



· 论 著 ·

# HIF-1 $\alpha$ 对人结直肠癌细胞裸小鼠成瘤性的影响

杨 宝<sup>1</sup>, 王 婧<sup>2</sup>, 陈 超<sup>3</sup>, 周 洁<sup>1</sup>, 李 海<sup>1</sup>

1. 宁夏医科大学总医院结直肠外科, 宁夏 银川 750004;
2. 宁夏医科大学总医院内分泌科, 宁夏 银川 750004;
3. 江苏省人民医院普外科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** **背景与目的:** 目前对于中晚期结直肠癌患者尚无统一有效的治疗方法, 探索影响结直肠肿瘤发生、发展的因子, 有利于提高老年患者的治疗效果。通过裸小鼠移植瘤实验探究缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 对人结直肠癌细胞增殖及成瘤性的影响。**方法:** 采用RNA干扰技术下调HIF-1 $\alpha$ 的表达, 通过蛋白质印迹法 (Western blot) 和反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 验证细胞转染率; 采用Annexin V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 流式细胞术检测空白对照组 (PBS组)、实验组 (si-HIF-1 $\alpha$ 组) 和阴性对照组 (si-NC组) 细胞的凋亡情况; 将空白对照组、实验组和阴性对照组的细胞分别注入裸小鼠体内, 进行肿瘤细胞移植瘤实验, 然后测量各组移植瘤的体积和质量, 评估抑制HIF-1 $\alpha$ 的表达水平对人结直肠癌细胞增殖的影响。**结果:** 细胞转染后, si-HIF-1 $\alpha$ 组HIF-1 $\alpha$ 的表达降低。与空白对照组相比, 实验组细胞的凋亡率明显上升 ( $P<0.05$ ), 实验组裸小鼠瘤体的体积和质量均明显降低 ( $P<0.05$ ), 而阴性对照组裸小鼠的瘤体体积和质量变化差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论:** 下调HIF-1 $\alpha$ 的表达水平, 能够抑制人结直肠癌细胞的增殖及成瘤性。

**[关键词]** 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 流式细胞术; 裸小鼠; 移植瘤

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.05.003

中图分类号: R735.3+5; R735.3+7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)05-0377-06

**A study on the tumorigenic effect of HIF-1 $\alpha$  on human colorectal cancer cells in nude mice** YANG Bao<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, CHEN Chao<sup>3</sup>, ZHOU Jie<sup>1</sup>, LI Hai<sup>1</sup> (1. Department of Colorectal Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; 2. Department of Endocrinology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; 3. Department of General Surgery, Jiangsu Provincial People's Hospital, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: LI Hai E-mail: zhuoran1126@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Since there is no unified and effective treatment for patients with advanced colorectal cancer currently, exploring the factors that affect the occurrence and development of colorectal cancer is beneficial to elderly patients. The effect of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) on the proliferation of human colorectal cancer cells was investigated by nude mice xenograft experiments. **Methods:** The expression of HIF-1 $\alpha$  was down-regulated by RNA interference, and the cell transfection rate was verified by Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Apoptosis in blank, experimental and negative control cells was detected by Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) flow cytometry. The cells from the blank control, the experimental and the negative control groups were separately injected into the nude mice to perform tumorigenic experiments. Then the volume and weight of each group of transplanted tumors were measured, and the effect of inhibiting HIF-1 $\alpha$  expression on the proliferation of human colorectal cancer cells was evaluated. **Results:** After transfection, the expression of HIF-1 $\alpha$  in the si-HIF-1 $\alpha$  group was decreased. Compared with the blank control group, the apoptotic rate of the experimental group was significantly increased ( $P<0.05$ ), and the volume and weight of the tumor in the experimental group were significantly decreased ( $P<0.05$ ). However, there was no significant difference in tumor volume and weight changes between the negative control group and the nude control group ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** Down-regulation of the expression level of HIF-1 $\alpha$  can inhibit the proliferation and tumorigenic ability of human colorectal cancer cells.

