



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170016

数字出版日期: 2018-04-11; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20180411.1437.004.html>

SMYD3 对氯化钴诱导 T47D 乳腺癌细胞缺氧的影响分析

王 蕾, 董青青, 苗 峙, 徐曼丽, 张同存, 罗学刚

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了探究组蛋白甲基化酶 SMYD3 是否会对氯化钴 (CoCl_2) 诱导乳腺癌细胞缺氧损伤作用产生影响, 采用 MTT 法和流式细胞术检测不同浓度的 CoCl_2 (0、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$) 给药 24 h 以及联合转染过表达质粒使 SMYD3 过表达后对 T47D 细胞的增殖及细胞周期的影响; 实时荧光定量 PCR 法 (Real-time PCR) 检测其对 SMYD3 转录表达的影响情况. MTT 和流式细胞术结果显示: CoCl_2 可剂量依赖性地对 T47D 乳腺癌细胞的增殖产生抑制作用 ($P < 0.01$), 并诱导产生 G0/G1 期细胞周期阻滞 ($P < 0.05$). CoCl_2 可以抑制 SMYD3 的转录 ($P < 0.01$). 利用 siRNA 抑制内源性 SMYD3 表达后同样可诱导细胞发生 G0/G1 期阻滞 ($P < 0.05$), 而转染外源质粒使 SMYD3 过表达则可明显拮抗 CoCl_2 所诱导的 G0/G1 期阻滞及对细胞的杀伤作用. CoCl_2 对 T47D 细胞的周期调控作用可能与抑制 SMYD3 的表达有关, SMYD3 的过表达可提升肿瘤细胞在缺氧环境下的存活能力.

关键词: CoCl_2 ; SMYD3; 乳腺癌; G0/G1 阻滞

中图分类号: R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2018)05-0033-06

Effects of SMYD3 on CoCl_2 -induced Hypoxia in T47D Breast Cancer Cells

WANG Lei, DONG Qingqing, MIAO Zhi, XU Manli, ZHANG Tongcun, LUO Xuegang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This research investigated whether histone methylase SMYD3 could affect hypoxia induced by cobalt chloride (CoCl_2) in breast cancer cells. Effects of different concentration of CoCl_2 (0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h and co-transfection of overexpression plasmid on the proliferation and cell cycle of T47D cells after overexpression of SMYD3 were determined with MTT and Flow Cytometry. The effect of CoCl_2 on the transcriptional level of SMYD3 was analyzed with Real-time PCR. CoCl_2 significantly inhibited the proliferation of T47D cells ($P < 0.01$), and induced cell arrest in the G0/G1 phase ($P < 0.05$), which was consistent with the results of siRNAs-mediated absence of SMYD3 ($P < 0.05$). Furthermore, CoCl_2 could down-regulate the transcription of SMYD3 ($P < 0.01$), and the overexpression of SMYD3 could abolish the effects of CoCl_2 on the proliferation and cell cycle of T47D cells. The regulation of CoCl_2 on cell cycle distribution was correlated with the transcription suppressing of SMYD3. Overexpression of SMYD3 might enhance the ability of cells to adapt to hypoxic environment.

Key words: CoCl_2 ; SMYD3; breast cancer; G0/G1 arrest

乳腺癌是世界高发癌症之一, 是威胁女性生存的首要因素. 目前, 乳腺癌在我国呈现出了发病年龄年轻化、恶性程度不断升高、发病率增加而预后差等特点^[1]. 与其他恶性肿瘤一样, 乳腺癌细胞往往因为增

殖迅速而导致附近组织血管氧供血不足, 并可在缺氧条件下生存, 诱导恶性选择及迁移的发生. 因此, 探究乳腺癌等恶性肿瘤细胞的缺氧应答机制对于相关疾病的临床合理用药及新药研发具有十分重要的理

收稿日期: 2017-02-05; 修回日期: 2017-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31470816, 31300642); 天津市大学生创新创业计划资助项目 (201510057057)

作者简介: 王 蕾 (1992—), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生; 通信作者: 罗学刚, 教授, luoxuegang@hotmail.com

论指导意义.

