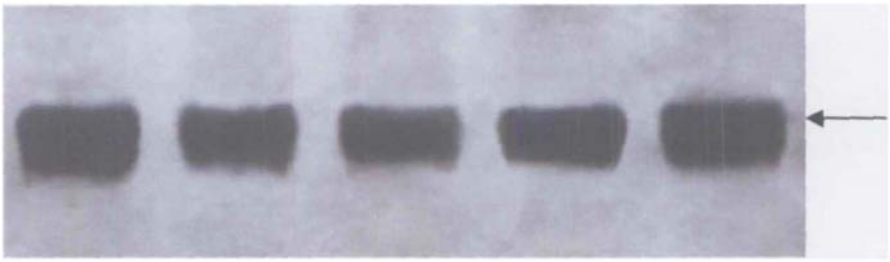


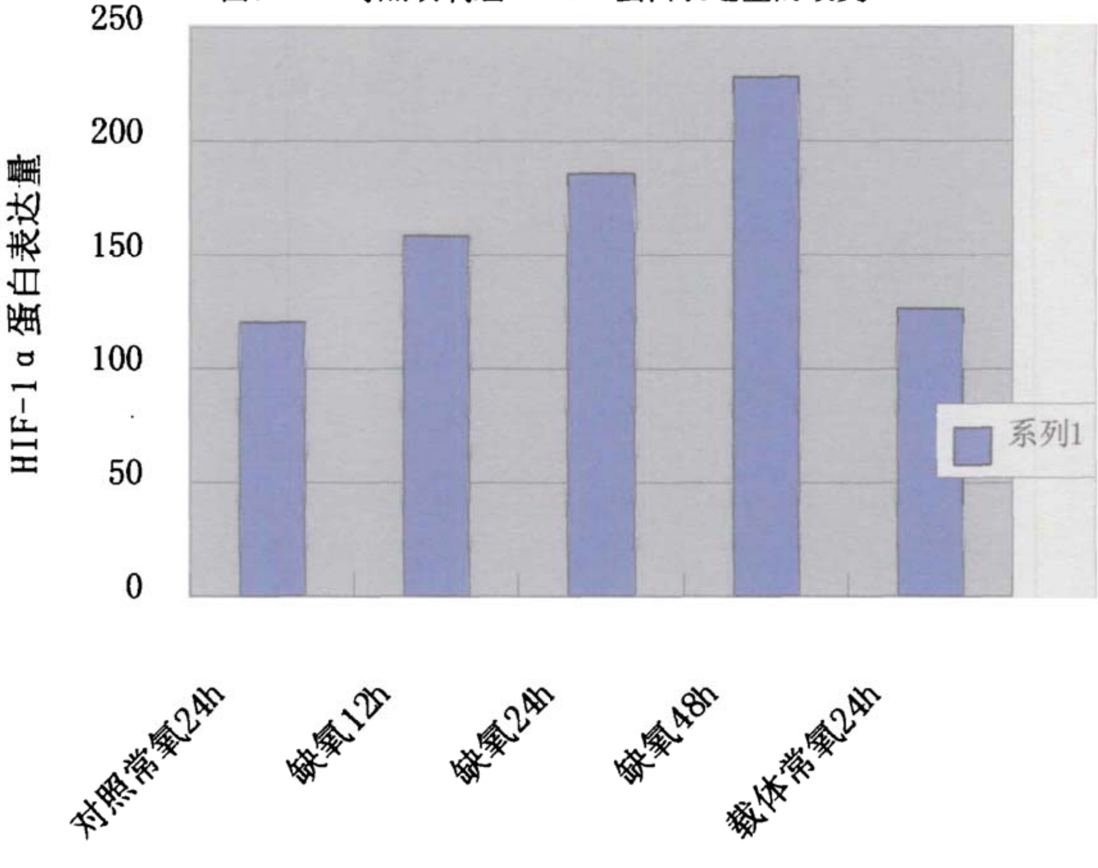
图 3.18 对照组 HIF-1α 蛋白表达的改变

表 3.6 对照组 HIF-1α 蛋白表达量的改变（$\bar{x}$±SD）

组 别	对照常氧24h	缺氧 12h	24h	48h	载体常氧24h
HIF-1α 蛋白	120.31±6.29	158.57±7.15*	186.32±10.69*	227.76±9.06*	126.77±6.29§

*与对照组比较，*与*组比较，P 均<0.05，§与对照组比较，P>0.05

图3.19 对照缺氧组HIF-1α蛋白表达量的改变



结果显示：方差分析 F=44.408, P<0.05（α=0.05）。对照常氧组同缺氧组间，各缺氧组间，载体常氧组同缺氧组间，HIF-1α 蛋白表达量均有显著性差异（P 均<0.05），对照常氧组同载体常氧组间 HIF-1α 蛋白表达量无显著性差异（P 均>0.05），HIF-1α 蛋白表达量随缺氧时间延长较对照常氧组逐渐增高（P 均<0.05）。对照缺氧 24h 组已高于对照常氧组水平（P 均<0.05）。

（二）、免疫组织化学

1、HIF-1α 免疫组化结果：

缺氧时：HIF-1α 蛋白在载体组 12h 即见表达，并持续至 48h。在空载体组及对照组仅见零星表达。在 12h～48h 的相同观察点，载体组阳性细胞计数大于空载体组及对照组组（P<0.05）。

常氧时：HIF-1α 蛋白在载体组、空载体组及对照组仅见零星表达，无显著性差异（P 均>0.05）。

表 3.7 HIF-1α 蛋白在人 U251 细胞中的免疫组化结果

	12h	24h	48h
载体缺氧组	13±3.27*	20.74±4.17*	27.72±2.26*
空载体缺氧组	5.84±1.97	7.28±2.64	9.35±2.32
对照缺氧组	5.93±0.84	7.45±2.12	9.54±2.41
载体常氧组	--	6.76±1.86	--
空载体常氧组	--	7.23±1.43	--
对照常氧组	--	7.54±1.93	--

