doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.01.005

低氧处理不同时间对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响及相应缺氧模型探讨 *

张 璐[1,2] 沈 红[2△] 沈 立[2] 朱祎娜[2] 崔 进[2]

(1 南京医科大学第二临床医学院 江苏 南京 210011;2 南京医科大学第二附属医院呼吸内科 江苏 南京 210011)

摘要 目的:观察低氧处理不同时间对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响,探讨合理的人肺腺癌细胞株 A549 体外模拟缺氧时间。**方法:**将人肺腺癌细胞 A549 细胞株在低氧环境下分别培养 12 h、24 h、48 h、72 h,设置常氧对照组,通过 CCK8 法测定 A549 细胞存活率,RT-PCR 和免疫印迹分别检测细胞缺氧诱导因子 -1α (hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α) 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA 及蛋白的表达。**结果:**低氧 24 h 组 A549 细胞存活率最高,低氧 48 h、72 h 组 A549 细胞存活率呈时间依赖性明显下降($P<0.001$)。自低氧 12 h 起,A549 细胞 HIF-1α mRNA 和 VEGFmRNA 的表达开始随低氧时间延长而显著增加(P 均 <0.001);HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达自 24 h 开始随低氧时间延长而显著增加(P 均 <0.001)。**结论:**低氧诱导的 A549 细胞存活率呈时间依赖性降低,而 HIF-1α、VEGF 表达呈时间依赖性增高,人肺癌细胞株 A549 缺氧模型最适时间为 24 h。

关键词:低氧;活性;缺氧诱导因子 -1α;血管内皮生长因子;模型

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)01-21-05

Effect of Different Time of Hypoxia Treatment on the Proliferation of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells and the Associated Experimental Study of Hypoxic Model*

ZHANG Lu[1,2], SHEN Hong[2△], SHEN Li[2], ZHU Yi-na[2], CUI Jin[2]

(1 The Second Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210011, China;

2 Department of Respiratory Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210011, China)

ABSTRCT Objective: To observe the effect of different time of hypoxia treatment on the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells. To explore the optimal time for the hypoxic model in vitro for human lung adenocarcinoma cell line A549. **Methods:** Human lung adenocarcinoma A549 cells were cultured under hypoxic environment for 12 h, 24 h, 48 h and 72 h respectively and set up a normoxic group as contrast. The proliferation of A549 cells was detected by CCK8 assay. The transcriptional mRNA and protein levels of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were examined by RT-PCR and western blot. **Results:** The survival rate of the 24 h group was the highest, and the cells' proliferation of 48 h and 72 h group significantly decreased in a time-dependent manner ($P<0.001$). The mRNA expression of HIF-1α and VEGF began to increase significantly from 12 h while the protein expression rose significantly from 24 h. After the above time points the mRNA and protein expression both increased with the prolongation of hypoxic time ($P<0.001$). **Conclusions:** The viability of hypoxia-induced A549 cells decreased in a time-dependent manner while the expression of HIF-1α and VEGF increased with the extension of hypoxic time. The optimal time for A549 hypoxic model in our study was 24 h.

Key words: Hypoxia; Viability; HIF-1α; VEGF; Model

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)01-21-05

前言

肺癌是全世界癌症的首要死因。肿瘤组织缺氧是所有实体肿瘤的特征，处于缺氧状态的肿瘤细胞仍能不断增殖和浸润，与起关键性作用的转录因子 HIF-1 密切相关。HIF-1 调控着下游包括 VEGF 的 70 多种基因,影响肿瘤生长、血管形成、转移、凋亡、耐药和预后等[1,2]。近年来,缺氧和血管生成在实体肿瘤中的作用得到学界极大的关注,抗血管生成已经成为肿瘤治疗的重要措施[3,4]。目前,大多肺癌细胞株的研究在常氧培养环境下,保持着较高而稳定的氧分压,其细胞的增殖、凋亡和信号传导与体内肿瘤缺氧生长环境有很大的不同。有必要通过低氧培养来模拟肺癌在体的情况，而有关这方面研究只有少量报道,且

