文章编号:1000-5404(2013)12-1219-06

论著

缺氧对人乳腺癌细胞微球体生长及化疗耐药性的影响

范原铭,屈洪波,吴诚义,侯 婧,韩明利 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科)

[摘要] **目的** 研究缺氧对人乳腺癌细胞微球体(mammospheres, MSs)培养效率及其化疗耐药性的影响。**方法** 分别在常氧及缺氧条件下对人乳腺癌MDA-MB-231细胞进行无血清悬浮培养,观察记录MSs的生长速率及体积变化。MTT比色法检测各组人乳腺癌微球体细胞(mammospheres-derived cells,MSDCs)及MDA-MB-231细胞在不同浓度、不同药物作用下的存活率(survive rate,SR)。免疫组织荧光化学法检测HIF-2α、ABCG2在各组MSDCs中的表达。Western blot检测乳腺癌干细胞标志物CD44及ALDH1在各组MSDCs中的表达。Western blot及Real-time RT-PCR检测HIF-2α、ABCG2、P-gp及MDR1在各组MSDCs中的表达。**结果** 缺氧组MSs生长速率及球体体积优于常氧组。缺氧组MSDCs在不同化疗药物作用下的SR高于常氧组MSDCs及MDA-MB-231细胞($P<0.05$)。免疫组织荧光化学检测发现HIF-2α及ABCG2在缺氧组MSDCs中的表达强于常氧组。Western blot检测发现CD44与ALDH1在缺氧组MSDCs中表达量高于常氧组。缺氧组MSDCs中HIF-2α、ABCG2及P-gP蛋白表达量均高于在常氧组MSDCs及MDA-MB-231细胞中的表达($P<0.05$)。Real-time RT-PCR检测发现缺氧组MSDCs中HIF-2α、ABCG2及MDR1 mRNA的表达量均高于常氧组MSDCs及MDA-MB-231细胞($P<0.05$)。**结论** 以HIF-2α为启动因子,ABCG2、MDR1及P-gP等为效应因子的生物化学反应可能是缺氧状态加快MSs的成球速度、提高其球体体积、增强其化疗耐药能力的可能机制。

[关键词] 乳腺肿瘤;化疗耐药;缺氧诱导因子2α;三磷腺苷结合转运蛋白G超家族成员2;多耐药基因1
[中图法分类号] R364.4;R73-35;R737.9 [文献标志码] A

Influence of hypoxia on human breast cancer mammospheres culture and resistance to chemotherapy

Fan Yuanming, Qu Hongbo, Wu Chengyi, Hou Jing, Han Mingli (Department of Endocrine Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of hypoxia on human breast cancer mammospheres (MSs) culture and resistance to chemotherapy. **Methods** MDA-MB-231 cells were cultured in serum-free medium supplemented with growth factors under normoxia and hypoxia conditions, respectively. The culture time and volume of the MSs were recorded. The survival rates (SR) of mammos-pheres-derived cells (MSDCs) and MDA-MB-231 cells incubated with various chemotherapy drugs with various concentrations were detected by MTT assay. The expression of hypoxia inducible factor 2α (HIF-2α) and ATP-binding cassette super family G2 (ABCG2) in the MSs were observed by immunofluorescence technique. The expression levels of CD44 and ABCG2 were detected by Western blotting. The expression levels of HIF-2α, ABCG2, glycoprotein P (P-gp) and multi-drug resistance gene 1 (MDR1) in the MSDCs were detected by Western blotting and real-time RT-PCR. **Results** The MSs of the hypoxia group had shorter culture time and greater volume than those of the normoxia group. The SR of the MSDCs incubated with various chemotherapy drugs with various concentrations in the hypoxia group were significantly higher than that of the MSDCs and MDA-MB-231 cells in the normoxia group ($P<0.05$). Immunofluorescence showed that the fluorescence of HIF-2α and ABCG2 in the MSDCs of the hypoxia group was stronger than that of the normoxia group. The expression levels of CD44 and ALDH1 in

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研计划(06-2-028)
[通信作者] 吴诚义,E-mail:wuchengyicq@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130108.1141.015.html(2013-01-08)

the MSDCs of the hypoxia group were higher than those of the normoxia group. The protein expression levels of HIF-2α, ABCG2 and P-gp in the MSDCs of the hypoxia group were significantly higher than those in the MSDCs and MDA-MB-231 cells of the normoxia group ($P<0.05$). The mRNA expression levels of HIF-2α, ABCG2 and MDR1 in the MSDCs of the hypoxia group were higher than those of the other groups. **Conclusion** Hypoxia can shorten the culture time for MDA-MB-231 cells forming MSs and increase the size of MSs. The pathway of HIF-2α, ABCG2, P-gp and MDR1 may be involved in the mechanism of the above phenomenon.

