

## · 研究论文 ·

## 西黄丸下调 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 信号通路抑制脑胶质瘤细胞血管生成拟态形成的作用及其机制

张其海<sup>1#</sup>, 余卓伦<sup>1#</sup>, 樊昊雯<sup>1</sup>, 潘晶<sup>1</sup>, 王霞<sup>2\*</sup>, 徐宏彬<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学第二附属医院, 江苏 南京 210017; 2. 南京中医药大学第二附属医院 (江苏省第二中医院), 江苏 南京 210017)

**摘要:** 探究西黄丸含药血清调控低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )/血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)/血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 信号通路, 抑制脑胶质瘤细胞血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 形成的作用及机制。采用对雄性 SD 大鼠连续灌胃给药 7 天, 制备西黄丸含药血清 (动物实验伦理审批号: 202105A051)。采用 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CoCl<sub>2</sub> 构建 U251 细胞低氧模型, 给予西黄丸含药血清后, CCK-8 法、细胞克隆实验检测 U251 细胞活力和增殖情况; 流式细胞术检测 U251 细胞凋亡及周期; 细胞划痕愈合、Transwell 侵袭实验检测 U251 细胞的迁移与侵袭能力; 3D 细胞培养检测 U251 细胞 VM 的形成情况; Western blot 法检测 U251 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、VEGFR2、磷酸化 VEGFR2 (phosphorylated-VEGFR2, p-VEGFR2)、血管内皮钙黏着蛋白 (vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin)、Eph 受体酪氨酸激酶 A2 (Eph receptor tyrosine kinases A2, EphA2)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2)、基质金属蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase 14, MMP14) 和层黏连蛋白  $\gamma$ 2 (laminin  $\gamma$ 2) 等蛋白表达水平。结果显示, 低氧状态下, 10% 西黄丸含药血清对 U251 细胞活力、增殖、凋亡和细胞周期影响较小。与低氧模型组相比, 10% 1.0、1.5 和 2.0 h 组西黄丸含药血清均显著减慢 U251 细胞的迁移速率 ( $P < 0.01$ ), 显著减少侵袭的 U251 细胞数量 ( $P < 0.01$ )。10% 2.0 h 组西黄丸含药血清显著抑制低氧状态下 U251 细胞的 VM 管状结构形成 ( $P < 0.01$ )。Western blot 实验显示, 10% 西黄丸含药血清显著下调 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、phospho-VEGFR2、VE-cadherin、EphA2、MMP14 等蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。综上所述, 西黄丸可通过下调 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 信号通路, 抑制脑胶质瘤 U251 细胞 VM 形成, 发挥抗血管生成的作用。

**关键词:** 西黄丸; 含药血清; 脑胶质瘤; U251 细胞; 血管生成拟态

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1256-11

## The effect and mechanism of Xihuang pill inhibits the formation of vasculogenic mimicry in human glioblastoma cells by down-regulating HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 signaling pathway

ZHANG Qi-hai<sup>1#</sup>, YU Zhuo-lun<sup>1#</sup>, FAN Hao-wen<sup>1</sup>, PAN Jing<sup>1</sup>, WANG Xia<sup>2\*</sup>, XU Hong-bin<sup>1\*</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210017, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine (Jiangsu Second Chinese Medicine Hospital), Nanjing 210017, China)

**Abstract:** Our studies were aimed to explore the effect and mechanism of the inhibition of the formation of

收稿日期: 2022-08-24; 修回日期: 2022-12-29.

基金项目: 江苏省卫生健康委医学科研重点项目 (ZD2021031); 2021 年江苏省研究生培养创新工程研究生科研与实践创新计划 (SJCX21\_0671).

#共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-25-83291119, E-mail: 20113065@njucm.edu.cn;

Tel: 86-25-83292443, E-mail: xuhongbin@njucm.edu.cn; jiang\_rh@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1016

vasculogenic mimicry (VM) in human glioblastoma cells by Xihuang pill (XHP) medicated serum through regulating the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )/vascular endothelial growth factor A (VEGFA)/vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) signaling pathway. The medicated serum of XHP was prepared by gavage for 7 days to male SD rats (approval number of animal experiment ethics: 202105A051). The hypoxia model of U251 cells was established using 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\text{CoCl}_2$ . After treatment with XHP-medicated serum, cell viability and proliferation of U251 cells were detected by CCK-8 and cell cloning experiment. Cell apoptosis and cell cycle of U251 cells were determined by flow cytometry. Cell migration and invasion were evaluated by wound healing and Transwell invasion assay. The formation of VM was assessed by three-dimensional cell culture of U251 cells. The protein expression levels of HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, VEGFR2, phosphorylated-VEGFR2 (p-VEGFR2), vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin), Eph receptor tyrosine kinases A2 (EphA2), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), matrix metalloproteinase 14 (MMP14) and laminin  $\gamma$ 2 in U251 cells were detected by Western blot. The results showed that 10% XHP-medicated serum had little effect on the cell viability, proliferation, apoptosis and cell cycle of U251 cells under hypoxia. Compared with the model group, 10% XHP-medicated serum at 1.0, 1.5 and 2.0 h significantly decreased the migration rate ( $P < 0.01$ ) and the number of invading U251 cells ( $P < 0.01$ ). 10% XHP-medicated serum at 2.0 h significantly suppressed the formation of VM tubular structures in U251 cells under the condition of hypoxia ( $P < 0.01$ ). Western blot experiment showed that 10% XHP-medicated serum significantly down-regulated the expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, phospho-VEGFR2, VE-cadherin, EphA2 and MMP14 proteins ( $P < 0.05$ ). In conclusion, XHP could inhibit the formation of VM in human glioblastoma U251 cells to suppress the angiogenesis by down-regulating the HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 signaling pathway.

**Key words:** Xihuang pill; medicated serum; glioma; human glioblastoma U251 cell; vasculogenic mimicry

脑胶质瘤起源于神经胶质细胞, 是较常见的高度侵袭性恶性脑肿瘤, 具有发展迅速、预后差、死亡率高等特点。临床上, 脑胶质瘤治疗主要为手术和术后辅助放疗, 但是多数患者对传统治疗方法不敏感, 预后较差<sup>[1-3]</sup>。目前, 脑胶质瘤的治疗策略主要包括诱导细胞凋亡和抗血管生成, 进而抑制肿瘤增殖和转移两方面。血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 是恶性肿瘤早期适应缺氧, 不依赖于传统血管内皮细胞的肿瘤细胞自身形态改变, 结合细胞外基质重塑形成的新型血管样结构, 这标志着肿瘤血管形成的开始。脑胶质瘤恶化过程中存在着 VM 形成现象, 且肿瘤恶性程度越高, VM 进展越快、现象越显著<sup>[4,5]</sup>。研究表明, 低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )/血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)/血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 信号通路在促进脑胶质瘤 VM 形成中起重要作用, 低氧环境可上调脑胶质瘤细胞 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 蛋白表达, 诱导 VM 形成<sup>[5-11]</sup>。

西黄丸始载于《外科证治全生集》, 由牛黄、麝香、乳香、没药组成, 具有清热解毒、活血祛瘀和化结散瘀之功, 临床上常用于恶性肿瘤的辅助治疗<sup>[12]</sup>。西黄丸可改善脑胶质瘤患者的临床症状, 提高生活质量<sup>[13]</sup>。研究表明, 西黄丸通过抑制 U87 细胞中丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (protein kinase B, PKB, Akt)/哺乳类动物雷帕霉素靶点 (mammalian target of rapamycin, mTOR)/头框转录因子 O 亚族 1 (FOXO1) 信号通路从而促进细

