

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.010

· 基础研究 ·

FOXO3a在缺氧诱导骨肉瘤U-2OS细胞顺铂耐药中的作用

张玲, 邵华(东南大学附属中大医院 药学部, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**探讨FOXO3a在缺氧诱导骨肉瘤细胞顺铂(cisplatin, DDP)耐药中的作用。**方法:**利用RT-PCR和Western blotting方法检测人骨肉瘤细胞U-2OS在常氧及缺氧条件下FOXO3a的表达水平, Western blotting检测转染FOXO3a-siRNA和HIF-1 α -siRNA对细胞内FOXO3a和HIF-1 α 表达的影响, CCK-8和Annexin V/PI染色法检测FOXO3a在缺氧诱导骨肉瘤细胞DDP耐药中的作用。**结果:**缺氧可使人骨肉瘤细胞U-2OS中FOXO3a mRNA和蛋白表达升高(均 $P < 0.05$)。FOXO3a的表达受HIF-1 α 调控, 与正常细胞组和转染阴性序列HIF-1 α -NC组相比, HIF-1 α -siRNA组FOXO3a蛋白表达量均显著降低[(0.38 \pm 0.03) vs (0.89 \pm 0.08), (0.91 \pm 0.07), 均 $P < 0.01$]。在缺氧条件下, FOXO3a-siRNA可降低U-2OS细胞对DDP的耐受性[(38.50 \pm 2.83)% vs (61.75 \pm 5.73)%], $P < 0.01$], 增加DDP诱导的U-2OS细胞凋亡[(73.41 \pm 6.13)% vs (32.38 \pm 2.23)%], (55.89 \pm 4.46)%, 均 $P < 0.05$]。**结论:**缺氧通过HIF-1 α 依赖的方式诱导骨肉瘤细胞内FOXO3a表达, 从而增强瘤细胞对DPP的耐药性。

[关键词] 叉头转录因子O亚型3a; 缺氧; 骨肉瘤; U-2OS细胞; 顺铂; 耐药

[中图分类号] R738.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)07-0716-05

Role of FOXO3a in hypoxia-induced cisplatin resistance in osteosarcoma U-2OS cells

ZHANG Ling, SHAO Hua (Department of Pharmacy, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 21009, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of FOXO3a in hypoxia-induced cisplatin (DDP) resistance in osteosarcoma cells. **Methods:** The FOXO3a expression was detected by RT-PCR and Western blotting in osteosarcoma U-2OS cell line under normoxia and hypoxia conditions. The effects of HIF-1 α -siRNA and FOXO3a-siRNA on the expressions of HIF-1 α and FOXO3a were detected by Western blotting. CCK-8 and Annexin V/PI assays were used to detect the function of FOXO3a in hypoxia-induced DDP resistance of U-2OS cells. **Results:** Hypoxia could significantly increase the mRNA and protein levels of FOXO3a in U-2OS cells (All $P < 0.05$). The expression of FOXO3a was regulated by HIF-1 α ; compared with control group and HIF-1 α -NC group, the FOXO3a protein expression was significantly down-regulated in HIF-1 α -siRNA group [(0.38 \pm 0.03) vs (0.89 \pm 0.08), (0.91 \pm 0.07), all $P < 0.01$]. Under hypoxia condition, FOXO3a-siRNA could decrease the tolerance of U-2OS cells to DDP [(38.50 \pm 2.83)% vs (61.75 \pm 5.73)%], $P < 0.01$], and increase DDP-induced apoptosis of U-2OS cells [(73.41 \pm 6.13)% vs (32.38 \pm 2.23)%], (55.89 \pm 4.46)%, All $P < 0.05$]. **Conclusions:** Hypoxia significantly enhanced DDP-resistance of U-2OS cells by increasing FOXO3a expression in a HIF-1-dependent manner.