*P<0.05（相同时点载体缺氧组与空载体缺氧组、对照缺氧组比较）

2、缺氧 12h 组 HIF-1α 免疫组织化学结果（见图 3.16~3.18）

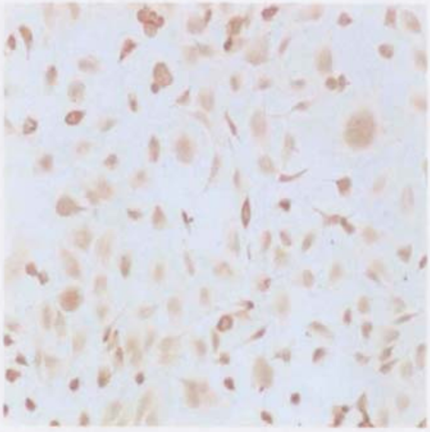


图 3.16 对照组×100

图 3.17 空载体组×100

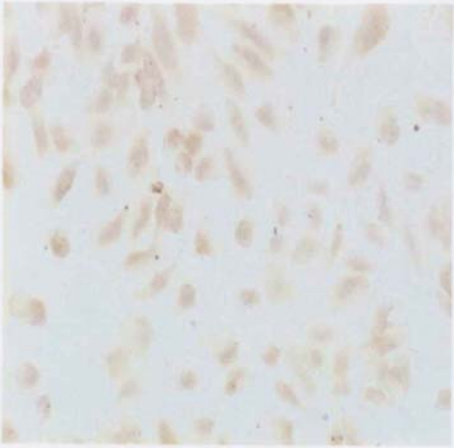


图 3.18 载体组×100

3、缺氧 24h 组 HIF-1α 免疫组织化学结果（见图 3.19~3.21）

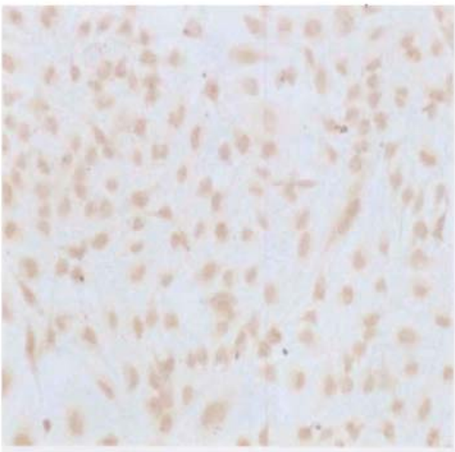


图 3.19 对照组×100

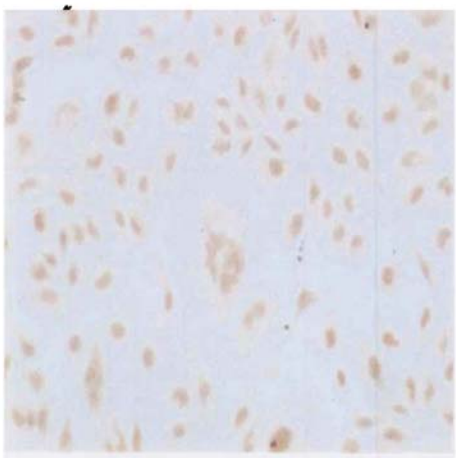


图 3.20 空载体组×100

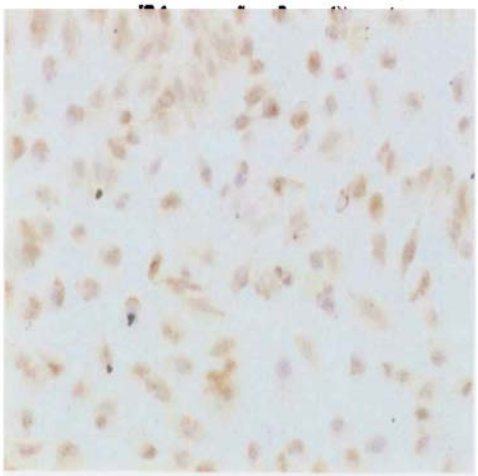


图 3.21 载体组×100

4、缺氧 48h 组 HIF-1α 免疫组织化学结果（见图 3.22~3.24）

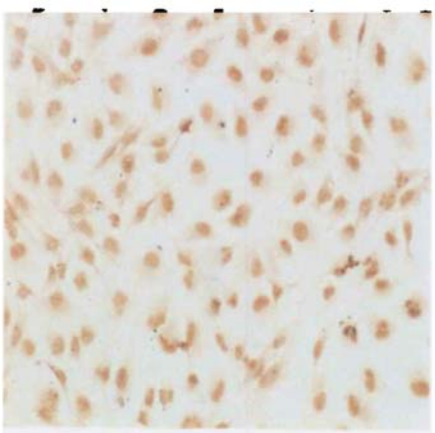


图 3.22 对照组×100

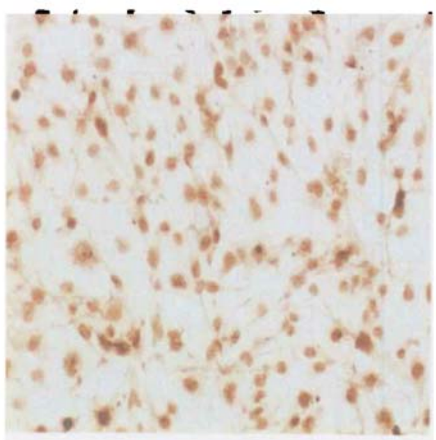


图 3.23 空载体组×100

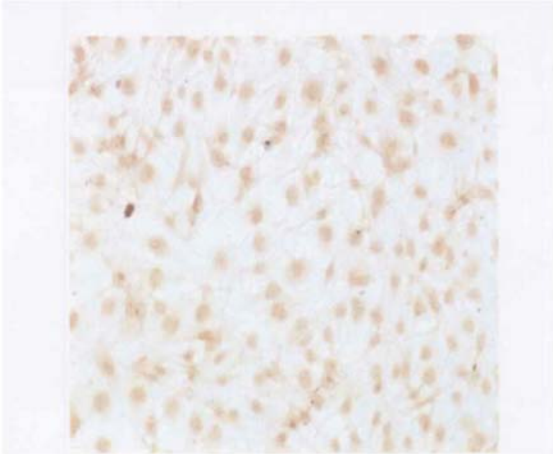


图 3.24 载体组×100

5、常氧 24h 组 HIF-1α 免疫组织化学结果（见图 3.25~3.27）

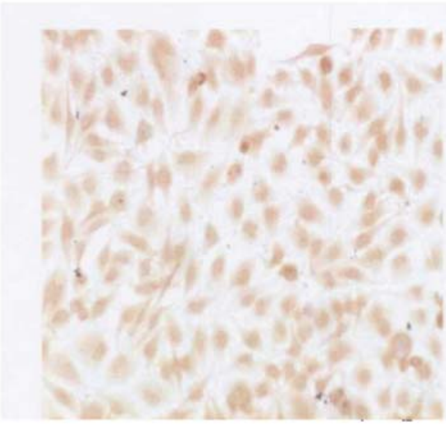


图 3.25 对照组×100

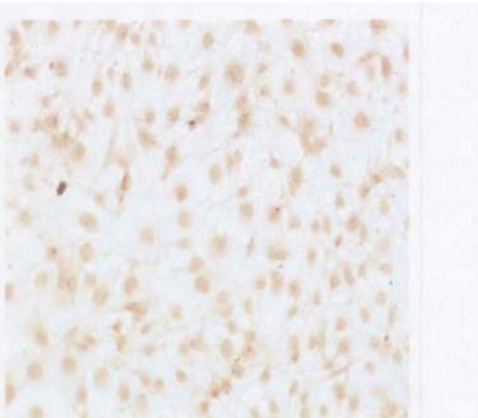


图 3.26 空载体组×100

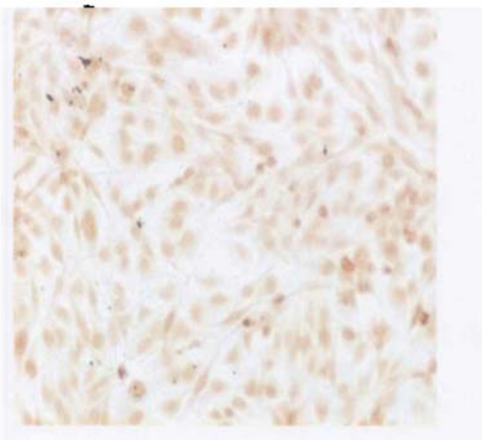


图 3.27 载体组×100

结果显示：

1、缺氧组：

载体组较空载体组、对照组的细胞核、细胞浆染色强度明显减弱，随着

缺氧时间延长，染色强度逐渐加深。

2、常氧组：

从对照组到载体组、空载体组细胞核、细胞浆染色强度无明显改变，强度一致。

三、电镜、荧光显微镜、免疫荧光及光镜观察人 U251 形态学改变的结果

（一）、电镜观察人 U251 线粒体形态学改变（见图 3.28～3.39）

各实验组人 U251 线粒体形态学改变（×1.4 万倍）

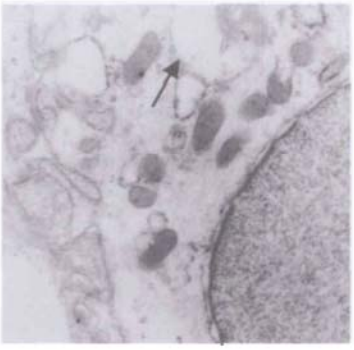


图 3.28 对照常氧 24h

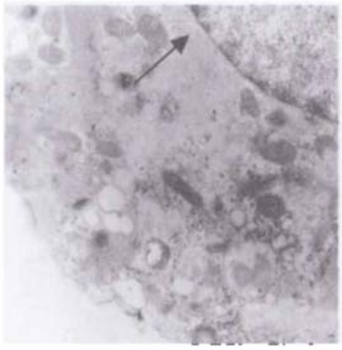


图 3.29 空载体常氧 24h

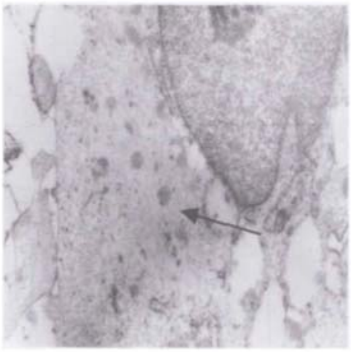


图 3.30 载体常氧 24h

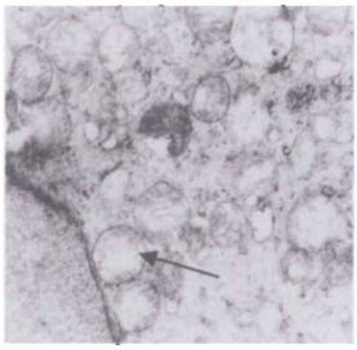


图 3.31 空载体缺氧 12h

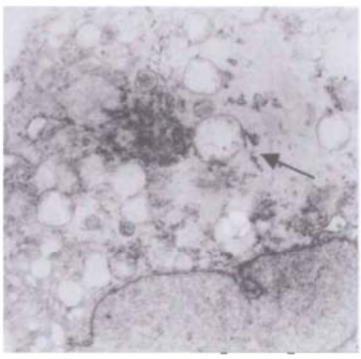


图 3.32 空载体缺氧 24h

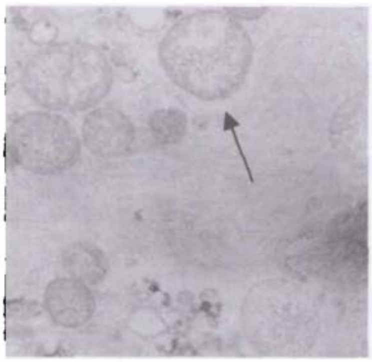


图 3.33 空载体缺氧 48h

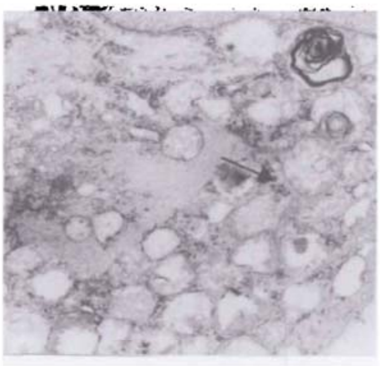


图 3.34 载体缺氧 12h

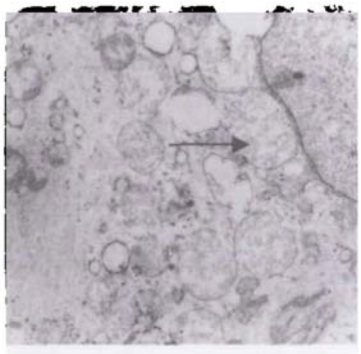


图 3.35 载体缺氧 24h

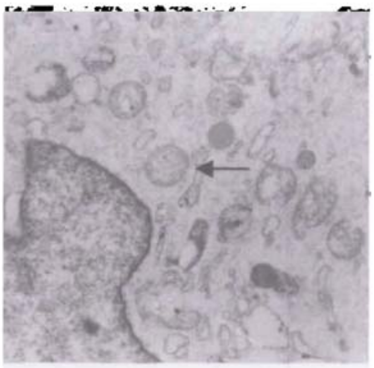


图 3.36 载体缺氧 48h

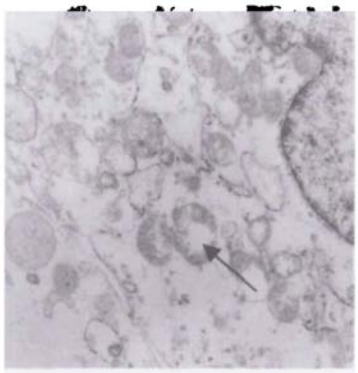


图 3.37 对照组缺氧 24h

结果显示：

1、缺氧组：

载体组较空载体组、对照组，线粒体肿胀明显增加。随着缺氧时间延长，线粒体肿胀逐渐加重，嵴溶解，甚至消失。

2、常氧组：从对照组到载体组、空载体组线粒体无明显改变。

（二）、光镜观察人 U251 形态学改变（见图 3.38~3.47）

各实验组人 U251 形态学改变（×200）

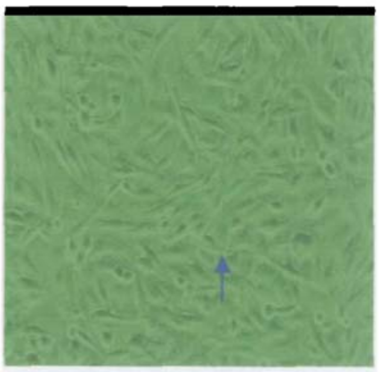


图 3.38 对照常氧 24h

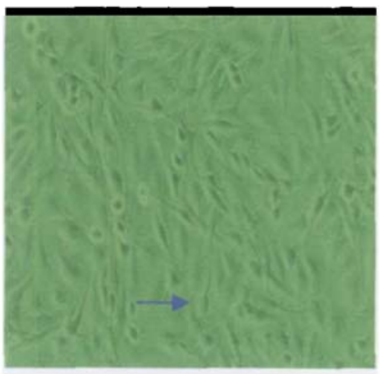


图 3.39 空载体常氧 24h

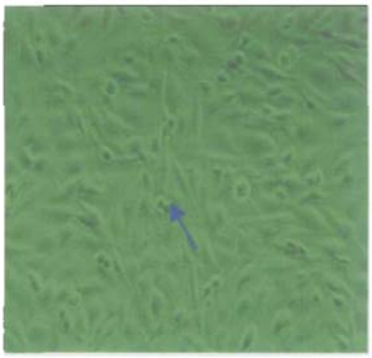


图 3.40 载体常氧 24h

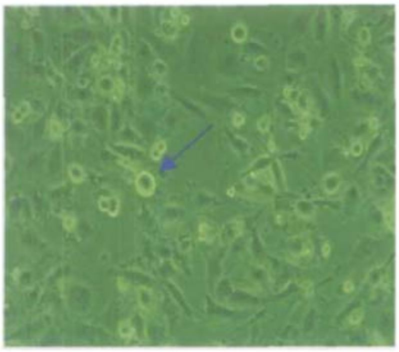


图 3.41 空载体缺氧 12h

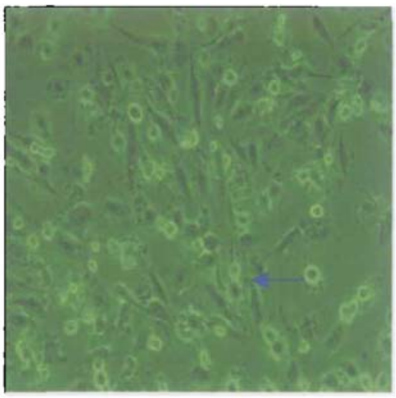


图 3.42 空载体缺氧 24h

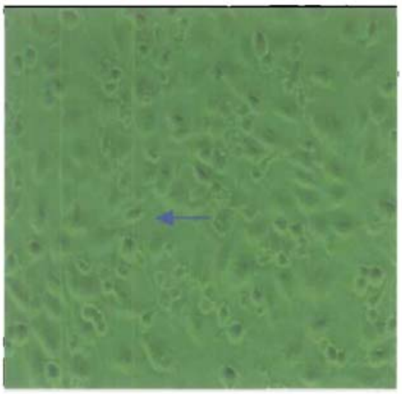


图 3.43 空载体缺氧 48h

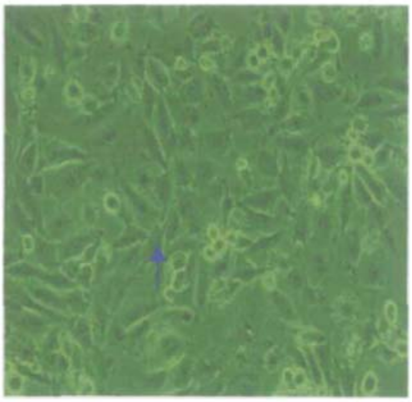


图 3.44 载体缺氧 12h

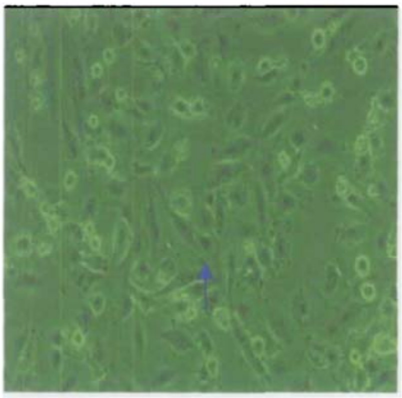


图 3.45 载体缺氧 24h

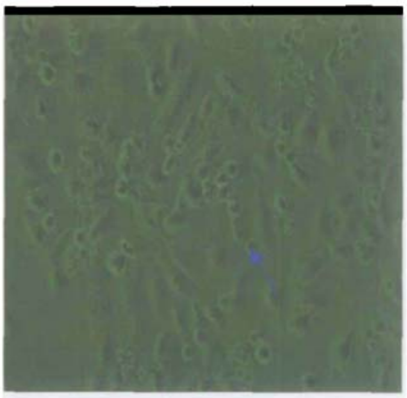


图 3.46 载体缺氧 48h

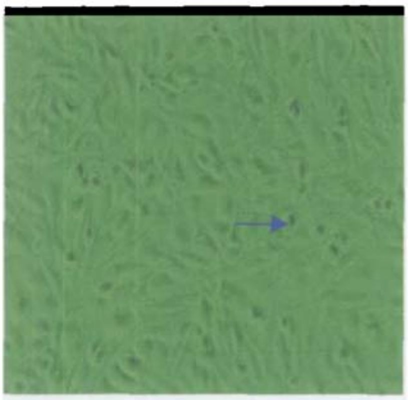


图 3.47 对照组缺氧 24 h

(三)、荧光显微镜观察人 U251 形态学改变（见图 3.48～3.47）

各实验组人 U251 形态学改变（×200）

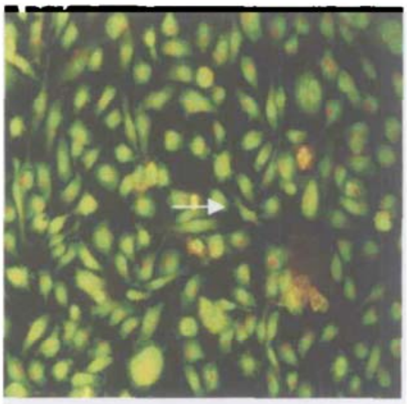


图 3.48 对照常氧 24h

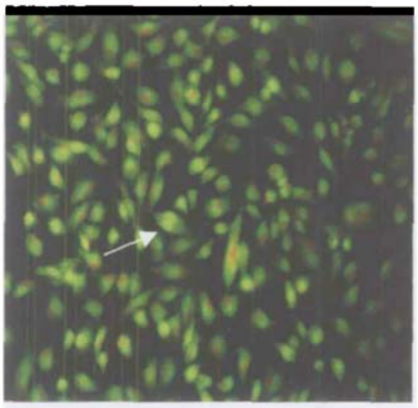


图 3.49 空载体常氧 24h

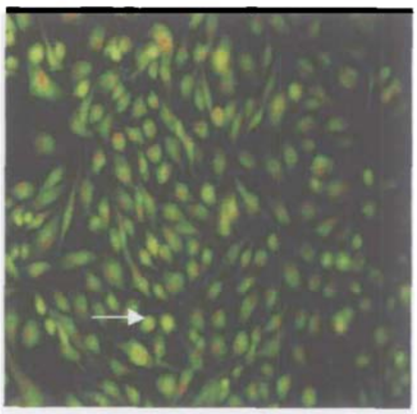


图 3.50 载体常氧 24h

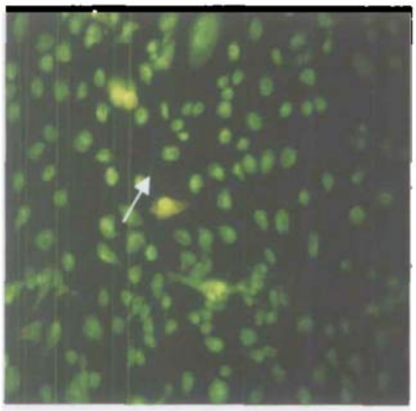


图 3.51 空载体缺氧 12h

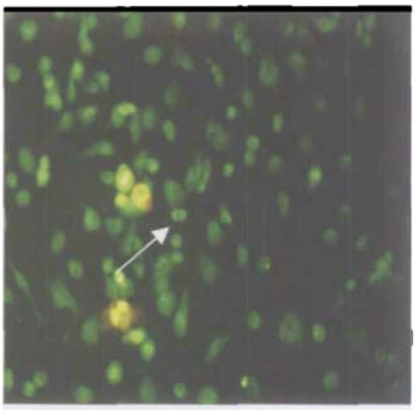


图 3.52 空载体缺氧 24h

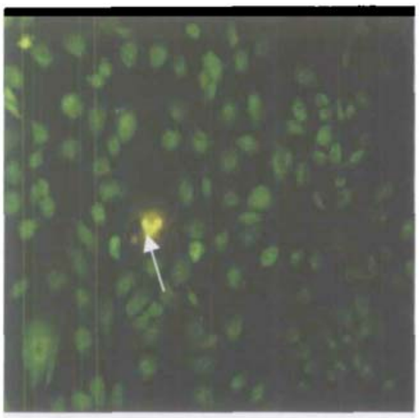


图 3.53 空载体缺氧 48h

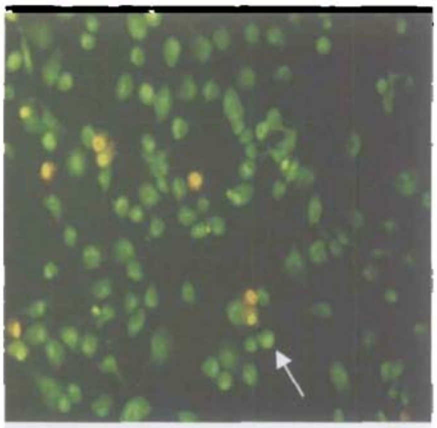


图 3.54 载体缺氧 12h

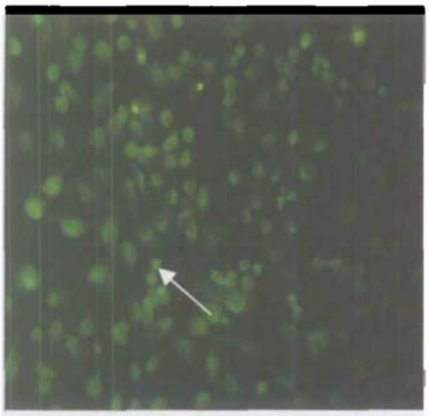


图 3.55 载体缺氧 24h

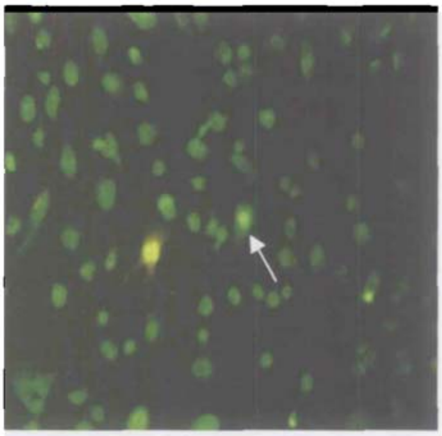


