

# Mipu1 和 HIF-1 $\alpha$ 在人脑胶质瘤中表达及相关性分析

叶巍巍<sup>1</sup>, 杨金福<sup>2</sup>, 陈志勇<sup>2</sup>, 黄德智<sup>2</sup>, 董林正<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第一医院惠亚医院, 广东 惠州 516081; 2. 中南大学湘雅三医院, 湖南 长沙 410013)

**摘要:** [目的] 探讨脑胶质瘤标本中 Mipu1 和 HIF-1 $\alpha$  表达及其相关性。[方法] 胶质瘤患者 24 例, 根据 WHO 病理分级分低级别组 12 例 (I 级 5 例, II 级 7 例), 高级别组 12 例 (III 级 7 例, IV 级 5 例), 以其中 10 例低级别胶质瘤患者瘤旁部分脑组织作为对照组。对三组标本进行针对 Mipu1 和 HIF-1 的免疫组化、实时荧光定量核酸扩增检测和免疫印迹分析检测, 对所得数据进行统计分析。[结果] 免疫组化结果显示 Mipu1 和 HIF-1 $\alpha$  表达蛋白均主要定位在细胞核内, 且有随着胶质瘤病理级别升高而增强表达的趋势。三组标本的 Mipu1 和 HIF-1 $\alpha$  的相对 mRNA 表达量和相对蛋白表达量组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 且 Mipu1 和 HIF-1 $\alpha$  在胶质瘤中的表达呈正相关 ( $P < 0.05$ )。[结论] HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 在胶质瘤中表达升高, 且两者表达呈正相关。

**关键词:** HIF-1 $\alpha$ ; Mipu1; 胶质瘤; 病理级别

**中图分类号:** R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)10-0848-06

**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.10.B003

## The Expression and Correlation Analysis of HIF-1 $\alpha$ and Mipu1 in Human Glioma

YE Wei-wei<sup>1</sup>, YANG Jin-fu<sup>2</sup>, CHEN Zhi-yong<sup>2</sup>, et al.

(1. Huiya Hospital, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Huizhou 516081, China; 2. The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the expression and their correlation of HIF-1 $\alpha$  and Mipu1 in human glioma. [Methods] 24 patients with glioma were classified as low grade group of 12 cases (5 cases of grade I, 7 cases of grade II) and the high grade group of 12 cases (7 cases of grade III, 5 cases of grade IV) according to the WHO pathological grading. Tumor adjacent tissues from 10 patients with low grade glioma were selected as the control group. The expression of Mipu1 and HIF-1 of the three groups were detected by immunohistochemical staining, real-time quantitative PCR and Western blot, and the data obtained were statistically analyzed. [Results] The results of immunohistochemical staining showed that the expression of Mipu1 and HIF-1 $\alpha$  protein was mainly localized in nucleus, and there was a tendency of increased expression of Mipu1 and HIF-1 $\alpha$  with the increase of pathological grade. The relative mRNA expression quantity and relative protein expression quantity of Mipu1 and HIF-1 $\alpha$  was statistically different among the 3 groups ( $P < 0.05$ ). The Mipu1 and HIF-1 $\alpha$  expression in glioma was positively correlated ( $P < 0.05$ ). [Conclusions] HIF-1 $\alpha$  and Mipu1 are overexpressed in human glioma, and the expression of HIF-1 $\alpha$  and Mipu1 showed a positive correlation.

**Subject words:** HIF-1 $\alpha$ ; Mipu1; glioma; pathological grade

神经胶质瘤是最为常见的神经系统原发性的恶性肿瘤, 预后较差<sup>[1]</sup>, 即使目前因术中神经导航系统

及术中磁共振的合理应用而大大提高了手术精确性并减少相关损伤<sup>[2]</sup>, 以及日趋成熟的术后的放疗手段也相应改善术后生存期<sup>[3-5]</sup>, 但脑胶质瘤的整体预后依然不佳。近年来靶向免疫治疗成为新的方向, 通过激活机体自身的免疫系统, 使其产生对肿瘤有特异性拮抗反应的抗体, 或将具有拮抗肿瘤作用的

