

分类号:
学 号: 20172114153

密 级: 内部 3 年
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



SR-B1 通过调控 HIF 信号通路促进肾透明细胞癌 增殖分子机制研究

学 位 申 请 人	赵为璘
指 导 教 师	邹 泓
申 请 学 位 类 别	临床医学硕士
专 业 名 称	临床病理学
研 究 方 向	肿瘤病理诊断
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2020 年 4 月

分类号：
学 号：20172114153

密 级：内部 3 年
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



SR-B1 通过调控 HIF 信号通路促进肾透明细胞癌 增殖分子机制研究

学 位 申 请 人	赵为璘
指 导 教 师	邹 泓
申 请 学 位 类 别	临床医学硕士
专 业 名 称	临床病理学
研 究 方 向	肿瘤病理诊断
所 在 学 院	医 学 院

中国·新疆·石河子

2020 年 4 月

**The mechanism of SR-B1 promoting the proliferation of renal
clear cell carcinoma through HIF signaling pathway**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Zhaoweilin

(Clinical pathology)

Dissertation Supervisor: Zouhong

April, 2020

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：赵为磷

时间：2020年6月7日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：赵为磷

时间：2020年6月7日

导师签名：郑斌

时间：2020年6月7日

摘 要

目的: 在前期工作基础上, 探讨 SR-B1 能否通过 HIF 信号途径促进肾透明细胞癌的增殖并阐明其分子机制。

方法: (1) 结合课题组前期结果, SR-B1 在肾小管上皮细胞 HK-2 中低表达, 肾透明癌细胞 786-0 中高表达, 故应用 SR-B1 过表达质粒转染提高肾小管上皮细胞 HK-2 中 SR-B1 的表达, 反向应用 SR-B1 抑制剂 BLT4 抑制肾透明癌细胞 786-0 中 SR-B1 的表达后, 检测、比较处理前后各组细胞 SR-B1 蛋白和 HIF-1a 蛋白的表达差异; (2) 用免疫共沉淀实验 (CO-IP) 方法检测在肾透明细胞癌中, SR-B1 与 HIF 信号通路相关蛋白 HIF-1a 是否存在相互作用; (3) 在 SR-B1 抑制剂 BLT4 抑制 786-0 细胞内 SR-B1 表达后, 应用 HIF-1a 过表达质粒转染提高 786-0 细胞中 HIF-1a 的表达, CCK-8 及 Western blot 法检测、比较是否可减少 BLT4 对细胞增殖以及 SR-B1 和 HIF-1a 的影响; (4) 应用质粒转染 HK-2 细胞以提高 SR-B1 的表达后, 加入 HIF1a 抑制剂 IDF-11774, CCK-8 法及 Western blot 法检测、比较是否可以抵消或部分减少 HK-2 细胞中 SR-B1 过表达后对细胞增殖以及 SR-B1 和 HIF-1a 的表达影响。

结果: (1) HK-2 细胞过表达 SR-B1 质粒后, HIF-1a 和 SR-B1 蛋白表达水平均较对照组升高, 差异具有统计学意义; SR-B1 特异性抑制剂 BLT4 处理 786-0 细胞后, HIF-1a 和 SR-B1 的蛋白表达水平均较未处理组降低, 差异具有统计学意义; (2) 在 786-0 细胞中, SR-B1 与 HIF 通路相关分子 HIF-1a 存在蛋白互作; (3) SR-B1 特异性抑制剂 BLT4 可以降低 786-0 细胞中 HIF-1a 和 SR-B1 的蛋白表达水平, 并抑制细胞的增殖; HIF-1a 过表达质粒可以有效的阻断 SR-B1 抑制剂 BLT4 对 HIF-1a 蛋白的抑制作用, 并提升细胞的存活率, 但其对 SR-B1 的蛋白表达无影响, 差异均具有统计学意义; (4) SR-B1 过表达质粒可以升高 HK-2 细胞中 HIF-1a 和 SR-B1 的蛋白表达水平, 并提高细胞的存活率; HIF-1a 特异性抑制剂 IDF-11774 可以阻断 SR-B1 过表达质粒对 HIF-1a 蛋白的升高作用, 及对增殖的影响, 但 SR-B1 的蛋白表达水平不受影响, 差异均具有统计学意义。

结论: SR-B1 可以调控 HIF 信号通路的关键分子 HIF-1a, 促进肾透明细胞癌的增殖。

关键词: 肾透明细胞癌; SR-B1; HIF-1a; HIF 信号途径

论文类型: A (基础研究)

Abstract

Objective: On the basis of previous studies, this study aimed to investigate whether the SR-B1 promoted the development of renal clear cell carcinoma through HIF signaling pathway and elucidate its molecular mechanism.

Methods: (1) Overexpression of SR-B1 gene in HK-2 cells, Western blot was used to detect the expression of HIF-1a protein. 786-0 cells were treated with the inhibitor of SR-B1(BLT4).Western blot was used to detect the expression of HIF-1a; (2)Immunoprecipitation assay(CO-IP) method was used to test the proteininteractions between SR-B1 and HIF-1a in 786-0 cells; (3)786-0 cells were transfected with the HIF-1a overexpression plasmid, after the expression of HIF-1a was increased, the cells were treated with BLT4. CCK-8 experiment was used to detect the changes of proliferation; Western blot experiment was used to detect and compare the expression of SR-B1 and HIF-1a protein; (4) The normal renal tubular epithelial cells HK-2 were transfected with SR-B1 overexpression plasmid, then, the cells were treated with IDF-11774. CCK-8 experiment was used to detect the changes of proliferation; Western Blot experiment was used to detect and compare the expression of SR-B1 and HIF-1a protein.

Results: (1) SR-B1 overexpression plasmid increased the expression of HIF-1a protein in HK-2 cells; SR-B1 inhibitor(BLT4) decreased the expression of HIF-1a protein in 786-0 cells. These differences were statistically significant; (2) There are protein interactions between SR-B1 and HIF-1a protein in 786-0 cells; (3) BLT4 can reduce the expression of SR-B1 and HIF-1a protein in 786-0 cells and inhibit the proliferation of cells; HIF-1a overexpression plasmid blocked the effect of BLT4, increased the expression of HIF-1a protein and cell viability.These differences were statistically significant;(4) SR-B1 overexpression plasmid increased the expression of SR-B1 and HIF-1a protein in HK-2 cells and increased cell viability; HIF-1a inhibitor(IDF-11774) blocked the effect of SR-B1 overexpression plasmid and decreased the expression of HIF-1a protein and cell viability. These differences were statistically significant.

Conclusions: SR-B1 may promote the proliferation of clear cell renal cancer cells(ccRCC) through HIF signaling pathway.

Key words: Renal clear cell carcinoma, SR-B1, HIF-1a, HIF signaling pathway

Type of thesis: A (Basic research)

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略语表.....	V
前 言.....	1
材 料 与 方 法.....	3
1.材 料.....	3
2.方法	6
结 果.....	13
1.过表达 SR-B1 及 SR-B1 抑制剂 BLT4 处理细胞后, 检测、比较处理前后 SR-B1 蛋白和 HIF-1a 蛋白的表达情况.....	17
2.检测在 786-0 细胞中, SR-B1 与 HIF 通路关键分子 HIF-1a 是否存在蛋白互作.....	18
3.应用 SR-B1 抑制剂 BLT4 处理 786-0 细胞, 转染 HIF-1a 过表达质粒, 检测、比较处理前后 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白的变化及细胞的增殖情况.....	22
4.应用 SR-B1 过表达质粒转染 HK-2 细胞, HIF-1a 抑制剂 (IDF-11774) 处理细胞后, 检测、比较处理前后 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白的表达以及细胞增殖的变化.....	25
讨 论.....	26
结 论.....	30
参 考 文 献.....	31
文 献 综 述.....	34
致 谢.....	43
作者简介.....	44

英文缩略语表

英文缩写	英文全名	中文译名
SR-B1	Scavenger receptor class B, type 1	B 类 1 型清道夫受体
CCRCC	Clear Cell Renal Cell Carcinoma	肾透明细胞癌
HIF-1a	Hypoxia inducible factor 1a	缺氧诱导因子 HIF-1a
IDF-11774	Hypoxia inducible factor 1a inhibitor, IDF11774	HIF-1a 抑制剂, IDF-11774
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
CO-IP	co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
OD	Optical Density	光密度
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
RCC	Renal Cell Carcinoma	肾癌
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
β -actin	Anti-beta Actin	肌动蛋白
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
PMSF	Phenylmethyl sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟化物
CoCl ₂	Cobalt Chloride	二氯化钴

前言

(Introduction)

肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是最常见且死亡率最高的肾细胞癌亚型^[1], 占肾细胞癌的 70% ~ 85%^[2], 其特点是易转移、预后差, 25% 的患者在确诊时已为临床晚期阶段, 且肾癌患者术后复发率高达 20%^[3], 故迫切需要阐明其分子机制。

近年来, 大量研究表明 ccRCC 存在胆固醇与脂质代谢异常^[4, 5]以及缺氧诱导途径 HIF-VEGF 通路的异常激活。其中, 胆固醇代谢的异常主要表现为肾透明细胞癌内总胆固醇(TC)和胆固醇酯(CE)的含量显著高于正常肾脏组织^[6], 且胆固醇显著促进肾透明细胞癌细胞的发生和发展^[7]。在胆固醇代谢异常的机制方面, 本课题组前期研究及文献报道均发现, 肾透明细胞癌中胆固醇的过度积累是 HDL 胆固醇摄入增加的结果^[5], 其对 HDL 胆固醇酯的吸收依赖于 B 型 1 类清道夫受体 (Scavenger receptor class B type 1, SR-B1) 在细胞表面的表达^[8], 而 SR-B1 是 HDL 胆固醇酯唯一的吸收分子, 其在肾透明细胞癌的脂质代谢里起着重要的影响。另一方面, 肾透明细胞癌中缺氧诱导途径即 HIF-VEGF 通路的异常活化被认为是肾透明细胞癌发病中经典的促癌机制, HIF 的激活可以引起下游 VEGF 的活化, 并促进血管的生成^[9]。舒尼替尼作为阻止 VEGF 与 VEGFR 结合的抑制剂^[10], 是已用于临床的转移性肾透明细胞癌的靶向化疗药物^[11]。那么脂质代谢和 HIF-VEGF 之间是否可以相互调控, 促进肿瘤的发生发展, 值得思考与研究。

课题组前期研究发现: (1) 在肾透明细胞癌组织和细胞中, SR-B1 在均较正常的组织和细胞显著高表达; 沉默肾透明细胞癌细胞中的 SR-B1 基因后, 不仅存在细胞中 HDL 胆固醇脂的含量下降, 而且明显抑制了细胞的增殖、迁移、侵袭、凋亡等生物学行为, 将 SR-B1 基因转入正常肾小管上皮细胞后, 促进 HDL 胆固醇脂的吸收与细胞的增殖; (2) 应用表达谱芯片发现: 沉默 SR-B1 基因后, 多条重要的通路如 ERK/MAPK、HIF-VEGF 等中的关键基因的表达均存在不同程度的下调, 提示 SR-B1 基因可能与多个信号通路共同作用, 调控肾透明细胞癌的发生发展; (3) ERK/MAPK 信号通路关键分子 p-ERK、ERK 在肾透明细胞癌中高表达; 沉默肾透明细胞癌细胞 786-0 细胞内 SR-B1 基因后, ERK/MAPK 信号通路中的关键蛋白 p-ERK 和 ERK 在肾透明细胞癌的表达明显降低, CO-IP 实验 SR-B1 与 ERK/MAPK 信号通路中的 p-ERK、ERK 存在互作, 证明 SR-B1 可能通过 ERK/MAPK 信号通路中的关键蛋白 p-ERK 和 ERK 相互作用, 进而促进肾透明细胞癌的增殖; (4) 随后的液相质谱实验分析发现: SR-B1 可能通过 HIF-VEGF 信号通路中的 Elongin C 蛋白以及 ERK 影响 HIF 通路。以上前期结果提示 SR-B1 可以直接影响 HIF-VEGF 信号通路, 或通过 ERK 间接调控 HIF, 值得研究证实。

通过查阅文献, 我们了解到, 一方面 HIF-1a 和 HIF-2a 是 HIF-VEGF 信号通路的关

键分子，延伸因子 Elongin C 可与 p-VHL、Elongin B 和 Cullin-2 形成一个具有活性的复合物，常氧下介导 HIF-1 α 和 HIF-2 α 的降解^[10]，且 HIF-1 α 被证实在肾癌等肿瘤里过表达^[12]。在早期肾细胞癌中，HIF-1 α 的水平因 VHL 缺失而明显升高^[13]，进而激活下游癌症相关效应如促进血管生成、代谢适应和肿瘤进展的其他关键方面^[9]，且高达 92% 的肾透明细胞癌患者有 VHL 的突变。而有文献报道 ERK/MAPK 对 HIF-1 α 活化具有关键作用^[15]，在恶性肿瘤中，HIF-1 α 的表达和活性可以通过 ERK/MAPK 信号转导途径来调节^[9, 16, 17]。ERK/MAPK 通路不仅参与 HIF-1 α 蛋白合成的调控^[18]、还参与其转录活性的增强^[19]以及在体内、体外的直接磷酸化^[20]。不仅如此，ERK/MAPK 通路的上调也可以增加 HIF-1 α 的表达，从而增加 VEGF 的转录活性并促进细胞增殖^[21]。基于课题组前期研究和相关文献报道，我们可以得出 SR-B1 可以调控 HIF 信号通路，但 SR-B1 是如何调控 HIF 信号通路，值得深入探讨。而当前海内外均未见 SR-B1 在肾透明细胞癌中调控 HIF 信号通路的研究报道。

结合前期实验结果及文献，我们提出以下假说（图 1）：SR-B1 能否通过直接影响 HIF，以及通过 ERK 介导调控 HIF，从而影响肾透明细胞癌的进展。故本研究拟在前期工作基础上，通过 Western blot、质粒转染、CCK-8、免疫共沉淀（CO-IP）等方法，通过正向与反向实验，检测、比较 SR-B1 的表达是否影响 HIF 的表达，二者之间是否存在蛋白互作，SR-B1 对细胞的增殖作用是否可被 HIF 的表达影响。结合课题组其他同学开展的 SR-B1 是否通过 ERK/MAPK 调控 HIF 信号通路的实验结果，从而阐明 SR-B1 能否通过影响 HIF 信号通路，参与肾透明细胞癌的进展。

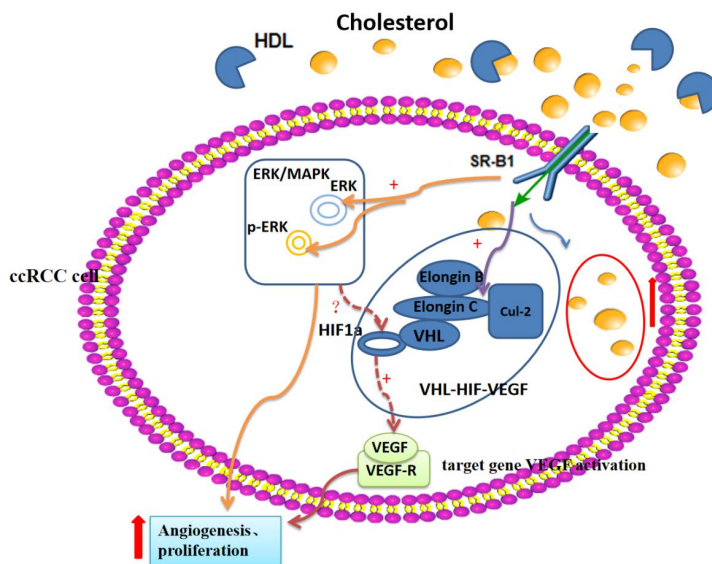


图 1: SR-B1 通过影响 HIF 信号途径促进肾透明细胞癌进展的可能机制

材 料 与 方 法

(Materials & Methods)

1. 材 料

1.1 细胞株、质粒

1.1.1 研究对象

人正常肾小管上皮细胞和肾透明细胞癌细胞购自上海富衡。

1.1.2.质粒构建

携带荧光的过表达质粒和菌液均由吉凯公司制备。

1.2 主要试剂、耗材

1.2.1 常规处理细胞相关试剂和耗材

1. DMEM-F12 培养基 (GIBCO, 美国)
2. 胎牛血清 (GIBCO, 美国)
3. 胰蛋白酶含 0.25%EDTA (Solarbio 公司, 中国)
4. 培养瓶 (25cm²、75cm²) (江苏海狸生物公司)
5. DMSO (Sigma 公司)
6. 青链霉素 (Solarbio 公司, 中国)
7. PBS (上海生工公司)
8. 15ml、50ml 离心管、2ml 冻存管 (Corning 公司, 美国)
9. EP 管 (500μl、1.5ml、2ml、5ml) (Corning 公司, 美国)
10. 6 孔细胞培养板 (Corning 公司, 美国)

1.2.2 细胞增殖实验相关试剂和耗材

1. 96 孔板、6 孔板 (Costar 公司, 美国)
2. 无酶 EP 管 (1.5ml、2ml) (Corning 公司, 美国)
3. CCK-8 试剂盒 (同仁公司, 北京)
4. 枪头 (Corning 公司, 美国)

1.2.3 质粒提取和转染实验相关试剂和耗材

1. 无内毒素抽提质粒试剂盒 (OMEGA 公司, 美国)
2. 胰蛋白胨 (英国 Oxoid 公司)
3. 酵母粉 (英国 Oxoid 公司)
4. 卡那青霉素 (Solarbio 公司)
5. 氨苄青霉素 (Solarbio 公司)
6. 固体 NaCl (上海生工公司)