SMYD3 (SET and MYND domain-containing protein 3) 是 2004 年由日本科学家 Hamamoto 等^[2]发现的组蛋白甲基化酶, 可特异性甲基化组蛋白 H3K4、H4K5、H4K20^[3-5], 并作为转录因子与靶基因启动子上的“CCCTCC”或“GGAGGG”结合, 调控基因转录表达、参与信号转导过程. 研究^[2,6-7]已发现, SMYD3 在乳腺癌、肝癌、结直肠癌、宫颈癌、胃癌等恶性肿瘤中均存在高表达, 并参与细胞增殖、黏附与迁移^[8-11]. 然而, 迄今为止, SMYD3 与肿瘤细胞缺氧应答的关系在国内外均未见报道. 鉴于此, 本文对氯化钴 (CoCl₂) 诱导缺氧损伤情况下, 检测 T47D 乳腺癌细胞的存活、细胞周期以及 SMYD3 转录水平的变化, 并就 SMYD3 过表达对氯化钴作用的影响情况进行了分析与探讨.

1 材料与方 法

1.1 细胞、试剂和主要仪器

人乳腺癌细胞系 T47D 购自上海哈灵生物有限公司, 并在本实验室长期保存. 胎牛血清, 天津康源生物技术有限公司; RPMI-1640 培养基, 美国 Gibco 公司; CoCl₂, 美国 Sigma 公司; Trizol 试剂、M-MLV 逆转录试剂盒, 美国 Invitrogen 公司; SYBR GREEN 染料, 德国 DBI 公司; 青霉素、链霉素、胰酶、MTT、PI 及 RNase A, 北京索莱宝科技有限公司. pcDNA5-TO/TAP-DEST-SMYD3 质粒由美国 OSI 制药公司 Kenneth W. Foreman 博士馈赠^[12].

ABI-Step One™ 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; BD Accuri C6 流式细胞仪, 美国 BD 公司.

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞系 T47D 使用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 在饱和水蒸气、5% CO₂ 恒温培养箱中进行 37 °C 贴壁培养. 待细胞汇合度达到 70%~90% 时, 采用 0.25% 胰酶温和消化传代.

1.3 MTT 法

将细胞以每孔 5×10^3 个细胞的细胞密度种入 96 孔板中, 12 h 后换成无血清的基础培养基, 进行 24 h 细胞归一化处理. 第 2 天, 加入 CoCl₂ 溶液 (终浓度为 0、50、100、200、400 μmol/L), 置于培养箱培养 24 h. 随后, 每孔加入 10 μL 5 mg/mL MTT 溶液, 避光 37 °C 反应 4 h 后随即弃去培养基, 加入 150 μL

DMSO 溶解形成的甲瓖结晶. 在酶标仪中检测 570 nm 波长下的吸光度, 按照式 (1) 计算相对细胞活力.

$$\text{相对细胞活力} = \frac{A_{\text{处理}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{未处理}} - A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 流式细胞术

收集处理组和对照组细胞, 用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 2 次后, 将细胞滴加至 PBS 稀释的 75% 乙醇中固定, -20 °C 静置过夜. 第 2 天, 将固定好的细胞离心收集, 并用 PBS 清洗 2 次后, 加入 500 μL 含 50 μg/mL PI 和 0.1% RNase A 的 PBS 并吹匀, 4 °C 避光染色 30 min 后即可使用流式细胞仪进行检测, 数据由 ModFIT 软件进行分析.

1.5 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

将细胞以 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 种入 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后梯度加入 CoCl₂ 至终浓度为 0、50、100、200、400 μmol/L, 放入培养箱中静置培养 24 h. 第 2 天, 将处理过的细胞加入 1 mL Trizol, 4 °C 下裂解提取 RNA. 取 2 μg 总 RNA 加入 M-MLV 及随机引物, 进行逆转录得到 cDNA, 随后即可进行 PCR. PCR 所用到的引物序列为: GAPDH, 上游 5'-ATTCAACG GCACAGTCAAGG-3', 下游 5'-GCAGAAGGGGCG GAGATGA-3'; SMYD3, 上游 5'-CCCAGTATCTCT TTGCTCAATCAC-3', 下游 5'-ACTTCCAGTGTGCC TTCAGTTC-3'. PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环, 并以 ΔΔCt 法对结果进行计算.

1.6 数据与统计

本文所有实验结果均至少重复 3 次, 实验结果数据以“平均值 ± 标准差”表示, 数据由 Graphpad Prism 5.0 进行统计分析, * 和 ** 分别表示与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$) 和极显著差异 ($P < 0.01$).