**基金项目:** 长沙市科技计划项目基金 (K1308024-31)

**通讯作者:** 杨金福, 副主任, 副教授, 博士; 中南大学湘雅三医院神经外科, 湖南省长沙市河西岳麓区桐梓坡路 138 号 (410013); E-mail: 22183730@qq.com

**收稿日期:** 2017-01-05; **修回日期:** 2017-02-25

特异性抗体人为导入体内的治疗<sup>[6,7]</sup>。有关神经胶质瘤的发生发展的机制研究非常广泛,并开始尝试针对某些关键通路加以调控,目前已发现缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducing factors 1,HIF-1)在快速生长而处于缺氧状态下的肿瘤细胞中起到极为重要作用<sup>[8]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 作为活性亚单位在肿瘤的血管形成,细胞能量代谢,细胞增殖凋亡,高度侵袭及易转移性,放化疗失敏性及预后不良性等方面均起到关键作用<sup>[9,10]</sup>。

近年,新发现的基因心肌缺血预适应上调蛋白 1(myocardial ischemic preconditioning up-regulated protein 1,Mipu1),定位于大鼠的染色体 q12.1,包含有 5 个外显子和 4 个内含子,通过多组织膜 mRNA 印记技术发现,该基因在心、脑的表达量较为突出,而在其他组织中少表达甚至不表达<sup>[11]</sup>。其结构为一典型的 KRAB/C2H2 型锌指蛋白,由此推测该新基因所具有的功能应该是以转录抑制为主;后续的研究亦证实 Mipu1 可抑制多种信号通路的活性<sup>[12,13]</sup>。同时相关实验发现人脑胶质瘤细胞中 Mipu1 的表达明显增加,提示可能参与胶质瘤的病理发展过程<sup>[14,15]</sup>。

采用生物信息学分析提示在 Mipu1 的启动子内存在数个潜在的转录因子结合位点,位于 Mipu1 转录起始位点-562~-550 的序列正是 HIF-1 的结合序列-ctCACGTGgccat-,该序列包含有 HIF-1 保守的缺氧反应元件(hypoxia response element HRE)(5'-RCGTG-3'),而 HIF-1 $\alpha$ 对下游基因的调节主要通过与 HRE 结合而起到对下游调控的作用,由此 HIF-1 $\alpha$ 可能通过对 Mipu1 的表达影响,从而抑制相关凋亡基因表达<sup>[16]</sup>。本研究通过对不同级别的人脑胶质瘤同时对其 HIF-1 $\alpha$ 及 Mipu1 行免疫组化及 RtpCR 和 West blot 检测,分析两者在人脑胶质瘤中可能的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2013 年 11 月至 2014 年 9 月湘雅三医院神经外科行“颅内胶质瘤切除术”并由湘雅三医院病理科切片确认为胶质瘤的患者 24 例,从 24 例患者切下的胶质瘤标本中心部位获取胶质瘤标本,将其

中 WHO 病理分级为Ⅲ~Ⅳ级的 12 份标本定为高级别组(Ⅲ级 7 例,Ⅳ级 5 例),将Ⅰ~Ⅱ级的 12 份标本定为低级别组(Ⅰ级 5 例,Ⅱ级 7 例);同时将低级别组中 10 份瘤旁脑组织标本作为对照组。

### 1.2 免疫组织化学 SABC 检测方法

从 3 组标本中选取同等量部分样本进行常规石蜡切片。切片经脱蜡、水化处理后用 PBS 洗片 5min $\times$ 2 次。按标准试验程序对组织进行抗体制片,封片后镜下观察。400 倍镜下随机选取 5 个视野,根据 Remmele 等提出的免疫反应积分打分法进行阳性判断<sup>[17]</sup>,即:根据阳性细胞在组织细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果。按显色细胞数记分:无阳性细胞记为 0 分,阳性细胞数<1/3 为 1 分,阳性细胞数 1/3~2/3 为 2 分,阳性细胞数 $\geq$ 2/3 为 3 分;按细胞显色深浅记分,无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两项积分相乘,0 为(-),1~2 为(+),3~4 为(++),6~9 为(+++)。

