

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.16.007

高氧对雄激素敏感的前列腺癌细胞移植瘤生长 及其缺氧诱导因子-1 α 表达的影响*

易升明¹ 孙跃喜² 华晶² 李桂圆¹ 赵启成^{1Δ}

(1 同济大学附属同济医院肿瘤科 上海 200086; 2 同济大学附属同济医院急诊科 上海 200086)

摘要 目的:探讨高氧对雄激素敏感的前列腺癌细胞移植瘤生长及其缺氧诱导因子-1 α 表达的影响。**方法:**将前列腺癌前列腺淋巴瘤(LNCaP)细胞接种于36只Foxn1小鼠的双侧腹,并将其随机放置于含氧量不同的气室中并分组如下:缺氧组11例,常氧组16例,高氧组9例。处理28天后进行称重,麻醉处死,从左心室取血样;分离出移植瘤并进行称重。采用Western blotting、免疫荧光分析、血红蛋白测定的方法对各组移植瘤生长、血管生成及血管化、缺氧诱导因子-1(HIF-1 α)表达以及细胞信号转导因子表达进行检测。**结果:**缺氧组的移植瘤生长较常氧组快($P<0.05$);高氧组移植瘤生长与常氧组相比差异不具有统计学意义($P>0.05$)。高氧组移植瘤的HIF-1 α 、血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体2(VEGF-R2)表达均较常氧组高,而缺氧组移植瘤的HIF-1 α 表达与常氧组基本相似。缺氧组移植瘤的血[HB]增长率(175%)高于常氧组(45%)。高氧组的Nrf2的表达水平较常氧组明显增加($P<0.05$)。**结论:**体内高氧诱导HIF-1 α 在LNCaP肿瘤高表达的同时,不会加快肿瘤的生长。

关键词:缺氧诱导因子-1 α ;高氧;缺氧

中图分类号:R730.5; R-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)16-3025-06

Effects of Inner Hyperoxia on the Growth and HIF-1 α Expression of Androgen Sensitive Prostatic Cancer Cell Transplantation Tumor*

YI Sheng-ming¹, SUN Yue-xi², HUA Jing², LI Gui-yuan¹, ZHAO Qi-cheng^{1Δ}

(1 Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200086, China;

2 Department of Emergency, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200086, China)

ABSTRACT Objective: To investigate effects of inner hyperoxia on the growth and HIF-1 α expression of androgen sensitive prostatic cancer cell transplantation tumor. **Methods:** Prostate cancer LNCaP cells were inoculated in the bilateral abdomen of 36 Foxn1 mice, which were placed randomly in the air chamber with disparate oxygen content, including hypoxia group with 11, normoxia group with 16 and hyperoxia group with 9. Mice were weighed and then killed by anaesthesia for blood in left ventricular after 28 days. The transplantation tumor was isolated and weighed as well. The transplantation tumor growth, angiogenesis and vascularization, HIF-1 α expression and cell signal transduction factors of each group were tested by western blotting, immunofluorescence and hemoglobin detection. **Results:** The transplantation tumor of hypoxia group developed more rapidly than the normoxia group ($P<0.05$). The showed no statistical difference was found in the growth of transplantation tumor between normoxia and hyperoxia group ($P>0.05$); the HIF-1 α , VEGF and VEGF-R2 expressions of transplantation tumor in the hyperoxia group were higher than those of the normoxia group ($P<0.05$). However, the HIF-1 α expression of transplantation tumor in hypoxia group was similar to that of the normoxia group. The hemoglobin growth rate (175%) of transplantation tumor in hypoxia group was higher than that of the normoxia group (45%). The Nrf2 expression of hyperoxia group was overtly higher than that of the normoxia group ($P<0.05$). **Conclusions:** High expression level of HIF-1 α was induced by inner hyperoxia, but it could not simultaneously accelerate the tumor growth.