[Key words] forkhead box O 3a (FOXO3a); hypoxia; osteosarcoma; U-2OS cell; cisplatin; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(7): 716-720. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.010]

骨肉瘤是好发于儿童和青少年的骨恶性肿瘤, 化疗是目前骨肉瘤治疗的重要手段之一^[1-2]。肿瘤细胞对化疗药物耐药性的产生导致肿瘤复发与转移是骨肉瘤治疗失败的主要原因^[3-4]。降低肿瘤耐药性成为近年来骨肉瘤治疗研究的重要内容。缺氧作为恶性实体瘤的特征之一, 不仅改变肿瘤细胞的生物学特性, 而且也是肿瘤细胞对化疗药物产生抗性的主要原因^[5-6]。然而, 缺氧诱导肿瘤细胞产生耐药性的机制目前尚未完全明确。叉头转录因子O亚型(forkhead box O, FOXO)3a (FOXO3a)是FOXO家族成员之一, 具有抑癌基因的作用, 调控包括骨肉瘤在内的多

种肿瘤的发生发展^[7-9]。近年来的研究^[10-12]发现, FOXO3a也有促癌作用, 其与肿瘤细胞耐药性的获得密切相关。但其是否参与骨肉瘤细胞对化疗药物耐药目前尚未见相关报道。本课题前期研究发现, 缺氧后骨肉瘤细胞中FOXO3a呈高表达状态, 提示FOXO3a可能参与了缺氧条件下骨肉瘤细胞耐药性的发生。因此, 本研究拟以人骨肉瘤细胞U-2OS为研究对象, 探讨FOXO3a是否参与缺氧诱导肿瘤细胞

[作者简介] 张玲(1983-), 女, 本科, 药师, 主要从事抗肿瘤药物耐药机制研究, E-mail: zhangling31930@126.com

[通信作者] 邵华(SHU Hua, corresponding author), 博士生, 副主任药师, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: gyesh@163.com

对顺铂(cisplatin, DDP)耐药。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

人骨肉瘤细胞U-2OS购自南京凯基生物有限公司。DMEM培养基、青/链霉素和胰蛋白酶均购自美国Gibco公司,胎牛血清购自美国Sincell公司,CCK-8试剂盒购自Biosharp公司, RNA逆转录试剂盒和PCR试剂盒购自TaKaRa公司,RIPA蛋白裂解液、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒购自南京碧云天生物技术有限公司,Annexin V Apoptosis Detection Kit购自美国eBioscience公司,FOXO3a和HIF-1 α 抗体均购自美国Cell Signalling Technology公司, β -actin抗体、顺铂(cisplatin, DDP)购自美国Sigma公司,羊抗鼠IgG-HRP和羊抗兔IgG-HRP抗体购自美国Santa Cruz公司,TRIzol和转染试剂Lipofectamine 2000为美国Invitrogen公司产品。PCR引物由Invitrogen公司合成,FOXO3a-siRNA、HIF-1 α -siRNA及无关对照(NC)siRNA的序列由上海吉玛生物技术有限公司设计与合成。序列如下:HIF-1 α #1, 5'-GGGAUUAACUCAGUUUGAATT-3'; #2, 5'-GGAAUUGAGAGAAAUGCUUTT-3'; #3, 5'-GCCGAGGAAGAACUAUGAATT-3'。FOXO3a #1, 5'-GCUCUUGGUGGAUCAUCAATT-3'; #2, 5'-GCAUGUUCUA UGGGAGCUUGGATT-3'; #3, 5'-UGACAGAAUUCGACAAGGCACTT-3'。无关序列, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。

1.2 细胞培养与缺氧处理

U-2OS细胞在含10%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 μ g/ml)的DMEM培养基中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂浓度下培养。待细胞汇合度达70%后,将细胞分别置于常规培养孵箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)及缺氧孵箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、1%O₂、94% N₂)中继续培养。

1.3 小干扰RNA转染U-2OS细胞

U-2OS细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,转染前24 h将处于对数生长期U-2OS细胞接种至6孔细胞培养板中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养24 h,使转染当天细胞处于40%~50%的汇合率。转染步骤按照Lipofectamine 2000操作说明进行。培养48 h后Western blotting检测干扰效率。

1.4 RT-PCR检测FOXO3a mRNA表达

收集不同处理组细胞,TRIzol法提取各组细胞总RNA,按照TaKaRa逆转录试剂盒说明书取1 μ g总RNA在20 μ l反应体系中逆转录生成cDNA。引物序列如下:FOXO3a上游引物为5'-GAGGCCGTCGATTCGCT-3',下游引物为5'-TGGGGAAGCAC-