胞凋亡<sup>[14]</sup>。亦有研究证明, 西黄丸及主要药味麝香和牛黄通过抑制人前列腺癌 PC-3 细胞中异常激活的磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt/mTOR 信号通路, 促进细胞凋亡, 抑制 PC-3 荷瘤小鼠的皮下移植瘤生长的作用<sup>[15]</sup>。此外, 西黄丸含药血清显著促进乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-435 和 MCF-7 细胞凋亡, 抑制细胞增殖和迁移<sup>[16,17]</sup>。

本课题组前期研究发现, 西黄丸可显著诱导 U251 和 U87 细胞凋亡, 抑制裸鼠异位移植瘤生长, 协同增强替莫唑胺的抗胶质瘤作用<sup>[18]</sup>。然而, 西黄丸是否可通过调控 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 信号通路, 抑制脑胶质瘤细胞 VM 形成尚不清晰。故本文拟构建 U251 细胞低氧模型, 研究西黄丸含药血清调控 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 信号通路对 VM 形成的影响, 旨在探究西黄丸对脑胶质瘤抗血管生成治疗的作用及其机制, 为临床中西药联合抗胶质瘤血管生成提供依据。

## 材料与方法

**实验材料** 西黄丸 (北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号: 19041288);  $\text{CoCl}_2$  (美国 Sigma-Aldrich 公司, BCBX0741); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 8121211); 胎牛血清 (中国 ExCell Bio 公司, 12A028); CCK-8 试剂盒 (上海点创生物, DC12988); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (040921210609)、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (090921220209)、BCA 试剂盒 (122120210621)、钙黄绿素 AM 染料 (01122220415)、结

晶紫溶液 (111621220209)、D-PBS (050122220505)、RIPA 裂解液 (062422220721)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (030922220713)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (012422220623) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; Matrigel Matrix 基质胶 (0281002)、Transwell 小室 (00721067) 均购自美国 Corning 公司; FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD Biosciences 公司, 1324995); 预染蛋白 Marker (美国 Thermo 公司, 01061725); Immobilon-NC 转印膜 (德国 Millipore 公司, R1NB70185); 血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 抗体 (#ab52917)、血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 抗体 (#ab134191)、基质金属蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase 14, MMP14) 抗体 (#ab51074)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 抗体 (#ab92536) 购自英国 Abcam 公司; 磷酸化血管内皮生长因子受体 2 (phosphorylated-VEGFR2, p-VEGFR2) 抗体 (#2478T)、血管内皮钙黏着蛋白 (vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin) 抗体 (#2500T)、Eph 受体酪氨酸激酶 A2 (Eph receptor tyrosine kinases A2, EphA2) 抗体 (#6997T)、 $\beta$ -肌动蛋白 (beta actin,  $\beta$ -actin) 抗体 (#3700S) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; HIF-1 $\alpha$  抗体 (成都正能生物技术有限责任公司, #340462); 层黏连蛋白  $\gamma$  2 (laminin  $\gamma$  2) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, #sc-28330); HRP goat anti-rabbit IgG (#AS014) 和 HRP goat anti-mouse IgG (#AS013) 均购自武汉 Abclonal 公司。

Forma 3111 二氧化碳培养箱、MSC-advantage 12 生物安全柜 (美国 ThermoFisher 公司); DMi8 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); HYQ-3110 涡旋混匀器 (美国 Crystal 公司); TDL-80-2B 低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); HH-ZK1 电热恒温水浴锅 (上海科升仪器有限公司); Infinite 200 PRO 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 功能); Gallios 流式细胞仪 (美国 Beckman 功能); 5200 全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

**西黄丸含药血清的制备** 取西黄丸适量, 置于研钵中研磨成粉末, 加 0.5% 羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na) 溶液溶解成浓度为 0.216 g·mL<sup>-1</sup> 西黄丸混悬液。

SPF 级雄性 SD 大鼠 (6~8 周龄, 200~240 g) 购自于南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 动物许可证号: SCXK (浙) 2019-0002, 动物实验伦理审批号: 202105A051。所有动物均分笼饲养于南京中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室, 饲养条件为: 12 h 光照和 12 h 黑夜循环, 恒温恒湿。取 36 只雄性 SD 大鼠适

应性饲养 5 天后, 随机分为 4 组, 即对照组、1.0、1.5、2.0 h 组。空白组灌胃给予 0.5% CMC-Na 混悬液, 其余各组灌胃给予 0.216 g·mL<sup>-1</sup> 的西黄丸混悬液, 给药体积为 5 mL·kg<sup>-1</sup>, 即给药剂量为 1.08 g·kg<sup>-1</sup>, 4 倍临床剂量 (每次 3 g, 1 天 2 次)。连续灌胃 7 天, 给药频率为 12 h。第 7 天首次灌胃后, 禁食且自由饮水 12 h, 分别于末次给药后 0、1、1.5、2 h, 戊巴比妥钠麻醉, 打开腹腔, 腹主动脉取血, 室温静置 15 min, 4 °C、12 000 ×g 离心 10 min, 吸取上层血清转移至 1.5 mL EP 管中。将血清置于 56 °C 水浴锅中灭活 30 min, 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 分装保存于 -80 °C 冰箱中。

**细胞培养与 CCK-8 检测 U251 细胞活力** U251 细胞以含有 10% 胎牛血清、青霉素 (100 u·mL<sup>-1</sup>) 和链霉素 (100 mg·mL<sup>-1</sup>) 的 DMEM 培养液, 培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。

取对数生长期的 U251 细胞, 以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 给予含有 CoCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 和 5%、10%、20% 及 40% 不同时间点组含药血清 (control、1.0、1.5、2.0 h) 的 DMEM 培养液, 作用 48 h, 每孔加入 CCK8 溶液 10  $\mu$ L, 孵育 1 h, 采用酶标仪记录 450 nm 波长处的 *A* 值, 计算相对抑制率。

**细胞克隆实验** 取对数生长期的 U251 细胞, 以 1 000 个/孔接种于 6 孔板中。待细胞贴壁后, 给予含有 200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> 和 10% 不同时间点组含药血清 (control、1.0、1.5、2.0 h) 的 DMEM 培养液, 另取含 10% 含药血清 (control 组) 的 DMEM 培养液作为空白组, 处理 48 h, 更换为完全培养液继续培养 14 天, 每隔 3 天更换新鲜的培养基并观察细胞状态。吸弃旧培养基, PBS 洗涤 2 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液 700  $\mu$ L, 于 4 °C 中固定细胞 60 min。吸弃固定液, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入结晶紫染色液 500  $\mu$ L, 染色 1 h, 吸弃结晶紫染色液, 超纯水洗涤 3 次, 晾干后计数。

**细胞凋亡测定** 取对数生长期的 U251 细胞, 以 8×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 同“细胞克隆实验”给药, 作用 48 h。用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化以收集细胞, 用旧的细胞培养液终止消化。1 000 ×g 离心 3 min, PBS 洗涤细胞, 将细胞沉淀用 1× binding buffer 200  $\mu$ L 重悬, 依次加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5  $\mu$ L, 混合均匀, 在室温下避光孵育 15 min, 应用 Gallios 流式细胞仪对其进行测定, 并使用 Kaluza Analysis 软件分析数据。每个组设置 3 个复孔。

**细胞周期测定** 同“细胞凋亡测定”接种、给药、收集细胞。1 000 ×g 离心 3 min, 轻轻吸弃上清, 加入预冷的 PBS 1 mL 洗涤细胞, 1 000 ×g 离心 3 min, 轻轻吸弃上清, 用预冷的 70% 乙醇固定 24 h。1 000 ×g 离心

