

低氧對於活體動物中腫瘤生長之影響

**Effects of Hypoxia on Tumor Growth :**  
*in vivo* studies

研究生：趙珮珊

Pei-Shan Chao

指導教授：林滿玉 博士

Anya Mann-Yuh Lin, Ph.D



國立陽明大學

醫學院

生理學研究所

碩士論文

National Yang-Ming University

School of Medicine

Institute of Physiology

Master Thesis

中華民國九十四年八月

August 2005

## 目 錄

壹 . 中文摘要 .....	1
貳 . 英文摘要 Abstract .....	3
參 . 緒論 .....	15
肆 . 實驗目的 .....	16
伍 . 實驗材料 .....	17
陸 . 實驗方法 .....	20
柒 . 實驗結果 .....	31
捌 . 討論 .....	40
玖 . 總結 .....	49
壹拾 . 附錄 .....	50
壹拾壹 . 圖表 .....	53
壹拾貳 . 參考文獻 .....	75

## 誌 謝

兩年碩士生涯，隨著論文的完成，也即將劃上句點。

能夠有今日的收穫，最感謝的是我的指導教授林滿玉老師，對於我無論學業上，抑或做人處事上的細心指導，讓我有更深的體認，並順利完成碩士論文。其次，特別感謝台大醫院腫瘤部楊志新醫師，給予實驗過程的指導與建議，讓實驗得以順利進行。除此之外，更要感謝戚謹文老師及蘇瑪老師，在口試時提供的寶貴意見，使本論文得以臻於完善。

謝謝兩年中陪伴我的實驗室伙伴：玟翰學長，沒有你我可能無法順利畢業；珮玲、素芬、怡芬學姊，實驗室都讓妳們打理的好好的；莉萍、桂芬、函芸，沒有妳們的協助與陪伴，實驗將是黑白的；還有後來加入的兩位壯丁，宥樺和志鋒，感謝大家給我加油打氣，並且帶給我無限的溫馨與歡樂，我永遠不會忘記。還有少琦，讓歡樂加倍，憂傷不再，真高興有你的陪伴；晚上陪我寫論文的 Juby，以及所有幫助過我的人，謝謝你們。

最後，僅將本論文獻給我的家人，謝謝辛苦養育我的父母、帥氣又調皮的老弟、可愛的娃仔，有你們的支持與鼓勵讓我繼續邁進人生的旅途。

珮珊

Aug. 2005

## 摘要

在體外實驗中，腫瘤內部的低氧被報導可以藉由血管新生的作用，而促進腫瘤的生長及轉移。本實驗中，關於低氧對於腫瘤生長的效應，利用 *in vivo* 的方法加以分析。本實驗利用 BALB/c 的公鼠，皮下轉植 CT26 細胞株後，隨機分成三組做不同的處理：第一組置於正常環境中作為對照組 (normoxia, N)；第二組處理正常大氣壓下間歇性低氧 (normobaric hypoxia, NH) (760 mmHg, PO<sub>2</sub>=76 mmHg, 每天 10 小時)；第三組處理低大氣壓下長時間間歇性低氧 (hypobaric hypoxia, HH) (大氣壓降為 380 mmHg、PO<sub>2</sub>=76 mmHg, 每星期處理 144 小時)，持續 21 天。經過低氧處理後，小鼠體內的血比容有顯著增加的趨勢，其比例為：HH>>NH>>N。在小鼠的體重方面，N 組與 NH 組間並沒有顯著性的差異，但是 HH 組相較於 N 組，卻有顯著性的下降。另外，NH 組的腫瘤大小相較於 N 組，有些微偏大，但並無顯著差異；然而，HH 組相較於 N 組卻有較小的現象。低氧處理之小鼠，轉植腫瘤後第 14 天，NH 組與 HH 組的腫瘤中，HIF-1 $\alpha$  的表現與活性皆有增高的情形。此外，低氧 (NH 與 HH) 也同樣造成兩組 VEGF mRNA 與蛋白質的增加，然而在小鼠血清中卻沒有這樣的現象。由免疫染色的方法可以發現，在轉植腫瘤第 21 天後，低氧造成 NH 組與 HH 組腫瘤內部大量 CD31 陽性細胞反應，即有內皮細胞的存在，顯示低氧會造成血管新生的現象。除上述之外，本實驗也發現，利用 EMSA 的方法，NH 與 HH 的腫瘤中 NF $\kappa$ B 的活性被大大的提升。再者，低氧處理 (NH 與 HH) 亦增加腫瘤中 COX II 蛋白質、mdr1 mRNA 與 thymidylate synthase mRNA 的表現量；然而，低氧處理 (NH 與 HH) 對於小鼠體內血清中 IL-6 的含量卻有全然不同的影響：血清中 IL-6 的含量，NH 組高於 N 組，HH 組卻低於 N 組。三組間在 Hsp70 與 Hsp 60 的表現並無差異。

在動物實驗中可以發現，HH 的處理會使腫瘤的生長減緩；而其中的原因可能是低壓低氧 (HH) 的環境所造成的。另一方面，由動物實驗的結果顯示，NH

組的腫瘤細胞，因為低氧處理而產生了低氧的反應，其中包含有腫瘤體積少量增加、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 及血管新生的現象增加；這暗示著 NH 處理可造就一個研究低氧與腫瘤關係的動物模式。此外，由 NF $\kappa$ B 活性增高、COX II 及 IL-6 增加的現象可知，三者可能參與由 NH 所影響的動物腫瘤血管新生，以及腫瘤生長之中。因此，由 NH 對腫瘤所產生的低氧效應，將較為符合病理上的現象。



## A b s t r a c t

Tumor hypoxia has been reported to promote tumor growth and metastasis via angiogenesis *in vitro*. In the present study, the effect of hypoxia on tumor growth was studied *in vivo*. Adult BALB/c male mice were used and murine CT26 colon adenocarcinoma cells were implanted subcutaneously. After implantation, mice were divided into three groups: normoxia (N), normobaric hypoxia (NH, 760 mmHg, PO<sub>2</sub>=76 mmHg, 10 hrs/day), and hypobaric hypoxia (HH, 380 mmHg, PO<sub>2</sub>=76 mmHg, 144 hrs/week) for 21 days. After hypoxic treatment, the order of increase of hematocrit was as follow: HH >> NH >> N. No difference in averaged body weight was observed between N mice and NH mice. However, the averaged body weight of HH mice was significantly lower than that of normoxic mice. The averaged tumor volume of NH mice was slightly but insignificantly larger than that of N mice. Nevertheless, the averaged tumor volume of HH mice was smaller than normoxic mice. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  was elevated in the tumors of hypoxic mice (NH and HH) at 14 days after implantation. Furthermore, hypoxic treatments (NH and HH) elevated VEGF mRNA and protein expression in tumors but showed no changes in serum VEGF level. A strong immunoreactivity of CD-31, an indicator of endothelial cells, was found in the tumor of hypoxic mice (NH and HH) at day 21, indicating a hypoxia-induced augmentation of angiogenesis. Moreover, NF $\kappa$ B binding activity was significantly increased in the tumor of hypoxic mice (NH and HH). In addition, hypoxic treatments (NH and HH) increased the COX II protein expression, *mdr1* mRNA, thymidylate synthase mRNA in tumors. However, hypoxic treatments differentially altered serum IL-6 level. IL-6 in NH group was higher than that of N group, while IL-6 in HH group was lower than that of N group. There was no difference in Hsp70 and Hsp60 levels in tumors from these three

groups.

Our *in vivo* data demonstrated that HH reduced tumors of hypoxic characteristics. One of the possibilities may be due to the deteriorated environment under HH. On the other hand, our *in vivo* study show that tumors in mice subjected to NH express tumor hypoxic characteristics, including a small increase in tumor size, elevation in HIF-1 $\alpha$ , VEGF and angiogenesis, indicating establishment of hypoxic condition of tumor cells *in vivo*. Furthermore, NF  $\kappa$  B activation and IL-6, COXII may be involved in normobaric hypoxia-induced angiogenesis and tumor growth *in vivo*. Therefore, the effect of NH on tumor growth is more pathophysiologically relevant.



## 緒 論

### 一、低氧的定義

當組織和細胞得不到充足的氧，或不能充分利用氧時，組織和細胞的代謝、功能，甚至形態結構都可能發生異常變化，這一病理過程稱為低氧（hypoxia）。

低氧在臨床上極為常見，是多種疾病引起死亡的最重要的直接因素。正常生物體內氧的貯備是有限的（約 1.5 L），而成年人體需氧量約為每分鐘 250 ml，一旦呼吸、心跳停止，數分鐘內就可能死於缺氧。氧的獲得和利用是個複雜過程，包括外呼吸、氣體運輸和內呼吸，是由許多系統（如呼吸、循環、血液等）共同協調完成的。其中任何一個環節發生障礙均會引起低氧。

常用的血氧指標有：

1. 血氧分壓（ $PO_2$ ）：指以物理狀態溶解於血液的氧（約 0.3 ml%）所產生的張力。正常人動脈血氧分壓（ $Pa O_2$ ）約為 13.3 kPa（100 mmHg），靜脈血氧分壓（ $Pv O_2$ ）約為 5.33 kPa（40 mmHg）。
2. 血氧容量（ $C O_2 \max$ ）：為 100 ml 血液中血紅蛋白為氧充分飽和時的最大帶氧量，它取決於血紅蛋白的質和量。正常約為 20 ml%。
3. 血氧含量（ $C O_2$ ）：為 100 ml 血液中實際的帶氧量，即血紅蛋白結合的氧量。取決於氧分壓和氧容量。正常人動脈血氧含量（ $Ca O_2$ ）約為 19 ml%，靜脈血氧含量（ $Cv O_2$ ）約為 14 ml%。
4. 血氧飽和度（ $S O_2$ ）：為血氧含量與血氧容量之百分比值。正常人動脈血氧飽和度（ $Sa O_2$ ）約為 95%，靜脈血氧飽和度（ $Sv O_2$ ）約為 70%。
5. 氧離曲線：血氧分壓與血氧飽和度之間的關係可用氧離曲線表示，大致呈 S 形。紅血球中 2, 3-二磷酸甘油酸（2,3-diphosphoglycerate）升高、



酸中毒、二氧化碳增多及血溫增高時，血紅蛋白與 O<sub>2</sub> 的親和力降低，以致在相同氧分壓下血氧飽和度降低，氧離曲線右移，反之則左移。

由於身體各部位所需氧氣消耗量不一，因此低氧情況亦不相同 (Stickney and Van Liere, 1953)。

## 二、腫瘤與低氧

在 1971 年時，Dr. Folkman 便提出了惡性腫瘤與新血管增生有關的假說 (Folkman, 1971)，他指出腫瘤的生長是緊鄰著微血管的，由於腫瘤細胞為一種不停增殖的細胞，所以當腫瘤生長速度過快，超過 100~200 μm 氧氣擴散範圍之後，腫瘤細胞便無法獲得外部血管所提供的養分及氧氣，因此就會產生低氧的環境 (Carmeliet and Jain, 2000)。

低氧的環境在絕大多數固狀腫瘤 (solid tumor) 中皆可發現，且扮演著相當重要的角色，因為低氧環境可以造成血管新生，提供腫瘤組織更多的養分外，亦可以提供腫瘤細胞轉移的途徑。

### (一) 低氧環境與腫瘤轉移

自低氧偵測探針 (Polarographic needle electrodes) 發明以後，證實了腫瘤內部確實存在了一個低氧的區域。1993年，Hockel等人發表的文章指出：具有低氧腫瘤 (median pO<sub>2</sub> < 10 mmHg) 的病人，其預後以及復發存活率，都較具有含氧高的腫瘤癌症病人來的低 (Hockel et al., 1993)。在這之後，陸續有研究發現，利用氧分壓偵測探針 (pO<sub>2</sub> needle electrode, KIMOC 6650, Sigman-pO<sub>2</sub>-histograph, Eppendorf, Hamburg, Germany) 測量不同腫瘤的樣本，腫瘤的發展以及復發率，確實與腫瘤的低氧有相關性 (Hockel et al., 1993)。除此之外，Brizel 發現，具有低氧腫瘤的病人，有較高的肺部轉移率，並且存活率又較含氧高的腫瘤癌症病人低 (Brizel et al., 1996)。臨床上的相關統計資料陸續增加的同時，近年來的研究發現，由於腫瘤內部的低氧現象，引發一連串的轉錄因子活化，例如：CREB (cyclic-AMP-response element

binding protein), AP-1 (activator protein-1), NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) 及 Egr-1 (early growth response-1), 而導致與腫瘤轉移相關的蛋白質表現增加, 或者增進了血管新生, 使腫瘤的轉移、侵入性能力增強 (Le et al., 2004)。

## (二) 低氧環境與抗藥性

罹患癌症的病人, 在經過手術切除或放射治療之後, 多半會受到化學、免疫等方法的治療; 但是為什麼有些病人能夠透過這樣的治療而痊癒, 有些卻不行? 這可能是由於腫瘤細胞相較於宿主細胞的基因發生變異, 和腫瘤附近的複雜環境所造成的抗藥機制而導致的。

抗藥性的機制主要可以略分為兩大類: 第一類是由於抗癌藥物傳遞到腫瘤細胞的能力被減弱, 第二類則是因為腫瘤細胞內部的基因發生改變, 而影響了細胞對藥物的敏感度 (Gottesman et al., 2002)。

第一類機制的成因, 有可能是藥物的吸收不好, 或是給予的方式不對, 而使得藥物的代謝和排出變快, 造成血液中藥物的濃度下降導致。有些研究將單層對藥物有敏感性的腫瘤細胞種到動物身上時, 長出來的腫瘤卻演變成對藥物有抗性的腫瘤, 可見腫瘤週邊的環境因子也同樣在抗藥機制中扮演相當重要的角色; 類似的實驗也在腫瘤細胞培養至三層時發現。第二類機制的成因目前也被廣泛的研究中, 在培養中的細胞可只對一種藥物具有抗藥性, 也可能對某一類相似的藥物具有相同機制造成的抗藥性, 而且, 在經過篩選這些抗藥性細胞後, 細胞也會漸漸呈現對於不同機制和結構的藥物發生交叉反應, 也就是我們所謂的 multidrug resistance, 這也就可以解釋為什麼有些人對這樣的治療沒有效果的原因。

第二類細胞內的抗藥機制, 依目前研究可區分為四種:

1. ATP-dependent efflux pumps: 對自然的親水性藥物普遍性的具有抗藥性。這類的 pumps 是屬於 ATP-binding cassette (ABC) transporters 家族, 目前人類已知有 48 個基因會表現這類的蛋白, 也依照序列的相似性被區分為七種亞族

(ABCA-ABCG)，其抗性來自於將細胞中的藥物排出，而減低胞內藥物的濃度所致。其針對的藥物有 vinca alkaloids、anthracyclines、actinomycin-D (抑制 RNA transcription)和 paclitaxel。研究指出，在許多抗藥性細胞株中皆可明顯發現 ATP-binding cassette (ABC) transporters 基因的表現，進而增加細胞膜上蛋白質如 P-glycoprotein、MRP (multidrug resistance associated protein)、BCRP (breast cancer related protein) 等表現量上升，藉此可以將藥物利用主動運輸方式送到細胞外，而減少藥物的作用 (Gottesman et al., 2002)。

2. 減低藥物進入細胞的量：水溶性的藥物可被 transporters 或 carriers 攜入，藉此可調控藥物的進入量。這類藥物有 antifolate methotrexate, nucleotide analogues (如 5-fluorouracil, 8-azaguanine) 和 cisplatin。
3. 活化抗毒性的修護系統：這些情況例如 DNA repair，產生 cytochrome P450。過去研究也指出，P-glycoprotein (PGP) 產生也和 cytochrome P450 3A 有關係。這類機制可以在處理過任何的藥物之後被誘發，目前也有證據指出，某些 orphan nuclear receptors (如 SXR) 參與在這項廣泛的反應之中。另外，大部分的抗癌藥物主要是藉由造成 DNA 損壞，來達成殺死腫瘤細胞的目的。而在許多具抗藥性的細胞中可以明顯發現造成細胞週期改變，增加 DNA 修補能力而減少癌細胞凋亡的情形產生 (Semenza, 2003)。
4. 破壞引發細胞程序性自然凋亡的訊息傳遞路徑：例如破壞 p53 或 ceramide，可活化 checkpoints 使細胞免於程序性死亡。此外，具抗藥性細胞株可藉由調控與細胞凋亡蛋白質，如 Bcl-2、Bax 等而降低細胞凋亡情形 (Erler et al., 2004)。

產生上述機制的原則是由於癌症細胞多數是 heterogeneous，並且不斷的經藥物篩選而具有抗性而大量生長。而近來許多文獻指出，具有較多缺氧區域的腫瘤，通常治癒率較低 (Hockel et al., 1993)，顯示腫瘤內部缺氧情況可能跟抗藥性有關聯 (Appendix 1)。之後許多研究亦證實腫瘤內部缺氧可能是導致抗藥性生成的主要原因之一 (Teicher, 1994; Shannon et al., 2003)。其中

可能機制包括：缺氧可以造成多重抗藥性蛋白質 (MRP) 表現量增加 (Comerford and Jane, 2002)、細胞為了獲得養分，轉行糖解作用 (glycolysis) 因而造成血液酸化 (acidosis)，進一步影響藥物作用 (Herman et al., 1988、1989) 以及調控細胞中與細胞凋亡有關蛋白質表現，如增加 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 表現或減少 Bax、Bid 的表現而造成抗藥性產生 (Erler et al., 2004) 等原因。

### 三、低氧誘導因子 (Hypoxia inducible factor, HIF)

低氧情況底下，最主要可以促進轉錄因子：缺氧誘導因子 (hypoxia-inducible factor-1; HIF-1) 的活化。HIF-1 是由兩個不同單元體 HIF-1 $\alpha$  及 HIF-1 $\beta$  所構成的蛋白複合體 (heterodimeric protein complex)。其中 HIF-1 $\alpha$  為 inducible form，HIF-1 $\beta$  則持續 (constitutive) 表現於細胞核中，屬於 bHLH-PAS 蛋白群中的 ARNT。正常情況，亦即氧分壓正常的環境底下，細胞中的 prolylhydroxylase 酵素可以感受氧分子的多寡，而將轉譯完成的 HIF-1 $\alpha$  蛋白質進行修飾，使其最後經蛋白質降解途徑 (Ubiquitin-proteasome degradation pathway) 而被水解掉 (Semenza, 2000) (Appendix 2)。但是當氧分壓不足，細胞處於缺氧環境時，prolylhydroxylase 無法作用，此時 HIF-1 $\alpha$  結構穩定性明顯提升，蛋白質停止降解轉而進入細胞核中，與 HIF-1 $\beta$  (ARNT) 結合，作用於 promoter 上的 hypoxia response element (HREs)，促進下游基因的表現量增加 (Semenza, 2003)。

目前已經知道 HIF-1 活化可以促進許多基因的表現，主要可分成三大類：(Carmeliet and Jane, 2000) (Appendix 2)

- (1) 參與 glycolysis 者：如 glucose transporter-1 (GLUT-1)、lactate dehydrogenase (LDH) 及 endolase- $\alpha$  等，而促使細胞轉行糖解作用 (glycolysis)。
- (2) 參與 survival/apoptosis 者：如 HIF-1 活化可以影響細胞中 Bax、Bid 表現量改變，進而調控細胞凋亡。

(3) 參與 angiogenesis 者：如 vascular endothelial growth factor (VEGF)、  
angiotension-2 (Ang-2) 及 PDGF-B 等，而促進血管新生產生。

#### 四、血管新生 (angiogenesis) 與血管內皮生長因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)

血管新生 (angiogenesis) 指的是從舊有血管長出新血管的過程，其中包括了內皮細胞的細胞間質分解、內皮細胞的移動與增生，以及最後形成血管的一連串過程 (Folkman and Shing, 1992)。此作用並非腫瘤生長所獨有的現象，其實血管新生對於正常個體的生長、胚胎發育、傷口癒合、組織修復或是女性的生理週期而言是非常重要的 (Folkman and Shing, 1992)。但事實上，在正常生理條件下，成年動物循環系統的內皮細胞是很少代謝的，只有在月經週期、傷口癒合或發炎時才会有血管新生的現象。

近幾年研究指出，血管新生在腫瘤生長過程中扮演相當重要的角色。主要是它可以造成新血管生成，因此提供了腫瘤轉移跟生長的良好環境。目前已知絕大部分固態腫瘤中都可以明顯發現VEGF基因大量表現，且以VEGF 121及VEGF 165最多，其中缺氧又已被認為是誘使VEGF大量表現的一個重要原因。VEGF的分子量大概是34-45kDa，以homodimer形式存在。最早是1983年時，Senger 等學者發現它可以增進腫瘤血管的通透性，因此將它命名為vascular permeability factor (VPF) (Senger et al., 1983)。接著在1989年時 Leung 等學者更進一步發現它可以專一性地刺激血管內皮細胞的細胞分裂，所以將它改名為vascular endothelial growth factor (Leung et al., 1989)。之後又陸續發現一些結構及功能相似的分子，也因此目前整個VEGF家族包括VEGF-A, B, C, D及placenta growth factor等。

1996年時，Ellis 及 Fidler 便發現若癌細胞附近的微血管密度越高，越有機會轉移至全身循環，且其預後也越差 (Ellis and Fidler, 1996)。1997年時，Paley 則發現在早期卵巢癌病人中，若VEGF含量增高，則其預後會較差 (Paley

et al., 1997)。Blouw 等人則利用動物實驗證實抑制VEGF表現可以抑制腫瘤的生長 (Blouw et al., 2003)。顯示VEGF確實在腫瘤的生長過程中扮演舉足輕重的角色。

## 五、Nuclear Factor-Kappa B (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B，轉錄活化因子的一種，最初是由 Sen 及 Baltimore 於 B 淋巴球中發現的一種轉錄因子 (Sen and Baltimore, 1986)，可以刺激免疫球蛋白的 light chain 基因表現，因此取名為 Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)。截至目前為止，NF- $\kappa$ B 的活化已被證實參與在許多不同的反應中，包括免疫反應、細胞分化及細胞凋亡等。