7. 无水乙醇、异丙醇（上海生工公司）
8. Lipofectamine 2000 试剂（Invitrogen 公司，美国）
9. DMEM-F12 培养基（GIBCO，美国）
10. 无酶 EP 管（500 μ l、1.5ml、2ml）、离心管（50ml）（Corning 公司，美国）
11. 无酶枪头（10 μ l、200 μ l、1ml）（Corning 公司，美国）
12. 甘油（Solarbio 公司）
13. 250ml 锥形瓶

1.2.4 Western blot 实验所需的试剂、耗材及 SDS-PAGE 凝胶的配制

1. 高效 RIPA 裂解液（Solarbio 公司，中国）
2. PMSF（Solarbio 公司，中国）
3. 4 \times 蛋白上样缓冲液（Solarbio 公司，中国）
4. 5 \times 蛋白上样缓冲液（Solarbio 公司，中国）
5. 30%丙稀酰胺（Solarbio 公司，中国）
6. Tris、Glycine、SDS（十二烷基硫酸钠）（Solarbio 公司，中国）
7. TEMED 溶液（Amresco，美国）
8. 固体 NaCl（上海生工公司）
9. 蛋白 Marker（Thermo 公司）
10. 奶粉（伊利）
11. 牛血清白蛋白 BSA（Solarbio 公司，中国）
12. 厚滤纸（BIO-RAD 公司，美国）
13. 曝光胶片（柯达公司）
14. PVDF 膜（Millipore 公司，美国）
15. ECL 化学发光试剂盒（Thermo 公司）
16. Western blot 主要抗体及浓度见表 1:

1.2.5 C0-IP 实验所用耗材及 SDS-PAGE 凝胶的配制

1. 高效 RIPA 裂解液（Solarbio 公司，中国）
2. PMSF（Solarbio 公司，中国）
3. 4 \times 蛋白上样缓冲液（Solarbio 公司，中国）
4. 30%丙稀酰胺（Solarbio 公司，中国）
5. Tris、Glycine、SDS（十二烷基硫酸钠）（Solarbio 公司，中国）
6. TEMED 溶液（Amresco，美国）
7. 固体 NaCl（上海生工公司）
8. 蛋白 Marker（Thermo 公司）
9. 奶粉（伊利）
10. 牛血清白蛋白 BSA（Solarbio 公司，中国）

11. 厚滤纸 (BIO-RAD 公司, 美国)
12. 曝光胶片 (柯达公司)
13. PVDF 膜 (Millipore 公司, 美国)
14. ECL 化学发光试剂盒 (Thermo 公司)
15. Western blot 主要抗体及浓度见表 1:

表 1 Western blot 实验所用抗体

Table 1 Antibody detected in Western blot

名称	抗体来源类型	抗体稀释浓度	所购公司	货号
SR-B1	兔抗人 (单抗)	1: 1000	Abcam	ab217318
HIF-1 α	兔抗人 (单抗)	1: 800	Abcam	ab51608
β -actin	鼠抗人 (单抗)	1: 1000	北京中杉	AF09

16. 实验中用到的分离胶及浓缩胶见表 2 (单位 ml) :

表 2 SDS-PAGE 凝胶的配制

Table 2 The preparation of SDS-PAGE gel

分组	10%分离胶 (2 块胶)	5%浓缩胶 (2 块胶)
ddH ₂ O	4.6	3.8
30%丙烯酰胺	2.6	0.67
0.5M Tris (PH6.8)	-	-
1.5M Tris (PH8.8)	2.6	-
10%SDS	0.1	0.04
10%AP	0.1	0.01
TEMED	0.004	0.004

1.3 主要仪器设备

表 3 主要仪器设备

Table 3 Major instruments and equipments

仪器设备	公司
SW-CJ-1F 型超净工作台	上海博讯公司, 中国
371 型 CO ₂ 培养箱	Thermo Fisher 公司, 美国
7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪	ABI 公司, 美国

GEL-DOC2000 凝胶成像仪	BIO-RAD 公司, 美国
微量台式离心机	Eppendorf
MilliQ 水装置	Millipore 公司, 美国
AB204-E 电子天平	MonoBloc 公司
双开门冰箱, 4°C/- 20°C	海尔公司, 中国
CHK OLYMPUS 显微镜	Olympus optical 公司, 日本
Biofuge Stratos 台式冷冻离心机	Thermo 公司, 美国
电泳仪	BIO-RAD 公司, 美国
电转膜仪	BIO-RAD 公司, 美国
Cu-420 型恒温水箱	一恒科技有限公司, 上海
海尔 BD/BC197SZG 冷藏用柜	海尔公司, 中国
蒸汽高压灭菌锅	三洋电机公司, 中国
xMark 酶标仪	BIO-RAD 公司, 美国
-80°C 冰箱	NURAIR 公司
高压蒸汽灭菌锅	SANYO 公司, 日本
Milli-Q Integral 水纯化系统	Millipore 公司, 美国

2 方法

2.1 细胞复苏

1. 首先把水浴锅加热至 37°C, 把所需的培养基进行加热, 在超净台里放置实验所需基本物品, 紫外线消毒 30 分钟。
2. 消毒完成后, 打开自然灯, 戴消好的无菌手套, 75%酒精棉球擦超净台至少 3 遍, 将实验所需培养基喷入超净台。
3. 15ml 离心管中加入 3ml 培养基, -80°C 冰箱里取出细胞, 在 37°C 水浴锅中来回快速晃动冻存管。快要完全融化时, 移入超净台, 把液体移入到已加好 3ml 培养基的 15ml 离心管中, 进行离心。
4. 提前配好培养基, 800rpm, 高速离心 4min, 倒去上清, 枪头吸出残余液体, 吸入 1ml 培养基悬浮细胞, 放入瓶中培养。
5. 在培养瓶上写清楚细胞名称及代数, 瓶底写培养瓶第一次使用日期, 放入培养箱中培养, 第二天可观察细胞状态, 进行换液。

2.2 细胞传代

1. 观察培养瓶的细胞, 当细胞状态较好, 密度达到百分之九十以上时, 便可进行传代。
2. 在超净台里移入实验所需的移液枪、枪盒、75cm² 培养瓶、15ml 离心管等试验耗材,

酒精喷壶（75%酒精）备用。将胰酶、PBS、培养基预热。紫外线消毒 30min。

3. 消毒完成后，戴上无菌手套后先将超净台台面擦干净，酒精棉球擦拭水浴锅中的试剂瓶，放入超净台中。
4. 取出细胞，在操作台内打开，并将其和培养瓶放在干净区域，移除废液，用 3mlPBS 洗 2 次后倒出清洗液。
5. 培养瓶内加 1ml 胰蛋白酶，静置 1min，镜下若见贴壁细胞形态变成圆形且透亮时，向瓶中吸入 3ml 有血清培养基。
6. 混合液吸入 15ml 离心管里旋转离心，倒掉残余液体，添加含 10%胎牛血清的培养基，吹匀之后，传入 75cm² 的培养瓶中，进行生长。

2.3 HK-2 细胞转染

1. 先将 HK-2 细胞消化下来，铺进 6 孔板中（每孔 20-30 万细胞），若第二天细胞密度达到 70%-80%即可进行转染。
2. 分为过表达质粒组和阴性对照组。在 EP 管配制转染试剂，两组 2mlEP 管分别放 500ul 无血清 DMEM，每个 EP 管内先加 7.3ul Lip2000，混匀放 5min。
3. 5min 后混入 4.9ug 过表达质粒和阴性质粒，均匀吹打，室温静置 30min，30min 期间将 6 孔板里的含血清 DMEM 换成不含血清的 DMEM 原液，放进 37 度恒温培养箱，30min 后取出 6 孔板，将板内液体换成配置好的混合液。
4. 37 度恒温培养箱生长，4-6h 后将板中液体替换成有 10%血清的 DMEM。
5. 细胞转染 48 小时后，在镜下查看细胞的荧光亮度并计算转染水平，也可提取 RNA 或蛋白备用。

2.4 786-0 细胞转染

1. 先将 786-0 细胞消化下来，铺进 6 孔板中（每孔 20-30 万细胞），若第二天细胞密度达到 70%-80%即可进行转染。
2. 分为过表达质粒组和阴性对照组。两组 2mlEP 管中分别放 500ul 无血清 1640 原液，每个 EP 管内先加 7.3ul Lip2000，混匀放 5min。
3. 5min 后混入 4.9ug 过表达质粒和阴性质粒，均匀吹打，室温放置 30min，30min 期间将 6 孔板里的培养基换成不含血清的 1640 原液，放入 37 度恒温培养箱，30min 后取出 6 孔板，将板内液体换成配置好的混合液。
4. 37 度恒温培养箱生长，4-6h 后将板中的液体替换为含 10%胎牛血清的 1640，观察。
5. 细胞转染 48 小时后，在镜下查看细胞的荧光亮度并计算转染水平，也可提取 RNA 或蛋白备用。

2.5 细菌培养及无内毒素质粒的提取

2.5.1 摇菌

1. 称取 0.25g 酵母粉，0.5g 蛋白胨，0.5gNaCl 移入锥形瓶里，加入 50ml 已高压的双蒸

水并充分震荡，高压。

2. 压好的混合液冷却至 60 度左右时，按卡那霉素/胺苄与混合液 1:1000 的比例加入锥形瓶，完全混匀后，封口，把锥形瓶放于 37℃ 摇菌床上，摇晃 12-14h。
3. 按时将摇好的菌液及时取出，将其中一部分菌液按甘油：菌液 200：800 的配比移入 2mlEP 管中，封口，贮存于-80℃ 冰箱内备用，其余菌液用于提取质粒。

2.5.2 质粒提取

1. 准备工作：先将 N3 Buffer 放于冰盒上降温，水浴锅温度调至 42℃，离心机温度调至 20℃。
2. 把菌液移入 50ml 离心管，在 13000 转条件下，高速离心 10min。离心完毕弃上清，随后把 1500ul 的 Solution I/RNase A 混合液吸进离心管，充分摇晃，致细菌充分漂浮，然后把每组菌液分至 3 个 2mlEP 管中。
3. 向每个 EP 管中加入 500ul Solution II，轻轻地混匀，为避免 DNA 断裂，静置 2min 左右。
4. 向每个 EP 管中吸入 250ul N3 Buffer，充分混合，产生白色絮状物后即可停止，于常温下，大于 12,000 转条件下旋转离心 10min。
5. 完成后可看到 EP 管上方的清亮液体，把上清液转移到另一个 EP 管中，吸入十分之一上清液体积的 ETR，摇匀后置于冰块上 10min。
6. 冰浴结束后，置于 42℃ 干锅中 5min，室温下离心（12000 转，3min）。离心完成后可以看到 EP 管中液体的分层，其中最下层可看到蓝色液体，转移上清液至新的 EP 管，避免吸到蓝色分层，加入 0.5 倍体积的无水酒精，常温放置 1-2min。
7. 首先把 2ml 收集管中装上 HiBind，移入 700ul 混合液至 HiBind 中，10000 转、1min 旋转，倒掉过滤液。重复此步，至混合液全部滤出。
8. 向柱中加 500ul HBC Buffer，离心（10000 转、1min），弃滤液。于柱中加 700ul DNA Wash Buffer，离心（10000 转、1min），弃滤液，然后再重复加 700ul DNA Wash Buffer 离心一次。
9. 把 HiBind 柱插入收集管，离心空柱子（10000 转、3min）。
10. 把 HiBind 柱放入新的 EP 管中，向 HiBind 柱子中加 100ul 洗脱液，离心（10000 转、2min），洗脱出 DNA，然后重复此步骤一次。检测提取的质粒的浓度。

2.6 CCK-8 法检测细胞增殖实验

1. 6 孔板中转染过表达质粒和阴性质粒，24h 后将细胞处理下来，计数，均匀铺入 4 块 96 孔板中，每孔铺入 3000 个细胞。5h 后取出第 1 块 96 孔板，关掉自然灯，每孔中滴加 10ul CCK-8 试剂。
2. 37℃ 培养箱反应 2h 后取出，于 A450nm 处测 OD 值，即为 0h 的 OD 值。同样方法测量 24h、48h、72h 相应时间点的 OD 值。

2.7 模拟细胞缺氧环境实验

1. 细胞复苏以后，移入 37℃ 培养箱中孵育 24h。
2. 24h 后进行消化，计数，均匀铺入 6 孔板中，每孔铺 $2-3 \times 10^6$ 个细胞。
3. 12h 后去除培养基，用 PBS 清洗 2 遍。
4. 吸除 PBS，按照 2ml 培养基和 6ulCoCl₂ 的比例配制新的液移入 6 孔板中。
5. 把 6 孔板移入 37℃ 培养箱中反应 2h 后，拿出 6 孔板。
6. 提蛋白或 RNA 进行后续实验。

2.8 Western blot 方法步骤

2.8.1 提蛋白步骤

1. 准备好枪及枪头，高压好的 PBS 等物品，首先取出准备提取蛋白的 6 孔板，将培养基吸除，每孔用 2ml 高压的 PBS 处理 2 次，最后把干净的 6 孔板放在冰盒上。
2. 按照 RIPA: PMSF 为 100ul:1ul 的比例在 1.5ml 的 EP 管里配置裂解液，并向冰盒上的六孔板内每孔均匀加入 100-200ul 的裂解液，轻轻拍动孔板，使裂解液能够均匀覆盖整个底面，冰盒上六孔板放置 30min 左右；
3. 时间到后在冰盒上操作，用蓝色枪头或细胞刮刀将每个孔全部细胞刮下来，均匀用力，然后把刮下的混合液吸入到 1.5ml 无酶 EP 管里。
4. 离心机提前降温至 4 度，把细胞对称放入，12000rpm，20min 后可以观察到 EP 管上层有清亮透明液体，将液体吸入至另外一个 EP 管内，同时在实验记录本上记录吸取液体的总体积。
5. 打开电脑及测定蛋白浓度的软件，首先用无酶水将测量蛋白的探头清洗干净，校正调零，用高压过的枪头吸取 1ul 的蛋白液体轻轻放置探头上，测定浓度后将浓度值记录到实验记录本上，每个样本测量 3 次，测量完成后关闭软件及电脑；
6. 测量完成后通过计算将每组需要配平的裂解液补齐，浓度调为一致，并向每组滴加上清 1/3 体积的 4×loading buffer；
7. 将干锅温度调至 100 度，将处理好的蛋白放于干锅上煮 8 分钟，时间到后将 EP 管内气体放出晾至室温后，即可保存并记录蛋白提取时间及浓度。

2.8.2 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 先将干净的厚薄玻璃板取出，将厚薄板对齐，薄板放在厚板的有凹槽的一面，然后用胶架固定，放在胶架上，然后向厚薄板中间的缝隙中加干净的双蒸水，计时 5-10min，不漏水即可使用，倒掉缝隙中的双蒸水并用滤纸擦干净，在干净的烧杯中先配制分离胶，从一侧缝隙缓慢注入并继续加入双蒸水液封分离胶，计时 50min 左右，等分离胶与双蒸水之间出现明显的分割线后便可倒掉双蒸水并用滤纸擦干净，然后再配制 5% 浓缩胶注入板中，避免生气泡，静置 30-50 分钟，等待凝固后便可取下胶板，保鲜膜包裹记录日期平放冰箱保存。
2. 取出电泳设备，并将需要的蛋白从冰箱取出振荡仪震动融化。然后把提前制备的胶

取出，并将胶固定于电泳夹上，配制新鲜的 1×电泳液并将其倒在胶板之间的槽内，液体没过梳子上缘，然后将梳子缓慢拔出，孔内避免产生气泡，缓慢向各孔加入需要的蛋白的适宜的上样量，将电泳槽周围注入电泳液，盖上盖子，打开电源并设置好电压及时间即可开始电泳，注意将电泳仪放入装有水的盆子里，并将盆内放满冰块。

2.8.3 转膜

1. 电泳完成之前便可剪膜，膜孔径一般为 0.22 μm 或 0.45 μm ，首先根据蛋白分子量的大小取出相应的 PVDF 膜，取出膜时注意不要碰到两层蓝膜中间的白膜，为避免浪费，长度一般会多出一个上样孔的长度，宽度多为 1.5cm 左右，也可根据需要裁剪，裁剪完放入干净的皿中，裁剪滤纸时长宽均要比膜小 0.2cm，裁剪完可在膜上剪角做标记。
2. 电泳快结束时首先向皿中倒入甲醇浸泡，时间大约 3-5min，然后再换成 1×电转液浸泡 15min 左右，备用。电泳完成后取下胶板，用切胶板从薄板一侧缓慢撬动，将厚薄板分离，根据 marker 选择目的蛋白并切胶，移入提前配好的 1×电转液中；
3. 首先将半干转膜仪用湿润的滤纸擦一遍，然后先将浸泡的滤纸平铺在转膜仪中间，其次是 PVDF 膜，确保滤纸与 PVDF 膜之间没有气泡，最后是滤纸。放好之后盖上盖子并设定好电压及时间即可开始转膜。

2.8.4 免疫反应

1. 转膜完成之前要将封闭用的 BSA 溶液或脱脂奶粉溶液配好，均用 TBST 配制，放入孵育盒中，每格 5ml，转膜完成后把 PVDF 膜夹出并且放入孵育盒中，孵育盒放到摇床上，转速 50 左右，常温下封闭 2-4 小时；
2. 封闭期间可进行一抗的配制，根据一抗的浓度用脱脂奶粉 TBST 溶液或者 BSA TBST 溶液进行配制，封闭完成后，把 PVDF 膜从盒中夹出并放到一抗溶液中，4℃冰箱过夜，一般一抗孵育时间大于 12h；
3. 一抗孵育结束后将 PVDF 膜取出并放入 1×TBST 里，放到摇床上，转速 100 左右，每隔 5 分钟换一次 1×TBST，共进行 6 次，结束后把 PVDF 膜移入提前配好的二抗中，二抗浓度一般为 1:5000-1:20000，配制方法同一抗，常温下摇晃 2 小时；
4. 时间到后，再次洗膜，方法同一抗，每 5 分钟换一次 1×TBST，共需 30min。