[**Key words**] breast neoplasm; chemotherapy drug resistance; hypoxia inducible factor -2α; ATP-binding cassette super family G2; multi-drug resistance gene 1

Supported by the Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (06-2-028). Corresponding author: Wu Chengyi, E-mail: wuchengyicq@163.com

肿瘤干细胞是指肿瘤组织内存在的一小部分致瘤能力特别强,分化程度极低的细胞,并且具有自我更新、多向分化以及无限增殖的“干性”。目前包括乳腺癌在内的多种实体瘤肿瘤干细胞已得到分离。一般采用的是流式细胞技术、磁性激活细胞分选法进行分选以及无血清悬浮培养纯化肿瘤干细胞。无血清悬浮非黏附成球培养法可以促使肿瘤细胞在培养过程中大部分发生失巢凋亡,而存留下来的则是一些增殖能力强、类似于干细胞样的肿瘤细胞,在无血清培养基内呈悬浮状球形生长。而该球体中部分细胞被认为具有肿瘤干细胞特性,亦被称为“乳腺癌干细胞样细胞”[1]。化疗耐药是造成恶性肿瘤患者治疗效果不佳、影响预后及生存期的一个重要因素。化疗耐药的发生机制较为复杂,而缺氧就是其中的一个重要始动因素。缺氧是指组织细胞得不到充足的氧或者不能充分地利用氧,从而导致组织、细胞的生理代谢、功能、形态结构发生异常变化的过程。本研究拟在缺氧状态下对人乳腺癌MDA-MB-231细胞株进行无血清培养,观察缺氧对人乳腺癌细胞微球体(mammospheres,MSs)成球的影响。并检测在缺氧状态下所获取的MSs化疗耐药性的变化,从而了解缺氧在乳腺癌干细胞富集过程中的可能作用,阐述其增强肿瘤细胞化疗耐药性的可能机制。

1 材料与方法

1.1 MSs的培养

将人乳腺癌MDA-MB-231细胞接种于内含DMEM-F12培养基(1∶50 B27,20 ng/mL EGF,20 ng/mL bFGF)的8个培养瓶中,置于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中孵育。每3天换液1次,250×g离心5 min,收集细胞,半量换液及全量换液交替进行。MSs每5~7天传代1次,传代时250×g离心5 min,收集MSs,胰酶消化5 min后吹打至MSs消失,从而终止消化,离心收集细胞,继续上述无血清培养。本实验选取的是2次传代后的MSs[1]。

1.2 缺氧条件下的MSs培养

采用密闭的1% O_2、5% CO_2、94% N_2恒温培养箱进行细胞培养。在细胞换液与传代过程中均在密闭的无菌操作台中进行,尽量缩短操作时间以减少缺氧条件的破坏。选择MDA-MB-231细胞进行无血清悬浮培养,其余培养条件和操作过程与1.1一致。

1.3 体外药物敏感性实验

实验分为3组:缺氧MSs组、常氧MSs组与MDA-MB-231细胞组($n=16$)。以未加细胞的培养液作为空白对照。先用胰酶分别将各组MSs消化成单细胞1×10^8/L,即人乳腺癌微球体细胞(mammospheres-derived cells,MSDCs),然后将3组细胞以每孔200 μL接种于96孔板。化疗药物选择多西紫杉醇(Docetaxel,DTX,江苏恒瑞医药股份有限公司),表柔比星(Epidoxorubicin,EPB,辉瑞公司),奥沙利铂(艾恒,江苏恒瑞医药股份有限公司),5氟尿嘧啶(5-Fu,上海微晶生物试剂有限公司)。上述药物均以生理盐水稀释至1×PPC。常规培养72 h后每孔加入10 μL MTT(5 g/L,pH=7.4),继续培养4 h后加入10%十二烷基磺酸钠(SDS) 100 μL/孔,37 ℃培养24 h。用450型酶标仪(Bio-Rad公司)分别于490 nm及630 nm波长处测定吸光度值。计算细胞存活率(survival rate,SR)=(加药后吸光度值-空白吸光度值)/(未加药吸光度值-空白吸光度值)×100%,抑制率=1-存活率。

