

生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000108

2 种人卵巢癌细胞乏氧耐药模型的比较研究

尹明月, 孙江川, 常淑芳, 刘 莉

(重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆 400010)

【摘要】目的:采用二氯化钴(cobaltous chloride, CoCl_2)化学诱导法构建人卵巢癌细胞株 A2780 和 SKOV3 的乏氧耐药模型, 并比较二者耐药特性。**方法:**(1)体外培养的 A2780 和 SKOV3 细胞分别加入不同浓度 CoCl_2 培养液作用 12、24、48、72 h, 采用 MTT 法检测其增殖活性及对紫杉醇的耐药倍数;(2)采用 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 培养液作用 24 h 构建乏氧环境, RT-PCR 检测常氧和乏氧条件下乏氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)1 α mRNA 的表达情况。**结果:**2 种细胞的增殖抑制率与 CoCl_2 呈剂量-时间依赖关系(A2780 组: $F=1\ 165.416$, $P=0.000$; SKOV3 组: $F=2\ 802.394$, $P=0.000$)。随着 CoCl_2 浓度的增加, A2780 和 SKOV3 细胞对紫杉醇的耐药倍数增加($F=7\ 842.711$, $P=0.000$); 在相同 CoCl_2 浓度作用下, SKOV3 细胞对紫杉醇的耐药倍数明显高于 A2780 (50 $\mu\text{mol/L}$ 组: $t=-48.287$, $P=0.000$; 100 $\mu\text{mol/L}$ 组: $t=-263.205$, $P=0.000$; 150 $\mu\text{mol/L}$ 组: $t=-143.305$, $P=0.000$)。150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 24 h, 2 种细胞耐药倍数分别为(9.84 ± 0.11)和(21.08 ± 0.08), 并出现稳定的 HIF-1 α mRNA 表达, 其中 SKOV3 细胞 HIF-1 α mRNA 的表达增加量明显高于 A2780 细胞($t=-5.573$, $P=0.000$)。**结论:** CoCl_2 化学诱导法可成功建立卵巢癌细胞乏氧耐药模型, 其耐药倍数与细胞类型有关。在相同条件下, SKOV3 细胞株乏氧耐药模型较 A2780 更易建立, 是乏氧耐药逆转研究较为理想的细胞株。

【关键词】乏氧耐药; 二氯化钴; 人卵巢癌细胞; 乏氧因子**【中图分类号】**R737.31**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-11-20

Comparison on hypoxia induced drug resistance model for two kinds of human ovarian cancer cell lines

Yin Mingyue, Sun Jiangchuan, Chang Shufang, Liu Li

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish hypoxia drug resistance model(HDRM) of human ovarian cancer cell lines A2780 and SKOV3 by chemical induction method of Cobalt Chloride(CoCl_2) and to compare the drug resistant characteristics of those two cell lines. **Methods:** CoCl_2 with different concentrations(0, 50, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$) was added to A2780 and SKOV3 cells for 12, 24, 48, 72 h. Cell proliferation activity(CPA) was detected by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT). MTT was used to detect the drug resistance multiple(DRM) of paclitaxel under the different concentrations of CoCl_2 . The same cell lines without CoCl_2 were taken as normoxic control. CoCl_2 with concentration of 150 $\mu\text{mol/L}$ was added to A2780 and SKOV3 cells medium for 24 h respectively and the expression of HIF-1 α mRNA was detected by the real time polymerase chain reaction. The same cell lines without CoCl_2 were taken as normoxic control. **Results:** The proliferation activity of A2780 and SKOV3 cells was correlated with CoCl_2 in a dose and time dependent manner(A2780 group: $F=1\ 165.416$, $P=0.000$; SKOV3 group: $F=2\ 802.394$, $P=0.000$). Paclitaxel resistance fold of those two kinds of cells was increased with the increase of CoCl_2 concentration($F=7\ 842.711$, $P=0.000$). With the same concentration of CoCl_2 , DRM of SKOV3 cells was significantly higher than that of A2780 cells(50 $\mu\text{mol/L}$ group: $t=-48.287$, $P=0.000$; 100 $\mu\text{mol/L}$ group: $t=-263.205$, $P=0.000$; 150 $\mu\text{mol/L}$ group: $t=-143.305$, $P=0.000$). With 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 culturing for 24 h, DRM of A2780 and SKOV3 cells reached to 9.84 ± 0.11 and 21.08 ± 0.08 , respectively. The increase of HIF-1 α mRNA expression in SKOV3 cells was significantly higher than that of A2780 cells($t=-5.573$, $P=0.000$). **Conclusion:** Ovarian cancer HDRM can be successfully established by CoCl_2 induction method and DRM is related with cell characteristics. Under the same condition, SKOV3 cell line is easier to establish HDRM than A2780 cell line, and SKOV3 is an ideal cell line for hypoxia resistance reversal study.