Key words: Hypoxia-inducible factor-1 α ; Hyperoxia; Hypoxia

Chinese Library Classification(CLC): R730.5; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)16-3025-06

前言

缺氧是恶性实体肿瘤化疗和放射治疗抵抗的一个重要原因^[1]。当肿瘤增殖超过毛细血管网氧气的供应速度,可能在肿瘤细胞中形成一个缺氧的微环境,从而启动自适应机制,使其在

面对敌对环境时具有更强的抵抗力,可能转化到细胞快速增长抑制的凋亡过程^[2-5]。有研究显示缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α)过表达以调节适应缺氧是依靠下游基因的氧气传感器的激活才使机体能够生存于缺氧微环境^[6-8]。通过降低氧气吸入使肿瘤细胞缺氧程度增加导致适度的全身性

* 基金项目:上海市科委西医引导项目(134119a6800);上海市自然科学基金项目(13ZR1438300)

作者简介:易升明,男,博士,研究方向:肿瘤,电话:13918022923

Δ 通讯作者:赵启成,男,博士,电话:13916066502

(收稿日期:2017-02-10 接受日期:2017-02-27)

缺氧使前列腺淋巴结癌 (lymph node carcinoma of prostate, LNCaP) 移植瘤的增长率提高近一倍^[9]。但当肿瘤缺氧而 HIF-1 α 不再高表达时, 提示移植瘤生长在非 HIF-1 α 为中心的替代途径中^[10], 氧气在脯氨酰羟化酶反应中的价值表现于 PO₂ 值范围为 40-150 mmHg 时, HIF-1 α 接近泛素化^[11]。有研究者提出高氧能够作为一种有力的手段去阻止 HIF-1 α 蛋白表达衍生改变^[12]。虽然有争议, 但高氧确实在克服某些类型的肿瘤的原发与继发中发挥作用^[13-15]。因此, 本研究通过小鼠体内试验研究低氧和高氧环境对雄激素敏感的前列腺癌 (LNCaP) 细胞生长和 HIF-1 α 表达的影响, 以期前列腺癌的临床治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取七周龄的 Foxn1 小鼠 36 只 (购自北京维通利华实验动物公司, 合格证号 0197119), 体重约 27-30 g, 按照实验室动物指南进行喂养和使用。饮水和垫料均进行高温消毒, 而饲料需经 60℃ 辐照灭菌; 小鼠保持饮水与饮食直到处死前的 24 h, 并保持 12 / 12 h 的光 / 暗周期。动物处理、培训协议和处死模式均经动物处理委员会批准。

1.2 细胞与实验试剂

前列腺癌细胞株: LNCaP 细胞 (购自: 北京协和技术所细胞库); 主要试剂与仪器: 热灭活胎牛血清、L- 谷氨酰胺, RPMI-1640 培养基和胰岛素注射器等 (购自: 南京凯基生物科技公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 LNCaP 细胞 (80-90% 聚集) 均培养在含 10% (V/V) 热灭活胎牛血清和 L- 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基中, 并于 5% CO₂ 中进行培养。

1.3.2 处理 处理第一天, 将 LNCaP 细胞重新悬浮在 3 × 10⁶ / 0.1 mL 终浓度的冰冻胶 (1:1) 中; 并用 26G 胰岛素注射器将其接种在每个小鼠的侧腹; 再将小鼠转移到一个充满混合气体 (N₂ 平衡) 的气室中进行处理。根据含氧量不同进行分组: 含有 10% O₂ 为缺氧组 11 例, 含有 21% O₂ 为常氧组 16 例, 含有 30% O₂ 为高氧组 9 例, 所有组均处理 28 天。

1.3.3 称重 测量所有小鼠的体重及移植瘤体积, 每周三次。称重前预先将低氧和高氧的小鼠转移到一个补偿气室进行厌氧补偿。

1.3.4 处死 处理第 28 天, 将小鼠一一转移到补偿室; 注射 NA 硫喷妥钠加肝素 (500U), 以 10 mg/100 g 体重进行麻醉; 颈

椎脱位处死, 将小鼠从气室取出; 开胸, 从左心室取血样; 解剖将移植瘤迅速分离, 称重; 用液氮冷冻并将其保存在 -80℃ 中。

1.3.5 血红蛋白测定 血红蛋白 (Hb) 的浓度测定: 将 10 μ L 血与 1 mL 德拉布金试剂稀释搅拌; 室温培养 30 min, 并用 1 mL 试管测量当 $\lambda = 540$ nm 时的吸光度; 计算浓度, 假设 $\epsilon = 11.05$ cm⁻¹·mM⁻¹。测量移植瘤和参考器官 (左肾) 组织中的 Hb 含量, 将 10 μ L 提取液与 1 mL 德拉布金试剂稀释, 同上述处理。