2 结果与分析

2.1 CoCl₂ 抑制 T47D 细胞的活力

在加入 CoCl₂ 处理 24 h 后, MTT 法检测 CoCl₂ 对 T47D 细胞的增殖影响情况发现: 随着浓度的增加, T47D 细胞增殖受到明显抑制, 呈现出显著的程度依赖性 (图 1). 在 400 μmol/L CoCl₂ 处理后, 细胞存活率降到了 (58.36 ± 8.31)%, 活细胞数明显低于对照组细胞 ($P < 0.01$), 表明 CoCl₂ 诱导的化学缺氧会对细胞产生损伤, 抑制细胞活力.

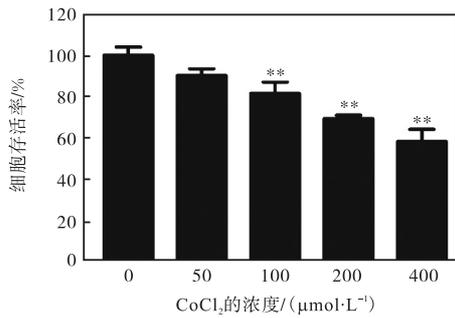


图 1 CoCl₂ 对 T47D 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of CoCl₂ on proliferation of T47D cells

2.2 CoCl₂ 诱导 T47D 细胞产生 G0/G1 期周期阻滞

为进一步探究 CoCl₂ 对 T47D 细胞活力的抑制作用机制, 采用流式细胞术对加药后的细胞周期分布进行了检测, 结果如图 2 所示. 在 0、100、400 μmol/L CoCl₂ 培养 24 h 后, T47D 细胞的 G0/G1 期含量发生

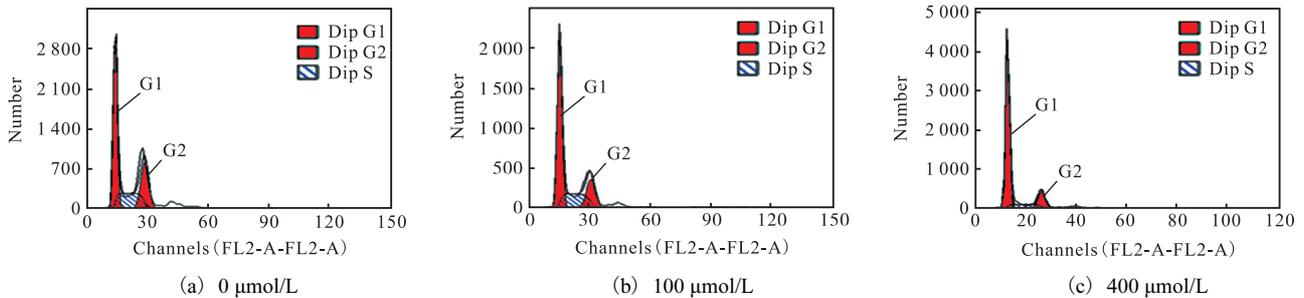


图 2 CoCl₂ 对 T47D 细胞周期的影响

Fig. 2 Influence of CoCl₂ on cell cycle of T47D breast cancer cells

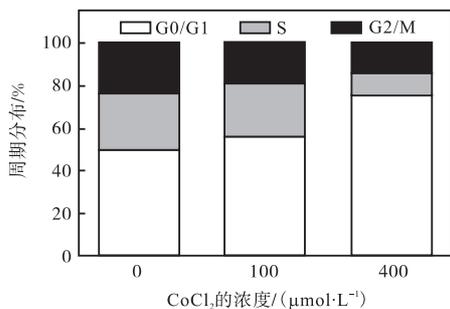


图 3 CoCl₂ 对 T47D 细胞的周期分布比率的影响

Fig. 3 Effect of CoCl₂ on the cell distribution ratio of T47D cells

在此, 首先在本实验所用的雌激素受体阳性乳腺癌细胞 T47D 中就 SMYD3 对细胞周期的影响情况进行了分析, 结果如图 4 和图 5 所示. 用特异性 siRNA 抑制内源 SMYD3 表达后, T47D 细胞同样会发生 G0/G1 期阻滞, 表现出了与 CoCl₂ 处理相类似的现象. 因此, 推测在 CoCl₂ 诱导 T47D 细胞产生 G0/G1 期阻滞、抑制细胞增殖的过程中, SMYD3 很可能也牵涉其中. 为验证这一假设, 通过荧光定量