* 基金项目:江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(201510312017Z);南京市医学科技发展基金项目(YKK16226)

作者简介:张璐(1996-),本科,从事肺癌的基础与临床研究,电话:18351977923,E-mail: zhangluabc@126.com

△通讯作者:沈红(1974-),博士,副主任医师,从事肺癌的基础与临床研究,E-mail: shenhong603@163.com

(收稿日期:2018-03-07 接受日期:2018-03-28)

存在两种相互矛盾的观点：一方面低氧环境可抑制 A549 细胞增殖[5]，另一方面低氧环境又可通过 HIF-1α 途径上调 VEGF 表达促进血管生成，从而促进肿瘤组织增殖和浸润[6-9]；另外，各个文献中所采用的缺氧模型各不相同，尤其是低氧培养时间不一，势必会影响结论。因此，有必要进一步探索低氧下肺癌 A549 的存活率，及选择低氧培养 A549 细胞肺癌模型的时间截点。

本课题组前期研究在晚期非小细胞肺癌患者中发现升高的血清 HIF-1α 与 VEGF 与疾病的诊断、疗效、预后有一定的关系[10,11]。在此基础上，本研究通过观察低氧环境下 A549 细胞增殖活性的变化及 HIF-1α 和 VEGF mRNA 及蛋白表达随着低氧时间变化的趋势，旨在探讨合理的人肺癌细胞株 A549 体外模拟低氧时间，分析低氧影响癌细胞活性的可能机制，为完善体外模拟缺氧模型的建立提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞株来自南京拜睿生物技术有限公司；Matrigel Matrix（美国 Corning,5131014），PVDF 膜(Millipore, IPVH00010)，预染蛋白分子(Fermentas, 26616)，ECL Plus 发光试剂盒、细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天公司。抗 HIF-1α 抗体(proteintech,20960-1-AP)，抗 VEGF 抗体 (Santa Cruz, sc-7269)，抗 β-actin 抗体(abcam, ab8226)。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞株低氧培养及 CCK-8 法检测存活率 采用人肺癌细胞 A549，用含 10 %新鲜胎牛血清的 DMEM、100 U/mL 的青霉素、100 U/mL 的链霉素的培养基，在 37 ℃、5 % CO_2 的条件下培养。细胞低氧培养在 37 ℃、1 % O_2、5 % CO_2 和 94 %N_2 条件下，由 Thermo 三气培养箱(型号：3131，美国)中控制各气体浓度。

A549 细胞株培养后，取对数生长期细胞，换无血清培养液培养 12 小时使得细胞周期同步化，细胞低氧的环境下培养 12 h、24 h、48 h、72 h。加入 CCK-8 溶液，继续培养 4 小时，用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度值。计算存活率：存活率 = 实验孔 A 值 / 对照孔 A 值× 100 %，并用 SPSS20 和 prism 5 软件进行数据处理。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测细胞内 HIF-1α 及 VEGF 的 mRNA 变化 细胞分别低氧培养 12 h、24 h、48 h、72 h 后，离心收集细胞，加 1 mL Trizol 抽提总 RNA。按照逆转录试剂盒说明书步骤反转录制备 cDNA。以 β-actin 为内参，基因检测引物如下：HIF-1α 上游：GGCAGCAACGACACAGAAAC，下游：TGATTGAGTGCAGGGTCAGC，扩增长度 164 bp；VEGF 上游：TTCTGGGCTGTTCTCGCTTCG，下游：CCCCTCTC-CTCTTCCTTCTCT，扩增长度：123 bp；β-Actin 上游：CATG-TACGTTGCTATCCAGGC，下游：CTCCTTAATGTCACG-CACGAT，扩增长度 103 bp。扩增曲线：95 ℃ 5 min 1cycle；95 ℃ 5 s，60 ℃ 31 s 40 cycles。熔解曲线：95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，95 ℃ 15 s。采用 Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.1 分析软件及△△CT 法定量分析扩增曲线及溶解曲线。