**[Key words]** Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; Flow cytometry; Nude mice; Transplanted tumor

基金项目: 宁夏自然科学基金 (2019AAC03202)。

通信作者: 李 海 E-mail: zhuoran1126@163.com

随着中国人生活水平的不断提高,老年患者中结直肠肿瘤的发病率也呈逐年升高趋势。目前对于中晚期结直肠癌患者尚无统一有效的治疗方法,探索影响结直肠肿瘤发生、发展的因子,有利于提高老年患者的治疗效果及生存率。缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 因其在肿瘤发生、发展过程中的关键作用,成为研究热点。之前研究<sup>[1]</sup>表明, HIF-1 $\alpha$ 也会影响结直肠肿瘤的发生、发展。肿瘤细胞恶性增殖数量短时间内激增,血管供氧不足,造成局部缺氧环境,而有研究<sup>[1]</sup>发现, HIF-1 $\alpha$ 在这种缺氧环境中表达异常增高。HIF-1 $\alpha$ 可以诱导血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的产生,为肿瘤的增殖提供充足的营养物质<sup>[2]</sup>。而在这些研究中,大部分仅局限于体外细胞实验来证明HIF-1 $\alpha$ 在肿瘤中的作用。本文通过裸小鼠移植瘤实验,将人结肠癌HCT116细胞注入到裸小鼠体内,来探讨HIF-1 $\alpha$ 对结直肠肿瘤细胞成瘤性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

HCT116细胞购自美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection, ATCC), BALB/c裸小鼠 (雄) 30只购自宁夏医科大学动物实验中心, Annexin V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) /碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒购自甘肃海基生物科技有限公司, McCoy's 5A培养基购自美国Gibco公司, 兔多克隆抗体 (HIF-1 $\alpha$ ) 购自美国Abcam公司, HRP标记山羊抗兔IgG抗体购自美国Proteintech公司, 反转录试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司, TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞的复苏与培养

HCT116细胞保存在液氮罐中,取出后马上37℃水浴锅中复苏,待冻存管中液体完全溶解后,在超净工作台无菌条件下将细胞移至5 mL离心管中。1 000 r/min离心5 min后弃上清液,加入

适量培养基充分吹打混匀后转入含有10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、2.5%青霉素、2.5%链霉素的McCoy's 5A培养基中,然后放至37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的细胞培养箱中培养。2~3 d换液1次,细胞贴壁长至80%~90%后传代1次。

#### 1.2.2 细胞转染

HCT116细胞培养至对数生长期,加入适量胰酶消化数分钟,待细胞脱壁后加入含FBS的培养基终止胰酶消化,充分吹打后将细胞移至5 mL离心管中离心。重悬细胞并计数,取 $1 \times 10^5$ 个细胞接种至6孔板中,置于37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的细胞培养箱中培养。24 h后根据使用说明加入病毒,放至培养箱中继续温育12 h后吸弃上层转染液,加入含10%FBS的McCoy's 5A培养基培养。si-HIF-1 $\alpha$ 由上海吉凯基因医学科技股份有限公司合成。si-HIF-1 $\alpha$ 序列: 5'-CTGATGACCAGCAACTTGA-3'。

#### 1.2.3 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测蛋白的水平

细胞培养至对数生长期后,使用全蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,BCA法蛋白定量后,100 V电压下行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 1 h,转膜后TBST封闭1 h,加入HIF-1 $\alpha$ 抗体,4℃温育过夜, TBST洗膜3次,加入二抗后室温下温育1 h, TBST洗膜3次,采用电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 法显影。条带结果灰度值使用Image J软件进行分析,结果计算目的蛋白灰度值与相应内参灰度值之比,取平均值。

#### 1.2.4 反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测mRNA的表达

细胞培养至对数生长期,提取细胞RNA并反转录为cDNA,以cDNA为模板行RT-PCR检测各组细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA的表达情况。RT-PCR条件: 98℃预变性30 s; 98℃变性10 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸10 s,共40个循环; 4℃保存。计算公式:  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ,  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct$

实验组 -  $\Delta Ct_{\text{对照组}}$ ,  $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 将对照组目的基因 mRNA 相对水平作为 1。

### 1.2.5 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡

将细胞以 2 000 r/min 悬浮离心 5 min, 收集细胞。然后 PBS 洗涤, 离心细胞 2 次 (2 000 r/min, 5 min), 收集  $1\sim 5 \times 10^5$  个细胞。分别加入 500  $\mu\text{L}$  的结合缓冲液悬浮细胞, 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 混匀细胞, 5  $\mu\text{L}$  PI 再次混匀细胞后, 室温、避光反应 5~15 min, 采用流式细胞术检测。

### 1.2.6 裸小鼠移植瘤实验

#### 1.2.6.1 裸小鼠的饲养

裸小鼠在无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级环境下进行饲养。裸小鼠分为 3 组: 空白对照组、实验组和阴性对照组, 分别注射对应组别的细胞, 每组裸小鼠 10 只。饲料及饮用水须灭菌, 控制裸小鼠饲养环境的温度、氧气、湿度恒定。当裸小鼠生长至 8 周龄后进行实验。