1.3.6 Western blot 在 4℃ 环境下对每个活检提取物进行制备。冰冻组织 (50-80 mg) 与包含有 10 mm HEPES, 1.5 mm 氯化镁, 0.5 mm DTT, 0.2 mm PMSF, 10 mm KCl 和蛋白酶抑制剂混合物以 1:3 (w/v) 的比例在玻璃波特调匀, pH 值 7.9, 14000 转离心 20 min, 颗粒悬浮, 14000 转离心 10 min。从离心池提取上清液。

采用考马斯亮蓝法试剂盒测定提取物的蛋白浓度, 每个电泳槽加 70g 蛋白, 通过 SDS-PAGE 分离 (6-8% 丙烯酰胺凝胶)。然后, 蛋白被印迹到硝酸纤维素膜并采用 5% 脱脂奶粉在含有 0.1% 吐温的 Tris 缓冲液生理盐水中封闭 (室温, 1 h)。在 4℃ 环境下, 将膜用一抗孵育过夜, 紧随其后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 (室温, 1 h)。采用的一抗和稀释液有: 兔多克隆抗 HIF-1 α (1:300), 兔多克隆抗血管内皮 (1:400), 小鼠单克隆抗肌动蛋白 (1:10000), 兔多克隆抗 Akt (1:1000), 兔多克隆抗磷酸化蛋白激酶 AKT 抗体 -Ser473 (1:1000), 兔多克隆抗 Nrf2 (1:1000)。二抗为辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG (1:10000) 或抗兔 IgG (1:10000)。采用 LiteAblo 化学发光底物软化孵化膜, 其次用 X 射线胶片曝光进行化学发光检测。通过 Gel Doc 对印迹强度进行量化, 并采集其结果图像。

1.4 统计学分析

计量资料数据以 (MEAN $\pm$ SD) 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析法及 Dunnett 多重比较试验, 计数资料以百分比表示, 采用 X² 检验及 Fisher 精确概率法, 以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的体重增加情况及移植成功率比较

各组小鼠的体重增加情况显示: 常氧组与高氧组的小鼠体重增加量相比差异无统计学意义 (P > 0.05); 缺氧组小鼠的体重增加量小于常氧组和高氧组, 差异具有统计学意义 (P < 0.05)。各组小鼠移植成功率相比, 差异不具有统计学意义 (P > 0.05), 见表 1。因此, 各组移植瘤的相关比较具有可比性。

表 1 各组小鼠的体重增加情况及移植成功率比较

Table 1 Comparison of the weight gain and successful rate of transplantation among different groups of mice

Groups	Number(n)	Weight augmenter(g)	Successful transplant(n)	Rate of Successful transplant(%)
Hypoxia group	11	0.14 $\pm$ 0.39	8	72.7
Normoxia group	16	2.82 $\pm$ 0.48	14	87.5
Hyperoxia group	9	2.56 $\pm$ 0.46*	6	66.7
F/ χ^2	-	119.164	-	1.734
P	-	0.000	-	0.420

注: 与常氧组相比, *P=0.186 > 0.05。

Note: compared with the normoxia group, *P=0.186 > 0.05.

2.2 各组小鼠的移植瘤生长情况比较

三组移植瘤平均体积/体重在不同时间点的变化情况显示:缺氧组的移植瘤生长较常氧组显著增快($P<0.05$),但高氧组在任何时间点检测的移植瘤生长与常氧组相比差异均无统计学意义($P>0.05$),见图 1A。缺氧组移植瘤生长较常氧组和高氧

组都快一倍,与常氧组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$)(图 1B,左)。高氧组移植瘤的重量与常氧组相比(图 1B,右)差异无统计学意义 ($P>0.05$); 缺氧组移植瘤的重量显著高于常氧组 ($P<0.05$)。