【Key words】hypoxia drug resistance model; cobalt chloride; human ovarian cancer cell; hypoxia inducible factor

作者介绍: 尹明月, Email: yinmingyue_23@126.com,

研究方向: 卵巢癌的分子靶向治疗。

通信作者: 常淑芳, Email: shfch2005@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: N081372799)及重庆

市卫生局资助项目(编号: 2010-1-6, 2010-1-39)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000108.html>

乏氧是实体肿瘤普遍存在的问题,卵巢癌亦不例外。大量研究表明,乏氧可增强肿瘤侵袭和转移能力,并对放疗及多种化疗药物产生抵抗^[1-2]。故改善肿瘤乏氧微环境是提高肿瘤治疗效果的重要手段。体外乏氧耐药模型的建立是研究乏氧耐药机理及耐药逆转的基础。本研究采用二氯化钴(cobaltous chloride, CoCl_2)形成局部乏氧微环境,分别对卵巢癌 A2780 及 SKOV3 2 种细胞株进行体外化学诱导,采用 MTT 法检测 2 种细胞对紫杉醇的耐药倍数,通过检测乏氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF) 1α mRNA 表达验证乏氧与耐药的关系,为卵巢癌细胞株进行乏氧耐药逆转奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

CoCl_2 , RPMI1640 培养基,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS),双蒸水,紫杉醇标准品(paclitaxel, 纯度>98%),噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购于美国 Sigma 公司。自动酶联检测仪(基因有限公司, Elx800 型)。电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司, PL-203 型)。脱色摇床(北京六一仪器厂, WD-9405A 型)。

1.2 细胞系与培养

将消化或者复苏的 A2780 细胞(华中科技大学王泽华教授馈赠)和 SKOV3 细胞(重庆医科大学附属第二医院妇产科实验室于廷和教授馈赠)以 50%左右的浓度分别种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO_2 及饱和湿度条件的恒温孵箱中,用含有 10%胎牛血清、5%双抗的 RPMI1640 培养基培养。隔天更换培养基,常规传代培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 实验方法

1.3.1 CoCl_2 及紫杉醇溶液配制 避光环境下用电子天平精确称取一定量 CoCl_2 ,用双蒸水配置为 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的母液,0.22 μm 滤膜过滤除菌。MTT 粉末用消毒的 PBS 液配制成 5 mg/ml 的溶液,0.22 μm 滤膜过滤。将紫杉醇药物用 DMSO 溶解为 25 mg/ml 的储备液(当 DMSO 终浓度小于 0.05%,对细胞没有明显影响),以上溶液均置于消毒好的玻璃瓶中, -20℃冰箱避光保存。

1.3.2 MTT 法检测各 CoCl_2 浓度组对 A2780 和 SKOV3 细胞增殖的影响 将对数生长期的 2 种细胞用 0.25%胰酶消化,分别制备为浓度 4×10^4 个/ml 细胞悬液,每孔 200 μl 种入 96 孔板,使细胞达 8 000 个/孔,每组设置 5 个复孔,并设置空白对照组(不加细胞组)与阴性对照组(不含 CoCl_2 的细胞组)。过夜待细胞贴壁后,将 CoCl_2 母液用 RPMI1640 培养基稀释为 50、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 终浓度组。共同孵育 12、24、48、72 h 后每孔分别加入 MTT 液 10 μl ,锡箔纸避光置于培养箱中。4 h 后,小心弃去上清,加入 150 μl /孔 DMSO,置于脱色摇床低速振荡 10 min,用自动酶联检测仪在 492 nm 吸光度(absorbance, A)值下测得每孔 A 值。实验重复 3 次。

计算每组细胞增殖抑制率(inhibition rate, IR)=[阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值-用药组 A 值/阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值] $\times 100\%$ 。