2.8.5 曝光及拍照

1. 准备曝光的物品，进入暗室进行曝光，首先将各种物品摆放好，避光条件下将胶片取出并剪好，可在胶片上做标记。取出发光试剂盒，在 EP 管中两种液体按 1:1 比例配制，混合均匀。
2. 将皿中的膜取出，尽量将多余的 TBST 溶液甩掉，并将膜放于曝光板上，膜有蛋白的一面向上，用干净的枪头吸取发光试剂 180-200 μl 均匀的滴在膜上，滴完用干净

的保鲜膜把 PVDF 膜及曝光板包裹在一起。于黑暗的地方观察是否出现荧光亮，荧光出现后及时将剪好的胶片覆盖于膜上，用压片板压住；

3. 根据实际情况调整压片时间，曝光之后把胶片放入显影液中，几秒后用镊子取出观看条带显示情况，若没显示，则继续，若成功，及时移入定影液中；
4. 将各种液体回收并收拾好物品，将定影的胶片用自来水冲洗干净，置于泡沫板上晾干。待胶片晾干后进行拍照。
5. 将拍好的照片用 Gel-Pro analyzer 5 软件进行灰度分析。

2.9 免疫共沉淀实验 (CO-IP)

2.9.1 总蛋白提取

1. 选取 2ml 的 EP 管放入冰盒中，将 1000ml 非变性裂解液，10ul PMSF 加入到 EP 管中充分混匀，配置非变性裂解液，用于一个 75cm² 的透气培养瓶。
2. 把细胞从瓶中处理下来，装入 1.5 的无酶 EP 管里，离心去上清，再用 1×PBS 清洗一遍，离心，向 EP 管中加 1000ul 预冷的非变性裂解液，吹打混合液，使两者完全融合，放于冰盒上静置 20-30min。
3. 在 6°C 温度下震裂细胞 2s/次 3-5 次后，12000 转，5 min，4°C 离心。
4. 吸取 1.5-2ul 蛋白液测浓度。
5. 吸取 36ul 蛋白液，吸取 1/3 蛋白体积的 4×上样缓冲液，100°C，8min 煮熟蛋白，冷却后放入 -20/-80°C 冰箱保存，作为总蛋白 (input) 用。
6. 将剩下的蛋白液分入两份等体积的 EP 管中，IgG 管 1000ul，目的 1000ul。

2.9.2 抗体与蛋白结合

1. 加 SR-B1 抗体 7ul 在对应的 EP 管中，加 IgG 抗体 5ul 在对应的 EP 管中，EP 管完整固定于旋转摇床上，温和旋转震荡孵育 12-16h，50 rpm，4°C。（因抗体浓度不同，体积不同，以等质量的抗体做为标准）。
2. 珠子的洗涤与重悬。
3. 量取 beads：将 200ul 枪头的尖端用剪刀减掉一小部分以避免损伤 beads，将装有 Protein A agarose beads 和 Protein G agarose beads 混悬液的试剂瓶静置，用无尖端枪头深入试剂瓶底部 beads 层分别取 50ul 的 Protein A agarose beads 和 Protein G agarose beads 共计 100ul 加入同一个 1.5ml 的 EP 管中，做两个相同体积的 EP 管，分别标记目的、IgG 管，此步骤最好是在前一天做好，是珠子静置一晚，可使珠子充分沉淀，避免浪费漂浮的珠子。
4. 洗涤和离心：在上述装有 protein A/G agarose beads 的 EP 管里滴加 1ml 提前预冷的非变性组织/细胞裂解液，重复 2-3 次，最后一次用 1×PBS 洗涤，离心，4°C，14000rpm，30s，弃掉上清，留取下层沉淀物。

2.9.3 Protein A/G agarose beads 捕获抗体/抗原抗体复合物

1. 将 1000ul 抗原抗体反应体系用移液器加入到装磁珠的 100ul 的 beads 混悬液中。
2. 将 EP 管放置于旋转摇床中，4°C温和旋转震荡孵育 8-12h。
3. 将 4°C旋转后的 EP 管，离心（3000 rpm，30s，4°C），弃上清（可以留少量目的上清，以检测是否有 SR-B1 没有拉下来的蛋白），留沉淀。
4. EP 管加入 100ul 变性裂解液（预冷）重悬并洗涤珠子，温和震荡孵育 10min，离心（13000 rpm，30 s，4° C），留上清，洗珠子，留下次用。
5. 测上清液蛋白浓度：吸取 1.5-2ul 上清液，测定蛋白浓度。测过浓度之后加入 4×上样缓冲液（含 DTT）33ul，煮沸 8min，100°C，-80°C保存备用。待样品恢复到室温时，-80°C保存备用。
6. Protein A/G Beads 回收：将步骤 2 中的下层物质回收，加入 1ml 非变性裂解液，充分混匀，离心（4°C，14000rpm，30s），弃上清，重复洗涤 3-4 次，离心完成后，倒掉上清，吸取非变性裂解液 50ul，4°C保存备用。

2.9.4 Western blot 方法步骤（与前边的步骤类同）

3 统计学分析

Gel-Pro analyzer 6.0 软件测量和分析, HK-2 细胞转染 SR-B1 过表达质粒加入 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 后 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白表达的灰度值, 分析抑制剂 BLT4 抑制 SR-B1 后 SR-B1 和 HIF-1a 表达的灰度值, 分析抑制剂 BLT4 抑制 SR-B1 后转染 HIF-1a 过表达质粒后 SR-B1 和 HIF-1a 表达的灰度值（均数+标准差进行描述）；SPSS 22.0 完成统计学分析, $P < 0.05$ （双侧）为差异具有统计学意义。

结 果

(Results)

1. 过表达 SR-B1 及 SR-B1 抑制剂 BLT4 处理细胞后, 检测、比较处理前后 SR-B1 和 HIF-1 α 蛋白的表达情况

1.1 确定 SR-B1 过表达质粒的最佳浓度

本实验通过设置 SR-B1 过表达质粒与 Lip2000 的不同比例, 确定 SR-B1 过表达质粒转染的最佳浓度。设置 1 个对照组和 5 个实验组, 这 6 组为对照组 (空质粒组), 实验组 (SR-B1 过表达质粒与 Lip2000 的比例) 分别为 0.75:1, 1:1, 1.5:1, 2:1, 1:2 (即 0.5:1)。状态良好的 HK-2 细胞以每孔 2.5×10^6 的量种植于 6 孔板中, 设置两个 6 孔板, 其中 1 块板转染 24 小时后将细胞消化下来按照分组计数, 以每孔 3000 个细胞、每组设置 5 个复孔, 均匀铺于 96 孔板中, 48h 后滴入 CCK-8, 孵育 2h 后, 检测细胞的吸光度, CCK-8 实验结果显示: 与对照组相比, 从 0.5:1 组开始, 随着转染浓度逐渐提高, HK-2 细胞的增殖也逐渐升高, 在 1:1 组达到高峰 ($P < 0.05$) (表 4, 图 2)。剩下的一个 6 孔板转染 48h 后提蛋白, 进行 Western blot 实验, Western blot 实验结果显示: 从 0.5:1 转染组开始, 随着转染比例的增加, SR-B1 过表达质粒对 SR-B1 蛋白的升高作用逐渐增加, 在 1:1 组达到高峰 ($P < 0.05$) (表 5, 图 2)。通过 CCK-8 法及 Western blot 实验结果, 最终确定过表达质粒最佳转染浓度比为 0.5:1, 0.75:1 和 1:1 组。

表 4 HK-2 中不同处理组细胞的存活率 (%) (均数 \pm 标准差)

Table 4 Cell survival rate of different group of HK-2 cells (Mean \pm SD)

细胞	组别	转染比例	存活率	<i>P</i>
	对照组		1.0000 \pm 0.02088	
HK-2	实验组①	0.5:1	1.3326 \pm 0.03273	<0.001
	实验组②	0.75:1	1.6968 \pm 0.06341	<0.001
	实验组③	1:1	1.8465 \pm 0.02396	<0.001
	实验组④	1.5:1	1.4733 \pm 0.02271	<0.001
	实验组⑤	2:1	1.0963 \pm 0.00490	<0.001

表 5 SR-B1 过表达质粒不同转染浓度 (0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.5:1, 2:1) 处理正常肾小管上皮细胞 (HK-2) 与未处理的 HK-2 细胞中, SR-B1 蛋白表达的灰度值比较 (均数 \pm 标准差)

Table 5 Comparison of value of the expression of SR-B1 in HK-2 cells (control) between HK-2 cells

(0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.5:1, 2:1) with different concentration			
细胞	组别	转染比例	SR-B1 灰度值
	对照组		1.0000±0.04818
HK-2	实验组①	0.5: 1	1.2750±0.8846
	实验组②	0.75: 1	1.5939±0.09762
	实验组③	1: 1	1.8152±0.08293
	实验组④	1.5: 1	1.6485±0.07677
	实验组⑤	2: 1	1.3556±0.08446

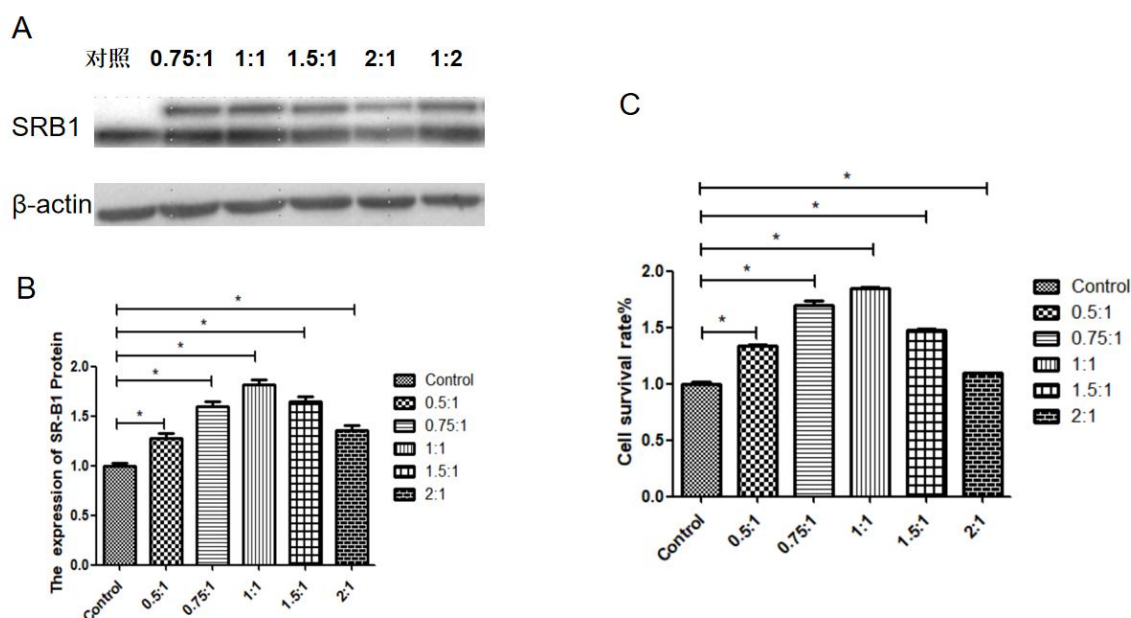


图2：应用CCK-8及Western blot实验检测HK-2细胞转染不同浓度的SR-B1后，SR-B1蛋白的相对表达量。A：HK-2细胞中SR-B1不同转染条件下SR-B1蛋白条带表达情况；B：HK-2细胞，SR-B1蛋白灰度值分析柱状图；C：HK-2细胞中SR-B1质粒不同浓度下，细胞的增殖水平。

注：*表示与对照组比较， $P < 0.05$ 。

1.2 应用 SR-B1 过表达质粒处理 HK-2 细胞后，检测、比较处理前后 HIF-1a 蛋白的差异

前期实验已经成功确定SR-B1过表达质粒最佳浓度，实验设置1个对照组和3个实验组，这4个组分别为对照组（空质粒组），实验组分别为0.5:1，0.75:1，1:1。把长势良好的HK-2细胞以每孔 2.5×10^6 的量均匀移入6孔板中，SR-B1过表达质粒转染48h后停止培养，进行Western blot实验，Western blot实验表明，与空质粒组相比，随着SR-B1过表达质粒比例的升高，HIF-1a蛋白的水平也逐步增强（图3，表6），差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

表 6 在正常肾小管上皮细胞 (HK-2) 中, SR-B1 不同转染条件下, HIF-1a 表达的灰度值比较

Table 6 Comparison of gray value of the expression of HIF-1a between HK-2 cells with different concentration of SR-B1

分组	对照组	0.5: 1 组	0.75: 1 组	1: 1 组
HIF-1a	0.25±0.03798	0.5974±0.02450	0.9010±0.04328	1.2538±0.10320

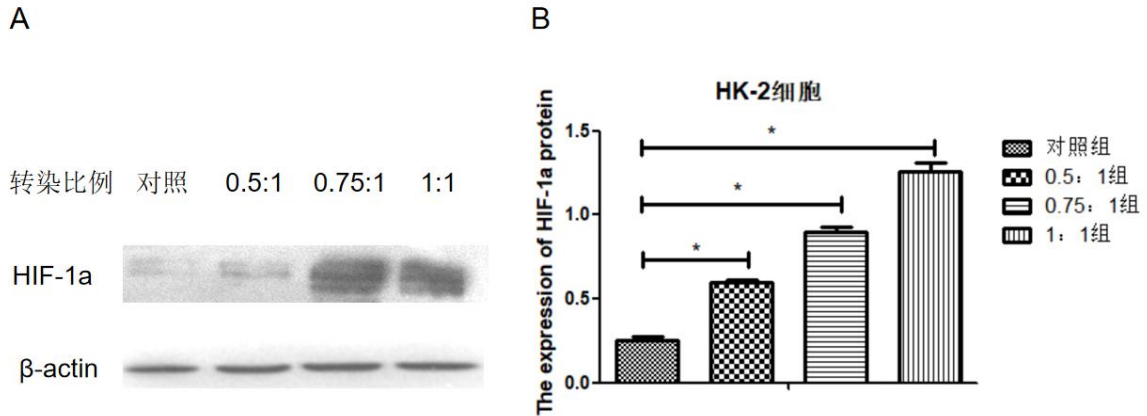


图3: 应用Western blot技术比较不同浓度SR-B1转染HK-2细胞后, HIF-1a蛋白的水平。A: HK-2细胞中HIF-1a蛋白条带表达情况; B: HK-2细胞, HIF-1a蛋白灰度值分析柱状图。

注: *表示与对照组 (HK-2) 比较, $P < 0.05$ 。

1.2 应用 BLT4 处理肾透明癌细胞 786-0 后, 检测、比较处理前后 SR-B1 蛋白和 HIF-1a 蛋白的表达情况

根据本课题组前期的实验结果, 挑选SR-B1高表达的786-0细胞, 利用梯度浓度 (0umol/l、25umol/l、50umol/l、60umol/l) 的SR-B1的特异性抑制剂BLT4抑制786-0细胞后, 利用Western blot实验方法检测SR-B1、HIF-1a的蛋白表达情况。结果如表7和图4所示: SR-B1和HIF信号通路的关键分子HIF-1a随着BLT4的浓度梯度的增高, 呈显著的降低趋势, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 7 不同浓度梯度的 BLT4 抑制剂 (0umol/l、25umol/l、50umol/l、60umol/l) 抑制肾透明细胞癌 (786-0) 细胞后, SR-B1 和 HIF-1a 表达的灰度值比较 (均数±标准差)

Table 7 Comparison of gray value of the expression of SR-B1 and HIF-1a in 786-0 cells (0umol/l、25umol/l、50umol/l、60 umol/l) with different concentration inhibitors of SR-B1(BLT4)

分组	0uM	25uM	50uM	60uM
SR-B1	4.6782±0.13176	2.7125±0.13587	1.5585±0.18152	1.2349±0.11910
HIF-1a	3.7993±0.02984	1.9393±0.25081	0.8830±0.15635	0.1120±0.01752

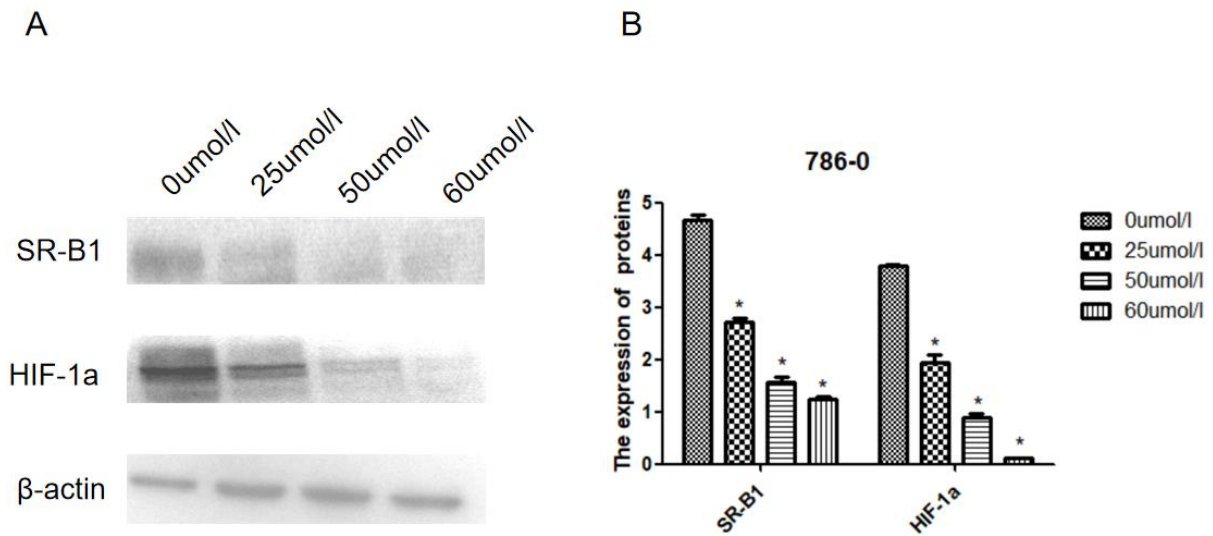


图 4: 利用梯度浓度 (0umol/l、25umol/l、50umol/l、60umol/l) SR-B1 特异性抑制剂 BLT4 抑制 786-0 后, 检测 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白的表达情况。A: 786-0 细胞, 梯度浓度药物处理下 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白条带表达情况; B: 786-0 细胞, SR-B1 和 HIF-1a 蛋白灰度值分析柱状图。