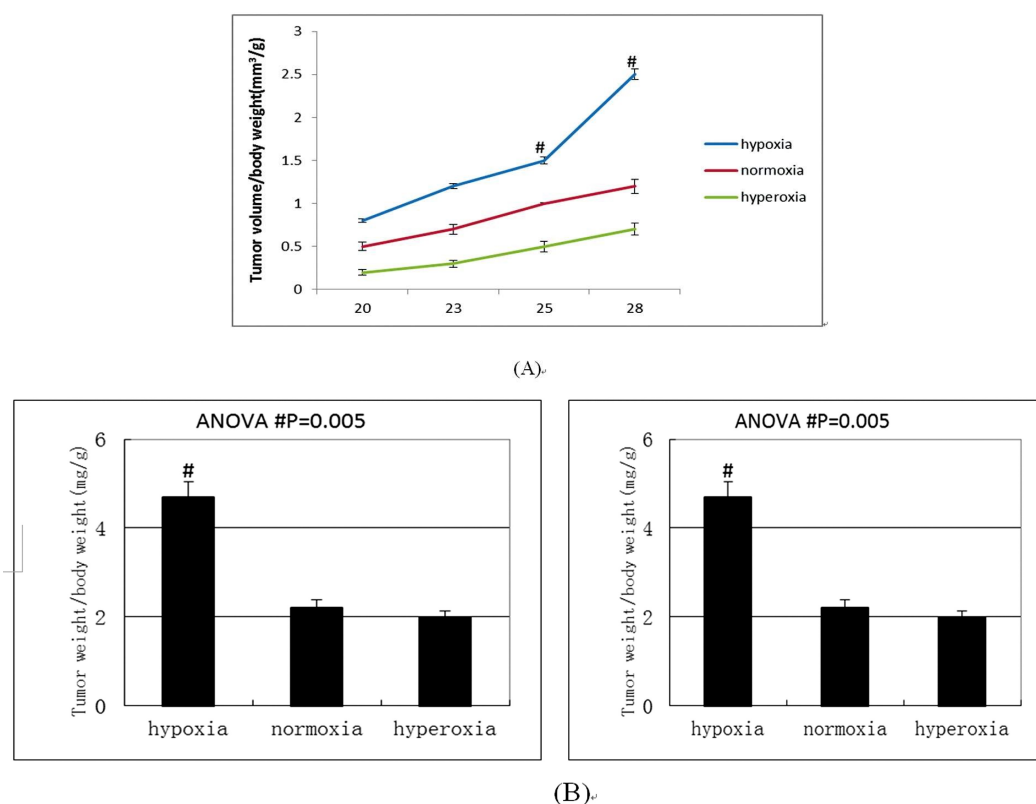


图 1 三组移植瘤生长情况比较

Fig.1 Comparison of the xenografts growth among three groups

注:与常氧组相比, # $P<0.05$ 。

Note: compared with normoxia group, # $P<0.05$.

2.3 各组小鼠的血管生成和血管化相关指标比较

高氧组移植瘤的 VEGF 和 VEGF-R2 表达均较常氧组高 (图 2)($P<0.05$); 缺氧组与常氧组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。缺氧组移植瘤的 Hb 含量均高于常氧组和高氧组(图 3, 左)($P<0.05$)。缺氧组移植瘤的血[Hb]增长率(175%)高于常氧组(45%)(图 3, 中)($P<0.05$)。缺氧组移植瘤组织的 Hb 含量与左肾的 Hb 含量相比增加了 100%(图 3, 右)。

2.4 各组小鼠移植瘤的 HIF-1 α 、Nrf2 和磷酸化 Akt 表达比较

高氧组移植瘤的 HIF-1 α 较常氧组显著增加, 而缺氧组移植瘤的 HIF-1 α 表达与常氧组比较差异无统计学意义 (图 4B), 图 4A。高氧组 Nrf2 的表达水平较常氧组明显增加[(图 5A)和 (图 5B, 左)]。缺氧组的 Akt 活性高于常氧组和高氧组, 但三组 Akt 表达总量基本保持不变(图 5B, 右)。

3 讨论

有研究报道高氧通过增加细胞凋亡和降低血管密度可以降低大鼠乳腺肿瘤和胶质瘤的肿瘤增长^[16], 高压氧治疗也会诱导多分化和低侵袭性肿瘤的上皮间质细胞转录, 从而使肿瘤生长减弱^[17-19]。而高氧对于注射 PC3 前列腺癌细胞的小鼠无影响^[20]。