1.3.3 不同 CoCl_2 浓度下的耐药监测 选择 1.3.2 中筛选的对两种细胞没有明显抑制作用的 CoCl_2 浓度与作用时间构建乏氧模型。将筛选的不同浓度 CoCl_2 培养液分别稀释紫杉醇母液,以紫杉醇 50、5、0.5、0.005 $\mu\text{g/ml}$ 为终浓度分别作用于贴壁生长的 A2780 和 SKOV3 细胞,并以不含 CoCl_2 培养液的同一株细胞作为常氧对照,按照 1.3.2 MTT 方法分别测得常氧下和 CoCl_2 乏氧后细胞 A 值。计算出不同浓度 CoCl_2 作用下紫杉醇的半数抑制率和耐药倍数。

计算半数抑制率(half maximal inhibitory concentration, IC_{50}),根据改良寇氏法 $\text{IgIC}_{50}=[X_m-I \times (P-0.5)+I/4 \times (1-P_m-P_n)]$,其中, X_m 为 Ig 最大剂量; I 为 Ig (最大剂量/相邻剂量); P 为阳性抑制率之和; P_m 为最大阳性抑制率; P_n 为最小阳性抑制率。

计算耐药倍数=常氧下紫杉醇 IC_{50} 值/乏氧下紫杉醇 IC_{50} 值。

1.3.4 RT-PCR 测 2 种细胞常氧和乏氧下的 HIF- α mRNA 表达 选择 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 培养液作用 24 h 构建乏氧环境,同时不含 CoCl_2 培养基的同一株细胞作为常氧对照。2 种细胞按 10^6 个/瓶分别接种于 100 ml 培养瓶中,孵育 12 h 待细胞贴壁后加 CoCl_2 使其终浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$,作用 24 h 后收集细胞按照 Trizol 试剂盒方法提取细胞总 RNA,PCR 扩增 HIF- 1α ,同时扩增 GAPDH 作为内参照。人 HIF- 1α 的引物序列(应用 NCBI 的 UniSTS 查找):正义:5'-CTGAAAGTC-GGACAGCCTCA-3',反义:5'-CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT-3',扩增产物为 460 bp。以 GAPDH 作为内参照,其上游引物序列为:5'-ACGGATTGCTCGTATTGGG-3',下游:5'-TGA-TTTTGGAGGGATCTCGC-3';扩增产物片段长度为 230 bp。扩增条件如下:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,52.2℃退火 45 s,72℃延伸 60 s,相应循环 30 次。每个样本至少重复 3 次。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后拍照。图像经 Quantity One 分析处理各条光密度值,并计算 HIF- 1α 与 GAPDH 之比。

1.4 统计学处理

实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件包,对于不同时间及不同浓度 CoCl_2 对 2 种细胞增殖抑制率的影响及不同浓度 CoCl_2 对两者的紫杉醇 IC_{50} 的影响采用重复测量的方差分析,其余结果采用两独立样本 t 检验进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CoCl_2 对 2 种细胞增殖抑制率的影响

如表 1、表 2 所示,在 CoCl_2 浓度<150 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 时,2 种细胞增殖抑制率无明显变化,细胞存活率均大于 90%,随着作用时间的延长或 CoCl_2 浓度>200 $\mu\text{mol/L}$ 时,出现明显的细胞生长抑制现象,其抑制作用与 CoCl_2 呈剂量-时间依赖关系(A2780 组: $F=1\ 165.416$, $P=0.000$; SKOV3 组: $F=2\ 802.394$, $P=0.000$)。

表 1 CoCl_2 对 A2780 细胞增殖抑制率的影响 ($\%, \bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of CoCl_2 on the proliferation and inhibition rate of A2780 cells ($\%, \bar{x} \pm s$)

CoCl_2 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	12 h	24 h	48 h	72 h
0 (常氧)	2.13 ± 0.02	2.48 ± 0.17	2.99 ± 0.68	3.17 ± 0.51
50	2.55 ± 0.11	3.33 ± 0.11	6.78 ± 0.04	9.75 ± 0.05
100	3.10 ± 0.05	3.61 ± 0.08	11.27 ± 0.42	14.76 ± 0.24
150	4.41 ± 0.22	6.85 ± 0.08	20.88 ± 0.09	27.13 ± 0.58
200	8.20 ± 0.25	10.99 ± 0.43	42.94 ± 0.25	53.11 ± 0.86
300	30.67 ± 0.79	39.88 ± 1.07	66.84 ± 0.86	71.82 ± 1.23