3 min 以去除固定液, 用预冷的 PBS 洗涤, 加入含 RNase A 和 PI 的染色液 0.3 mL, 避光 37 °C 孵育 30 min, 应用 Gallios 流式细胞仪对其进行测定, 并使用 Kaluza Analysis 软件分析数据。每个组平行 3 个复孔。

**细胞划痕实验** 取对数生长期的 U251 细胞, 以  $1.5 \times 10^5$  个/孔接种于底部标记 2 条标识线的 24 孔板中。待细胞贴壁后, 用 200  $\mu$ L 枪头沿直尺与标识线垂直划痕 2 道, PBS 洗涤 2 次以去除脱落细胞, 同“细胞克隆实验”给药。于划痕给药后 0、12、24、48 h 用钙黄绿素 AM 染料染色标记, 采用 Leica 显微镜采集同一位置划痕图像, 用 Image J 软件测量划痕宽度。

**Transwell 侵袭实验** 取 45  $\mu$ L matrigel 基质胶插入碎冰中于 4 °C 冰箱解冻, 用 DMEM 以 1:8 比例稀释基质胶, 吸取稀释后基质胶 50  $\mu$ L 均匀铺于 Transwell 小室上室, 置于培养箱中凝胶 30 min。取对数生长期的 U251 细胞, 饥饿培养 24 h, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化以收集细胞, 1 000  $\times$ g 离心 3 min, 用 DMEM 培养液重悬细胞, 调整细胞数至每毫升  $6 \times 10^5$  个。吸取该细胞悬液 100  $\mu$ L 加入 Transwell 小室。同“细胞克隆实验”给药, 作用 48 h。取出 Transwell 小室, 吸弃培养液, D-PBS 洗涤 2 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液 800  $\mu$ L, 室温固定 30 min, 将小室适当晾干, 加入结晶紫染色液 800  $\mu$ L, 室温染色 30 min, 再用 D-PBS 洗涤 3 次, 用棉签轻轻擦去上层未迁移细胞并晾干, 采用 Leica 显微镜于 100 倍镜下随机采集 5 个视野观察细胞并计数。

**3D 细胞培养下血管生成拟态** 将 Matrigel 基质胶插入碎冰中于 4 °C 冰箱解冻, 以每孔 250  $\mu$ L 均匀铺于 24 孔板中, 于培养箱中凝胶 30 min。收集对数生长期细胞, 用含 200  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> 的 DMEM 培养液重悬细胞, 调整细胞密度至每毫升  $1.6 \times 10^5$  个细胞, 吸取该细胞悬液 500  $\mu$ L 加入 24 孔板中。另取含 10% 含药血清 (control 组) 的 DMEM 培养液替换作为常氧对照组。待培养 24 h 后, 24 孔板中用含 200  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> 及 10% 不同时间点含药血清 (control 和 2.0 h) 的 DMEM 培养液 500  $\mu$ L 替换。于给药后 0、1、3、6、12 h, 采用 Leica 显微镜于 50 倍镜下随机采集 5 个视野下的 VM 结构并计数。

**蛋白印迹法检测蛋白表达** 取对数生长期的 U251 细胞, 以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 同“细胞克隆实验”给药, 处理 48 h。用 PBS 溶液洗涤 3 次, 加入适量细胞裂解液 (含 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 蛋白酶抑制剂和 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 磷酸酶抑制剂), 冰上裂解 30 min, 于 4 °C 下 13 000  $\times$ g 离心 10 min, 吸取上清溶液转移至 1.5 mL 离心管中, BCA 法测定蛋白浓度并加入适量 loading buffer, 混合均匀, 95 °C 加热 10 min, 放冷后, 分

装保存于 -20 °C 冰箱中。

使用 8%~12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 恒压电泳分离上清液中的蛋白, 采用湿转法恒流将其转印到硝酸纤维素 (NC) 膜上, 5% BSA 封闭 1 h 后, 分别以 HIF-1 $\alpha$  (1:1 000)、VEGFA (1:5 000)、VEGFR2 (1:2 000)、p-VEGFR2 (1:1 000)、VE-cadherin (1:1 000)、EphA2 (1:1 000)、MMP14 (1:5 000)、MMP2 (1:2 000)、laminin  $\gamma$ 2 (1:100)、 $\beta$ -actin (1:1 000) 抗体于 4 °C 孵育过夜, 再与相对应的二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h。应用超敏 ECL 化学发光液于 Tanon-5200 成像系统中可视化印迹条带, 并运用 Image J 软件进行量化。

**统计学分析** 采用 GraphPad 8.0 统计学软件对实验结果进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组分别与低氧对照组进行单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

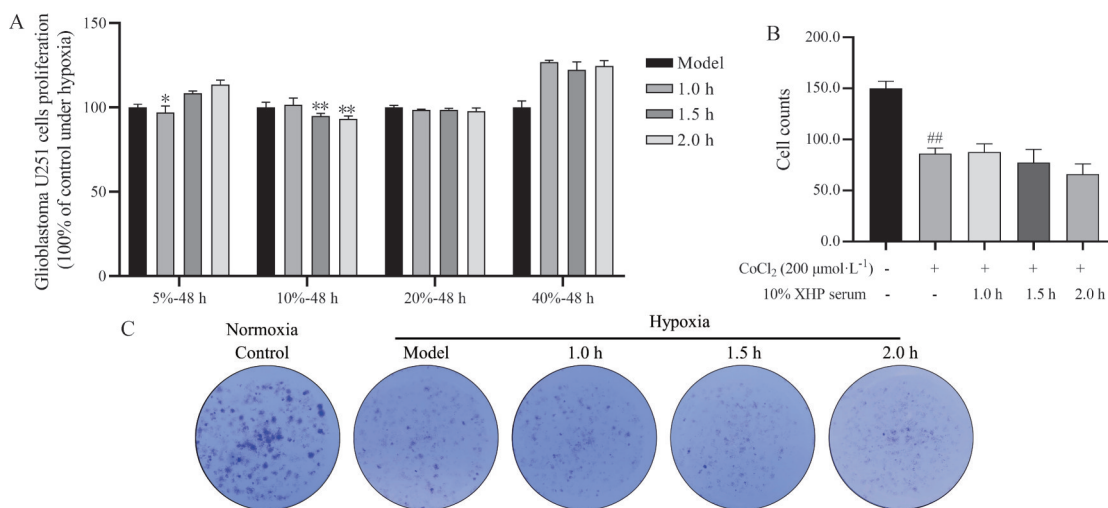
### 1 西黄丸含药血清对 U251 细胞活力及增殖的影响

低氧状态下, 不同时间点西黄丸含药血清及其不同百分比含量作用 U251 细胞 48 h 的细胞活力测定结果如图 1A 所示。结果显示, 当含药血清浓度为 5% 时, 1.0 h 组西黄丸含药血清可以抑制 U251 细胞活力 ( $P < 0.05$ )。当含药血清浓度为 10% 时, 1.5 和 2.0 h 西黄丸含药血清可以抑制 U251 细胞活力 ( $P < 0.01$ ); 其中, 2.0 h 西黄丸含药血清对 U251 细胞的抑制作用最强, 为  $93.2\% \pm 3.6\%$ 。故选用 10% 含药血清作用 U251 细胞 48 h 为条件进一步探究其作用机制。