本研究中, 缺氧组的裸鼠体内 LNCaP 细胞移植瘤生长较常氧组快一倍, 而高氧组小鼠体内移植瘤生长与常氧组基本一致。此外, 高氧组移植瘤 HIF-1 α 表达水平高于缺氧组。这些结果提示体内高氧可以诱导 LNCaP 细胞移植瘤 HIF-1 α 水平的增长但不影响移植瘤的生长速度。高氧组移植瘤部分 HIF-1 α 和 VEGF 表达增加, 可能与高氧诱导血管收缩使血流量减少引起局部缺氧有关。

VEGF/VEGF-R2 信号通路是公认的一个最突出的肿瘤促进途径^[21]。缺氧可轻微诱导 VEGF-R2, 而高氧可通过刺激 HIF-1 α 的表达对 VEGF 和 VEGF-R2 具有较大的调节, 可增加激活的 VEGF/VEGF-R2 通路^[22]。然而, VEGF/VEGF-R2 信号通道活性增加与移植瘤 Hb 含量增加无关。因此, 高氧组移植瘤 VEGF 和 VEGF-R2 呈高表达, 而其 Hb 含量较缺氧组低。

HIF-1 α 在包括前列腺癌在内的实体恶性肿瘤发展过程中具有关键作用, 其表达上调是前列腺癌早期和癌症发展促进血管生成的表现^[23]。有研究表明地高辛和拓扑替康作为 HIF-1 α 抑制剂未能显示其显著的抗肿瘤作用^[24]; 在 LNCaP 细胞急性缺氧时, HIF-1 α 呈高表达, 随着时间进程, 其表达会恢复到正常水平甚至低表达水平^[25]。因此, 仅依靠 HIF-1 α 抑制剂的抗

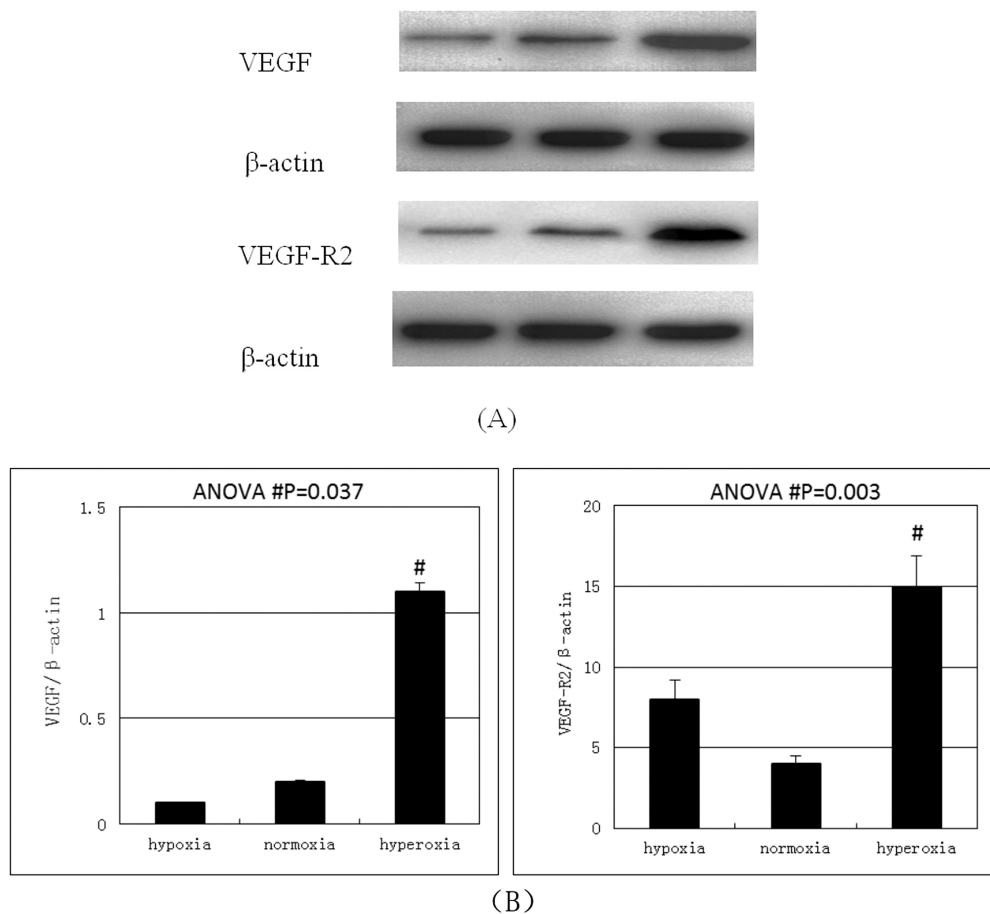


图2 三组移植瘤 VEGF 和 VEGF-R2 表达情况比较

Fig.2 Comparison with the expression of VEGF and VEGF-R2 in the xenografts among three groups

注:与常氧组相比, #P<0.05。

Note: compared with normoxia group, #P<0.05.

