

乏氧环境下 HIF-1 α 对肝癌细胞逆向分化影响的实验研究



黄晶晶^{1,2}, 卢乐¹, 吉鸿¹, 陆宏伟¹

1. 西安交通大学第二附属医院普外科 (西安 710004)
2. 安康市人民医院普通外科 (陕西安康 725000)

【摘要】 目的 探讨体外乏氧环境下低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 对诱导肝癌细胞逆向分化为肝癌干细胞并维持恶性生物学行为的影响。方法 采用免疫磁珠分选出 HepG2 细胞中的 CD133 阴性细胞, 分为 2 个大组: 转染组转染 siRNA-HIF-1 α 以沉默 HIF-1 α 基因的表达, 空白对照组不转染任何 siRNA 片段。2 类细胞分别进行常氧及乏氧条件培养, 本实验共计 4 组。采用 MTT、克隆形成实验及 Trans-well 小室实验检测细胞的增殖和侵袭能力, 采用 Western blot 法及 RT-PCR 法检测细胞中 HIF-1 α 、CD133、CD90 及 CD44 mRNA 及其蛋白的表达。结果 MTT 实验结果显示: 4 组细胞的增殖率随乏氧时间延长而增高; 24 h 及以后, 与空白对照组相比, 经 siRNA-HIF-1 α 转染后, 转染常氧组和乏氧组的细胞增殖率降低 ($P < 0.05$)。平板克隆实验结果显示: 转染常氧组与转染乏氧组、空白对照常氧组与空白对照乏氧组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Transwell 小室实验结果显示: 乏氧培养后, 转染组与空白对照组相比, 迁移至下室的细胞数目减少 ($P < 0.05$)。Western blot 及 RT-PCR 结果显示: 空白对照乏氧组中 HIF-1 α 及肿瘤干细胞标志物 (CD133、CD90、CD44) 蛋白及其 mRNA 的表达水平均高于其余 3 组 ($P < 0.05$); 经 siRNA-HIF-1 α 转染后, 转染乏氧组中 HIF-1 α 及肿瘤干细胞标志物 (CD133、CD90、CD44) 蛋白及 mRNA 的表达水平均较转染常氧组和空白对照常氧组降低 ($P < 0.05$)。结论 在乏氧环境下, 低氧诱导因子 HIF-1 α 可促进肝癌细胞逆向分化为肝癌干细胞并增强其恶性生物学行为。

【关键词】 人肝癌 HepG2 细胞; 肝癌干细胞; 乏氧环境; 低氧诱导因子-1 α ; 逆分化

Effect of HIF-1 α on reverse differentiation of hepatocellular carcinoma cells in hypoxic environment

HUANG Jingjing^{1,2}, LU Le¹, JI Hong¹, LU Hongwei¹

1. Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, P. R. China
2. Department of General Surgery, Ankang People's Hospital, Ankang, Shaanxi 725000, P. R. China

Corresponding author: LU Hongwei, Email: lhwdoc@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) on the reverse differentiation of hepatocellular carcinoma cells into liver cancer stem cells, and the maintenance of malignant biological behavior in hypoxic environment. **Methods** CD133-negative cells in HepG2 cells were separated by immunomagnetic beads and divided into two groups. The cells of siRNA group were transfected with siRNA-HIF-1 α to silence the expression of HIF-1 α gene, while cells of the blank control group did not transfect any siRNA fragments. Two groups of cells were cultured under normal and hypoxic conditions respectively. MTT, cloning and trans-well chamber experiments were used to detect the proliferation and invasion ability of cells. Western blot and real-time PCR (RT-PCR) were used to detect the expression of HIF-1 α , CD133, CD90, and CD44 protein and mRNA in cells. **Results** MTT results showed that the cell proliferation rate increased with the prolongation of hypoxia in four groups. Compared with the control group at 24, 32, 40, and 48 hours, the cell proliferation rate decreased significantly after siRNA-HIF-1 α transfection, on both two kinds of cultured conditions ($P < 0.05$). The results of plate cloning experiment showed that the number of cell-forming

DOI: 10.7507/1007-9424.201807082

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (项目编号: 2014JM2-8189); 西安交通大学第二附属医院科研基金青年项目 [项目编号: YJ (QN) 201113]