1.2.3 免疫印迹 用 IP 裂解液(含 1 mM 的 PMSF)裂解样本细胞，BCA 法定量，测定 562 nm 处的吸光度值，根据标准曲线计算样品的蛋白浓度。取每泳道 30 μg 的上样量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，分离后转印至 PVDF 膜，将 PVDF 膜浸入含 5 %脱脂奶粉的封闭液中，加入一抗，4 ℃孵育过夜。洗膜后加入二抗，于室温摇床上孵育 1 h。ECL 化学发光显影，在凝胶成像分析仪中，化学光敏模式曝光显影。用 ImageJ 软件对目的条带的灰度值进行半定量分析。

1.3 统计学分析

应用 IBM SPSS 20 软件进行统计学处理，实验数据用 表示，两组间比较采用 t 检验，多组间行方差分析(ANOVA)及 q 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧培养不同时间对 A549 细胞存活率的影响

低氧 12 h 组细胞存活率为(94.25± 2.92)%、低氧 24 h 组细胞存活率为 (96.30± 2.79)%、低氧 48 h 组细胞存活率为(66.97± 3.01)%、低氧 72 h 组细胞存活率为(45.16± 1.80)%。经单因素方差分析，A549 细胞低氧不同时间的存活率比较差异有统计学意义(P=0.000)，以低氧 24 h 组细胞生存率最高，且与该组相比(图 1)，低氧 12 h 组细胞存活率无明显差异，低氧 48 h、72 h 细胞存活率呈时间依赖性明显下降($P<0.001$)。

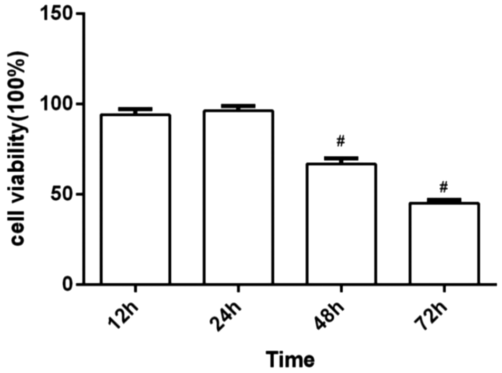

图 1 低氧培养不同时间对 A549 细胞的生存率的影响

Fig.1 Effect of different time of hypoxia treatment on the proliferation of A549 cells

A549 cells were exposed to hypoxia, and the cell viability was correlated with the time of hypoxia.

# $P<0.05$ compared with 24h

2.2 低氧培养不同时间对 A549 细胞 HIF-1α 及 VEGF 的mRNA 表达的影响

HIF-1α mRNA 表达为：常氧组(1.0± 0.12)、低氧 12 h 组(3.16± 0.38)、低氧 24 h 组(4.57± 0.33)、低氧 48 h 组(12.13± 1.14)、低氧 72 h 组(16.19± 2.04)；VEGFmRNA 表达为：常氧组(1.0± 0.21)、低氧 12 h 组 (2.43± 0.38)、低氧 24 h 组 (2.63± 0.30)、低氧 48 h 组(5.92± 0.33)、低氧 72 h 组(7.68± 0.68)。常氧下 A549 细胞中 HIF-1α 及 VEGF 的 mRNA 水平均较低，自低氧 12 h 起 HIF-1α mRNA 和 VEGF mRNA 的表达开始随低氧时间延长而明显增加(P 均 <0.001)，其中低氧 12 h 组的 mRNA 表达与低氧 24 h 组相比均无明显差异($P>0.05$)，如图 2。