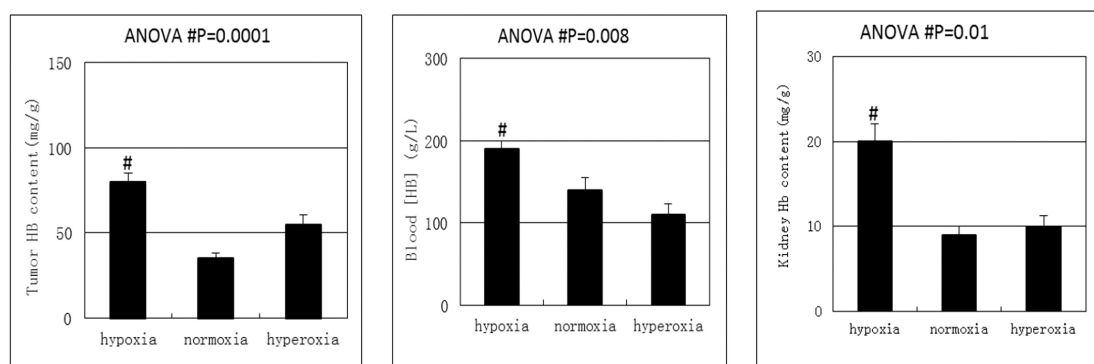


图3 三组移植瘤 Hb 含量的比较

Fig. 3 Comparison of the Hb content among three groups

注:与常氧组相比, #P<0.05

Note: compared with normoxia group, #P<0.05.

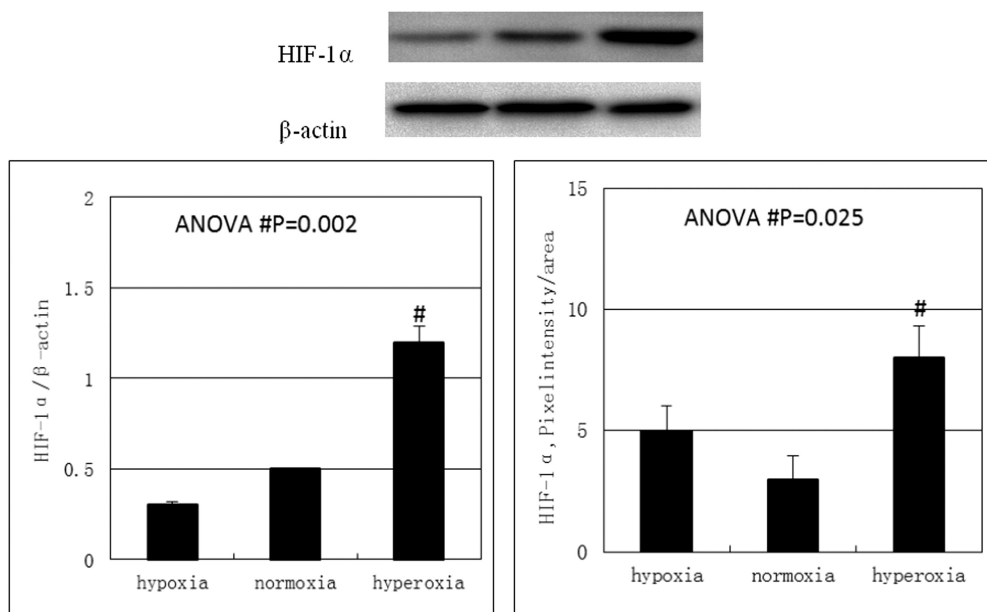
瘤治疗有可能是无效的。

Akt 的活化是缺氧环境下细胞存活的标志^[26], 缺氧组的 Akt 活性高于常氧组和高氧组, 提示前列腺癌细胞中缺氧诱导移植瘤生长加快与 Akt 活化的增加之间有一定联系。Nrf2 蛋白是一种可激活抗氧化反应的转录因子^[27], 因其具有解除细胞环境毒性的能力而被认为是一种肿瘤抑制物^[28]。本研究结果显示高氧组 Nrf2 的表达水平明显增加, 表明高氧细胞具有较强