### 1.3 实时荧光定量 PCR 检测

在冰上将各组样本分离,TRIZOL 试剂盒提取总 RNA。用分光光度法测定 RNA 浓度与纯度,-80℃保持备用。Superscript 逆转录试剂盒合成第一链 cDNA。QPCR 扩增体系总反应体系为 10 $\mu$ l,其中 SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 5 $\mu$ l,正反引物各 0.3 $\mu$ l,cDNA 2 $\mu$ l,无核酶水 2.4 $\mu$ l。针对 HIF-1 $\alpha$ 、Mipu1 设计的特异性正反引物见 Table 1;扩增反应共进行 39 个循环。反应完成后由软件自动进行基线调整并将获取的数据进行自动分析,之后软件会算出达到阈值的最低循环数比(Ct 值),实验中对每个标本针对目的基因测量 3 次,对获取的 Ct 值取平均后再采用相对表达量算法对各组基因 mRNA 表达量进行比较分析。

Table 1 PCR primer design sequence

| Goal gene      | Genebank | Primer sequence                                        |
|----------------|----------|--------------------------------------------------------|
| HIF-1 $\alpha$ | AF057308 | 5'-CACAAATCAGCACCAAGC-3'<br>5'-AGTGTACCCTAACTAGCCG-3'  |
| Mipu1          | AY221750 | 5'-AAGACCAAGCGAGACCAG-3'<br>5'-AATCCAAGGCACCTATAACA-3' |
| GAPDH          | M32599   | 5'-GCTGTAGCCAAATCGTTGT-3'<br>5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGA-3'  |

### 1.4 免疫印迹分析检测方法

将三组标本加液氮磨碎,按常规方法用贝博公司的核蛋白提取试剂盒提取总蛋白。用 BCA 法进行

蛋白定量。制作出 5%的浓缩胶和 10%分离胶后对蛋白混合液进行不连续电泳分离蛋白，将分离后的蛋白进行抗体孵育和化学发光法显色。用 Mipu1 灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值、HIF-1 $\alpha$  灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值表示 Mipu1 及 HIF-1 $\alpha$  相对表达水平。

1.5 统计学处理

采用统计软件 SPSS20.0 进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较应用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析;两基因的相关性分析采用 Pearson 法;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化检测不同组间 HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 表达情况

三组标本进行免疫组化检测后，通过 400 倍镜下观测,对照组中细胞形态基本正常,不存在明显的细胞核异型性和细胞排列不密集,且其中着色较少,HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 的表达为(+)。低级别组中能明显看到细胞密集度明显增高,且存在核异型表现,细胞坏死表现不明显,符合胶质瘤 I~II 级表现,且核染色也较为明显且增多,HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 的表达为(++)。高级别组中,可以明显观察到细胞大量密集且排列紊乱,细胞核固缩坏死明显增多,细胞核异型

性明显,且存在血管反应表现,符合胶质瘤 III~IV 级表现,核染色明显增多且细胞间质内也可见到多量的着色颗粒,HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 的表达为(+++)。见 Figure 1。

2.2 实时荧光定量 PCR 检测不同组间 HIF-1 $\alpha$  及 Mipu1 表达情况

HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 的 mRNA 相对表达量组间差异有统计学意义(*P*<0.05),见 Table 2。HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 的 mRNA 相对表达量随着胶质瘤病理级别升高而升高(Figure 2)。对三组数据进行 Pearson 相关性分析,表明 HIF-1 $\alpha$  与 Mipu1 呈正相关(*r*=0.98,*P*<0.05)。