NF- $\kappa$ B 由三個不同的次單元 (subunit) 所組成，包含 p50 及 p65 兩個標準 (prototypical) 單元及抑制性 (inhibitory) 單元 I $\kappa$ B。平常時 NF- $\kappa$ B 存在細胞質中與 I $\kappa$ B 穩定結合在一起而抑制其活性，主要是由於 I $\kappa$ B 會遮蔽 NF- $\kappa$ B 序列中的 nuclear localization sequence (NLS)，因此 NF- $\kappa$ B 無法活化進入細胞核中 (Miyamoto and Verma, 1995)。但是當有外來刺激如氧化壓力 (ROS) 及細胞激素 (cytokine) 時，會造成 I $\kappa$ B kinase 活化，進一步磷酸化 I $\kappa$ B，使其脫離 NF- $\kappa$ B 並送到 proteasome 中水解掉。此時活化態 NF- $\kappa$ B 便可經核膜進入細胞核中與基因序列上的  $\kappa$ B 序列 (enhancer regions of  $\kappa$ B-responsive genes) 結合並啟動基因的表現。目前已知 NF- $\kappa$ B 的活化可以造成許多不同基因的表現，包含細胞素 (cytokines: IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ )、細胞凋亡相關蛋白質 (Bcl-2、Bcl-xl) 及細胞增生相關蛋白 (cyclin D1、c-myc) 等的表現 (Karin et al., 2002)。而目前許多研究亦證實，缺氧情況下可以藉由提高 I $\kappa$ B 磷酸化情形而造成 NF- $\kappa$ B 活化 (Koong et al., 1994)，而且當 transfection 一段 I $\kappa$ B mutant 時，可以反轉 (reverse) 缺氧情形下所誘導產生的抗藥性情形 (Brandes et al., 2001)。除此之外，daunorubicin 及 camptothecin (CPT-11) 所造成的細胞凋亡 (apoptosis) 現象亦可以藉由提高 NF- $\kappa$ B 的活性而被抑制住 (Wang et al.,

1996、1999)。因此，NF- $\kappa$ B 在抗藥性機轉上似乎扮演一重要的角色。

## 六、介白素-6 (Interleukin-6, IL-6)

細胞激素 (cytokine) 或介白素 (interleukin) 在各種不同的組織及細胞中扮演著調控細胞增生及分化的重要角色。而介白素 6 號 (interleukin-6, IL-6) 為一種多功能的細胞激素，最初是在促使活化後的 B 細胞分泌免疫球蛋白中發現的，因此又稱為 B-cell differentiation factor (BSF-2) (Hirano et al., 1985)。

IL-6 為分泌型醣蛋白，含有 185 個胺基酸，分子量約 22 kDa。目前已經發現許多與 IL-6 結構及功能上相關的蛋白質，包括：IL-11、leukemia inhibitory factor、oncostatin M、ciliary neurotrophic factor 及 cardiotrophin-1 等，由這些蛋白質共同組成介白素-6 家族 (Pennica et al., 1996; Taga et al., 1996)。

目前研究顯示，許多不同的細胞都具有分泌 IL-6 的能力，包含：CD8<sup>+</sup> T cell、纖維母細胞、巨核細胞、內皮細胞、中樞腦皮質神經元及結腸的上皮細胞等 (Kishimoto, 1989; Kishimoto et al., 1992)。而被 IL-6 所刺激的細胞會有許多不同的反應，如在造血系統中，可以促進骨髓瘤及漿細胞瘤增生、造血前趨細胞數量增加及巨核前趨細胞的增生分化等。在神經系統方面，IL-6 則可以刺激 PC12 細胞分化成神經元細胞 (Sato et al., 1988) 除此之外，IL-6 更可以刺激肝細胞產生 acute phase 蛋白質 (Gauldie et al., 1987)。目前越來越多文獻指出，IL-6 亦參與在多種癌症的發生過程中，主要是 IL-6 可以調控許多腫瘤細胞的生長，如腎細胞癌、子宮頸癌、前列腺癌、卵巢癌及大腸直腸癌、多發性骨髓瘤 (Kinoshita et al., 1999) 等。一些文獻則指出，IL-6 在多發性骨髓瘤、食道癌及腎細胞癌上可能扮演一種自泌 (autocrine) 及旁泌 (paracrine) 的作用 (Kawano et al., 1988; Miki et al., 1989; Oka et al., 1996)。顯示，IL-6 在腫瘤的發育生長過程中扮演非常重要的角色。

## 七、還氧化酶 (cyclooxygenase, COX)

環氧化酶 (COX) 的作用在於將花生四烯酸 (arachidonic acid) 轉換合成前列腺素 (prostaglandins, PGs)。環氧化酶主要有兩種 isoform，分別為 COX I 以及 COX II。COX I 是持續表達於大多數的組織細胞中，負責生產 PGs 以調控細胞正常生理功能，例如腎臟的血流速等 (Smith et al., 2000)。COX II 則是受到刺激才會開始製造，例如免疫反應時，在受感染的組織中，COX II 會促使 PGs 合成。

過去研究指出，在某些惡性腫瘤中也有發現 COX II 過渡表現的情形，例如大腸癌、胃癌、肝癌、乳癌、和肺癌等 (Dannenber, 2001)。然而，依照各類細胞的不同，COX II 的表現受到不同轉錄因子 (transcription factor) 的調控，例如：AP-1、NF-IL-6、NF $\kappa$ B、TFAT 等 (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003)。除此之外，在人類的大腸癌中發現，其 COX II 的過渡表現，除了因為轉錄增加，同時也包含了傳訊分子 (mRNA) 的分解減少 (Shao et al., 2000)。

在 in vitro 的實驗中證實，部分種類的癌細胞低氧處理後，會刺激 COX II 的產生，使 PGs 合成增加，並提高 VEGF 分泌，促進血管增生的作用 (Liu et al, 1999; Shao et al., 2000)，可見 COX II 在腫瘤發展上，佔有重要地位。

2004 年，利用人類前列腺癌細胞株以低氧處理，發現 COX II 有增高的情形，並且藉由 mdm2 調控調控由 p53 所引發的細胞自然性凋亡 (apoptosis) (Liu et al., 2005)。除此之外，近年來的研究指出，COX II 的過渡表現，會增加 MRP-1 (multidrug resistance protein-1 即 P-Glycoprotein, P-gp) 的產生以及功能 (Patel et al., 2002)；以上資料顯示，COX II 除了能做為一種腫瘤惡化的指標，同時也會增強腫瘤的抗藥性。

## 八、多重抗藥性蛋白質 (multidrug resistance protein, MRP)

腫瘤細胞發展的多重抗藥性蛋白 (MRP phenotype)，是評估投藥效率，以及癌症抗藥性的重要指標 (Kuwano et al., 1999)。

MDR 得名的原因是腫瘤細胞在抗腫瘤藥作用一段時間後，不僅對該藥物



會產生抗藥性，而且對其它許多結構差異極大的抗癌藥也會產生抗藥性 (Gottesman et al., 2002)。已經發現 MDR 主要與體內一大類稱作 ABC transporters 的蛋白有關，這是一類廣泛存在於原核和真核細胞中的 energy-dependant efflux pumps，其中對 P-gp (P-glycoprotein) 的研究最為深入。

P-gp 是由 *mdr1* 基因所產生的蛋白質，分子量約 170 KDa，存在於小腸上皮細胞、淋巴細胞等 (Appendix 3)。然而，若當 P-gp 有大量表現的情形，則被認為是具有多重抗藥性的細胞珠 (Chevillard et al, 1996)。目前已有多種抑制 P-gp 作用的小分子被發現，甚至研發成對抗 MDR 的有效藥物，如 Verapamil 等。也有一些小分子可以作為某種抗癌藥如 Taxol 與 P-gp 的競爭性結合劑，從而使 Taxol 不能與 P-gp 結合並被排出細胞外。細胞為何有 P-gp 過度表現的情形，目前仍在研究中。Wartenberg 等人的研究指出，在攝護腺癌多細胞球狀模形中，給予加熱處理，發現內部低氧的區域 ROS 上升，導致 HIF-1  $\alpha$  活化，引發下游訊息傳遞路徑而致 P-gp 表現上升 (Wartenberg et al., 2003, 2005)。除此之外，在 HeLa cell 中，低氧處理後引發 HIF-1 活化，使下游 JNK 活化，導致 P-gp 表現量上升 (Comerford et al., 2004)。更明確的證據指出，運用 phenolic 類的抗癌藥物，作用於預處理低氧的癌細胞上，發現死亡率有下降的情形，其中亦伴隨著 P-gp 表現增加 (Hyun et al., 2003)，顯示低氧或許可以藉由 MDR 表現增加，使抗藥性提高。

## 實 驗 目 的

統計資料顯示，癌症無論是在台灣抑或是世界上絕大多數的國家，都佔有極高的死亡率，也因此，科學家們竭盡心力發展出更多的治療方式，希望能有效治癒癌症；但是，由於癌細胞的種類與成因各有不同，並且在化療過程中出現抗藥性，因而增加了治療上的困難性。

近年來的研究指出，在固態腫瘤中，內部的低氧環境，或許是造成轉移增加、產生抗藥性的原因。然而截至目前為止，研究缺氧與抗藥性相關的模式，絕大部分都是利用離體 (*in vitro*) 的方式，即將各種不同腫瘤細胞培養於正常 (normoxia) 或低氧 (hypoxia) 的狀態之下，再利用各種不同化療藥物處理，如 cisplatin、paclitaxel 等 (Koch et al., 2003)，進一步比較兩者之間的差異，當然，在此種離體模式下確實證明低氧可以誘導抗藥性的產生。

本實驗室過去即針對低氧造成的抗藥性進行研究，利用低氧處理 (通以混和氣 10% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>、每天 10 小時) 造成轉植腫瘤細胞之小鼠產生缺氧反應，發現腫瘤組織中缺氧相關蛋白質，如 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 及 NF- $\kappa$ B、IL-6 等表現量增加；進一步利用化療藥物 5-FU 處理則在低濃度 10 mg/kg 作用下，低氧處理腫瘤組織具有抗藥性情形產生，但是對於其如何產生抗藥性仍然有待釐清。

因此，在本實驗中，進一步利用此種動物模式 (通以混和氣 10% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>、每天 10 小時，即大氣壓 760 mmHg，PO<sub>2</sub>=76 mmHg)，針對其腫瘤發展前期 (第 14 天) 以及後期 (第 21 天)，進行抗藥性相關蛋白的分析與比較；除此之外，利用低壓低氧 (大氣壓 380 mmHg，PO<sub>2</sub>=76 mmHg) 的處理，比較另一種形式所造成的低氧，對腫瘤所造成的影響，希望能夠藉此釐清在何種處理下的低氧，能夠造成抗藥性，而發展出篩選抗癌藥物的動物模式。

## 實 驗 材 料

### 一、實驗動物

7~8 週大 BALB/c 公鼠購自國家動物動物中心

### 二、實驗藥品

#### 1. 細胞培養

RPMI-1640 Medium (Hyclone, Logan, Utah, USA)

Fetal bovine serum (Biochrom AG, Berlin, Germany)

HyQ®L-glutamine 200 mM (Hyclone, Logan, Utah, USA)

Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen Corporation, N.Y., USA)

Trypan blue (Gibco, Grand Island, NY, USA)

Trypsin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

#### 2. 免疫酵素分析法 (ELISA)

NUNC-Immuno plate (442404, F96, MaxiSorp, NUNC, Denmark, USA)

Mouse IL-6 DuoSet® ELISA Development System (DY406, R&D systems, MN, USA)

Mouse VEGF DuoSet® ELISA Development System (DY493, R&D systems, MN, USA)

Substrate reagent pack (DY999, R&D systems, MN, USA)

#### 3. 電泳移動偏向分析法 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

Biotin 3' End DNA Labeling Kit (PIERCE, Rockford, IL, USA)

LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit (PIERCE, Rockford, IL, USA)

Mouse monoclonal NF-kB p65 antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Mouse Monoclonal HIF-1  $\alpha$  antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA)

#### 4. 西方墨點法 (Western blot)

proteinase inhibitor cocktail set I (Calbiochem, Germany)

BCA protein assay kit (ED60966, PIERCE, Rockford, IL, USA)

Prestained Protein Ladder (Biomax Scientific, LTD, USA)

Ponceau S concentrate (2% Ponceau S, 30% trichloroacetic, 30% sulfosalicylic acid) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Mouse monoclonal anti-HIF-1  $\alpha$  (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Mouse monoclonal anti-Actin (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Mouse monoclonal anti-Actin (abcam, UK)

Sheep polyclonal anti-Thymidylate Synthase (abcam, UK)

Mouse monoclonal anti-Histone H1 (Santa Cruz, CA, USA)

Rabbit polyclonal anti-VEGF (Santa Cruz, CA, USA)

Goat polyclonal anti-COX-2 (Santa Cruz, CA, USA)

Mouse monoclonal anti-Hsp70 (Santa Cruz, CA, USA)

Horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse IgG (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA)

Amersham enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Buckingham, UK)

Restore™ Western Blot Stripping Buffer (PIERCE, Rockford, IL, USA)

#### 5. 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

Trizol Reagent™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Titan One Tube RT-PCR system (Roche, Basel, Switzerland)

Protector RNase Inhibitor (Roche, Basel, Switzerland)

DEPC (diethyl pyrocarbonate) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Agarose I (Amresco, Solon, OH, USA)

Ethidium bromide solution (United States Biological, USA)

## **6. 免疫組織染色法 (immunohistochemistry)**

Cryo-Gel embedding medium (Instrumedics, USA)

Goat serum (Sigma, Steinheim, Germany)

VECTASTAIN<sup>®</sup> ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Rat anti-CD31 antibody (BD Pharmingen, Palo Alto, CA, USA)

Rabbit anti-VEGF antibody (Santa Cruz, CA, USA)

Mouse anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)

Biotinylated anti-Rat IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Biotinylated anti-Rabbit IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Biotinylated anti-Mouse IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

3,3'-Diaminobenzidine-4HCl (Sigma, Steinheim, Germany)

Hematoxylin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Hypoxyprobe<sup>™</sup>-1 kit for the detection of tissue hypoxia (HP1-100, Chemicon, Temecula, CA, USA)

BRIJ 35 (MP Biomedicals, Irvine, CA)

Pronase Reagent (M31, Biomed, CA, USA)

Protein Block Serum-Free (X0909, DakoCytomation, CA, USA)

## **7. Hematoxylin & Eosin staining (H & E staining)**

Hematoxylin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Eosin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

## **三、實驗儀器**

CO<sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator (REVCO)

Tissue culture dish (100×20mm, FALCON, NJ,USA)

Bright-Line Hemacytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA)

Oxygen Analyzer/Monitor ( Vascular Technology, Lowell, MA )

Disposable Polarographic Oxygen Cell ( Vascular Technology, Lowell, MA )

NUNC microwell plate (269620, 96F, without LID SH, NUNC, PA, USA)

Spectra MAX 250 (Molecular Devices)

Protean® II xi Cell (Bio-Rad)

Trans-Blot Cell (Bio-Rad)

Nylon transfer membrane, Nucleic acid transfer membrane, Hybound N<sup>+</sup>  
(Amersham, UK)

Kodak cassette (Kodak, France)

Kodak BioMax Scientific Imaging Film (Kodak, France)

Ultrasonic Cell Disruptor (Microson™, NY, USA)

Dry bath incubator (Violet Bio Sciences)

Protein electrophoresis and Western blot system (BIO-RAD)

Nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Palo Alto, CA, USA)

Immobilon-P transfer membrane (0.45 μ m) (IPVH00010, Millipore, USA)

U3300 pro UV/Vis Spectrophotometer (Amersham Biosciences)

Gene Amp® PCR System 2007 (Applied Biosystems)

Leica CM1900 (Leica)

## 實 驗 方 法

### 一、 小鼠大腸直腸癌細胞 (CT26) 之培養

本實驗選用之癌細胞為小鼠大腸直腸癌細胞 (CT26)，購自 ATCC (American Type Culture Collection)。細胞培養於 RPMI-1640 培養液酸鹼值調整為 pH 7.4，並添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、20mM L-Glutamine 及全效性抗生素 (Antibiotic-Antimycotic: penicillin G 100 µg/ml, streptomycin sulfate 100 µg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)，置於含 5% CO<sub>2</sub>、95% 大氣的 37 飽和溼度培養箱 (CO<sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator) 中培養。每兩天更換一次培養液，每 3~4 天進行繼代培養。進行轉植實驗的細胞代數均控制在第 8 代到第 11 代間，轉植實驗進行前一天更換培養液，使細胞處於指數增加狀態 (log phase)，再開始進行轉植實驗。

### 二、 實驗動物

本實驗所使用動物為與 CT26 細胞同源之 7~8 週大 BALB/c 小鼠，購於國家動物中心。自動物中心購入小鼠後，飼於台北榮民總醫院動物房中，室溫控制在 23 ± 2，光暗循環時間各為 12 小時，自由攝食飲水及飼料的環境中，使其適應環境約 1~2 星期後才進行腫瘤轉植實驗。

### 三、 小鼠大腸直腸癌細胞 (CT26) 之轉植

將處於指數增加狀態 (log phase) 的 CT26 細胞，利用 0.05% 胰蛋白酶 (Trypsin-EDTA) 作用三分鐘，使細胞脫離培養皿 (tissue culture dish) 底部後，將懸浮的細胞置於 15 ml 無菌離心管中，並加入培養液抑制胰蛋白酶作用，以 1000 xg 離心 3 分鐘，將細胞收下。收下的細胞去除培養液後加入無菌 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

pH 7.4) 打散細胞，並利用血球計數盤 (Bright-Line Hemacytometer) 計算細胞數，最後再用無菌 PBS 調整細胞濃度到  $2.5 \times 10^6$  cells/ml，隨即取用調整好濃度的細胞利用 1 ml 的針筒轉植注射 0.1 ml 到 7 ~ 8 週大的 BALB/c 小鼠右大腿皮下 (即每隻老鼠轉植  $2.5 \times 10^5$  cells)，再隨機進行分組。

#### 四、 實驗動物處理及腫瘤大小 (tumor volume) 測量

將已轉植 CT26 腫瘤細胞的 BALB/c 小鼠隨機分成三組，每組 5 ~ 8 隻。第一組置於正常環境中作為對照組 (normoxia, N)；第二組處理正常大氣壓下間歇性低氧 (normobaric hypoxia, NH)，置於長 42 公分、寬 35 公分、高 21 公分的壓克力密閉箱中 (Fig. 1A) (含 10% O<sub>2</sub> 及 90% N<sub>2</sub> 的混合氣，即氧分壓為 76 mmHg)，每天 10 小時 (09:00 ~ 19:00)，氣體流速 0.5 L/min；第三組處理低大氣壓下長時間間歇性低氧 (hypobaric hypoxia, HH)，放置於台大醫學院生理學科 (陳朝峰教授) 低氧艙，大氣壓降為 380 mmHg、氧分壓為 76 mmHg，每星期處理 144 小時，每星期一、三、五開放 8 小時；三組皆自由攝食飲水及飼料。約 10 天，待皮下形成腫瘤後，以測微尺測量腫瘤大小，由於腫瘤生成時為橢圓形，因此大小計算方式依 Makino 等人所提出公式計算 (Makino et al., 2001)，即：

[最大的直徑長 (large diameter) × 最小的直徑長<sup>2</sup> (small diameter)] / 2

#### 五、 正常大氣壓下間歇性低氧之系統氧分壓測量

利用細胞低氧處理系統 (Oxygen Analyzer/Monitor, Vascular Technology) 中所附的氧分壓偵測探針 (Disposable Polarographic Oxygen Cell) 進行檢測；先將探針與顯示器安裝好後，暖機 30 分鐘，並且以純氧氣體進行校正。將處理的小鼠連同飼養箱放入壓克力箱中，並放入適量乾燥劑，將其密閉後開始通以混合氣並開始計時。將校正後的氧分壓偵測系統安置於壓克力箱的流出氣體口，記錄顯示的讀值，直到達到一穩定值 (Fig. 1B)。



## 六、 實驗檢體樣本之收集

### 1. 眼窩採血及血球容積比 (hematocrit, Hct) 測定

將轉植腫瘤的對照組及低氧處理組老鼠，於轉植腫瘤後第 14 天，利用眼窩採血方式，收集血液以做血球容積比測定。採血方式為先以左手拇指及食指將老鼠輕提固定後，利用含 heparin 的微量毛細管 (micro-hematocrit capillary tubes) 採集老鼠右眼球後方的靜脈血管叢全血，之後再利用黏土封住其中一端，置於離心機 (hematocrit centrifuge 4203) 中以 3000 xg 室溫下離心 5 分鐘，讀值判斷血球所佔的血球容積比。

### 2. 心臟採血

小鼠先以 chloral hydrate (400 mg/kg) 麻醉後，利用以 0.5 M EDTA 潤濕過的 1 ml 針筒，直接插入胸腔中的心臟處，回抽採集約 1 ml 的全血血液，置入 1.5 ml 的微量離心管內並靜置在 4 °C 冰箱中，待血清離出後，於 4 °C、10,000 xg 離心 20 分鐘，收集上層的血漿，儲存於 -80 °C 冰箱中，以供日後免疫酵素分析時使用。

### 3. 腫瘤採取

小鼠心臟採血結束後，給予斷頸並處理掉腫瘤外部的皮毛。利用解剖剪刀將右大腿外側的腫瘤取下，立即放入乾冰之中冷凍，當其定型後以刀片對剖兩半，一半放入 4% paraformaldehyde-PBS 中固定，以備後續切片染色，另一半放入液態氮中，之後以 -80°C 保存作為日後生化及分子生物學分析。

## 七、 免疫酵素分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

血清中 VEGF 及 IL-6 含量以 DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development System (R&D)。首先以 PBS 製備 capture antibody，施予 100 µl 於 96 孔盤 (NUNC-Immuno plate) 上，室溫下靜置超過 12 小時，使抗體黏附於孔盤底

部。作用後的 96 孔盤，以 250  $\mu$ l wash buffer (0.05% Tween 20-PBS) 洗去未結合之抗體，清洗後並叩乾孔盤內殘餘液體，施予每孔 300  $\mu$ l blocking buffer (1% BSA, 5% sucrose in PBS) 去除孔盤內非專一性結合位置，於室溫下反應 1 小時。反應後以 wash buffer 清洗三次並叩乾孔盤內殘餘液體標準溶液，隨後加入 100  $\mu$ l 預先配置於 reagent diluent (1% BSA-PBS) 之兩倍序列稀釋標準液或待測樣本，室溫下作用 2 小時。以 wash buffer 清洗三次，接著加入 100  $\mu$ l 預先配置於 reagent diluent 之具有生物素結合的 detection antibody，室溫下作用 2 小時後，清洗三次後，加入 streptavidin-HRP 避光反應 20 分鐘，最後加入 substrate solution (substrate reagent pack)，此時溶液會漸漸呈現藍色反應，避光作用 30 分鐘後，加入 2N 濃硫酸終止反應，並在 30 分鐘內於 ELISA reader (spectra MAX 250) 以 450 nm 為測定值，540 nm 為參考值，標準曲線取 log-log 後，代入換算其濃度。