CAAAGAAGAG-3'。 β -actin上游引物为5'-GTTT-GAGACCTTCAACACCC-3',下游引物为5'-CAGCTTCTCCTTAATGTCACG-3'。扩增反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性2 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共进行28个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸6 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 Western blotting检测FOXO3a蛋白表达

收集不同处理组细胞,RIPA蛋白裂解液裂解各组细胞提取总蛋白,BCA比色法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸10 min使其变性,取等量蛋白进行SDS-PAGE,电泳完毕后将蛋白转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,抗FOXO3a抗体(1:1 000)、抗 β -actin抗体(1:5 000)、抗HIF-1 α 抗体(1:1 000)、4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗膜,羊抗鼠IgG-HRP(1:4 000)或羊抗兔IgG-HRP(1:4 000)室温孵育2 h,TBST洗膜,暗室中加入ECL液孵育4 min后曝光和显影,利用软件分析目的蛋白的相对表达量。

1.6 CCK-8法检测U-2OS细胞耐药性的改变

取对数生长期U-2OS细胞,以 1×10^4 个/孔接种于96孔板,实验分常氧组和缺氧组两大组,每组包含4小组:正常细胞组、DDP组、DDP+FOXO3a-NC组和DDP+FOXO3a-siRNA组,每组设5个复孔。转染相应siRNA,24 h后加入终浓度为10 μ mol/L的DDP,各组细胞培养48 h后,每孔加入10 μ l CCK-8试剂,继续孵育1.5 h,检测各孔450 nm处光密度(D)值,计算细胞增殖率。细胞增殖率(%)=(实验组D值-空白组D值)/(正常细胞组D值-空白组D值) $\times 100\%$ 。

1.7 流式细胞术检测骨肉瘤U-2OS细胞凋亡

消化、收集细胞,PBS洗涤后离心,调整细胞密度至 1×10^6 /ml,取100 μ l细胞悬液于5 ml流式管,加入200 μ l结合缓冲液、5 μ l Annexin V-FITC和5 μ l PI,混匀后室温避光放置15 min,上机检测。

1.8 统计学处理

各实验重复3次。采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,检测数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本t检验,多样本均数比较采用One-Way ANOVA分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧条件下U-2OS细胞中FOXO3a mRNA和蛋白表达水平均上升

将U-2OS细胞分别经常氧及缺氧处理后,利用RT-PCR和Western blotting方法检测细胞中mRNA水平和蛋白表达的变化,结果(图1)显示,与常氧条件下相比,U-2OS细胞在缺氧培养后FOXO3a的mRNA

表达水平[4 h:(0.15 ± 0.02) vs (0.06 ± 0.02), $P < 0.01$; 24 h: (0.34 ± 0.02) vs (0.06 ± 0.02), $P < 0.01$]和蛋白表达[4 h: (0.41 ± 0.08) vs (0.12 ± 0.06), $P < 0.01$; 24 h: (0.82 ± 0.05) vs (0.12 ± 0.06), $P < 0.01$]均有所上升,呈时间依赖性。