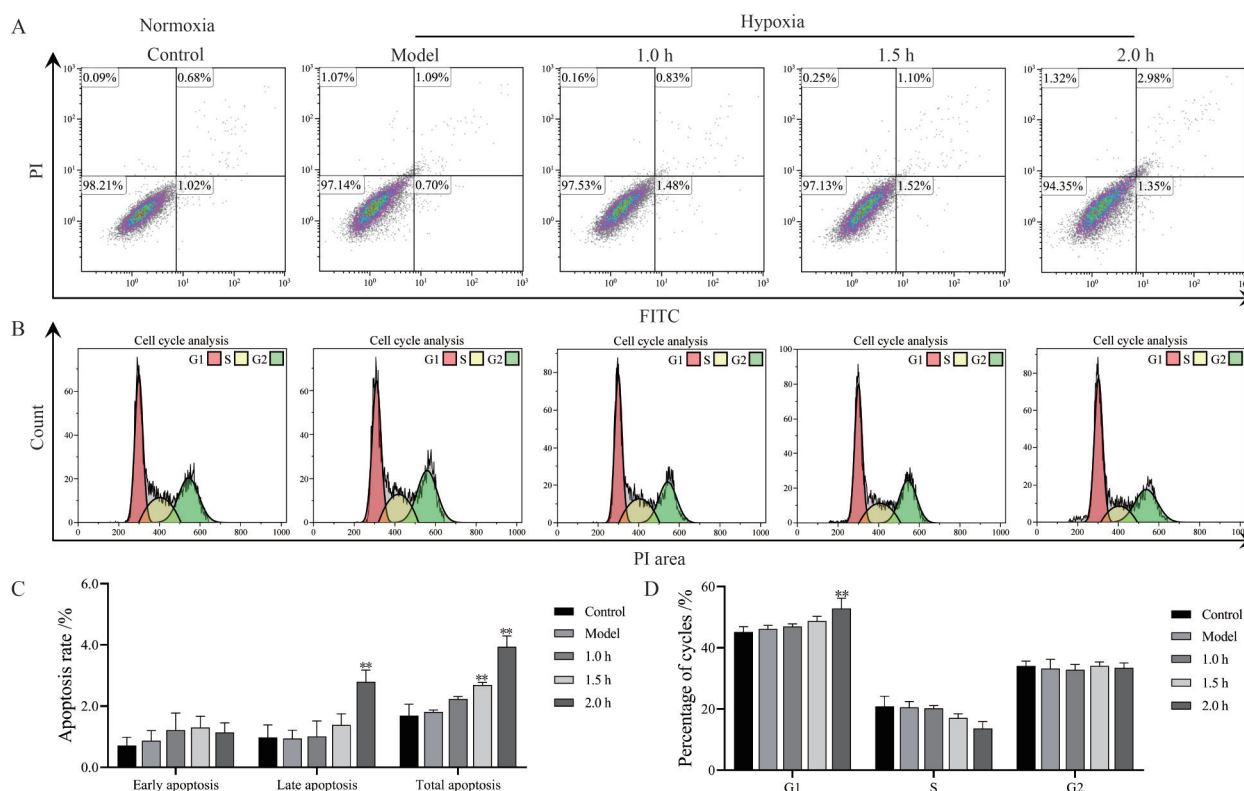
低氧状态下, 10% 不同时间点西黄丸含药血清作用 U251 细胞 48 h 的克隆增殖测定结果如图 1B、C 所示。结果显示, 与对照组相比, 低氧对 U251 细胞增殖有抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 与低氧模型组相比, 1.5 和 2.0 h 西黄丸含药血清对 U251 细胞增殖呈下调趋势, 但无统计学差异。结果表明, 西黄丸含药血清对 U251 细胞活力及增殖影响作用较小。

### 2 西黄丸含药血清对 U251 细胞凋亡及周期的影响

低氧状态下, 不同时间点西黄丸含药血清对 U251 细胞凋亡和细胞周期的影响结果如图 2 所示。结果显示, 对照组细胞形态正常, 几乎无凋亡和坏死细胞。CoCl<sub>2</sub> 低氧对 U251 细胞凋亡及细胞周期几无影响。给予浓度为 10% 的 1.0、1.5 和 2.0 h 时间点西黄丸含药血清处理 48 h 后, U251 细胞的总凋亡率分别为 2.23%、2.69% 和 3.94%, 且 G1 期的细胞数量分别从 46.2% 增加到 47.0%、48.8% 和 52.9%。与低氧模型组相比, 1.5 和 2.0 h 组西黄丸含药血清能提高 U251 细胞总凋亡率



**Figure 1** Effects of Xihuang pill (XHP)-mediated serum at different concentrations and time points on the cell viability of U251 cells under hypoxia. A: Effects of XHP-mediated serum at different concentrations (5%, 10%, 20% and 40%) and time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the cell viability of U251 cells at 48 h under hypoxia by CCK-8; B, C: Effects of XHP-mediated serum at different time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the cell proliferation of U251 cells at 48 h under hypoxia by cell cloning experiment.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$  vs the control group;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs the model group



**Figure 2** Effects of 10% XHP-mediated serum at different time points on the cell apoptosis and cell cycle in U251 cells under hypoxia. A, C: Effects of 10% XHP-mediated serum at different time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the cell apoptosis at 48 h in U251 cells under hypoxia; B, D: Effects of 10% XHP-mediated serum at different time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the cell cycle at 48 h in U251 cells under hypoxia.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $^{**}P < 0.01$  vs the model group

( $P < 0.01$ )。其中, 2.0 h组西黄丸含药血清能提高细胞晚期凋亡水平 ( $P < 0.01$ ), 并使细胞增殖阻滞在G1期 ( $P < 0.01$ )。结果表明, 西黄丸含药血清对U251细胞凋亡及细胞周期影响较小。

### 3 西黄丸含药血清对U251细胞迁移及侵袭能力的影响

低氧状态下, 10%不同时间点西黄丸含药血清作用U251细胞48h的细胞迁移能力测定结果如图3A、B

所示。结果显示,与对照组相比,当划痕 48 h 时,低氧对 U251 细胞迁移能力有显著的诱导作用 ( $P < 0.01$ )。与低氧模型组相比,当划痕 24 h 时,1.5 和 2.0 h 西黄丸含药血清显著抑制了 U251 细胞的迁移能力 ( $P < 0.01$ );当划痕 48 h 时,1.0、1.5 和 2.0 h 西黄丸含药血清均对 U251 细胞的迁移能力有显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。