## 八、 電泳移動偏向分析法 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

### 1. 細胞核蛋白質萃取

取不同處理組腫瘤組織約 20mg，加入四倍組織重量的細胞核萃取液約 80  $\mu$ l (10 mM Tris-HCl, pH 7.4、10 mM NaCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% NP40、0.5 mM DTT 及 0.5 mM PMSF)，用 Dounce tissue grinder 小力的將組織均質化並均勻混合，冰浴 10 分鐘，再以 4  $\times$  10<sup>5</sup>、2,000  $\times$ g 離心 3 分鐘，移除上清液，沉澱的部份即為細胞核。加入兩倍沉澱物體積的細胞核萃取液約 40  $\mu$ l (20 mM HEPES, pH 7.9、25% glycerol、0.4% NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM EDTA、0.5 mM PMSF) 均勻混合，冰浴 20 分鐘，並且每五分鐘強力震盪 (vortex) 一次。再以 4  $\times$  10<sup>5</sup>、14000  $\times$ g 離心 5 分鐘，所得上清液即為細胞核蛋白質萃取液。取 2  $\mu$ l 萃取液測定蛋白質濃度，分裝並儲存於 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中，等待日後分析。

### 2. DNA 探針製備

利用 Biotin 3'End DNA Labeling Kit (PIERCE) 將 NF- $\kappa$ B 或 HIF-1  $\alpha$  consensus sequence 標定上 biotin 作為 DNA 探針。取 5  $\mu$ l (1  $\mu$ M) NF- $\kappa$ B 或 HIF-1  $\alpha$  結合片段的雙股 DNA (consensus sequence : NF- $\kappa$ B, 5'-AGTTG AGGGG ACTTT CCCAG G-3'; HIF-1  $\alpha$  , 5'-ACCGG CCCTA CGTGC TGTCT CAC -3') 加入 kit 中所附 5X reaction buffer 10  $\mu$ l , biotin-N4-CTP 5  $\mu$ l 及 TdT (2U/ $\mu$ l) 5  $\mu$ l 補水至 50  $\mu$ l , 於 37 反應 1 小時 , 之後分裝避光儲存於 -20 冰箱中。

### 3. 電泳及轉漬

首先製備 5% native gel , 成分如下 : 30% acrylamide 8.3 ml 、 5X TBE 10 ml 、 d.d.H<sub>2</sub>O 31.35 ml 、 10% APS 0.35 ml 及 TEMED 17.5  $\mu$ l , 注入架好的玻璃架台內凝膠 1 小時 , 組裝好電泳座台放入電泳裝置 (Protean® II XI Cell) 後 , 加入 0.5X TBE buffer (50 mM Tris, 50 mM boric Acid, 1 mM EDTA, pH 8.3) 為電泳液 , 再利用 150V 電壓預跑 30 分鐘以上。取腫瘤細胞的細胞核蛋白 , 定量 10  $\mu$ g , 加入 5X reaction buffer 4  $\mu$ l 、 poly dI.dC 2  $\mu$ l DNA 探針 (probe) 5  $\mu$ l 並補二次水至 20  $\mu$ l 於室溫下作用 30 分鐘。Shift 實驗中 , 則先加入 anti-p65 antibody 或 anti-HIF-1  $\alpha$  antibody 5  $\mu$ l 於室溫下與核蛋白作用 45 分鐘後 , 再加入 DNA 探針 , 並於室溫下作用 30 分鐘。將配置好的樣品注入電泳槽尺狀凹槽內 , 以 150V 電壓電泳約 2.5 小時 , 再利用轉漬裝置 (Trans-Blot Cell) , 以 380 mA 將 DNA-蛋白質複合體轉漬 (transfer) 1 小時到 nylon transfer membrane (0.45  $\mu$ m) 上。取轉漬好的 membrane , 吸除多餘水分 , 置於 UV 燈下以 125 mJ/cm<sup>2</sup> , 照射兩次 , 藉此增加其 cross-link。之後利用 LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit (PIERCE) 中所附 blocking buffer blocking 15 分鐘 , 接著加入 conjugate/blocking buffer (Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate : blocking buffer = 1 : 500) ; 作用 15 分鐘後 , 以 wash buffer 清洗 , 每 5 分鐘 1 次共 4 次。再加入 substrate equilibration buffer 作用 5 分鐘 , 及 substrate working buffer (等量的

Luminol/Enhancer 及 Stable Peroxide Solution 均勻混合) 作用 5 分鐘。最後將 Kit 內所附試劑 enhancer、stable peroxide 等量混合後，與 membrane 充分反應 4 分鐘後，吸除多餘水分，置於 Fuji film EC-BW cassette 內，以冷光專用 X 光片 (Kodak BioMax Scientific Imaging Film) 於暗房壓片。

## 九、 西方墨點法(Western blot)

### 1. 蛋白質萃取

取定量腫瘤組織 (約 20 mg)，加入 10 倍體積的均質液約 200  $\mu$ l (0.1 M PBS, pH 7.4, 含 1% proteinase inhibitor cocktail set I)，利用均質機 (Ultrasonic Cell Disruptor) 研磨使其均質化，之後於 4  $^{\circ}$ C、12,000  $\times$ g 離心 30 分鐘。離心後所得上清液即為細胞蛋白質萃取液，取出置於新的離心管中，儲存於 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中，等待日後分析。

### 2. 蛋白質濃度測定

以 BCA kit (PIERCE) 測定蛋白質濃度。由於蛋白質會與二價銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 作用，結合產生成一價銅離子 ( $\text{Cu}^{+}$ )，而 kit 內所附 working solution 即和一價銅離子作用，產生紫色複合物，於 590 nm 測定其吸光值，藉以測定蛋白質濃度。首先製備蛋白質濃度標準曲線，將 2 mg/ml 牛血清白蛋白標準品 (bovine serum albumin) 以二次水 ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) 做兩倍連續序列稀釋，濃度為 1、0.5、0.25、0.125 mg/ml 的蛋白質標準液。樣本則用二次水稀釋 10 倍後使用。取 20  $\mu$ l 的標準液或稀釋樣品置於 96 孔盤 (NUNC microwell plate) 中，加入 180  $\mu$ l BCA working solution 混合均勻，置於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中反應 30 分鐘。反應後利用 ELISA reader (Spectra MAX 250) 於 590 nm 下測定其吸光值，並繪出標準曲線後比對樣本蛋白質的濃度。

### 3. SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE electrophoresis)

Sodium dodecyl sulfate (SDS, 硫酸十二酯鈉) 為一種離子性清潔劑，可與蛋白質結合並包覆之，使所有的蛋白質皆具備相同的荷質比。當不同

的 SDS-蛋白質複合物通過多孔性膠體時，會因為蛋白質分子量不同，進而造成泳動速度不同，藉此分離蛋白質。首先製備 SDS-PAGE，將電泳所需玻璃架好後，加入所需濃度均勻混合 separating gel 溶液，利用 H<sub>2</sub>O-saturated butanol 壓平，待 1 小時 separating gel 凝結後，洗去多餘的上層液，接著加入均勻混合的 4% polyacrylamide stacking gel 溶液，並輕輕放入梳狀模板 (comb)，等到 1 小時 stacking gel 凝固後，即完成 SDS-PAGE 製備。將欲分析的蛋白質溶液與 6 倍濃縮 sample buffer (300 mM Tris-Cl pH 6.8, 12% SDS, 0.6% bromophenol blue, 60% glycerol, 200 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) 依比例均勻混合，置於 95 乾浴機 (Dry bath incubator) 中作用 10 分鐘，以打斷蛋白質結構中的雙硫鍵，使其變性，再放回冰上 10 分鐘後離心。將樣品與蛋白質標準品 (Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa) 依序注入電泳槽尺狀凹槽中，小心放入電泳裝置中以 40~50V 電壓進行 stacking，之後再以 70V 電壓進行 separating。

#### 4. 西方墨點法 (Western blotting)

將蛋白質電泳完成之 SDS-PAGE 小心取下，浸泡於轉漬溶液 (transfer buffer: 2.5 mM Tris-base, 192 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3) 中，接著進行西方墨點法實驗。裁切適當大小的 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 用甲醇 (methanol) 活化 30 秒，浸泡於轉漬溶液中備用。在轉漬海綿上放置用轉漬溶液潤濕的 3M 圖畫紙，接著放上電泳好的膠片，以及 PVDF membrane，最後在覆蓋潤濕的 3M 圖畫紙以及轉漬海綿；過程中要小心夾層中不可以有氣泡和雜質，小心放於轉漬裝置進行轉漬，100V、70 分鐘即可完成。轉漬完成後取出 membrane，先以 Ponceau S concentrate 染 1 分鐘確認其上的蛋白質位置，以及轉漬的效率與品質，再利用含 5% 脫脂奶粉 (non-fat milk power) 的 0.1% Tween 20 -PBS (PBST) 於室溫下 blocking 1 小時，再加入特定的一級抗體於 4 冷房中作用 overnight。反應完成後先以 PBST 沖洗 5 分鐘 3~4 次，再加入適合之二級抗體於室溫下作用 1.5 小時，重複上述清洗步驟，之後利用 ECL (enhanced chemiluminescence)

顯影，顯影方式為將 Western Lightning™ 內所附試劑 A、B 等量混合，放入 membrane 充分反應 4 分鐘後，吸除多餘水分，置於 Kodak cassette 內，以冷光專用 X 光片 (Kodak BioMax Scientific Imaging Film) 於暗房中壓片。

## 十、 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

### 1. 全量 RNA 萃取 (total RNA extraction)

使用 Trizol Reagent™ 萃取。取不同處理組腫瘤組織約 30 mg，置於滅菌的 1.5 ml 微量離心管中，加入 1 ml Trizol 溶液，利用 Dounce tissue grinder 在冰上小力的將組織均質化並均勻混合，靜置於室溫下 20 分鐘，之後加入 200  $\mu$ l 氯仿 (chloroform, CHCl<sub>3</sub>) 立刻上下倒轉混合均勻，並靜置室溫 10 分鐘，再以 4、12,000 xg 離心 15 分鐘，抽取上層無色水層上清液到新的 1.5 ml 無菌微量離心管內，加入 500  $\mu$ l 異丙醇 (isopropyl alcohol) 輕搖混合均勻並靜置室溫下 10 分鐘，再以 6、12,000 xg 離心 15 分鐘，此時即可見到 RNA 白色沉澱物，移去上清液後，利用 -20 的 75% 乙醇 (ethanol) 清洗兩次後，移去上清液並置於室溫下風乾，最後回溶於滅菌 DEPC-H<sub>2</sub>O 約 50  $\mu$ l 中，保存於 -80 冰箱中；或者放於冰上溶解 12 小時以上，隔日使用之。

### 2. 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

使用 Titan One Tube RT-PCR system (Roche) 做單一步驟的反轉錄-聚合酶連鎖反應。首先分別置備 premix 1 (dNTP mix 2  $\mu$ l、100 mM DTT 1.25  $\mu$ l、10  $\mu$ M sense primer 1  $\mu$ l、10  $\mu$ M anti-sense primer 1  $\mu$ l 及 5U/ $\mu$ l RNase inhibitor 0.25  $\mu$ l) 及 premix 2 (5X reaction buffer 10  $\mu$ l、enzyme mix 1  $\mu$ l 及 ddH<sub>2</sub>O 14  $\mu$ l)，之後取定量的 RNA，加入 premix 1 及 premix 2 補二次水至 50  $\mu$ l/tube。將製備好的樣品放入溫度循環器 (Gene Amp® PCR System 2007) 中進行反轉錄步驟 50、30 分鐘及 70、5 分鐘。再進行 PCR 反

應，條件如下：

VEGF (total RNA 定量 3  $\mu$ g, 26 cycles) : 94 1 min、65 1 min、72 40 sec

VEGF sense primer	5'-GCGGG CTGCC TCGCA GTC-3'
VEGF anti-sense primer	5'-TCACC GCCTT GGCTT GTCAC-3'

TS (Thymidylate Synthase ; total RNA 定量 5  $\mu$ g, 33 cycles) : 94 1 min、55 1 min、72 1 min

TS sense primer	5'-TCTGG AAGGG TGTTT TGGAGG-3'
TS anti-sense primer	5'- CCCTT CAATC TGAAA GTCTT C-3'

mdr1 (total RNA 定量 5  $\mu$ g, 30 cycles) : 94 1 min、50 1 min、72 1 min

mdr1 sense primer	5'-TGCTA TTATC CATGG AGTGG C-3'
mdr1 anti-sense primer	5'-CCATT GCCTG GAAGA ACATT-3'

GAPDH (total RNA 定量 3  $\mu$ g, 35 cycles) : 94 40 sec、65 40 sec、72 40 sec

GAPDH sense primer	5'-TCAAC GGCAC AGTCA AGGC-3'
GAPDH anti-sense primer	5'-AGGGA TGATG TTCTG GGCTG-3'

### 3. 電泳 (electrophoresis)

將適量的 agarose I 以 0.5X TBE buffer (89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8) 加熱溶解，配置成適當比例之電泳膠片。之後各取 10  $\mu$ l marker 或 sample 加入 2  $\mu$ l 6X loading dye 混合均勻後注入電泳槽尺狀凹槽內，以 50V 電壓進行電泳。完成後，利用外染的方法，將電泳膠片浸潤在

ethidium bromide (EtBr) solution 中約 3 分鐘，以二次水退染 2 分鐘，於紫外燈下觀察基因產物。

## 十一、 組織染色

### 1. 冷凍切片

將不同處理組老鼠犧牲後，分離出腫瘤組織，取一半的組織置於 4% paraformaldehyde-PBS 中固定約 2 ~ 3 天，接續置於 30% sucrose-PBS 中脫水，待整個腫瘤組織沉入底部時即表示脫水完成。脫水完成後將腫瘤組織取出，先以冷凍膠 (Cryo-Gel embedding medium) 包埋好後，置於冷凍切片機(Leica CM1900)中，以厚度 16  $\mu\text{m}$  做連續切片。

### 2. 免疫組織染色法 (immunohistochemistry)

將腫瘤組織切片以內含 3% 山羊血清、0.3% Triton 的 PBS 溶液 blocking 約一小時，再利用 mouse anti-HIF 1 $\alpha$  Ab (1:100; Novus)、rabbit anti-VEGF Ab (1:100; Santa Cruz) 或 rat anti-CD31 Ab (1:50; BD) 一級抗體於 4 $^{\circ}\text{C}$  作用 overnight。每染一種抗體時，選擇一組做空白校正試驗，以 PBS 取代一級抗體的步驟。反應結束後，利用 0.1 M PBS 清洗兩次，再加入以生物素做標定 (biotinylated) 的二級抗體 (anti-mouse、anti-rabbit 或 anti-rat IgG) 室溫下反應 1 小時，一樣利用 0.1 M PBS 清洗，之後加入 ABC (avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex) 於室溫下作用 1 小時，最後加入 3,3'-Diaminobenzidine-4 HCl (DAB) 為 substrate 以及 0.003%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，當受到標定的抗原有棕色反應呈現時，立刻用二次水清洗終止反應，之後再放到 0.1% hematoxylin 中做 counterstain 5 分鐘。

### 3. 低氧探針染色 (hypoxyprobe)

在犧牲小鼠前 1 小時，以腹腔注射法給予 60 mg/kg 低氧探針 (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1, pimonidazole hydrochloride) 待藥物擴散治標定位置時，再將其犧牲。取下的腫瘤組織同樣以 4% paraformaldehyde 固定後脫



水，以冷凍切片機進行切片，以備染色。取欲染色之切片，以 0.2% Brij35-PBS 清洗兩次後放入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中，室溫下作用 10 分鐘，去除內生性的 peroxidase。加入 0.01% pronase 以 40°C 作用 40 分鐘，再以 0°C 的 0.2% Brij35-PBS 清洗 2 分鐘，取 DAKO blocking solution 加入，室溫作用 10 分鐘。加入 Hypoxyprobe-1 (1:50; Chemicon) 單株抗體室溫作用 40 分鐘，洗去多餘抗體後，再加入帶有生物素連接的二級抗體 (1:500)，室溫下作用 10 分鐘。洗去多餘抗體後，加入 avidin-biotin complex 於室溫下作用 1 小時，最後加入 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 為 substrate，當受到標定的抗原有棕色反應呈現時，立刻用二次水清洗終止反應，之後再放到 0.1% hematoxylin 中做 counterstain 5 分鐘。

#### **4. Hematoxylin & Eosin staining (H & E staining)**

將腫瘤組織切片利用 0.1 M PBS 清洗 2 次，以除去多餘的冷凍膠，之後將組織切片置於含 0.1% hematoxylin 染劑的染缸中染色 5 分鐘，作用完成後以二次水清洗多餘染劑，之後再置入含 0.5% eosin 染劑的染缸中染色 1 分鐘，一樣作用完後以二次水清洗多餘染劑，之後依序浸泡 70%、95%、100% 及 xylene 中各 1 分鐘進行脫水步驟，最後利用封片膠封片觀察。

## **十二、 統計方法**

實驗所得的結果的表示方法是平均值±標準誤差值。統計的比較方式則採用單次變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 加以評估，之後再以 Bonferoni 多項比較步驟作為後分析。P < 0.05 時視為有統計差異。

## 實 驗 結 果

### 一、低氧處理造成小鼠血球容積比 (Hematocrit, Hct) 上升

雖然 Normobaric hypoxia (NH) 的低氧艙，在密封通入混合氣(含 10% O<sub>2</sub> 及 90% N<sub>2</sub>)後一小時可以達到我們希望的氧分壓 (Fig. 1)，但是，更進一步的利用眼窩採血法，於第 14 天時測量各組小鼠的血球容積比 (n=5)。

結果顯示，相較於對照組 (Normoxia, N)，低氧處理的小鼠，無論是 NH 亦或是 Hypobaric hypoxia (HH)，其血球容積比 (Fig. 2) 都有提高的現象。

### 二、低氧處理對小鼠體重之影響

為了檢視低氧處理對於小鼠腫瘤細胞生長改變的影響是因為體重變化而來，因此我們先檢測老鼠於低氧情況下體重改變情形。

將轉植腫瘤後的小鼠置於正常大氣壓下低氧 (NH, normobaric hypoxia) 中每天 10 小時，抑或是低壓低氧 (HH, hypobaric hypoxia) 每星期處理 144 小時，約每兩天測量一次體重 (n=3-6)。結果發現，對照組 (N, normoxia) 老鼠於轉植腫瘤後第 10 天，隨著腫瘤體積增大而有體重些許減輕的情形產生。而 NH 組老鼠，同樣於轉植後第 10 天開始隨著腫瘤體積增加有體重減輕的情況產生，但相較於對照組，小鼠體重並無顯著的差異 (Fig. 3)，顯示 NH 處理並不會顯著改變老鼠體重 (Table 1)。反觀 HH 組老鼠在放入低氧艙中後，體重便有急速下降的情形，並且直到實驗結束，其體重仍然低於 N 組與 NH 組 (Table 1)。

### 三、低氧處理對小鼠腫瘤之影響

由於轉植後 10 天內未能測得腫瘤之大小，直到第 11 天後皮下才可形成一顆腫瘤，此時利用游標尺每天測量一次腫瘤大小的變化 (n=3-6)，比較對照組與兩組低氧處理組—NH、HH 腫瘤大小改變情形。結果顯示，對照組 (N) 老鼠於轉

植腫瘤後第 14 天，腫瘤大約可長到  $159.6 \pm 93.8 \text{ mm}^3$  大，而低氧處理下的老鼠於轉植後第 14 天，NH 組腫瘤大約可長到  $180.9 \pm 53.1 \text{ mm}^3$  大，相較於對照組有些微增加但無顯著性差異 (Fig. 4)；第 21 天時，N 組腫瘤約長至  $441.3 \pm 196.6 \text{ mm}^3$ ，NH 組腫瘤長至  $572.4 \pm 113.2 \text{ mm}^3$ ，幾乎無差異，表示 NH 處理對於腫瘤細胞正常生長狀態並沒有太大的影響。然而，HH 組腫瘤第 21 天時，約可長至  $394.2 \pm 192.0 \text{ mm}^3$ ，相較其他兩組都要來的低，但是並無顯著差異。

#### 四、低氧處理與低氧誘導因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)的關係

##### 1. 低氧處理使低氧誘導因子表現增加

一般而言認為在低氧情況底下，生物體為了適應此種低氧環境，會有許多反應出現，其中在分子層面方面，最明顯的是低氧可以顯著誘導低氧誘導因子 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 的活化，而促進許多基因表現。因此在本實驗中，將對照組 (N) 及兩組低氧處理組 (NH 及 HH) 老鼠於第 14 天犧牲後，分離出腫瘤組織並萃取核蛋白，利用西方墨點法 (Western) 進行 HIF-1 $\alpha$  表現量的檢測 (Fig. 5A)，其中以 Histone H1 做為半定量的控制，比較觀察三組處理組腫瘤細胞中缺氧誘導因子表現情形。結果顯示，相較於對照組，兩組低氧處理組 (NH 及 HH) 的腫瘤具有明顯缺氧誘導因子表現的情形產生。

##### 2. 低氧處理使低氧誘導因子活化

除此之外，為了觀察 HIF-1 $\alpha$  的活化情形，進一步利用電泳移動偏向分析法分析三組第 14 天細胞核蛋白。結果發現，對照組腫瘤組織中並無明顯活化態的 HIF-1 $\alpha$  表現 (Fig. 5B; N1, N2)，但相對於對照組，低氧處理下 NH 組的腫瘤組織內可以明顯發現 HIF-1 $\alpha$  活化的情形產生 (Fig. 5B; NH1, NH2, NH3)；而 HH 組的腫瘤組織內亦可以發現 HIF-1 $\alpha$  活化的情形產生 (Fig. 5B; HH1, HH2, HH3)，唯 HH 的活化量偏少。進一步利用 HIF-1 $\alpha$  的抗體檢測，可以偵測到 super shift 的情形產生 (Fig. 5B; SS; NH2, NH3, HH3)，顯示所得的 band 確實為 HIF-1 $\alpha$  而不是非專一性結合。