表 2 CoCl_2 对 SKOV3 细胞增殖抑制率的影响 ($\%, \bar{x} \pm s$)
Tab.2 Effects of CoCl_2 on the proliferation and inhibition rate of SKOV3 cells ($\%, \bar{x} \pm s$)

CoCl_2 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	12 h	24 h	48 h	72 h
0 (常氧)	2.12 ± 0.12	2.86 ± 0.08	3.15 ± 0.14	3.43 ± 0.12
50	2.63 ± 0.20	3.46 ± 0.11	6.82 ± 0.10	9.80 ± 0.57
100	3.13 ± 0.03	3.70 ± 0.56	11.86 ± 0.18	15.07 ± 0.33
150	4.53 ± 0.04	7.19 ± 0.06	23.95 ± 0.16	27.95 ± 0.30
200	8.76 ± 0.08	10.8 ± 0.15	43.17 ± 0.63	53.79 ± 0.26
300	31.89 ± 0.21	41.96 ± 0.18	67.94 ± 0.58	74.61 ± 0.23

2.2 不同 CoCl_2 浓度下 2 种细胞对紫杉醇的耐药倍数

如表 3 所示,不同浓度 CoCl_2 分别处理 A2780 和 SKOV3 细胞 24 h,随着 CoCl_2 浓度增加,2 种细胞对紫杉醇的敏感性均降低,且 SKOV3 对紫杉醇的耐药更明显 ($F=7\ 842.711, P=0.000$);在相同浓度 CoCl_2 作用下,SKOV3 细胞对紫杉醇的耐药倍数均明显高于 A2780 细胞 (50 $\mu\text{mol/L}$ 组: $t=-48.287, P=0.000$; 100 $\mu\text{mol/L}$ 组: $t=-263.205, P=0.000$; 150 $\mu\text{mol/L}$ 组: $t=-143.305, P=0.000$)。

表 3 不同 CoCl_2 浓度下 A2780 和 SKOV3 细胞对紫杉醇的耐药倍数 ($\%, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Paclitaxel resistant fold of A2780 and SKOV3 cells with different concentrations of CoCl_2 ($\%, \bar{x} \pm s$)

CoCl_2 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	紫杉醇的 IC_{50} 值		耐药倍数	
	A2780	SKOV3	A2780	SKOV3
0	0.81 ± 0.03	0.88 ± 0.09	—	—
50	1.58 ± 0.06	3.64 ± 0.02	1.96 ± 0.07^a	4.14 ± 0.03
100	1.91 ± 0.02	6.51 ± 0.02	2.36 ± 0.03^a	7.40 ± 0.02
150	7.89 ± 0.05	18.55 ± 0.07	9.84 ± 0.11^a	21.08 ± 0.08

注: a,同一 CoCl_2 浓度下,与 SKOV3 细胞组相比, $P<0.05$;—,无耐药倍数值。

2.3 RT-PCR 测常氧与乏氧条件下 2 种细胞的 HIF-1 α mRNA 表达情况

如图 1,常氧下 A2780 与 SKOV3 的 HIF-1 α mRNA 的相对表达量分别为 $(44.43 \pm 2.68)\%$ 和 $(40.78 \pm 2.24)\%$;在 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 培养液作用 24 h 的乏氧条件下, A2780 与 SKOV3 的 HIF-1 α 相对表达量分别为 $(65.18 \pm 0.57)\%$ 和 $(82.26 \pm 1.10)\%$ 。2 种细胞的 HIF-1 α mRNA 表达量均较常氧条件下

增高 (A2780 组: $t=-13.098, P=0.000$; SKOV3 组: $t=-28.779, P=0.000$),其中 SKOV3 细胞 HIF-1 α mRNA 的表达增加倍数 (2.04 ± 0.01) 明显高于 A2780 细胞 (1.46 ± 0.02) ($t=-5.573, P=0.000$)。