图 3.56 载体缺氧 48h

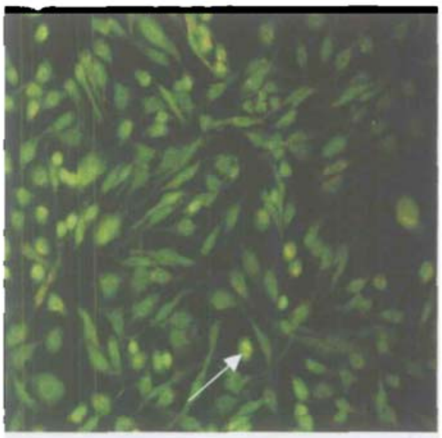


图 3.57 对照组缺氧 24 h

（四）、吖啶橙染色光学显微镜观察人 U251 形态学改变（见图 3.58~3.67）

各实验组人 U251 形态学改变（×200）

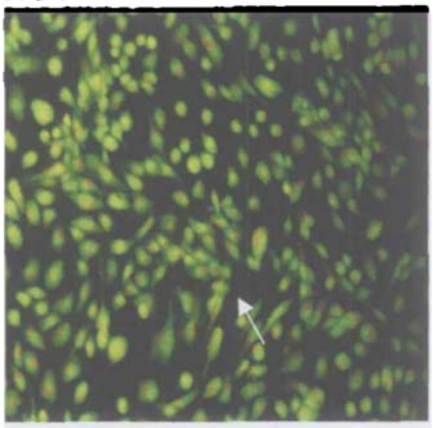


图 3.58 对照常氧 24h

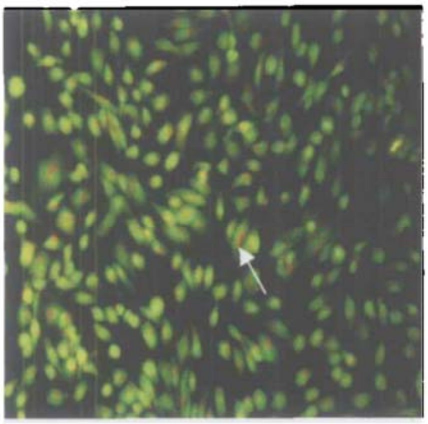


图 3.59 空载体常氧 24h

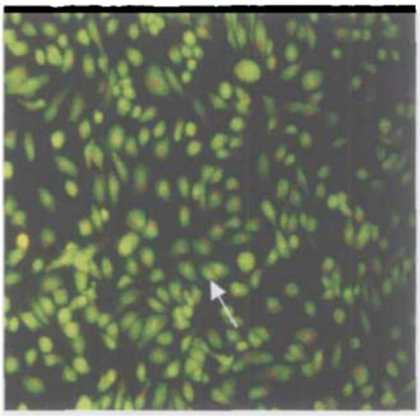


图 3.60 载体常氧 24h

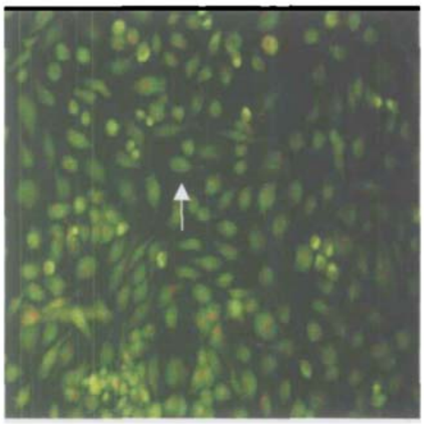


图 3.61 空载体缺氧 12h

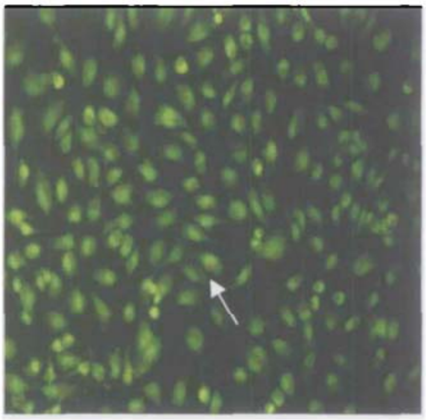


图 3.62 空载体缺氧 24h

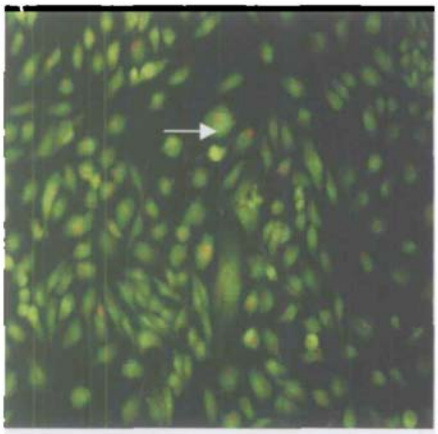


图 3.63 空载体缺氧 48h

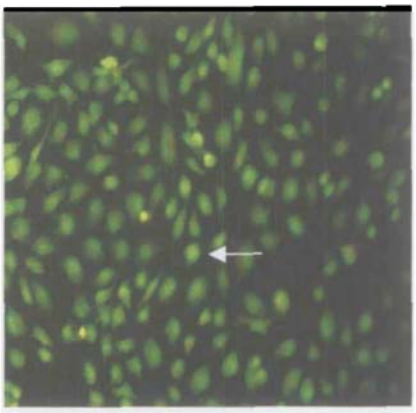


图 3.64 载体缺氧 12h

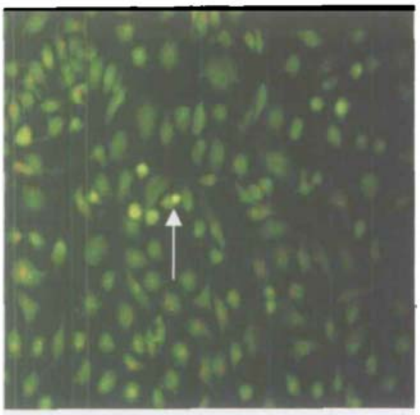


图 3.65 载体缺氧 24h

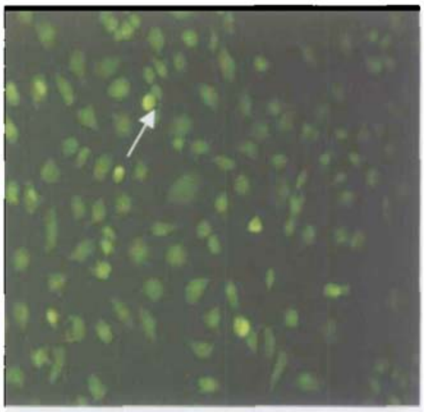


图 3.66 载体缺氧 48h

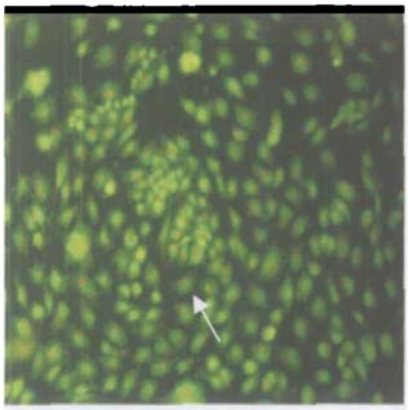


图 3.67 对照组缺氧 24 h

（五）、免疫荧光显微镜观察人 U251 形态学改变（见图 3.68～3.75）

各实验组人 U251 形态学改变（×200）

图 3.68 空载体常氧 24h

图 3.69 载体常氧 24h

图 3.70 空载体缺氧 12h

图 3.71 空载体缺氧 24h

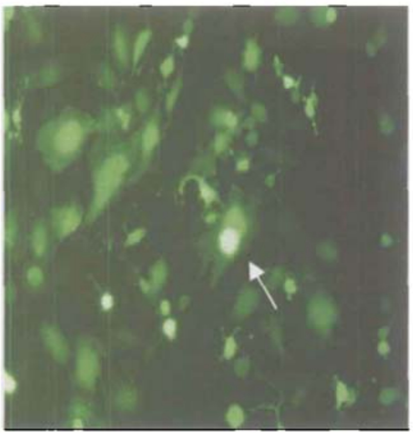


图 3.72 空载体缺氧 48h

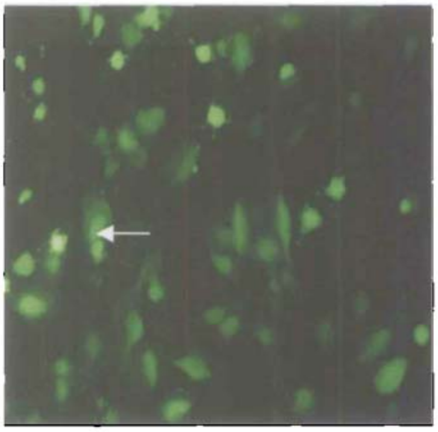


图 3.73 载体缺氧 12h

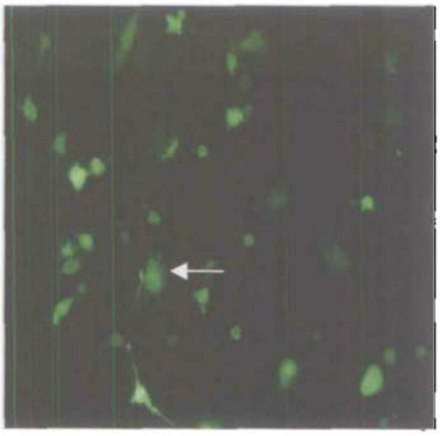


图 3.74 载体缺氧 24h

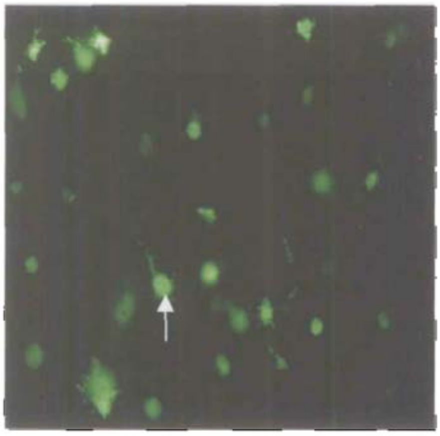


图 3.75 载体缺氧 48h

光镜、荧光显微镜和免疫荧光观察结果显示：

1、缺氧组：

载体组较空载体组、对照组，细胞凋亡增加。随着缺氧时间延长，细胞凋亡明显增加。

2、常氧组：

从对照组到载体组、空载体组细胞凋亡无明显改变。

四、MTT 法检测人 U251 细胞活力的结果

不同数量的细胞，在加入 MTT 后形成的紫色甲脱颗粒，所产生的不同 A 值。在本实验中，测定的吸光度(A)采用重复实验 3 孔的平均值，绘制细胞生长曲线（图 3.76～3.77）。

表 3.7 酶联免疫仪 490 nm 波长检测各孔吸光度(OD 值)结果

	12h	24h	48h
载体缺氧组	0.236±0.13*	0.329±0.17*	0.502±0.28*
空载体缺氧组	0.096±0.14	0.081±0.03	1.226±0.18
对照缺氧组	0.094±0.19	0.079±0.14	1.209±0.09
载体常氧组	0.101±0.07	0.104±0.08	0.105±0.11
空载体常氧组	0.100±0.04	0.105±0.11	0.106±0.13
对照常氧组	0.102±0.06	0.104±0.14	0.105±0.08

*P<0.05（相同时点载体缺氧组与空载体缺氧组、对照缺氧组比较）

图 3.76 酶联免疫仪 490 nm 波长检测各孔吸光度(A 值)

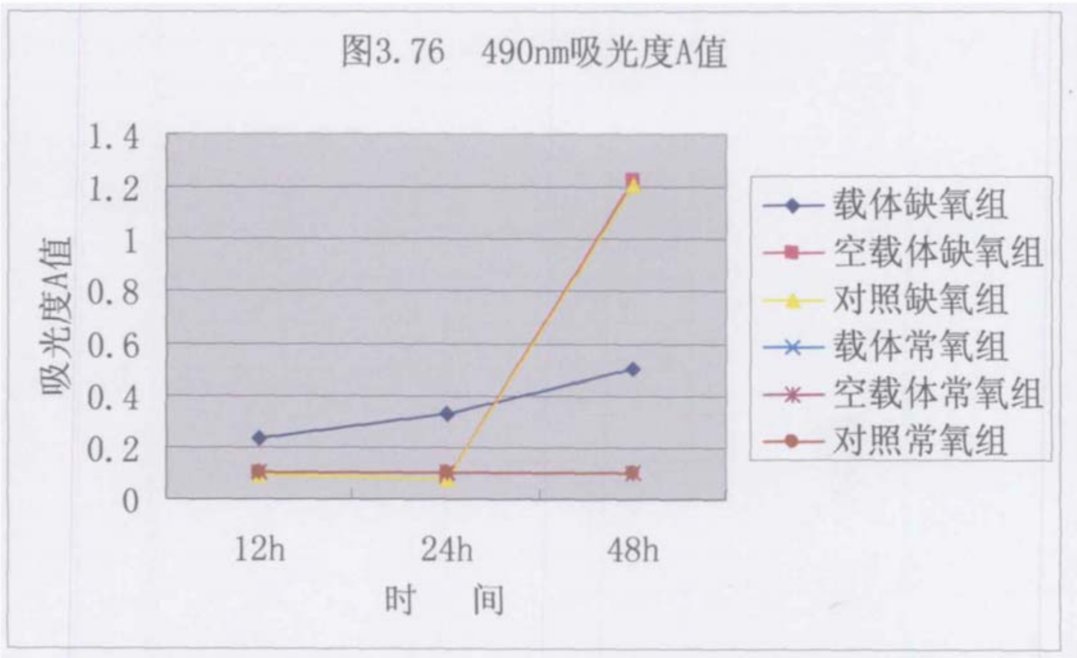
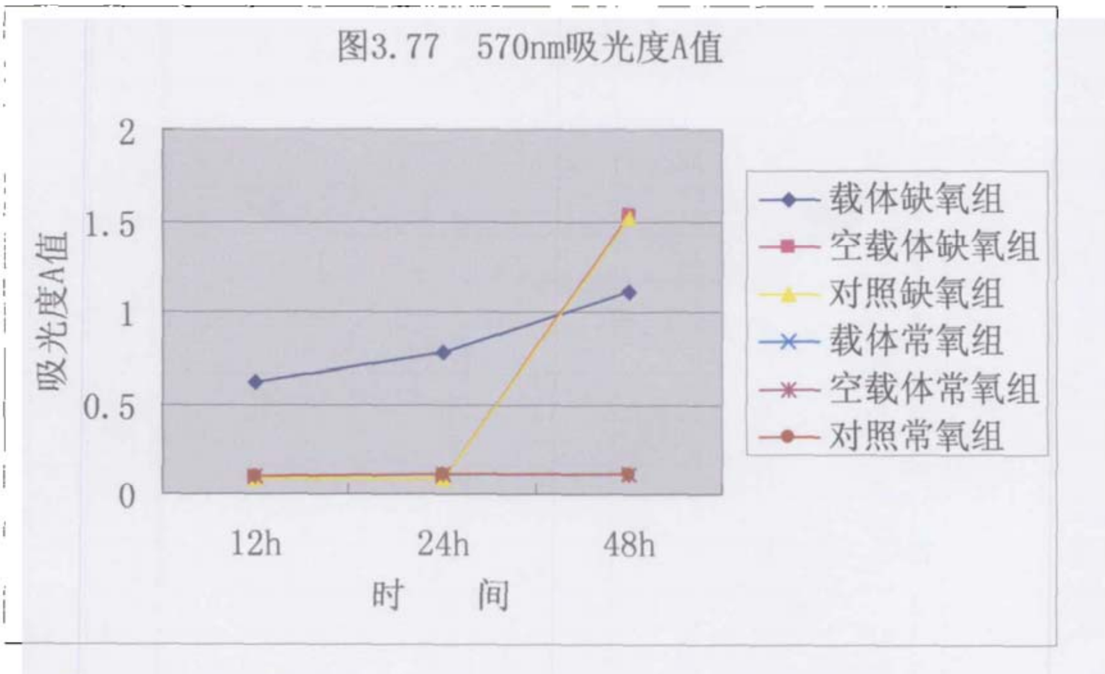


表 3.8 酶联免疫仪 570 nm 波长检测各孔吸光度(OD 值)

	12h	24h	48h
载体缺氧组	0.619±0.23*	0.783±0.15*	1.108±0.26*
空载体缺氧组	0.082±0.07	0.084±0.11	1.526±0.09
对照缺氧组	0.086±0.12	0.085±0.19	1.513±0.12
载体常氧组	0.102±0.04	0.108±0.09	0.109±0.03
空载体常氧组	0.103±0.03	0.107±0.12	0.108±0.02
对照常氧组	0.103±0.05	0.106±0.05	0.109±0.01

*P<0.05（相同时点载体缺氧组与空载体缺氧组、对照缺氧组比较）

图 3.77 酶联免疫仪 570 nm 波长检测各孔吸光度(A 值)



结果显示：

当细胞数在 10～10^5 个 / 孔以内时，活细胞数与 A 值呈直线相关，相关系数 r＝0.9888，P<0.001。回归方程 y=0.2966+0.000014x。

1、缺氧组：

载体组较空载体组、对照组，活细胞数减少，细胞凋亡增加。随着缺氧时间延长，活细胞数明显减少，细胞凋亡明显增加。

2、常氧组：

从对照组与载体组、空载体组比较，活细胞数和细胞凋亡无明显改变。

综合四个检测指标，结果显示：

1、缺氧各时相载体组较空载体组、对照组，HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平变化趋势基本一致，即表达减少，细胞的活力降低，细胞凋亡增加。随着缺氧时间延长，表达明显减少，细胞的活力明显降低，细胞凋亡明显增加。

2、载体缺氧组各时相中 HIF-1α 表达进行性下降，出现细胞线粒体和细胞足突肿胀进行性加重，细胞的活力进行性降低，细胞凋亡进行性增加。

讨　论

肿瘤细胞的生理功能的发挥和氧代谢有着密切关系。细胞在缺氧时，出现细胞内线粒体肿胀，嵴最后消失，导致细胞能量供应障碍，激活细胞内的凋亡基因，使其表达增加，促进细胞的凋亡。

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1，HIF-1)是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子，能激活许多低氧反应性基因的表达，是在低氧条件下维持氧稳态的关键性物质。目前认为，HIF-1是细胞在低氧条件下产生的蛋白性调节因子，它与靶基因结合，促进其转录，使机体产生一系列低氧适应反应。当细胞氧分压降低或者受到其他刺激时，HIF-1α在胞浆中积累、活化，转移到细胞核，与HIF-1β形成HIF-1分子，结合相应的靶序列，调节基因表达。HIF-1活化是细胞低氧应答的关键环节，受胞浆多种蛋白质精细调控，HIF-1与这些蛋白质构成细胞内低氧应答系统。

