

ErbB-2 increases ets, AP-1, and NF- κ B-dependent gene expression, and inhibiting Ets activation blocks Neu-mediated cellular transformation. *J Biol Chem*, 1996, **271** (14): 7992~ 7998

4 Yu D, Matin A, Hinds P W *et al*. Transcriptional regulation of neu by RB and E1A in Rat-1 cells. *Cell Growth Diff*, 1994, **5** (4): 431~ 438

5 Yu D, Matin A, Xia W *et al*. Liposome-mediated *in vivo* E1A gene transfer suppressed dissemination of ovarian cancer cells that overexpress HER-2/ neu. *Oncogene*, 1995, **11** (7): 1383~ 1388

Overexpression and Suppression of *neu* Gene in Human Cancers. GONG Hai-biao, ZHANG Wei-jie, XU Jin-lin (*Department of Biological Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*).

Abstract The *neu* gene is known to encode a PTK-activity-bearing phosphoprotein which is one of the homologous proteins of epidermal growth factor receptor (EGFR). Amplification and (or) overexpression of *neu* gene have been found in various human cancers recently. Some protein factors and chemical agents can suppress *neu* gene transcription or reduce the PTK activity of p185^{neu}, resulting in the inhibition of metastasis and proliferation of cancer cells with *neu* overexpression.

Key words *neu* gene, p185^{neu}, overexpression, tumor

缺氧诱导因子 1

张继峰 陈光慧 汤 健

(北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

摘要 缺氧诱导因子 1 是缺氧诱导细胞所产生的一种蛋白质, 由一个 120 ku 的 α 亚基和一个 91~ 94 ku 的 β 亚基组成的异源二聚体. 在缺氧条件下, 促进红细胞生成素和糖酵解酶等基因的转录和表达, 维持机体氧稳态.

关键词 缺氧, 缺氧诱导因子 1, 转录因子

学科分类号 Q7

氧是机体新陈代谢和维持生存的必要因素. 在某些生理或病理条件下, 整体或局部缺氧能引起机体出现一系列适应性反应, 如红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelium growth factor, VEGF) 合成分泌增加, 糖酵解途径酶的合成等. 这些反应同缺氧诱导细胞产生的一种蛋白质- 缺氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF₁) 有关, 它可调节一系列基因的转录和表达, 以维持机体的正常代谢和功能.

1 HIF₁ 的发现及其 cDNA 的克隆

HIF₁ 是在研究缺氧诱导的 EPO 基因表达

时发现的^[1]. Semenza 等将人肝癌 Hep3B 细胞用 1% 低氧处理, 细胞内 EPO mRNA 可增加 50 倍, 而且缺氧处理过的细胞, 其细胞核提取物也具有促进 EPO 基因转录的作用, 但预先给予蛋白合成抑制剂能阻断缺氧对 EPO 基因表达的诱导作用. 因而提出, 缺氧可以诱导细胞产生某种新的蛋白质, 调节基因的表达, 这种物质被称为 HIF₁. Wang 等分别从培养的 Hep3B 和 HeLa S3 细胞中提纯了 HIF₁, 后者主要以异源二聚体的形式存在, 由 120 ku 的 α 亚单位 (HIF_{1 α}) 和 91~ 94 ku 的 β 亚单位 (HIF_{1 β}) 组成. 随之 Wang 等从 Hep3B 细胞

收稿日期: 1997-09-03, 修回日期: 1998-01-07

cDNA 文库中克隆了 HIF_{1α} 和 HIF_{1β} 的全长 cDNA 序列^[2]. 其中人的 HIF_{1α} cDNA 全长为 3 720 bp, 开放阅读框 2478 bp, 编码 826 个氨基酸, 5' 和 3' 非翻译区分别为 28 和 1 211 bp, 应用体细胞杂交分析和荧光原位杂交方法证实人的 HIF_{1α} 基因位于第 14 号染色体 (14q²¹⁻²⁴). 小鼠 HIF_{1α} 的 cDNA 序列, 全长 3 746 bp, 开放阅读框 2 430 bp, 编码 810 个氨基酸, 5' 和 3' 非翻译区分别为 125 和 1 188 bp. 与人的 HIF_{1α} cDNA 序列有 90% 的同源性. 小鼠 HIF_{1α} 基因位于第 12 号染色体.