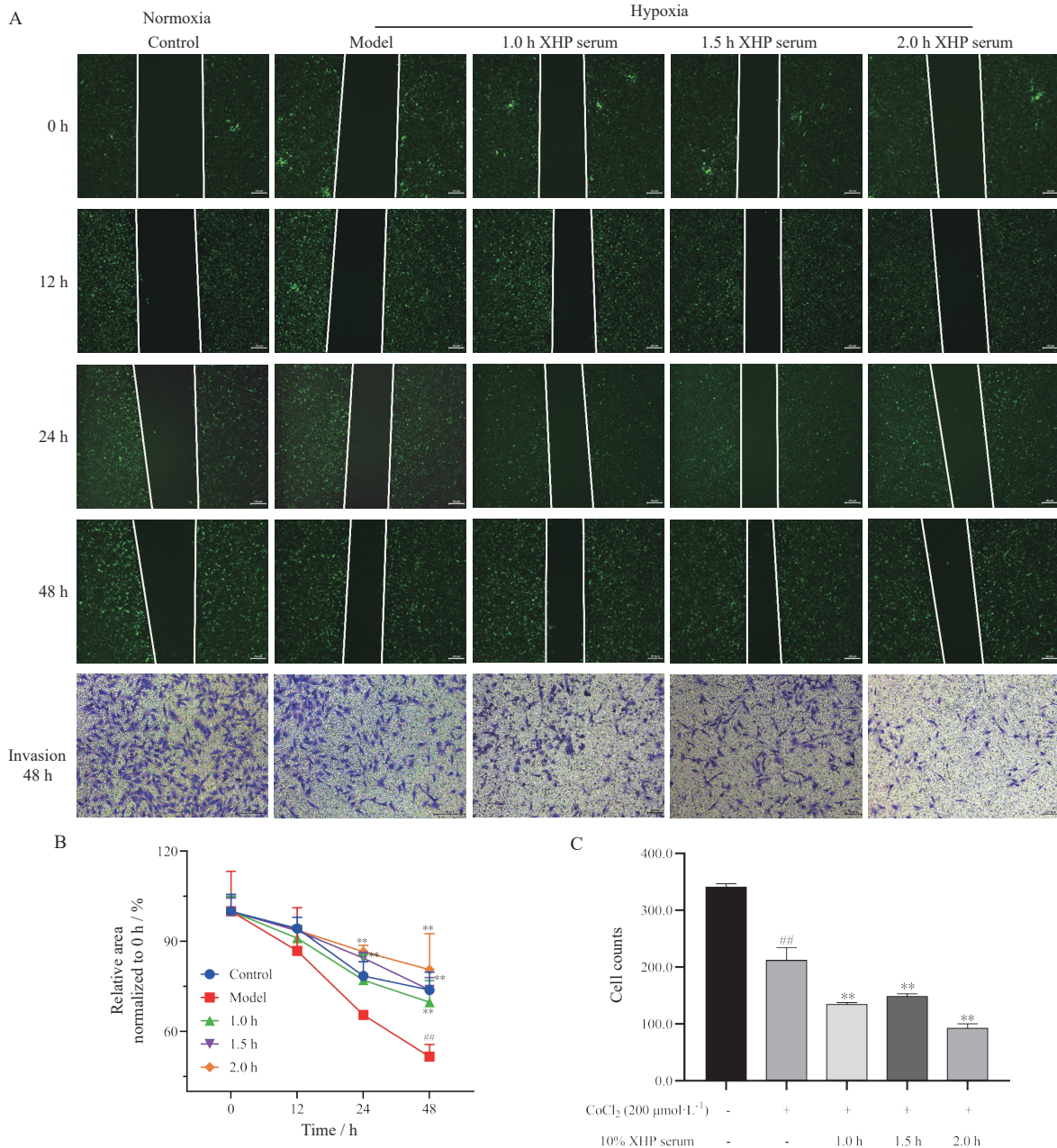
低氧状态下,10% 不同时间点西黄丸含药血清作用 U251 细胞 48 h 的细胞侵袭能力测定结果如图 3A、C 所示。结果显示,与对照组相比,低氧对 U251 细胞侵袭能力有显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ );与低氧模型组相

比,1.0、1.5 和 2.0 h 西黄丸含药血清均显著抑制了 U251 的侵袭能力 ( $P < 0.01$ )。

结果表明,西黄丸含药血清可显著抑制 U251 细胞的迁移与侵袭能力,抑制 U251 细胞转移。

#### 4 西黄丸含药血清对 U251 细胞 VM 形成的影响

低氧状态下,10% 2.0 h 西黄丸含药血清对 U251 细胞中 VM 形成影响结果如图 4 所示。结果显示,与常氧对照组相比,低氧模型组所形成的 VM 结构数量显著增加 ( $P < 0.01$ ),表明低氧环境能显著促进 U251 细胞中 VM 形成。与低氧模型组相比,2.0 h 西黄丸含



**Figure 3** Effects of 10% XHP-mediated serum at different time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the cell migration and invasion in U251 cells under hypoxia. A, B: Cell migration at 0, 12, 24 and 48 h. Magnification = 50 $\times$ , scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ; A, C: Cell invasion at 48 h. Magnification = 100 $\times$ , scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$  vs the control group;  $^{**}P < 0.01$  vs the model group

药血清作用 1、3、6 和 12 h 后均显著抑制了 U251 细胞 VM 形成 ( $P < 0.01$ ), 促使基质胶中已形成的 VM 管网样结构断裂溃散并使形成 VM 结构的 U251 细胞皱缩成团直至死亡。结果表明, 西黄丸含药血清可显著抑制 U251 细胞中 VM 形成。

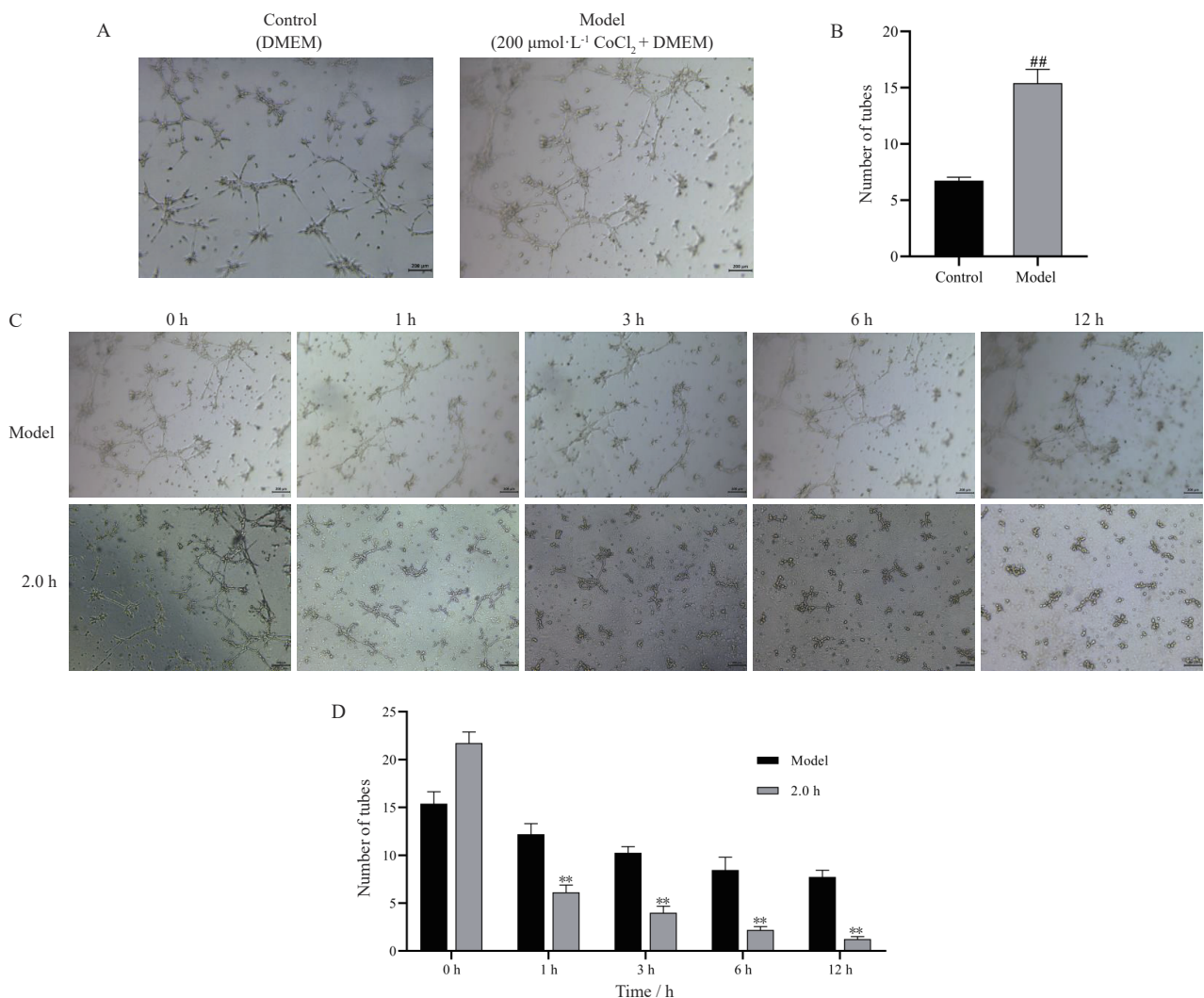
### 5 西黄丸含药血清对 U251 细胞中 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 通路相关蛋白的影响