通信作者: 陆宏伟, Email: lhwdoc@163.com

clones increased significantly after hypoxic culture (there were significant differences between transfected hypoxic group and transfected hypoxic group, blank control hypoxic group and blank control hypoxic group, $P < 0.05$); and the formation of transfected hypoxic condition group at the same time of hypoxia was also significant ($P < 0.05$). The number of clones were significantly less than that of the blank control group at the hypoxic condition ($P < 0.05$). Transwell lab experiment showed that after hypoxic culture, the number of cells migrated to the inferior chamber in transfection group was significantly reduced compared with that of blank control group ($P < 0.05$). Western blot and RT-PCR results showed that the expression levels of HIF-1 α protein and tumor stem cell markers (CD133, CD90, and CD44 protein) in the blank control hypoxic condition group were significantly higher than those in the other three groups ($P < 0.05$); after siRNA-HIF-1 α transfection, HIF-1 α mRNA and tumor stem cell markers mRNA (CD133, CD90, and CD44 mRNA) in the transfected hypoxic condition group were significantly lower than those in the transfected normal condition group and blank control normal condition group ($P < 0.05$). **Conclusions** In hypoxia environment, hypoxia inducible factor HIF-1 alpha (HIF-1 α) can promote hepatocellular carcinoma cells to differentiate into liver cancer stem cells and enhance their malignant biological behavior.

【Keywords】 hepatocellular carcinoma HepG2 cells; liver cancer stem cells; hypoxia; hypoxia inducible factor-1 alpha; reverse differentiation

原发性肝癌患者中有 91.5% 为肝细胞肝癌, 占我国癌症死亡人数的第 3 位, 是目前较常见的恶性肿瘤之一, 严重危害着人们的健康^[1]。肝细胞肝癌作为高侵袭性的肿瘤, 其增殖和转移是导致肝癌临床治疗效果差和治愈率低的主要原因^[2]。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 被认为是肿瘤发生发展过程中关键的基因之一, 与肿瘤的代谢变化、血管形成、侵袭、转移及耐药性有关, 最终导致临床预后不佳^[3]。迄今 (至 2018 年) 为止, 也有众多试验表明, HIF-1 α 与肝细胞肝癌的预后密切相关^[4-5]。因此, 笔者认为, 在乏氧状态下, 低氧诱导因子 HIF-1 α 可使肝癌细胞转化为肝癌干细胞, 从而促进肝癌的增殖和转移。为此, 笔者通过体外实验的研究方法, 来验证乏氧环境下 HIF-1 α 对肝癌细胞去分化、增殖力和侵袭力变化的影响, 为临床肝癌的治疗提供有力的理论依据及新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料、主要试剂和设备

人肝癌细胞 HepG2 购买自中科院细胞库, DMEM 高糖培养液购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; 免疫磁珠分选所用试剂均购自德国美天旎公司; 各种 PCR 引物由上海生物工程有限公司提供; Trizol、cDNA 逆转录试剂及 SYBR Master Mix 均购自美国 Invitrogen 公司; HIF-1 α 小干扰 RNA (siHIF-1 α) 由广州锐博生物有限公司设计并合成; HIF-1 α 抗体购自美国 Novus 公司; Anti-CD133、Anti-CD44 及 Anti-CD90 抗体均购自英国 abcam 公司; 内参抗体 β -actin 购自武汉三鹰生物有限公司。

1.2 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液培养, 常氧下置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱培养。为了模拟肿瘤内部乏氧微环境, 将细胞置放于 37 °C、5% CO₂ 及 1% O₂ 的低氧箱中培养。

1.3 免疫磁珠分选

常氧条件下取对数生长期细胞 2×10^7 个, 以 buffer 洗涤后, 加入 100 μ L FcR 阻断剂和 100 μ L CD133 MicroBeads, 充分混匀, 4 °C 孵育 30 min 后, 以 buffer 洗涤, 上柱, 收集流下的细胞即为 CD133 阴性细胞。

1.4 siRNA 转染细胞

将筛选后的 CD133 阴性细胞按 4×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板中, 待细胞长至 80% 融合时, 按照 pofecta II line²⁰⁰⁰ 说明书将 siRNA 片段转染于细胞中, 为转染组; 未转染 siRNA 片段的细胞为对照组, 每组均设 5 个复孔, 6 h 后换新鲜培养液继续培养至 48 h 后, 进行下一步实验。

1.5 MTT 法检测细胞增殖能力

取上述转染组及空白对照组 HepG2 细胞接种于 96 孔板中, 按不同实验条件, 包括常氧和乏氧分别处理 8、16、24、32 及 48 h, 加入 MTT 孵育 4 h 后, 再加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 用平板摇床摇匀振荡 10 min, 待细胞完全溶解后, 放入自动酶标仪于 490 nm 波长处读数, 并记录吸光度 (OD) 值, 实验重复 3 次。