## 五、低氧處理活化 NF $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B 為一種轉錄活化因子，過去文獻證實低氧情況下可以造成 NF- $\kappa$ B 大量活化，且 NF- $\kappa$ B 的活化亦被證實可能參與在抗藥性的機轉中。因此在本實驗中，於轉植腫瘤細胞後第 14 天將腫瘤組織分離出來，利用電泳移動偏向分析法 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 方式檢測腫瘤組織中 NF- $\kappa$ B 活化的情形。結果發現，對照組 (N) 腫瘤組織中並無明顯活化態的 NF- $\kappa$ B 表現 (Fig. 6; N1, N2, N3)，但相對於對照組，低氧處理 (NH, HH) 下的腫瘤組織內可以明顯發現 NF- $\kappa$ B 活化的情形產生 (Fig. 6; NH1-3, HH1-3)。進一步利用 NF- $\kappa$ B p65 的抗體檢測，可以明顯偵測到 super shift 的情形產生，顯示所得的 band 確實為 NF- $\kappa$ B 而不是非專一性結合。

## 六、低氧處理與血管內皮因子 (VEGF) 間的關係

### 1. 低氧處理與腫瘤內部血管內皮因子 (VEGF mRNA) 的關係

由於先前的實驗證實，低氧處理可以顯著提高腫瘤細胞中缺氧誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ) 表現與活化，而缺氧誘導因子表現常可以造成大量血管新生因子 (VEGF) 產生，進而造成新血管生成。因此在本實驗中，進一步將對照組 (N) 及低氧處理組 (NH, HH) 老鼠於第 14 天以及第 21 天犧牲後，分離出腫瘤組織，利用 RT-PCR 分析其中 VEGF 基因表現情形 (Fig. 7)，由於 VEGF 有不同 Splicing 的現象，因此本實驗利用適當 annealing 溫度與時間，特別針對 VEGF<sub>164</sub>，與 VEGF<sub>120</sub> 進行分析，其片段經計算後分別約為 644 bps 與 512 bps，經電泳比對後確認，另一方面利用 GAPDH 做為半定量的控制。結果發現，在腫瘤發展的前期 (第 14 天) 時，與對照組相比，在低氧處理組老鼠腫瘤細胞中無論是 NH 組抑或是 HH 組，都可以明顯發現 VEGF 基因大量表現的情形 (Fig. 7)；然而在腫瘤發展至後期 (第 21 天) 時，由於 N 組腫瘤越長越大的關係，其血管內皮因子 (VEGF) 基因表現有增加的趨勢，而低氧處理的小鼠腫瘤，則仍然有血管內皮

因子 (VEGF) mRNA 表現的情形 (Fig. 7)。

## 2. 低氧處理與腫瘤內部血管內皮因子蛋白質 (VEGF protein) 的關係

另一方面，本實驗也萃取其細胞總蛋白質，以西方墨點法分析其 VEGF 表現量，並且以  $\beta$ -Actin 做為內部控制。結果發現，在腫瘤發展前期 (第 14 天)，與對照組 (N) 相比，NH 組似乎有些微增加的趨勢，與 RT-PCR 的結果類似，但是 HH 組血管內皮因子 (VEGF) 蛋白質的量似乎比起 N 組要少一些 (Fig. 8A)；而當腫瘤發展至後期 (第 21 天)，各組皆有 VEGF 的表現，且 HH 組有增高的趨勢 (Fig. 8B)。

## 3. 低氧處理對於小鼠血清中血管內皮因子 (VEGF) 的影響

由上述實驗可知低氧處理可以造成 NH 組小鼠腫瘤細胞中 VEGF 基因及蛋白質表現增加，然而 HH 組卻有些許的不同：第 14 天時，mRNA 的表現量高，然而蛋白質的表現量卻較低，而第 21 天時，蛋白質的表現量開始增高。

因此，為了釐清 VEGF 的角色，進一步利用 ELISA 方式檢測小鼠血清中 VEGF 含量的改變情形。結果發現，在腫瘤發展的前期與後期，低氧處理下並不會顯著造成血清中 VEGF 含量提高 (Fig. 9A)，然而 NH 組與 N 組相較之下有偏高的趨勢，HH 組卻沒有這樣的現象。

## 七、低氧處理與血管新生的現象

總觀上述包含 HIF-1 $\alpha$  與 VEGF 的各項實驗，進一步利用免疫染色的方式對腫瘤生長前期 (第 14 天)，以及後期 (第 21 天) 進行檢視。

### 1. 低氧處理與腫瘤組織 HIF-1 $\alpha$ 的關係

在腫瘤發展的前期 (第 14 天)，與 N 組相比，低氧處理的小鼠腫瘤組織，無論是 NH 組或是 HH 組，HIF-1 $\alpha$  的表現量都較高 (Fig. 10B, C)，與西方墨點法的結果相仿。

腫瘤發展的後期 (第 21 天)，N 組由於腫瘤越長越大的關係，內部開始出現低氧區域，而有 HIF-1 $\alpha$  增加的趨勢 (Fig. 10D)；類似的情形也可以在 HH 組發

現 (Fig. 10F)，腫瘤內部仍有不少陽性細胞的存在；反觀 NH 組 (Fig. 10E)，相較於另兩組，陽性細胞偏少，但是細胞型態較為完整，並且可以看到類似血管的構造。

## 2. 低氧處理與腫瘤組織 VEGF 的關係

由於 HIF-1  $\alpha$  的表現對於其下游 VEGF 有極大的影響，因此本實驗進一步分析 VEGF 的表現。

腫瘤發展前期時，三組皆可以發現 VEGF 陽性細胞的存在，但是相較於 N 組，NH 組的表現量較高 (Fig. 11B)，然而 HH 組卻有偏少的情形 (Fig. 11C)，結果與西方墨點法相符合。

當腫瘤發展至後期時，三組仍皆可發現 VEGF 陽性細胞的存在，然而相較於 N 組，低氧處理組 NH 以及 HH 組，表現量都有偏高的現象 (Fig. 11E, F)。

## 3. 低氧處理對於後期 (第 21 天) 腫瘤組織血管新生的關係

VEGF 為一種強力的血管新生因子，許多文獻指出 VEGF 的表現可以造成血管新生的情形產生。因此，在本實驗中，更進一步利用血管內皮細胞的標定抗原 CD-31/PECAM 來檢測腫瘤組織中血管生成的情形。結果發現，N 組腫瘤於第 21 天時只有少數 CD31 陽性反應細胞出現 (Fig. 12D)，並且伴隨著細胞壞死的現象，類血管的空腔較少；而 NH 組與 HH 組老鼠腫瘤中則有明顯的 CD31 陽性反應的細胞產生 (Fig. 12E, F)，同時可以看見類似血管的空腔。顯示，低氧處理確實可以藉由促進大量 VEGF 生成而導致血管新生的情形。

## 4. 低氧處理對於後期 (第 21 天) 腫瘤型態之影響

第 21 天時將老鼠犧牲，分離出腫瘤組織並固定切片，利用 Hematoxylin and Eosin (H&E stain) 進行染色 (Fig. 12A-C)，觀察腫瘤組織型態改變的情形。結果發現 N 組 (Fig. 12A) 相較於 NH 組 (Fig. 12B) 有較多細胞壞死 (necrosis) 的區域出現，而 HH 組也同樣可以發現細胞壞死的區域。除此之外，相較於 N 組，在 NH 組織中可以發現較多的空腔，其內有血球細胞的存在，推測其為血管的形成。

## 5. 低氧處理與腫瘤組織發展後期（第 21 天）低氧的關係

腫瘤發展至後期（第 21 天）時，於犧牲小鼠一小時之前，注射低氧偵測探針（Hypoxyprobe-1, 60 mg/kg Pimonidazole），等待藥品擴散至低氧區域後再進行腫瘤組織的取樣，經固定脫水後進行冷凍切片，以 Hypoxyprobe-1 抗體加以染色分析 (Fig. 13A-F)。

由染色結果可以發現，腫瘤發展至後期時，由於 N 組 (Fig. 13A, B) 小鼠的腫瘤越長越大，因此內部可以發現許多低氧的區域，可以藉由 Hypoxyprobe-1 偵測到，同時伴隨著許多萎縮壞死的細胞；類似的情形也可以發現在 HH 組 (Fig. 13E, F)，內部的低氧同樣可以被偵測到；而 NH 組則不同於其他兩組，低氧的區域偏少，萎縮壞死的細胞也比較少見 (Fig. 13C, D)。

## 八、低氧處理與血中介白素-6 (IL-6) 的關係

IL-6 為一多功能的細胞激素 (cytokine)，文獻指出 NF- $\kappa$ B 的活化可以造成 IL-6 表現量上升，且 IL-6 亦被證實參與在腫瘤細胞生長分化及抑制細胞凋亡的過程中。因此，在本實驗中，既然低氧可以顯著造成 NF- $\kappa$ B 大量活化，那麼對於其下游 IL-6 是否有具有同樣的效應呢？因此後續更進一步利用 ELISA 方式檢測小鼠血清中 IL-6 的含量變化。

結果顯示，NH 組小鼠於轉植腫瘤細胞後第 14 天時，血清中 IL-6 含量有些微提高的情形，而 HH 組，相較於 N 組，血清中 IL-6 卻有降低的情形 (Fig. 14A)；類似的結果，在轉植腫瘤後第 21 天時差異更為明顯，相較於 N 組，NH 組的血清 IL-6 含量有顯著性的增加，然而 HH 組卻看不到這樣的現象，反之有降低的情形。

為了確認小鼠血清中的 IL-6 與腫瘤的發展有相關性，並且是因為轉植腫瘤後才增加的，進一步選用未轉植腫瘤細胞的小鼠，同樣分為三組：N、NH、HH，給予前述相同的處理，第 21 天時採取全血中的血清，以 ELISA 的方式分析其內 IL-6 的含量。結果發現，在未轉植的小鼠的血清內 IL-6 的含量，無論是 N、NH

或是 HH 組，相較於轉植後的小鼠，皆是偏低的，並且三組之間並無顯著差異 (Table 2)。除此之外，將三組血清 IL-6 含量與腫瘤大小做相關性的比較 (Fig. 14B)，顯示 IL-6 與腫瘤的發展有相關性。

由結果可知，小鼠血清中的 IL-6 大多是由腫瘤所產生的，並不是低氧所造成的，但是在轉植小鼠的血清中 Normobaric Hypoxia 的處理確實可以提高其 IL-6 的含量，但是 Hypobaric Hypoxia 的處理卻有可能因為小鼠攝食較差的關係，而有減少的趨勢。

## 九、低氧處理與還氧化酶 (COX II) 的關係

由於本實驗所選用的癌細胞是屬於大腸直腸癌細胞，而還氧化酶 (COX II) 在此種癌細胞中可說是對於預後惡化的一個指標，因此在轉植腫瘤後第 14 天與第 21 天，分別取腫瘤抽取細胞蛋白質，以西方墨點法觀察腫瘤生長的前期以及後期，各組間還氧化酶的表現量，並且以  $\beta$ -Actin 做為內部控制。

結果顯示，在腫瘤生長的前期 (第 14 天)，低氧處理的小鼠腫瘤 (Fig. 15A)，無論是 NH 或是 HH 組，還氧化酶 (COX II) 的表現量皆有增高的情形。類似的情形也可以發現在腫瘤生長的後期 (第 21 天)，低氧處理組的小鼠腫瘤 (Fig. 15B)，還氧化酶的表現仍有增高的情形，但是相較於對照組 (N)，似乎兩組之間的差異減小了，表示或許對照組 (N) 的腫瘤內部開始有低氧的反應，而使得還氧化酶 (COX II) 有增高的情形，可見低氧可能使腫瘤有惡化的現象。

## 十、低氧處理與多重抗藥基因 (mdr1) 的關係

過去文獻指出，低氧處理或許會藉由多重抗藥性蛋白的表現增加，而導致抗藥性的現象，因此本實驗先就其 mRNA 的表現進行觀察。當腫瘤發展前期 (第 14 天)，將小鼠犧牲後取樣，抽取總 RNA，利用半定量 RT-PCR 的方式，比較三組間 mdr1 基因的表現量 (Fig. 16)，針對基因設計之探針引子所夾出的片段約為 413 bps，經電泳比對後證實，同時以 GAPDH 做為內部控制。



結果顯示，相較於 N 組而言，NH 組的表現量似乎有偏高的趨勢，而 HH 組與 N 組的量相比，也有些微增加。

## 十一、 低氧處理與 thymidylate synthase (TS) 的關係

由於 5-Fluorouracil (5-FU) 仍是目前結腸直腸癌化學治療最主要的藥物，其主要的抗癌作用機轉，係與酵素 thymidylate synthase 結合並抑制其作用，使 thymidylate 無法合成，而影響癌細胞 DNA 之製造，因此本實驗針對 thymidylate synthase 進行分析。

### 1. 低氧對於前期腫瘤組織 thymidylate synthase (TS) 之 mRNA 的分析

腫瘤發展前期 (第 14 天)，將小鼠犧牲後取樣，抽取總 RNA，利用半定量 RT-PCR 的方式，比較三組間 thymidylate synthase 基因的表現量 (Fig. 17)，針對基因設計之探針引子所夾出的片段約為 660 bps，經電泳比對後證實，同時以 GAPDH 做為內部控制。

結果顯示，與 N 組相較之下，NH 組有增高之趨勢，然而 HH 組只有些微的增加。

### 2. 低氧對於腫瘤組織 thymidylate synthase (TS) 之蛋白質表現量的分析

本實驗分別於腫瘤發展前期以及後期抽取總蛋白質，以西方墨點法加以分析 (Fig. 18)，並且以  $\beta$ -Actin 做為內部控制。

結果顯示，在腫瘤發展前期，與 N 組相較之下，NH 組似乎有增高趨勢，但並無顯著差異，而反觀 HH 組卻有不同的表現，蛋白質有減少的現象。

腫瘤發展後期時，TS 的表現與前期相似，NH 的表現量相較於 N 組有上升的趨勢，而 HH 組卻有減少的現象。

## 十二、 低氧與熱休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 的關係

本實驗分別於腫瘤發展前期以及後期抽取總蛋白質，以西方墨點法加以分析，並且以  $\beta$ -Actin 做為內部控制。

結果顯示，無論是腫瘤發展的前期抑或是後期，三組內部的 Hsp60 (Fig. 19)、Hsp70 (Fig. 20)皆無表現量的差異。



## 討 論

### 一、 低氧處理明顯造成小鼠產生低氧的生理反應

過去的文獻指出，當老鼠處於低氧狀態下的時候，常會發展出許多不同的適應機制，其中最主要的是造成血液中紅血球數目增加 (Goldberg et al., 1988)，以增加攜氧量。在本實驗中，NH 組每天 10 小時給予 10% O<sub>2</sub> 及 90% N<sub>2</sub> 的低氧處理，或者是 HH 組給予低壓低氧，每週 144 小時，於第 14 天時便可造成血比容 (Hct) 的數值顯著上升，表示低氧處理，確實對小鼠造成血球數目的增加，以適應低氧的環境，提高攜氧量。其上升比例為：HH>NH>N。

類似的實驗在過去研究也被證實，低氧處理每天 10 小時給予 10% O<sub>2</sub> 及 90% N<sub>2</sub>，於第 5 天過後，便可明顯造成血液中紅血球數目顯著性增加，且可以持續到第 21 天 (Kuwahira et al., 1993； 陳玟翰, 2004)，而低壓低氧的處理也有類似現象 (Kuo et al., 1999； Pavlicek et al., 2000)。

除此之外，Kuwahira 等人更證實低氧處理狀態下，老鼠血流會有重新分佈的情形產生，增加到腦、呼吸肌 (如橫膈) 及肝臟並且減少到其他組織的情形產生，且肺臟、肝臟相對重量亦會因為低氧的處理而顯著上升 (Kuwahira et al., 1993)，而過去研究亦證實，低氧處理 13 天後便可明顯造成肺臟相對重量顯著上升相符 (陳玟翰, 2004)。Deveci 則證實，當大白鼠處於連續低氧 (12% O<sub>2</sub>) 的環境中 3 個星期，可以明顯增加老鼠後腿肌上小動脈分支數目及血管新生的現象 (Deveci et al., 2002)。因此，由以上文獻可知，確實低氧處理可以明顯造成老鼠處於缺氧狀態，尤其對於轉植腫瘤的部位：大腿皮下，一樣可以明顯達到缺氧環境出現 (陳玟翰, 2004)。

### 二、 轉植腫瘤及低氧處理對於小鼠體重之影響

文獻指出，當老鼠轉植 CT26 細胞株時，隨著腫瘤的增長，體態會有消瘦

(cancer cachexia) 的情形產生，因此會造成體重明顯降低 (Nukatsuka et al., 1996)，而在本實驗中，對照組 (N) 老鼠轉植 CT26 細胞後第 11 天開始，隨著腫瘤體積變大，小鼠體重也有下降的情形產生，此結果與 Nukatsuka 等人的研究結果相同。

除此之外，Kuwahira 等人指出，當大白鼠處於長期低氧狀態下 3 星期，其體重有稍微減輕但沒有顯著性差異產生 (Kuwahira et al., 1993)，而我們的實驗中，NH 組低氧處理組老鼠於轉植腫瘤後雖然體重跟 N 組一樣有些微下降情形，但相較於 N 組並不會更進一步造成老鼠體重下降，兩組老鼠的體重並沒有顯著性差異出現，與前者研究相符合。

另外，HH 組除了處理低氧外，不但處理時間延長，同時合併處理低壓，對於體重有十分顯著的影響，此結果與過去研究相符合 (Kuo et al., 1999; La Padula and Corta, 2005; Meberg, 1981)，顯示低氧低壓的處理，對小鼠的攝食或代謝產生影響，而造成體重減輕的現象。因此，其體重大小比例為： $N \geq NH > HH$ 。

### 三、 低氧處理對腫瘤大小之影響

實驗結果顯示，NH 組老鼠的腫瘤組織在腫瘤發展前期相較於對照組 (N) 有稍微增加，但無顯著性差異產生；而腫瘤發展至後期也有類似的現象，但並無顯著差異。推測其可能原因為長期間歇性低氧處理改變細胞層面蛋白質如 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 等的表現，而使得 NH 組低氧處理的腫瘤，在腫瘤生長至後期時可以發展出較多新生血管，提供其生長所需養分，與文獻指出低氧狀態下可以明顯造成 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 生成而促進腫瘤生長相符合 (Carmeliet and Jain, 2000)。然而，當老鼠 HH 組處理長時間低壓低氧 (380mmHg、PO<sub>2</sub>=76 mmHg) 環境中，其腫瘤的生長反而有抑制的效應，表示 HH 處理或許會經由攝食變差，而導致腫瘤的發展受到影響，而有偏小的情形。因此，其腫瘤大小比例為： $NH \geq N > HH$ 。

#### 四、 低氧處理造成腫瘤內部細胞層面各分子的改變

本實驗利用 RT-PCR、西方墨點法、EMSA 及免疫組織染色法發現，低氧處理會造成下述多種蛋白質分子之改變。

##### 1. 低氧處理顯著提高腫瘤組織中前期 HIF-1 $\alpha$ 表現

由實驗結果可以發現，在腫瘤發展的前期時，利用萃取核蛋白以西方墨點法與 EMSA 分析，低氧處理的小鼠腫瘤，無論是 NH 組或是 HH 組，不但 HIF-1 $\alpha$  的表現量增加，其 HIF-1 $\alpha$  活性也有增加的情形，除此之外，進一步利用免疫染色法同樣應証這樣的結果。

過去許多文獻指出，低氧處理可以有效造成缺氧誘導因子 HIF-1 $\alpha$  的活化，2001 年時 Stroka 證實，將老鼠置於 6% 低氧艙中 1~6 個小時內，利用免疫組織染色法及 Western blot 可以明顯發現在腎臟、肝臟、腦及肌肉中有明顯 HIF-1 大量表現 (Stroka et al., 2001)，此與我們的結果，低氧處理第 14 天時，可以顯著造成腫瘤組織中 HIF-1 $\alpha$  表現量大量提升相類似。不過，由於我們的處理為間歇性低氧處理，NH 組每天給予 10% O<sub>2</sub> 及 90% N<sub>2</sub> 10 小時，或是 HH 組大氣壓降為 380 mmHg、氧分壓為 76 mmHg，每星期處理 144 小時，與 Stroka 等人短暫性處理不盡相同，然而第 14 天時還是可以觀察到 HIF-1 $\alpha$  表現。

##### 2. 低氧處理顯著提高腫瘤組織中 VEGF 基因、蛋白質表現及血管新生

經由 RT-PCR 的結果可以發現，腫瘤發展前期時，低氧處理，無論是 NH 組或是 HH 組皆可提升其 VEGF mRNA 的含量；而當發展至後期時，由於 N 組腫瘤越長越大，因此其 VEGF mRNA 的量也就漸漸的有提升的趨勢，而 NH 組與 HH 組由於低氧處理，仍然可以測得 VEGF mRNA 的表現。因此，其腫瘤 VEGF mRNA 比例為：NH>HH>N。

由 RT-PCR 的結果比對西方墨點法與免疫染色法所得到的結果，N 組與 NH 組相符合，但是在腫瘤發展前期時的 HH 組 VEGF 蛋白質含量，相較之下有偏低的趨勢，或許是由於低壓低氧造成小鼠攝食不佳、養分不足

所導致，抑或者是其處理造成蛋白質後修飾作用不同所造成，類似的結果也在過去的研究被應証 (Biro et al., 2004)；因此，其前期腫瘤 VEGF 蛋白質比例為：NH>N>HH。

在後期時，我們又可以發現 HH 組 VEGF 的蛋白質含量上升，這或許是由於小鼠漸漸對低壓低氧的環境適應後所產生的預期反應。因此，其後期腫瘤蛋白質比例為：NH $\geq$ HH>N。

比對之前的實驗證實低氧可以有效造成腫瘤組織中 HIF-1 $\alpha$  大量表現。且許多文獻指出，低氧狀態下所造成的 HIF-1 活化，可以進一步造成 VEGF 基因大量表現，而促進血管新生；相反的，若抑制 HIF-1 的表現則可以降低 VEGF 表現並抑制腫瘤生長，因此關於 VEGF 的結果與預期相符合。如 Sun 等人證實，利用分子轉殖方式大量表現 von Hippel-kindau (VHL) 可以降低腫瘤組織內 VEGF 的表現及腫瘤的生長 (Sun et al., 2003)，更進一步顯示 HIF-1 及 VEGF 的相關聯性。而在本實驗中，確實發現低氧處理，無論是 NH 組或 HH 組，在腫瘤發展後期可以顯著提高腫瘤組織中 VEGF 基因、蛋白質及 CD31-positive 細胞表現量增加，因此證實在此種低氧處理模式下，可以有效使老鼠腫瘤組織產生低氧反應，如 HIF-1 $\alpha$  表現量增加，使 VEGF 基因、蛋白質表現增加，進而造成血管新生的情形產生。