1.4 Western blot检测

将无血清培养所获得的MSs用胰酶消化成MSDCs,根据试剂公司所提供的操作步骤进行蛋白提取及Western blot操作。实验所需的抗体:CD44鼠抗人、ALDH1兔抗人、HIF-2α鼠抗人(1∶600)及ABCG2兔抗人抗体(Santa Cruz公司,USA),HRP标记的羊抗鼠及羊抗兔IgG(鼎国生物公司)。

1.5 免疫荧光检测

用胰酶将MSs消化成MSDCs,0.8×10^5/孔接种于96孔板,待细胞生长满意后,移去培养基并用PBS清洗。4 ℃下以10% NGS的PBS封闭过夜。分别将一抗:HIF-2a鼠抗人及ABCG2兔抗人抗体以1∶1比例混合,37 ℃湿盒内染色30 min。0.01 mL PBS漂洗3次,5 min/次。滴加1∶100稀释的FITC-羊

抗鼠 sIg,室温或 37 ℃湿盒内染色 30 min。0.01 mL PBS 漂洗 3 次,5 min/次。封片,镜检。荧光显微镜下采用两种不同的激发光即可观察到不同抗原的存在。实验分为 3 组进行:缺氧组(1% O_2、5% CO_2、94% N_2 条件培养获得的 MSs)、常氧组(5% CO_2、95% CO_2 条件下培养获得的 MSs)、空白组(PBS 代替一抗)。

1.6 Real-time RT-PCR 分析

引物由上海吉凯公司设计合成。提取 RNA 使用 Trizol 试剂进行细胞裂解,反转录及 PCR 反应使用 SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ试剂盒,β-actin 为内参。实验操作均按试剂公司提供说明书进行。

表 1　Real-time RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列	片段大小(bp)
HIF-2α	上游:5′-ATGGTAGCCCTCTCCAACAAG-3′	134
	下游: 5′-AGGTTCTTCATCCGTTTCCAC-3′	
ABCG2	上游: 5′-AGAGTGGCTTTCTACCTTGTCG-3′	124
	下游: 5′-AATAACGAAGATTTGCCTCCAC-3′	
MDR1	上游: 5′-GGAGGAGCAAAGAAGAAG-3′	170
	下游: 5′-AATGTAAGCAGCAACCAG-3′	
β-actin	上游: F5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′	325
	下游: R5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′	

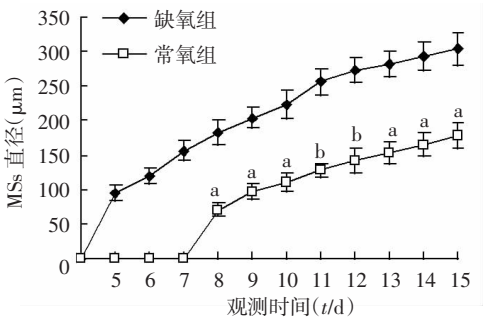
1.7 统计学方法

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 MSs 的培养

第 5 天观察到缺氧组培养瓶中有 MSs 出现,而在第 8 天方观察到常氧组中开始出现 MSs。此时 2 组 MSs 的体积与结构差异不明显。随着球体体积增加,第 10 天观察到缺氧组 MSs 较常氧组球体体积大,折光度强,结构紧密。第 15 天后 2 组 MSs 球体体积停止增长。见图 1、2。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与缺氧组比较