1.6 Transwell 小室实验检测细胞迁徙能力

取上述转染组及空白对照组 HepG2 细胞, 分别于常氧和乏氧环境下培养 48 h 后, 将 4 组细胞调

整至 2×10^5 个/mL 后向 Transwell 上室中加入 400 μ L 细胞悬液, 在下室的 24 孔板中加入含 20% FBS 的 DMEM 600 μ L 作为趋化因子。24 h 后用棉签擦去上室细胞, 将下室细胞用 4% 多聚甲醛固定、行 0.1% 结晶紫染色 15 min, 于光镜下随机选取 5 个视野, 计数后取其平均值。

1.7 克隆形成实验

取上述转染组及空白对照组 HepG2 细胞接种于 6 孔板中, 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 10 ~ 14 d, 按不同实验条件分别在常氧和乏氧环境下培养 48 h, 以 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 计数、拍照。所有实验独立重复 3 次。

1.8 蛋白免疫印迹 (western blot) 法检测蛋白表达

取上述转染组及对照组 HepG2 细胞, 分别于常氧和乏氧环境下培养 48 h 后, 获得目的细胞。目的细胞经 PBS 清洗后, 加入含有蛋白酶抑制剂的 SDS 裂解细胞, 沸水浴 10 min, 12 000 g 离心 15 min。经蛋白定量后, 每孔上样量为 30 μ g, 以 β -actin 为内参, 使用 Anti-HIF-1 α 、Anti-CD133、Anti-CD44 及 Anti-CD90 抗体检测目的蛋白, 以 ECL 法曝光显像。

1.9 反转录实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测 mRNA 的表达

取上述转染组及对照组 HepG2 细胞, 分别于常氧和乏氧环境下培养 48 h 后, 以 Trizol 法提取 4 组细胞的总 RNA, 测定 RNA 的浓度及纯度, 逆转录得到 cDNA。置于荧光定量 PCR 仪进行扩增, 反应体系为 20 μ L (具体见试剂盒说明书)。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 60 s, 变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 58 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共扩增 40 个循环。以 β -actin 基因作为内参, 检测 HIF-1 α mRNA、CD133 mRNA、CD44 mRNA 及 CD90 mRNA 的表达。采用 ABI 7900HT 定量 PCR 软件系统, 对结果进行分析。

1.10 统计学方法

实验结果采用 SPSS 17.0 进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组与组之间的比较采用方差分析方法, 两两比较采用 LSD-*t* 检验方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HIF-1 α 对肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移情况的影响

通过 MTT 法检验细胞的增殖情况, 结果显示: 总体而言, 4 组细胞的细胞增殖率随乏氧时间延长而增高; 24 h 及以后, 与空白对照组相比, 经 siRNA-HIF-1 α 转染后, 转染常氧组和乏氧组的细胞

增殖率降低 ($P < 0.05$)。平板克隆实验结果显示: 乏氧培养后, 细胞形成克隆数较同类型细胞常氧培养明显增多 (转染常氧组与转染乏氧组、空白对照常氧组与空白对照乏氧组比较差异均有统计学意义, $P < 0.05$); 且相同乏氧条件下, 转染乏氧组的形成克隆数明显少于空白对照乏氧组 ($F=196.495$, $P < 0.05$)。Transwell 小室实验结果显示: 乏氧培养后, 空白对照组迁移至下室的细胞数目高于其余 3 组 ($P < 0.05$); 乏氧培养后, 转染组迁移至下室的细胞数目高于转染常氧组和空白对照常氧组 ($P < 0.05$)。具体见图 1a-1g。

2.2 HIF-1 α 及肿瘤干细胞标志物蛋白及其 mRNA 的表达

为了验证 HIF-1 α 与肝癌细胞逆向分化为肝癌干细胞的关系, 在乏氧环境下使用 siRNA-HIF-1 α 质粒转染人肝癌 HepG2 细胞, 从而抑制 HIF-1 α 基因的表达。通过 Western blot 及 PCR 方法检测 4 组细胞中 HIF-1 α 及肝癌干细胞标志物 (CD133、CD90 和 CD44) 蛋白及其 mRNA 的表达情况。结果显示: ① HIF-1 α : 空白对照常氧组细胞中 HIF-1 α 的蛋白及其 mRNA 表达水平平均高于转染常氧组及乏氧组 ($P < 0.05$), 且空白对照乏氧组细胞中 HIF-1 α 蛋白及其 mRNA 的表达水平高于其余 3 组 ($P < 0.05$); ② CD133 和 CD90: 空白对照乏氧组细胞中 CD133 和 CD90 蛋白及其 mRNA 的表达水平平均高于其余 3 组 ($P < 0.05$), 且转染乏氧组高于转染常氧组和空白对照常氧组 ($P < 0.05$); ③ CD44: 空白对照乏氧组细胞中 CD44 蛋白及其 mRNA 的表达水平高于其余 3 组 ($P < 0.05$), 但其余 3 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。具体见图 1h-1p。