除此之外，Moeller 等證實，HIF-1 所造成的 VEGF 大量生成，可以進一步作用在血管內皮細胞上，促進內皮細胞的生長而使得其對於放射線療法具有抵抗性 (Moeller et al., 2004)。因此，在我們的實驗中觀測到 VEGF 大量生成，將來可以利用 NH 組處理的模式，更進一步探討對於放療或化療的抗性。

### 3. 低氧處理造成腫瘤組織中 NF- $\kappa$ B 活性升高及其下游基因的表現

NF- $\kappa$ B 在許多癌症的發生過程中扮演非常重要的角色，在本實驗處理的低氧小鼠腫瘤中，無論是 NH 組或是 HH 組於腫瘤發展前期，其 NF- $\kappa$ B 的活性皆顯著性的升高。文獻指出，缺氧情況下可以藉由提高 I $\kappa$ B 磷酸化

情形而造成 NF- $\kappa$ B 活化 (Koong et al., 1994)，此結果與我們的研究結果相符；近來許多文獻更進一步指出與發炎反應息息相關的 NF- $\kappa$ B，可能是藉由促進 COX-II 大量表現，而導致 HIF-1 活化，進而產生 VEGF 促進血管新生，而影響腫瘤的生長 (Jung et al., 2003；Lukiw et al., 2003)，此結果又與本實驗有一致性：低氧處理 NH、HH 組，在腫瘤發展的前期與後期，皆可以發現 COX II 的蛋白質表現有提高的現象，尤其當 N 組腫瘤發展至後期時，與前期相較亦有些微增加。因此，其腫瘤 COX II 蛋白質比例為：HH  $\geq$  NH > N。

除上述之外，文獻指出：NF- $\kappa$ B 在癌症發生過程中可能藉由調控一些蛋白質，如 COX-II 及細胞激素如：IL-6、IL-8 的表現而影響腫瘤生長 (Maihofner et al., 2003；Lukiw et al., 2003；Xiong et al., 2004)。因此，我們也檢測了小鼠血清中前期與後期 IL-6 的含量，結果發現，NH 低氧處理組老鼠血清中 IL-6 含量與 N 組相比確實有增加的情形，尤其當腫瘤發展至後期有顯著性的增加，顯示，NH 組低氧處理或許可以藉由活化腫瘤組織中 NF- $\kappa$ B 及其下游產物 IL-6 的表現；過去研究指出，NF- $\kappa$ B 及 IL-6 皆被證實可以有效的抑制細胞凋亡的產生。如 Wang 等人於 1996 及 1999 年分別發現，利用基因轉殖法提高 NF- $\kappa$ B 活性可以有效降低 daunorubicin 及 camptothecin 所造成的細胞凋亡現象 (Wang et al., 1996、1999)。Lichtenstein 等人則證實 IL-6 可以有效抑制 malignant cells 細胞凋亡 (Lichtenstein et al., 1995)，推測其可能機制為促進抗細胞凋亡蛋白質 XIAP 的表現 (Yamagiwa et al., 2004)。所以綜合以上文獻，推測，NH 組低氧狀態下所造成的 NF- $\kappa$ B 及 IL-6 大量表現，可以促進腫瘤細胞生長，此與觀測到的腫瘤大小，在低氧處理 NH 組有稍微的增加相符合。且 NF- $\kappa$ B 及 IL-6 表現可能可以抑制細胞凋亡產生，但更進一步的抗藥性研究能仍待釐清。

反觀 HH 組，IL-6 的表現量卻沒有增高的情形。因此，在有轉植腫瘤的小鼠中，其血清中 IL-6 比例為：NH > N > HH。

進一步我們比較其與沒有轉植腫瘤細胞小鼠血清內的量，以及其與體重、腫瘤大小之間的關係；由結果我們可以推測，小鼠內部的 IL-6 是由於轉植腫瘤而來的，因此當腫瘤長的越大，IL-6 的表現量愈高；再者，由於低壓低氧的處理，使得 HH 組小鼠的體重急速下降，養分不足使得腫瘤的發展產生影響（偏小），進一步也使蛋白質的產生些許發生延緩的現象，以上或許是造成 HH 組小鼠體內之 IL-6 有偏少現象的原因，但是相較於沒有轉植腫瘤的低壓低氧小鼠，其 IL-6 的量還是較高的。

## 五、 低氧處理對於腫瘤組織前期與後期的影響

2000 年時，Chavez 等人指出，將老鼠置於低壓低氧（380 mm 水銀柱，20% O<sub>2</sub>）低氧艙中連續 21 天，在前期 1-14 天時都可以在大腦皮質中發現 HIF-1 大量表現的情形，然而到第 21 天時，HIF-1 的表現量則恢復正常，推測其可能原因是由於長期缺氧造成血管新生及新陳代謝的改變而達成的（Chavez et al., 2000），此與本實驗的結果相類似，第 13 天時於低氧處理組腫瘤組織，無論是 NH 組或是 HH 組，皆可以明顯發現 HIF-1 $\alpha$  大量表現、活化的情形；但是，在第 21 天時低氧處理腫瘤組織中，反而 HIF-1 $\alpha$  表現較低（免疫染色之結果），同時，第 21 天時，N 組可以明顯發現細胞壞死（necrosis）的區域，而 NH 組則有較多 CD31 陽性反應的空腔，由此推測，本實驗的 NH 組低氧處理由於一開始便令腫瘤細胞處於一低氧環境底下，因此可以有效促使腫瘤細胞產生低氧反應，即 HIF-1 $\alpha$  活化、VEGF 基因、蛋白質表現量增加，進而造成血管新生的情形產生，也因此比較晚期（第 21 天）時，已有明顯血管新生情形產生，所以腫瘤組織中會出現比較多 CD31 陽性反應的血管內皮細胞，而 N 組，因為血管新生不明顯，所以組織較緻密，且較內部的地方會因為沒有血液提供氧氣跟養分而有細胞壞死（necrosis）的情形產生。

反觀 HH 組，由於合併低壓低氧的處理，而且處理時間較長，造成體重下降，腫瘤細胞生長不良，其蛋白質表現又與 NH 組有不同的現象；HH 組腫瘤雖



然前期時可以明顯引發 HIF- $\alpha$  的活化與表現，但是其下游的 VEGF 卻到後期時才開始有提高的現象，因此大大的減緩了血管新生的效率，雖然腫瘤組織後期仍可見血管的存在，但是內部仍然充滿著細胞壞死的組織。

## 六、 低氧處理與腫瘤細胞抗藥性的關係

過去文獻指出，HIF-1 的大量表現可降低細胞對化療藥物的敏感性 (Unruh et al., 2003)，以及其下游產物 VEGF 大量生成可以促進內皮細胞存活，因此有效降低放射線療法的成效 (Moeller et al., 2004)，可能機制為此外，NF- $\kappa$ B 及 IL-6 亦被證實可能參與在抗藥性機轉及抑制細胞凋亡的作用中 (Wang et al., 1996； Yamagiwa et al., 2004)。為了進一步分析低氧所造成的抗藥性，本實驗針對下列進行探討：

### 1. 低氧處理與 thymidylate synthase (TS) 的關係

化療藥物 5-FU 一直是臨床上用來治療大腸直腸癌的第一線用藥，但平均只有 15~20% 的癌症病人對藥物治療有改善的成效 (Schmoll et al., 1999；許純慧, 2001)，顯示抗藥性的嚴重性；文獻指出，動物實驗中給予 5-FU 可以有效減低腫瘤生成 (Makino et al., 2001)。5-FU 的作用機制即是減低 thymidylate synthase 的作用（原料相似物），若是 TS 的表現增加似乎可代表其對於 5-FU 的抗藥性 (Peters et al., 2002)。

本實驗分析腫瘤發展前期與後期 TS 蛋白質的改變，結果發現，與 N 組相比 NH 組雖有些微增加但並無顯著差異，而 HH 組卻有減低現象；類似實驗於 1999 年時，Ehrnrooth 等人轉植 C3H 於 CDF1 小鼠中，帶腫瘤長至 200 mm<sup>3</sup> 放入低氧艙 0-50 小時，發現 TS 有下降的現象 (Ehrnrooth et al., 1999)，但是相較於過去研究，由於處理方式不同，因此或許有不同的機制調控此現象。因此，其腫瘤 TS 蛋白質比例為：NH $\geq$ N>HH。

### 2. 低氧處理與多重抗藥性蛋白質 (multidrug resistance protine, MDR) 的關係

近年來研究 MDR 與低氧造成的抗藥性有增多的趨勢，因此本實驗初

步分析腫瘤發展前期 *mdr1* 基因的表現，結果顯示相較於 N 組，NH 組有些微的上升，此結果與過去研究相似 (Wartenberg et al., 2003, 2005)，雖然不同的癌細胞有不同的表現與調控，仍然應當進一步以西方墨點法或是 real-time-PCR 作更精細的分析。因此，其腫瘤 *mdr1* mRNA 比例為：NH>HH  $\geq$  N。

### 3. 低氧處理與熱休克蛋白 (heat-shock proteins, HSPs) 的關係

目前為止所發現的熱休克蛋白主要分為兩大類，即熱休克蛋白質與葡萄糖調節蛋白質 (glucose-regulated proteins, GRPs)，而熱休克蛋白質又因其分子量的不同，可分成五個家族，可經由熱或其他緊迫誘發細胞合成，屬酸性蛋白質。HSP110，分子量在 100-110 kDa 之間，已發現有 3 個 isoforms，可能與細胞核仁的保護有關；HSP90，目前發現有 2 個 isoforms，其表現量僅次於 HSP70，可與類固醇受體結合，可能與訊號傳遞有關；HSP70，為表現量最多的熱震蛋白質，可有 10 個 isoforms，與耐熱性及蛋白質轉運有關；HSP60，目前只發現 1 個，與粒線體蛋白質重組成有關；低分子量 HSP，分子量在 15-30 kDa 之間，可有 26 個 isoforms，與抗氧化緊迫及植物耐熱性有關。

過去研究指出，Hsp70 可以抑制由低氧所引發的細胞自然性凋亡 (apoptosis)，增加細胞的抗性 (Keita et al., 2004; Suzuki et al., 1998)；2004 年的研究利用大鼠肝細胞，處理低氧 4 小時後，在給予回復氧 (re-oxygenation) 處理，結果發現，在結束低氧處理時其 Hsp70 含量與一般細胞無異，但是隨著回復低氧的時間增加，Hsp70 的量也隨之增加，直到 36 小時仍有增加的現象 (Keita et al., 2004)。本實驗初步分析 Hsp 70 在腫瘤發展的前期與期時的表現量，結果三組並無顯著差異；事實上在不同的細胞，或者是處理低氧不同的時間，Hsp 對於低氧的保護各有不同的現象，2004 年 Chiral 等人的研究利用新生的 piglets 處理低氧 1-4 小時觀察腦中蛋白質的表現，雖然 HIF-1  $\alpha$  與 Hsp 27 有增加的現象，但是 Hsp70、Hsp

90 與 HO-2 並無顯著差異 (Chiral et al., 2004), 與本實驗相似。

除上述 Hsp 70 外, 本實驗亦初步分析 Hsp 60 表現量, 發現三組無論在前期或後期皆無顯著差異; 然而在 Gupta 等人的研究指出, 利用低氧處理, 雖然 Hsp 60 的總蛋白量並無改變, 但是原本與 Bax、Bak 或 Bcl-X<sub>L</sub> 結合存在於細胞質的 Hsp 60, 會分離跑到 plasma membrane 上, 而 Bax 等便會跑到粒線體引發細胞性自然凋亡 (Gupta and Knowlton, 2005), 因此若要進一步研究 Hsp60 與低氧的關係, 應當抽取細胞質蛋白作分析。

#### 4. 低氧處理與 Bcl-2 family 的關係

過去研究指出, 低氧可以藉由 HIF-1 $\alpha$  活化, 改變細胞凋亡相關蛋白 Bax 及 Bid 的表現而達到抗藥性 (Erler et al., 2004); 此外, 低氧亦可經由篩選 Bcl-X<sub>L</sub> 較高的細胞, 而使腫瘤對死亡具有抗性 (Dong and Wang, 2004), 然而在本實驗中, 以西方墨點法分析腫瘤發展前期與後期 Bcl-X<sub>L</sub>、Bcl-2 含量, 三組小鼠個體間的表現並沒有一致性 (n=3, 結果並未放入), 或許應增加樣本數目進一步分析之。

## 總 結

本實驗使用 CT26 細胞轉植小鼠右大腿皮下為動物模式，利用正常大氣壓下低氧處理 (NH 組；10% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>，每天 10 小時)，或者是低壓低氧處理 (HH 組；大氣壓 380 mmHg、氧分壓 76 mmHg，每星期處理 144 小時)，可以有效造成低氧反應，但是兩組低氧處理，在腫瘤發展前期 (第 14 天) 與後期 (第 21 天) 的反應卻有不同的現象。

在腫瘤發展的前期，兩組低氧處理其腫瘤內部的 HIF-1 $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 的活性皆有增高的趨勢，同時其 VEGF mRNA、mdr1 mRNA、COX II 蛋白質的量也同樣提高；但是在血清中 IL-6 與 VEGF、TS 蛋白質含量卻有不同的表現：NH 組增高而 HH 組減低，可見其兩組對於下游基因的調控有些許的不同。

在腫瘤發展的後期，兩組 VEGF、COX II 蛋白質表現量有增高現象，然而 IL-6、TS 卻仍然有不同的表現：NH 組增高而 HH 組減低，推測此結果又與低壓低氧造成小鼠攝食不佳、體重下降有相關性。

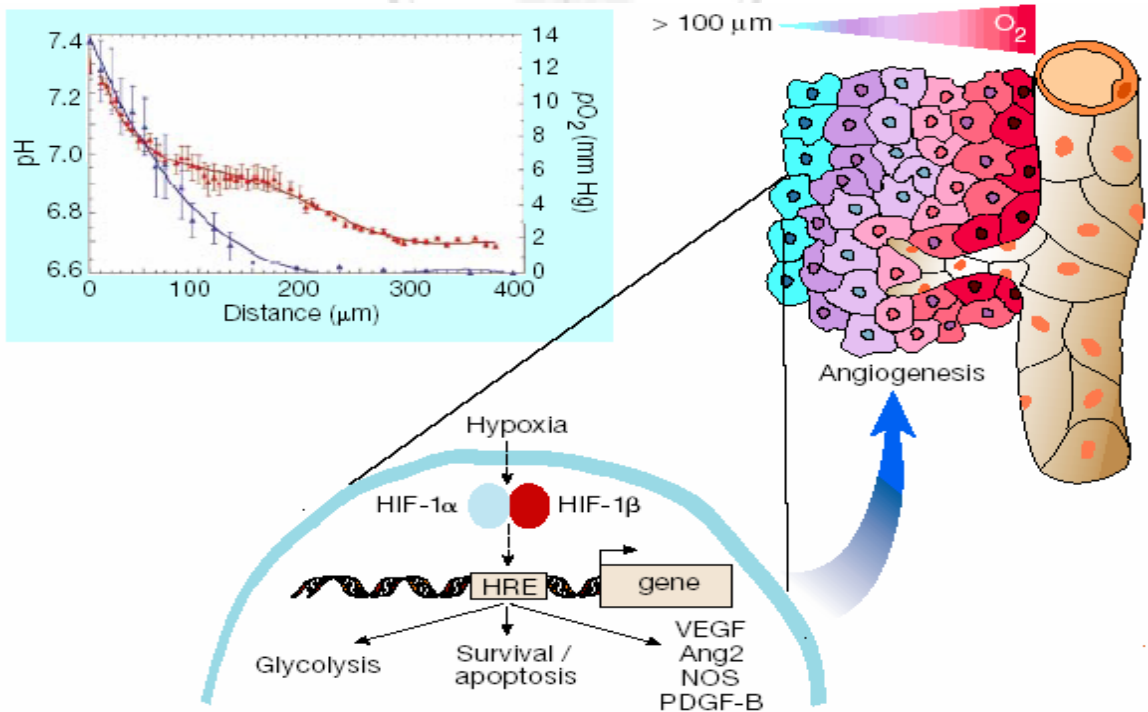
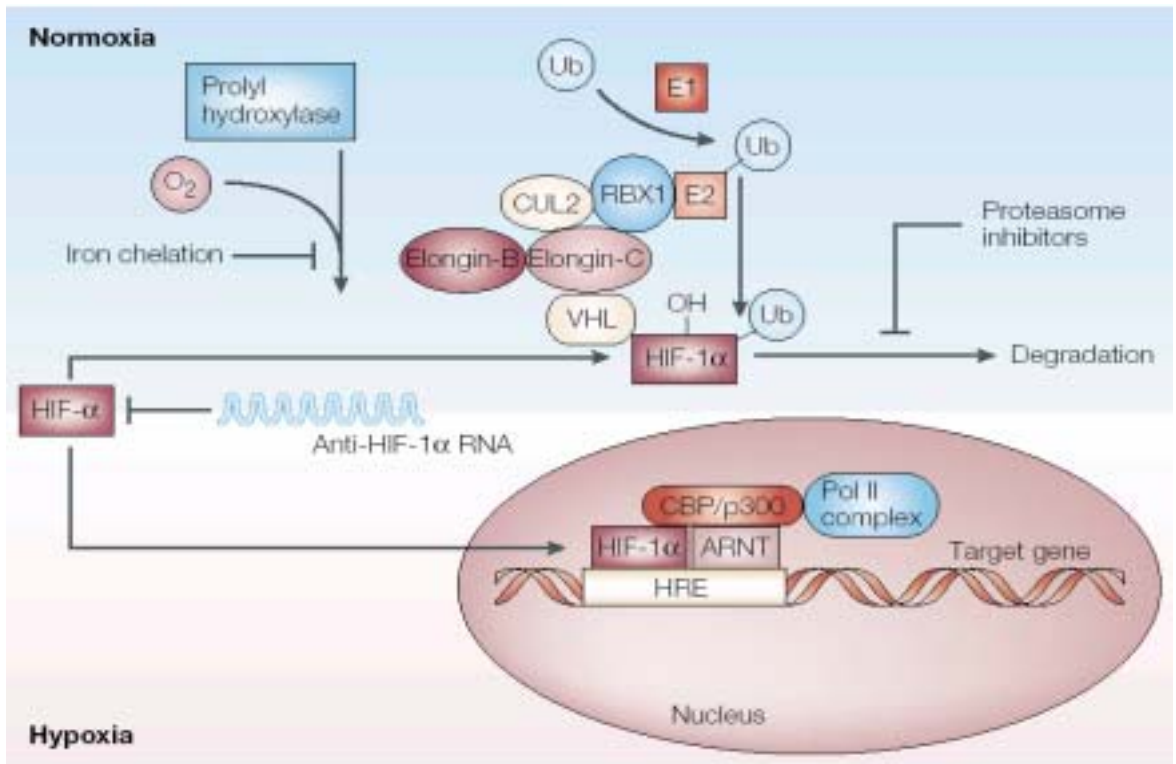
由實驗結果可推知，若是進一步研究低氧所造成的抗藥性，應當利用間歇性低氧 (NH 組)，並且在腫瘤發展前期時觀察，方為較佳的動物模式。

## Appendix 1. Hypoxia-mediated chemotherapeutic resistance

Hypoxia-induced	Resistance/Drugs affected
Direct effects	Drugs require cellular O <sub>2</sub> melphalan bleomycin etoposide
Indirect effects : proteomic changes	Cell-cycle slows down/arrests alkylating agents antimetabolites Elevated levels DNA repair enzymes alkylating agents platinum compounds Metallothioneins cisplatin
Indirect effects : genomic changes	Clonal selection : p53 mutations alkylating agents antimetabolites Multi-drug resistance adriamycin
Angiogenesis/abnormal vasculature	Reduced drug diffusion Impaired drug delivery
Extracellular acidosis	pH gradient weak base drugs

Shannon et al., Cancer Treat. Rev. 29, 297-307, 2003.

## Appendix 2. Regulation of HIF-1



Semenza GL, Nat. Rev. Cancer 3, 721-732, 2003.

Carmeliet and Jain, Nature. 407, 249-257, 2000.

## Appendix 3. Tissue localization and possible of ABC transporters

Common Name	Systematic name	Tissue	Non-chemotherapy substrates	Chemotherapy substrates (known and suspected)	Defects in human disease
PGP/MDR1	ABCB1	Intestine, liver, kidney, placenta, blood-brain barrier	Neutral and cationic organic compounds, many commonly used drugs	Doxorubicin, daunorubicin, vincristine, vinblastine, actinomycin-D, paclitaxel, docetaxel, etoposide, teniposide, bisantrene, homoharringtonine (STI-571)	None known; altered sensitivity to drugs
MDR2	ABCB4	Liver	Phosphatidylcholine, some hydrophobic drugs	Paclitaxel, vinblastine	Progressive familial intrahepatic cholestasis
MRP1	ABCC1	All tissues	Glutathione and other conjugates, organic anions, leukotriene C4	Doxorubicin, epirubicin, etoposide, vincristine, methotrexate	None known
MRP2, cMOAT	ABCC2	Liver, kidney, intestine	Similar to MRP1, non-bile salt organic anions	Methotrexate, etoposide, doxorubicin, cisplatin, vincristine, mitoxantrone	Dubin-Johnson syndrome
MRP3	ABCC3	Pancreas, kidney, intestine, liver, adrenal glands	Glucuronate and glutathione conjugates, bile acids	Etoposide, teniposide, methotrexate, cisplatin, vincristine, doxorubicin	None known
MRP4	ABCC4	Prostate, testis, ovary, intestine, pancreas, lung	Nucleotide analogues, organic anions	Methotrexate, thiopurines	None known
MRP5	ABCC5	Most tissues	Nucleotide analogues, cyclic nucleotides, organic anions	6-Mercaptopurine 6-Thioguanine	None known
MRP6	ABCC6	Liver, kidney	Anionic cyclic pentapeptide	Unknown	Pseudoxanthoma elasticum (substrate unknown)
MXR, BCRP, ABC-P	ABCG2	Placenta, intestine, breast, liver	Prazosin	Doxorubicin, daunorubicin, mitoxantrone, topotecan, SN-38	None known
BSEP, SPGP	ABCB11	Liver	Bile salts	Paclitaxel	Progressive familial intrahepatic cholestasis
ABCA2	ABCA2	Brain, monocytes	Steroid derivatives, lipids	Estramustine	Intracellular steroid transport

Gottesman, M. M. et al., Nat Rev Cancer. 48-58, 2002.