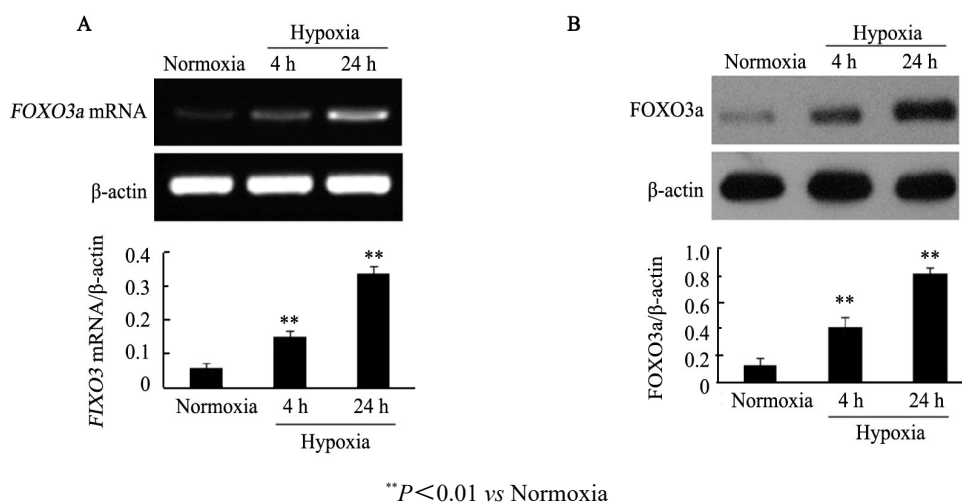


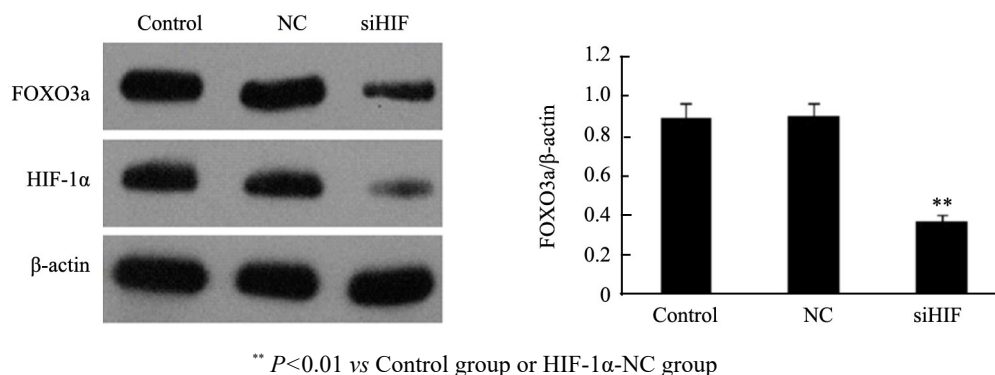
图1 缺氧对 FOXO3a mRNA(A)和蛋白(B)表达的影响

Fig.1 Effect of hypoxia on the expression of FOXO3a mRNA(A) and protein (B)

2.2 缺氧条件下 HIF-1α 正向调节 FOXO3a 的表达

Western blotting 检测结果(图2)显示,在缺氧条件下利用 siRNA 抑制 U-2OS 细胞内 HIF-1α 表达后,

与正常细胞组和转染阴性序列 HIF-1α-NC 组相比, HIF-1α-siRNA 组 FOXO3a 蛋白表达量均显著降低 [(0.38 ± 0.03) vs (0.89 ± 0.08), (0.91 ± 0.07), 均 $P < 0.01$].



** $P < 0.01$ vs Control group or HIF-1α-NC group

Control: control group; NC: HIF-1α-NC group; siHIF: HIF-1α-siRNA group

图2 HIF-1α 对 FOXO3a 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of HIF-1α on the expression of FOXO3a

2.3 FOXO3a 影响缺氧条件下 U-2OS 细胞对 DDP 的敏感性

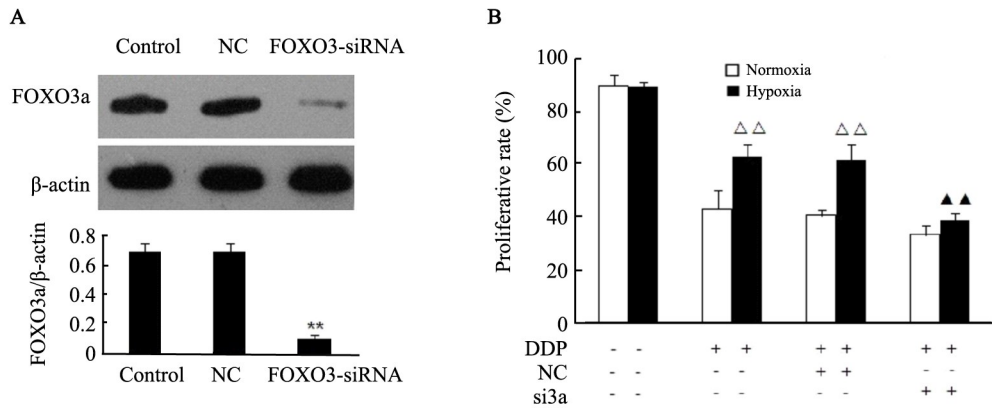
Western blotting 检测结果(图3A)显示,与正常细胞组相比,FOXO3a-siRNA 组 FOXO3a 蛋白表达量显著降低 [(0.10 ± 0.02) vs (0.69 ± 0.06), $P < 0.01$],而转染阴性序列 FOXO3a-NC 组 FOXO3a 蛋白表达量无明显变化。CCK-8 检测结果(图3B)显示,DDP 能显著降低常氧组和缺氧组 U-2OS 细胞增殖率,而缺氧组细胞增殖率显著高于常氧组 [DDP: (62.88 ± 4.44)% vs (43.13 ± 7.13)%, $P < 0.01$; DDP+FOXO3a-NC: (61.75 ± 5.73)% vs (40.63 ± 2.16)%, $P < 0.01$]. 在缺氧条件下,