RNA干扰(RNAi)是一种序列特异性、转录后基因沉默机制，由双链RNA(dsRNA)引发并导致与dsRNA序列同源的mRNA降解。它是有机体一种古老而普遍存在的抗病毒方式，用来保持基因组完整性，防止细胞受到病毒感染和调节细胞基因表达。RNAi依赖于反义链与靶基因转录本互补的双链RNA(dsRNA)形成。研究证明，在哺乳动物细胞内也可诱导出RNAi序列特异性抑制。向哺乳动物细胞内转染双链siRNA可导致快速的和有效的靶基因mRNA降解，并避免了由长的双链RNA触发的非特异效应。目前，RNAi已广泛应用于基因组功能、抗病毒和抗肿瘤治疗的研究。

RNAi具有4个特点：①、特异性地抑制目的基因，能够非常特异地只降解与其序列相应的单个内源基因的mRNA[55]；②、靶序列的选择性，RNAi的靶序列需要慎重选择，外显子序列的dsRNA能产生特异高效的基因抑制作用[56]，dsRNA的长度对RNAi的效率也有影响；③、RNAi抑制基因表达具有很高的效率，可以达到缺失突变体表型的程度[57]；④、RNAi抑制基因表达的效应可以越过细胞界限，在不同的细胞间长距离传递和维持[58]。

RNA干扰的效果分析是本实验的重要内容。RNAi分子水平的检测主要通过mRNA和蛋白两个方面进行检测。mRNA的丰度直接关系到基因功能的发挥，是基因表达调控的一个重要方面。蛋白质是执行生命活动的主要功能物质，在结构

和数量等方面发生异常，都会给生命活动造成不良后果，尤其是关键功能蛋白的异常，必然导致机体的异常和疾病。对于mRNA，可以采用RT-PCR、定量PCR或Northern杂交等，通过信号强弱判断目的基因的沉默效果。

实时荧光定量PCR是目前最准确、最快捷灵敏的检测mRNA的方法。对蛋白质来说，可通过Western杂交，ELISA，免疫荧光等。本实验同时从mRNA和蛋白质水平检测了siRNA干扰的效果，结果显示:在300～350ug/ul范围内随着siRNA浓度的递增，siRNA在mRNA水平的沉默效应增强，体现了siRNA沉默效应的剂量依赖性和高效性。siRNA在转染后12小时即有抑制效果，随着时间的延长，抑制效果逐渐增加。蛋白质的沉默效应相对滞后，于转染后48小时最强。这与文献报道的siRNA作用特性相似[59]。然而，RNA干扰的效果受许多因素的影响，如转染效率、靶基因的转录效率、蛋白质稳定性、所选择特异siRNA序列的效能、哺乳动物细胞株的生长特性、细胞类型、传代数以及细胞的汇合率。

MTT法是检测细胞增殖能力的常用方法之一。活细胞中的琥珀酸脱氢酶可使MTT分解产生兰色结晶状紫色甲脱颗粒沉积于细胞内和细胞周围。其量与细胞量成正比，也与细胞活力成正比。本实验结果表明，siRNA干扰对人脊髓胶质瘤细胞的增殖的影响明显。随着时间的延长，细胞的活力逐渐减弱，siRNA抑制效果逐渐增加。

本研究结果显示：①、在缺氧时，载体组较空载体组和对照组 HIF-1α mRNA 表达和蛋白表达受到抑制，细胞对缺氧的耐受下降，细胞内线粒体肿胀，最后嵴消失，导致细胞凋亡增加。细胞的生长明显受到抑制。而空载体组和对照组细胞的凋亡不很明显；②、在常氧时，载体组、空载体组和对照组 HIF-1α mRNA 表达和蛋白表达、细胞内线粒体和细胞的生长均无显著性差异。

研究结果表明人U251细胞经HIF-1α-siRNA处理后能够发生凋亡，并表现出经典的凋亡特征。在这一过程中，线粒体膜上的PT孔通透性增加，细胞色素C释放到细胞质中。由于人U251细胞不能表达凋亡蛋白酶Caspase3，在凋亡过程中不能出现明显的DNA ladder现象，可能是由于细胞色素C的释放激活了caspase9，然后又激活caspase7和caspase6。HIF-1α-siRNA可以进一步通过RNAi作用抑制靶基因的表达，抑制肿瘤细胞的生长，诱导肿瘤细胞发生周期阻滞和细胞凋亡，为肿瘤的基因治疗提供了一个新途径[60-62]。

因此，我们认为应用 RNAi 使 HIF-1α 基因沉默，在缺氧的情况下，肿瘤细胞对缺氧的耐受能力降低，出现细胞内线粒体肿胀，最后嵴消失，导致细胞凋亡增加。我们应用 21nt 的小干扰 RNA(siRNA)引发人脊髓胶质瘤细胞 HIF-1α 基因沉默，增加细胞的凋亡，借此研究对人脊髓胶质瘤细胞生物学行为的影响，为脊髓胶质瘤基于 RNA 的药物治疗提供理论基础[63-65]。

小　结

本部分对载体组、空载体组和对照组各实验组分别采用荧光定量 PCR 测定其 HIF-1α mRNA 表达量的改变；Western Blot 和免疫荧光测定各组 HIF-1α 蛋白表达量的变化；电镜、光镜、荧光显微镜和免疫荧光观察各组人 U251 细胞形态学的改变。

结果显示：

1、缺氧各时相载体组较空载体组、对照组，HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平变化趋势基本一致，即表达减少，细胞的活力降低，细胞凋亡增加。随着缺氧时间延长，表达明显减少，细胞的活力明显降低，细胞凋亡明显增加。

2、载体缺氧组各时相中 HIF-1α 表达进行性下降，出现细胞线粒体和细胞足突肿胀进行性加重，细胞的活力进行性降低，细胞凋亡进行性增加。

结　论

各实验组中可能因 HIF-1α 表达下降而导致细胞凋亡，提示 HIF-1α 可能具有阻止细胞凋亡的功能；采用小干扰 RNA(siRNA)技术，使 HIF-1α 基因沉默，在缺氧情况下，HIF-1α mRNA 表达和蛋白表达受到抑制，细胞对缺氧的耐受下降，细胞内线粒体肿胀，最后消失，细胞的活力降低，导致细胞凋亡增加，这为肿瘤的治疗提供了新的实验依据。

参考文献

1. Teicher BA.Hypoxia and drug resistance.Cancer Metas Rev, 1994, 13: 139-168.
2. 夏曙，于世英，袁响林，等。乏氧对肺腺癌 A549 细胞 P 糖蛋白和多药耐药相关蛋白表达的影响。中华医学杂志，2004，84：663-666.
3. Brizel DM.ScuUy SP,Harrelson JM， et a1.Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma.Cancer Res.1996.56:941-943.
4. Fire A.Xu S.Montgomery MK.et al.Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabaditis elegans.Nature, 1998, 391: 806-811.
5. Aronin N Target selectivity in mRNA silencing.Gene Ther,2006,13(6): 509-516.
6. Zamore PD.Ancient pathways programmed by small RNAs .Science,2002, 296: 1265-1269.
7. Chan R. Gilbert M. Thompson KM. Marsh HN. Epstein DM. Pendergrast PS Co-expression of anti-NFkappaB RNA aptamers and siRNAs leads to maximal suppression of NFkappaB activity in mammalian cells.Nucleic Acids Res. 2006, 34(5):e36.
8. Elbashir SM.Lendeckel W.Tuschl T.RNA interference is mediated bu 21-and 22-nucleotide RNAs.Genes Dev.2001.15:188-200.
9. Andika IB. Kondo H. Rahim MD. Tamada T.Lower Levels of Transgene Silencing in Roots is Associated with Reduced DNA Methylation Levels at Non-Symmetrical Sites but not at Symmetrical Sites.Plant Mol Biol,2006, 60(3):423-435.
10. Timmons L. The long and short of siRNAs. Mol Cell.2002, 10(3): 435-437.
11. Knight SW. Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in Caenorhabditis elegans.Science,2001,Sep21:293(5538): 2269-2271.
12. Zamore PD.Tuschl T .Sharp PA.et al.RNAi:double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at21 to 23 nucleotide intervals.Cell.2000， 101(1): 25-33.
13. Scottm .Hammond. Emilyb Ernstein. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.Nature,2000,404:293-296.
14. Hannon GJ.RNA interference. Nature. 2002,418:244-251.
15. Nakano M. Nobuta K. Vemaraju K. Tej SS. Skogen JW. Meyers BC. Plant MPSS databases:

signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA.Nucleic Acids Res.2006,34(Database issue):D731-735.

16. Plastedc R.Ketting R.The silence ofthe genes.Curt Opin Genet Dev. 2000, 10(5): 562-567.

17. Sakasai R, Shinohe K, Ichijima Y, Okita N, Shibata A, Asahina K, Teraoka H Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases in hyperphosphorylation of replication protein A2 in response to replication-mediated DNA double-strand breaks.Genes Cells.2006, 11(3): 237-246.

18. Sohn D, Totzke G, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Levkau B, Janicke RU The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. Mol Cell Biol. 2006, 26(5):1967-1978.

19. Lin Y, Kokontis J, Tang F, Godfrey B, Liao S, Lin A, Chen Y, Xiang J Androgen and its receptor promote Bax-mediated apoptosis.Mol Cell Biol.2006 , 26(5): 1908-1916.

20. Cejka D, Losert D, Wacheck V.Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic?. Clinical Science ,2006,110:47-58

21. Wu W, Hodges E, Hoog C.Thorough validation of siRNA-induced cell death phenotypes defines new anti-apoptotic protein.Validation Studies Nucleic Acids Research.2006,34:e13

22. Yeung ML, Bennasser Y, LE SY, Jeang KT.siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. Cell Research.2005,15:935-946

23. Agrawal N,Dasaradhi PV,MohmmedA,et al. RNA Interference: Biology, Mechanism,and Applications.Microbiol Mol Biol Rev,2003,67 (4):657-685.

24. Baer M ,Nilsen TW,Costigan C,et al.Structure and transcription of a human gene for HI RNA,the RNA component of human RNase P.Nucleic Acids Res.1990,18(1):97-103.

25. Matzke M,Matzke AJ,Kooter JM.RNA: Guidinggene'silencing. Science, 2001, 293(5532): 1080-1083.

26. Kieleczawa J Simple modifications of the standard DNA sequencing protocol allow for sequencing through siRNA hairpins and other repeats.J Biomol Tech. 2005,16(3):220-223.

27. Fuessel S, Herrmann J, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, Hakenberg OW, Wirth MP, Meye A Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA.Cancer Lett.2006,232(2):243-254.

28. Bantounas I,Phylactoul L A,Uney J B.RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. Journal of Molecular Endocrinology, 2004,33:545-557.

29. Popova B. Kuhlmann M. Hinas A. Soderbom F. Nellen W HelF. a putative RNA helicase acts as a nuclear suppressor of RNAi but not antisense mediated gene silencing.Nucleic Acids Res.2006,34(3):773-784.

30. Ye K. Jin S Potent and Specific Inhibition of Retrovirus Production by Coexpression of Multiple siRNAs Directed Against Different Regions of Viral Genomes.Biotechnol Prog, 2006 ,22(1):45-52.

31. Itaka K. Chung UI. Kataoka K. Supramolecular nanocarrier for gene and siRNA delivery. Nippon Rinsho.2006,64(2):253-257.

32. Jones L,Ratclif F,Baulcombe DC.RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met I for maintenance. Curr Biol.2001,11(10):747-757.

33. Vornlocher HP.Antibody-directed cell-type-specific delivery of siRNA.Trends in Molecular Medicine.2006,12:1-3

34. Chan SM. Olson JA. Utz PJ.Single-cell analysis of siRNA-mediated gene silencing using multiparameter flow cytometry.The Journal of the International Society for Analytical Cytology 2006,69:59-65

35. Valencia-Sanchez MA. Liu J. Hannon GJ. Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs.Genes & Development. 2006,20:515-524

36. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer ,2003;3:721–732.

37. Chen J. Zhao S. Nakada K. Kuge Y. Tamaki N. Okada F. et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. Am J Pathol.2003;162:1283–1291.

38. Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. Int Med ,2002. 41:79–83.

39. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. Trends Mol Med. 2002,8:S62–67.

40. .Sanchez-Puig N. Veprintsev DB. Fersht AR.Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53.Journal Article MolecularCell .2005,17:11-21

41. Chen D. LiM. Luo J. et al. Direct interactions between H IF-1 and Mdm-modulate p53 function. J Biol Chem, 2003, 278 (16) :13595-13598.

42. Sohda M. Ishikawa H. Masuda N. Kato H. Miyazaki T. Nakajima M. Fukuchi M. Manda R. Fukai Y. Sakurai H. Kuwano H.Pretreatment evaluation of combined HIF-1alpha, p53 and p21 expression is a useful and sensitive indicator of response to radiation and chemotherapy in esophageal cancer. International Journal of Cancer,2004,110:838-44

43. AchisonM. Hupp TR. Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage. Oncogene. 2003, 22 (22) : 3431-3440.

44. Pan Y, Op rysko PR. Asham AM, et al. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment.Oncogene, 2004, 23 (29) :4975-4983.

45. Park J. Nadeau P. Zucali JR. Johnson CM. Mergia A.Inhibition of simian immunodeficiency virus by foamy virus vectors expressing siRNAs.Virology, 2005, 343: 275-82

46. Kavi HH. Xie W. Fernandez HR. Birchler JA.Kavi HH. Xie W. Fernandez HR. Birchler JA.Global analysis of siRNA-mediated transcriptional gene silencing.Journal Article Bioessays,2005,27:1209-12

47. Choi I. Cho BR. Kim D. Miyagawa S. Kubo T. Kim JY. Park CG. Hwang WS. Lee JS. Ahn C.Choice of the adequate detection time for the accurate evaluation of the efficiency of siRNA-induced gene silencing.Journal Article Journal of Biotechnology,2005,120:251-261

48. Zhao HF. L'Abbe D. Jolicoeur N. Wu M. Li Z. Yu Z. Shen SH.High-throughput screening of effective siRNAs from RNAi libraries delivered via bacterial invasion.Journal Article Nature Methods,2005,2:967-973

49. Bartlett DW. Davis ME.Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging.Journal Article Nucleic Acids Research,2006,34:322-333

50. Xu Q. Briggs J. Park S. Niu G. Kortylewski M. Zhang S. Gritsko T. Turkson J. Kay H. Semenza GL. Cheng JQ. Jove R. Yu H. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways.Oncogene.

2005,24(36):5552-5560.

51. Iida T, Mine S, Fujimoto H, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells[J]. Genes Cells, 2002,7 (2) : 143-149.

52. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. J Biol Chem , 2003,278:14013–14019.

53. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA,Song EJ, Lee KJ, Kim KW: Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. Cell 2002, 111:709-720.

54. Ang SO, Chen H, Hirota K, Gordeuk VR, Jelinek J, Guan Y, Liu E, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Mole D et al.: Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia.Nat Genet 2002,32:614-621.

55. Svintradze DV, Mrevlishvili GM.Fiber molecular model of atelocollagen-small interfering RNA (siRNA) complex. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37: 283-286

56. Ohrt T, Merkle D, Birkenfeld K, Echeverri CJ, Schwille P. In situ fluorescence analysis demonstrates active siRNA exclusion from the nucleus by Exportin 5.Nucleic Acids Research, 2006,34:1369-1380

57. Xie FY, Woodle MC, Lu PY.Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. Drug Discovery Today ,2006,11:67-73

58.Itaka K, Chung UI, Kataoka K.Supramolecular nanocarrier for gene and siRNA delivery. Journal of Clinical Medicine ,2006,64:253-257

59. Morris KV.siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code.Cellular & Molecular Life Sciences,2005,62:3057-3066

60. Popescu FD. Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy.J Cell Mol Med. 2005,9(4):840-53.Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, Lemoine NR. Bacterial gene therapy strategies.J Pathol.2006,208(2):290-298.

61. Herve JC, Phelan P, Bruzzone R, White TW. Connexins, innexins and pannexins: bridging the communication gap.Biochim Biophys Acta.2005,1719(1-2):3-5.

62. Wynter CV. The dialectics of cancer: A theory of the initiation and development of cancer through errors in RNAi.Med Hypotheses,2006,66(3):612-635.

63. Maniataki E, Mourelatos Z .A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA.Genes Dev,2005,19(24):2979-2990.

64. Andrew Dillin.The specifics of small interfering RNA specificity. PNAS,2003, 100(11): 6289-6291.

65. Qin XF,An DS,Chen IS,et a1.Inh hitmg HIV-1 infecti0n in human T cells by lentivlral-mediated delivery 0f small interfering RNA against CCRS.Proc Natl Acad Sci USA,2003,100:183-188.