#### 1.2.6.2 移植瘤模型的建立

3 组细胞制成悬液, 用洁净 1.5 mL Ependorf 试管保存置于冰上, 然后将悬液与基质胶混匀迅速接种。每只裸小鼠在右前肢背部的皮下注射约  $2 \times 10^6$  个细胞。接种后观察裸小鼠肿瘤形成及生长情况, 饲养方式不变, 在接种约 1 周后判断是否成瘤, 每周测量裸小鼠瘤体的体积 (体积 =  $1/2 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ )<sup>[3]</sup>。瘤体形成、生长 4 周后, 裸小鼠麻醉后处死, 取出裸小鼠皮下瘤体称重。将取出的瘤体放入冻存管标记后迅速投入到液氮中贮存。

### 1.3 统计学处理

用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行分析。数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并用 *t* 检验进行组间两两比较。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 Western blot 和 RT-PCR 检测细胞转染后 HIF-1 $\alpha$ 的蛋白和 mRNA 水平

采用 RNA 干扰技术下调 HIF-1 $\alpha$  的表达, 并通过镜下观察细胞内绿色荧光强度以判断转染质粒在细胞内的稳定表达。在 Western blot

实验中, 空白对照组 (PBS 组)、si-NC 组及 si-HIF-1 $\alpha$  组中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的相对表达量分别为  $0.85 \pm 0.06$ 、 $0.79 \pm 0.07$  和  $0.37 \pm 0.08$ 。空白对照组 (PBS 组) 的 HIF-1 $\alpha$  蛋白相对表达量与 si-NC 组相比差异无统计学意义, si-HIF-1 $\alpha$  组的 HIF-1 $\alpha$  蛋白相对表达量与空白对照组 (PBS 组) 相比显著降低 ( $t=3.82$ ,  $P < 0.01$ ), 与 si-NC 组相比也显著降低 ( $t=4.89$ ,  $P < 0.01$ ), 表明转染 si-HIF-1 $\alpha$  可特异性降低细胞内 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量, 沉默效率为 56.5%。RT-PCR 实验中, 空白对照组 (PBS 组)、si-NC 组及 si-HIF-1 $\alpha$  组的 HIF-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量分别为  $5.95 \pm 1.36$ 、 $5.71 \pm 1.22$  和  $1.74 \pm 0.42$ 。空白对照组 (PBS 组) 的 HIF-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量与 si-NC 组相比差异无统计学意义, si-HIF-1 $\alpha$  组的 HIF-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量与空白对照组 (PBS 组) 相比显著降低 ( $t=4.64$ ,  $P < 0.01$ ), 与 si-NC 组相比也显著降低 ( $t=3.71$ ,  $P < 0.01$ ), 沉默效率为 70.8%。通过 Western blot 和 RT-PCR 的检测证明, 细胞转染成功, HIF-1 $\alpha$  的表达显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

### 2.2 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡情况

采用流式细胞术对细胞凋亡情况进行检测, 结果表明, 空白对照组凋亡率为  $1.3\% \pm 0.7\%$ , 实验组为  $11.1\% \pm 1.6\%$ , 与空白对照组相比显著升高 ( $P < 0.001$ ), 阴性对照组凋亡率为  $3.5\% \pm 0.8\%$ , 与空白对照组相比未显著升高 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

### 2.3 裸小鼠移植瘤实验

#### 2.3.1 裸小鼠成瘤情况

裸小鼠接种 1 周后观察各组成瘤情况, 空白对照组与阴性对照组中 10 只裸小鼠全部成瘤; 实验组中 9 只成瘤, 1 只未成瘤。前期裸小鼠精神尚可, 后期精神萎靡、纳差, 在此期间未见死亡裸小鼠 (表 1)。