的抗氧化应答能力, 高氧使体内氧化还原反应失衡。肺上皮细胞高氧可通过 PI3K/Akt 信号刺激 Nrf2 转录应答^[29]。本研究中高氧移植瘤 Nrf2 过度表达与缺氧移植瘤 Akt 高表达不一致。这可能因为 ROS 的两种相分歧的作用^[30]: 在低表达中 ROS 作为 Akt 激活物(如: 缺氧), 然而在高表达中它们的毒性效应变为优势(如: 高氧), 从而导致 Akt 失活。

综上所述, 高氧可诱导 HIF-1 α 在 LNCaP 细胞中高表达而

(A)

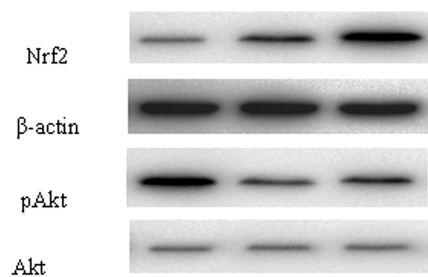


(B)

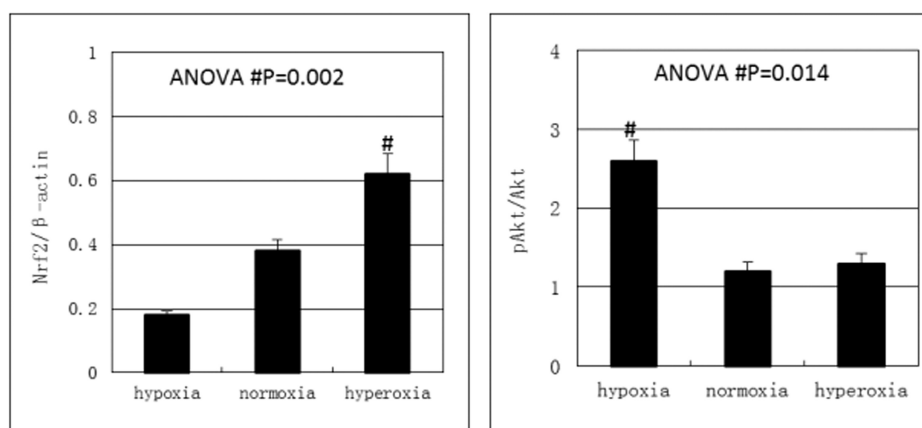
图 4 三组小鼠移植瘤 HIF-1 α 表达的比较Fig. 4 Comparison with the expression of HIF-1 α in the xenografts among three groups

注:与常氧组相比, #P<0.05。

Note: compared with normoxia group, #P the xenografts among three groups<0.05.



(A)



(B)

图 5 三组移植瘤 Nrf2、p-Akt 表达情况的比较

Fig. 5 Comparison with the expressions of cell Nrf2, p-Akt in in the xenografts among three groups

注:与常氧组相比, #P<0.05。

Note: compared with normoxia group, #P<0.05.

不影响移植瘤的生长速度,通过体内高氧化还原反应失衡和涉及细胞增殖通路的复杂的相互作用以抑制体内缺氧和血管生成信号。

参考文献(References)