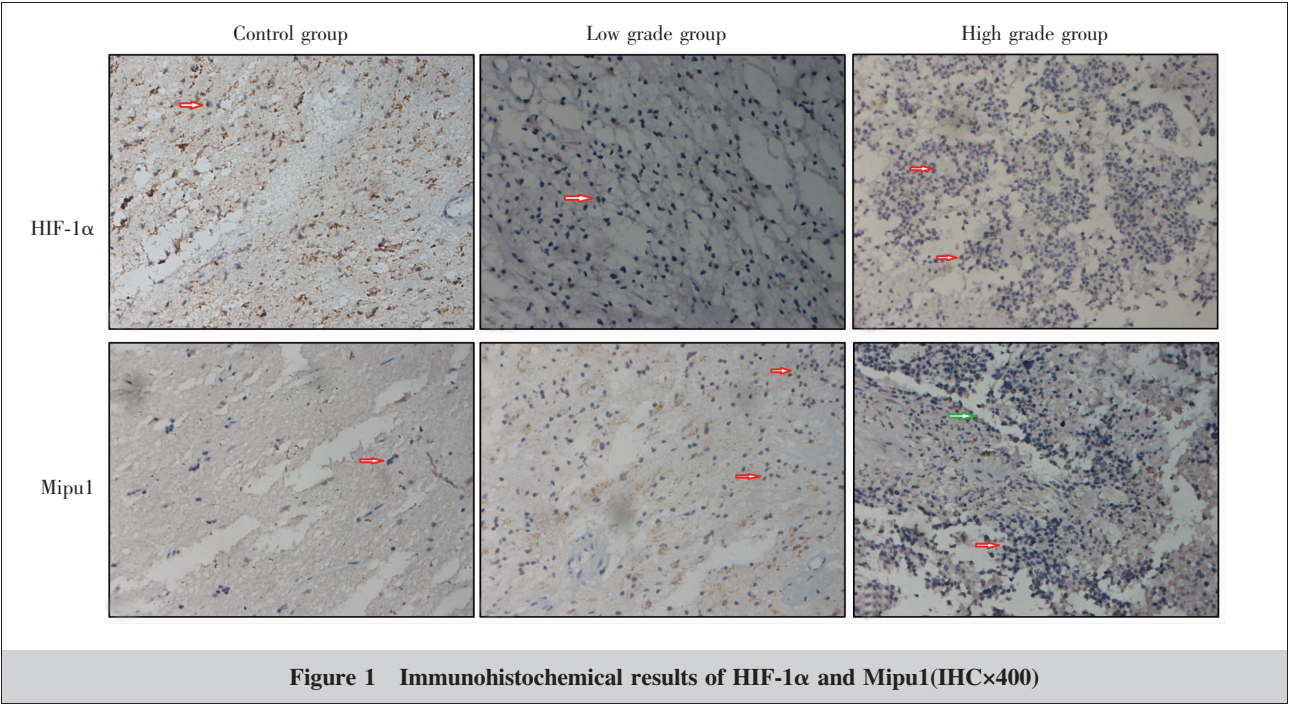
Table 2 Relative expression of mRNA in each gene

| Group            | Sample number | Relative expression of mRNA  |                              |
|------------------|---------------|------------------------------|------------------------------|
|                  |               | HIF-1 $\alpha$               | Mipu1                        |
| Control group    | 10            | 1.00 $\pm$ 0.10              | 1.00 $\pm$ 0.04              |
| Low grade group  | 12            | 2.33 $\pm$ 0.17 <sup>#</sup> | 2.12 $\pm$ 0.15 <sup>#</sup> |
| High grade group | 12            | 4.87 $\pm$ 0.22 <sup>*</sup> | 4.49 $\pm$ 0.37 <sup>*</sup> |

Note:<sup>#</sup>;compared with the control group,*P*<0.05.<sup>\*</sup>;compared with low grade group,*P*<0.01.