DDP+FOXO3a-siRNA 组细胞增殖率显著低于 DDP+FOXO3a-NC 组和 DDP 组 [(38.50 ± 2.83)% vs (61.75 ± 5.73)%、(62.88 ± 4.44)%, 均 $P < 0.01$].

2.4 FOXO3a 影响缺氧条件下 DDP 诱导的 U-2OS 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图4)显示,在缺氧条件下,与对照组相比,DDP 可促进 U-2OS 细胞的凋亡 [FOXO3a-NC: (55.89 ± 4.46)% vs (22.54 ± 3.67)%, $P < 0.01$; FOXO3a-siRNA: (73.41 ± 6.13)% vs (32.38 ± 2.23)%, $P < 0.01$]. DDP+FOXO3a-siRNA 组细胞凋亡率明显高于 FOXO3a-siRNA [(73.41 ± 6.13)% vs

(32.38±2.23)% , $P<0.01$]组和 DDP+FOXO3a-NC 组 [(73.41±6.13)% vs (55.89±4.46)% , $P<0.05$].



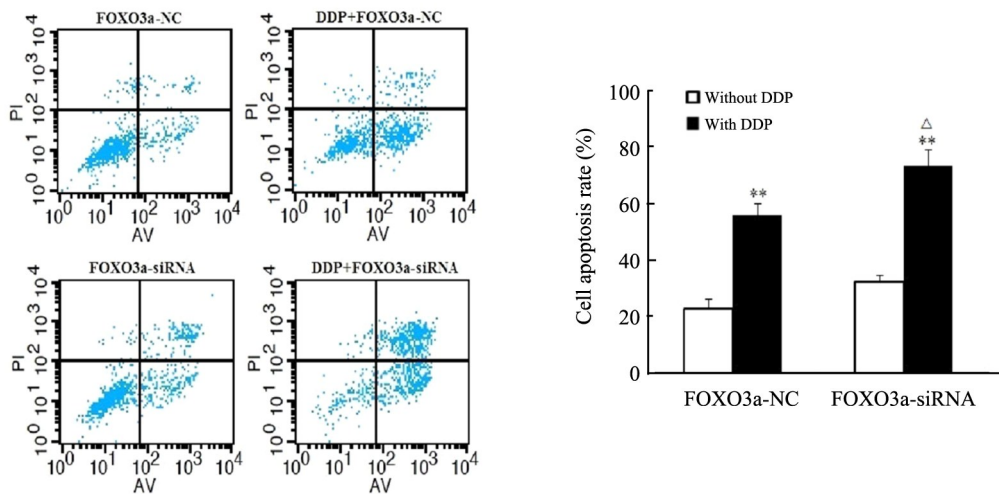
** $P<0.01$ vs Control group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Normoxia group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Control group or FOXO3a-NC group

A: Effect of FOXO3a-siRNA on the expression of FOXO3a;

B: Effect of FOXO3a-siRNA on proliferative rate of U-2OS cells treated with DDP

图3 FOXO3a对DDP处理的U-2OS细胞增殖率的影响

Fig. 3 Effect of FOXO3a on proliferative rate of U-2OS cells treated with DDP



** $P<0.01$ vs group without DDP, $\Delta P<0.05$ vs FOXO3a-NC group with DDP

图4 缺氧条件下DDP联合FOXO3a-siRNA转染促进U-2OS细胞凋亡

Fig.4 Apoptosis of U-2OS cells was promoted by the treatment of DDP combined with FOXO3a-siRNA transfection