备注: *表示与对照组 (0umol/l) 比较, $P < 0.05$ 。

2. 免疫共沉淀 (CO-IP) 验证SR-B1在786-0细胞中与HIF信号通路中关键分子HIF-1a分子之间的蛋白互作情况

2.1 SRB1 与 HIF-1a 之间存在蛋白互作

缺氧处理肾透明癌细胞 786-0, 应用免疫共沉淀 (CO-IP) 实验方法及 Western blot 方法对各组细胞进行检测、比较细胞中 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白的表达情况。实验结果如图 5 所示: 在肾透明癌细胞 786-0 中, SR-B1 可直接将 HIF-1a 拉下来, 表明两者存在直接的蛋白互作, 提示 SR-B1 通过 HIF 信号通路的 HIF-1a 调节肾透明细胞癌的发展。



图 5 利用免疫共沉淀原理检测 SR-B1 蛋白与 HIF 信号通路关键分子 HIF-1a 蛋白的结合情况。采取 SR-B1 特异性抗体沉淀物全细胞 (786-0 细胞) 裂解液, 免疫印迹实验 (Western-blot) 检测免疫沉淀物中的 HIF-1a 蛋白。

2.2 HIF-1a 与 SR-B1 之间存在蛋白互作

缺氧处理肾透明癌细胞 786-0，应用免疫共沉淀（CO-IP）实验方法及 Western blot 方法对各组细胞进行检测、比较细胞中 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白的表达情况。实验结果如图 6 所示：在肾透明癌细胞 786-0 中，HIF-1a 可直接将 SR-B1 拉下来，表明两者存在直接的蛋白互作。



图 6 利用免疫共沉淀原理检测 HIF 信号通路关键分子 HIF-1a 与 SR-B1 蛋白的结合情况。采取 HIF-1a 特异性抗体沉淀物全细胞（786-0 细胞）裂解液，Western blot 实验检测沉淀物中的 SR-B1 蛋白。

3. 应用BLT4处理786-0细胞后，转染HIF-1a过表达质粒，检测、比较处理前后SR-B1、HIF-1a蛋白的变化及细胞的增殖情况

3.1 HIF-1a 基因过表达质粒的设计与合成

为了有效的过表达肾透明癌细胞786-0中HIF-1a基因，首先选取GV657载体（图7A），并配制50 μ l酶切体系。置于37 $^{\circ}$ C反应3h或过夜。针对HIF-1a基因片段的获取进行对应引物的设计（表8），并通过PCR 扩增目的基因片段，检测PCR 扩增结果（图7B和C），从而合成并构建了过表达质粒。随后公司通过重组质粒构建及测序实验证实了插入的过表达基因编码序列正确。质粒的构建及过表达序列验证由上海吉凯公司操作完成。

表 8 HIF-1a 基因片段的获取引物设计

Table 8 Design of primers for obtaining HIF-1a gene fragments

ID	序列信息
HIF1A(56185-1)-P1	CACACTGGACTAGTGGATCCCGCCACCATGGAGGGCGCCGGCGGCGCGAAC
HIF1A(56185-1)-P2	AGTCACTTAAGCTTGGTACGTAACTTGATCCAAAGCTCTGAGTAATTC

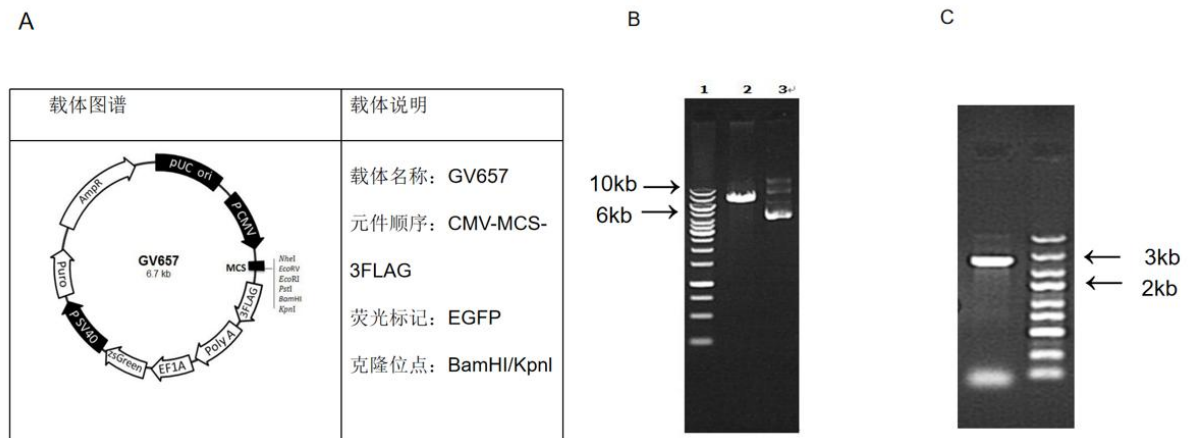


图 7: 质粒相关信息及验证结果。A: 质粒构建载体图谱及载体信息; B: XhoI / KpnI 酶切电泳图 (2 为载体酶切产物) C: PCR 扩增电泳图

3.2 过表达 HIF-1a 基因后可增强 786-0 细胞的增殖能力并提高 HIF-1a 蛋白的表达水平, 但对 SR-B1 蛋白的表达没有影响

本实验涉及为3组, 分别为对照组、空质粒组、过表达质粒组。把状态良好的786-0 细胞以每孔 2.5×10^6 的量转移至6孔板中, 设置两个6孔板, 其中1块板转染24小时后将细胞消化下来按照分组计数, 以每孔3000个细胞、每组设置5个复孔, 均匀铺于4个96孔板中, 首先在5h贴壁后的第一个96孔板中加入CCK-8试剂, 孵育2h后, 检测450nm处的吸光度, 即为0h的值, 此后在24h、48h、72h均重复以上步骤。比较每组的吸光度, 并计算细胞的存活率水平, CCK-8实验结果 (图8, 表9) 显示: 与对照组及阴性质粒组比较, 过表达组显著提高了细胞的增殖率并且在48h时达到最大值, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。剩下的一个6孔板转染HIF-1a过表达质粒, 48h后提取蛋白, 完成Western blot 实验, Western blot 实验表明: 在肾透明细胞癌细胞786-0中, 过表达质粒组的HIF-1a蛋白的表达水平较对照组明显升高 (表10), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。但HIF-1a过表达质粒对SR-B1蛋白的表达没有任何影响 (图8)。

表 9 786-0 细胞中每组细胞的存活率 (均数±标准差)
Table 9 The survival rate of each group of 7860 cells (Mean± SD)

细胞	组别	0h	24h	48h	72h
	空白对照	0.0723±0.00666	0.1787±0.00503	0.5427±0.01155	0.5073±0.00289
786-0	阴性质粒	0.0727±0.01079	0.2090±0.00173	0.5923±0.02902	0.5463±0.019557
	过表达质粒	0.0730±0.0656	0.3820±0.00693	1.3330±0.05071	1.3273±0.00961

表 10 不同处理组 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白水平的灰度值比较 (均数±标准差)

Table 10 Gray value comparison of HIF-1a gene and SR-B1 gene expression among different groups (Mean± SD)

组别	空白对照	阴性质粒	过表达质粒
HIF-1a	0.6963±0.08007	1.0708±0.05169	1.6669±0.19345
SR-B1	0.7188±0.08940	0.7137±0.03514	0.7274±0.05212

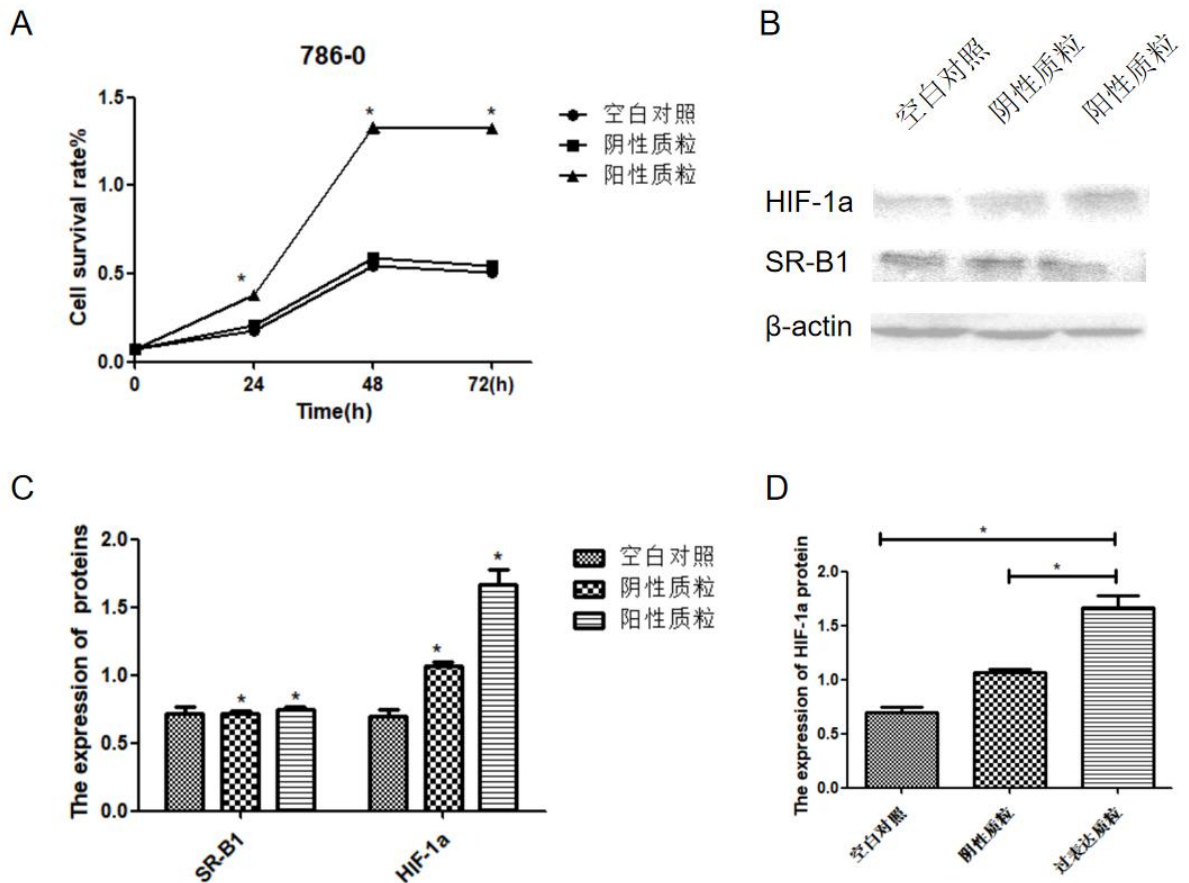


图 8: 用 HIF-1a 过表达质粒转染 786-0 细胞后, 细胞存活率及 HIF-1a 蛋白表达情况。A: 用 HIF-1a 过表达质粒处理 786-0 细胞后, 0、24、48、72h 细胞增殖能力的比较; B: 786-0 细胞, 不同转染条件下, HIF-1a 和 SR-B1 蛋白条带表达情况; C: 786-0 细胞, HIF-1a 和 SR-B1 蛋白灰度值分析柱状图。D: 786-0 细胞, HIF-1a 蛋白灰度值分析柱状图。

备注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3.3 应用梯度浓度 BLT4 抑制肾透明癌细胞 (786-0) 后转染 HIF-1a 过表达质粒, 检测 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白的表达及细胞增殖情况。

本实验根据 SR-B1 的特异性抑制剂 BLT4 浓度分为 4 组, 即 0 μ mol/l 组、25 μ mol/l

组、50 μ mol/l 组、60 μ mol/l 组。将成熟的 786-0 细胞以每孔 2.5×10^6 的量移入 6 孔板中，设置两个 6 孔板，其中 1 块板转染 HIF-1a 过表达质粒，12 小时后将细胞消化下来按照分组计数，以每孔 3000 个细胞、每组设置 5 个复孔，均匀铺于 96 孔板中，37 $^{\circ}$ C 培养箱中静置观察 24h 后，向 96 孔板中加入 CCK-8，继续培养 2h 后，检测 450nm 处的吸光度，并计算各组细胞的存活率，另一块板转染 HIF-1a 空质粒，其余步骤同上。CCK-8 实验结果（图 9，表 11）显示：与空质粒组相比，过表达质粒组极大地提高了细胞的存活率，并且阻断了 BLT4 抑制细胞增殖生长的作用，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。按照上述分组处理 786-0 细胞后，提蛋白，进行 Western blot 实验，Western blot 实验结果显示：在肾透明癌细胞 786-0 中，转染 HIF-1a 过表达质粒可以阻断 SR-B1 抑制剂 BLT4 对 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白水平的降低作用（图 9，表 12），差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

表 11 786-0 细胞中不同处理组的增殖情况（均数 \pm 标准差）Table 11 Proliferation of different group of 786-0 cells (Mean \pm SD)

组别	0 μ M	25 μ M	50 μ M	60 μ M
阴性质粒	1.0000 \pm 0.04649	0.7890 \pm 0.05668	0.4721 \pm 0.04935	0.3246 \pm 0.03050
阳性质粒	1.0000 \pm 0.03030	0.8816 \pm 0.00454	0.6658 \pm 0.01965	0.5582 \pm 0.02560

表 12 不同组间 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白水平的灰度值比较（均数 \pm 标准差）Table 12 Gray value comparison of HIF-1a gene and SR-B1 gene expression among different groups (Mean \pm SD)

组别	0 μ M	25 μ M	50 μ M	60 μ M
HIF-1a+阴性质粒	0.8796 \pm 0.09498	0.3605 \pm 0.02233	0.1669 \pm 0.02618	0.0064 \pm 0.00126
HIF-1a+阳性质粒	2.9193 \pm 0.07476	1.3010 \pm 0.07064	0.5958 \pm 0.08885	0.0364 \pm 0.00214
SR-B1+阴性质粒	0.3568 \pm 0.03177	0.2272 \pm 0.02545	0.0520 \pm 0.00528	0.0096 \pm 0.00226
SR-B1+阳性质粒	1.2386 \pm 0.03256	0.9319 \pm 0.05770	0.7992 \pm 0.03992	0.0455 \pm 0.00694

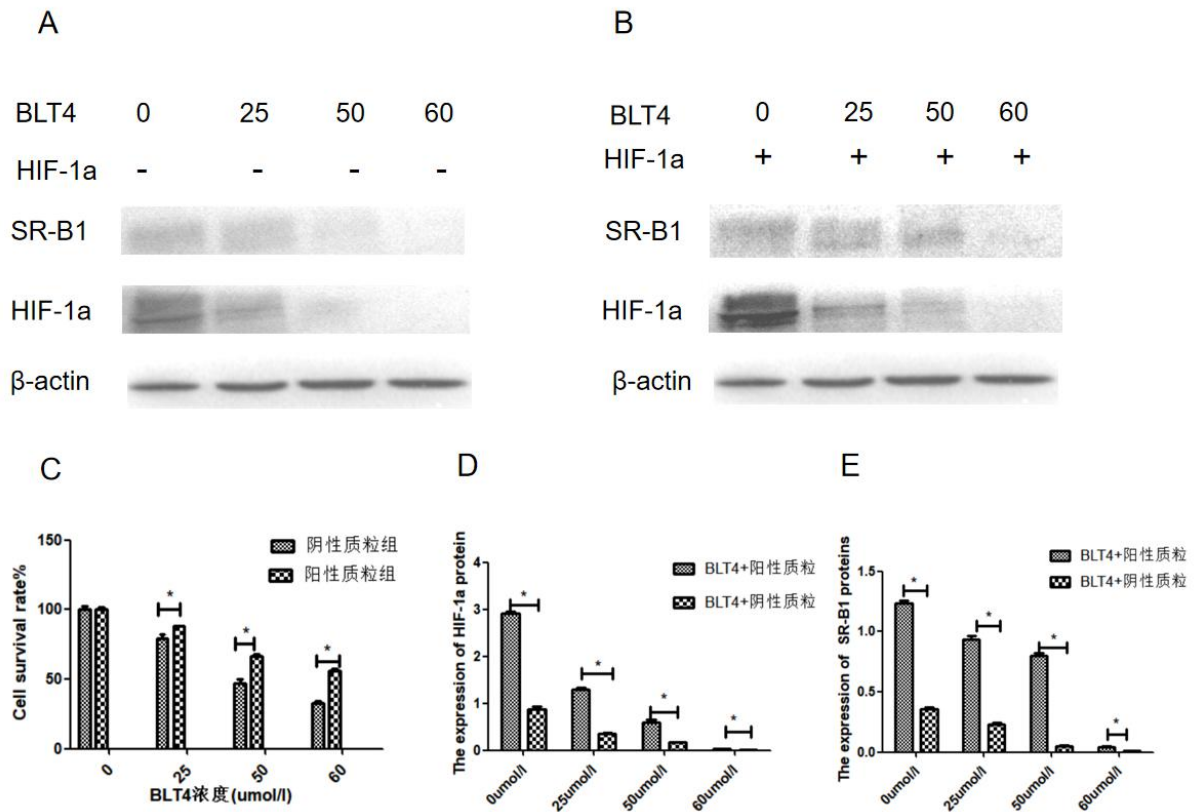


图 9: 用过表达质粒转染 786-0 细胞与不同浓度 BLT4 联用后, HIF-1a 和 SR-B1 蛋白的表达情况的比较及细胞的增殖情况。A: 786-0 细胞过表达 HIF-1a 阴性质粒后加入 SR-B1 抑制剂 BLT4 后, SR-B1 和 HIF-1a 蛋白条带表达情况; B: 786-0 细胞过表达 HIF-1a 阳性质粒后加入 SR-B1 抑制剂 BLT4 后, SR-B1 和 HIF-1a 蛋白条带表达情况; C: 用阳性质粒与阴性质粒转染 786-0 细胞并与不同浓度 BLT4 联用后, 细胞增殖能力的比较; D: 用 HIF-1a 阳性质粒转染 786-0 细胞与不同浓度 BLT4 联用后, HIF-1a 蛋白灰度值分析柱状图; E: 用 HIF-1a 阳性质粒转染 786-0 细胞与不同浓度 BLT4 联用后, SR-B1 蛋白灰度值分析柱状图。