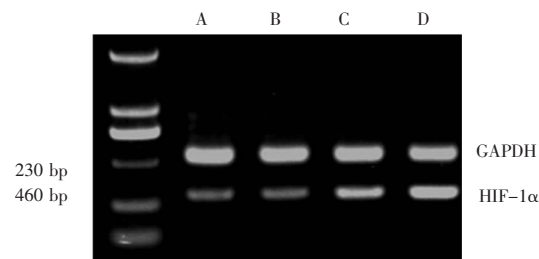


图 1 常氧与乏氧条件下两种细胞的 HIF-1 α mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Expression of HIF-1 α mRNA for A2780 and SKOV3 cells in normoxic and hypoxic conditions ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

卵巢癌为女性生殖系统的三大恶性肿瘤之一,其发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌而列居第三位^[3]。但由于卵巢癌早期无明显症状、缺乏特异性的检查手段及手术后化疗耐药等特点,导致其死亡率居妇科肿瘤之首^[4]。随着对肿瘤生物学特性认识的深入,实体肿瘤乏氧导致化疗抵抗现象逐渐引起学者的关注。研究发现,体外三维培养卵巢癌细胞直径 200 μm 即出现中心乏氧区^[5]。在乏氧状态下,肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性下降 100 倍^[6]。乏氧往往与肿瘤血管生成及侵袭转移密切相关^[7-9],是独立于肿瘤期别及淋巴结转移情况等的独特预后指标^[10-13]。因此,细胞乏氧模型的建立将对研究肿瘤耐药逆转及抑制侵袭转移方面具有十分重要的意义。

肿瘤细胞乏氧模型的建立主要有 2 种方法,一种是使用特定的装置对细胞进行乏氧诱导,另一种是采用 CoCl_2 等化学试剂进行化学诱导。前者设备相对昂贵、实验条件复杂且不适用于细胞培养体系局部氧浓度的改善研究。后者主要利用 CoCl_2 的二价钴离子置换脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 辅助因子——二价的铁离子, HIF-1 α 被羟基化,同时影响抑癌基因产物——结合氧依赖性降解区域 (oxygen-dependant degradation domain, ODD), 稳定细胞内 HIF-1 α 的表达,以达到和缺氧条件下类似的结果^[14-15]。HIF-1 α 是细胞在缺氧条件下产生的一种核转录因子,它可作用于多种靶基因,使其转录活性发生改变,从而介导组织细胞产生一系列的缺氧适应性反应^[16]。化学诱导法操作简便,成本低廉,可用于细胞培养体系局部氧浓度改善的研究^[17-18]。

本研究采用 2 种常见的卵巢癌细胞株 A2780 与 SKOV3,其中 A2780 细胞存在促黄体(生成)激素

释放激素受体,SKOV3 细胞存在叶酸受体,可用于卵巢癌靶向治疗研究。本实验通过 MTT 法测定不同浓度 CoCl_2 作用下 2 种细胞对紫杉醇的耐药倍数,结果发现,在 CoCl_2 浓度小于 $150 \mu\text{mol/L}$ 时,对 2 种细胞生长均无明显抑制作用,而 CoCl_2 浓度大于 $200 \mu\text{mol/L}$ 时,2 种细胞均出现明显的细胞生长抑制现象,且其抑制作用与 CoCl_2 呈剂量-时间依赖关系,这与 Su 等^[1]用 CoCl_2 诱导卵巢癌细胞株 C13K 对顺铂耐药的研究结果一致。以上研究提示,在建立乏氧耐药模型时,不宜选择 CoCl_2 浓度大于 $200 \mu\text{mol/L}$,以排除 CoCl_2 自身对细胞生长的影响。研究同时发现,在相同浓度 CoCl_2 作用下,SKOV3 细胞对紫杉醇的耐药倍数明显高于 A2780,这可能与细胞不同生物学特性有关,提示在 CoCl_2 诱导细胞乏氧耐药模型研究中,要针对不同的细胞株选择合适的 CoCl_2 浓度及作用时间,在相同作用条件下,卵巢癌 SKOV3 细胞株较 A2780 细胞株更易产生耐药,是用于构建卵巢癌细胞乏氧耐药模型较理想的选择。