人的 HIF_{1β} cDNA 序列和已知的芳香烃受体核转位蛋白 (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) 相同^[2], 全长为 2 604 bp, 开放阅读框 2 367 bp, 编码 789 个氨基酸, 5' 和 3' 非翻译区分别为 56 和 188 bp. 在其基因中有一个长 45 bp 的可变外显子, 编码 15 个氨基酸, 因此体内还存在一种 774 个氨基酸的 HIF_{1β}. 小鼠 HIF_{1β} 的基因定位于第 3 号染色体.

2 HIF₁ 的功能

HIF₁ 可促进 EPO 基因的转录. 缺氧时 HIF₁ 产生的动力学与 EPO 基因的表达相平行, 氧张力恢复以后, HIF₁ 的 DNA 结合活性迅速下降, EPO 基因表达也降至基础水平. 在 EPO 基因 3' 侧翼存在缺氧诱导增强子序列, 其中含 HIF₁ 蛋白的结合位点. 将这一段序列克隆到表达载体中, 转染多种细胞均可使缺氧条件下报告基因的表达提高^[1]. 应用缺失突变和碱基替换等方法, 最终得到了 HIF₁ 的 DNA 结合序列: 5'-TACGTGCT-3'. 目前已知除 EPO 基因外, HIF₁ 还参与缺氧诱导的 VEGF、诱导型一氧化氮合酶、内皮素、血红素氧合酶 I、葡萄糖转运蛋白 3 (Glut3)、酪氨酸羟化酶以及糖酵解途径的酶等基因的表达. 在这些基因的启动子、增强子或其他调控区含有 HIF₁ 的特异结合序列.

O' Rourke 等用差异显示 PCR 的方法, 比较小鼠野生型肝细胞瘤 Hepa 1 细胞及其衍生

的一种缺乏 HIF_{1β} 基因的缺陷型 C4 细胞在缺氧条件下的基因表达情况, 发现 C4 细胞不能在缺氧时表达 Glut3 和腺苷酸激酶 3 等基因, 但如果用 HIF_{1β} 的表达载体转染 C4 细胞, 则上述两种酶获得高表达. 因此, HIF₁ 的功能是作为基因转录的生理调节因子, 在缺氧调节中起着关键作用, 是缺氧适应和病理反应中的一个中介因子, 是多种与红细胞生成、血管生长、血流供应、氧化和能量代谢相关基因转录和表达的一个重要调节因子.

3 HIF₁ 的结构与功能的关系

HIF_{1α} 和 HIF_{1β} 均属于 basic helix-loop helix (bHLH) 蛋白的 PAS 亚家族^[2]. Jiang 等将 HIF_{1α} 的全长 cDNA 或部分缺失的 cDNA 克隆于原核细胞表达质粒中, 得到多种表达蛋白. 他们发现 HIF_{1α} 的 1~166 位氨基酸是与 HIF_{1β} 形成二聚体的必需结构; 去除 N 端的碱性区, 即 4~27 位氨基酸则 HIF₁ 不能与 DNA 结合, 但不影响异源二聚体的形成; 仅保留 N 端 390 个氨基酸的 HIF_{1α}, 既能与 HIF_{1β} 形成异源二聚体, 又能与 DNA 达到最大结合, 但其转录激活作用几乎完全丧失. 这提示 HIF_{1α} N 端的 bHLH 和 PAS 结构域, 主要介导异源二聚体的形成及其与 DNA 的结合, 而 HIF_{1α} 的 C 端主要参与转录激活作用.

最近, Jiang 等^[3]用构建嵌合基因的方法, 把编码 HIF_{1α} C 端的序列与编码 GAL4 (依赖半乳糖的激活蛋白 4) DNA 结合区的序列连在一起, 克隆于真核表达质粒中, 使之与报告基因载体共转染 hep3B 细胞, 观察融合蛋白 GAL4/HIF_{1α} 在缺氧条件下的转录激活作用, 发现在 HIF_{1α} 的 531~826 位氨基酸间有两个转录激活区域, 分别位于第 531~575 和 786~826 位氨基酸, 而两个激活区域间的一段序列, 即 576~785 位氨基酸有抑制转录激活的作用, 用缺失分析方法, 逐渐去除以上抑制区域, 融合蛋白的转录激活作用也逐渐提高.