Table 1. Effects of hypoxia on body weight of BALB/c mice with or without CT26 tumor

	Body weight of mice bearing no tumors (g)	Body weight of mice bearing tumors (g)
Normoxia	30.09 ± 1.15 (7)	24.86 ± 3.01 (5)
Normobaric hypoxia	28.97 ± 0.84 (4)	24.79 ± 2.13 (5)
Hypobaric hypoxia	23.42 ± 1.00 #(5)	22.05 ± 1.65*(6)

Numbers in parentheses represent sample size. #p<0.05 of mice bearing no tumors compared with those of normoxic mice; \* p<0.05 in hypoxic mice bearing tumors compared with those in normoxic mice by one-way ANOVA followed by post hoc analysis. Values are the mean ± SD



Table 2. Effects of hypoxia on serum IL-6 level in BALB/c mice bearing CT26 tumor

	Serum IL-6 level in mice bearing no tumors (ng/ml)	Serum IL-6 level in mice bearing tumors (ng/ml)
Normoxia	3.09 ± 0.57 (3)	29.32 ± 3.41 # (7)
Normobaric hypoxia	3.41 ± 0.32 (4)	61.59 ± 5.56 # *(6)
Hypobaric hypoxia	2.18 ± 0.51 (5)	19.19 ± 2.34 # *(4)

Numbers in parentheses represent sample size. #p<0.05 in mice bearing tumors compared with those without tumors; \* p<0.05 in hypoxic mice bearing tumors compared with those in normoxic mice by one-way ANOVA followed by post hoc analysis. Values are the mean ± S.E.M.

Table 3. Effects of hypoxia on BALB/c mice bearing CT26 tumor

		14 days after tumor transplantation			21 days after tumor transplantation		
		N	NH	HH	N	NH	HH
Serum	VEGF	±	+	±	±	+	±
	IL-6	±	+	±	+	++	±
Tumor	HIF-1	-	++	++	+	±	+
	NF B	-	+	+	Not determined		
	VEGF (mRNA)	-	++	+	±	++	+
	VEGF	+	+	±	+	+	+
	CD31	Not determined			-	+	±
	TS (mRNA)	+	++	+	Not determined		
	TS	+	++	±	+	++	±
	mdr1 (mRNA)	+	+++	++	Not determined		
	Hsp 70	+	+	+	+	+	+
	Hsp 60	+	+	+	+	+	+

(A)



(B)

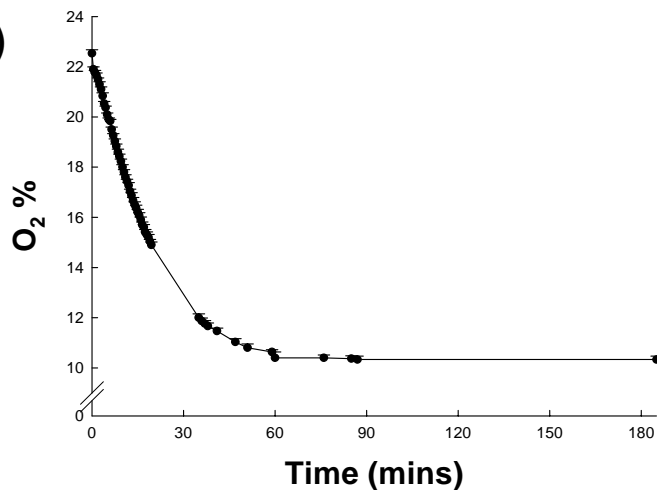


Figure 1. The normobaric hypoxic cage. (A) A picture of normobaric hypoxic cage which was continuously perfused with 10% oxygen and 90% nitrogen (1ml/min) for 10 hours/day. (B) Oxygen level of cage after the perfusion. One hour after the perfusion, the oxygen level reached 10% and maintained at the same level afterwards.

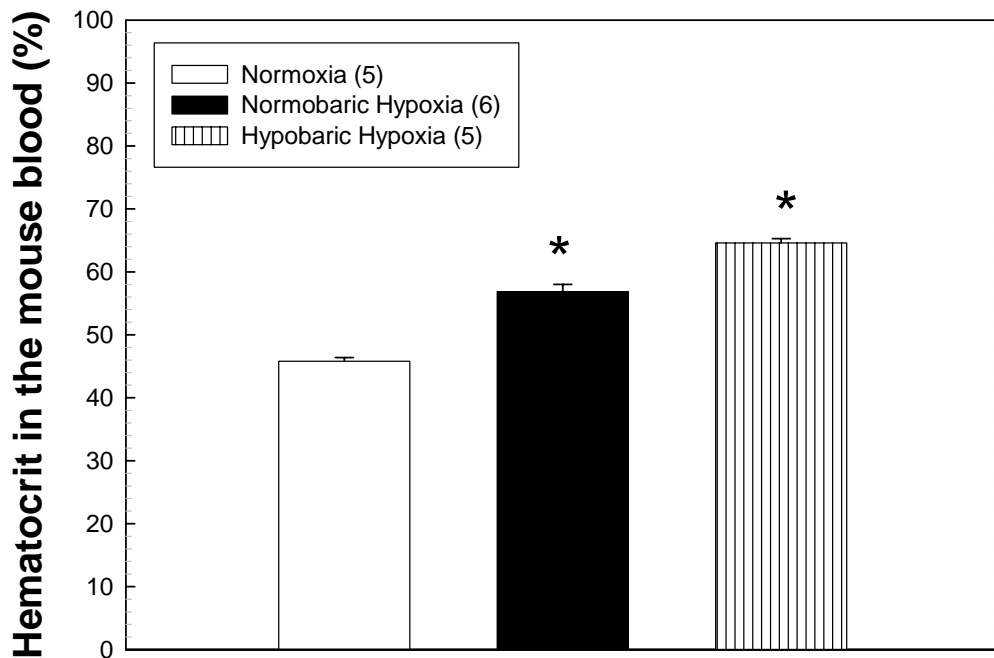


Figure 2. Effects of hypoxic treatments on hematocrit. Hypoxic treatment elevated hematocrit. Blood was directly withdrawn from eye and hematocrit was measured using heparinized micro-hematocrit capillary tube. Numbers in parentheses represent sample size. \*,  $p < 0.05$  in hypoxic mice compared with that in normoxic mice.

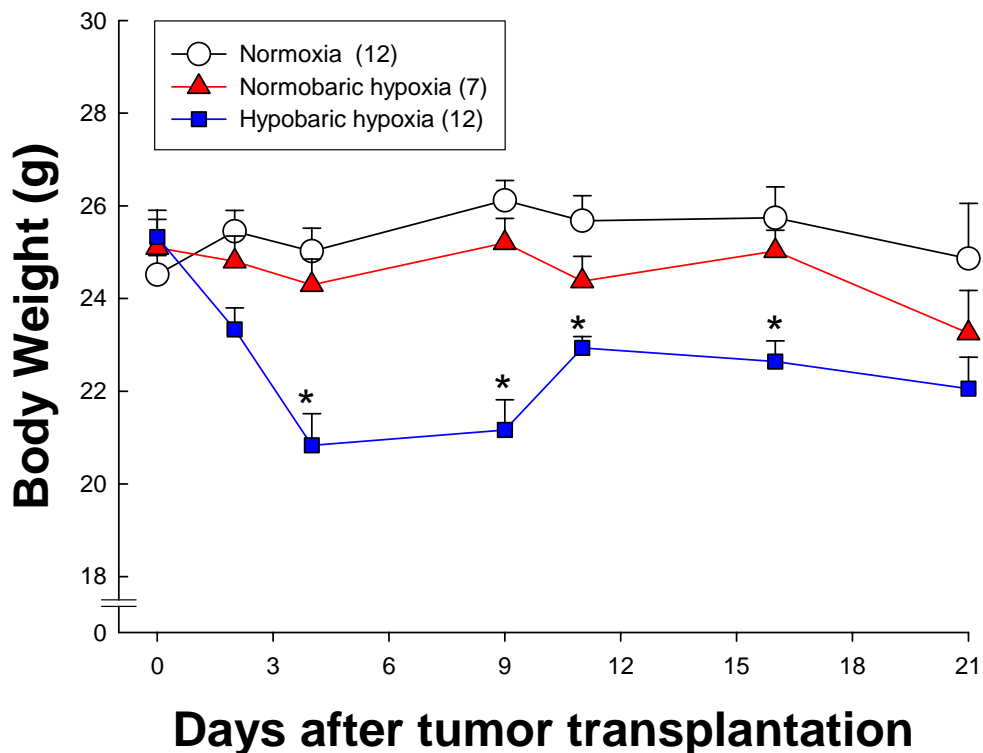


Figure 3. Effects of hypoxic treatments on body weight. During 21 days of hypobaric hypoxia exposure, body weight significantly decreased vs. the normoxic group at day 4-16. Numbers in parentheses represent sample size. \*,  $p < 0.05$  in hypoxic mice compared with that in normoxic mice.

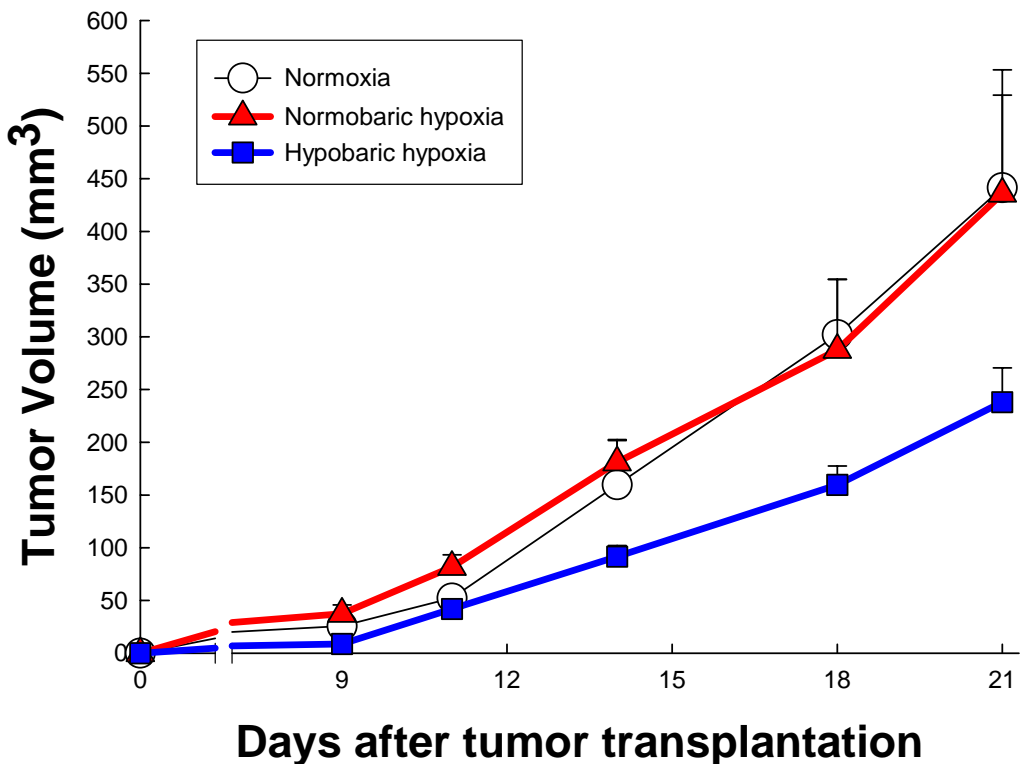


Figure 4. Effects of hypoxic treatments on tumor growth. Eleven days after CT26 cells inoculation, the tumor size was measured by a single person. Tumor volumes were estimated as  $0.5 \times (\text{largest diameter}) \times (\text{smallest diameter})^2$ . Similar results were obtained in duplicate experiments.  $n=5-6$  mice/group.

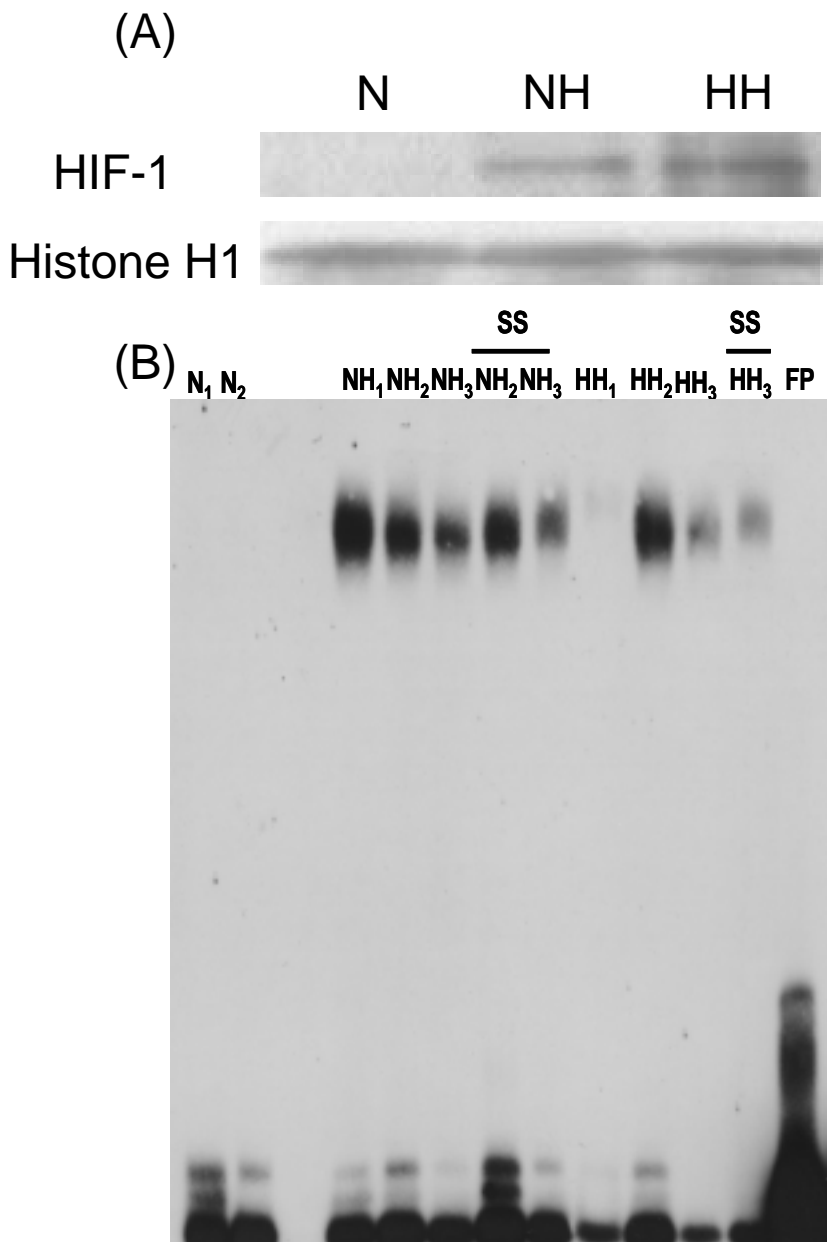


Figure 5. Effects of hypoxia on HIF-1 expression and activation at day 14. (A) Nuclear HIF-1 level was detected in tumors from normoxic (N), normobaric hypoxic (NH) and hypobaric hypoxic (HH) mice using Western blot. (B) EMSA of HIF-1 in tumors from normoxic and hypoxic-treated mice. The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. SS, supershift ; FP, free probe. Similar results were observed in duplicate experiments.

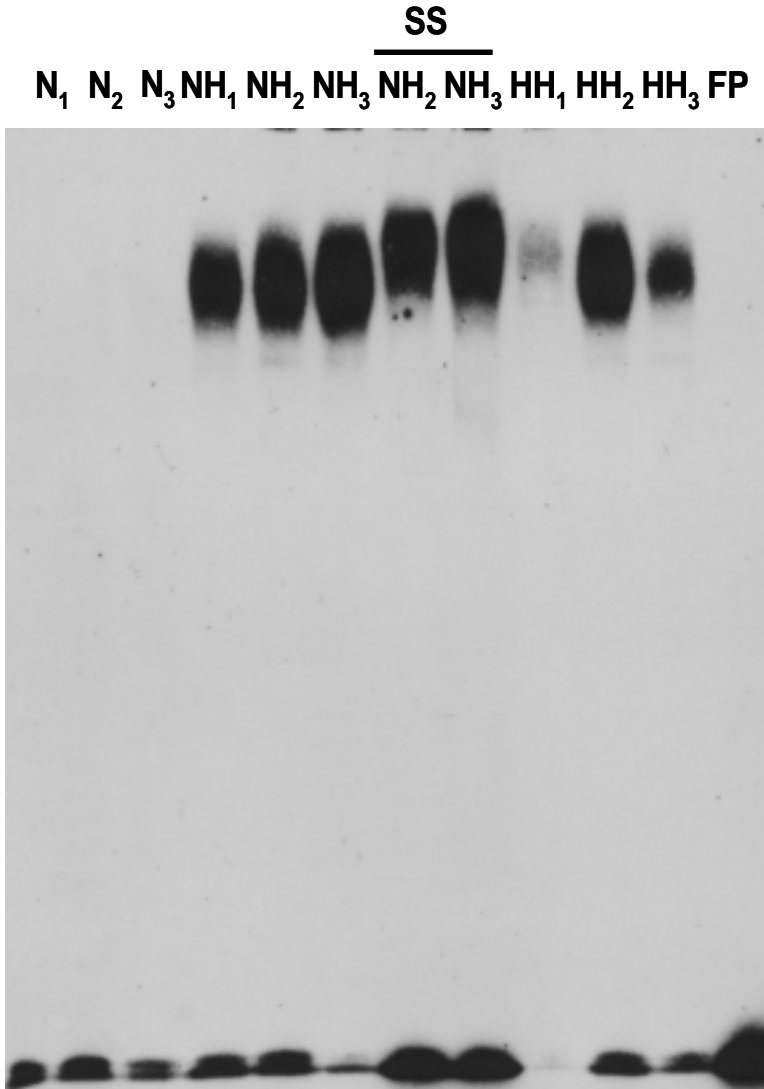


Figure 6. Effects of hypoxia on NFkB activation. EMSA of NFkB in tumors from normoxic and hypoxic-treated mice at day 14. The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. SS, supershift ; FP, free probe. Similar results were observed in duplicate experiments.



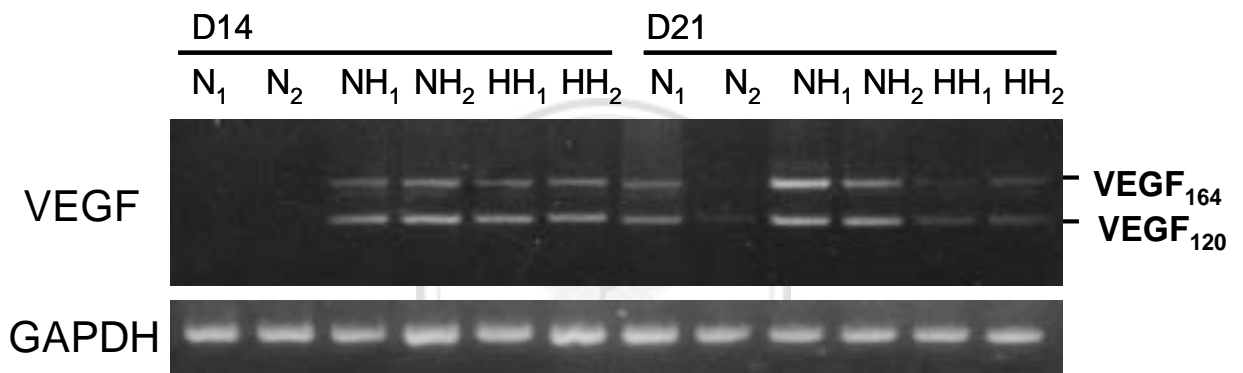
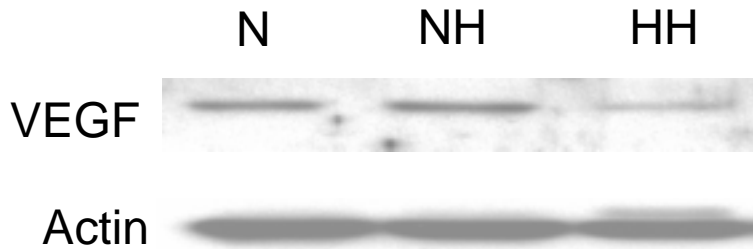


Figure 7. Effects of hypoxia on VEGF mRNA expression in tumors. Agarose gel (2%) was used for gel electrophoresis. The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 ; D21, day 21. Similar results were observed in duplicate experiments.

(A) D14



(B) D21

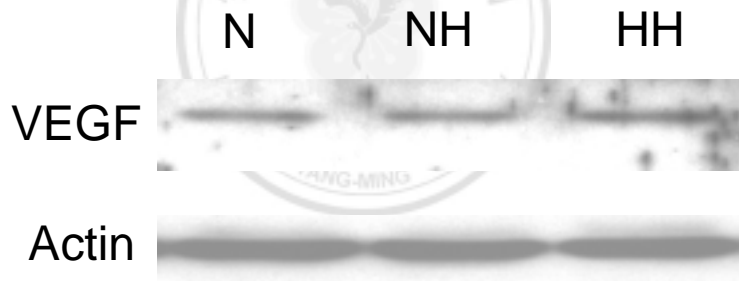


Figure 8. Effects of hypoxia on VEGF protein expression in tumors. VEGF protein level was detected in tumors using Western blot. The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 ; D21, day 21. Similar results were repeated six times.

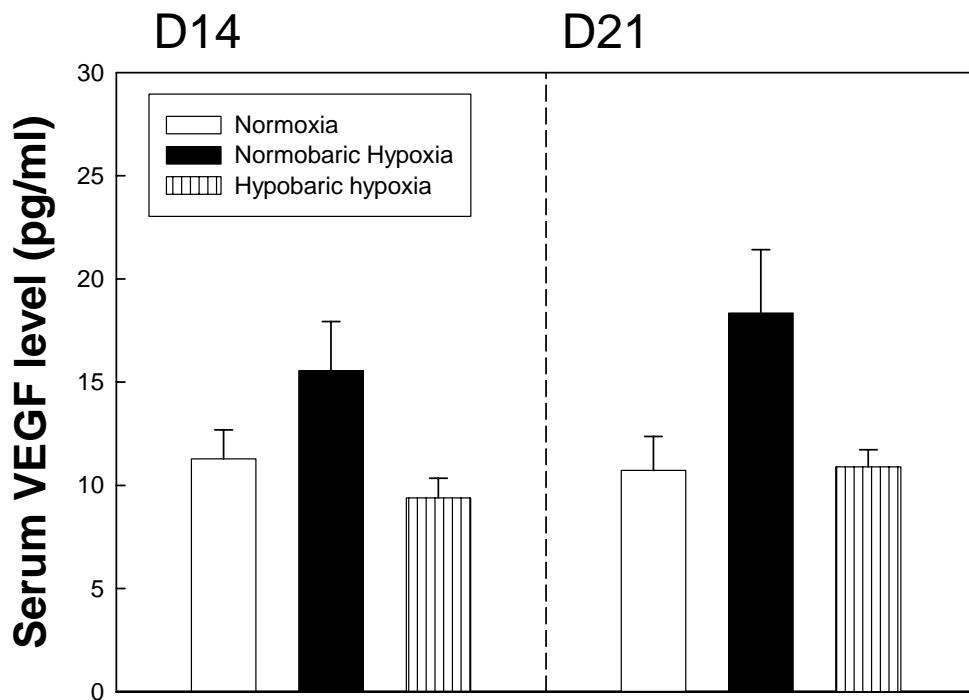


Figure 9. Effects of hypoxia on serum VEGF. The serum VEGF level was measured using ELISA. No significant difference was observed in three groups. The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 ; D21, day 21.