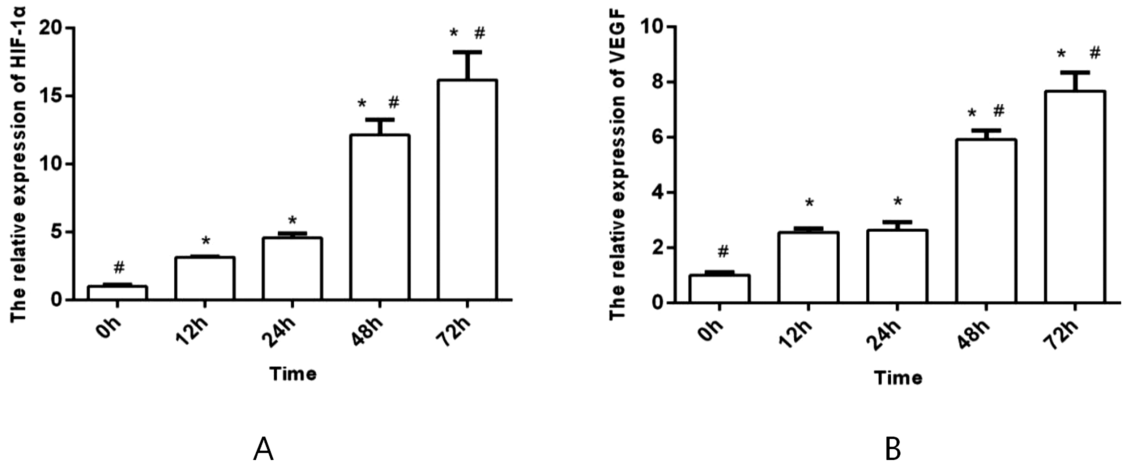

图 2 低氧培养不同时间对 A549 细胞 HIF-1α 及 VEGF 的 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of different time of hypoxia treatment on the mRNA expressions of HIF-1α and VEGF in A549 cells

A. Expression of HIF-1α mRNA B. Expression of VEGF mRNA

A549 cell exposed to hypoxia, the expression of HIF-1α mRNA and VEGF mRNA were both correlated with the time of hypoxia treatment.

* *P<0.05* compared with 0 h; # *P<0.05* compared with 24 h.

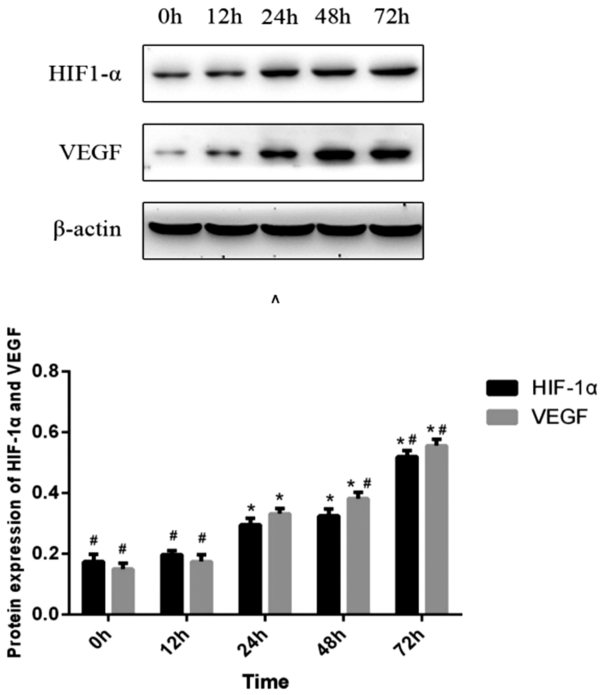

图 3 低氧培养不同时间对 A549 细胞 HIF-1α 及 VEGF 的蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of different time of hypoxia treatment on the protein expressions of HIF-1α and VEGF in A549 cells

A. protein expression of HIF-1α and VEGF B. quantitative analysis of HIF-1α and VEGF protein expression

A549 cell exposed to hypoxia, the protein expression of HIF-1α and VEGF were both correlated with the time of hypoxia treatment. * *P<0.05* compared with 0h; # *P<0.05* compared with 24h.