3 讨论

乏氧治疗是目前治疗肝癌的主要的非手术方法之一^[2,6]。其治疗机理是栓堵住肿瘤的营养血管, 导致肿瘤细胞因缺血缺氧而坏死, 从而达到治疗的目的^[7]。该方法虽然早期疗效显著, 但远期效果并不理想^[2,8]。有研究^[9]证实, 经肝动脉栓塞 (TAE) 后肝癌局部缺氧微环境会导致产生一些具促进肿瘤细胞生物行为向恶性方向转化的活性物质, 如 HIF-1 α 等, 使残存的癌细胞具有更强的增殖和侵袭能力^[10-11]。HIF-1 α 是人体组织在缺氧环境下维持稳态的主要介质之一^[12], 通过增强 β -catenin 的活化和下游效应物淋巴样增强因子-1 (LEF-1) 和转录因子-1 (TCF-1) 的表达来调节缺氧胚胎干细胞 Wnt/ β -catenin 信号的转导, 使肿瘤细胞得以维持其干细胞

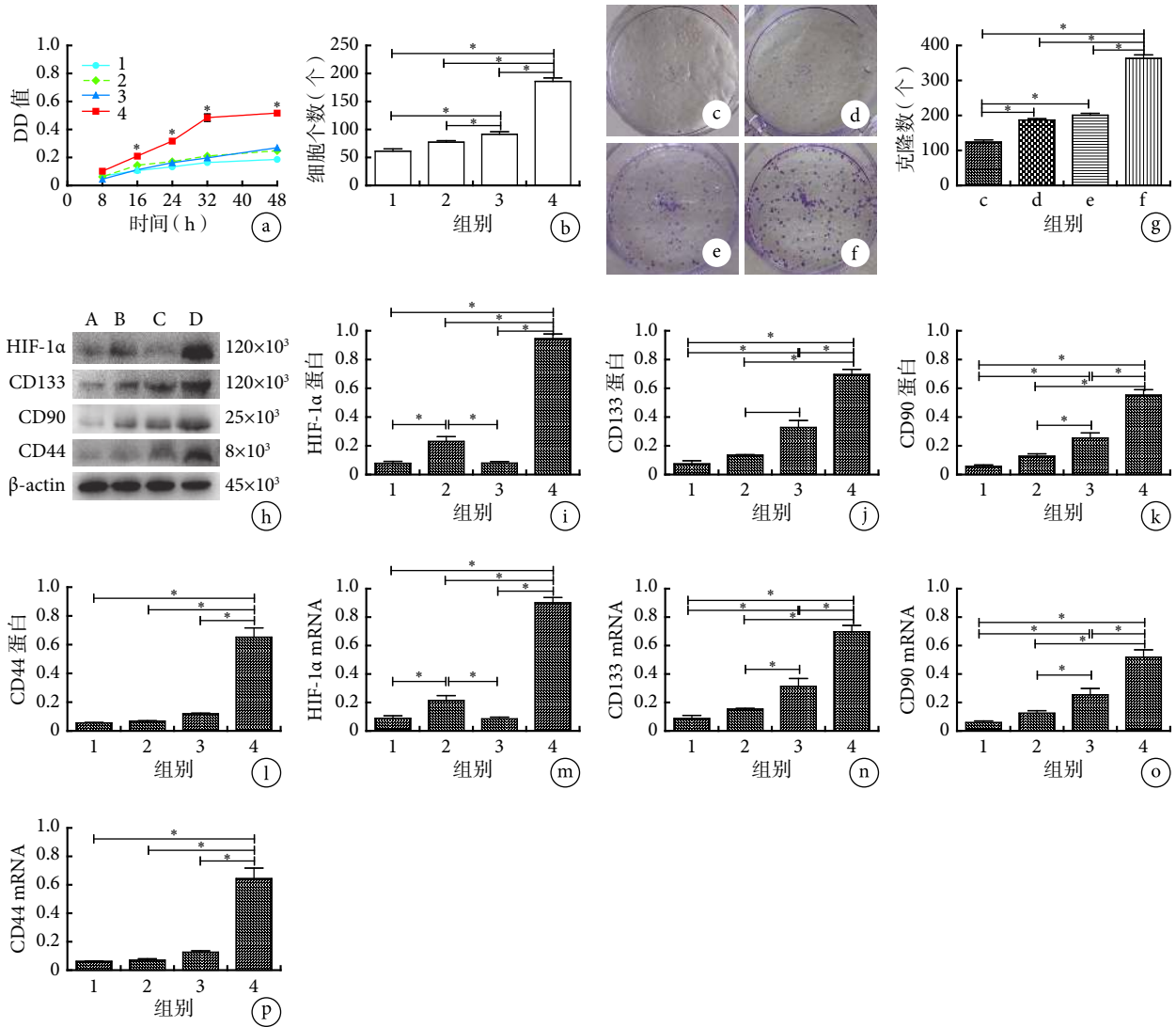


图1 示4组细胞的MTT、Transwell小室迁移实验、克隆形成实验、蛋白免疫印迹及PCR实验结果

a: 4组细胞的增殖曲线, 24 h 及以上, 空白对照常氧组的 OD 值高于其余 3 组 ($P < 0.05$); b: Transwell 小室迁移实验结果; c ~ g: 克隆形成实验染色及结果; h ~ j: 4 组细胞中 HIF-1 α 、CD133、CD90 及 CD44 蛋白的电泳结果 (h) 和表达结果 (i ~ l); m ~ p: 4 组细胞中 HIF-1 α 、CD133、CD90 及 CD44 mRNA 的表达结果; 1: 转染常氧组; 2: 空白对照常氧组; 3: 转染乏氧组; 4: 空白对照乏氧组; * 表示 $P < 0.05$

特性和生物学恶性^[3]。