如图 5 所示, 低氧显著上调 U251 细胞中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。给予 10% 不同时间点西黄丸含药血清处理 48 h 后, 细胞中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGFA 蛋白表达显著下调。

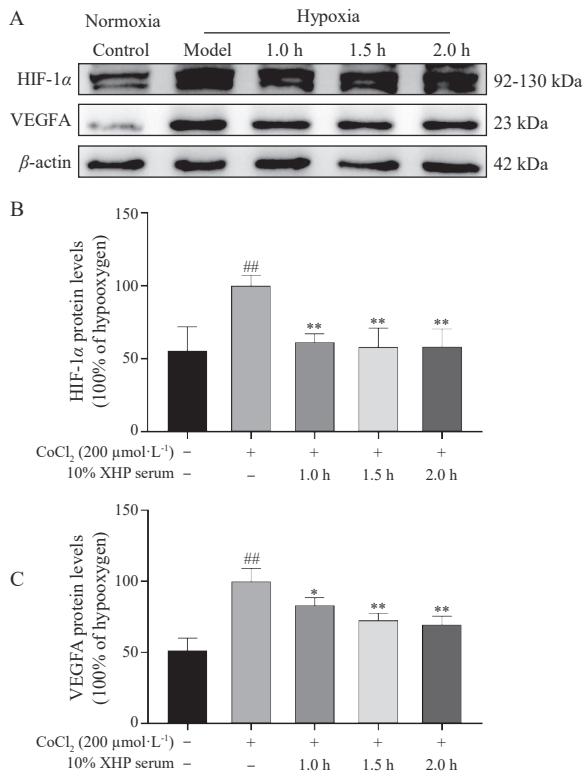
如图 6 所示, 低氧对 U251 细胞中 VEGFR2 和 p-VEGFR2 蛋白表达无明显影响。给予 10% 不同时间点西黄丸含药血清处理 48 h 后, 含药血清对细胞中

VEGFR2 蛋白表达无明显影响; 1.5 和 2.0 h 组西黄丸含药血清显著下调细胞中 p-VEGFR2 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。

如图 7 所示, 低氧显著上调 U251 细胞中 VE-cadherin、MMP14、laminin  $\gamma$ 2 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。给予 10% 不同时间点西黄丸含药血清处理 48 h 后, 1.0 h 组西黄丸含药血清显著上调细胞中 EphA2 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ); 1.5 h 组西黄丸含药血清显著下调细胞中 VE-cadherin ( $P < 0.01$ )、EphA2 ( $P < 0.05$ )、MMP14 ( $P < 0.05$ ) 蛋白的表达; 2.0 h 组西黄丸含药血清显著下调了细胞中 MMP14 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ); 而与低氧模型组相比, 西黄丸含药血清对细胞中 active-MMP2/pro-MMP2 比值和 laminin  $\gamma$ 2 表达无明显影响。结果表明, 西黄丸含药血清可能通过调节 U251 细胞中 HIF-1 $\alpha$ /



**Figure 4** Effects of 10% 2.0 h XHP-mediated serum time points on the number of vasculogenic mimicry (VM) tubes in U251 cells. A, B: Effects of hypoxia model on the number of VM tubes in U251 cells; C, D: Effects of 10% 2.0 h XHP-mediated serum time points on the number of VM tubes at 0, 1, 3, 6 and 12 h in U251 cells under hypoxia. Magnification = 50 $\times$ , scale bar = 200  $\mu$ m.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs the control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the model group



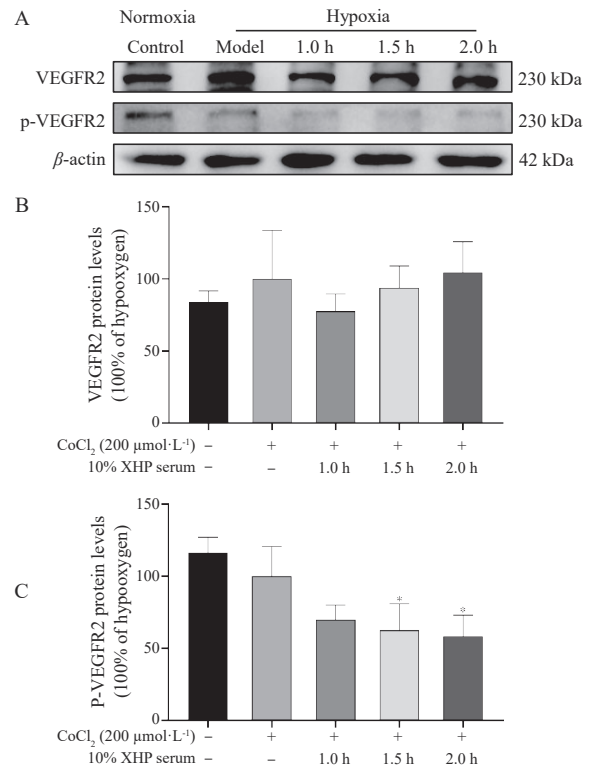
**Figure 5** Effects of 10% XHP-mediated serum at different time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the protein expression (A) of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , B) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA, C) in U251 cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$  vs the control group;  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs the model group

VEGFA/VEGFR2 通路相关蛋白, 抑制 VM 形成从而发挥抗胶质瘤作用。

## 讨论

在前期研究结果基础上, 本研究确定西黄丸含药血清作用 48 h 为后续给药时间。CCK-8、细胞克隆、细胞凋亡和细胞周期测定结果显示, 西黄丸含药血清对 U251 细胞的活力、增殖、凋亡与周期影响较小。