备注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

4. 过表达肾小管上皮细胞 HK-2 中 SR-B1 基因, 梯度加入 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774, 检测细胞的增殖水平以及 SR-B1 和 HIF-1a 蛋白的表达水平。

4.1 应用梯度浓度 IDF-11774 抑制正常肾小管上皮细胞 (HK-2) 后, 随着 IDF-11774 的浓度梯度的增高, HIF 信号通路的关键分子 HIF-1a 呈明显的降低趋势, SR-B1 蛋白的表达不受影响。

根据文献报道及前期实验, 设置 HIF-1a 特异性抑制剂 IDF-11774 四个梯度浓度 (0umol/l、10umol/l、25umol/l、30umol/l) 处理正常肾小管上皮细胞 (HK-2), 利用 Western blot 实验技术比较 SR-B1 和 HIF 信号通路中关键分子 HIF-1a 蛋白的表达情况。结果如图 10 和表 13 所示: HIF-1a 随着 IDF-11774 的浓度梯度的增高, 呈明显的降低趋

势，且较未处理组（0umol/l）低表达，差异具有统计学意义， $P < 0.05$ ；SR-B1 随着 IDF-11774 的浓度增高，表达未有明显差异。

表 13 不同组间 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白水平的灰度值比较（均数±标准差）

Table 13 Gray value comparison of HIF-1a gene and SR-B1 gene expression among different groups (Mean±SD)

组别	0uM	15uM	25uM	30uM
HIF-1a	1.6942±0.05930	1.1775±0.12084	1.0142±0.11416	0.0663±0.00738
SR-B1	1.6874±0.15337	1.6874±0.15337	1.6875±0.05537	1.7022±0.04361

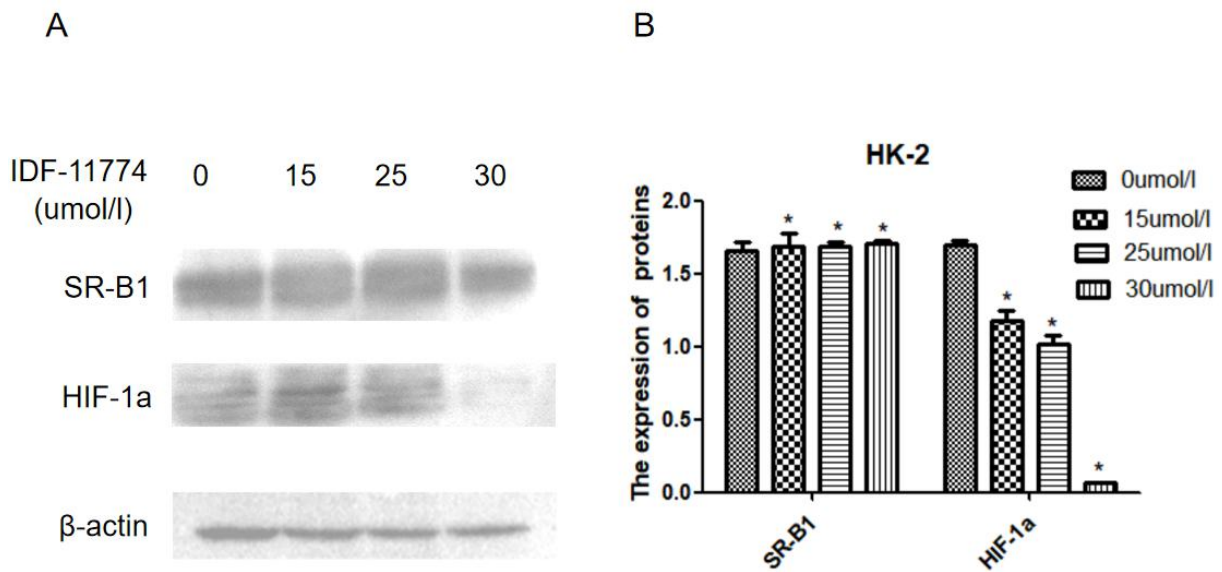


图 10: HK-2 细胞梯度使用 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 后，HIF-1a 和 SR-B1 蛋白的相对表达情况。A: HK-2 细胞，不同 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 浓度下 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白条带表达情况；B: HK-2 细胞，不同 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 浓度下 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白灰度值分析柱状图。

备注：*表示与对照组比较， $P < 0.05$ 。

4.2 应用梯度浓度 IDF-11774 抑制正常肾小管上皮细胞（HK-2）后转染 SR-B1 过表达质粒，检测 SR-B1 和 HIF-1a 的表达水平及细胞增殖情况。

实验设置实验组和对照组，实验组将过表达质粒与 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 进行组合，过表达质粒转染比例分别为 0.5: 1，0.75: 1 和 1: 1 组，HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 浓度分别为 15umol/L，25umol/L，30umol/L，最终设定实验组的组合方式为 0.5: 1 组与 15umol/L 组，0.75: 1 组与 25umol/L 组，1: 1 组和 30umol/L 组。对照组用阴性 SR-B1 质粒处理，具体操作步骤同上所述。通过 CCK-8 法比较不同处理组细胞的存活率，通过 Western blot 方法比较 SR-B1 和 HIF 信号通路中关键分子 HIF-1a 蛋白的表达情况。CCK-8 结果（图 11C）显示：与对照组相比，过表达 SR-B1 质粒后，能明显阻断 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 的部分作用，提高细胞的存活率，差异均具有统计学意义。Western blot

结果显示：过表达 SR-B1 质粒后，能够抵消 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 的部分作用效果，提高 HIF-1a 蛋白的表达（图 11 和表 14），差异均具有统计学意义。

表 14 不同条件下 HIF-1a 和 SR-B1 蛋白水平的灰度值比较（均数±标准差）

Table 14 Gray value comparison of HIF-1a gene and SR-B1 gene expression among different groups (Mean±SD)

组别	0uM	15uM	25uM	30uM
HIF-1a+阴性质粒	2.7349±0.38452	1.3509±0.12999	0.3011±0.03111	0.0336±0.00389
HIF-1a+阳性质粒	3.1973±0.25317	0.4464±0.02729	0.5348±0.02247	0.7600±0.04049
SR-B1+阴性质粒	0.8047±0.08870	0.8100±0.03229	0.8128±0.09973	0.5361±0.09749
SR-B1+阳性质粒	1.0942±0.09524	1.4179±0.04861	0.9667±0.03595	0.2370±0.45384

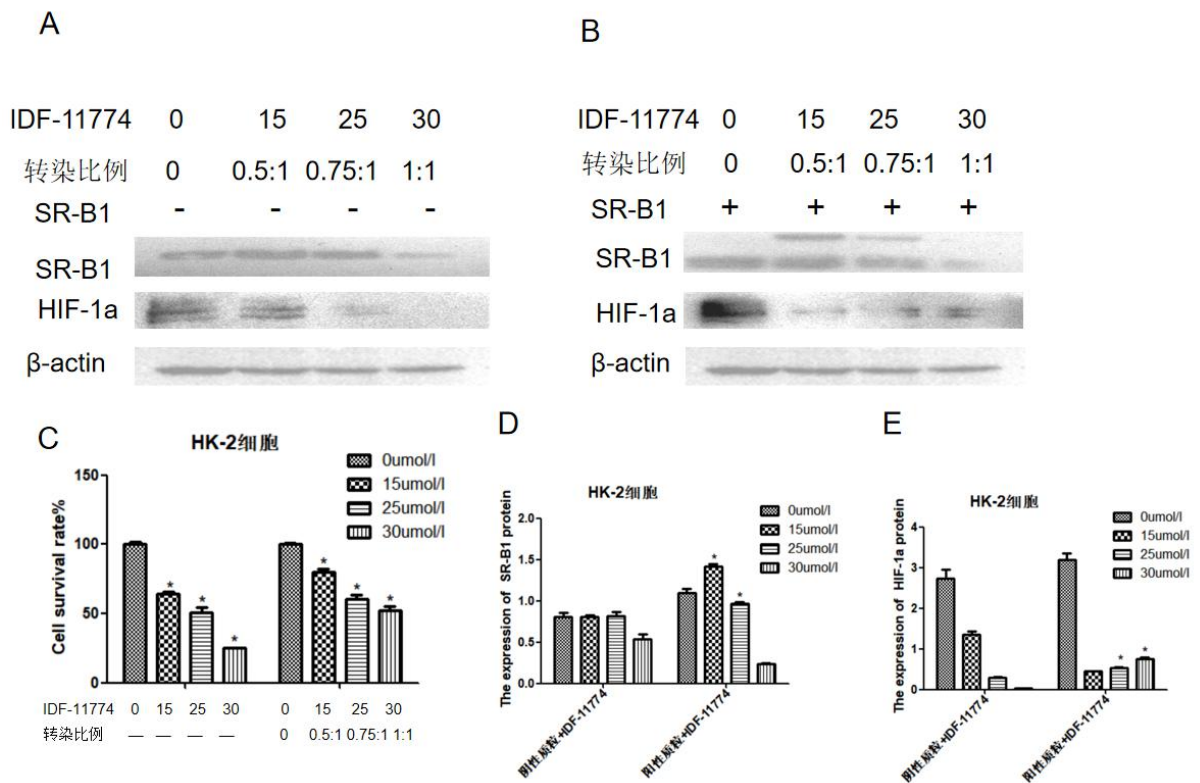


图 11: HK-2 细胞梯度过表达 SR-B1 后梯度加入 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774, HIF-1a 和 SR-B1 蛋白的表达情况及细胞的增殖情况。A: HK-2 细胞过表达 SR-B1 阴性质粒后加入 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774, SR-B1 和 HIF-1a 蛋白条带表达情况; B: HK-2 细胞过表达 SR-B1 阳性质粒后加入 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774, SR-B1 和 HIF-1a 蛋白条带表达情况; C: 用阳性质粒转染 HK-2 细胞并与不同浓度 IDF-11774 联用后与单独 IDF-11774 处理, 细胞增殖能力的比较; D: 用 SR-B1 质粒转染 HK-2 细胞与不同浓度 IDF-11774 联用后, SR-B1 蛋白灰度值分析柱状图; E: 用 SR-B1 质粒转染 HK-2 细胞与不同浓度 IDF-11774 联用后, HIF-1a 蛋白灰度值分析柱状图。

备注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$

讨 论

(Discussions)

1. 肾透明细胞癌与脂质代谢

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 是泌尿系统最易见的恶性肿瘤, 其罹患率正以较高的水平逐年递增。在 2018 年, 共新增 400000 例肾细胞癌患者, 并导致 175000 人丧生^[22]。17% 的肾癌患者都将且会发生转移, 仅有 12% 的肾癌患者存活时间超过了 5 年^[23]。肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是肾细胞癌最常见的亚型, 组织学特点为胞浆丰富、透亮, 提示癌细胞内可能富含较多脂质及大量糖原。大量的研究证据显示, 肾细胞癌是一种与代谢相关的疾病^[24]。目前, 越来越多的文献及研究表明, 脂质代谢与肾透明细胞癌关系密切, 很可能参与了肾透明细胞癌的发生发展, 但脂质代谢在肿瘤进展中的作用机制还不是很明确。大量临床数据表明, 肾透明细胞癌组织内的胆固醇含量明显高于正常肾组织, 存在着胆固醇的积累。有实验研究发现, 与正常肾脏组织相比, ccRCC 组织中总胆固醇和胆固醇酯(CE)的比例更高^[25]。Sundelin 等人的研究证明了 ccRCC 组织内积累了大量的脂质, 并且以 CE 形态为主^[26], 以上结果表明胆固醇代谢和 ccRCC 之间有很强的联系。

B 型 1 类清道夫受体 (Scavenger receptor class B type 1, SR-B1) 是分子量为 82 kDa 的一种膜蛋白, 它属于 CD36 超家族, SR-B1 和 CD36 具有广泛的配体亲和力^[27]。SR-B1 是目前报道唯一作用于 HDL 胆固醇酯的选择性吸收分子^[28], 肾透明细胞癌中胆固醇的大量积累是由于 SR-B1 的过表达从而导致 HDL 胆固醇摄取增加的结果。SR-B1 在脂质代谢中起着关键作用, 目前关于 SR-B1 在肾透明细胞癌中影响脂质代谢异常的分子机制值得深入探讨。

课题组前期主要研究 HDL 胆固醇酯的吸收分子 SR-B1 在肾透明细胞癌中的分子机制, 课题组前期利用免疫组织化学技术证明: SR-B1 在肾透明细胞癌中较正常肾组织高表达且与不良预后相关; 利用 RT-PCR 技术在 mRNA 水平上也验证了 SR-B1 基因的高表达; 在细胞水平, SR-B1 在 786-0、ACHN 和 Caki-1 细胞中较 HK-2 细胞高表达; 沉默 786-0 细胞中的 SR-B1 基因后, 不仅细胞中的 HDL 胆固醇酯含量下降, 而且明显抑制了细胞的增殖、侵袭等; 过表达 HK-2 细胞的 SR-B1 基因后, 细胞内的 HDL 胆固醇酯含量升高, 而且明显促进了细胞的增殖、侵袭等。以上结果显示 SR-B1 在肾透明细胞癌的发展过程中有着举足轻重的影响, 肾透明细胞癌中 SR-B1 基因高表达可能是通过改变细胞内 HDL-C 的含量来影响肾透明细胞癌细胞的发生发展的, SR-B1 可能是通过影响脂质代谢调控肾透明细胞癌的进展。

2. 肾透明细胞癌与 HIF 通路研究现状

HIF信号通路是由几种被称为缺氧诱导因子（Hypoxia-inducible factors, HIFs）的异二聚体构成，分别是HIF-1、HIF-2和HIF-3，并且大多数低氧效应均由他们介导^[29]。缺氧诱导因子由 α 亚基和 β 亚基构成，目前关于缺氧诱导因子1a（Hypoxia-inducible factor 1a, HIF-1a）和缺氧诱导因子2a（Hypoxia-inducible factor 2a, HIF-2a）的研究报道越来越多。在缺氧条件下，HIF-1a和HIF-2a作为HIF- α 的子单元与HIF- β 结合，调节目标基因的转录。在结构上，它们有48%相同的DNA结合区域，但又有其独特的生物学效应。HIF在常氧条件下5 min内即可失活，而在缺氧条件下，HIF的稳定性和转录活性明显增加，从而诱导其下游效应分子的表达^[30]。在缺氧的环境下，HIF-1a作为主要的转录因子之一，其活性显著增强，并且调控缺氧应答基因的水平。当缺氧时，HIF-1a蛋白表达增强并快速调节下游相关分子的活性水平。

众所周知，肾透明细胞癌中伴随着VHL的缺失，越来越多的文献也报道了这一点^[31]。在常氧条件下，HIF-1a的快速降解是由VHL与E3泛素连接酶协同介导的^[32]。先天性VHL突变的患者，VHL基因突变失活引起HIF-1a异常调节和活化，奠定了肾细胞癌发生发展的基础^[33]。HIF-1a对肿瘤环境缺氧的感应，促进靶基因的转录，引起肿瘤的侵袭、代谢改变、血管生成和转移潜能^[34,35]。有文献报道，HIF-1a在肾癌和肝癌等多种肿瘤中高表达，并且促进肿瘤的转移^[36,37]，通过HIF-1a的低氧反应是实体瘤生长的重要积极因素^[38]，HIF-1a是成纤维细胞H-ras转化后的肿瘤生长中起着正调节剂的作用^[38]。而肾透明细胞癌的进展与HIF途径密切相关，因此，本研究的重点集中于HIF-1a与肾透明细胞癌之间的关系。我们推测，HIF信号通路影响肾透明细胞癌进展的分子机制：1.VHL的基因突变；2.HIF-1a的累积。但目前关于HIF-2a的研究报道越来越多，有文献报道，HIF-2a在肾透明细胞癌中高表达^[39]，并且HIF-2a的抑制剂已经用于临床治疗^[40]，但HIF-1a和HIF-2a在肾透明细胞癌中的表达情况和主导作用仍然存在很大争议，且没有确定的答案，有文献表明，HIF1和HIF2下游低氧基因表达的激活被认为是ccRCC发展的主要驱动力^[41]，也有人报道ccRCC的启动需要HIF-1的初始表达，而HIF-2的表达促进了疾病的进展^[42]。而本实验研究在786-0，Caki-1和ACHN细胞及HK-2细胞中，利用Western blot实验方法检测HIF-1a蛋白的表达情况，发现HIF-1a在Caki-1中较正常肾小管上皮细胞HK-2高表达，但在786-0和ACHN细胞中较HK-2细胞低表达，差异具有统计学意义。这一结果表明HIF-1a并不是在所有肾癌细胞株中高表达，与现阶段存在的争议相呼应，但HIF-1a对肾透明细胞癌的发展过程也发挥着作用，HIF-1a和HIF-2a在肾透明细胞癌的作用机制仍需继续研究探讨。