图 1　人乳腺癌细胞微球体生长曲线

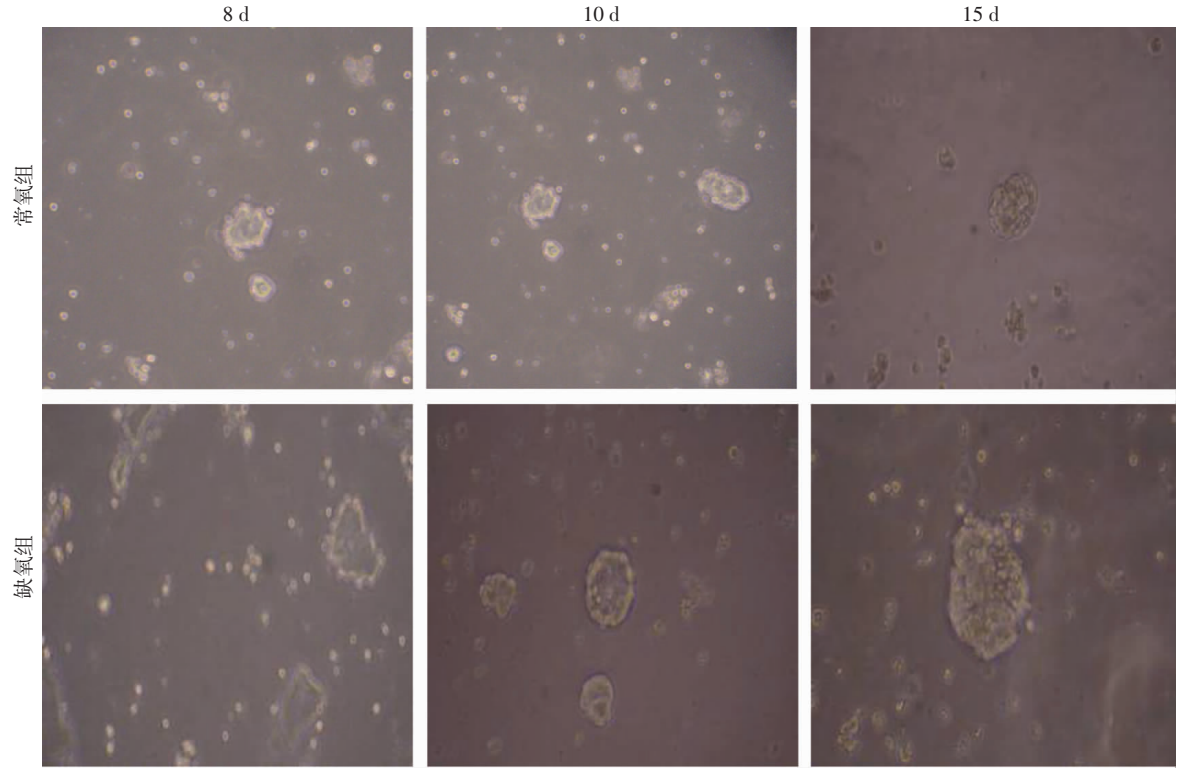


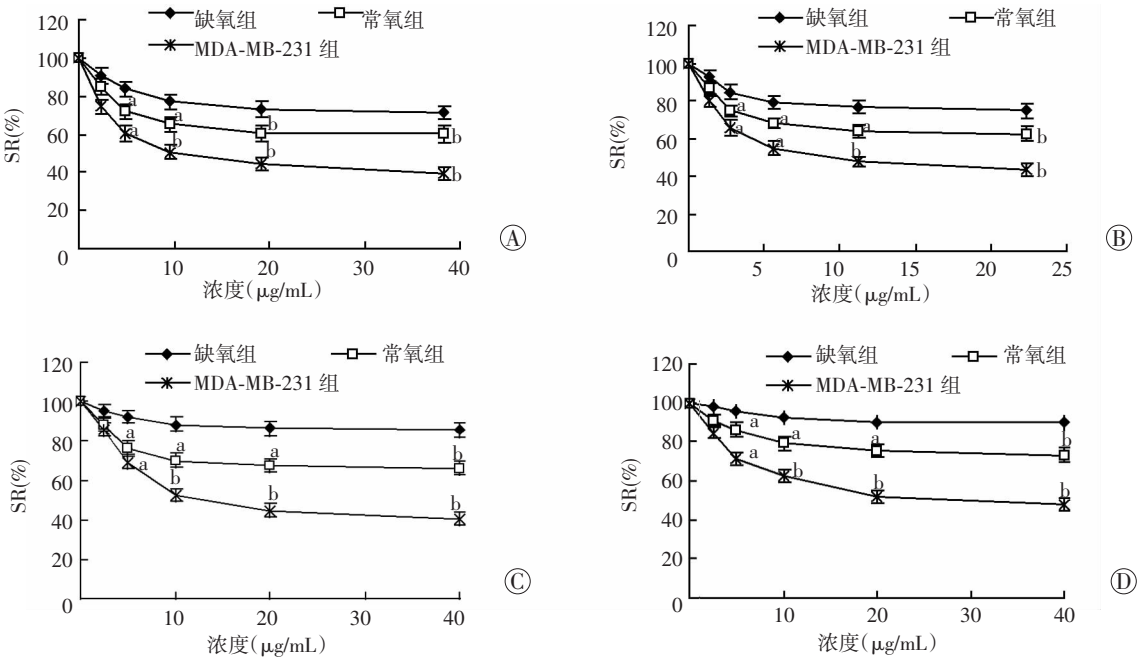
图 2　2 组人乳腺癌细胞微球体不同培养时间生长状态变化　(LM ×100)