3 讨论

骨肉瘤具有局部侵袭和早期转移等特点,预后较差^[1-2]。目前临床治疗的首选方案是手术切除联合术前和术后化疗^[1-2]。骨肉瘤化疗多以顺铂为基础,能够杀灭大部分肿瘤细胞,降低复发率,提高患者的5年生存率^[1-2]。然而,部分患者因产生顺铂耐药性导致肿瘤复发与转移,严重影响治疗效果和生存率^[3-4]。目前有关顺铂耐药的机制仍不清楚。大量研究证据^[13-17]表明,缺氧能够诱导骨肉瘤细胞对化疗药物的抵抗。缺氧可通过缺氧诱导因子来促进耐药相关基因的表达,从而使肿瘤细胞对化疗药物产生抗

性^[13-15]。本研究发现,缺氧可诱导骨肉瘤细胞中FOXO3a的表达,进一步研究发现,缺氧条件下FOXO3a的表达依赖于HIF-1 α ,提示FOXO3a有可能参与了缺氧条件下骨肉瘤细胞耐药的发生。

FOXO3a是FOXO基因家族的一个重要成员,在多种类型肿瘤中的表达都有所下调或缺失,如卵巢癌、鼻咽癌和乳腺癌等^[18-19]。FOXO3a通过与相应的DNA结合调控下游靶基因的表达,参与肿瘤细胞增殖、分化、凋亡及血管生成的调控,发挥抑癌作用^[7-9]。然而,近来研究^[12]表明,FOXO3a也有促癌作用,其高表达于对西妥昔单抗(cetuximab)耐药的结肠癌组织中,与结肠癌细胞对西妥昔单抗(cetuximab)耐药性

的产生密切相关。在替莫唑胺(temozolomide)耐药的脑胶质瘤细胞中, *FOXO3a* 呈高表达状态, 敲除细胞内 *FOXO3a* 能有效降低耐药细胞对替莫唑胺(temozolomide)的抵抗性^[10]。

然而, 关于 *FOXO3a* 与骨肉瘤细胞耐药的相关性尚无报道, 其在缺氧诱导肿瘤细胞耐药中的作用也尚未见相关报道。本研究发现, 缺氧可使骨肉瘤细胞对 DDP 产生抵抗, 降低细胞凋亡率, 同时细胞内 *FOXO3a* 表达亦升高。在缺氧条件下干扰 *FOXO3a* 的表达, 可增强骨肉瘤细胞对 DDP 的敏感性, 促进 DDP 诱导的细胞凋亡。这些结果表明, *FOXO3a* 参与了缺氧条件下骨肉瘤细胞 DDP 耐药表型的发生。鉴于体外已证实了 *FOXO3a* 在缺氧诱导骨肉瘤细胞 DDP 耐药中的作用, 下一步体内实验中本实验组采用裸鼠移植瘤模型验证其作用。文献报道, *FOXO3a* 通过结合到 *c-myc* 启动子区域活化结肠癌细胞中 *c-myc* 基因的转录, 使 *c-myc* 下游耐药靶基因表达上调, 从而使肿瘤细胞对西妥昔单抗(cetuximab)产生抗性^[12]。在神经胶质瘤细胞中, *FOXO3a* 可通过降低 β -catenin 的核聚集使肿瘤细胞对替莫唑胺(temozolomide)产生抵抗^[10]。*FOXO3a* 在缺氧诱导骨肉瘤细胞 DDP 耐药中的作用机制仍有待进一步研究。

综上, 本研究证实, 缺氧通过 HIF-1 α 上调 *FOXO3a* 参与了骨肉瘤 DDP 耐药发生, *FOXO3a* 在缺氧与骨肉瘤细胞相互作用下促进骨肉瘤耐药发生过程中发挥了关键作用。在本研究的基础上, 将 *FOXO3a* 作为一个重要的耐药靶点进一步研究其耐药机制, 对临床药物治疗骨肉瘤具有指导意义。