#### 2.3.2 瘤体体积的变化

在瘤体形成后, 连续 4 周对瘤体的体积进行测量, 得到瘤体体积 (表 2), 并绘制生长曲线图 (图 3)。将每周的瘤体测量值比较后可以看到,

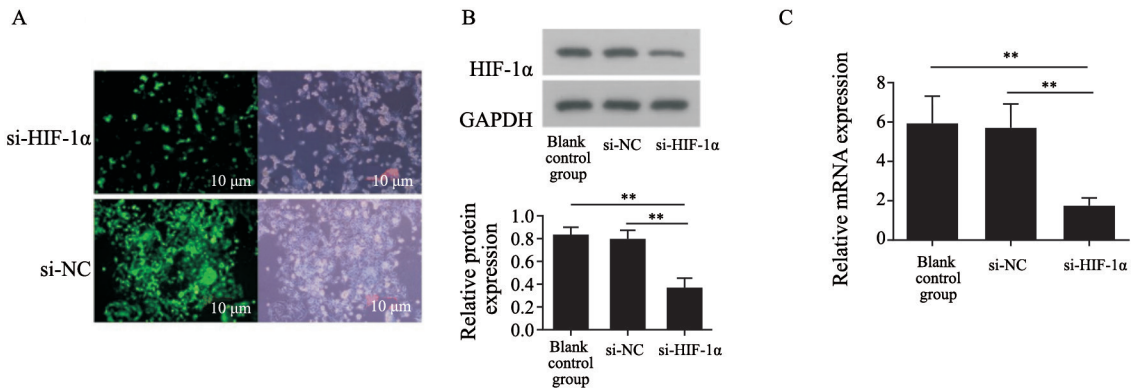


图1 细胞转染后HIF-1 $\alpha$ 的表达水平

Fig. 1 Expression level of HIF-1  $\alpha$  after transfection

A: After transfection, the green fluorescence images of si-HIF-1 $\alpha$  group and si-NC group (left panel), as well as the cell morphology under ordinary optical microscope in the same field of vision (right panel); B: Western blot was used to detect the protein expression changes and semi-quantitative analysis of si-HIF-1 $\alpha$  group and si-NC group; C: RT-PCR was used to detect the mRNA expressions of si-HIF-1 $\alpha$  group and si-NC group. \*\*:  $P < 0.01$ , compared with si-HIF-1 $\alpha$  group

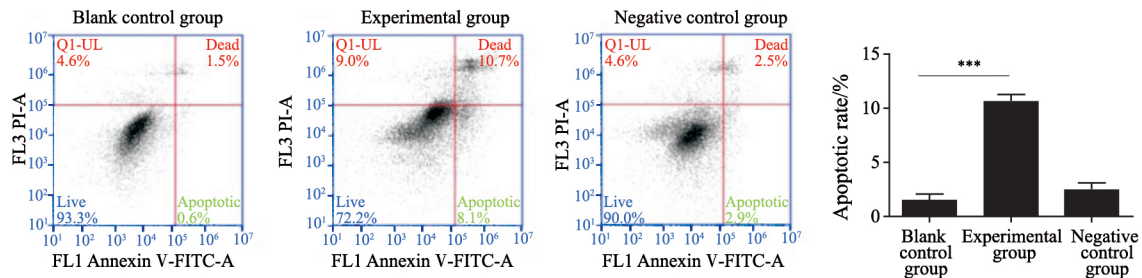


图2 Annexin V-FITC/PI流式细胞术检测各组细胞凋亡

Fig. 2 Apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry in each group

\*\*\*:  $P < 0.001$ , compared with black control group

表1 裸小鼠成瘤情况

Tab. 1 Tumorigenesis in nude mice

Group	Tested amount $n$	Number of tumorigenesis $n$	Rate of tumorigenesis/%	Death rate/%
Blank control group	10	10	100	0
Experimental group	10	9	90	0
Negative control group	10	10	100	0

表2 每周的瘤体体积

Tab. 2 Tumor volume per week

Time/week	Blank control group $V/mm^3$	Experimental group $V/mm^3$	Negative control group $V/mm^3$
1	77.30 $\pm$ 8.36	8.45 $\pm$ 2.01	70.56 $\pm$ 9.58
2	198.91 $\pm$ 10.53	26.61 $\pm$ 5.12	171.82 $\pm$ 12.14
3	361.88 $\pm$ 13.40	53.26 $\pm$ 6.32	323.44 $\pm$ 12.88
4	513.27 $\pm$ 15.92	83.87 $\pm$ 6.96	479.06 $\pm$ 14.33

与空白对照组相比, 实验组的瘤体体积增加较为缓慢, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.3.3 瘤体质量的比较