2.2 MTT 实验

MTT 实验显示:在 4 种不同化疗药物作用下常氧组 MSDCs 的存活率随着药物浓度的增大,其下降趋势较缺氧组 MSDCs 更为明显($P<0.05$)。而 MDA-MB-231 细胞的表现与之相同,在不同化疗药物浓度增加时其存活率均出现较缺氧组 MSDCs 更为明显的下降趋势($P<0.05$)。见图 3。

2.3 免疫荧光观察

免疫荧光检测显示在缺氧组 MSDCs 中 HIF-2α 及 ABCG2 的表达强于常氧组,HIF-2α 显绿光,ABCG2 显红光(图 4)。



A:多西紫杉醇;B:表柔比星;C:奥沙利铂;D:5 氟尿嘧啶　a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与缺氧组比较

图 3　在不同药物作用下各组 MSDCs 存活率变化

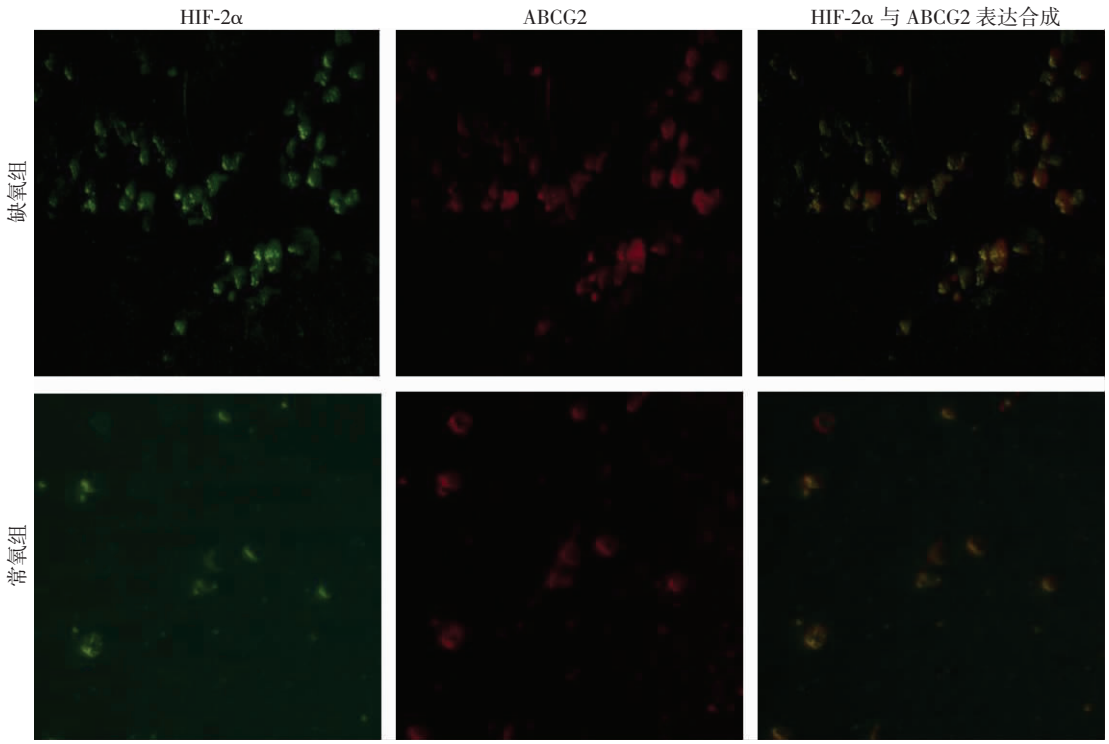
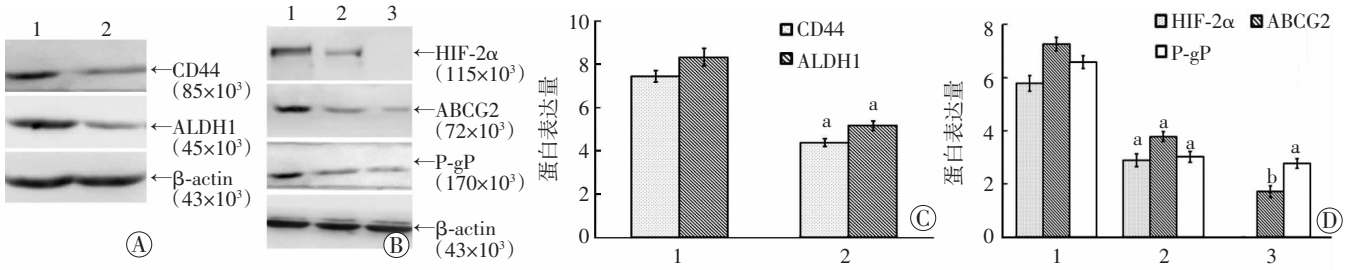