Wnt 信号通路蛋白是一组细胞内信号蛋白, 在肿瘤细胞生物学恶性的维持中作用明确^[13]。通过与它们受体复合体相互作用的 Wnt 配体结合而激活下游相关效应物, 使 β -catenin 活化并进入细胞核内与 T 细胞因子家族 (TCF4) 的转录因子结合, 然后转录 Cylin D1、c-Myc、Survivin 等目标基因, 使肿瘤细胞的干性和恶性得以维持^[14]。癌细胞的增殖力及侵袭力是最能反映其生物学恶性行为^[15-16]。在本实验中, 笔者发现, 正常乏氧培养后, 即空白对照乏氧组与空白对照常氧组相比, 肝癌 HepG2 细胞的增殖能力和迁移能力明显增强; 但在降低了细胞中 HIF-1 α 基因的表达后, 即转染乏氧组与

空白对照乏氧组相比, 细胞增殖力及迁移力也有了明显的下降, 进而说明, HIF-1 α 可促进肝癌 HepG2 细胞维持其生物学恶性并增加其恶性潜能, 其机制可能与参与 Wnt 信号通路的转导有关。

癌细胞的逆向分化是其恶性表型增加的重要机制, 目前有研究^[17]认为, 该机制与癌细胞获得某些干细胞样表型有关。而乏氧和 HIF-1 α 又是干细胞分化的关键调节因子^[18-19], 其中 HIF-1 α 专门调节所有与干细胞自我更新和分化过程相关的基因和转录因子^[20], 通过与细胞内信号传导蛋白的相互作用, 使干细胞处于未分化状态, 从而增强其恶性潜能^[21]。

近些年, 在对肝癌进行的相关报道中, 已

支持了肝癌干细胞这一理论：包括 CD13、CD44、CD24、CD90、CD133、EpCAM、DLK1、ALDH1 等在内的蛋白均被证实可作为表面标志物来鉴别肝癌干细胞^[22]。本实验通过对 CD133、CD44、CD90 等干细胞表面标志物表达量的检测来检测 HepG2 细胞中肝癌干细胞的数目，发现正常乏氧培养后（即空白对照乏氧组）肝癌干细胞的数目明显有增加。降低 HIF-1 α 的表达后，对应的蛋白和 mRNA 表达均比同条件下的空白对照组降低，其变化趋势与 HIF-1 α 的表达变化趋势基本保持一致。这一结果与 Vadde 等^[23]在探索 HIF-1 α 对于结肠癌细胞恶性和干性维持的作用研究的结论基本吻合。由此可见，乏氧环境下，HIF-1 α 对肝癌细胞逆向分化为肝癌干细胞有着正性作用，其可促使肝癌细胞逆向分化为肝癌干细胞。