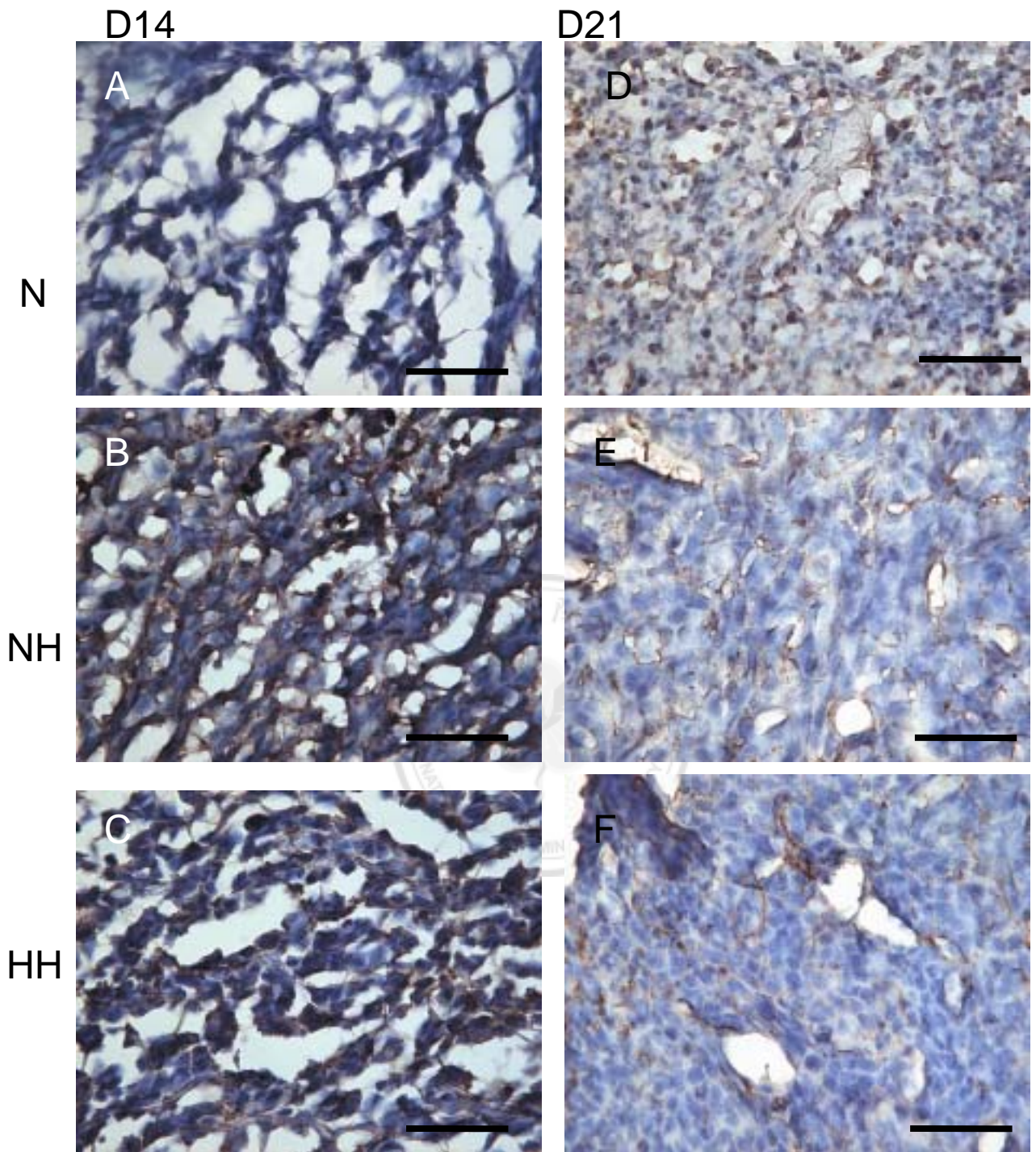


Figure 10. Effects of hypoxia on HIF-1 expression in tumors. Fourteen days (A-C) and twenty one days (D-E) after tumor implantation, tumors were removed, fixed and frozen sectioned for HIF-1 immunostaining. The abbreviation used are: N, normoxia (A, D); NH, normobaric hypoxia (B, E) and HH, hypobaric hypoxia (C, F). D14, day 14; D21; day 21. Results were repeated with three independent experiment. Scale bar = 50  $\mu$ m.

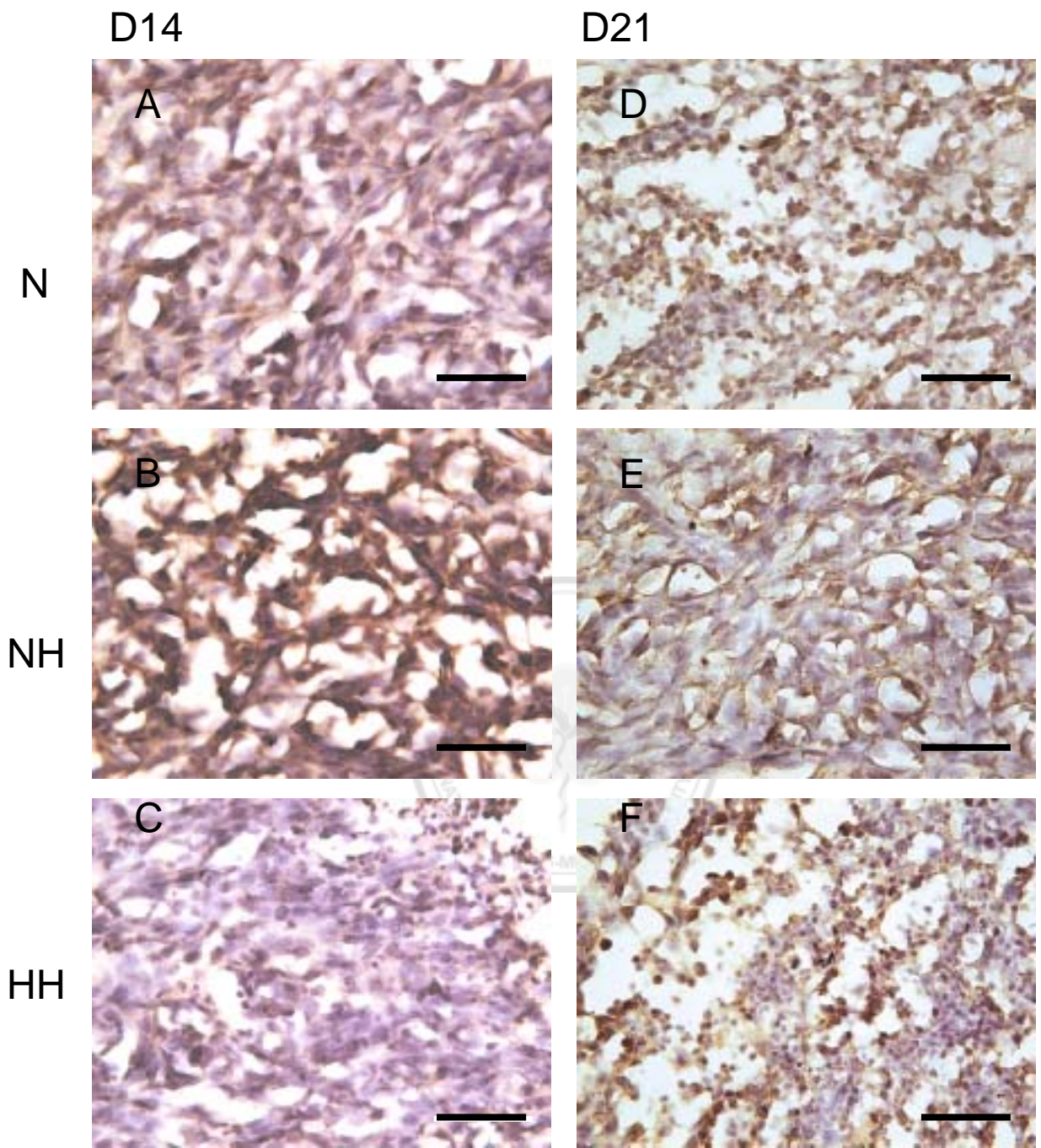


Figure 11. Effects of hypoxia on VEGF expression in tumors. Fourteen days (A-C) and twenty one days (D-E) after tumor implantation, tumors were removed, fixed and frozen sectioned for VEGF immunostaining. The abbreviation used are: N, normoxia (A, D); NH, normobaric hypoxia (B, E) and HH, hypobaric hypoxia (C, F). D14, day 14; D21; day 21. Results were repeated with three independent experiment. Scale bar = 50  $\mu$  m.

H&amp;E

CD 31

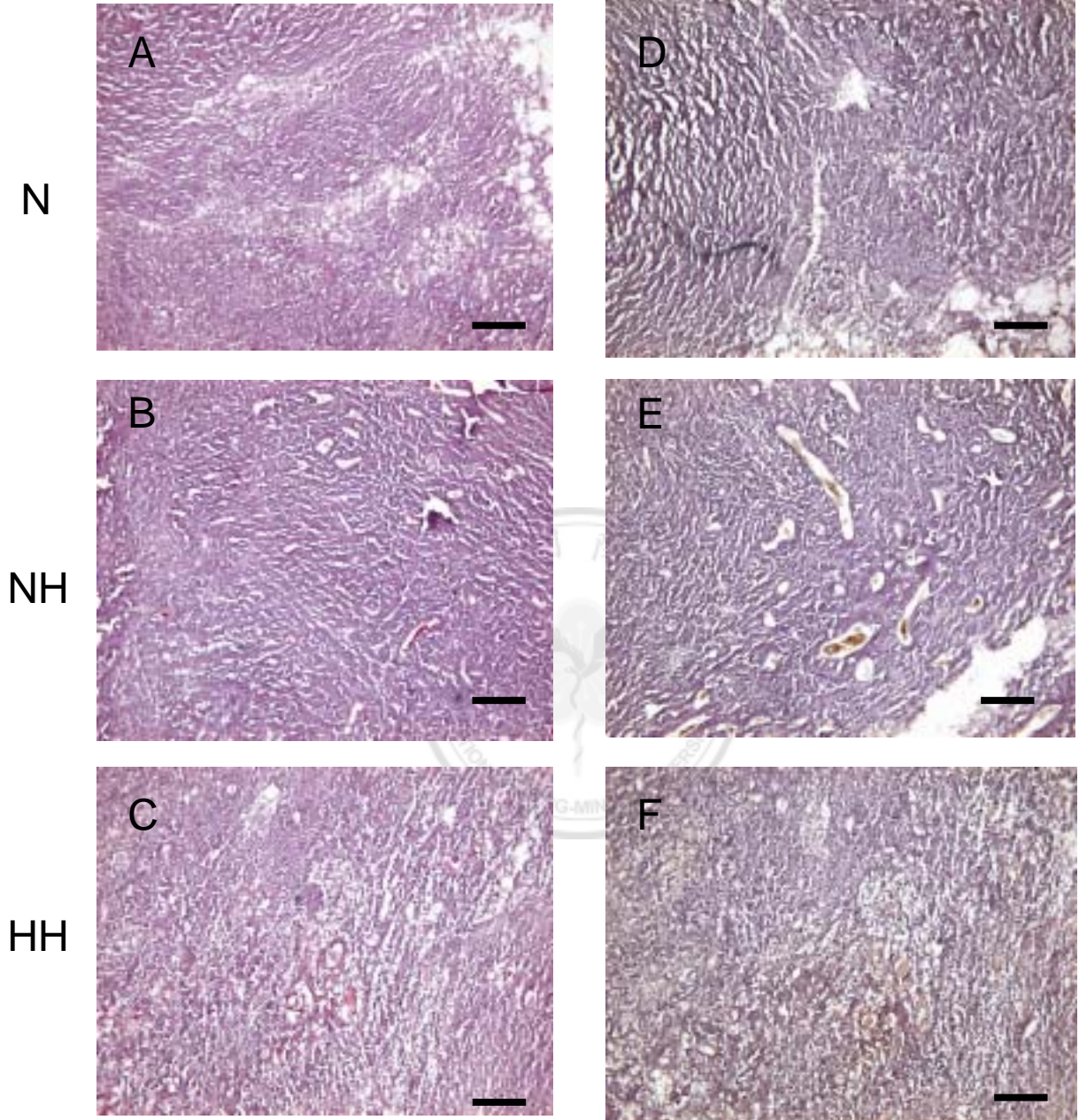


Figure 12. Effects of hypoxia on tumors. Twenty one days after tumor implantation, tumors were removed, fixed and frozen sectioned for H&E stain (A-C) and CD31 immunostaining (D-F). The abbreviation used are: N, normoxia (A, D); NH, normobaric hypoxia (B, E) and HH, hypobaric hypoxia (C, F). Results were repeated with three independent experiment. Scale bar = 10  $\mu$ m.

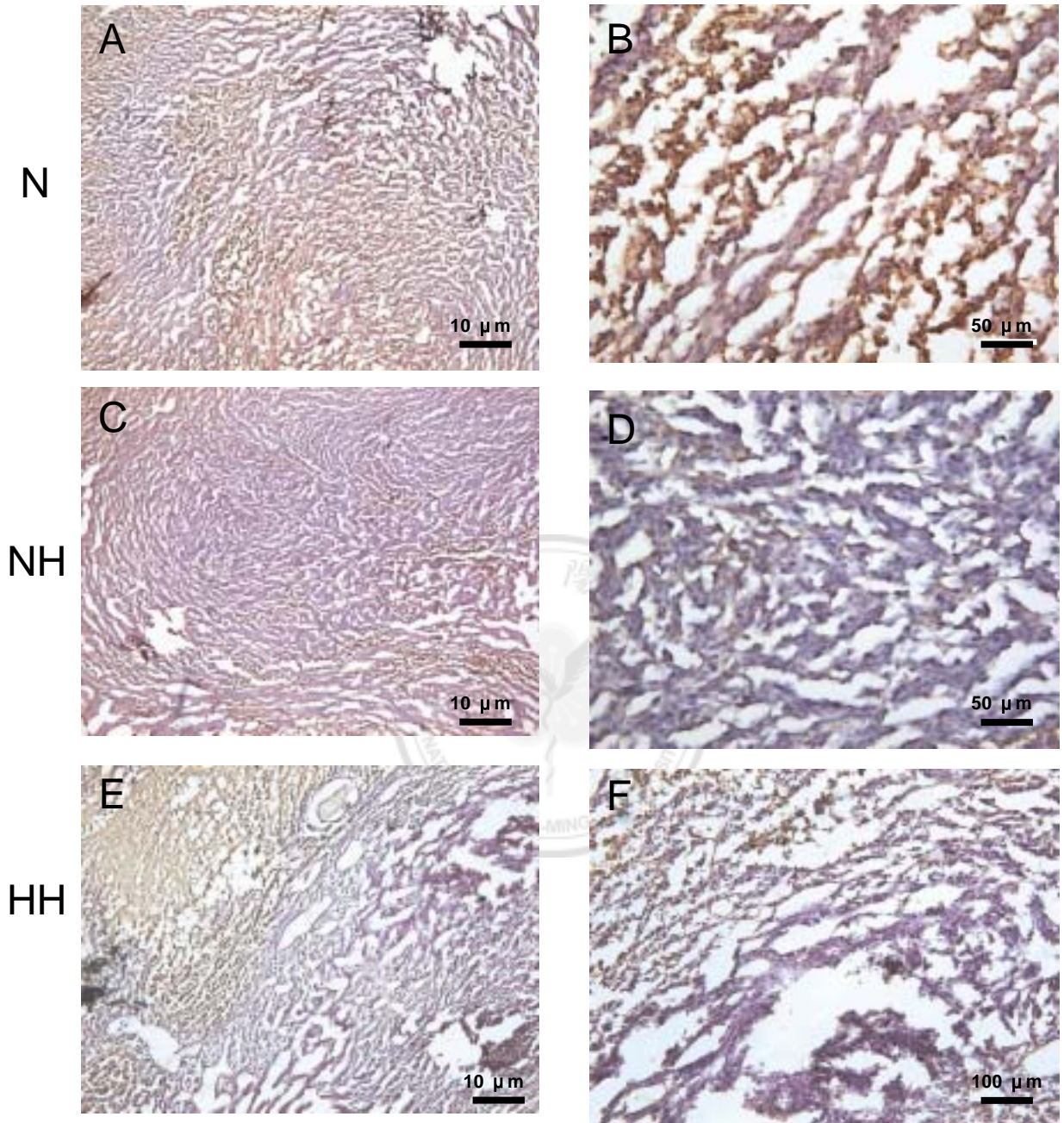


Figure 13. Effects of hypoxia on tumors. Twenty one days after tumor implantation, tumors were removed, fixed and frozen sectioned for Hypoxyprobe-1 immunostaining. The abbreviation used are: N, normoxia (A, B); NH, normobaric hypoxia (C, D) and HH, hypobaric hypoxia (E, F). Results were repeated with three independent experiments.

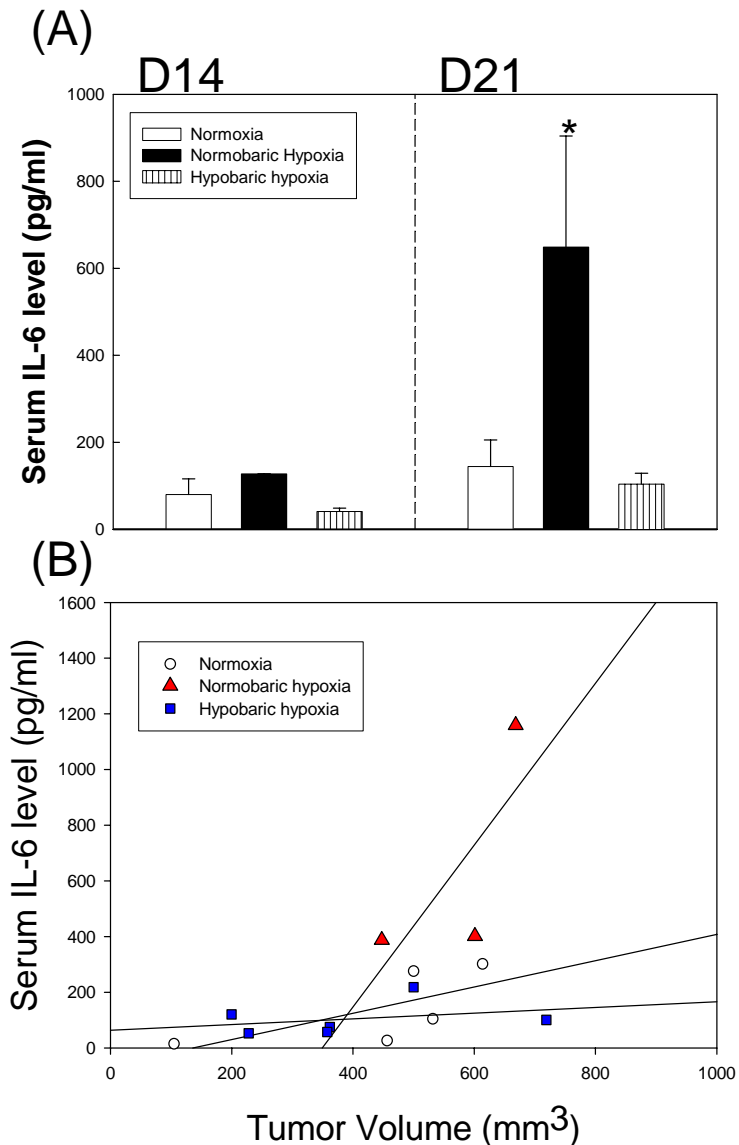
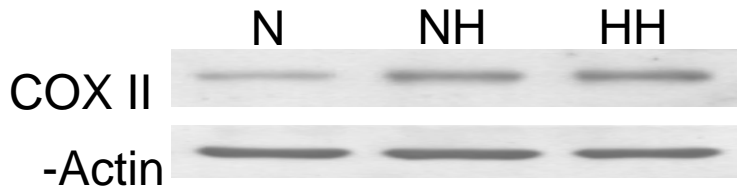


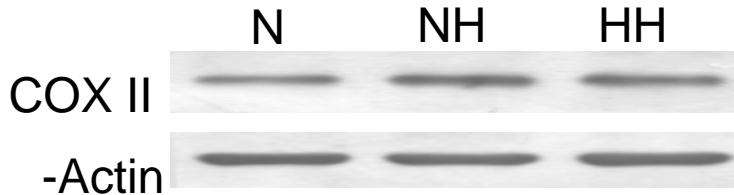
Figure 14. Effects of hypoxia on serum IL-6. (A) The serum IL-6 level was measured by ELISA. \* $p < 0.05$  in normobaric hypoxic mice bearing tumors compared with those in normoxic mice at day 21 by one-way ANOVA followed by post hoc analysis. (B) The relationship between IL-6 and tumor volume at day 14. The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 ; D21, day 21.