图 4　2 组 MSDCs 中 HIF-2α 与 ABCG2 的表达　(免疫荧光显微镜 ×200)



A:Western blot 检测 CD44 与 ALDH1 在各组的表达;B:Western blot 检测 HIF-2α、ABCG2 与 P-gP 在各组的表达;C:CD44 与 ALDH1 表达的半定量分析;D:HIF-2α、ABCG2 与 P-gP 表达的半定量分析

1:缺氧组;2:常氧组;3:MDA-MB-231 组; a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与缺氧组 MSDCs 比较

图 5 Western blot 检测乳腺癌干细胞标志物在各组 MSDCs 中的表达

2.4 Western blot 检测

CD44 在缺氧组 MSDCs 中的表达高于常氧组($P<0.05$),ALDH1 在缺氧组 MSDCs 中的表达量同样高于常氧组($P<0.05$)。HIF-2α 蛋白在缺氧组 MSs 中的表达高于常氧组($P<0.05$),而在 MDA-MB-231 细胞组中 HIF-2α 无表达。ABCG2 蛋白在缺氧组 MSs 中的表达量明显高于常氧组($P<0.05$),在 MDA-MB-231 细胞组中的表达低于常氧组($P<0.05$)。P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gP)在缺氧组 MSs 中的表达明显高于常氧组($P<0.05$),在常氧组与 MDA-MB-231 细胞组中的表达无明显差异($P>0.05$)。见图 5。

2.5 Real-time RT-PCR 检测

检测 HIF-2α、ABCG2 及 MDR1 mRNA 在各组中的表达差异,结果与 Western blot 结果相近。在缺氧组 MSs 中 HIF-2α mRNA 的表达均高于常氧组 MSs 及 MDA-MB-231 细胞组中的表达量($P<0.05$)。在 MDA-MB-231 细胞组中 HIF-2α mRNA 的表达量为 3 组中最低($P<0.05$),在缺氧组 MSs 中 ABCG2 mRNA 表达量最高($P<0.05$),MDA-MB-231 细胞组中 ABCG2 mRNA 的表达最低($P<0.05$),缺氧组中 MDR1 mRNA 的表达量为 3 组中最高($P<0.05$),MDA-MB-231 细胞组中 MDR1 mRNA 表达最低($P<0.05$)。见表 2。

表 2 HIF-2α、ABCG2 及 MDR1 mRNA 在各组中的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HIF-2α mRNA	ABCG2 mRNA	MDR1 mRNA
缺氧组	38	7.23±0.29	8.25±0.31	10.58±0.34
常氧组	38	4.45±0.27	4.58±0.26	6.32±0.29
MDA-MB-231 组	25	1.17±0.12	2.24±0.18	2.57±0.27