综述

低氧诱导因子-1 与细胞凋亡的关系

研究生：肖　睿　　（综述）
导　师：宋跃明　教授（审校）

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1，HIF-1)是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子，能激活许多低氧反应性基因的表达，是在低氧条件下维持氧稳态的关键性物质。因首先在 1992 年作为被低氧诱导的、连接在红细胞生成素(erythropoietin，EPO)基因低氧反应元件上的一个核因子被发现并上调促红细胞生成素(erythropoictin，EPO)基因转录而得名。目前认为，HIF-1 是细胞在低氧条件下产生的蛋白性调节因子，它与靶基因结合，促进其转录，使机体产生一系列低氧适应反应[1]。当细胞氧分压降低或者受到其他刺激时，HIF-1α 在胞浆中积累、活化，转移到细胞核，与 HIF-1β 形成 HIF-1 分子，结合相应的靶序列，调节基因表达。HIF-1 活化是细胞低氧应答的关键环节，受胞浆多种蛋白质精细调控，HIF-1 与这些蛋白质构成细胞内低氧应答系统[2]。

研究表明 HIF-1 与细胞的生存、凋亡、运动、细胞结构、红细胞生成、血管形成、转录的调节、上皮新陈代谢、药物抵抗、核苷酸、氨基酸、铁、葡萄糖、能量新陈代谢和 PH 的调节密切相关[3-6]。

一、HIF-1结构与组成

HIF-1 属于 bHLH-PAS(basic Helix-Loop—Helix-Per / ARNT / AhR / Sim) 转录因子家族成员，主要以异源二聚体的形式存在，由 120KD 的 alpha 亚基(HIF-1α)和 91/93/94KD(3 种分子量)的 beta 亚基(HIF-1β)组成，异源四聚体较少见。bHLH- PAS 蛋白质的特征结构是 PAS 结构域。PAS 结构域得名于最早发现的具有这种结构特点的 3 个蛋白质，即果蝇 Per(peroid)、Sim(single-minded)以及人芳香烃核转运蛋白(aryl hydrocarbon nuclear translocation，ARNT)[7]。PAS 结构域含有约 260～310 个氨基酸残基，由极不保守的间隔序列及其分割的 PAS-A、PAS-B 两个重复序列构成，各重复序列约有 44 个氨基酸残基大小，始于 Phe，终于 His-X- X- Asp[8]。从总体上看，PAS 序列的保守性很低，由于这段序列的长度以及序列差异，PAS 决定了该家族成员以一定的组合两两特

异结合，形成不同的转录因子[9-10]。HIF-1α 结构更加接近 Sim，为 HIF-1 特有。HIF-1β 又称为芳香烃受体核转运蛋白(ARNT)，为哺乳动物芳香烃受体复合物的亚基，可与其它具有螺旋-环-螺旋区域(basic-Helix-Loop-Helix，bHLH)的蛋白形成二聚体。HIF-1α 分子的氨基端方向依次排列着碱性区域、HLH 和 PAS，共同构成转录因子 DNA 结合结构域(DNA-binding domain，DBD)。碱性区域和 bHLH 介导与 DNA 的结合，其中 1～166 氨基酸残基为二聚体形成所必需，1-390 氨基酸残基完整才能与 DNA 达到最适结合，因此仅当 alpha 亚基和 beta 亚基聚合后，结合 DNA 的能力达到最佳[11]。

HIF-1α 氨基端有两个相对独立的反式激活结构域(transactivation domain，TAD)，分别称之为 TAD-N(氨基酸 531～575)和 TAD-C(氨基酸 786～826)。TAD 间序列(氨基酸 576～785)具有抑制该分子在常氧条件的反式激活作用，称为抑制结构域(inhibitory domain，ID) [12-13]，能降低 TAD 的活性，抑制的 HIF-1α 转录。如同其他反式激活结构域，TAD-N 和 TAD-C 富含酸性氨基酸和疏水氨基酸残基，但是二者之间没有同源序列。

在非低氧条件下，HIF-1α 通过泛素-蛋白酶体途径降解[14-16]。HIF-1α 分子中部是氧依赖降解结构域(oxygen-dependent degradation domain，ODDD)，含有 203 个氨基酸残基，位于 DBD 之后，与 TAD 的 5'端重叠，控制其常氧降解[17]。ODDD 对调节 HIF-1 活性起中心作用，去除此区域，HIF-1α 能自发地异二聚化、DNA 结合和活化。ODDD 含有 3 个独立的调控组件，它们是氨基酸 401～496、氨基酸 497～529、氨基酸 531～601，第 2、3 个区域的氨基侧有 PEST 样序列(氨基酸 499～518、氨基酸 531～601)[18-19]。PEST 序列因富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)残基而得名，与胞内蛋白质快速降解密切相关。低氧可以抑制 HIF-1α 和泛素蛋白的结合和降解，使 HIF-1α 大量快速聚集[20]。低氧条件下 HIF-1α 与热休克蛋白 90(Hsp90)分离，转运至细胞核内，与核蛋白 ARNT-1 结合，形成有活性的异二聚体 HIF-1 蛋白。

HIF-1α 既是 HIF-1 的调节亚基又是活性亚基[21]。O_2 对 HIF-1 活性的调节主要通过该亚基。HIF-1β 作用尚不清楚，可能与 HIF-1 稳定性及二聚化引起的活性构象转变有关。两个亚基具有以下共同的结构特点：①、基本的 bHLH 区域介导二聚体形成，从而形成完整的 DNA 连接区域；②、具有次要的二聚

体形成区域-PAS区域(Per-AHR/ARNT-Sim)；PAS区域使蛋白高效地形成二聚体。bHLH和PAS区域共同提供了亚单位之间蛋白二聚化的功能界面。③、羧基端一侧具有一个或多个有效的转录活化区域，可能直接或间接与转录起始复合物反应从而影响基因转录[22]。

人的HIF-1α基因位于14号染色体(14q21-24)，HIF-1β基因位于1号染色体(1q21)。人的HIF-1α cDNA全长3720bp，开放阅读框2478bp，编码826个氨基酸，5'和3'非翻译区分别为28bp和1211bp。人的HIF-1β cDNA全长为2604bp，开放阅读框2367bp，编码789个氨基酸，5'和3'非翻译区分别为56bp和188bp[23-27]。

二、HIF-1低氧活性调节

作为低氧反应基因表达的生理性调控因子，HIF-1分子的两个亚基在细胞内均是组成性表达[28]。HIF-1的DNA结合活性和转录活性受到氧分压严格调节，其在正常氧分压没有DNA结合活性，并且HIF-1难以在脑浆中检测到。氧分压下降时，HIF-1在脑浆中的表达水平增高，DNA结合活性也相应增强。这些特征性变化均与其反式激活活性升高一致。动力学研究显示，HIF-1结合DNA的能力对氧分压下降、HIF-1与DNA解离的能力对氧分压的升高均呈指数性关系增强。体外HIF-1与其结合靶位点的相互作用非常迅速，半数结合或者解离时间均短至4ms [29-30]。低氧时HIF-1α的表达水平增加，HIF-1α从胞浆移入胞核，并在胞核内蓄积。而HIF-1β并不受低氧的影响或有轻度增加，在胞浆胞核中的分布也没有变化。HIF-1α的表达调控表现在mRNA、蛋白、核定位和转录活化作用等多水平上。HIF-1α表达广泛，在所有检测的细胞和组织中HIF-1α和HIF-1β的mRNA都有表达，但大多数实验证明：其mRNA的水平调节并不重要，推测低氧对HIF-1的调节主要发生在翻译和翻译后[31]。研究发现HIF-1α在翻译后调节的调控区在530～652氨基酸之间，将这一段序列进行蛋白表达，常氧时可使这一段序列降解，HIF-1α水平下降，而低氧、$CoCl_2$、去铁胺可使这一段序列稳定，HIF-1α水平升高[32]。

三、HIF-1α与低氧信号转导

HIF-1α低氧活性调节需要一个完整的依赖于氧化还原反应的信号通路。

（一）、参与HIF-1α磷酸化以及活化过程的转录通路

HIF-1α 是一种磷酸化蛋白，蛋白合成时其磷酸化过程参与 HIF-1α 亚单位的稳定以及 HIF-1 转录活性的调节。蛋白激酶抑制剂和蛋白磷酸酶均能够抑制 HIF-1 的活性[33]。因此明确氧分压变化信号所影响的 HIF-1α 磷酸化位点，以及这种磷酸化如何影响遍在蛋白-蛋白酶解系统的降解非常重要。虽然促使 HIF-1α 在常氧条件下降解的 ODD 结构域相当大，但是该区域部分缺失却不能增强 HIF-1α 的稳定性，说明 ODD 结构域存在功能上的冗余[34-36]。上述 ODD 各个区域均能在不同程度上独立执行低氧诱导效应，因此寻找确切的氧依赖降解调控位点显得十分困难。

目前有几条HIF-1α磷酸化的途径：

1、磷酸肌醇-3激酶/Akt通路

Akt 是磷酸肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase，PI-3K)激活的蛋白激酶 b，又称 PKB，是一种丝氨酸-苏氨酸激酶。低氧时血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)的表达受 HIF-1 的调节，HIF-1 活化，与 VEGF 基因启动子和 5'端的低氧反应元件(HRE)结合。实验证实：缺失 PI-3K 或 Akt 激酶的突变子能够阻止低氧诱导的 VEGF 的过度表达，表明 PI-3K/Akt 通路可能参与 HIF-1 活化；HIF-1α 报道基因与 Akt 变异性突变子载体共转染时，HIF-1 活化受阻，表明 PI-3K/Akt 通路的破坏可损害 HIF-1 的活性，即 HIF-1α 由此通路调节[37]，但低氧活化 PI-3K 的机制还不清楚[38-39]。

研究发现，Ras 转化细胞的 PI-3K 信号转导途径高度活化并上调 HIF-1α 表达，活化的 PI-3K 使胞内信使分子磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol，PtdIns) PtdIns(4) P、PtdIns(4，5)p2 分别转变为 PtdIns(3)P、PtdIns(3，4)P2、PtdIns(3，4,5)P3。PI(3)K 的 P85 亚基接受上游活化的受体信号起调节作用，P110α、P110β 具有激酶活性而起催化作用。PI-3K 具有脂激酶活性，是胞内重要的 PtdIns 信号调节分子。P110α、P110β 具有蛋白激酶活性，前者的蛋白激酶活性催化其接头链 P85 磷酸化，并降低它的脂激酶活性，而后者的蛋白激酶活性可以激活 MAPK 途径，从而将两条信号途径联系起来。PI-3K 活化继发于细胞因子诱导的 Ras 分子活化和一些信号分子的磷酸化。活化受体的脑浆区或者与之相关底物构象发生变化，带动 PI-3K 向膜靠近，使 PI-3K 作用于膜上磷脂，产生

第二信使，进而激活下游丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，包括 PKB / Akt、P70s6k、PKC 及 PKC 相关激酶，传导细胞生长、抗凋亡信号[40-42]。

在肿瘤组织中，癌基因、抑癌基因变异和瘤组织低氧微环境，通过遗传改变和生理微环境两方面调控 HIF-1 依赖的 VEGF 表达，这个过程需要 PI-3k / Akt 途径的活化。PTEN(Phostase and tensin homology deleted on chromosome ten)通过使 PtdIns(3)P、PtdIns(3，4)p2、PtdIns(3，4，5)P3 去磷酸化，从而发挥其在 PI-3k / Akt 信号途径的负调节作用。在 PTEN 异常表达的胶质细胞瘤中，PI-3K / Akt 因 PTEN 的负调控作用丧失而呈现高活性状态，使 HIF-1 及其靶基因的表达上调。调节发生于 HIF-1α 蛋白质水平，对 HIF-1α mRNA 几乎没有影响[43]。胰岛素、上皮细胞生长因子和 NO 特异上调人类瘤细胞 HIF-1α 的蛋白质水平表达，不影响 HIF-1α 的 mRNA 水平和 HIF-1β 的表达，这个过程需要 PI-3K 信号，引入野生型 PTEN 能够抑制 PTEN 缺失的细胞表达 HIF-1α 及 VEGF[44-47]。

2、GSK-3beta通路

GSK-3beta(glycogen synthase kinase-3beta)是 PI(3)K / AKT 在体内的直接底物，被 PKB / AKt 磷酸化而失活，抑制糖原的合成。GSK-3beta 还参与其他几种细胞内信号的调节，研究发现 GSK-3beta 直接作用于 HIF-1α，对其 ODD 结构域进行磷酸化[48]。推测 GSK-3beta 通过磷酸化 HIF-1α 促进其进入遍在蛋白-蛋白酶解系统，PI(3)K / AkT 激活后，通过抑制 GSK-3beta 的磷酸化作用而稳定 HIF-1α 蛋白质[49]。基因表达谱分析发现低氧处理 Hep3B 后，GSK-3beta、ILK(integri-linked kinase)和纤连蛋白前体分子表达增高。

GSK-3beta 表达上调可能是 PI(3)K / AKT / GSK-3beta 的一个负反馈调节机制。另外 ILK 是丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，与纤连蛋白的相互作用，被胰岛素激活，可以磷酸化修饰 PKB 和 GSK-3beta[50]。

3、ERK信号依赖的HIF-1反式激活通路

ERK途径参与细胞因子、生长因子、激素、丝裂原受体活化信号的转导。ERK也称为p42 / 44 MAPK，是最早发现的MAPK，其活性受到自身苏氨酸、酪氨酸残基的磷酸化调节，由一种双特异性蛋白激酶MAPK。

有丝分裂活化蛋白激酶(mitogen-activated Protein kiase，MAPK)如细胞qh

信号调节激酶(extracellular sin-gal-regulated protein kinase，ERK)、P38参与了HIF-1α翻译后磷酸化修饰，即HIF-1α活化[51-52]。MAPK包括细胞外信号调控的蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase，ERK)、Jun N端的蛋白激酶(Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase，JNK / SAPK)、p38 MAPK，是一组可以被多种细胞外信号激活的蛋白丝称氢酸激酶，处于脑浆信号转导通路的终末位置，活化后转位到核内，作用于核内转录因子，调节基因表达。MAPK主要参与生长因子、激素、细胞因子、应激等各种刺激下细胞的反应，以及细胞的生长、分化等过程。Salceda通过报道基因分析和EMSA实验证实，在低氧性Hep3B细胞中，ERK通路抑制剂PD98059能够阻止HIF-1的转录活性，而不影响其DNA结合活性[53]，表明ERK通路能调节HIF-1的转录活性，而不参与其稳定化过程。Richard证明HIF-1α亚单位可被活化的ERK1或ERK2磷酸化，但却检测不到ERK1或ERK2的活性。其它相关实验证实ERK通路的激活，能够直接参与HIF-1转录活性的活化。

在低氧应激反应中，不同的细胞在不同的低氧环境中，MAPK 亚类的活性消涨以及作用途径有所差别。PC12 细胞在中度低氧(6%)时，p38MAPK / SAPK 途径强烈活化，ERK 活化的程度较低，JNK 几乎没有活性；当该细胞经受严重缺氧时(1%，6h)，ERK1 活性显著升高。对生长因子、低氧诱导转化成纤维细胞(CCL39)的血管内皮生长因子(VEGF)表达调控研究，发现 ERK 信号转导途径在两个水平对 VEGF 表达进行调控。常氧条件下 ERK 直接作用 VEGF 启动子进行表达调控，低氧条件下 ERK 需要激活 HIF-1α，方能促进 VEGF 表达。在 Kaposi's 肉瘤 VEGF 表达调控研究中，P38MAPK 受到抑制后能够取消 HIF-1α 的活性及其 VEGF 高表达[54]。凝血酶活化血管平滑肌细胞的 HIF-1α 也是通过 P38 MAPK 途径[55-56]。虽然在体研究发现 P38 MAPK 的活性与 HIF-1α 活性表达有一定的联系，但是目前体外研究仅证实 ERK 能够对 HIF-1α 直接进行修饰调节[57]。

低氧时 ERK 如何被激活有几种假设：①、低氧诱导钙流入引起 ERK 的活化(以低氧 PCL2 细胞实验证实)；②、低氧时诱导线粒体 ROS 产生增加(以 Hep3 细胞实验证实)，引起 ERK 活化；不仅 Hep3 细胞，其他不同的细胞中(包括 JB6、MCT 以及鼠内皮细胞)，ERK1 和 ERK2 也证明可被 ROS 活[58]，推测 ROS 的

产生可能是另一种活化 ERK 途径的方法。③、VEGF 以及其它生长因子是 ERK 通路的活化剂。VEGF 可能参与一种自调节形式的反馈环，导致 ERK 活化以及 HIF-1 的磷酸化[59]。