3.SR-B1 与 HIF 信号通路之间相关性研究现状

HIF 信号通路中的延伸因子 B（ElonginB）和延伸因子 C（ElonginC）是一类具有延伸作用的因子，参与转录延伸，并与细胞功能有关^[43]。VHL 蛋白（pVHL）与 ElonginB/C

形成稳定的复合物 (VHL-BC-Cul-2)，调控 HIF-1a，抑制肿瘤的生长；而 VHL 突变通常破坏 VHL 与 Elongin B 和 ElonginC 之间的相互作用，并使 VHL-Elongin B / C-Cullin-2 E3 连接酶失活，激活 HIF-1a 的活性，从而促进肿瘤的生长^[44,45]。

已有文献表明，HIF-1a 在肾透明细胞癌中高表达，本课题组前期实验已经证明与正常肾组织相比，SR-B1 在肾透明细胞癌中高表达。HIF-1a 主要参与缺氧诱导因子信号通路，SR-B1 主要参与脂质代谢，而在肾透明细胞癌中，既有着脂质代谢的异常，又存在缺氧诱导因子的过度激活，那么 SR-B1 与 HIF-1a 之间的关系值得我们探讨。课题组前期通过表达谱芯片发现：沉默肾透明细胞癌中的 SR-B1 基因后，多条重要癌症相关通路如 ERK/MAPK、HIF-VEGF、Hedgehog (Hh) 等中的关键基因表达均存在不同程度的下调，提示 SR-B1 可能与多条通路同时作用调控肾透明细胞癌的发展。Hedgehog 通路的相关研究已经由课题组其他成员完成，且证明了 SR-B1 通过调控 Hedgehog 信号通路影响肾透明细胞癌的发生发展，SR-B1 与 ERK/MAPK 和 HIF-VEGF 信号通路在肾癌发生发展中的关系目前正在研究探索中。课题组成员通过液相质谱及 Co-IP 实验发现，SR-B1 可以将 HIF 信号通路中的 ElonginC 蛋白拉下，证明 SR-B1 与 ElonginC 蛋白之间有相互作用的关系，提示 SR-B1 可能是直接通过 HIF 信号通路中 ElonginC 影响 HIF-1a，进而调控肾透明细胞癌的生长。质谱还发现 SR-B1 与 ERK/MAPK 信号通路中 ERK、p-ERK 存在相互作用，且课题组其他成员已经证明 SR-B1 和 ERK、p-ERK 在肾透明细胞癌中较正常肾组织高表达，沉默 SR-B1 后 ERK、p-ERK 的表达降低，以上结果显示，SR-B1 可调控 ERK/MAPK，促进肾透明细胞癌的增殖与进展。

本研究首先通过 Western blot 实验确定了 SR-B1 和 HIF-1a 在肾透明细胞癌中较正常肾小管上皮细胞高表达，SR-B1 在 HK-2 细胞中表达较低，差异具有统计学意义。当应用梯度浓度 SR-B1 的特异性抑制剂 BLT4 处理 786-0 后，Western blot 实验结果表明随着 BLT4 剂量升高，HIF-1a 蛋白的水平逐渐降低；当用 SR-B1 过表达质粒转染 HK-2 细胞后，通过 Western blot 实验检测发现随着 SR-B1 过表达质粒转染浓度的升高，SR-B1 和 HIF-1a 的蛋白水平均逐渐升高。以上结果均提示，SR-B1 可能在 HIF-1a 的上游，可以调控并影响 HIF-1a 的表达。接着应用免疫共沉淀技术 (CO-IP) 证实了在 786-0 细胞中，SR-B1 和 HIF 信号通路关键分子 HIF-1a 之间存在蛋白互作。随后应用 SR-B1 特异性抑制剂 BLT4 处理 786-0 细胞，降低 SR-B1 的表达后，转染 HIF-1a 过表达质粒，CCK-8 实验发现 HIF-1a 过表达质粒可以提高细胞的增殖，而 BLT4 可以阻断 HIF-1a 过表达质粒对细胞增殖水平的提升作用，降低细胞的存活率，差异具有统计学意义；Western blot 实验显示 HIF-1a 过表达质粒可以阻断 BLT4 对 HIF-1a 的抑制作用，提高 HIF-1a 蛋白的表达，但 HIF-1a 过表达质粒对 SR-B1 蛋白的表达没有影响，差异均具有统计学意义。另一方面，过表达肾小管上皮细胞 HK-2 中 SR-B1 基因，梯度加入 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774。CCK-8 实验发现 IDF-11774 可以抑制细胞的增殖，而 SR-B1 过表达质粒可以阻断 HIF-1a 抑制剂对细胞增殖的抑制作用，大幅度增强细胞的增殖能力，差异具有统计学意义；Western blot 实验检测发现 SR-B1 过表达质粒可以阻断 IDF-11774 对 HIF-1a

蛋白的抑制作用，提高 HIF-1a 蛋白的表达，但 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 对 SR-B1 蛋白的表达没有影响，差异均具有统计学意义。以上结果均证明，SR-B1 可以通过调控 HIF 途径中的 HIF-1a，影响肾透明细胞癌的增殖。

课题组其他成员通过研究 SR-B1 是否通过 ERK/MAPK 调控 HIF，从而促进肾透明细胞癌的增殖，间接证明 SR-B1 调控 HIF 影响肾透明细胞癌的进展。其结果显示在肾透明细胞癌细胞 786-0 和肾小管上皮细胞 HK-2 中 SR-B1 与 ERK、p-ERK 存在蛋白互作，HIF-1a 与 ERK、p-ERK 存在蛋白互作。SR-B1 过表达质粒可以升高肾小管上皮细胞 HK-2 中 ERK、p-ERK、HIF-1a 蛋白和 mRNA 水平，增加细胞的增殖、迁移和侵袭；ERK 抑制剂可以有效的阻断 SR-B1 过表达质粒对 HIF-1a 蛋白和 mRNA 水平的升高作用，以及阻断对细胞的增殖、迁移和侵袭的影响。SR-B1 沉默质粒可以降低肾透明细胞癌细胞 786-0 中 ERK、p-ERK、HIF-1a 的蛋白水平，ERK 激动剂 (EGF) 可以有效的阻断 SR-B1 沉默质粒对 ERK、p-ERK、HIF-1a 蛋白的降低作用，并提高细胞的增殖、迁移和侵袭。结合以上所有实验结果，我们可以得到：1.SR-B1 通过直接调控 HIF 途径的 HIF-1a，影响肾透明细胞癌的增殖；2.SR-B1 通过 ERK/MAPK 间接调控 HIF 通路促进肾透明细胞癌增殖。

本实验研究的特色在于：1.将 SR-B1 高表达的 786-0 细胞用 SR-B1 抑制剂 BLT4 处理后，再过表达 HIF-1a 质粒；2.在 SR-B1 低表达的 HK-2 细胞中过表达 SR-B1，再加入 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774。从正反两个方面进行探讨研究，所得结果更全面，也更具说服力。

4.不足与展望

本研究探讨了 SR-B1 是否调控 HIF 途径直接促进肾透明癌细胞的增殖，结果显示 SRB1 可以直接调控 HIF 途径促进肾透明细胞癌的增殖。但是本研究仍然存在一些不足：1.在 HK-2 细胞中过表达 SR-B1 后联用 HIF-1a 抑制剂 IDF-11774 实验中，我们的设计思路是低浓度 SR-B1 质粒与低浓度 IDF-11774 组合（双低），高浓度之间梯度组合（双高），但由于抑制剂本身对细胞有较大的致死率，而质粒本身也对细胞有毒性，所以两者联合后，对细胞的杀伤特别大，导致实验结果不完美，与设计初衷稍有偏差；2.目前关于 HIF-1a 和 HIF-2a 在肾癌中的作用争议较大，而本研究重点在 HIF-1a 上，后期需要进行 HIF-2a 的相关实验 3.由于时间有限，HIF-VEGF 通路中的 VEGF 还未在蛋白及 mRNA 水平上进行验证，目前仅有细胞增殖的情况。后期将完善相关实验，深入阐明 SR-B1 基因调控 HIF 途径并影响肾透明细胞癌生物学功能的分子机制。

结 论

(Conclusions)

SR-B1 可调控 HIF 信号通路的关键分子 HIF-1a，促进肾透明癌细胞的增殖。

参考文献

- 1.Zhang Z, Lin E, Zhuang H, Xie L, Feng X, Liu J, Yu Y: Construction of a novel gene-based model for prognosis prediction of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell Int* 2020, 20:27-27.
- 2.Chen L, Peng T, Luo Y, Zhou F, Wang G, Qian K, Xiao Y, Wang X: ACAT1 and Metabolism-Related Pathways Are Essential for the Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC), as Determined by Co-expression Network Analysis. *Front Oncol* 2019, 9:957-957.
- 3.Motzer RJ: Perspective: What next for treatment? (1476-4687 (Electronic)).
Xu G-H, Lou N, Shi H-C, Xu Y-C, Ruan H-L, Xiao W, Liu L, Li X, Xiao H-B, Qiu B et al:
- 4.Up-regulation of SR-BI promotes progression and serves as a prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2018, 18(1):88-88.
- 5.Kim J, Thompson B, Han S, Lotan Y, McDonald JG, Ye J: Uptake of HDL-cholesterol contributes to lipid accumulation in clear cell renal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2019, 1864(12):158525.
- 6.Wu G, Wang Q, Xu Y, Li J, Zhang H, Qi G, Xia Q: Targeting the transcription factor receptor LXR to treat clear cell renal cell carcinoma: agonist or inverse agonist? *Cell Death Dis* 2019, 10(6):416-416.
- 7.Liu Z, Liu X, Liu S, Cao Q: Cholesterol promotes the migration and invasion of renal carcinoma cells by regulating the KLF5/miR-27a/FBXW7 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018, 502(1):69-75.
- 8.Velagapudi S, Schraml P, Yalcinkaya M, Bolck HA, Rohrer L, Moch H, von Eckardstein A: Scavenger receptor BI promotes cytoplasmic accumulation of lipoproteins in clear-cell renal cell carcinoma. *J Lipid Res* 2018, 59(11):2188-2201.
- 9.Semenza GL: Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* 2002, 64(5):993-998.
- 10.Wierzbicki PM, Klacz J, Kotulak-Chrzaszcz A, Wronska A, Stanislawowski M, Rybarczyk A, Ludziejewska A, Kmiec Z, Matuszewski M: Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGFA and p53 expression in patients with clear-cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first-line treatment. *International journal of oncology* 2019, 55(2):371-390.
- 11.Isaacsson Velho P, Nardo M, Souza MCLdA, Bonadio RRCC, Marta GN, Muniz DQB, Bastos DA, Dzik C: Analysis of Efficacy and Toxicity Profile of First-Line Sunitinib or Pazopanib in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma in the Brazilian Population. *J Glob Oncol* 2018, 4:1-10.
- 12.Wan L, Huang J, Chen J, Wang R, Dong C, Lu S, Wu X: Expression and significance of FOXP1, HIF-1a and VEGF in renal clear cell carcinoma. *J BUON* 2015.
- 13.van der Mijjn JC, Fu L, Khani F, Zhang T, Molina AM, Barbieri CE, Chen Q, Gross SS, Gudas LJ, Nanus DM: Combined Metabolomics and Genome-Wide Transcriptomics Analyses Show Multiple HIF1 α -Induced Changes in Lipid Metabolism in Early Stage Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Transl Oncol* 2020, 13(2):177-185.

- 14.Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK: The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* 2015.
- 15.Kowshik J, Giri H, Kishore TKK, Kesavan R, Vankudavath RN, Reddy GB, Dixit M, Nagini S: Ellagic acid inhibits VEGF/VEGFR2, PI3K/Akt and MAPK signaling cascades in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *Anticancer Agents Med Chem* 2014.
- 16.Déry M-AC, Michaud MD, Richard DE: Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005, 37(3):535-540.
- 17.Bárdos JI, Ashcroft M: Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2005, 1755(2):107-120.
- 18.Fukuda R, Hirota K Fau - Fan F, Fan F Fau - Jung YD, Jung Yd Fau - Ellis LM, Ellis Lm Fau - Semenza GL, Semenza GL: Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. (0021-9258 (Print)).
- 19.Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J: Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cellular Signalling* 2005, 17(1):1-9.
- 20.Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS: MAPK and Akt Act Cooperatively but Independently on Hypoxia Inducible Factor-1 α in rasV12 Upregulation of VEGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 287(1):292-300.
- 21.Liang Z, Chi Yj Fau - Lin GQ, Lin Gq Fau - Luo SH, Luo Sh Fau - Jiang QY, Jiang Qy Fau - Chen YK, Chen YK: MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway. (2284-0729 (Electronic)).
- 22.Elias Roy,Sharma Akanksha,Singla Nirmish et al. Next Generation Sequencing in Renal Cell Carcinoma: Towards Precision Medicine.[J] .*Kidney Cancer J*, 2019, 17: 94-104.
- 23.Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD: National Cancer Institute; Bethesda, MD; 2019.
- 24.Lameirinhas Ana,Miranda-Gonçalves Vera,Henrique Rui et al. The Complex Interplay between Metabolic Reprogramming and Epigenetic Alterations in Renal Cell Carcinoma.[J] .*Genes (Basel)*, 2019, 10: undefined.
- 25.Gebhard R L,Clayman R V,Prigge W F et al. Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma.[J] .*J. Lipid Res.*, 1987, 28: 1177-84.
- 26.Sundelin Jeanna Perman,Ståhlman Marcus,Lundqvist Annika et al. Increased expression of the very low-density lipoprotein receptor mediates lipid accumulation in clear-cell renal cell carcinoma.[J] .*PLoS ONE*, 2012, 7: e48694.
- 27.Zanoni Paolo,Khetarpal Sumeet A,Larach Daniel B et al. Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease.[J] .*Science*, 2016, 351: 1166-71.
- 28.Singh Amar B,Dong Bin,Kraemer Fredric B et al. FXR activation promotes intestinal cholesterol excretion and attenuates hyperlipidemia in SR-B1-deficient mice fed a high-fat and high-cholesterol diet.[J] .*Physiol Rep*, 2020, 8: e14387.
- 29.Foster John G,Wong Sybil C K,Sharp Tyson V,The hypoxic tumor microenvironment: driving the tumorigenesis of non-small-cell lung cancer.[J] .*Future Oncol*, 2014, 10: 2659-74.
- 30.Du Xiangnan,Yang Jian,Liu Cuiying et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 α and 2 α Have

- Beneficial Effects in Remote Ischemic Preconditioning Against Stroke by Modulating Inflammatory Responses in Aged Rats.[J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 54.
- 31.Chakraborty Abhishek A,Coalescing Lessons from Oxygen Sensing, Tumor Metabolism, and Epigenetics to Target VHL loss in Kidney Cancer.[J]. *Semin. Cancer Biol.*, 2020, undefined: undefined.
- 32.Yang Fei,Cai Jiarong,Zhan Hailun et al. α Suppression of TRPM7 Inhibited Hypoxia-Induced Migration and Invasion of Androgen-Independent Prostate Cancer Cells by Enhancing RACK1-Mediated Degradation of HIF-1.[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6724810.
- 33.Henegan John Clark,Gomez Christian R,Heritable Cancer Syndromes Related to the Hypoxia Pathway.[J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 68.
- 34.Courtney Rupert,Ngo Darleen C,Malik Neha et al. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K.[J]. *Mol. Biol. Rep.*, 2015, 42: 841-51.
- 35.Denko Nicholas C,Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour.[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2008, 8: 705-13.
- 36.Jang Yunseon,Han Jeongsu,Kim Soo Jeong et al. Suppression of mitochondrial respiration with auraptene inhibits the progression of renal cell carcinoma: involvement of HIF-1 α degradation.[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 38127-38.
- 37.Cui S Y , Huang J Y , Chen Y T , et al. The role of Aurora A in hypoxia-inducible factor 1 α -promoting malignant phenotypes of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(17):2849-2866.
- 38.Swiatek Monika,Jancewicz Iga,Kluebsongnoen Jakkapong et al. Various forms of HIF-1 α protein characterize the clear cell renal cell carcinoma cell lines.[J]. *IUBMB Life*, 2020.
- 39.Gkagkalidis K , Kampantais S , Dimitriadis G , et al. Expression of HIF-2 α in clear-cell renal cell carcinoma independently predicts overall survival[J]. *Medical Molecular Morphology*, 2020(6).
- 40.Yu Yancheng,Yu Quanwei,Zhang Xiaojin,Allosteric inhibition of HIF-2 α as a novel therapy for clear cell renal cell carcinoma.[J]. *Drug Discov. Today*, 2019, 24: 2332-2340.
- 41.Wohlrab Christina,Kuiper Caroline,Vissers Margreet Cm et al. Ascorbate modulates the hypoxic pathway by increasing intracellular activity of the HIF hydroxylases in renal cell carcinoma cells.[J]. *Hypoxia (Auckl)*, 2019, 7: 17-31.
- 42.Shi Fei,Wei Di,Zhu Zheng et al. The RNA-binding protein QKI suppresses tumorigenesis of clear cell renal cell carcinoma by regulating the expression of HIF-1 α . [J]. *J Cancer*, 2020, 11: 1359-1370.
- 43.Okumura F , Okumura A , Nakatsukasa K , et al. [Regulation of cellular functions by Elongin BC based E3 ubiquitin ligase][J]. *Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society*, 2013, 85(2):76-88.
- 44.Akhtar M, Albozom I A, Al T H. Molecular and Metabolic Basis of Clear Cell Carcinoma of the Kidney.[J]. *Advances in Anatomic Pathology*, 2018:1.
- 45.Liu Xijuan,Zurlo Giada,Zhang Qing,The Roles of Cullin-2 E3 Ubiquitin Ligase Complex in Cancer.[J]. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, 1217: 173-186.