裸小鼠成瘤4周后, 裸小鼠麻醉处死后取瘤体称重。得出各组的瘤体质量 (表3), 并绘制

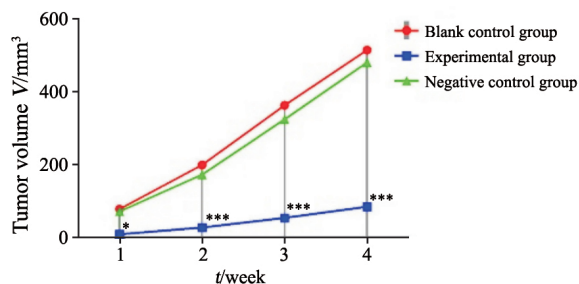


图3 瘤体生长曲线图

Fig. 3 Growth curve of tumor

\*:  $P < 0.05$ , compared with blank control group; \*\*\*:  $P < 0.001$ , compared with blank control group

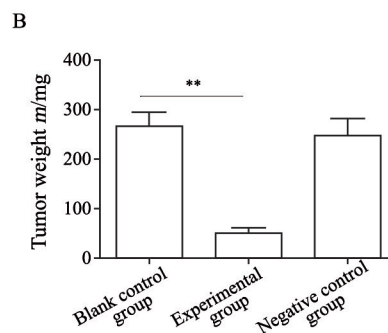
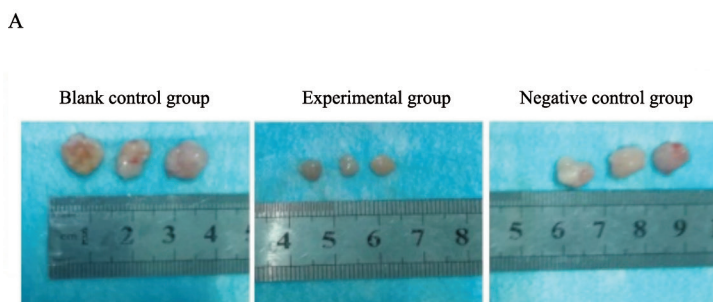


图4 各组的瘤体质量比较

Fig. 4 Comparison of tumor weight in each group

A: The tumor tissues of blank control group, experimental group and negative control group ( $n=10$ , each group only showed 3 representative tumor bodies); B: semi-quantitative analysis of tumor weight comparison among blank control group, experimental group and negative control group. \*\*:  $P < 0.01$ , compared with blank control group

### 3 讨论

HIF-1 $\alpha$ 是治疗肿瘤的关键靶点，目前已经得到许多研究者的证实<sup>[4]</sup>。在结直肠癌肿瘤发生、发展的过程中，HIF-1 $\alpha$ 的表达水平异常增高，可以激活基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、VEGF和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关因子等，使肿瘤细胞获得增殖、迁移和侵袭的能力<sup>[5-7]</sup>。体外细胞学实验<sup>[2]</sup>已经揭示了其发挥功能的相关机制。而本研究通过体内实验来探讨HIF-1 $\alpha$ 在结直肠癌肿瘤发生、发展过程中的作用，本研究成功构建了细胞和裸小鼠的相关模型，通过比较分析，探讨HIF-1 $\alpha$ 在结直肠癌肿瘤的作用。

裸小鼠致瘤实验结果显示，与空白对照组相比，实验组中裸小鼠瘤体的体积增加较慢，

瘤体质量半定量分析图(图4)。与空白对照组相比，实验组的瘤体质量较低( $P < 0.05$ )；而阴性对照组的瘤体质量与空白对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表3 各组的瘤体质量

Tab. 3 Tumor weight in each group

Group	$(\bar{x} \pm s)$		
	Blank control group	Experimental group	Negative control group
Tumor weight m/mg	266.45 $\pm$ 50.77	52.38 $\pm$ 18.79	246.03 $\pm$ 60.53

瘤体质量较低，而阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义。这些研究结果表明，下调HIF-1 $\alpha$ 在结直肠癌肿瘤中的表达，能够有效抑制瘤体的增殖，这与体外细胞学研究结果是一致的，提示HIF-1 $\alpha$ 在结直肠癌肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用。当瘤体内HIF-1 $\alpha$ 表达水平降低时，其下游因子MMP和VEGF的表达受到抑制。VEGF作为一种生长因子，具有高度特异性<sup>[8]</sup>，能够增加血管通透性，促进细胞外基质变性，促进血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用<sup>[9-11]</sup>。MMP家族如MMP2，能够将细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的蛋白成分降解，使得能够阻滞肿瘤细胞侵袭的组织屏障受到破坏，并且使细胞的黏附力得到增强，从而增强肿瘤细胞的侵袭能力<sup>[12]</sup>。而且MMP2还能促进合成和释放多种能够调控血管生长的因子(如VEGF等)，促进血管生成，激发潜在的生物活