进一步研究发现，胞外信号调节激酶(ERK)对 HIF-1α 蛋白的磷酸化修饰既不影响其稳定性，也不增强其 DNA 结合能力，但是抑制这个激酶的活性就抑制了 HIF-1 的转录活性，提示 ERK 具有调控 HIF-1α 的反式激活功能[60]。Hur[61]在 Ras 上调 HIF-1 依赖的 VEGF 表达细胞模型中，对 ERK 的调控机制进行了系统研究. 他采用 3 种方法相互补充证明 ERK 对 HIF-1α 的磷酸化修饰作用及该作用的生物学效应：①、激酶抑制剂(PD98059)实验初步表明 ERK 对 HIF-1α 的修饰活化作用；②、保留部分功能的 Ras 蛋白突变异构体实验，确认 ERK 途径在 HIF-1α 活化过程的信号传导；③、稳定表达 HIF-1α 嵌合蛋白和 HIF-1α 反式激活抑制结构域嵌合蛋白直接证明了 ERK 的作用及作用位点[62-63]。

ERK对HIF-1反式激活活性的调控途径可以简单地描述为RTK / NRTK - Ras -Raf(MAPKK)-MEK(MAPKK)-ERK1-HIF-1。ERKs转位到核内是信号传递至转录因子的关键。近期发现经长时间刺激，ERK虽然仍然滞留在核内，但是已经失去活性，不能活化HIF-1的反式激活功能。MKP1/2蛋白磷酸酶负责ERK核内失活，它是ERK途径所上调的一种立即早期基因表达产物。细胞核是ERK信号向内传导的终点，核内ERK失活机制在上述过程中起负反馈调节作用[64]。

HIF-1的活化是一种多步骤过程，近期关于几种低氧细胞中的激酶及其在HIF-1活化中的作用的实验研究较多，得到几个结论：①、PI-3K/Akt通路参与HIF-1α的稳定，但生长因子诱导的HIF-1α稳定似乎不依赖该通路； ②、在常氧和低氧条件下，ERK通路参与HIF-1转录活性的活化，并且有赖于细胞类型和刺激的不同；③、P38参与调节HIF-1。虽然这些激酶的上游活化物尚未阐明，但低氧时产生的线粒体ROS或者与信号转态相关的NADPH类氧化还原酶可以作为其中代表，另外，在几种活化途径中，Ca的准确作用有待进一步研究[65]。

（二）、影响HIF-1α稳定性调节的基因或蛋白

1、VHL基因

Kaelin等[66-70]发现，VHL(Von Hippel-Lindau)基因参与了HIF-1α的降解过

程，VHL是一种肿瘤抑制基因，其失活会引起多种类型的癌症，称为VHL病。缺失pVHL(product of the Von Hippel-Lindau)的肿瘤细胞，在常氧和低氧下，细胞中HIF-1α均处于活化状态，而重新介入野生型pVHL，可恢复低氧依赖的HIF-1α表达和转录活性[71-73]。pVHL的β区域直接同HIF-1α的ODDD结合，在HIF-1α的降解过程中，发挥重要作用[74]。和HIF-1α调控的其它基因相同，VHL3'未翻译区也包含HIF-1的结合位点，实验证实VHL的表达也受HIF-1的调控[75-76]，这样构成一个反馈环。在HIF-1α的C 端，TAD与共活化因子如CBP、P300、SRC-1以及TIF-2作用以活化转录活动，虽然TAD的N端同HIF-1α中小部分VHL结合区域重合，但VHL并不具有调节TAD部分的功能，缺失TAD部分的HIF-1α突变体不能够再结合VHL[77-78]，但HIF-1的转录活性仍然受低氧诱导，氯化钴模拟低氧时，将VHL与HIF-1α隔离，则HIF-1α的降解受阻，但低氧时并不能使两者隔离[79]，因此低氧时HIF-1α减少降解的机制有待研究。

2、ARD1蛋白

ARD1蛋白是包括组蛋白乙酰基转移酶在内的乙酰基转移酶家族中的一员，参与细胞的循环[80-81]. HIF-1α的乙酰化作用是蛋白质转录后修饰的最显著的特点[82]，赖氨酸532 ARD1蛋白的乙酰化作用局限在ODDD区域，邻近羟赖氨酸564，是pVHL的补充。因此ARD1蛋白和PHDs一样对HIF-1α起负调节作用。在缺氧和含氧量正常情况下，乙酰基转移酶的活化是否依赖于氧含量的改变还不清楚。但是，在缺氧或有$CoCl_2$的状况下，ARD1mRNA水平稍微有所下降，HIF-1α的活性降低。进一步研究发现缺氧和含氧量正常调节ARD1的活性，细胞液中ARD1的缺乏会优先作用于细胞液中的HIF-1α[83]。

3、PHDs

最近发现脯氨酸3-羟化酶即脯氨酸4-羟化酶的蛋白质区域（PHD1、PHD2、PHD3）[84]，3个亚基各自独立但起源相同，从EGLN2，1，3到EGLN9以相同的基础蛋白质序列依赖铁的酶将脯氨酸转化为羟脯氨酸，在此过程中需要氧、2-酮戊二酸脱氢酶和抗坏血酸盐。在人类HIF-1α中含有两个脯氨酸，即Pro402和Pro564，已经证明它们可以被羟基化和含有保守的序LXXLAP[85]，在细胞内这些酶的活性被以氧为中心的蛋白质控制，而这些蛋白质需要铁的存在，此已经通过应用铁螯合剂如去铁胺（DFO）和铁拮抗剂如$CoCl_2$证实[86]。以氧为中

心的蛋白质控制PHDs的活性和PHD1mRNA、PHD2mRNA的表达[87]。与P53类似，HIF-1α通过控制PHD2 mRNA的表达的调节自身的稳定[88]。Metzen等[89]测定细胞内不同区域GFP含量、外源性表达发现：PHD1位于细胞核，PHD2主要集中在细胞质，PHD3则无一定的分布区域。

4、NO及CO

HIF-1 的活性可能受 CO 及 NO 调节，作为一种信号转录机制导致 HIF-1 活化。CO 及 NO 阻止 HIF-1α 表达、DNA 结合及 HIF-1 转录活性，而 CO 和 NO 的合成酶 HO-1 和 NOS 又受低氧时 HIF-1 的调节[90-91]。NO 抑制线粒体电子转移复合体 I 活性，复合体 I 的药理拮抗剂如鱼藤酮可防碍低氧诱导 HIF-1α 的表达[92-93]。但在常氧时，暴露于 NO 的细胞能够诱导 HIF-1α 的表达、DNA 的结合及下游靶基因的表达。最近研究表明，NO 增加 ROS 的产生。一种可能的解释是，活化氧和氮化物能分别直接或间接调节 HIF-1α 的表达，但两者结合如过氧化氮就失去此作用。

（四）、参与HIF-1α活性调节的基因或蛋白

1、FIH-1

在HIF-1α调节过程中，FIH-1被证实是具有抑制HIF-1α活性的第一个氧传感元件[94-95]， FIH-1主要在细胞质出现，特别是在低氧状态下。FIH-1含有天冬酰胺羟化酶，激活天冬酰胺803，阻止HIF-1α 300/CBP转录为HIF-1α C-TAD。与PHDs相反，天冬酰胺羟化酶的序列还没有确定，而在不同种群之间，人类天冬酰胺803序列具有很高的保守性。最近Linke等[96]证实邻近缬氨酸802残基的天冬酰胺803羟化酶是非常关键的。缬氨酸-天冬酰胺主要就是在300/CBP和HIF-1α C-TAD之间保持相互作用。FIH-1并不影响HIF-1α的稳定性，但是，它像PHDs一样，是2-酮戊二酸脱氢酶和依赖铁的加双氧酶家族中的一员[97]。与PHD1相似，FIH-1的转录是完全独立于氧并且在所有细胞中均表达。PHD1和FIH-1均含有组蛋白，在含氧正常的情况下，FIH-1调节HIF-1α的转录。

2、肿瘤坏死因子

最近Newcomb等[98]实验发现，肿瘤坏死因子(TNF-1α)也参与HIF-1α的活性调节。表现在：①、常氧时TNF-α允许HIF-1α的稳定和核移位，以及DNA结合；②、它促进细胞内ROS的集聚[99]；③、某些抗氧化剂能够减弱TNF-α对

HIF-1α的活性调节；④、线粒体复合体I和其呼吸链的受阻，使依赖TNF2α的HIF-1α活性调节丧失，可见存在一种非低氧的、ROS敏感的机制调节HIF-1α的稳定、移位和活化[100]。

3、CBP/p300和其他共价催化剂

CBP和p300位于细胞核内具有组蛋白羟化酶活性的同源广泛表达的蛋白质[101]，他们的功能是转录其他共价催化剂和参加细胞的分裂、凋亡、分化和转化等[102]。p300通过富含半胱氨酸-组氨酸区域（CH1）与HIF-1α的C-TAD连接起来。通过增加组蛋白乙酰化而增加了转录的可能，其结果是局部的染色质结构改变，导致进入DNA的转录因子增加。HIF-1α的CBP/p300相互抑制作用使诱导低氧的基因表达被抑制。而且，Carrero等[103]发现CBP/p300通过N-TAD和C-TAD区域提高HIF-1α的转录[104]。其他组蛋白乙酰化类固醇受体SRC-1和转录媒介TIF2同HIF-1α相互作用，以p300增效的方式提高活性。

4、CBP/p300的结合蛋白p35srj

Dial R等[105-106]研究表明，CBP/p300的结合蛋白p35srj可与HIF-1α相互作用而抑制HIF-1α的活性，p35srj的作用是通过抑制CBP/p300与HIF-1α的接触而实现的。因p35srj是HIF-1α作用的靶基因之一，低氧时其表达增加，反过来又抑制HIF-1α的活性，形成一个负反馈的调节环路[107]。

5、MAPK

Kimba等[108]证实无论体内或体外，在低氧情况下，p42/p44分裂素MAPK能够使HIF-1α磷酸化，从而使HIF-1α稳定。而且，MAPK的活性与HIF-1转录活性的增加相关联。Trisciuoglio等[109]证实，在体外抑制MAPK的磷酸化，并保持细胞核内ERKs活性，能够使HIF-1α磷酸化。然而，Sang等[110]发现，通过MAPK使HIF-1α磷酸化，MAPK不与HIF-1α的转录活性的增加直接相关联，而是通过MAPK将信息从p300传递到HIF-1α，并增加其相互作用。

6、糖代谢中的目的基因

在氧供应减少的条件下，无氧酵解就成为细胞产生ATP的主要形式。现已证实许多与葡萄糖摄取及糖酵解的基因均为HIF-1目的基因[111]。无氧酵解增强可使乳糖产生增多，pH值下降，尽管有充足的葡萄糖供应，也可能限制ATP的来源。据报道，转膜碳酸酐酶为HIF-1目的基因，碳酸酐酶通过把二碳化合

物和质子转化为CO_2而调节pH值，CO_2被红细胞摄取而转运到肺。肿瘤细胞结构性活化无氧代谢可解释氧不足时细胞的自主性反应，因此，在肿瘤低氧性适应过程中，HIF的功能不仅是VEGF介导的血管生成，增加糖酵解，PH缓冲等，可能在肿瘤发生发展中还有其它关键性细节[112]。

四、HIF -1 与细胞凋亡的关系

（一）、HIF-1在抗细胞凋亡方面的作用

应用 RNA 干扰技术高效特异性地抑制人血管内皮细胞上 HIF-1 的表达后，在缺氧/复氧条件下培养发现，使用 RNA 干扰的人血管内皮细胞的凋亡明显比未用 RNA 干扰的多，说明 HIF-1 有抗细胞凋亡的作用[113-114]。Piret 等[115]也发现在肝细胞瘤细胞系 HepG2 中，低氧诱导 HIF-1α 的表达能减少叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide， t-BHP)引发的细胞凋亡。Chung 等[116]发现缺氧能够阻断细胞凋亡，VEGF 是缺氧时 HIF-1 的最重要的靶基因之一，因此推测这与缺氧时 VEGF 的增多有关，进一步发现人重组 VEGF 加入到细胞能抑制无血清诱导的细胞凋亡，而用抗体中和 VEGF，则能阻断缺氧时的抗凋亡作用，从而证实了他们的推测。

VEGF 可能通过促血管新生发挥抗细胞凋亡的作用，但最近研究发现缺血缺氧时 VEGF 对神经有直接的保护作用[117]。Zaman 等[118-119]的实验结果则为 HIF-1 抗细胞凋亡的作用提供了直接证据，他们证明铁离子螯合剂能阻止氧化压力诱导的凋亡。这一保护作用与其增强 HIF-1 的 DNA 结合能力，从而使 HIF-1 的靶基因糖代谢酶，p21(waf1/cip1)，EPO 的表达增加有关。Akakura 等[120]的研究结果也证实了相似的 HIF-1 抗细胞凋亡的机制。他们发现常氧条件下 HIF-1α 组成性表达的胰腺癌细胞系比无 HIF-1α 表达的其他细胞系更能抵抗缺氧和无糖所诱导的细胞凋亡；在缺氧和无糖培养条件下，组成性表达 HIF-1α 的胰腺癌细胞中 HIF-1α 水平高于 HIF-1α 非组成性表达的其他细胞系，进一步研究发现胰腺癌细胞在缺氧的环境下通过 HIF-1 促使 GLUT-1 和 ALDA 的转录，从而增加无氧代谢和葡萄糖摄取而使细胞存活，导致肿瘤的生长。

HIF-1 能够下调促凋亡的分子的表达是其抗细胞凋亡的机理之一。Erler 等[121-122]发现在结肠癌细胞，肝细胞瘤，卵巢上皮细胞，肺和胚胎纤维原细胞中，缺氧条件下促凋亡分子Bid呈HIF-1依赖性下调。从而成为细胞存活的原因。

HIF-1特异地与Bid启动子上的HRE 结合，发挥转录抑制作用，此位点位于Bid基因翻译起始位点的-8484 bp处。

现已不乏有 HIF-1 发挥转录抑制作用的例子，如 HIF-1 能够与过氧化酶增殖体激活受体(peroxisome proliferator-activated recep tors，PPARs)基因结合使其转录下调，但其中的机制尚不清楚[123-124]。

（二）、HIF-1在促细胞凋亡中的作用

HIF-1 作为缺氧条件下机体的调节因子，可能在体内发挥多向性调节作用。除了上述 HIF -1 发挥抗细胞凋亡方面的作用，它还介导缺氧诱导的细胞凋亡。Carmeliet 等[125]发现缺氧能够增加野生型胚胎干细胞(ES，HIF-1α$^{+/+}$)凋亡，但不能促进 HIF-1α 基因缺失的胚胎干细胞(ES，HIF-1α$^{-/-}$)发生凋亡，他们对胚胎干细胞来源的肿瘤进行培养时，同样发现 HIF-1α$^{-/-}$基因型肿瘤的凋亡比 HIF-1α$^{+/+}$基因型肿瘤少，可见缺氧诱导的凋亡是由 HIF-1 介导的。Moritz 等[126]也发现胰腺移植治疗 I 型糖尿病时移植物早期出现的细胞凋亡与 HIF-1 的高表达有关。

HIF-1 促凋亡的机理与其调控促凋亡的分子表达有关。缺氧能够在转录水平上诱导 CHO-K1 细胞内 Bcl-2 家族促凋亡分子 Nip3 和 Nix 表达上调。缺氧条件下 HIF-1 与位于 Nip3 翻译起始密码子上游 234 bp 处 Nip3 基因启动子的公认 HRE 序列 5 '-CACGTG-3 '结合，从而促进 Nip3 的表达[127-128]。对于人 Nip3 基因，HIF-1 的结合位点位于 2609 bp 处，HIF-1 与 HRE 位点的结合对于激活 Nip3 是非常必需的[129]。在许多人类细胞如上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞中，HIF-1 都能上调 Nip3 和 Nix，但在淋巴细胞和纤维肉瘤中 H IF 则不能上调 Nip3 和 Nix[130]，在瘢痕瘤细胞以及 HCT116 等结肠癌细胞中 Nip3 的水平反而下降，因此缺氧诱导 Nip3 可能有细胞特异性。Kim 等[131-132]证明了缺氧时另一促凋亡分子 Noxa 的表达上调不依赖于 p53，而是依赖于 HIF-1，HIF-1α 结合在 Noxa 起始位点 ATG 的上游-1275 bp 处的 HRE 基序上。最新发现 HGTD-P 也是受 HIF-1 调控表达的促凋亡分子[133-134]。Noxa 和 HGTD-P 在缺氧早期表达，而 Nip3 在持续缺氧后期才表达，对慢性缺氧起反应。