文献综述 (Review)

HIF 信号通路的研究进展

摘要: 缺氧在许多恶性肿瘤中起着重要的作用, 其促进肿瘤的发生发展。低氧水平引起的影 响主要是依靠缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)协调的, HIFs 调控许多参与癌症进展基因的表达。缺氧诱导因子(HIF)信号通路主要由几种异二聚体构成, 分别为 HIF-1、HIF-2 和 HIF-3, 目前, 关于 HIF-1a 和 HIF-2a 的研究报道较多。其中肾透明细胞癌与 HIF 信号通路的相关研究越来越多, 大多数研究集中在 VHL-HIF-VEGF 信号通路, 且大部分肾癌患者存在 VHL 突变, 证明该通路可能参与了肾透明细胞癌的发生发展。此外, HIF 信号通路也与其他肿瘤的进展关系密切, 并与其他信号途径共同影响肿瘤的进展。本文撰写综述一篇, 描述 HIF 信号通路, 为深入研究做准备。

一、HIF 信号通路的基本构成

1、HIFs 家族

HIF 信号通路是由几种被称为缺氧诱导因子 (HIFs) 的异二聚体构成的, 他们分别是 HIF-1、HIF-2 和 HIF-3, 大多数低氧效应均由他们介导^[1]。三种不同的 HIFs 均有 HIF-a 子单元, 哺乳动物基因组编码的三个 α 亚基 (HIF-1a、HIF-2a 和 HIF-3a) 和三个 β 亚基 (Arnt1、Arnt2 和 Arnt3) 是已经确定的^[2], HIF-1a 和 HIF-2a 在氨基酸序列水平有 48% 同源性^[3], HIF-1a 在急性缺氧反应中起关键作用, 而 HIF-2a 则影响慢性缺氧反应。HIF-1a 和 HIF-2a 都有 N-末端反激活域 (N-TAD) 和 C-末端反激活域 (C-TAD), 而 HIF-3a 缺少 C-末端反激活域 (C-TAD), HIF-1a 和 HIF-2a 这两个亚型控制着共同基因组的表达^[4]。有文献报道, HIF-3a 蛋白的功能为转录激活, 可以激活一个对缺氧反应独特的转录程序^[5]。

2、HIFs 蛋白

HIF-1 最早是在 1992 年由 Semenza GL 发现的^[6], HIF-1 是一种由 α 亚基(HIF-1a)和 β 亚基(HIF-1 β)组成的异质二聚体^[7,8]。HIF-1a 蛋白质是由信使 RNA 进行翻译和通过羟化酶进行修饰, 在氧气充足的情况下, 脯氨酸残基羟化和 HIF-1a 的泛素化修饰是依赖其脯氨酸羟化 E3 连接酶和 VHL。另一方面, HIF-1a 激活转录的能力也是由天冬酰胺残留的羟化所修饰^[9,10,11]。羟化 HIF-1a 作为转录因子是不活跃的。作为酶反应的底物, 分子氧是缺乏的, 由于脯氨酸残基的羟化和天冬酰胺的残留, 蛋白质破坏减少, 从而 HIF-1a 积累在细胞中^[12,13]。VHL 基因与 HIF 信号通路有很大的联系, 有文献报道, VHL 基因突变可绕过泛素化检查点, 使缺氧条件下的 HIFs 稳定^[14]。HIF-2 是一种转录因子, 主要作用于肾脏间质中产生环氧乙烷的细胞^[15,16], HIF-2a 是目前研究报道较多的 HIF-2。文献报道, 缺氧能够稳定 HIF-2a^[17]。HIF-1a 和 HIF-2a 有不同的表达谱和不同的目标, 例如 HIF-1a 表达是无处不在的, 而 HIF-2a 表达于更狭小的细胞, 如肝细胞和内皮细胞

[18]。目前，关于 HIF-3 的研究还比较少，值得后续深入研究。

二、HIF 与肿瘤的关系

在实性肿瘤中，肿瘤的发生发展速度非常快，但肿瘤内血管生成较缓慢，且肿瘤内血管极其脆弱，极易发生闭塞和返流^[19,20]。近年来，肿瘤的远处转移与 HIFs 的关系逐渐被阐明^[21]，大量的文献报道证实 HIFs 在肿瘤的发生发展中发挥着关键作用。

有文献报道，HIFs 在肺癌的发生发展中起关键作用，且 HIF-1a 和 HIF-2a 在 NSCLC 中的预后作用是有争议的，HIF-1a 的高表达可能预示着不良预后^[22]。也有报道指出，HIF-2a 在 NSCLC 的高表达是预后不良的一个标志，而不是 HIF-1a^[23]。Méndez-Blanco^[24] 等人的文章报道，肝癌的发生发展于缺氧诱导因子（HIF）有着密切关系，临床数据表明，HIF-1a 和 HIF-2a 在肝癌中的高表达，且 HIF-1a 和 HIF-2a 的高水平是肝癌患者不良预后的可靠指标，目前针对 HIFs 抑制剂的研究已经展开，将会很快用于临床。HIF-1a 被报道在乳腺癌中高表达，HIF-1a 的高表达与较差的总体生存率相关，肿瘤的恶性程度越高，HIF-1a 的表达水平就越高^[25]。在胃癌中也发现了缺氧诱导因子（HIF）的异常，HIF-1a 主要通过增殖，凋亡，血管生成，以及 EMT 影响胃癌的发生发展^[26]。

三、HIF 与肾透明细胞癌的关系

HIF 信号通路虽然参与多个肿瘤的发生发展，但它与肾透明细胞癌关系似乎更密切。在肾透明细胞癌中，HIF 途径是最重要且被研究最多的，其中，HIF-VEGF-VHL 首当其冲。VHL 是一种重要的肿瘤抑制因子，在大多数的肾癌透明细胞癌（Clear cell carcinoma of renal cancer, ccRCC）中缺失^[27]。肾透明细胞癌是最易见且死亡率最高的肾细胞癌亚型^[28]，占肾细胞癌的 70%~85%^[29]，也是发生于肾实质最常见的恶性肿瘤，且高达 92% 的肾透明细胞癌患者都有 VHL 的缺失^[30,31]。VHL 是 ccRCC 中的一种肿瘤抑制因子，它通过与伸长素 B 和 C 形成复合物（称“VBC”）来调节其底物，后者是 E3 泛素连接酶复合物的关键成分，对 VHL 的功能至关重要^[32,33,34,35]。众所周知，E3 连接酶是由缺氧诱导因子 a（HIFa, 包括 HIF-1a 和 HIF-2a）引起泛素化和降解，这对肾癌的表型转换有重大帮助^[36,37]。因此，VHL 的丧失导致 HIFa 的积累并易位到细胞核，随后激活诱导目标基因的转录，从而参与重要的致癌途径，包括血管生成（如血管内皮生长因子（VEGF））、糖酵解和葡萄糖转运（如 I 型葡萄糖转运蛋白（GLUT1））、红细胞的生成（典型代表是促红细胞生成素（EPO））^[38,39]。VHL 基因产物 pVHL 是一种多功能蛋白，它在细胞内自由穿梭^[40]。VHL 的失活，导致肿瘤由于血管内皮生长因子（VEGF）的过度激活，造成高度血管化。VEGF 和 EPO 是缺氧诱导的 mRNA 的产物，受 HIF 转录因子的调控^[41]。在实体肿瘤当中，肾透明细胞癌的 VEGF 水平最高，是由于 HIF2 的下调和 pVHL 的丢失。舒尼替尼作为阻止 VEGF 与 VEGFR 结合的抑制剂^[42]，是转移性肾透明细胞癌的一线化疗药物^[43]，目前，HIF-2a 的抑制剂 PT-2385 以及与其十分相似的复合物 PT-2399 已经用于临床治疗^[44,45]。越来越多的临床实验陆续展开，也极大的帮助了肾透明细胞癌患者，在未来，肾透明细胞癌患者的患病率将会下降，生存环境将会大幅改变。

目前，对于 HIF-1a 和 HIF-2a 在机体中的作用机制研究较多，但并未研究透彻，对

于 HIF-1a 和 HIF-2a 在肿瘤的作用还有着很大的争议。有文献报道, HIF-1a 是一个致癌基因, 在肾透明细胞癌中高表达^[46]; 而 HIF-2a 的激活会引起炎症反应, HIF-2a 的破坏则会导致细胞凋亡和炎症减少^[47]。而另外一篇文章对 HIF-2a 的报道则相反, 他们认为 HIF-2a 是一个致癌因子, 它在肾癌中高表达, 并且参与脂质的储存, 促进肿瘤的生长^[48]。针对目前的研究现状, 我们可能无法对 HIF-1a 和 HIF-2a 进行明确的定义, 未来的研究将会为我们一层层揭开 HIF-1a 和 HIF-2a 的神秘面纱。

四、HIF 与其他通路的关系

EMT

EMT (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤侵袭的重要过程, 其调控机制取决于肿瘤的类型和其亚型, 许多驱动 EMT 的途径都被 HIFs 影响和调控。通常来说, EMT 主要由 Wnt, TGF- β (transforming growth factor β), Sonic Hedgehog (SHH) 等调节^[49]。TGF- β 是一个 EMT 的诱导物, 而缺氧诱导因子 HIF-1a 调节 TGF- β 1 通路, Notch 是另一种可被缺氧诱导因子调控的 EMT 信号通路。

PI3k/Akt/mTOR

PI3k/Akt/mTOR 信号同路与 HIF 信号通路之间关系也很密切。众所周知, PI3K/AKT/mTOR 信号级联的激活可上调 HIF-1a 的 mRNA 转录和 HIF-1a 的蛋白翻译^[50], 这意味着多种生长因子、癌基因激活、抑癌基因突变 (如 PTEN) 可通过 PI3K/AKT/mTOR 激活 HIF-1a^[51]。糖原合成激酶 3 β (GSK3B) 可以使 HIF-1a 磷酸化, 从而导致 HIF-1a 蛋白的降解, 但 PI3K/AKT 信号可以使 GSK3B 失活, 从而使 HIF-1a 蛋白稳定^[52]。Hong 等人确定 HIF-2a 通过 PI3k / Akt 途径增加 β -catenin 的表达, 且与 HIF-1a 相比, HIF-2a 在肺癌细胞有较高的 pAkt1 表达水平^[53]。Wnt / β -catenin 信号级联是一个经典的致癌途径^[54], 而 PI3k/Akt 通路上调对于缺氧介导的 Wnt 信号级联的激活至关重要^[53]。并且, 参与 HIF 通路的关键分子是 HIF-2a 而不是 HIF-1a。

NF-kB

NF-kB 是一个无处不在的转录因子参与很多生理和病理过程, 癌症过程就是其中之一。1994 年, Koong 等人首次报道了缺氧能够激活 NF-kB^[55], 目前, HIF 与 NF-kB 之间更广泛的关系也已经被报道^[56], 并强调缺氧在通路中的作用。NF-kB 子单元以一个不活跃的形式位于细胞质中, 保证快速反应后的激活刺激^[56]。Liu^[57]等人的研究报道了 HIF-1a/EPO 轴可以调控 NF-kB 信号通路, 且文章提出了一个以前从未引起注意的 CPC1, 它在 NF-kB 与 HIF-1a/EPO 信号轴之间起着重要作用。也有报道称, 在缺血性脑卒中存在 NF-kB p65/HIF-1a 信号通路的异常, 他们的研究结果证实了甘氨酸在神经保护中的作用是通过抑制 NF-kB p65 / HIF-1a 信号并促进抗炎^[58], NF-kB 也调节免疫反应和免疫细胞功能等的多个方面^[58], NF-kB 的激活主要通过两条主要的通路, 一条是经典途径, 一条是非经典途径^[59]。在最近的一项体外研究实验中, NF-kB 通路的抑制剂 BAY11-7082, 在缺氧的环境下, 抑制肿瘤细胞的分化以及肿瘤的上皮间叶转化^[60], 最终他们得出, NF-kB 信号通路与 HIF 信号通路关系密切, 并且参与了肿瘤的上皮-间叶

转换。NF- κ B 的活性主要由 NF- κ B 的抑制剂 NF- κ B 激酶 (IKKs)，主要是 IKK β 调控，在缺氧水平下，HIF 介导 NF- κ B 在中性粒细胞中的活性^[61]。并且，缺氧本身能够刺激 NF- κ B 的活性，在缺氧环境下，NF- κ B 有助于提高 HIF-1 α 信使 RNA 的转录。

Hypoxia/VHL 与 Lactate-NDRG3-Raf-ERK

Hypoxia/VHL 与 Lactate-NDRG3-Raf-ERK 轴是目前正逐步展开研究的一条通路。Lee 等人通过 Flag 介导的 EglN1 免疫沉淀和质谱分析鉴定得出 NDRG3 是 EglN1/VHL 的底物，在常氧条件下，NDRG3 通过 EglN1-VHL 信号通路被逐步泛素化和降解，NDRG3 在缺氧条件下通过与乳酸结合逐步积累，并进一步与 c-Raf 相互作用，进而激活 Raf-ERK 通路，从而促进缺氧细胞生长和血管生成。NDRG3 一旦与乳酸结合，即使在细胞恢复氧供时也非常稳定，这表明在长时间缺氧条件下，乳酸-NDRG3-Raf-ERK 轴诱导的反应有助于维持肿瘤的进展，靶向联合 HIF 和 NDRG3 可能是一种非常有效的癌症治疗方法^[62,63]。

Hypoxia/VHL-AKT-mTOR

PI3K/AKT/mTOR 信号通路是一条调节细胞生长成熟的信号通路，AKT 在 Thr308 和 Ser473 位点的磷酸化增加了其激酶活性，从而刺激其下游 mTORC1 的激活，进而增加了细胞生长和增殖以及各种合成代谢和生物合成途径的活性^[64]。Hypoxia/VHL 可以调控 PI3K/AKT/mTOR，Polytarchou 等人报道了在缺氧条件下，AKT 信号通路被激活，通过诱导 miR-21 促进肿瘤对缺氧的抵抗能力^[65]。Guo 等人的报道显示，在缺氧环境下，AKT 被激活可以促进肿瘤的发生。Hypoxia/VHL 与 AKT 信号通路的联系涉及很多步骤，包括 microRNA 调节、亚细胞的间隔变化和翻译后修饰(羟化)。Zhang 等人在超过 10000 例人类癌症中发现了 PI3K/AKT/mTOR 的泛癌蛋白基因组图谱，强有力的支持了 VHL 突变与 AKT/mTOR 高度活跃密切相关的观点^[66]。

MDM2 和 TP53

鼠双微基因同系物 (Mouse double minute 2 homolog, MDM2) E3 泛素连接酶促进 HIF-1 α 蛋白降解，而不受氧条件的影响，MDM2 与 p53 等抑癌因子协同下调 HIF-1 α 蛋白表达。MDM2 被认为是 p53 蛋白的 E3 泛素连接酶^[67]。在常氧环境下，HIF 可与 p53 结合，通过 MDM2 泛素化和蛋白酶体降解进行泛素化。有研究报道，在常氧状态下，RUNX1 突变体可以通过破坏 MDM2/p53 轴来稳定 HIF-1 α 蛋白^[68]。

RACK1 和 HSP90

热休克蛋白 90 (HSP90) 与 HIF-1 α 蛋白的基本螺旋环 (basic helix-loop-helix, bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS) 域结合，调节 HIF-1 α 的活性^[69]。活化的 C 激酶 1 受体 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 与 HSP90 竞争结合到 bHLH-PAS 域。有报道称，HSP90 抑制剂破坏了 HSP90 与 HIF-1 α 之间的相互作用的关系，使 RACK1 与 HIF-1 α 蛋白结合，从而导致 E3 泛素连接酶复合物的聚集和 HIF 的降解^[70]。在这个过程中，RACK1 的磷酸化和它的二聚作用是 Elongin-C 所必需的，Elongin-C 是 HIF-1 α 降解的 E3 泛素连接酶复合物的主要成分。有趣的是，钙调神经磷酸酶，可以促进 RACK1 的去

磷酸化和 HIF-1a 的稳定^[71]，目前钙调神经磷酸酶的抑制剂（环孢素 A 和 FK506）也已经广泛用于临床免疫治疗，并诱导 HIF-1a 的降解。

USP20 和 UCHL1

HIF-1a 的去泛素化也会导致 HIF-1a 蛋白的稳定，泛素特异性肽酶 20（ubiquitin specific peptidase 20, USP20, 也称为 VDU2）被报道可特异性地去泛素化并稳定 HIF-1a 蛋白^[72]。泛素 C-末端水解酶-L1（ubiquitin C-terminal hydrolase-L1, UCHL1）也是一个被广泛研究去泛素化酶，其与多种癌症的关系已被大量研究报道^[73]。最近，UCHL1 被认为是 HIF-1a 信号激活的一种新的调节因子，UCHL1 可阻断 VHL 介导的 HIF-1a 泛素化。值得注意的是，UCHL1 在肺癌中的表达情况与 HIF-1a 的表达水平及预后不良呈正相关^[74]。