4 HIF₁ 的分布及表达调控

缺氧可以诱导多种细胞 HIF₁ 的表达.

Wang 等^[2]用 Northern 杂交方法观察到 Hep3B 细胞在常氧条件下, HIF_{1α}和 HIF_{1β}均无表达. 用 1% 低氧处理后, HIF_{1α}和 HIF_{1β} mRNA 迅速增加, 1~ 2 h 达高峰, 8 h 恢复基础水平, 连续处理 16 h 后又出现第二高峰. HIF_{1α}和 HIF_{1β}蛋白合成的高峰出现在 4~ 8 h, 这与缺氧条件下, HIF₁ 和 DNA 结合活性的变化相一致. 缺氧 4 h 后恢复供氧, 则其 mRNA 的表达和蛋白合成分别在 5 和 15 min 后降到基础水平. HIF_{1α}迅速被蛋白水解酶水解.

Wiener 等^[4]观察了人、大鼠和小鼠 HIF₁ mRNA 在不同组织的分布. 在常氧条件下, 人的心、脑、胎盘、肺、骨骼肌、肾和胰腺等组织 HIF_{1α}和 HIF_{1β}均有表达. 大鼠的肺、心、肝、脾、肾和脑组织中也均有 HIF_{1α}和 HIF_{1β}的表达. 低氧可使肺、脑和肾组织中 HIF₁ 表达明显增加. 但小鼠脑、肺和肾组织在常氧条件下, HIF_{1α} mRNA 表达很低, 甚至低于检测水平, 7% 低氧处理 30 min 后, HIF_{1α} mRNA 明显被诱导出来, 60 min 时达到高峰, 持续低氧处理 4 h 后, HIF_{1α} mRNA 水平又恢复基础水平. 缺氧诱导 HIF₁ 表达的机制目前尚不清楚.

5 HIF₁ 的生理意义

缺氧是许多疾病发病过程中一个最重要的生理因素, 如心脑血管病组织供血不足、肿瘤形成过程中血管生长滞后均造成局部缺氧. 了解 HIF₁ 在其中的作用及其机制, 对疾病的防治将有重要意义.

Maxwell 等^[5]将肝细胞瘤 Hepa 1 细胞和缺陷型 C4 细胞分别种植于裸鼠背部, 观察 HIF₁ 在基因表达、肿瘤内血管的形成及肿瘤生长中的作用. 他们选择了两种对 HIF₁ 依赖程度不同的基因, 用原位杂交方法发现, 完全依赖 HIF₁ 的 Glut3 在 Hepa 1 肿瘤中有较高表达, 位置靠近坏死部位, 而在 C4 肿瘤中无表达; VEGF 基因在 Hepa 1 肿瘤中高表达, 在

C4 肿瘤中低表达, 这是由于 VEGF 基因还有不依赖于 HIF₁ 的调控机制. 同时他们发现 C4 肿瘤内血管分布少, 毛细血管密度明显低于 Hepa 1 肿瘤, 且生长缓慢. 由此可见, HIF₁ 在肿瘤生长以及血管形成中发挥重要作用, 值得进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Semenza G, Wang G. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcription activation. *Mol Cell Biol*, 1992, **12** (12): 5447~ 5454
- 2 Wang G, Jiang B, Rue E *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (12): 5510~ 5514
- 3 Jiang B, Zheng J, Leung S *et al.* Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 1997, **272** (31): 19253~ 19260
- 4 Wiener C, Booth G, Semenza G. *In vivo* expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Com*, 1996, **225** (2): 485~ 488
- 5 Maxwell P, Dachs G, Gleadle J *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 modulated gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (15): 8104~ 8109

Hypoxia inducible Factor 1. ZHANG Ji-feng, CHEN Guang-hui, TANG Jian (*Institute of Cardiovascular Basic Research, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Hypoxia-inducible factor 1 (HIF₁) is a nuclear factor whose production and DNA binding activity is induced by hypoxia in a variety of cell types, which is composed of two different subunits: 120 ku HIF_{1α} and 91~ 94 ku HIF_{1β}. HIF₁, as a hypoxia inducible transcription factor, promotes the expression of erythropoietin gene and glycolytic enzymes gene etc. in response to hypoxia which maintain the oxygen homeostasis.

Key words hypoxia, hypoxia-inducible factor 1, transcription factor