2.3 低氧培养不同时间对 A549 细胞 HIF-1α 及 VEGF 蛋白表达的影响

HIF-1α 蛋白表达为：常氧组 (0.17± 0.02)、低氧 12 h 组(0.20± 0.01)、低氧 24 h 组(0.30± 0.02)、低氧 48 h 组(0.33± 0.02)、低氧 72 h 组(0.52± 0.02)；常氧环境下 HIF-1α 蛋白表达水平较低，自 24 h 起蛋白表达随低氧时间延长而明显增加(*P<0.001*)，低氧 12 h 组 HIF-1α 相较于常氧组表达无明显增加(*P>0.05*)，低氧 48 h 组相较于低氧 24 h 组蛋白表达无明显增加(*P>0.05*)。

VEGF 蛋白表达为：常氧组 (0.15± 0.02)、低氧 12 h 组(0.18± 0.02)、低氧 24 h 组(0.33± 0.02)、低氧 48 h 组(0.38± 0.02)、低氧 72 h 组(0.56± 0.02)。结果显示，统计结果显示，常氧环境下 VEGF 蛋白表达水平较低，自 24 h 起蛋白表达随低氧时间延长明显增加(*P<0.001*)，而低氧 12 h 组相较于常氧组蛋白表达无明显增加(*P>0.05*)，如图 3。

3 讨论

肿瘤微环境是影响肿瘤细胞的生物学特性和抗肿瘤治疗应答的重要因素，是所有实体肿瘤的特征，当肿瘤体积超过 3 mm^3 时，肿瘤内部即处于缺氧状态。在这种缺氧微环境下，肺癌组织在体内仍能不断增殖生长，并易于发生转移且和耐药有密切关系[1-3]。因此，在进行肺癌相关的体外试验时，有必要建立合格的缺氧微环境来模拟肺癌组织在体环境进行研究。

HIF-1α 是介导肿瘤缺氧微环境的关键因子，且组织缺氧的最重要和直接的表现是 HIF-1α 的水平上调，故 HIF-1α 升高通常作为缺氧细胞模型构建成功的标志。我们及他人临床研究证实 HIF-1α 在肺癌患者的血清中表达明显升高[10-12]。肿瘤细胞的 HIF-1α 能够调控糖酵解途径中的一系列酶表达，因而肿瘤能够将葡萄糖代谢成乳酸，并在缺氧环境中生存。常氧条件下，HIF-1α 表达的蛋白在细胞中被脯氨羟基化酶(prolylhydroxylase domain，PHD)迅速降解[13,14]，但在缺氧环境中降解途径被破坏，HIF-1α 在细胞中积累并从胞浆进入胞核，进而在胞核中激活为异二聚体 HIF-1，激活的 HIF-1 与下游靶基因结合后能进一步激活下游众多缺氧相关基因(包括 VEGF 基因)的表达，使机体对缺氧反应进行一系列多样化的调节，例如促进 VEGF 表达。

VEGF 在肿瘤的血管形成过程中起到关键的作用，通过刺

激肺血管内皮细胞分化增殖和迁移、提高血管通透性、浸润淋巴管等促进肺癌的进展和转移[15-17],因其在肺癌发生、发展中的作用,靶向 VEGF 是肺癌治疗潜在的靶点[18]。在肿瘤组织内部的缺氧环境下,HIF-1α 激活物与 VEGF 基因启动子结合,不仅能使 VEGF 的 mRNA 稳定性增加，还能增加 VEGF 的转录活性。很多文献表明 VEGF 在非小细胞肺癌中过表达,而且与非小细胞肺癌化疗疗效和预后相关[11,16,19]。本实验结果与文献报道一致，随低氧培养时间的延长,A549 细胞 HIF-1α 和 VEGF 的 mRNA 及相应的蛋白表达水平呈时间依赖性增加，说明 HIF-1α 蛋白降解受抑制并在细胞中积累,VEGF mRNA 稳定存在且转录活性增加，自低氧 24 h 起 mRNA 蛋白表达已明显上升,HIF-1α 转录和翻译水平的高表达提示本实验在低氧培养 24 h 后建立了缺氧培养环境。