了不同程度的变化. 随着 CoCl₂ 给药浓度的增加, G0/G1 期细胞峰型面积呈显著的上升趋势, 与对照组细胞相比, 加入 400 μmol/L CoCl₂ 处理 24 h 后, G0/G1 期细胞明显增多 ($P < 0.05$) (图 3), 在总体细胞中所占比例由 (50.32 ± 1.12)% 增至 (75.69 ± 3.58)%, 而 S 期细胞所占比例则由 (26.48 ± 0.75)% 降至 (10.87 ± 0.49)%, 表明 CoCl₂ 能够抑制细胞由 G1 期进入 S 期, 从而影响细胞的复制, 抑制其增殖.

2.3 CoCl₂ 抑制 SMYD3 的转录

前人研究^[10,13]已表明, SMYD3 是雌激素受体重要的辅助因子, 对于乳腺癌细胞的增殖、迁移具有十分重要的作用. Ren 等^[14]在雌激素受体阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中干扰 SMYD3 后发现细胞增殖能力受到明显的抑制, 且细胞周期被阻滞在了 G0/G1 期.

RT-PCR 方法对不同浓度 CoCl₂ 处理后 SMYD3 的 mRNA 水平进行了检测, 结果如图 6 所示.

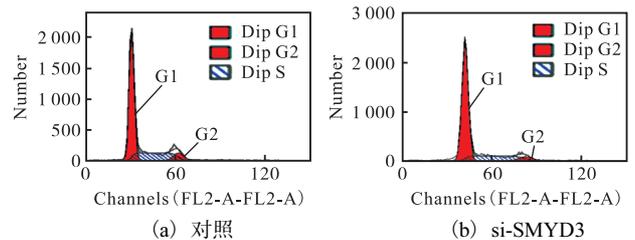


图 4 干扰 SMYD3 诱导 T47D 细胞产生 G0/G1 期阻滞

Fig. 4 SMYD3 absence induced G0/G1 arrest in T47D breast cancer cells

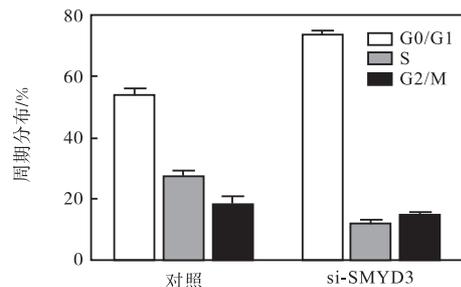


图 5 干扰 SMYD3 周期分布图

Fig. 5 Ratio of cell distribution of SMYD3 absence

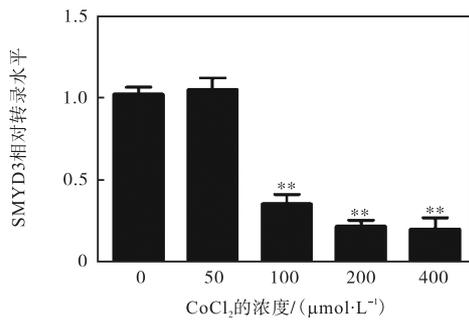


图6 CoCl₂对SMYD3转录的影响

Fig. 6 Effect of CoCl₂ on the transcription of SMYD3

由图6可知:在CoCl₂浓度大于100 μmol/L时,SMYD3的转录水平显著下降($P < 0.01$),至浓度达到400 μmol/L时,SMYD3的mRNA水平降到了对照细胞的1/5左右(0.20 ± 0.12)。

2.4 过表达SMYD3抑制CoCl₂对T47D细胞的作用

从图1—图6结果可以看出,CoCl₂对T47D细胞的缺氧损伤作用很可能与其对SMYD3的转录抑制有关。为进一步验证这一结论,将SMYD3的过表达质粒pcDNA5-TO/TAP-DEST-SMYD3转入T47D细胞使SMYD3过表达(图7),探究其是否可以抵消CoCl₂对细胞的缺氧损伤作用。MTT检测结果显示:与转染空质粒的对照组相比,过表达SMYD3可增强细胞的增殖活力,并抑制CoCl₂对细胞的增殖抑制作用(图8)。