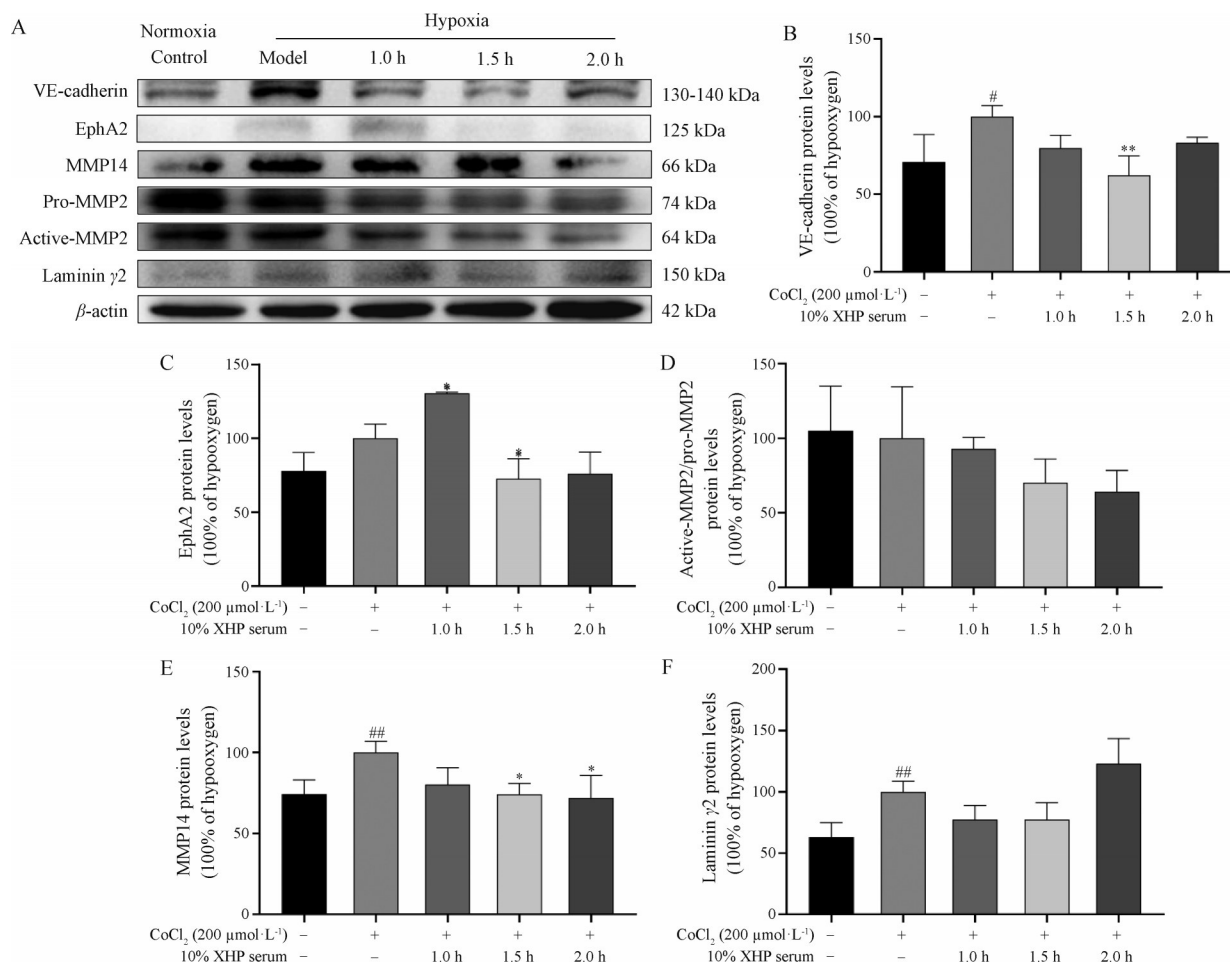
划痕愈合与 Transwell 侵袭实验结果表明, 西黄丸含药血清对 U251 细胞的迁移与侵袭能力有显著抑制作用; 3D 细胞培养下血管生成拟态实验结果表明 2.0 h 组西黄丸含药血清对 U251 细胞 VM 形成有显著抑制作用, 能破坏基质胶中已形成 VM 结构并促使形成 VM 的 U251 细胞皱缩成团; 可见西黄丸含药血清对脑胶质瘤的转移与侵袭能力有一定的抑制作用。研究<sup>[19,20]</sup>表明低氧环境下, 肿瘤细胞侵袭和运动性增强。然而本研究中, CoCl<sub>2</sub> 诱导的低氧环境下 U251 细胞的侵袭能力相较于常氧环境低, 侵袭细胞数减少, 推测其原因可能为本研究选用化学诱导剂 CoCl<sub>2</sub> 诱导低氧, 短时间内对细胞产生一定的损伤 (预实验选取了



**Figure 6** Effects of 10% XHP-mediated serum at different time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the protein expression (A) of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2, B) and phospho-VEGFR2 (p-VEGFR2, C) in U251 cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^*P < 0.05$  vs the model group

200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>, 细胞增殖抑制率为 7.56%), 在低氧初期细胞侵袭能力有所降低。后续将采用低氧工作站对此进行进一步验证。

Western blot 实验结果表明, 西黄丸含药血清对 U251 细胞中 VM 形成的抑制作用与下调 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、p-VEGFR2、VE-cadherin、EphA2、MMP14 等蛋白表达存在密切关系。研究表明, HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路可以介导 VM 形成, 是导致脑胶质瘤患者治疗过程中抗血管生成方面治疗效果不佳的重要机制<sup>[5,21,22]</sup>。Duan<sup>[5]</sup>研究中发现低氧增加人脑胶质瘤 U87 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达和诱导 VM 形成。Jiang 等<sup>[6]</sup>研究也证明低氧增加人脑胶质瘤 T98G 细胞和原代培养人脑胶质瘤干细胞中 HIF-1、VEGFA、p-VEGFR2 表达和诱导 VM 形成。HIF-1 是介导肿瘤细胞对低氧微环境进行适应性反应的关键性转录调控因子, 是肿瘤微血管形成机制中的“中枢”。HIF-1 由一个  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位组成; 低氧微环境下, 细胞内低氧感应器脯氨酰羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 活性降低, HIF-1 $\alpha$  羟基化受阻, 允许 HIF-1 $\alpha$  逃避 p-VHL 蛋白 (von Hippel-Lindau protein) 介导的泛素化降解, 胞浆内 HIF-1 $\alpha$  积聚并转



**Figure 7** Effects of 10% XHP-mediated serum at different time points (1.0, 1.5 and 2.0 h) on the protein expression (A) of vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin, B), Eph receptor tyrosine kinases A2 (EphA2, C), active matrix metalloproteinase 2 (MMP2)/pro-MMP2 (D), matrix metalloproteinase 14 (MMP14, E) and laminin  $\gamma$ 2 (F) in U251 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs the control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the model group

移入核, 与 HIF-1 $\beta$  结合形成异二聚体, 随后与靶基因缺氧反应元件结合, 激活靶基因。VEGF 是促进肿瘤 VM 和血管生成的关键调节因子, 也是 HIF-1 调控的重要靶基因。VEGF 家族主要分为 VEGFA、-B、-C、-D 以及胎盘生长因子 (placenta growth factor, PIGF) 等亚型; 其中, VEGFA 在血管形成中发挥重要作用。VEGFs 通过与其受体 VEGFRs 结合后, 胞内激酶区构象改变, 产生激酶活性催化底物蛋白磷酸化, 最终通过信号级联反应产生生物效应; 其中, HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 信号通路在促进脑胶质瘤 VM 形成中起重要作用<sup>[6-11]</sup>。Yao 等<sup>[7]</sup> 研究发现, 脑胶质瘤干细胞样细胞中 VEGFR2、VE-cadherin、EphA2 表达增高, VM 形成明显增加。有研究表明, VE-cadherin、EphA2、MMP14、MMP2 及 laminin5 $\gamma$ 2 与 VM 形成密切相关<sup>[22-25]</sup>。VE-cadherin 激活 MMPs 是 VM 形成的关键通路<sup>[22]</sup>。MMPs 涉及多种促进肿瘤进展的机制, MMP2

和 MMP14 被发现与肿瘤 VM 形成密切相关, MMP2 对细胞外基质有强烈的蛋白水解作用, MMP14 通过与金属蛋白酶组织抑制因子 2 形成复合体, 激活前体 MMP2 促进 IV 胶原降解。VM 形成起始阶段, 侵袭的癌细胞可能失去细胞间黏附, 其运动性增加并分泌 MMPs 溶解基底膜<sup>[26,27]</sup>。同时, MMPs 将 laminin5 $\gamma$ 2 分割成  $\gamma$ 2' 和  $\gamma$ 2x, 是 VM 形成的最终步骤<sup>[22]</sup>。在本研究中, 西黄丸含药血清对细胞中 VEGFR2、laminin  $\gamma$ 2 蛋白表达和 active-MMP2/pro-MMP2 比值有一定下调作用, 但无统计学差异, 研究结果与以上研究结果相符。

低氧模型组部分通路蛋白相较于常氧对照组未能上调, 其可能原因为文献<sup>[4,6,25]</sup> 采用低氧工作站造模, 本研究选择化学诱导剂 CoCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 建立低氧模型, 两种造模方法不同。CoCl<sub>2</sub> 造模条件下, 低氧环境显著上调 HIF-1 $\alpha$ 、VEGFA、VE-cadherin、MMP14 及 laminin  $\gamma$ 2 等蛋白表达, VEGFR2 和 EphA2 蛋白表达有