有关肺癌细胞在低氧环境中的增殖活性目前存在不同的观点。在不同条件下,HIF-1α 可分别引起抗凋亡和促凋亡基因的表达。Li[8]等通过使用 1%O_2 不同时间低氧培养,发现低氧培养 3 天后 A549 腺癌细胞增殖活性呈时间依赖性增加,凋亡减少,而 siRNA 干扰抑制 HIF-1α 后,细胞凋亡增加。其主要通过 HIF-1、NF-κB 和 p53 介导的适应性反应以抵抗细胞死亡[20]。还有研究显示在氯化钴低氧环境下,A549 细胞能通过 HIF-1α 途径在转录水平大幅上调凋亡抑制基因 survivin 表达从而抑制细胞凋亡,而靶向沉默 HIF-1α 基因表达则能通过下调 survivin 表达促进 A549 细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长,并发现仅在低氧环境下有上述结果；而在常氧环境下沉默 HIF-1α 基因则对肺癌细胞增殖无明显影响，表明 HIF-1α 仅在低氧条件下促进肺癌细胞增殖生长[9]。然而,另一方面,低氧环境(1 %O_2)可抑制 A549 细胞增殖生长。在低氧环境下,HIF-1α 通过 p27 的作用影响细胞周期 G1/G0 期向 S 期的转变过程，使肿瘤细胞周期阻滞于 G1/G0 期,进而抑制细胞增殖活性[5]。同时,低氧环境又可通过降低抗凋亡基因 bcl-2、增加促凋亡基因 caspase-3 蛋白的表达,导致 caspase 等死亡受体通路被不同程度地激活,活化的 caspase-3 蛋白通过水解凋亡相关蛋白而使细胞发生凋亡的作用被放大,从而诱导 A549 细胞的凋亡[5,21-23]。本次实验结果与上述研究均不相同,结果显示 A549 细胞生存活性与低氧培养时长有关。低氧 24 h 组的细胞存活率最高，低氧 24 h 后 HIF-1α、VEGF 的 mRNA 和蛋白表达也已明显升高,我们通过流式细胞仪测得常氧组和低氧 24 h 组细胞凋亡率分别为 (7.20± 1.35)%、(6.79± 1.48) %,差异无统计学意义,说明低氧培养 24 h 后 A549 细胞生存活性较好[24],而低氧 48 h 后 A549 细胞存活率明显下降,HIF-1α 可能发挥促凋亡作用,与肺癌细胞恶性生物学特性不符合,不适合肺癌缺氧微环境模型的有效建立。故取肺癌细胞株 A549 缺氧模型最适时间为 24 h。

本实验结果显示 HIF-1α 和 VEGF 的 mRNA 表达水平自低氧培养 12 h 起，而相应的蛋白表达水平自低氧培养 24 h 起即开始明显上升,且随低氧培养时间的延长均呈时间依赖性明显增加。而低氧培养 24 h 内 A549 细胞存活率能维持在较高水平,自低氧培养 48 h 起存活率反而呈现时间依赖性明显下降。这种低氧环境下细胞活性的不同与低氧培养时长的关系,其具体机制有待进一步探讨,推测可能原因如下:①缺氧方式不同会影响肿瘤生长。国内外基于肺癌合并阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征（obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome,OSAHS)的研究[25,26]发现,慢性间歇低氧可通过 HIF-1α 途径下调下游的肿瘤凋亡和细胞周期相关基因等表达，进而抑制 A549 细胞凋亡,促进 A549 细胞的生长和转移。Gozal David[26]等提出由于肿瘤生长速度和血管生成不匹配,肿瘤内部常出现连续缺氧和间歇缺氧微环境并存的现象,肿瘤的发生、生长和转移浸润由连续和间歇缺氧两种机制共同调节。本次实验条件为持续缺氧,A549 细胞不能适应持续缺氧这一过程，造成 A549 细胞凋亡增加。②在肿瘤缺氧微环境下,肿瘤内部远离血管的组织由于氧供不足,生长会受到限制,甚至发生死亡[26]。临床患者中发现较大的肺癌实体肿瘤中心部位常发生坏死,临近坏死的肿瘤实质保持较高的恶性生物学行为,也说明肿瘤中心的长期缺氧微环境不利于肺癌组织生长。由于缺氧对肿瘤生长影响的复杂性，实际上模拟低氧也仅仅是部分与生理性缺氧相吻合,需要进一步对这方面进行研究。