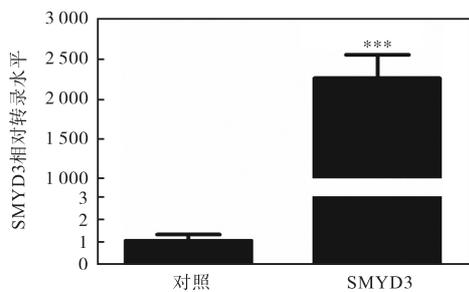


图7 过表达SMYD3的mRNA水平

Fig. 7 The mRNA level of overexpressed SMYD3

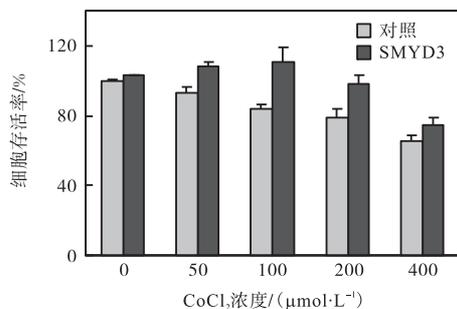


图8 过表达SMYD3抑制CoCl₂诱导的抗增殖作用

Fig. 8 Effect of SMYD3 overexpression on CoCl₂-induced antiproliferation in T47D breast cancer cells

进一步检测细胞周期(图9)发现:在过表达SMYD3与CoCl₂同时给药200 μmol/L时,G₀/G₁期细胞含量(56.05 ± 0.72)%较单过表达SMYD3组(50.98 ± 0.49)%有所升高,但比单加200 μmol/L CoCl₂组(64.21 ± 1.46)%明显降低,周期分布比率见图10。结合MTT结果(图8),这些现象提示SMYD3的过表达可对CoCl₂诱导的缺氧损伤产生一定的保护作用,即SMYD3可提高癌细胞在缺氧条件下的存活能力。

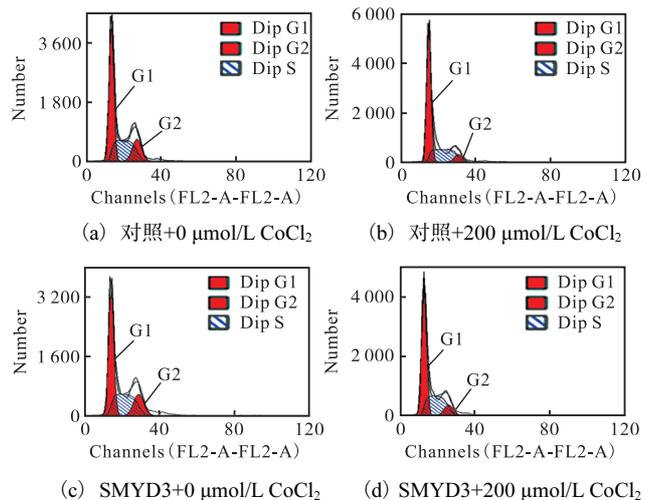
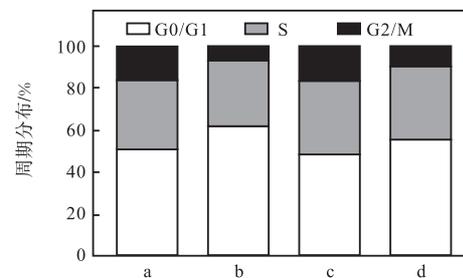


图9 SMYD3对CoCl₂诱导的周期阻滞的影响

Fig. 9 Effect of SMYD3 on CoCl₂-induced cell cycle arrest



a. 对照 + 0 μmol/L CoCl₂; b. 对照 + 200 μmol/L CoCl₂; c. SMYD3 + 0 μmol/L CoCl₂; d. SMYD3 + 200 μmol/L CoCl₂

图10 细胞周期分布比率图

Fig. 10 Ratio of cell cycle distribution

3 讨论

SMYD3已被证实在乳腺癌、肝癌、结直肠癌等多种癌组织中都有异常的高表达,而在相应的正常组织中表达量低^[2],这与肿瘤患者的存活率密切相关^[7, 15]。Ren等^[14]研究表明,敲低SMYD3可以促进乳腺癌细胞产生周期阻滞,抑制其增殖;Tsuge等^[16]认为,SMYD3是RB-E2F信号转导通路中的一个下游靶点,5'-CCGCC-3'序列拷贝数降低将可能降低