(A) D14



(B) D21



(C)

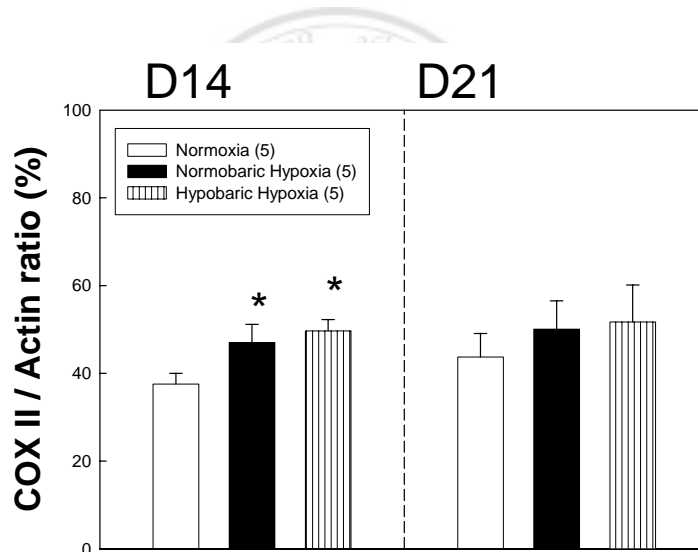


Figure 15. Effects of hypoxia on COX II protein expression in tumors. COX II protein level was detected in tumors using Western blot (A, B). The abbreviations used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 (A); D21, day 21 (B). (C) COX II level in tumors were normalized with -Actin. Numbers in parentheses represent sample size. \*,  $p < 0.05$  in hypoxic mice compared with that in normoxic mice.

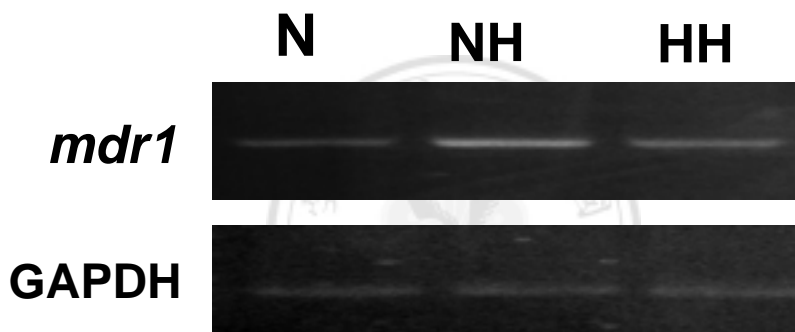


Figure 16. Effects of hypoxia on *mdr1* mRNA expression in tumors. *mdr1* mRNA level was detected in tumors at day 13 using RT-PCR. The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia.

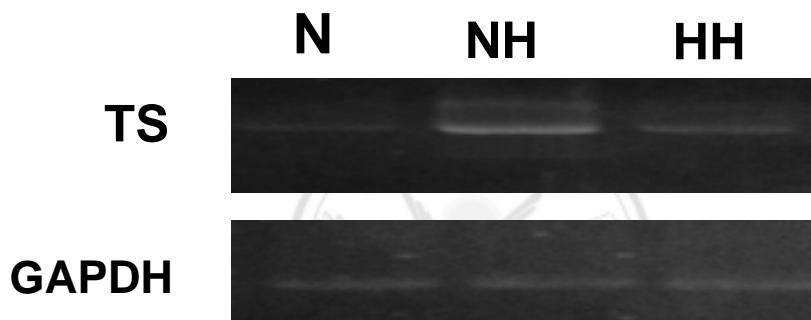
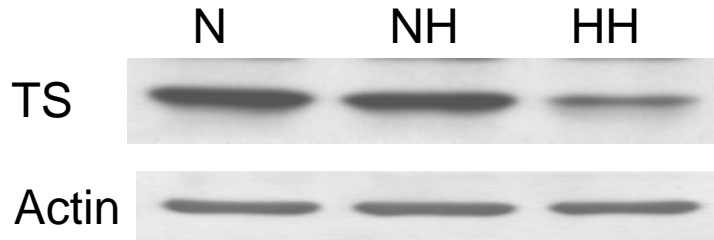
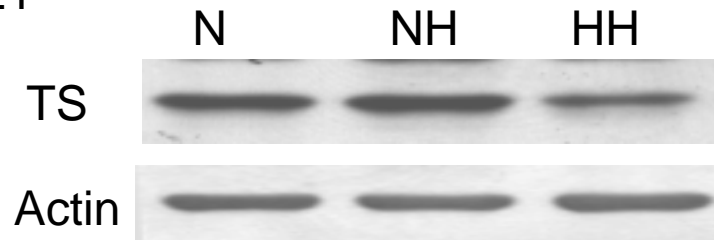


Figure 17. Effects of hypoxia on thymidylate synthase (TS) mRNA expression in tumors. TS mRNA level was detected in tumors at day 13 using RT-PCR . The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia.

(A) D14



(B) D21



(C)

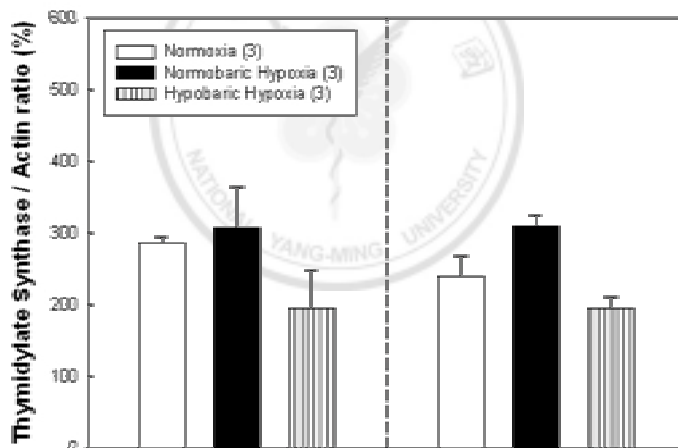


Figure 18. Effects of hypoxia on thymidylate synthase (TS) protein expression in tumors. TS protein level was detected in tumors using Western blot (A, B). The abbreviations used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 (A); D21, day 21 (B). (C) TS level in tumors were normalized with Actin. Numbers in parentheses represent sample size.

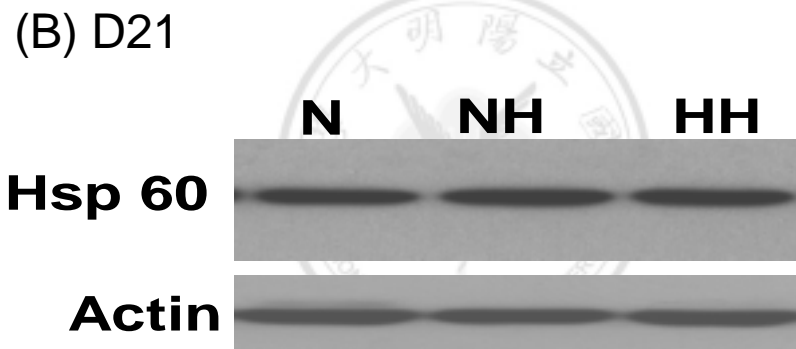
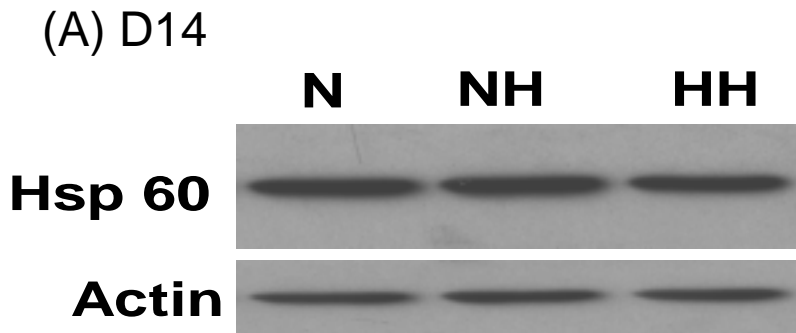


Figure 19. Effects of hypoxia on heat shock protein (Hsp) 60 protein expression in tumors. Hsp 60 protein level was detected in tumors using Western blot (A, B). The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 (A); D21, day 21 (B).

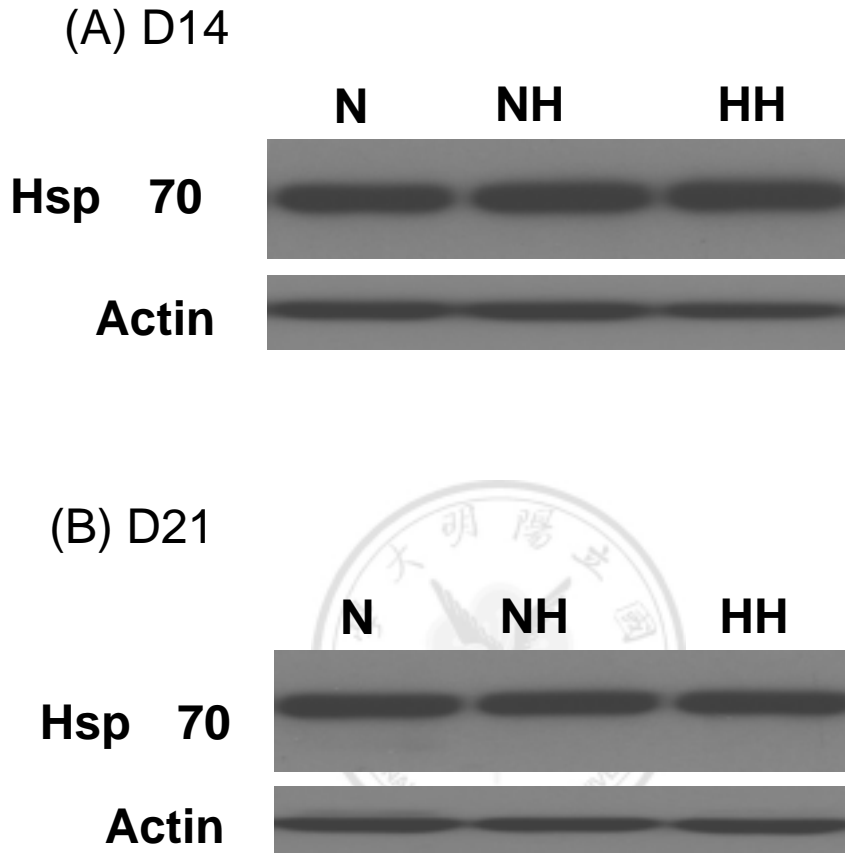


Figure 20. Effects of hypoxia on heat shock protein (Hsp) 70 protein expression in tumors. Hsp 70 protein level was detected in tumors using Western blot (A, B). The abbreviation used are: N, normoxia; NH, normobaric hypoxia and HH, hypobaric hypoxia. D14, day 14 (A); D21, day 21 (B).

## 參 考 文 獻

陳玟翰。2004。缺氧對小鼠大腸直腸癌細胞生長之影響。國立陽明大學生理研究所。碩士論文。

許純慧。2001。大直腸癌細胞抗藥反應之相關基因表現之研究及其臨床應用。長庚大學基礎醫學研究所 碩士論文。

Birot, O.J., Peinnequin, A., Simler, N., van Cuyck-Gandre, H., Hamel, R., and Bigard, X.A. (2004). Vascular endothelial growth factor expression in heart of rats exposed to hypobaric hypoxia: differential response between mRNA and protein. *J Cell Physiol* 200, 107-115.

Blouw, B., Song, H., Tihan, T., Bosze, J., Ferrara, N., Gerber, H.P., Johnson, R.S., and Bergers, G. (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4, 133-146.

Brandes, L.M., Lin, Z.P., Patierno, S.R., and Kennedy, K.A. (2001). Reversal of physiological stress-induced resistance to topoisomerase II inhibitors using an inducible phosphorylation site-deficient mutant of I kappa B alpha. *Mol Pharmacol* 60, 559-567.

Brizel, D.M., Scully, S.P., Harrelson, J.M., Layfield, L.J., Bean, J.M., Prosnitz, L.R., and Dewhirst, M.W. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56, 941-943.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Chavez, J.C., Agani, F., Pichiule, P., and LaManna, J.C. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor-1-alpha in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 89, 1937-1942.

- Chevillard, S., Vielh, P., Vallidire, P., Robert, J., and Marie, J.P. (1996). [A study of the expression of MDR1 gene in solid tumors. Initial results of a multicenter evaluation]. *Bull Cancer* 83, 626-633.
- Chien, C.T., Chen, C.F., Hsu, S.M., Lee, P.H., and Lai, M.K. (1999). Protective mechanism of preconditioning hypoxia attenuates apoptosis formation during renal ischemia/reperfusion phase. *Transplant Proc* 31, 2012-2013.
- Chiral, M., Grongnet, J.F., Plumier, J.C., and David, J.C. (2004). Effects of hypoxia on stress proteins in the piglet brain at birth. *Pediatr Res* 56, 775-782.
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., and Colgan, S.P. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 62, 3387-3394.
- Comerford, K.M., Cummins, E.P., and Taylor, C.T. (2004). c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hypoxia-inducible factor 1-alpha-dependent P-glycoprotein expression in hypoxia. *Cancer Res* 64, 9057-9061.
- Dannenber, A.J., Altorki, N.K., Boyle, J.O., Dang, C., Howe, L.R., Weksler, B.B., and Subbaramaiah, K. (2001). Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2, 544-551.
- Deveci, D., Marshall, J.M., and Egginton, S. (2002). Chronic hypoxia induces prolonged angiogenesis in skeletal muscles of rat. *Exp Physiol* 87, 287-291.
- Dong, Z., and Wang, J. (2004). Hypoxia selection of death-resistant cells. A role for Bcl-X(L). *J Biol Chem* 279, 9215-9221.
- Ehrnrooth, E., von der Maase, H., Sorensen, B.S., Poulsen, J.H., and Horsman, M.R. (1999). The ability of hypoxia to modify the gene expression of thymidylate synthase in tumour cells in vivo. *Int J Radiat Biol* 75, 885-891.
- Ellis, L.M., and Fidler, I.J. (1996). Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 32A, 2451-2460.



Erler, J.T., Cawthorne, C.J., Williams, K.J., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I.J., and Dive, C. (2004). 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* 24, 2875-2889.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.

Folkman, J., and Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934.

Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., and Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7251-7255.

Goldberg, M.A., Dunning, S.P., and Bunn, H.F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242, 1412-1415.

Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2, 48-58.

Gupta, S., and Knowlton, A.A. (2002). Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation* 106, 2727-2733.

Gupta, S., and Knowlton, A.A. (2005). HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med* 9, 51-58.

Herman, T.S., Teicher, B.A., and Collins, L.S. (1988). Effect of hypoxia and acidosis on the cytotoxicity of four platinum complexes at normal and hyperthermic temperatures. *Cancer Res* 48, 2342-2347.

- Herman, T.S., Teicher, B.A., Holden, S.A., and Collins, L.S. (1989). Interaction of hyperthermia and radiation in murine cells: hypoxia and acidosis in vitro, tumor subpopulations in vivo. *Cancer Res* 49, 3338-3343.
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K.H., and Kishimoto, T. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5490-5494.
- Hockel, M., Knoop, C., Schlenger, K., Vorndran, B., Baussmann, E., Mitze, M., Knapstein, P.G., and Vaupel, P. (1993). Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 26, 45-50.
- Hyun, J.Y., Chun, Y.S., Kim, T.Y., Kim, H.L., Kim, M.S., and Park, J.W. (2004). Hypoxia-inducible factor 1-alpha-mediated resistance to phenolic anticancer. *Chemotherapy* 50, 119-126.
- Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1-alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 17, 2115-2117.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2, 301-310.
- Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., and et al. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332, 83-85.
- Kinoshita, T., Ito, H., and Miki, C. (1999). Serum interleukin-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 85, 2526-2531.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74, 1-10.
- Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258, 593-597.

Koch, S., Mayer, F., Honecker, F., Schittenhelm, M., and Bokemeyer, C. (2003). Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. *Br J Cancer* 89, 2133-2139.

Koong, A.C., Chen, E.Y., and Giaccia, A.J. (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 54, 1425-1430.

Kuo, N.T., Benhayon, D., Przybylski, R.J., Martin, R.J., and LaManna, J.C. (1999). Prolonged hypoxia increases vascular endothelial growth factor mRNA and protein in adult mouse brain. *J Appl Physiol* 86, 260-264.

Kuwahira, I., Gonzalez, N.C., Heisler, N., and Piiper, J. (1993). Changes in regional blood flow distribution and oxygen supply during hypoxia in conscious rats. *J Appl Physiol* 74, 211-214.

Kuwano, M., Toh, S., Uchiumi, T., Takano, H., Kohno, K., and Wada, M. (1999). Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance. *Anticancer Drug Des* 14, 123-131.

La Padula, P., and Costa, L.E. (2005). Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. I. Mechanical activity. *J Appl Physiol* 98, 2363-2369.

Le, Q.T., Denko, N.C., and Giaccia, A.J. (2004). Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 23, 293-310.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.

Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R., and Berenson, J. (1995). Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* 162, 248-255.

Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Stearns, M.E., Holland, J.F., Claffey, K., and

Levine, A.C. (1999). Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 17, 687-694.

Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yu, K., Yao, S., and Levine, A.C. (2005). Cyclooxygenase-2 suppresses hypoxia-induced apoptosis via a combination of direct and indirect inhibition of p53 activity in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem* 280, 3817-3823.

Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330-338.

Lukiw, W.J., Ottlecz, A., Lambrou, G., Grueninger, M., Finley, J., Thompson, H.W., and Bazan, N.G. (2003). Coordinate activation of HIF-1 and NF-kappaB DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4163-4170.

Maihofner, C., Charalambous, M.P., Bhambra, U., Lightfoot, T., Geisslinger, G., and Gooderham, N.J. (2003). Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 24, 665-671.

Makino, M., Shoji, H., Takemoto, D., Honboh, T., Nakamura, S., Kurayoshi, K., and Kaibara, N. (2001). Comparative study between daily and 5-days-a-week administration of oral 5-fluorouracil chemotherapy in mice: determining the superior regimen. *Cancer Chemother Pharmacol* 48, 370-374.

Meberg, A. (1981). Somatic growth and brain development. Effects of intrauterine malnutrition and hypoxia in mice. *Biol Neonate* 39, 272-284.

Miki, S., Iwano, M., Miki, Y., Yamamoto, M., Tang, B., Yokokawa, K., Sonoda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett* 250, 607-610.

Miyamoto, S., and Verma, I.M. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv Cancer*

Res 66, 255-292.

Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., and Dewhirst, M.W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5, 429-441.

Nukatsuka, M., Fujioka, A., Saito, H., Uchida, J., Nakano, K., Takeda, S., and Unemi, N. (1996). Prolongation of survival period and improvement of cancer cachexia by long-term administration of UFT. *Cancer Lett* 104, 197-203.

Oka, M., Iizuka, N., Yamamoto, K., Gondo, T., Abe, T., Hazama, S., Akitomi, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Ooba, Y., Ishihara, T., and Suzuki, T. (1996). The influence of interleukin-6 on the growth of human esophageal cancer cell lines. *J Interferon Cytokine Res* 16, 1001-1006.

Paley, P.J., Staskus, K.A., Gebhard, K., Mohanraj, D., Twiggs, L.B., Carson, L.F., and Ramakrishnan, S. (1997). Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 80, 98-106.

Patel, V.A., Dunn, M.J., and Sorokin, A. (2002). Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 277, 38915-38920.

Pavlicek, V., Marti, H.H., Grad, S., Gibbs, J.S., Kol, C., Wenger, R.H., Gassmann, M., Kohl, J., Maly, F.E., Oelz, O., Koller, E.A., and Schirlo, C. (2000). Effects of hypobaric hypoxia on vascular endothelial growth factor and the acute phase response in subjects who are susceptible to high-altitude pulmonary oedema. *Eur J Appl Physiol* 81, 497-503.

Pennica, D., Wood, W.I., and Chien, K.R. (1996). Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 81-91.

Peters, G.J., Backus, H.H., Freemantle, S., van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., van der Wilt, C.L., Smid, K., Lunec, J., Calvert, A.H., Marsh, S., McLeod, H.L., Bloemena, E., Meijer, S., Jansen, G., van Groeningen, C.J., and Pinedo, H.M. (2002). Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta*

1587, 194-205.

Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., and Kaziro, Y. (1988). Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol* 8, 3546-3549.

Schmoll, H.J., Buchele, T., Grothey, A., and Dempke, W. (1999). Where do we stand with 5-fluorouracil? *Semin Oncol* 26, 589-605.

Schroter, W., and Eber, S.W. (1989). [Molecular pathology of the erythrocyte membrane. Erythrocyte membrane defects as a cause of congenital hemolytic anemia]. *Monatsschr Kinderheilkd* 137, 368-379.

Semenza, G.L. (2000). HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev* 19, 59-65.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.

Shannon, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Condon, C.M., and Toomey, D. (2003). Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 29, 297-307.

Shao, J., Sheng, H., Inoue, H., Morrow, J.D., and DuBois, R.N. (2000). Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 275, 33951-33956.

Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural,

cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69, 145-182.

Stickney, J.C., and Van Liere, E.J. (1953). Acclimatization to low oxygen tension. *Physiol Rev* 33, 13-34.

Stroka, D.M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R.H., Neil, D.A., Bauer, C., Gassmann, M., and Candinas, D. (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 15, 2445-2453.

Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A.J. (2003). Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 24, 96-102.

Sun, X., Kanwar, J.R., Leung, E., Vale, M., and Krissansen, G.W. (2003). Regression of solid tumors by engineered overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and antisense hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Gene Ther* 10, 2081-2089.

Suzuki, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Ichikawa, H., Shirakura, R., and Matsuda, H. (1998). Overexpressed heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1129-1136.

Taga, T. (1996). Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J Neurochem* 67, 1-10.

Teicher, B.A. (1994). Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 13, 139-168.

Terui, K., Haga, S., Enosawa, S., Ohnuma, N., and Ozaki, M. (2004). Hypoxia/re-oxygenation-induced, redox-dependent activation of STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) confers resistance to apoptotic cell death via hsp70 induction. *Biochem J* 380, 203-209.

Unruh, A., Ressel, A., Mohamed, H.G., Johnson, R.S., Nadrowitz, R., Richter, E., Katschinski, D.M., and Wenger, R.H. (2003). The hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 22, 3213-3220.

Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S., Jr. (1996). TNF- and cancer

therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-787.

Wang, C.Y., Cusack, J.C., Jr., Liu, R., and Baldwin, A.S., Jr. (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 5, 412-417.

Wartenberg, M., Ling, F.C., Muschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., Petrat, K., Putz, V., Hescheler, J., and Sauer, H. (2003). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J* 17, 503-505.

Wartenberg, M., Gronczynska, S., Bekhite, M.M., Saric, T., Niedermeier, W., Hescheler, J., and Sauer, H. (2005). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species. *Int J Cancer* 113, 229-240.

Xiong, H.Q., Abbruzzese, J.L., Lin, E., Wang, L., Zheng, L., and Xie, K. (2004). NF-kappaB activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 108, 181-188.

Yamagiwa, Y., Marienfeld, C., Meng, F., Holcik, M., and Patel, T. (2004). Translational regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein by interleukin-6: a novel mechanism of tumor cell survival. *Cancer Res* 64, 1293-1298.