综上所述,低氧诱导的 A549 细胞存活率呈时间依赖性降低，而 HIF-1α、VEGF 表达呈时间依赖性增高，人肺癌细胞株 A549 缺氧模型最适时间为 24 h。

参 考 文 献(References)

[1] Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH. HIF-1: a key mediator in hypoxia[J]. Acta Physiol Hung, 2009, 96(1): 19-28

[2] 袁源, 钟竑, 梅举, 等. 人非小细胞肺癌中缺氧诱导因子 1α 的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(15): 2814-2817
Yuan Yuan, Zhong Hong, Mei Ju, et al. Expression and Clinical Significance of HIF-1α in Non-small Cell Lung Cancer[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(15): 2814-2817

[3] Jackson AL, Zhou B, Kim WY. HIF, hypoxia and the role of angiogenesis in non-small cell lung cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(10): 1047-1057

[4] Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia[J]. Cancer Cell, 2014, 26(5): 605-622

[5] 张莉, 李清泉. 低氧对人肺腺癌 A549 细胞生长的影响[J]. 实用医学杂志, 2007, (04): 451-453
Zhang Li, Li Qing-quan. Effect of hypoxia on cell growth of human lung adenocarcinoma cell line A549 [J]. The Journal of Practical Medcine, 2007, (04): 451-453

[6] Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor--HIF-1α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(1): 90-97

[7] Alevizakos M, Kaltsas S, Syrigos KN. The VEGF pathway in lung cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 72: 1169-1181

[8] Li X, Liu X, Xu Y, et al. KLF5 promotes hypoxia-induced survival and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer cells via HIF-1α [J]. Int J Oncol, 2014, 45(4): 1507-1514

[9] Li W, Chen YQ, Shen YB, et al. HIF-1α knockdown by miRNA decreases survivin expression and inhibits A549 cell growth in vitro and in vivo[J]. Int J Mol Med, 2013, 32: 271-280

[10] Shen H, Feng GZ, Cui J, et al. Clinical implications of serum hypoxia inducible factor-1α and vascular endothelial growth factor in lung cancer[J]. Tumori, 2015, 101(4): 404-411

[11] 沈红, 崔进, 秦湧, 等. 晚期非小细胞肺癌患者化疗前后血清

HIF-1α 和 VEGF 的变化及临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23 (6): 791-794
Shen Hong, Cui Jin, Qin Yong, et al. Clinical study of the changes of serum HIF-1α and VEGF before and after chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer [J]. Journal of Modern Oncology, 2015, 23(6): 791-794

[12] Jing XG, Chen TF, Huang C, et al. MiR-15a expression analysis in non-small cell lung cancer A549 cells under local hypoxia microenvironment [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21 (9): 2069-2074

[13] Rogoziński P, Bruliński K, Malinowski E, et al. Is the vascular-endothelial growth factor responsible for the malignancy of lung cancer?[J]. Pol Merkur Lekarski, 2012, 33(196): 213-216

[14] Ajdukovic' J. HIF-1: a big chapter in the cancer tale [J]. Exp Oncol, 2016, 38(1): 9-12

[15] Yousefi B, Rahmati M, Ahmadi Y. The roles of p53R2 in cancer progression based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic p21[J]. Life Sci, 2014, 99(1-2): 14-17

[16] Cathcart MC, Gately K, Cummins R, et al. Thromboxane synthase expression and correlation with VEGF and angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(5): 747-755

[17] 郭树鹏, 杨柳, 张莉琳, 等. HIF-1α 信号通路在肿瘤细胞调控中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(16), 3145-3148
Guo Shu-peng, Yang Liu, Zhang Li-lin, et al. Research Progress in Regulation of HIF-1α Signaling Pathways in Cancers [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(16): 3145-3148