SMYD3 与 E2F-1 的亲合力,从而使结肠癌、肝癌和乳腺癌发生率降低;还有研究^[17]表明,SMYD3 通过调控一系列靶基因及信号通路,参与到了肝癌与结肠癌的增殖和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程中,促使肿瘤恶化及转移.此外,本课题组前期研究^[18-19]发现,SMYD3 在肿瘤的发生发展中起重要作用,干扰 SMYD3 可抑制宫颈癌细胞的增殖与迁移^[8];过表达 SMYD3 可上调迁移标志基因 MYL9,与 MRTF-A 协同促进乳腺癌发生迁移^[9].由此可见,SMYD3 已被视为是非常有潜力的肿瘤基因治疗及药物研发新靶点之一.

由于肿瘤细胞增殖迅速,周围组织血管逐渐无法提供足够的氧气,而容易在肿瘤内部形成缺氧微环境.缺氧会对细胞产生杀伤和抑制作用,例如:临床上就有针对局部晚期肿瘤的 SFP(hypoxic antiproliferative stop-flow perfusion)缺氧疗法^[20-21],即通过充气气囊导管将肿瘤与血管隔离,截断肿瘤的血氧供应,从而杀伤肿瘤细胞.然而,在低氧环境下,肿瘤细胞会逐步改善自身基因表达情况,通过增强糖酵解代谢、促进血管新生等方式,提升对缺氧环境的适应能力.这种缺氧微环境及与之相伴随的代谢方式等的改变,是恶性肿瘤细胞中普遍存在的生化特征,被称为瓦博格效应^[22].尽管低氧糖酵解途径较有氧的线粒体氧化磷酸化途径产能效率低,但却可为肿瘤细胞快速提供 ATP 以及细胞分裂增殖所必需的前体物质,同时产生大量乳酸,形成酸性微环境,既可抵御免疫细胞、免疫分子及抗癌药物的杀伤作用,还可分解破坏细胞基质,促进肿瘤细胞浸润和转移.因此,对低氧损伤的耐受能力增强是肿瘤细胞恶性转化、侵袭转移和对放化疗抵抗的重要原因之一.^[23-24]

CoCl₂ 模拟肿瘤细胞低氧环境是体外诱导细胞缺氧的经典模型,研究表明 CoCl₂ 可通过置换脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylases, PHD)辅因子中的 Fe²⁺,阻断氧信号的转导,阻止 HIF-1 α 被羟化,同时影响抑癌基因产物 pVHL 结合 HIF-1 α 氧依赖性降解区域(ODD),从而稳定细胞内 HIF-1 α 的表达,引起一系列细胞对缺氧的反应.因此,CoCl₂ 得到了国内外关于体外缺氧研究的广泛应用^[25-28].在本研究中,通过 CoCl₂ 来诱导缺氧环境,探究缺氧环境对人乳腺癌细胞 T47D 增殖能力及细胞周期的影响机制.结果发现:CoCl₂ 诱导缺氧可引发细胞 G0/G1 期阻滞、抑制癌细胞增殖,这一过程与其对 SMYD3 的转录抑制密切相关,而人为过表达 SMYD3 则可缓解缺氧诱导的 G0/G1 期阻滞及增殖抑制效应.这些结果表明:

SMYD3 对乳腺癌等恶性肿瘤发生发展的推动作用,很可能与其提高细胞对缺氧环境的耐受能力有关.

参考文献:

- [1] 郑莹,吴春晓,张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志,2013,23(8):561-569.
- [2] Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells[J]. Nature Cell Biology, 2004, 6(8):731-740.
- [3] Nagata D E, Ting H A, Cavassani K A, et al. Epigenetic control of Foxp3 by SMYD3 H3K4 histone methyltransferase controls iTreg development and regulates pathogenic T-cell responses during pulmonary viral infection[J]. Mucosal Immunology, 2015, 8(5):1131-1143.
- [4] Vieira F Q, Costa-Pinheiro P, Almeida-Rios D, et al. SMYD3 contributes to a more aggressive phenotype of prostate cancer and targets Cyclin D2 through H4K20me3[J]. Oncotarget, 2015, 6(15):13644-13657.
- [5] Foreman K W, Brown M, Park F, et al. Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3[J]. PLoS One, 2011, 6(7):e22290.
- [6] Luo X G, Zou J N, Wang S Z, et al. Novobiocin decreases SMYD3 expression and inhibits the migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. IUBMB Life, 2010, 62(3):194-199.
- [7] Liu Y, Luo X, Deng J, et al. SMYD3 overexpression was a risk factor in the biological behavior and prognosis of gastric carcinoma[J]. Tumor Biology, 2015, 36(4):2685-2694.
- [8] Wang S Z, Luo X G, Shen J, et al. Knockdown of SMYD3 by RNA interference inhibits cervical carcinoma cell growth and invasion in vitro[J]. BMB Reports, 2008, 41(4):294-299.
- [9] Luo X G, Zhang C L, Zhao W W, et al. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells[J]. Cancer Letters, 2014, 344(1):129-137.
- [10] Hamamoto R, Silva F P, Tsuge M, et al. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells[J]. Cancer Science, 2006, 97(2):113-118.
- [11] Van Aller G S, Reynoird N, Barbash O, et al. SMYD3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation[J]. Epigenetics, 2012, 7(4):340-343.

- [12] Foreman K W, Brown M, Park F, et al. Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3 [J]. PLoS One, 2011, 6 (7) : e22290.
- [13] Kim H, Heo K, Kim J H, et al. Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284 (30) : 19867–19877.
- [14] Ren T N, Wang J S, He Y M, et al. Effects of SMYD3 over-expression on cell cycle acceleration and cell proliferation in MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. Medical Oncology, 2011, 28 (S1) : S91–S98.
- [15] Liu T T, Xu H, Gao W P, et al. SET and MYND domain-containing protein 3 (SMYD3) polymorphism as a risk factor for susceptibility and poor prognosis in ovarian cancer [J]. Medical Science Monitor, 2016, 22 : 5131–5140.
- [16] Tsuge M, Hamamoto R, Silva F P, et al. A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers [J]. Nature Genetics, 2005, 37 (10) : 1104–1107.
- [17] Sarris M E, Moulos P, Haroniti A, et al. SMYD3 is a transcriptional potentiator of multiple cancer-promoting genes and required for liver and colon cancer development [J]. Cancer Cell, 2016, 29 (3) : 354–366.
- [18] 罗学刚, 潘辉, 刘志鹏, 等. SMYD3 在肿瘤发生发展中的作用 [J]. 生命的化学, 2009, 29 (2) : 247–249.
- [19] 罗学刚, 林超, 陆云华, 等. SMYD3 与细胞增殖相关性及其对细胞周期的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38 (3) : 277–282.
- [20] Pilati P, Miotto D, Bertolo S, et al. Hypoxic antiblastic stop-flow perfusion: Clinical outcome and pharmacokinetic findings [J]. Journal of Chemotherapy, 2004, 16 (S5) : 44–47.
- [21] Pilati P, Mocellin S, Miotto D, et al. Hypoxic antiblastic stop-flow limb perfusion: A novel treatment for in transit melanoma metastases. Clinical outcome and pharmacokinetic findings [J]. Oncology Reports, 2004, 12 (4) : 895–901.
- [22] Vander H M, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science, 2009, 324 (5930) : 1029–1033.
- [23] Tennant D A, Duran R V, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy [J]. Nature Reviews Cancer, 2010, 10 (4) : 267–277.
- [24] Buchakjian M R, Kornbluth S. The engine driving the ship: Metabolic steering of cell proliferation and death [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, 11 (10) : 715–727.
- [25] Yang G, Xu S, Peng L, et al. The hypoxia-mimetic agent CoCl₂ induces chemotherapy resistance in LOVO colorectal cancer cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 13 (3) : 2583–2589.
- [26] 青青, 王媛媛, 张绍衡, 等. 结肠癌细胞体外模拟缺氧的相关研究 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31 (1) : 133–137.
- [27] 吴媛媛, 刘海意, 乔福元. 二氯化钴化学缺氧对细胞滋养层细胞凋亡及浸润的影响 [J]. 生殖与避孕, 2009, 29 (6) : 354–359.
- [28] 王敏, 薛同敏, 刘伟, 等. 二氯化钴所致缺氧对 HepG2 细胞增殖抑制和凋亡的影响 [J]. 中华普通外科学文献: 电子版, 2016, 10 (5) : 346–349.

责任编辑: 郎婧