另外，缺氧能够激活 caspase-9 的启动子，在 mRNA 水平上诱导 caspase-9 表达增加， caspase-9 基因上有 HIF -1 的结合位点，但缺氧时 HIF-1 的结合元件即 HRE 对 caspase-9 的表达是否有作用尚待研究[135]。

p53 是介导 HIF-1 发挥促凋亡作用的比较重要的分子。有关 HIF-1 与 p53 的关系是探讨 HIF- 1 与细胞凋亡关系中研究最多的一个方面。Sanchez-Puig 等[136]证实缺氧条件下野生型胚胎干细胞(ES, HIF-1α$^{+/+}$)的 p53 蛋白水平升高，在 HIF -1α 基因缺失的胚胎干细胞(ES，HIF-1α$^{-/-}$)中 p53 蛋白水平则没有明显改变，从而认为缺氧时 p53 蛋白水平的升高是呈 HIF-1 依赖的。免疫共沉淀等方法证明，HIF-1 能够直接与 p53 蛋白结合，增加 p53 的稳定性，促进 p53 发挥促细胞凋亡的作用。严重长时间缺氧诱导产生磷酸化与去磷酸化 2 种状态的 HIF-1，只有去磷酸化的 HIF-1 对于稳定 p53 有作用[137]。然而，Chen 等[138]用 GST pull-down assay 没有发现 p53 与 HIF-1 可以直接作用，他们证明了 HIF-1 是通过抑制 MDM2 介导的 p53 泛素化和阻断 MDM2 介导的 p53 向核外转运而稳定 p53 的，MDM2 在 HIF-1 与 p53 之间起桥梁作用，并且发现 HIF-1 不能增加突变的 p53 稳定性。实验表明轻度缺氧不能使 p53 积聚，只有比较严重的缺氧条件，才能使 p53 积聚增加。鼠胚胎纤维原细胞，在 0.02%的氧的条件下才能诱导 p53 介导的细胞凋亡，在 0.2%的氧的条件下则不能。可能严重长时间缺氧能使 HIF-1 去磷酸化，去磷酸化的 HIF-1 使 p53 稳定性增加[139]。Achison 等[140]则认为不同的氧浓度引起的不同反应与其导致的 p53 的不同的磷酸化状态有关，并且把 1%的氧定义为低氧，把 0. 01%～0. 1%定义为缺氧，发现低氧能减轻 p53 的促细胞凋亡作用，但这是否与 HIF-1 直接相关还不十分清楚。最近发现低氧时 HIF-1 蛋白水平增加对 p53 无影响，研究者认为增加的 HIF-1 不足以使其与 p53 相互作用，低氧本身不能使 p53 聚集，它可能通过引起酸毒症改变微环境来提高 p53 的水平[141]。

HIF- 1还可能通过下调Bcl-2促进细胞凋亡。缺氧条件下，野生型胚胎干细胞(ES，HIF-1α$^{+/+}$)中的Bcl-2表达下降，而HIF-1α基因缺失胚胎干细胞(ES，HIF-1α$^{-/-}$)中的Bcl-2较缺氧培养前无明显变化，表明缺氧时Bcl-2下降是依赖HIF-1的。把HIF-1α基因转染到内皮细胞中能够下调Bcl-2的表达[142]。

另外，有些HIF-1 的靶基因本身对凋亡就有双重调节作用。如iNOS，iNOS

能促进NO的生成， NO既有促细胞凋亡的作用，又有抗细胞凋亡的作用[143]。RTP801 是最近被鉴定出来的受HIF-1 调控的分子，在不同的细胞中对凋亡发挥双重作用[144]。

HIF-1 在凋亡中的作用具有矛盾性：HIF-1α 能稳定凋亡蛋白 P53，然后二者一同促进低氧诱导性凋亡，而 P53 抑制 HIF-1 活性,诱导 MDM2 介导的 HIF-1α 水平的降低。近来一些其它证据表明，HIF-1 对凋亡具有抑制作用[145-146]，低氧诱导产生的 VEGF 已经证实可以保护凋亡，这一作用依赖于 PI-3K/Akt 信号通路[147]；一种 HIF-1 靶基因 GLUT/1 的过度表达也保护细胞减少凋亡；另外，HIF-1 以及其靶基因的活化已被证明参与铁螯合物的抗凋亡效应，在这种保护性效应中激酶的作用需待研究[148]。

六、总结

低氧是许多疾病的一个重要病理因素，了解HIF-1在其中的作用机制，对癌症、心脏病、中风、恶性贫血等严重威胁人类健康的疾病的有效治疗及预防具有重要意义。HIF-1在哺乳动物细胞的低氧应答中居于核心地位，但HIF-1的活化及其参与的低氧信号转录，不是一条简单清晰的路径,具有复杂化与多样性，因此，目前该领域内多种学说并存，而且每种学说都有实验基础作支持。尽管如此，HIF-1的运用仍然已成为疾病基因治疗新手段[149]。HIF-1/HRE选择性基因表达系统将会成为疾病基因治疗研究的新的热点。

作为调控细胞氧平衡的重要调控因子，HIF-1自身活性的调控在很大程度上决定了细胞对氧分压变化应答的敏感性和准确性。HIF-1α的快速降解及其依赖其转录活性的稳定性调控，是一个能够对刺激做出迅速反应的高效系统，细胞很多重要基因表达调控系统也采用这种策略。因此认识HIF-1α活性调控机制不仅为肿瘤、心血管疾病的药理学研究提供靶点，还能够对生命的精确调控机制进一步了解。

参考文献

1. Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, Tsujie M, Yamamoto H, Miyata H, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M, Monden M. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma.Gastric Cancer,2006,9(1):44-49.

2. Kopper L, Timar J. Genomics of renal cell cancer - does it provide breakthrough?Pathol Oncol Res,2006,12(1):5-11.

3. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer ,2003,3:721–732.

4. Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F, et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose mètabolism. Am J Pathol ,2003,162:1283-1291.

5. Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. Int Med,2002,41:79-83.

6. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. Trends Mol Med 2002,8:S62-67.

7. Yang J, Zhang L, Erbel PJ, Gardner KH, Ding K, Garcia JA, Bruick RK. Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor.J Biol Chem,2005, 280(43): 36047-36054.

8. Yoo YG, Kong G, Lee MO. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1.EMBO J,2006, 25(6):1231-1241.

9. Pore N, Jiang Z, Gupta A, Cerniglia G, Kao GD, Maity A. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms.Cancer Res. 2006, 66(6):3197-3204.

10. James LP, Donahower B, Burke AS, McCullough S, Hinson JA .Induction of the nuclear factor HIF-1alpha in acetaminophen toxicity: Evidence for oxidative stress.Biochem Biophys Res Commun,2006 , 343(1):171-176.

11. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC .HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption.Cell Metab,2006, 3(3):187-197.

12. van den Tweel ER. Kavelaars A. Lombardi MS. Nijboer CH, Groenendaal F. van Bel F. Heijnen CJ. Bilateral molecular changes in a neonatal rat model of unilateral hypoxic-ischemic brain damage.Pediatr Res.2006.59(3):434-439.

13. Sung KC. Kim KS. Lee S. Hypoxic regulation of VEGF. HIF-1(alpha) *in* coronary collaterals development.Korean J Intern Med.2005.20(4):295-302.

14. Liu L. Cash TP. Jones RG. Keith B. Thompson CB. Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. Mol Cell.2006.21(4):521-531.

15. Tuncer MC. Hatipoglu ES. Ozturk H. Kervancioglu P. Buyukbayram H. The effects of L-arginine on neurological function. histopathology. and expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha following spinal cord ischemia in rats.Eur Surg Res.2005.37(6):323-329.

16. Dang DT. Chen F. Gardner LB. Cummins JM. Rago C. Bunz F. Kantsevoy SV. Dang LH. Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts.Cancer Res.2006. 66(3): 1684-1693.

17. Gregg L.Sememza.Expression of hyposia-induced factor1:mechanisms and consequences. Biochemical Pharmacology.2000.59:47-53

18. Arnesen T. Kong X. Evjenth R. Gromyko D. Varhaug JE. Lin Z. Sang N. Caro J. Lillehaug JR .Interaction between HIF-1 alpha (ODD) and hARD1 does not induce acetylation and destabilization of HIF-1 alpha.FEBS Lett.2005. 579(28): 6428-6432.

19. Kajimura S. Aida K. Duan C. Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: in vitro and in vivo analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression.Mol Cell Biol.2006. 26(3): 1142-1155.

20. Sutter CH.Laughner E.Semenza GL.Hypoxia-inducible factor 1m protein expression is controlleed by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations.Proc Natl Acad Sci USA 2000.97:4748-4753.

21. Quintero M. Brennan PA. Thomas GJ. Moncada S. Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation.Cancer Res.2006.66(2):770-774.

22. GreggL.Sememza.HIF-1:mediator of physiological and patho-physiological reponses to

hypoxia. Appl Physiol,2000,88:1471-1480

23.Peng J, Zhang LY, Drysdale L, Fong GH: The transcription factorEPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 alpha plays an importantrole in vascular remodeling. Proc Natl Acad Sci USA , 2000,97:8386-8391.

24. Compernolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F et al.: Loss of HIF-2alpha andinhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. Nat Med,2002, 8:702-710.

25. Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA: The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. Blood,2003, 102: 1634-1640.

26. Brusselmans K, Compernolle V, Tjwa M, Wiesener MS,Maxwell PH, Collen D, Carmeliet P: Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2 alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. J Clin Invest,2003, 111:1519-1527.

27. Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, Kawauchi S, Ema M, Shibahara S, Udono T et al.: HLF/HIF-2alpha is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. EMBO J ,2003, 22:1134-1146.

28. Gleadle JM, Mole DR, Pugh CW. Hypoxia-inducible factors: where, when and why?Kidney Int,2006,69(1):15-17.

29. Ferrario A, Gomer CJ. Avastin Enhances Photodynamic Therapy Treatment of Kaposi's Sarcoma in a Mouse Tumor Model.J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2006,25(1-2):251-260.

30. Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, Tsujie M, Yamamoto H, Miyata H, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M, Monden M. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma.Gastric Cancer,2006,9(1):44-49.

31. Gregg L,Sememza.HIF-1 and human disease:one highly involved factor.[J]Genes & development,2000,14:1983-1991

32. Ueno M, Tomita S, Nakagawa T, Ueki M, Iwanaga Y, Ono J, Onodera M, Huang CL, Kanenishi K, Shimada A, Maekawa N, Sakamoto H .Effects of aging and HIF-1alpha

deficiency on permeability of hippocampal vessels.Microsc Res Tech,2006,69(1):29-35.

33. Minet E,Michel G,Mottet D,et al.Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation.[J]Free Radical Biology & Medicine, 2001, 31(7): 847-855.

34. Jeong BC, Kim MY, Lee JH, Kee HJ, Kho DH, Han KE, Qian YR, Kim JK, Kim KK. Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 regulates VEGF through GABP that acts as a transcriptional repressor.FEBS Lett,2006,580(2):6596-6616.

35. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison C, Lappin TR, Maxwell PH, McMullin MF, Lee FS. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis.Proc Natl Acad Sci U S A,2006,103(3):654-659.

36. Grumann T, Arab A, Bode C, Guttenberger R, Hehrlein C. Reoxygenation of human coronary smooth muscle cells suppresses HIF-1alpha gene expression and augments radiation-induced growth delay and apoptosis.Strahlenther Onkol. 2006,182(1):16-21.

37. Sollid J, Rissanen E, Tranberg HK, Thorstensen T, Vuori KA, Nikinmaa M, Nilsson GE. HIF-1alpha and iNOS levels in crucian carp gills during hypoxia-induced transformation.J Comp Physiol,2005,14:1-11

38. Kasper LH, Brindle PK. Mammalian gene expression program resiliency: the roles of multiple coactivator mechanisms in hypoxia-responsive transcription.Cell Cycle,2006, 5(2):142-146.

39. Koshikawa N, Takenaga K. Hypoxia-regulated expression of attenuated diphtheria toxin A fused with hypoxia-inducible factor-1alpha oxygen-dependent degradation domain preferentially induces apoptosis of hypoxic cells in solid tumor.Cancer Res, 2005, 65(24): 11622-11630.

40. Mansoor JK, Morrissey BM, Walby WF, Yoneda KY, Juarez M, Kajekar R, Severinghaus JW, Eldridge MW, Schelegle ES. L-arginine supplementation enhances exhaled NO, breath condensate VEGF, and headache at 4,342 m.High Alt Med Biol,2005 ,6(4):289-300.

41. Schumacker PT. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).Crit Care Med,2005, 33(12 Suppl): S423-425.

42. De Armond R, Wood S, Sun D, Hurley LH, Ebbinghaus SW .Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter.Biochemistry,2005 , 44(49): 16341-16350.

43. Zundel W,Schindler C,Hass-Kogan D,et al.Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression.Genes Dev,2000,14(4):391-396.

44. Blagosklonny MV. How avastin potentiates chemotherapeutic drugs: action and reaction in antiangiogenic therapy.Cancer Biol Ther,2005,4(12):1307-10.

45. Ibrahim NO, Hahn T, Franke C, Stiehl DP, Wirthner R, Wenger RH, Katschinski DM. Induction of the hypoxia-inducible factor system by low levels of heat shock protein 90 inhibitors.Cancer Res,2005,65(23):11094-11100.

46. Acker H. The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species.Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2005,360(1464):2201-2210.

47. Langhner E,Taghavi P,Chiles K,et al.HER2(neu)signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor lalpha(HIF-1alpha) synthesis:novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression.Mol Cell Biol,2001, 21(12): 3995-4004.

48. Zhang Q, Oh CK, Messadi DV, Duong HS, Kelly AP, Soo C, Wang L, Le AD. Hypoxia-induced HIF-1 alpha accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt.Exp Cell Res, 2006, 312(2):145-155.

49. Loboda A, Jazwa A, Wegiel B, Jozkowicz A, Dulak J. Heme oxygenase-1-dependent and -independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells.Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),2005,51(4):347-355.

50. Calvani M, Rapisarda A, Uranchimeg B, Shoemaker RH, Melillo G. Hypoxic induction of an HIF-1{alpha}-dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells.Blood,2006,107(7):2705-2712.

51. Schumacker PT. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).Crit Care Med,2005,33(12 Suppl): S423-425.

52. De Armond R, Wood S, Sun D, Hurley LH, Ebbinghaus SW .Evidence for the presence of a

guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter.Biochemistry,2005,44(49): 16341-16350.

53. Pore N, Jiang Z, Gupta A, Cerniglia G, Kao GD, Maity A. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms.Cancer Res,2006, 66(6): 3197-3204.

54. Ferrario A, Gomer CJ. Avastin Enhances Photodynamic Therapy Treatment of Kaposi's Sarcoma in a Mouse Tumor Model.J Environ Pathol Toxicol Oncol,2006;25(1-2):251-260.

55. Sodhi A，Montaner S，Patel V，et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpes viendothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor laapha.Canaer Res. 2000，60(17):4873-4880.

56. Gorlach A，Diebold I，Schini-Kerth VB，et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. Circ Res，2001，89(1)：47-54.

57. Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, Singh RK. Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor.J Interferon Cytokine Res. 2005,25(11):674-683.

58. HannkenT.Schroeder R.Zahner G.et al.Reactive oxygenspecies stimulated P44/ 42 mitogen-activated protein kinase and induce p27(kip 1):role in angiotensin Ⅱ2mediated hypertrophy of proximal tubular cells.[J]J Am Seo Nephrol, 2000, 11:1387-1397.

59. Kirito K, Kaushansky K.Thrombopoietin stimulates vascular endothelial cell growth factor (VEGF) production in hematopoietic stem cells.Cell Cycle. 2005, 4(12):1729-1731.

60. Brown LM, Cowen RL, Debray C, Eustace A, Erler JT, Sheppard FC, Parker CA, Stratford IJ, Williams KJ. Reversing hypoxic cell chemoresistance in vitro using genetic and small molecule approaches targeting hypoxia inducible factor-1.Mol Pharmacol,2006, 69(2): 411-418.

61. Hur E,Chang KY,Lee E,et al.Mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha.Mol Pharmacol,2001, 59(5): 1216-1224.

62. Kasper LH, Boussouar F, Boyd K, Xu W, Biesen M, Rehg J, Baudino TA, Cleveland JL, Brindle PK. Two transactivation mechanisms cooperate for the bulk of HIF-1-responsive gene expression.EMBO J,2005, 24(22):3846-3858.

63. Natarajan R, Jones DG, Fisher BJ, Wallace TJ, Ghosh S, Fowler AA 3rd. Hypoxia inducible factor-1: regulation by nitric oxide in posthypoxic microvascular endothelium.Biochem Cell Biol,2005,83(5):597-607.

64. Volmat V,Camps M,Arkinstall S,et al.The nucleus,a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases.J Cell Sci,2001,114(Pt 19):3433-3443.