3 讨论

随着对于肿瘤干细胞研究的深入,分选与鉴定肿瘤干细胞已成为目前众多学者关注的热点。无血清悬浮非黏附成球法被应用于肿瘤干细胞的分选已得到广泛地认可与应用[2-4]。但在培养的过程中被发现仍存在着分选成功率不高及培养效率低的问题。陈元文等[5]发现无血清悬浮培养获得的 MSs 在传代培养3 代后无法再获得新的 MSs,考虑与大量的 MSDCs 贴壁分化有关。董华英等[6]发现 MSs 中乳腺癌干细胞标记物 $ALDH1^+$ 细胞比例明显高于普通乳腺癌细胞。因此认为无血清培养获得的 MSs 中相当比例的细胞具有一定肿瘤干细胞特性,并称其为“乳腺癌干细胞样细胞”。而在分选培养过程中发现选择经过 3 次化疗后的乳腺癌组织进行无血清培养更容易获得 MSs 的形成,且需要的培养时间较细胞株更长。本研究通过改变培养条件,降低氧分压从而缩短形成 MSs 的时间,并且可以获得体积更大,结构更为紧密的 MSs。

随着实体肿瘤体积的增长,肿瘤组织生长对氧的需求进行性增加,因此在瘤体内缺氧环境是普遍存在的。Eli 等[7]对恶性胶质细胞瘤研究发现:在 1% 氧浓度的环境下培养恶性胶质细胞瘤细胞微球体,其中肿瘤干细胞样标记物 CD133 的表达量会增加 3 倍,而具有干细胞特性的侧群细胞的比例增加 5 倍。Elizabeth 等[8]通过缺氧-再氧化循环的方法培养 MDA-MB-231 细胞,从中分选出具有肿瘤干细胞特性的一种亚群细胞。这种细胞在免疫缺陷小鼠体内成瘤效率极高,并且高表达 $CD44^+CD^{24-/Low}$、$ALDH1^+$ 以及 E-Cadherin 等乳腺肿瘤干细胞标记物。Salnikov 等[9]对胰腺肿瘤细胞研究发现:缺氧状态导致干细胞样胰腺肿瘤细胞中 HIF-2α 与 CD133 过表达,上皮标志物 E-Cadherin 低表达或无表达,从而诱导上皮间质化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)发生。动物实验同时证实缺氧导致肿瘤细胞的迁徙能力增强。于是推测缺氧可能会加强相应细胞的结构稳定性及对缺氧环境的耐受力,从而使其表现出肿瘤干细胞样特性,并增加肿瘤干细胞样细胞的分选比例。本研究发现缺氧可以增加 MSs 中乳腺癌干细胞标记物 CD44 与 ALDH1 的表达增加,并且成瘤速度加快,认为缺氧状态会增加无血清培养获取的 MSs 的干细胞特性。Whelan 等[10]发现缺氧可以通过启动 HIF-1α 及细胞外信号调节激酶的活化,进

而诱导加强失巢凋亡发生。推测缺氧增加失巢凋亡的发生可能是缺氧提高 MSs 干细胞特性及成球速率的机制。

Xiang 等[11]指出在缺氧状态下，肿瘤细胞通过位于细胞膜上的氧分子受体来感受低氧信号，导致细胞内包括缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor，HIF)在内的多种基因表达发生改变，从而导致其下游的 ABCG2、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin，EPO)等的表达随之变化，促进细胞在缺氧状态下生存。HIF 家族中的 HIF-1、HIF-2 被认为参与缺氧应答反应。HIF-2α 作为亚单位与 HIF-β 相结合形成 HIF-2 蛋白发挥生物学作用。目前 HIF-2 蛋白被认为与代谢适应、侵袭转移、血管生成等肿瘤细胞生物学行为有关[12-14]。ABCG2 是 ATP 结合组件蛋白 G 亚家族成员，被认为通过泵出化疗药物而导致化疗的失败。另外 ABCG2 被认为在肿瘤干细胞中高表达，其表达量随细胞的不断分化而降低，在分化成熟细胞中几乎没有表达[15]。而 MDR1 与 ABCG2 同属 ABC 转运蛋白超家族，在化疗耐药中同样起着重要作用[16]。P-gP 是 MDR1 编码的一种能量依赖性转运蛋白，1976 年首次在对秋水仙碱耐药的中国仓鼠卵巢癌细胞上分离获得。作为防御保护机制，P-gP 在肠道、肝、肾等器官的上皮细胞中有表达，并且对药物或化疗物质的吸收、分布、排泄等方面发挥调控作用[17]。Liu 等[18]研究发现缺氧状态启动肿瘤细胞中 HIF-1α 的活化，继而上调 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)、P-gP、MDRP1 的表达，从而增强胃癌细胞的化疗耐药性。本研究结果与其完全相符，推测正是由于缺氧环境启动了缺氧反应起始因子 HIF-2α，而 HIF-2α 启动了下游 ABCG2、MDR1 等相关化疗耐药基因的活化表达，从而增强其化疗耐药能力。