总结

缺氧诱导因子 HIF 参与了多种肿瘤的进展，其在肿瘤中的作用机制值得深入探讨和阐明，当前，关于 HIF 信号通路的研究报道越来越多，且缺氧诱导因子还于 2019 年获得了诺贝尔奖，由此可见 HIF 信号通路的重要性，这也为未来对 HIF 通路的研究以及其致癌机制的探讨做好了铺垫。尽管目前的研究越来越多，但是 HIF-1a 和 HIF-2a 的具体作用还未阐明，且存在着很多争议，有专家认为，HIF-1a 是一种致癌因子，在癌症中高表达，HIF-2a 是一种抑癌因子，在癌症里低表达；也有报道指出，HIF-2a 是癌症发生发展中的关键分子，起着调控肿瘤生长的作用，HIF-1a 则在肿瘤发生发展中的作用不大；还有研究指出，HIF-1a 主要在癌症的早期发挥作用，而 HIF-2a 则调控着肿瘤的晚期发展。HIF 途径在肾癌的进展过程中起着重要作用，目前研究报道最多的便是 HIF-VEGF，且关于 VEGF 的抑制剂已经用于临床的诊治，为肾癌患者的放疗与化疗带来了很大的帮助。HIF 信号通路在其他癌症中的分子作用机制报道并不多，而 HIF 虽然与很多分子与信号通路都互相影响，但 HIF 与其他通路共同调控肾癌进展的研究报道还很欠缺。本文总结了目前关于 HIF 信号通路方面的研究现状，希望可以为下一步研究提供帮助，尽早发现并阐明 HIF 通路的机理。

参考文献

- 1.Foster John G,Wong Sybil C K,Sharp Tyson V,The hypoxic tumor microenvironment: driving the tumorigenesis of non-small-cell lung cancer.[J].Future Oncol, 2014, 10: 2659-74.
- 2.Lisy K,Peet D J,Turn me on: regulating HIF transcriptional activity.[J].Cell Death Differ., 2008, 15: 642-9.
- 3.Keith Brian,Johnson Randall S,Simon M Celeste,HIF1a and HIF2a: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression.[J].Nat. Rev. Cancer, 2011, 12: 9-22.
- 4.Lee Kyoung Eun,Simon M Celeste,From stem cells to cancer stem cells: HIF takes the stage.[J].Curr. Opin. Cell Biol., 2012, 24: 232-5.
- 5.Duan Cunming,Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes.[J].Am. J. Physiol., Cell Physiol., 2016, 310: C260-9.
- 6.Wang G L,Semenza G L,General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia.[J].Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, 90: 4304-8.
- 7.Wang G L,Semenza G L,Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.[J].J. Biol. Chem., 1995, 270: 1230-7.
- 8.Eales K L , Hollinshead K E R , Tennant D A . Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells[J]. Oncogenesis, 2016, 5(1):e190.
- 9.Maxwell P H,Wiesener M S,Chang G W et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.[J].Nature, 1999, 399: 271-5.
- 10.Ivan M,Kondo K,Yang H et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.[J].Science, 2001, 292: 464-8.
- 11.Jaakkola P,Mole D R,Tian Y M et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation.[J].Science, 2001, 292: 468-72.
- 12.Luo J C,Shibuya M,A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha).[J].Oncogene, 2001, 20: 1435-44.
- 13.Depping Reinhard,Steinhoff Amrei,Schindler Susann G et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway.[J].Biochim. Biophys. Acta, 2008, 1783: 394-404.
- 14.Maxwell P H,Wiesener M S,Chang G W et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.[J].Nature, 1999, 399: 271-5.
- 15.Suzuki Norio,Yamamoto Masayuki,Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis.[J].Pflugers Arch., 2016, 468: 3-12.
- 16.Souma Tomokazu,Suzuki Norio,Yamamoto Masayuki,Renal erythropoietin-producing cells in health and disease.[J].Front Physiol, 2015, 6: 167.
- 17.Franovic Aleksandra,Holterman Chet E,Payette Josianne et al. Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis.[J].Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2009, 106: 21306-11.
- 18.Wiesener Michael S,Jürgensen Jan Steffen,Rosenberger Christian et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs.[J].FASEB J., 2003, 17: 271-3.
- 19.Brown J M , Wilson W R . Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment[J]. nature reviews cancer, 2004, 4(6):437-447.
- 20.Semenza Gregg L,Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets

- for cancer therapy.[J].Trends Pharmacol. Sci., 2012, 33: 207-14.
- 21.Rankin, E. B, Giaccia, A. J. Hypoxic control of metastasis[J]. Science, 352(6282):175-180.
- 22.Wang Qian,Hu Dan-feng,Rui Yan et al. Prognosis value of HIF-1 α expression in patients with non-small cell lung cancer.[J].Gene, 2014, 541: 69-74.
- 23.Gao Z J , Wang Y , Yuan W D , et al. HIF-2 α not HIF-1 α overexpression confers poor prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Tumor Biology, 2017, 39(6):101042831770963.
- 24.Méndez-Blanco Carolina,Fondevila Flavia,García-Palomo Andrés et al. Sorafenib resistance in hepatocarcinoma: role of hypoxia-inducible factors.[J].Exp. Mol. Med., 2018, 50: 1-9.
- 25.Zhao Z,Mu H,Li Y et al. Clinicopathological and prognostic value of hypoxia-inducible factor-1 α in breast cancer: a meta-analysis including 5177 patients.[J].Clin Transl Oncol, 2020, undefined: undefined.
- 26.Li Hongyu,Jia Yanfei,Wang Yunshan,Targeting HIF-1 α signaling pathway for gastric cancer treatment.[J].Pharmazie, 2019, 74: 3-7.
- 27.Zhang Jing,Zhang Qing, VHL and Hypoxia Signaling: Beyond HIF in Cancer.[J].Biomedicines, 2018, 6: undefined.
- 28.Zhang Zedan,Lin Enyu,Zhuang Hongkai et al. Construction of a novel gene-based model for prognosis prediction of clear cell renal cell carcinoma.[J].Cancer Cell Int., 2020, 20: 27.
- 29.Chen Liang,Peng Tianchen,Luo Yongwen et al. ACAT1 and Metabolism-Related Pathways Are Essential for the Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC), as Determined by Co-expression Network Analysis.[J].Front Oncol, 2019, 9: 957.
- 30.Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma[J]. Nature Genetics, 2013, 45(8):860-867.
- 31.Moore Lee E,Nickerson Michael L,Brennan Paul et al. Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors.[J].PLoS Genet., 2011, 7: e1002312.
- 32.Kishida T,Stackhouse T M,Chen F et al. Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: mapping of binding domains and the effect of missense mutations.[J].Cancer Res., 1995, 55: 4544-8.
- 33.Kibel A, Iliopoulos O, Decaprio J,et al.Binding of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein to Elongin B and C[J]. Science, 1995, 269(5229):p.1444-1446.
- 34.Duan D R,Pause A,Burgess W H et al. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein.[J].Science, 1995, 269: 1402-6.
- 35.Kaelin William G,Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome.[J].Nat. Rev. Cancer, 2002, 2: 673-82.
- 36.Jaakkola P,Mole D R,Tian Y M et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation.[J].Science, 2001, 292: 468-72.
- 37.Ivan M,Kondo K,Yang H et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.[J].Science, 2001, 292: 464-8.
- 38.Gossage Lucy,Eisen Tim,Maher Eamonn R,VHL, the story of a tumour suppressor gene.[J].Nat. Rev. Cancer, 2015, 15: 55-64.
- 39.Semenza, Gregg L . Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nature Reviews Cancer, 2003, 3(10):721-732.
- 40.Lee S,Neumann M,Stearman R et al. Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic

trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.[J].Mol. Cell. Biol., 1999, 19: 1486-97.

41.Semenza G . Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine[J]. cell, 2012, 148(3):0-408.

42.Wierzbicki Piotr M,Klacz Jakub,Kotulak-Chrzaszcz Anna et al. Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGFA and p53 expression in patients with clear-cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first-line treatment.[J].Int. J. Oncol., 2019, 55: 371-390.

43.Isaacsson Velho Pedro,Nardo Mirella,Souza Manoel Carlos Leonardi de Azevedo et al. Analysis of Efficacy and Toxicity Profile of First-Line Sunitinib or Pazopanib in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma in the Brazilian Population.[J].J Glob Oncol, 2018, 4: 1-10.

44.Chen Wenfang,Hill Haley,Christie Alana et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist.[J].Nature, 2016, 539: 112-117.

45.Wallace Eli M,Rizzi James P,Han Guangzhou et al. A Small-Molecule Antagonist of HIF2 α Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma.[J].Cancer Res., 2016, 76: 5491-500.

46.Wan Li,Huang Jingyong,Chen Jianou et al. Expression and significance of FOXP1, HIF-1 α and VEGF in renal clear cell carcinoma.[J].J BUON, 2015, 20: 188-95.

47.Ramakrishnan Sadeesh K,Shah Yatrik M,Role of Intestinal HIF-2 α in Health and Disease.[J].Annu. Rev. Physiol., 2016, 78: 301-25.

48.Koh, M. Y, Nguyen, V, Lemos, R. Hypoxia-Induced SUMOylation of E3 Ligase HAF Determines Specific Activation of HIF2 in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma[J]. Cancer Research, 75(2):316-329.

49.Zhang Jingyu,Tian Xiao-Jun,Xing Jianhua,Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- β , SHH, and WNT and Their Crosstalks.[J].J Clin Med, 2016, 5: undefined.

50.Rasmussen Kasper Dindler,Helin Kristian,Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer.[J].Genes Dev., 2016, 30: 733-50.

51.Semenza Gregg L,HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations.[J].J. Clin. Invest., 2013, 123: 3664-71.

52.Yee Koh Mei,Spivak-Kroizman Taly R,Powis Garth,HIF-1 regulation: not so easy come, easy go.[J].Trends Biochem. Sci., 2008, 33: 526-34.

53.Hong Chun-Fu,Chen Wei-You,Wu Cheng-Wen,Upregulation of Wnt signaling under hypoxia promotes lung cancer progression.[J].Oncol. Rep., 2017, 38: 1706-1714.

54.Wu Cunen,Zhuang Yuwen,Jiang Shan et al. Interaction between Wnt/ β -catenin pathway and microRNAs regulates epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review).[J].Int. J. Oncol., 2016, 48: 2236-46.

55.Koong A C,Chen E Y,Giaccia A J,Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues.[J].Cancer Res., 1994,

56.D'Ignazio Laura, Rocha Sonia. Hypoxia Induced NF- κ B[J]. Cells, 5(1):10-.

57.Liu Yumei,Zou Xiaoqian,Ou Meiling et al. Toxoplasma gondii Cathepsin C1 inhibits NF- κ B signalling through the positive regulation of the HIF-1 α /EPO axis.[J].Acta Trop., 2019, 195: 35-43.

58.Liu Rui,Liao Xin-Yu,Pan Meng-Xian et al. Glycine Exhibits Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke in Rats through the Inhibition of M1 Microglial Polarization via the NF- κ B p65/Hif-1 α Signaling Pathway.[J].J. Immunol., 2019, 202: 1704-1714.

59. Lawrence T . The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6):a001651.
60. Bakkar Nadine, Guttridge Denis C, NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis.[J]. Physiol. Rev., 2010, 90: 495-511.
61. Walmsley Sarah R, Print Cristin, Farahi Neda et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity.[J]. J. Exp. Med., 2005, 201: 105-15.
62. Lee Dong Chul, Sohn Hyun Ahm, Park Zee-Yong et al. A lactate-induced response to hypoxia.[J]. Cell, 2015, 161: 595-609.
63. Park Kyung Chan, Lee Dong Chul, Yeom Young Il, NDRG3-mediated lactate signaling in hypoxia.[J]. BMB Rep, 2015, 48: 301-2.
64. Manning B D , Toker A . AKT/PKB Signaling: Navigating the Network[J]. Cell, 2017, 169(3):381-405.
65. Polytarchou Christos, Iliopoulos Dimitrios, Hatziapostolou Maria et al. Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation.[J]. Cancer Res., 2011, 71: 4720-31.
66. Zhang Yiqun, Kwok-Shing Ng Patrick, Kucherlapati Melanie et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations.[J]. Cancer Cell, 2017, 31: 820-832.e3.
67. Cai Xiongwei, Gao Long, Teng Li et al. Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells.[J]. Cell Stem Cell, 2015, 17: 165-77.
68. Hayashi Yoshihiro, Zhang Yue, Yokota Asumi et al. Pathobiological Pseudohypoxia as a Putative Mechanism Underlying Myelodysplastic Syndromes.[J]. Cancer Discov, 2018, 8: 1438-1457.
69. Gradin K, McGuire J, Wenger R H et al. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor.[J]. Mol. Cell. Biol., 1996, 16: 5221-31.
70. Liu Ye V, Baek Jin H, Zhang Huafeng et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha.[J]. Mol. Cell, 2007, 25: 207-17.
71. Liu Ye V, Hubbi Maimon E, Pan Fan et al. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization.[J]. J. Biol. Chem., 2007, 282: 37064-73.
72. Li Zaibo, Wang Dakun, Messing Edward M et al. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha.[J]. EMBO Rep., 2005, 6: 373-8.
73. Pfoh Roland, Lacdao Ira Kay, Saridakis Vivian, Deubiquitinases and the new therapeutic opportunities offered to cancer.[J]. Endocr. Relat. Cancer, 2015, 22: T35-54.
74. Goto Yoko, Zeng Lihua, Yeom Chan Joo et al. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6153.

致 谢

(Acknowledgments)

以前写作文时总喜欢引用“光阴似箭，日月如梭”，或者是“时间如白驹过隙”，那时候只知道这些话表示时间过的飞快，具体的含意并不是很了解。如今，我再一次站在了人生的十字路口，这一次是硕士研究生毕业。

回首研究生三年生活，现在的我觉得过的很快，但处于研一研二和研三时期的我，一定是希望时间快一点，被失败的实验少折磨一点。这三年里，留下了太多美好的回忆，有很多我要感谢的人。

我首先要感谢我的导师邹泓教授，我仍然记得初次见您时的紧张，甚至手都在抖，您微笑着对我说，不要紧张，好好发挥，或许从那时候起，就已经奠定了师生三年的情谊。在这三年里，您在做人，做事，学习，生活等方面给了我们无微不至的关怀，您言传身教，用您的个人魅力以及业务水平一次次让我们折服。在这三年里，您激起了我对科研的热情，教会了我迈向 SCI 的科研方法，传授给我临床阅片的经验以及为人处事的道理。太多太多的给与，我只能用“感谢”这两个字表示我心里的谢意。

其次，我要感谢病理系的李锋教授、胡文浩教授、张文杰教授、赵瑾教授、庞丽娟教授、曹玉文教授、刘春霞教授、陶林、齐妍、胡建明、贾薇、王良海副教授及实验室蒋金芳、任艳、梁伟华、郑玉琴、沈西华、李丽等老师在科研与临床病理诊断的学习中给予的精心指导。感谢病理系的所有老师们在三年的研究生学习和生活中给予关心和帮助。感谢我的师哥师姐、同门吉新华、熊鑫，师妹丁美丽、朱星瑶、李响，师弟王永刚，在实验、生活等方面的协助。感谢我的同学们，与他们携手共同走过的日子将是我珍贵的回忆。

最后，我要特别感谢我的家人和朋友们，是他们给了我动力、勇气和信心。感谢我的好朋友王莉杰、张璐和陈凤姣，在实验上提供技术指导，在生活上给与帮助，在失意时及时安慰，在开心时共同分享。我还要感谢我的室友曾盛熊和杨童，和你们住一个宿舍是我研究生最幸运的事情，每次不管我做实验多晚回宿舍，都会有人帮我开门禁，都会有人帮我打热水，谢谢你们对我的包容和帮助。衷心的感谢我的父母和亲戚朋友，很多个失意的夜晚都是你们的鼓励让我满血复活，很多次的不如意，都是你们的一个电话让我瞬间理智。感谢你们，使我顺利地完成了三年的研究生学业。

衷心感谢各位评阅专家,答辩委员和答辩秘书为本毕业论文的评审与答辩花费的宝贵时间和付出的辛勤劳动!

再次感谢所有曾给予我关心、鼓励、支持与帮助的人!

岁岁年华赠石大, 一次石大一生人!

作者简历

赵为璘，男，生于 1994 年 02 月，籍贯湖北。2017 年毕业于湖北医药学院临床医学专业，获医学学士学位。同年进入石河子大学医学院临床病理学专业学习，研究方向为肿瘤病理诊断的应用研究。

在学期间主要参与的研究项目

参加了国家自然科学基金地区基金项目《SR-B1 在肾透明细胞癌生物学行为及缺氧脂质代谢中的作用与分子机制研究》（81460383）的部分研究工作。

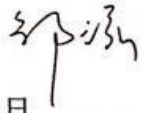
在学期间主要完成的学术论文

- 1.赵为璘，熊鑫，吉新华等，类似于卵巢性索间质肿瘤的子宫肿瘤 1 例，临床与实验病理学杂志，2020-5 录稿.
- 2.赵为璘，吉新华，熊鑫等，MAPK 通路蛋白在肾透明细胞癌中的表达及临床意义，农垦医学 2020-5 录稿.
- 3.Zhao Weilin , Ji Xinhua etc, IFITM1, CD10, SMA, and h-caldesmon as a helpful combination in differential diagnosis between endometrial stromal sarcoma and cellular leiomyoma, Humanpathology ,review.

SR-B1 通过调控 HIF 信号通路促进肾透明细胞癌增殖分子机制研究

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	赵为璘	学制	三年
专业	临床病理学	研究方向	肿瘤病理诊断
学术评语:			
<p>本研究基于前期实验结果立论清晰, 实验设计合理, 结果可信。从正向和反向分别选择 SR-B1 高表达的 786-0 细胞和 SR-B1 低表达的 HK-2 细胞, 应用 HIF-1a 过表达质粒, SR-B1 过表达质粒, HIF-1a 抑制剂和 SR-B1 抑制剂, 证明了 SR-B1 可以通过 HIF 信号通路影响肾透明细胞癌增殖</p> <p>论文逻辑清晰, 思路严密, 文笔流畅, 条理清楚, 观点明确, 达到专业性硕士论文的毕业要求。</p>			
指导教师签字:  2020 年 6 月 7 日			