- [1] Bayer C, Vaupel P. Acute versus chronic hypoxia in tumors [J]. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2012, 188(7): 616-627
- [2] Schilling D, Bayer C, Emmerich K, et al. Basal HIF-1 α expression levels are not predictive for radiosensitivity of human cancer cell lines [J]. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft* [et al], 2012, 188(4): 353
- [3] Bourdeau-Heller J, Oberley T D. Prostate carcinoma cells selected by long-term exposure to reduced oxygen tension show remarkable biochemical plasticity via modulation of superoxide, HIF-1 α levels, and energy metabolism [J]. *Journal of cellular physiology*, 2007, 212(3): 744-752
- [4] Chen H-H, Chen Y-T, Huang Y-W, et al. 4-Ketopinoresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52(6): 1054-1066
- [5] Li Z, Liu W, Kang Z, et al. Mechanism of hyperbaric oxygen preconditioning in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Brain Research*, 2008, 1196(4): 151-156
- [6] Tarhonskaya H, Chowdhury R, Leung I K, et al. Investigating the contribution of the active site environment to the slow reaction of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain 2 with oxygen[J]. *Biochemical Journal*, 2014, 463(3): 363
- [7] Doguchi H, Saio M, Kuniyoshi S, et al. The enhancing effects of hyperbaric oxygen on mouse skin carcinogenesis [J]. *Journal of Toxicologic Pathology*, 2014, 27(1): 67-72
- [8] Acute hypoxia increases the aggressive characteristics and survival properties of prostate cancer cells (p 58-67)[J]. *Prostate*, 2010, 54(1): 58-67
- [9] Ghosh P M, Malik S N, Bedolla R G, et al. Signal transduction pathways in androgen-dependent and-independent prostate cancer cell proliferation[J]. *Endocrine-related cancer*, 2005, 12(1): 119-134
- [10] Jung H J, Shim J S, Lee J, et al. Terpestacin inhibits tumor angiogenesis by targeting UQCRB of mitochondrial complex III and suppressing hypoxia-induced reactive oxygen species production and cellular oxygen sensing [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(15): 11584-11595
- [11] Hammarsten P, Cipriano M, Josefsson A, et al. Phospho-Akt immunoreactivity in prostate cancer: relationship to disease severity and outcome, Ki67 and phosphorylated EGFR expression [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e47994
- [12] Hussain A R, Uddin S, Bu R, et al. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24703
- [13] Khanna S, Roy S, Maurer M, et al. Oxygen-sensitive reset of hypoxia-inducible factor transactivation response: prolyl hydroxylases tune the biological normoxic set point [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(12): 2147-2154
- [14] Kim T-H, Hur E-g, Kang S-J, et al. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 α [J]. *Cancer research*, 2011, 71(6): 2260-2275
- [15] Liu X, Zhu W, Guan S, et al. Metabolomic analysis of anti-hypoxia and anti-anxiety effects of Fu Fang Jin Jing Oral Liquid [J]. *Plos One*, 2013, 8(8): e78281
- [16] Kummar S, Raffeld M, Juwara L, et al. Multihistology, target-driven pilot trial of oral topotecan as an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α in advanced solid tumors [J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(15): 5123-5131
- [17] Malec V, Gottschald O R, Li S, et al. HIF-1 α signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 48(12): 1626-1635
- [18] Marignol L, Roverafigueroa K, Lynch T, et al. Hypoxia, notch signalling, and prostate cancer [J]. *Nature Reviews Urology*, 2013, 10(7): 405-13
- [19] Milosevic M, Warde P, Mé nard C, et al. Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(7): 2108-2114
- [20] Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming [J]. *Cancer cell*, 2012, 22(1): 66-79
- [21] Moen I, Øyan A M, Kalland K-H, et al. Hyperoxic treatment induces mesenchymal-to-epithelial transition in a rat adenocarcinoma model [J]. *PLoS One*, 2009, 4: e6381
- [22] Murayama C, Kawaguchi A T, Ishikawa K, et al. Liposome-Encapsulated Hemoglobin Ameliorates Tumor Hypoxia and Enhances Radiation Therapy to Suppress Tumor Growth in Mice [J]. *Artificial organs*, 2012, 36(2): 170-177
- [23] Osburn W O, Kensler T W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults [J]. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2008, 659 (1): 31-39
- [24] Xu Y, Duan C, Kuang Z, et al. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin activates NRF2-ARE-mediated transcriptional response via the ROS-EGFR-PI3K-AKT/MEK-ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells[J]. *Plos One*, 2013, 8(8): e72528
- [25] Raa A, Stansberg C, Steen V M, et al. Hyperoxia retards growth and induces apoptosis and loss of glands and blood vessels in DMBA-induced rat mammary tumors[J]. *BMC cancer*, 2007, 7(1): 23
- [26] Jung S-N, Yang W K, Kim J, et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4): 713-721
- [27] Guyader C, C Raline J, Gravier E, et al. Risk of Hormone Escape in a Human Prostate Cancer Model Depends on Therapy Modalities and Can Be Reduced by Tyrosine Kinase Inhibitors [J]. *PloS one*, 2012, 7(8): e42252