65. Fechner G, Dederichs F, Schmidt D, Muller S, Vaupel P, Albers P. Hyperoxia-induced improvement of the in vitro response to gemcitabine in transitional cell carcinoma. Anticancer Res,2005,25(5):3413-3418.

66. Siddiq A, Ayoub IA, Chavez JC, Aminova L, Shah S, LaManna JC, Patton SM, Connor JR, Cherny RA, Volitakis I, Bush AI, Langsetmo I, Seeley T, Gunzler V, Ratan RR. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system.J Biol Chem,2005, 280(50):41732-41743.

67. Willam C, Warnecke C, Schefold JC, Kugler J, Koehne P, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU. Inconsistent effects of acidosis on HIF-alpha protein and its target genes.Pflugers Arch. 2006,451(4):534-543.

68. Schaffer L, Vogel J, Breymann C, Gassmann M, Marti HH. Preserved placental oxygenation and development during severe systemic hypoxia.Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006,290(3):R844-851.

69. Kaelin Jr WG. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome Nat Rev Cancer, 2002,2:673–682.

70. Friedrich CA. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. Hum Mol Genet,2001,10:763–777.

71. Hughson MD, He Z, Liu S, Coleman J, Shingleton WB. Expression of HIF-1 and ubiquitin in conventional renal cell carcinoma: relationship to mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. Cancer Genet Cytogenet,2003,143:145–153.

72. Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Markovic N, Conrad KP. Expression of von Hippel

Lindau (pVHL) Protein in Placentae from Normal Pregnant Women and Women with Preeclampsia.Placenta.2006,27(4-5):411-421.

73. Berra E, Roux D, Richard DE, Pouyssegur J, Maynard MA, Ohh M. Molecular targets from VHL studies into the oxygen-sensing pathway.Curr Cancer Drug Targets.2005, 5(5): 345-356.

74. Ng I, Tan WL, Ng PY, Lim J. Hypoxia inducible factor-1alpha and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in cerebral arteriovenous malformations.J Clin Neurosci.2005,12(7):794-799.

75. Belozerov VE, Van Meir EG. Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy. Anticancer Drugs.2005,16(9):901-909.

76. Kaelin WG Jr The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. Biochem Biophys Res Commun.2005,338(1):627-638.

77. Li Z,Wang D, Na X, Schoen SR, Messing EM, Wu G. The VHL protein recruits a novel KRAB-A domain protein to repress HIF- 1alpha transcriptional activity. EMBO J ,2003, 22:1857-1867.

78. Okada K, Osaki M, Araki K, Ishiguro K, Ito H, Ohgi S. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha), VEGF-C and VEGF-D in non-invasive and invasive breast ductal carcinomas.Anticancer Res,2005,25(4):3003-3009.

79. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator.Exp Physiol. 2005, 90(6):791-797.

80. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer.Semin Cell Dev Biol,2005,16(4-5): 523-530.

81. Carrozza MJ, Utley RT,Workman JL, Cote J. The diverse functions of histone acetyl transferase complexes. Trends Genet 2003,19:321–329.

82. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. Cell, 2002,111:709–720.

83. Dann CE 3rd, Bruick RK. Dioxygenases as O2-dependent regulators of the hypoxic response pathway.Biochem Biophys Res Commun.2005 ,338(1): 639-647.

84. Rohrbach S, Simm A, Pregla R, Franke C, Katschinski DM. Age-dependent increase of prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) 3 expression in human and mouse heart. Biogerontology.

2005;6(3):165-171.

85. Callapina M, Zhou J, Schmid T, Kohl R, Brune B. NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species.Free Radic Biol Med,2005,39(7):925-936.

86. Lee KH, Choi E, Chun YS, Kim MS, Park JW. Differential responses of two degradation domains of HIF-1alpha to hypoxia and iron deficiency.Biochimie,2006,88(2):163-169.

87. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. EMBO J,2003,22:4082-4090.

88. Detwiller KY, Fernando NT, Segal NH, Ryeom SW, D'Amore PA, Yoon SS. Analysis of hypoxia-related gene expression in sarcomas and effect of hypoxia on RNA interference of vascular endothelial cell growth factor A.Cancer Res,2005,65(13):5881-5889.

89. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing, J Cell Sci ,2003,116:1319–1326.

90. Lefer DJ. Induction of HIF-1alpha and iNOS with siRNA: a novel mechanism for myocardial protection.Circ Res. 2006,98(1):10-11.

91. Dawn B, Bolli R. HO-1 induction by HIF-1: a new mechanism for delayed cardioprotection? Am J Physiol Heart Circ Physiol,2005,89(2):H522-524.

92. Sollid J, Rissanen E, Tranberg HK, Thorstensen T, Vuori KA, Nikinmaa M, Nilsson GE. HIF-1alpha and iNOS levels in crucian carp gills during hypoxia-induced transformation.J Comp Physiol,2005,1-11

93. Mansoor JK, Morrissey BM, Walby WF, Yoneda KY, Juarez M, Kajekar R, Severinghaus JW, Eldridge MW, Schelegle ES. L-arginine supplementation enhances exhaled NO, breath condensate VEGF, and headache at 4,342 m.High Alt Med Biol,2005,6(4):289-300.

94. Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, Osaki T. Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells.Cancer Sci, 2005,96(7):394-402.

95. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA,Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptionalactivity of hypoxia-inducible factor.

Genes Dev.2002.16:1466–1471.

96. Linke S. Stojkoski C. Kewley RJ. BookerGW. Whitelaw ML. Peet DJ. Substrate requirements of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylasefactor inhibiting HIF. J Biol Chem. 2004. 15: 460-467

97. Safran M. Kaelin Jr WG. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. J Clin Invest.2003.111:779–783.

98. Newcomb EW. Ali MA. Schnee T. Lan L. Lukyanov Y. Fowkes M. Miller DC. Zagzag D. Flavopiridol downregulates hypoxia-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human glioma cells by a proteasome-independent pathway: implications for in vivo therapy.Neuro-oncol.2005.7(3):225-235.

99. Kaelin WG Jr. ROS: really involved in oxygen sensing.Cell Metab.2005. 1(6):357-8.

100. Li X. Kimura H. Hirota K. Kasuno K. Torii K. Okada T. Kurooka H. Yokota Y. Yoshida H. Synergistic effect of hypoxia and TNF-alpha on production of PAI-1 in human proximal renal tubular cells.Kidney Int.2005 .68(2):569-83.

101. Theodoropoulos GE. Lazaris AC. Theodoropoulos VE. Papatheodosiou K. Gazouli M. Bramis J. Patsouris E. Panoussopoulos D. Hypoxia. angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer.Int J Colorectal Dis.2006.21(3):248-257.

102. Takabuchi S. Hirota K. Oda S. Nishi K. Oda T. Shingu K. Adachi T. Fukuda K. Opioid receptor stimulation does not affect cellular hypoxia-induced gene responses mediated by hypoxia-inducible factor 1 in cultured cell lines.J Anesth.2005.19(3):263-265.

103. Carrero P. Okamoto K. Coumailleau P. O'Brien S. Tanaka H. PoellingerL. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivatorsCREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor1alpha. Mol Cell Biol.2000: 20:402–415.

104. Yasinska IM. Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alphaprotein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptionalactivity. FEBS Lett.2003.549: 105-109.

105. Dial R. Sun ZY. Freedman SJ. Three conformational states of the p300CH1 domain define its functional properties. Biochemistry.2003.42:9937-9945.

106. Freedman SJ. Sun ZY. Kung AL. France DS. Wagner G. Eck EckMJ. Structural basis for

negative regulation of hypoxia-induciblefactor-1alpha by CITED2. Nat Struct Biol 2003,10:504-512.

107. Bhattacharya S, Ratcliffe PJ. Excited about HIF. Nat Struct Biol , 2003,10: 501–503.

108. Kimba Y. Abe T, Wu JL, Inoue R, Fukiki M, Kohno K, Kobayashi H. Mutant IkappaBalpha suppresses hypoxia-induced VEGF expression through downregulation of HIF-1alpha and COX-2 in human glioma cells.Oncol Res,2005,15(3):139-149.

109. Trisciuoglio D, Iervolino A, Zupi G, Del Bufalo D。 Involvement of PI3K and MAPK signaling in bcl-2-induced vascular endothelial growth factor expression in melanoma cells.Mol Biol Cell,2005,16(9):4153-4162.

110. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. J Biol Chem, 2003,278: 14013-14019.

111. Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes.Histol Histopathol,2005,20(4):1327-1338.

112. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes.Mol Endocrinol,2005, 19(12):2955-2963.

113. Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R, Yu H. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways.Oncogene,2005, 24(36):5552-5560.

114. Yu EZ, Li YY, Liu XH, et al. Antiapop totic action of hypoxia-inducible factor-1 alpha in human endothelial cells. Lab Invest,2004, 84 (5) : 553-561.

115. Piret JP, MottetD, RaesM, et al. CoCl2 , a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apop totic cell death in hepatoma cell line HepG2 [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 973: 443-447.

116. Chung J. Yoon S. Datta K. Bachelder RE. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor transcription and protection from apoptosis are dependent on alpha6beta1 integrin in breast carcinoma cells. Mercurio AM.Journal Article Cancer Research,2004; 64: 4711-4716

117. Calviello G. Di Nicuolo F. Gragnoli S. Piccioni E. Serini S. Maggiano N. Tringali G. Navarra P. Ranelletti FO. Palozza P.n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. Journal Article Carcinogenesis ,2004,25:2303-2310

118. Zaman K. Ryu H. HallD. et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1 /CREB and increased exp ression of glycolytic enzymes, p21(waf1 / cip1) , and erythropoietin. J N eurosci, 1999, 19 (22) :9821-9830.

119. Sasabe E. Tatemoto Y. Li D. Yamamoto T. Osaki T.Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells.Journal Article Cancer Science,2005, 96:394-402.

120. Akakura N. KobayashiM, Horiuchi I, et al. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation.Cancer Res, 2001, 61 (17) : 6548-6554.

121. Unruh A. Ressel A. Mohamed HG. et al. The hypoxia-inducible Factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. Oncogene,2003, 22 (21) : 3213-3220.

122. Erler JT. Cawthorne CJ. Williams KJ, et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. Mol Cell Biol, 2004, 24 (7) : 2875-2889.

123. Wolf G.Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth, differentiation, and apoptosis.[J]Antioxidants & Redox Signaling,2005,7:1337-1345

124. Kimura S. Kitadai Y. Kuwai T. Tanaka S. Hihara J. Yoshida K. Toge T. Chayama K. Expression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinoma: relation to hypoxia-inducible factor-1alpha, angiogenesis and apoptosis. Journal Article Pathobiology,2005,72:179-185

125. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of H IF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. Nature, 1998, 394 (6692) : 485-490.

126. Moritz W, Meier F, Stroka DM, et al. Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with H IF-1alpha expression. FASEB J, 2002, 16 (7) : 745-747.

127. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97 (16) : 9082-9087.

128. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis.Greijer AE. van der Wall E. Journal of Clinical Pathology, 2004,57:1009-1014

129. Kothari S. Cizeau J, McMillan-Ward E, et al. BN IP3 p lays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. Oncogene, 2003, 22 (30) : 4734-4744.

130. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, et al. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BN IP3 and N IX in human tumors. Cancer Res, 2001, 61 (18) : 6669-6673.

131. Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, et al. BH3 -only protein noxa is amediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 { alpha}. J Exp Med, 2004, 199 (1) : 113-124.

132. Sohda M. Ishikawa H. Masuda N. Kato H. Miyazaki T. Nakajima M. Fukuchi M. Manda R. Fukai Y. Sakurai H. Kuwano H.Pretreatment evaluation of combined HIF-1alpha, p53 and p21 expression is a useful and sensitive indicator of response to radiation and chemotherapy in esophageal cancer. International Journal of Cancer ,2004,110:838-844

133. LeeMJ, Kim JY, Suk K, et al. Identification of the hypoxia-inducible factor 1 alpha2 responsive HGTD-P gene as a mediator in the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24 (9) :3918-3127.

134. Li J. Zhang X. Sejas DP. Bagby GC. Pang Q.Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. Journal of Biological Chemistry ,2004;279: 41275-41279

135. Nishiyama J, Yi X, Venkatachalam MA, et al. cDNA cloning and promoter analysis of rat caspase-9 [J]. B iochem J, 2001, 360: 49-56.

136. .Sanchez-Puig N. Veprintsev DB. Fersht AR.Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53Journal Article MolecularCell .2005.17:11-21

137. Suzuki H. Tomida A. Tsuruo T. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Oncogene. 2001. 20 (41) : 5779-5788.

138. Chen D. LiM. Luo J. et al. Direct interactions between H IF-1 and Mdm-modulate p53 function. J Biol Chem. 2003. 278 (16) :13595-13598.

139. Sohda M. Ishikawa H. Masuda N. Kato H. Miyazaki T. Nakajima M. Fukuchi M. Manda R. Fukai Y. Sakurai H. Kuwano H.Pretreatment evaluation of combined HIF-1alpha. p53 and p21 expression is a useful and sensitive indicator of response to radiation and chemotherapy in esophageal cancer. International Journal of Cancer.2004.110:838-844

140. AchisonM. Hupp TR. Hypoxia attenuates the p53 response to cellular damage. Oncogene. 2003. 22 (22) : 3431-3440.

141. Pan Y. Op rysko PR. Asham AM. et al. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment .Oncogene. 2004. 23 (29):4975-4983.

142. Iida T. Mine S. Fujimoto H. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells. Genes Cells. 2002.7 (2) : 143-149.

143. Brune B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? Cell Death Differ. 2003. 10 (8) : 864-869.

144. Shoshani T. Faerman A. Mett I. et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene. RTP801. involved in apoptosis. Mol Cell Biol. 2002. 22 (7) : 2283-2293.

145. Wolf G. Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth. differentiation. and apoptosis.Antioxid Redox Signal. 2005. 7(9-10): 1337-1345.

146. Kimura S. Kitadai Y. Kuwai T. Tanaka S. Hihara J. Yoshida K. Toge T. Chayama K. Expression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinoma: relation to hypoxia-inducible factor-1alpha. angiogenesis and apoptosis. Pathobiology. 2005.72(4): 179-185.

147. Minet E.Michel G.Mottet D.et al.Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation.[J]Free Radical Biology &Medicine.2001. 31(7):

847-855.

148. Jiang H, Feng Y. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) correlated with tumor growth and apoptosis in ovarian cancer.Int J Gynecol Cancer,2006,16 Suppl 1:405-412.

149. Redell MS, Tweardy DJ. Targeting transcription factors for cancer therapy.Curr Pharm Des, 2005, 11(22):2873-2887.

攻读博士学位期间发表的文章

1. 肖睿，宋跃明等. 预存自体输血在脊柱侧弯术中的应用. 华西医学，2003，18（4）：477-478.

2. 肖睿，宋跃明等. 血液回输技术在脊柱侧弯术中的应用. 生物医学工程学杂志，2004，21(5):809-811.

3. 肖睿,宋跃明,杨天府等.可吸收螺钉的初步临床观察.生物医学工程学杂志,,2005,22(5):1055-1057.

4. 肖睿，屠重琪，黄富国等.肱骨近端肿瘤保肢治疗的术后系统康复. 中国临床康复,9(26):34-36.

致　　谢

首先感谢我的恩师宋跃明教授。在临床、科研和生活中给予的关心、指导和培养，我的每一点滴进步都凝结着导师的心血。该课题的顺利完成，与宋老师的精心指导和无私帮助密不可分。导师高尚的人格、严谨的治学态度、精益求精的工作作风、分析处理问题的远见卓识、无私奉献的精神，在未来的岁月里，都将是我一生学习的楷模。师恩难忘！

感谢骨科的所有老师在三年的求学生涯中给予的关心、指导和帮助！

感谢指导小组屠重琪副教授，李涛讲师，及骨科全体老师在我临床实践和课题实施中的指导与帮助。

感谢眼科实验室陈晓英老师、阎乃红、张发祥、夏庆杰老师在实验中给予的大力支持与帮助。

感谢生物化学实验室彭老师、楚老师在实验中给予的大力支持与帮助。

感谢移植免疫教研室李胜富老师、消化实验室王玲老师在实验中给予的大力支持与帮助。

感谢康复科何成奇教授、金卡医院罗凤鸣博士、成都中医药大学饶朝龙博士后在实验中给予的大力支持与帮助。

感谢四川省宜宾市第一人民医院林琦远博士、孙广运博士、唐强主任在三年的学习、生活、工作中给予的关心和支持！

感谢家人在三年的学习、生活中给予的关心和支持！

三年的学习和工作中，各位师兄弟给予了很大的帮助，大家在一起互相交流、学习，互相帮助，使我受益非浅，在此表示衷心的感谢！

最后，向所有指导、关心、支持和帮助过我的老师、同学、朋友，致以深深的谢意。