一定上调趋势,但对 p-VEGFR2 和 active-MMP2/pro-MMP2 比例几无影响。Yao 等<sup>[7]</sup>研究发现,低氧状态下,胶质瘤细胞 VEGFR2 蛋白表达显著上调,促进 VM 形成。Jiang 等<sup>[6]</sup>研究进一步发现人脑胶质瘤 T98G 细胞在低氧环境中, p-VEGFR2 蛋白表达显著增加。然而,近期 McClellan 等<sup>[28]</sup>研究表明与常氧组相比,低氧组 p-VEGFR2 蛋白表达量无明显变化。本研究中,低氧状态上调 VEGFR2 蛋白表达,促进 VM 形成,但未上调 p-VEGFR2 蛋白,与文献<sup>[28]</sup>报道相一致,推测在化学诱导剂 CoCl<sub>2</sub> 建立的低氧模型中, VEGFR2 蛋白表达上调,但对 p-VEGFR2 蛋白表达影响较小,其具体作用机制仍需要进一步研究。Zhang 等<sup>[29]</sup>研究中探究了不同浓度 CoCl<sub>2</sub> 模拟缺氧对 HK2、786-0 和 HMEC-1 细胞中 MMPs 表达水平的影响, HMEC-1 细胞中 MMP2 表达量随 CoCl<sub>2</sub> 浓度增加呈剂量依赖性降低。在本研究中,低氧状态仅轻微下调 active-MMP2/pro-MMP2 比例,无统计学差异,与文献<sup>[29]</sup>报道存在差异,推测在化学诱导剂 CoCl<sub>2</sub> 建立的低氧模型中, MMP2 表达量变化与具体细胞系相关,后续将在脑胶质瘤 U87 细胞系中进一步探究。

综上所述,西黄丸含药血清可以抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGFA/VEGFR2 通路,下调该通路主要活性蛋白表达,抑制 U251 细胞的迁移与侵袭能力从而发挥抗脑胶质瘤 VM 形成的作用。本文是基于体外实验研究西黄丸抗脑胶质瘤 VM 形成的作用及其机制,存在一定的局限性,后续将继续开展体内实验,为该作用机制提供更可靠的支撑。同时,本研究将对西黄丸含药血清中具体发挥药理作用的成分及含量进行测定,丰富其物质理论基础。目前,已完成其主要成分没药中单体成分没药甙酮对 VM 形成影响的探究。

**作者贡献:** 徐宏彬、王霞负责实验设计、论文修改,提供了方法理论支持和建设;张其海完成实验数据、论文写作与修改;余卓伦、樊昊雯、潘晶帮助完成实验数据及分析。

**利益冲突:** 本文作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Lu XY, Wang ZZ, Wan SC, et al. Effects of tetrandrine on proliferation, migration, and invasion of glioblastoma cells [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46: 6520-6529.
- [2] Moen MD. Bevacizumab: in previously treated glioblastoma [J]. *Drugs*, 2010, 70: 181-189.
- [3] Jiang T, Nam DH, Ram Z, et al. Clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas [J]. *Cancer Lett*, 2021, 499: 60-72.
- [4] Huang M, Ke Y, Sun X, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is involved in the vasculogenic mimicry of glioma via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32: 1973-1980.
- [5] Duan SJ. Silencing the autophagy-specific gene Beclin-1 contributes to attenuated hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation in glioma [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21: 565-574.
- [6] Jiang Y, Zhou JP, Zou D, et al. Overexpression of Limb-Budand heart (LBH) promotes angiogenesis in human glioma via VEGFA-mediated ERK signaling under hypoxia [J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 36-48.
- [7] Yao X, Ping Y, Liu Y, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) plays a key role in vasculogenic mimicry formation, neovascularization and tumor initiation by glioma stem-like cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e57188.
- [8] Wechman SL, Emdad L, Sarkar D, et al. Vascular mimicry: triggers, molecular interactions and *in vivo* models [J]. *Adv Cancer Res*, 2020, 148: 27-67.
- [9] Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 378-389.
- [10] Gonzalez FJ, Xie C, Jiang C. The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 15: 21-32.
- [11] Shi XM, Liu YP, Qu D, et al. Research progress of anti-tumor components of traditional Chinese medicine inhibiting the expression of HIF-1 $\alpha$  [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 2689-2719.
- [12] Yang YT, Zeng J, Chen P, et al. Anti-tumor application and pharmacological mechanism of Xihuangwan: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 250-258.
- [13] Fan YP. One case of brain stem glioma treated by syndrome differentiation of TCM and Xihuangwan [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2010, 25: 245-248.
- [14] Meng S, He Z, Yin Z, et al. Xihuang pill induces apoptosis of human glioblastoma U-87 MG cells via targeting ROS-mediated Akt/mTOR/FOXO1 pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 6049498.
- [15] Long Y, Wu YR, Guo YM, et al. Xihuang pills and its main components inhibit PI3K/Akt/mTOR signaling pathways and promote the apoptosis of prostate cancer cells in PC-3 tumor-bearing mice [J]. *Natl J Androl* (中华男科学杂志), 2021, 27: 340-346.
- [16] He LJ, Wang YW, Zhang JY, et al. Effects of Xihuang pills containing serum on the proliferation, apoptosis and migration of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2021, 36: 463-466.
- [17] He LJ, Li JS, Chen X, et al. Effect of serum containing Xihuang pill on proliferation of human breast cancer cell line MDA-MB-435 and MCF-7 cells [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2018, 43: 2784-2788.
- [18] Fu J, Zhu SH, Xu HB, et al. Xihuang pill potentiates the anti-tumor effects of temozolomide in glioblastoma xenografts

- through the Akt/mTOR-dependent pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 113071.
- [19] Muoz-Nájjar UM, Neurath KM, Vumbaca F, et al. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 2379-2392.
- [20] Monteiro AR, Hill R, Pilkington GJ, et al. The role of hypoxia in glioblastoma invasion [J]. *Cells*, 2017, 6: 45.
- [21] Yang JP, Liao YD, Mai DM, et al. Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-analysis [J]. *Angiogenesis*, 2016, 19: 191-200.
- [22] Wei X, Chen Y, Jiang X, et al. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20: 7.
- [23] Zhang Z, Nong L, Chen M, et al. Baicalein suppresses vasculogenic mimicry through inhibiting RhoA/ROCK expression in lung cancer A549 cell line [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52: 1007-1015.
- [24] Xiang T, Lin YX, Ma W, et al. Vasculogenic mimicry formation in EBV-associated epithelial malignancies [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 5009.
- [25] Pulford E, Meevoy J, Hocking A, et al. The effect of aquaporin 1-inhibition on vasculogenic mimicry in malignant mesothelioma [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: e2293.
- [26] Ma Y, Wu T, Zhou H, et al. Canstatin represses glioma growth by inhibiting formation of VM-like structures [J]. *Transl Neurosci*, 2021, 12: 309-319.
- [27] Cheng R, Wang B, Cai XR, et al. CD276 promotes vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma *via* the PI3K/Akt/MMPs pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 11485-11498.
- [28] McClellan EB, Wang Z, Albertine KH, et al. l-Citrulline treatment alters the structure of the pulmonary circulation in hypoxic newborn pigs [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55: 2762-2772.
- [29] Zhang XY, Chen L. Effects of CoCl<sub>2</sub>-simulated hypoxia on the expression levels of matrix metalloproteinases in renal adenocarcinoma cells and renal tubular epithelial cells [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16: 1454-1460.