[18] Frezzetti D, Gallo M, Maiello MR, et al. VEGF as a potential target in lung cancer[J]. Expert OpinTher Targets, 2017, 21(10): 959-966

[19] Naikoo NA, Dil-Afroze, Rasool R, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF), its role in progression and prognosis of non-small cell lung carcinoma [J]. Cancer Genet, 2017, 216-217: 67-73

[20] 曲耘, 吴荣, 张晓晔. NF-κB/p65 siRNA 对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤细胞凋亡和 Bax 表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(02): 145-148
Qu Yun, Wu Rong, Zhang Xiao-ye. Effects of NF-κB/p65 siRNA on Apoptosis and Bax Expression in Lung Tumour Cell Xenografts of Nude Mouse [J]. Journal of China Medical University, 2017, 46(02): 145-148

[21] Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells [J]. Apoptosis, 2015, 20 (11): 1411-1419

[22] Tian HY, Li ZX, Li HY, et al. Effects of 14 single herbs on the induction of caspase-3 in tumor cells: a brief review [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(8): 636-640

[23] Cui R, Kim T, Fassan M, et al. MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7 [J]. Oncotarget, 2015, 6(26): 21802-21815

[24] 沈红, 朱祎娜, 秦湧, 等. 低氧降低肺腺癌 A549 细胞紫杉醇敏感性及其机制的探讨[J]. 肿瘤, 2017, 37(02): 135-142
Shen Hong, Zhu Yi-na, Qin Yong, et al. Inhibitory effect of hypoxia on chemosensitivity of human lung cancer A549 cells to paclitaxel and its possible mechanism[J]. Tumor, 2017, 37(02): 135-142

[25] 杨士芳, 李晓明, 安弘, 等. HIF-1α 介导了间歇低氧对人肺腺癌 A549 细胞体外生物学行为的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, (11): 1958-1965
Yang Shi-fang, Li Xiao-ming, An Hong, et al. HIF-1α mediates effect of intermittent hypoxia on biological behavior of A549 cells in vitro [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2016, (11): 1958-1965

[26] Gozal D, Farré R, Nieto FJ. Obstructive sleep apnea and cancer: Epidemiologic links and theoretical biological constructs [J]. Sleep Med Rev, 2016, 27: 43-55

（上接第 78 页）

[14] Pacher R, Globits S, Bergler-Klein J, et al. Clinical and neurohumoral response of patients with severe congestive heart failure treated with two different captopril dosages[J]. Eur Heart J, 1993, 14(2): 273-278

[15] McMurray J, Solomon S, Pieper K, et al. The effect of valsartan, captopril, or both on atherosclerotic events after acute myocardial infarction: an analysis of the Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT) [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(4): 726-733

[16] Konstam MA, Neaton JD, Dickstein K, et al. Effects of high-dose versus low-dose losartan on clinical out-comesin patients with heart failure (HEAAL study): a randomised, double-blind trial [J]. Lancet, 2009, 374(9704): 1840-1848

[17] Ishida J, Konishi M, Haehling SV. The appropriate dose of angiotensin-converting-enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers in patients with dilated cardiomyopathy. The higher, the better?[J]. ESC Heart Failure, 2015, 2(4): 103-105

[18] Takai S, Kirimura K, Jin D, et al. Significance of angiotensin II receptor blocker lipophilicities and their protective effect against vascular remodeling [J]. Hypertens Res, 2005, 28(7): 593-600

[19] Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system [J]. Hypertension, 1998, 32(3): 387-392

[20] Orsborne C, Chaggar PS, Shaw SM, et al. The renin- angiotensin-aldosterone system in heart failure for the non-specialist: the past, the present and the future[J]. Postgrad Med J, 2017, 93(1095): 29-37

[21] Sun W, Zhang H, Guo J, et al. Comparison of the Efficacy and Safety of Different ACE Inhibitors in Patients With Chronic Heart Failure: A PRISMA-Compliant Network Meta-Analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(6): 22-25