参考文献：

[1] Zhang F, Rothermund K, Gangadharan S B, *et al*. Phenotypic screening reveals topoisomerase I as a breast cancer stem cell therapeutic target[J]. Oncotarget, 2012, 3(9): 998-1010.

[2] 董华英，吴诚义，陈元文. 乳腺癌新辅助化疗后的癌干细胞分离培养[J]. 第三军医大学学报，2010，32(20)：2172-2176.

[3] Huang F T, Zhuan-Sun Y X, Zhuang Y Y, *et al*. Inhibition of hedgehog signaling depresses self-renewal of pancreatic cancer stem cells and reverses chemoresistance[J]. Int J Oncol, 2012, 41(5): 1707-1714.

[4] Hu H, Deng F, Liu Y, *et al*. Characterization and retinal neuron differentiation of WERI-Rb1 cancer stem cells[J]. Mol Vis, 2012, 18: 2388-2397.

[5] 陈元文，吴诚义，陈鑫，等. 长程无血清培养人乳腺癌细胞球的生物学特性[J]. 肿瘤，2010，30(4)：283-287.

[6] 董华英，吴诚义，陈元文. 化疗后乳腺癌组织中干细胞微球体的分离、培养及鉴定[J]. 吉林大学学报：医学版，2011，37(1)：163-167.

[7] Bar E E, Lin A, Mahairaki V, *et al*. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres[J]. Am J Pathol, 2010, 177(3): 1491-1502.

[8] Louie E, Nik S, Chen J S, *et al*. Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(6): R94.

[9] Salnikov A V, Liu L, Platen M, *et al*. Hypoxia induces EMT in low and highly aggressive pancreatic tumor cells but only cells with cancer stem cell characteristics acquire pronounced migratory potential[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46391.

[10] Whelan K A, Reginato M J. Surviving without oxygen: hypoxia regulation of mammary morphogenesis and anoikis[J]. Cell Cycle, 2011, 10(14): 2287-2294.

[11] Xiang L, Liu Z H, Huan Q, *et al*. Hypoxia-inducible factor-2a is associated with ABCG2 expression, histology-grade and Ki67 expression in breast invasive ductal carcinoma[J]. Diagn Pathol, 2012, 7: 32.

[12] Eliasson P, Rehn M, Hammar P, *et al*. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during *in vitro* culture[J]. Exp Hematol, 2010, 38(8): 301-310.

[13] Chen J, Imanaka N, Chen J, *et al*. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion[J]. Br J Cancer, 2010, 102(2): 351-360.

[14] Grkovic T, Whitson E L, Rabe D C, *et al*. Identification and evaluation of soft coral diterpenes as inhibitors of HIF-2α induced gene expression[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(7): 2113-2115.

[15] Sathi G A, Tamamura R, Tsujigiwa H, *et al*. Analysis of immunoexpression of common cancer stem cell markers in ameloblastoma[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(3): 397-402.

[16] Cuestas M L, Castillo A I, Sosnik A, *et al*. Downregulation of mdr1 and abcg2 genes is a mechanism of inhibition of efflux pumps mediated by polymeric amphiphiles[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(21): 6577-6579.

[17] Rapposelli S, Coi A, Imbriani M, *et al*. Development of Classification Models for Identifying "True" P-glycoprotein (P-gp) Inhibitors Through Inhibition, ATPase Activation and Monolayer Efflux Assays[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6924-6943.

[18] Liu L, Ning X, Sun L, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer[J]. Cancer Sci, 2008, 99(1): 121-128.

(**收稿**：2012-10-30；**修回**：2012-12-10)

(编辑　龙　亮)