HIF-1 α mRNA 的表达是 CoCl_2 诱导乏氧耐药模型成功的标志,本研究采用 RT-PCR 的方法对 CoCl_2 诱导的 2 种乏氧耐药细胞的 HIF-1 α mRNA 表达情况进行了测定,结果发现与诱导前相比,2 种细胞的 HIF-1 α mRNA 表达均明显增加,其中 SKOV3 细胞 HIF-1 α mRNA 表达量较 A2780 细胞增加更为明显,这与其耐药研究结果一致。以上研究结果进一步证实 2 种细胞对紫杉醇的耐药源于 CoCl_2 稳定细胞内 HIF-1 α mRNA 表达。提示采用 CoCl_2 化学诱导法建立的细胞乏氧耐药模型的耐药逆转研究时,要以 HIF-1 α 的改善作为耐药逆转的重要指标。

以上研究表明,采用 CoCl_2 化学诱导法可成功建立卵巢癌乏氧耐药模型,该方法简便,结果可靠;相同浓度 CoCl_2 诱导的不同卵巢癌细胞株产生的耐药特性不同,故要根据实验需要选择合适的细胞模型。在后续的靶向耐药逆转研究中,可以根据 2 种细胞表面不同的受体及乏氧耐药特性,研发氧气及药物靶向转运体,通过改善卵巢癌局部乏氧微环境提高其对化疗药物的敏感性^[19-20],对提高卵巢癌化疗效果将具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Su W, Huang L, Ao Q, et al. Nscapine sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin through inhibition of HIF-1 α [J]. Cancer Letter, 2011, 305(1): 94-99.
- [2] Huang L, Ao Q, Zhang Q, et al. Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancers via hypoxia-inducible factor 1 α [J]. Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(3): 447-456.
- [3] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [4] Schmid BC, Oehler MK. New perspectives in ovarian cancer treatment[J]. Maturitas, 2013. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.11.009. [Epub ahead of time]
- [5] Evans CL, Abu-Yousif AO, Park YJ, et al. Killing hypoxia cell populations in a 3D tumor model with EtNBs-PDT[J]. PloS One, 2011, 6(8): e234334.
- [6] Koch S, Mayer F, Honecker F, et al. Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro[J]. Br J Cancer, 2003, 89(11): 2133-2139.
- [7] Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(24): 9533-9537.
- [8] Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis; a chaperone escorts VEGF to the dance[J]. J Clin Invest, 2001, 108(1): 39-40.
- [9] Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, et al. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy[J]. Int J Radiat Biol, 2006, 82(10): 699-757.
- [10] Fyles A, Milosevic M, Hedley D, et al. Tumor Hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(3): 680-687.
- [11] Nordmark M, Lancaster J, Aquino-Parsons C, et al. The prognostic value of pimonidazole and tumour pO_2 in human cervix carcinomas after radiation therapy: a prospective international multi-center study[J]. Radiother Oncol, 2006, 80(2): 123-131.
- [12] Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. an international multi-center study[J]. Radiother Oncol, 2005, 77(1): 18-24.
- [13] Menon C, Fraker DL. Tumor oxygenation status as a prognostic marker[J]. Cancer Lett, 2005, 221(2): 225-235.
- [14] Ran R, Xu H, Lu A, et al. Hypoxia preconditioning in the brain[J]. Dev Neurosci, 2005, 27(2-4): 87-92.
- [15] 陈季武, 左秋红, 计磊, 等. 非泛素依赖地降解蛋白质研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(7): 593-603.
- [16] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(2): 225-239.
- [17] Nechemia-Arbely Y, Khamaisi M, Rosenberger C, et al. In vivo evidence suggesting reciprocal renal hypoxia-inducible factor-1 upregulation and signal transducer and activator of transcription 3 activation in response to hypoxic and non-hypoxic stimuli[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2013, 40(4): 262-272.
- [18] Cheng JC, Klausen C, P. Leung PC, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α mediates epidermal growth factor-induced down-regulation of E-cadherin expression and cell invasion in human ovarian cancer cells[J]. Cancer Lett, 2013, 329(2): 197-206.
- [19] Cavalli R, Bisazza A, Giustetto P, et al. Preparation and characterization of dextran nanobubbles for oxygen delivery[J]. Int J Pharm, 2009, 381(2): 160-165.
- [20] Cavalli R, Bisazza A, Rolfo A, et al. Ultrasound-mediated oxygen delivery from chitosan nanobubbles[J]. Int J Pharm, 2009, 378(1-2): 215-217.

(责任编辑: 关蕴良)