性<sup>[13]</sup>。在正常肿瘤生长低氧环境下, VEGF能够调节血浆酶原活化因子和血浆酶原活化因子抑制因子-1的mRNA水平升高, 从而增强血浆酶原活化因子的生物活性, 促进细胞外蛋白的水解, 进而催生新的毛细血管<sup>[14]</sup>。因而一旦VEGF的活性受到抑制, 不能为肿瘤的生长形成新生血管, 就会导致肿瘤增殖障碍。本研究实验组中的1只裸小鼠成瘤失败可能与上述原因相关。

综上所述, 结直肠肿瘤中HIF-1 $\alpha$ 的下调可以抑制瘤体的生长, 促进其凋亡。本文为HIF-1 $\alpha$ 作为癌症治疗的靶点提供了体内实验的依据。

### [参 考 文 献]

- [ 1 ] ZHANG W J, SHI X P, PENG Y, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through direct regulation of ZEB1 in colorectal cancer [ J ] . PLoS One, 2015, 10(6): e0129603.
- [ 2 ] DU Y Q, GE Y B, XU Z H, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ )/vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway participates in angiogenesis of myocardial infarction in muscone-treated mice: preliminary study [ J ] . Med Sci Monit, 2018, 24: 8870-8877.
- [ 3 ] NAITO S, VON ESCHENBACH A C, GIAVAZZI R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice [ J ] . Cancer Res, 1986, 46(8): 4109-4115.
- [ 4 ] WANG Y, HUANG Y, LIU H X, et al. Long noncoding RNA CDKN2B-AS1 interacts with miR-411-3p to regulate ovarian cancer *in vitro* and *in vivo* through HIF-1 $\alpha$ /VEGF/P38 pathway [ J ] . Biochem Biophys Res Commun, 2019, 514(1): 44-50.
- [ 5 ] GUO L Y, ZHU P, JIN X P. Association between the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF and prognostic implications in primary liver cancer [ J ] . Genet Mol Res, 2016, 15(2).
- [ 6 ] ZHU S K, ZHOU Y, WANG L, et al. Transcriptional upregulation of MT2-MMP in response to hypoxia is promoted by HIF-1 $\alpha$  in cancer cells [ J ] . Mol Carcinog, 2011, 50(10): 770-780.
- [ 7 ] DUAN W M, HU J J, LIU Y H. Ketamine inhibits colorectal cancer cells malignant potential via blockage of NMDA receptor [ J ] . Exp Mol Pathol, 2019, 107: 171-178.
- [ 8 ] BENCSIKOVA B, BUDINSKA E, SELINGEROVA I, et al. Circulating T cell subsets are associated with clinical outcome of anti-VEGF-based 1st-line treatment of metastatic colorectal cancer patients: a prospective study with focus on primary tumor sidedness [ J ] . BMC Cancer, 2019, 19(1): 687.
- [ 9 ] TOSHIMA H, IKUSUE T, HISAMATSU A, et al. VEGF inhibitors do not increase D-dimer levels in colorectal cancer patients without venous thromboembolism: a retrospective non-inferiority analysis [ J ] . In Vivo, 2019, 33(6): 2117-2123.
- [ 10 ] WANG J S, YANG L N, LIANG F, et al. Integrin alpha x stimulates cancer angiogenesis through PI3K/Akt signaling-mediated VEGFR2/VEGF-A overexpression in blood vessel endothelial cells [ J ] . J Cell Biochem, 2019, 120(2): 1807-1818.
- [ 11 ] OH M, RHO S B, SON C, et al. Non-proteolytic calpain-6 interacts with VEGFA and promotes angiogenesis by increasing VEGF secretion [ J ] . Sci Rep, 2019, 9(1): 15771.
- [ 12 ] ZHU D J, YE M, ZHANG W. E6/E7 oncoproteins of high risk HPV-16 upregulate MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 and promote the migration of cervical cancer cells [ J ] . Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 4981-4989.
- [ 13 ] OU Z Y, WANG Y J, LIU L F, et al. Tumor microenvironment B cells increase bladder cancer metastasis via modulation of the IL-8/androgen receptor (AR)/MMPs signals [ J ] . Oncotarget, 2015, 6(28): 26065-26078.
- [ 14 ] LUO X, JIA R, LUO X Q, et al. Cold exposure differentially stimulates angiogenesis in BAT and WAT of mice: implication in adrenergic activation [ J ] . Cell Physiol Biochem, 2017, 42(3): 974-986.

(收稿日期: 2020-09-21 修回日期: 2021-01-13)