【参考文献】

- [1] TARAN S J, TARAN R, MALIPATIL N B. pediatric osteosarcoma: an updated review[J]. Indian J Med Paediatr Oncol, 2017, 38(1): 33-43. DOI: 10.4103/0971-5851.203513.
- [2] HARRISON D J, GELLER D S, GILL J D, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1): 39-50. DOI: 10.1080/14737140.2018.
- [3] HATTINGER C M, FANELLI M, TAVANTI E, et al. Advances in emerging drugs for osteosarcoma[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2015, 20(3): 495-514. DOI: 10.1517/14728214.2015.1051965.
- [4] LI S, SUN W, WANG H, et al. Research progress on the multidrug resistance mechanisms of osteosarcoma chemotherapy and reversal [J]. Tumour Bio, 2015, 36(3): 1329-1338. DOI: 10.1007/s13277-015-3181-0.
- [5] KIM J Y, LEE J Y. Targeting tumor adaption to chronic hypoxia: implications for drug resistance, and how it can be overcome[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9). pii: E1854. DOI: 10.3390/ijms18091854.
- [6] DOKTOROVA H, HRABETA J, KHALIL M A, et al. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: the role of not only HIF-1 [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2015, 159(2): 166-177. DOI: 10.5507/bp.2015.025.
- [7] QIAN Z, REN L, WU D, et al. Overexpression of FoxO3a is associated with glioblastoma progression and predicts poor patient prognosis[J]. Int J Cancer, 2017, 140(12): 2792-2804. DOI: 10.1002/ijc.30690.
- [8] XU K, PEI H, ZHANG Z, et al. FoxO3a mediates glioma cell invasion by regulating MMP9 expression[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5): 3044-3050. DOI: 10.3892/or.2016.5087.
- [9] Gomes A R, Zhao F, Lam E W. Role and regulation of the forkhead transcription factors FOXO3a and FOXM1 in carcinogenesis and drug resistance[J]. Chin J Cancer, 2013, 32(7): 365-370. DOI: 10.5732/cjc.012.10277.
- [10] XU K, ZHANG Z, PEI H, et al. FoxO3a induces temozolomide resistance in glioblastoma cells via the regulation of β -catenin nuclear accumulation[J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 2391-2397. DOI: 10.3892/or.2017.5459.
- [11] CHIU C F, CHANG YW, KUO K T, et al. NF- κ B-driven suppression of FOXO3a contributes to EGFR mutation-independent gefitinib resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(18): E2526-35. DOI: 10.1073/pnas.1522612113.
- [12] YU YY, GUO M Z, WEI Y, et al. FoxO3a confers cetuximab resistance in RAS wild-type metastatic colorectal cancer through c-Myc [J]. Oncotarget, 2016, 7(49): 80888-80900. DOI: 10.1080/10245332.2016.1275426.
- [13] ZHENG D, WU W, DONG N, et al. Mxd1 mediates hypoxia-induced cisplatin resistance in osteosarcoma cells by repression of the PTEN tumor suppressor gene[J]. Mol Carcinog, 2017, 56(10): 2234-2244. DOI: 10.1002/mc.22676.
- [14] SCHOLTEN DJ 2ND, TIMMER C M, PEACOCK J D, et al. Down regulation of Wnt signaling mitigates hypoxia-induced chemoresistance in human osteosarcoma cells[J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e111431[2017-12-25]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111431>. eCollection 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0111431.
- [15] RONCUZZI L, PANCOTTI F, ALDINI N. Involvement of HIF-1 α activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 389-394. DOI: 10.3892/or.2014.3181.
- [16] MA Q, ZHANG Y, LIU T, al. Hypoxia promotes chemotherapy resistance by down-regulating SKA1 gene expression in human osteosarcoma[J]. Cancer Biol Ther, 2017, 18(3): 177-185. DOI: 10.1080/15384047.2017.1294285.
- [17] LI C, GUO D, TANG B, et al. Notch1 is associated with the multidrug resistance of hypoxic osteosarcoma by regulating MRP1 gene expression[J]. Neoplasma, 2016, 63(5): 734-742. DOI: 10.4149/neo_2016_510.
- [18] SHOU Z, LIN L, LIANG J, et al. Expression and prognosis of FOXO3a and HIF-1 α in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4): 585-593. DOI: 10.1007/s00432-011-1125-7.
- [19] LU M, ZHAO Y, XU F, et al. The expression and prognosis of FOXO3a and Skp2 in human ovarian cancer[J]. Med Oncol, 2012, 29(5): 3409-3415. DOI: 10.1007/s12032-012-0275-z.

【收稿日期】 2018-03-10

【修回日期】 2018-05-15

【本文编辑】 韩丹, 阮芳铭