缺氧在发育、生理过程和疾病发生、进展中起着重要的作用，它的主要介质是 HIF-1 α ^[24]。HIF-1 α 可通过参与 Wnt 信号通路的转导^[25]，使癌细胞维持干细胞特性和生物学恶性，这一机制已在其他如结肠癌等实体肿瘤中得到证实^[3, 23]，但在肝细胞肝癌中相关报道较为少见。肝癌细胞在乏氧环境中发生去分化，逆向分化为肝癌干细胞，是癌细胞侵袭及转移的一个重要原因。本实验结果表明，HIF-1 α 对肝癌细胞发生去分化有着明确的正向影响，可促使肝癌细胞逆向分化为肝癌干细胞，但其发生的机制目前还尚未明确。在今后的研究中，我们将着重探索 HIF-1 α 在肿瘤发生过程中对干细胞功能调节的途径及机制，为临床治疗肝细胞肝癌提供有效的治疗策略。

参考文献

- 1 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤*, 2017, 26(1): 1-7.
- 2 Raza A, Sood GK. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(15): 4115-4127.
- 3 Yoo YG, Christensen J, Huang LE. HIF-1 α confers aggressive malignant traits on human tumor cells independent of its canonical transcriptional function. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1244-1252.
- 4 Dai CX, Gao Q, Qiu SJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with inflammation, angiogenesis and MYC, is a critical prognostic factor in patients with HCC after surgery. *BMC Cancer*, 2009, 9: 418.
- 5 Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, et al. Prognostic significance of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study. *BMC Cancer*, 2008, 8: 335.
- 6 孙海香, 杨欣荣, 徐泱, 等. 肝癌肝动脉化疗栓塞治疗对缺氧诱导因子 2 α 表达的影响及其临床意义. *中国临床医学*, 2013, 20(1): 8-9.
- 7 Muz B, de la Puente P, Azab F, et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*, 2015, 3: 83-92.
- 8 Chen J, Zhang Y, Cai H, et al. Comparison of the effects of postoperative prophylactic transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and transhepatic arterial infusion (TAI) after hepatectomy for primary liver cancer. *J BUON*, 2018, 23(3): 629-634.
- 9 郝朗松, 张忠民, 伍晓汀. 肿瘤细胞能量代谢机理的研究进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2010, 17(1): 97-101.
- 10 Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA, et al. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: the role of not only HIF-1. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2015, 159(2): 166-177.
- 11 郑见宝, 孙学军, 王伟, 等. HIF-1 α 与 CDX2 在结直肠腺癌组织中的表达及意义. *中国普外基础与临床杂志*, 2010, (12): 1265-1269.
- 12 Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung*, 2009, 96(1): 19-28.
- 13 Holland JD, Klaus A, Garratt AN, et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(2): 254-264.
- 14 Tarapore RS, Siddiqui IA, Mukhtar H. Modulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway by bioactive food components. *Carcinogenesis*, 2012, 33(3): 483-491.
- 15 Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro Oncol*, 2014, 16(12): 1575-1584.
- 16 Brabletz T, Jung A, Spaderna S, et al. Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9): 744-749.
- 17 Danet GH, Pan Y, Luongo JL, et al. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*, 2003, 112(1): 126-135.
- 18 Yun Z, Lin Q. Hypoxia and regulation of cancer cell stemness. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 772: 41-53.
- 19 Wang P, Wan WW, Xiong SL, et al. Cancer stem-like cells can be induced through dedifferentiation under hypoxic conditions in glioma, hepatoma and lung cancer. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 16105.
- 20 Santoyo-Ramos P, Likhatcheva M, García-Zepeda EA, et al. Hypoxia-inducible factors modulate the stemness and malignancy of colon cancer cells by playing opposite roles in canonical Wnt signaling. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112580.
- 21 Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4): 678-685.
- 22 Castelli G, Pelosi E, Testa U. Liver cancer: molecular characterization, clonal evolution and cancer stem cells. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(9): E127.
- 23 Vadde R, Vemula S, Jinka R, et al. Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 113: 22-27.
- 24 Masson N, Ratcliffe PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab*, 2014, 2(1): 3.
- 25 Yuen TJ, Silbereis JC, Griveau A, et al. Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. *Cell*, 2014, 158(2): 383-396.