2.3 Western-blot 检测不同组间 HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 表达情况

HIF-1 $\alpha$  和 Mipu1 的蛋白表达量在 3 组间差异有统计学意义,两种基因的蛋白表达量随着胶质瘤病理级别的升高而升高(见 Figure 3,Figure 4)。两种基因不同组别的相对蛋白表达量经 Pearson 相关



性分析进行分析,结果显示两者呈正相关( $r=0.96$ ,  $P<0.01$ )。

### 3 讨论

脑胶质瘤作为脑内原发最常见的恶性肿瘤,死亡率极高<sup>[18]</sup>;在恶性肿瘤中存在众多细胞调控通路的异常,而 HIF-1 $\alpha$  作为肿瘤细胞中重要的转录因子,其可调节多达 200 个左右的基因<sup>[19]</sup>,其异源二聚体的结构构包含了敏感的  $\alpha$  亚基和非氧敏感的  $\beta$  亚基,其中  $\alpha$  亚基在氧调节下,通过与下游基因的结合发挥对下游基因的多种调控作用。其可能影响到胶质瘤的发生发展的多个环节,包括:(1)参与肿瘤内血管形成全过程,其通过对血管内皮生长因子(VEGF)的控制调节<sup>[20]</sup>,促进胶质瘤内血管内皮细胞的增殖,迁移,侵袭以及血管通透性的增加,从而为胶质瘤内的血管形成创造了条件;(2)参与细胞能量代谢,增强糖酵解<sup>[21]</sup>;(3)调节细胞的凋亡及增殖,有研究表明通过 HIF-1 $\alpha$  途径对细胞增殖产生促进作用的同时又能对细胞的分化产生抑制作用<sup>[22]</sup>。说明 HIF-1 $\alpha$  在胶质瘤细胞非控制性生长调节中有着重要的地位。HIF-1 $\alpha$  在人体多种细胞内存在,特异性一般,而新发现的 Mipu1 证实在大脑和心脏组织内大量表达,而在其他人体组织细胞内表达量极少<sup>[23]</sup>。相关研究表明 Mipu1 通过多种途径抑制细胞的凋亡过程,其中有 Mipu1 可能通过抑制 AP-1 的表达从而抑制丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路介导的细胞凋亡功能<sup>[24]</sup>。也有研究表明 Mipu1 抑制线粒体凋亡通路相关的促凋亡基因 *Bax*<sup>[25]</sup>,其通过直接抑制 *Bax* 的表达,间接促进了 *Bcl-2* 抗凋亡基因的表达,从而阻断线粒体凋亡信号相关通路。Mipu1 可能通过以上调节方式抑制心肌细胞凋亡。考虑 Mipu1 在心肌和脑内大量表达,且其与抑制细胞凋亡密切相关,由此推测其在脑组织特别是胶质瘤细胞中起到重要抗凋亡的作用,通过生物信息软件对 Mipu1 中 1.5kb 的启动子序列进行筛查分析后发现,其启动子序列当中存在着数个转录因子可能的结合位点,其中-ctCACGTGgccat-是 HIF-1 的结合序列,该序列中包含有保守的 HRE(5'-RCGTG-3'),根据现阶段的基础研究以及生物学分析我们可以认为 HIF-1 $\alpha$  在转录水平对 Mipu1 的表达进行调控,并且王慷慨等<sup>[16]</sup>已通过细胞实验初步证明 HIF-1 $\alpha$  通过上调 Mipu1 的表达以调控其对心肌细胞的保护作用。HIF-1 $\alpha$  在调节 Mipu1 上可能有重要作用,本实验目

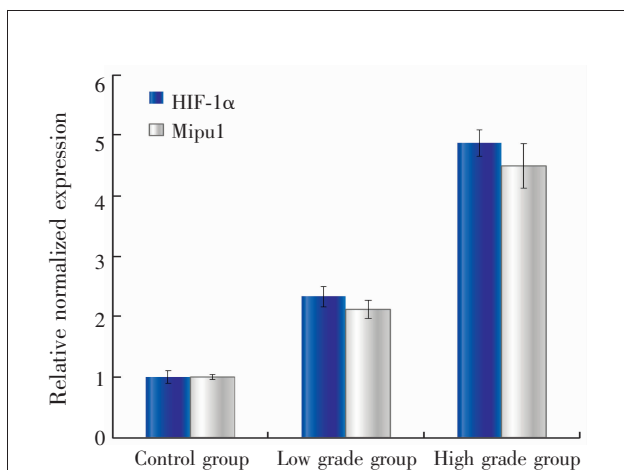


Figure 2 QPCR results of HIF-1 $\alpha$  and Mipu1 in different group

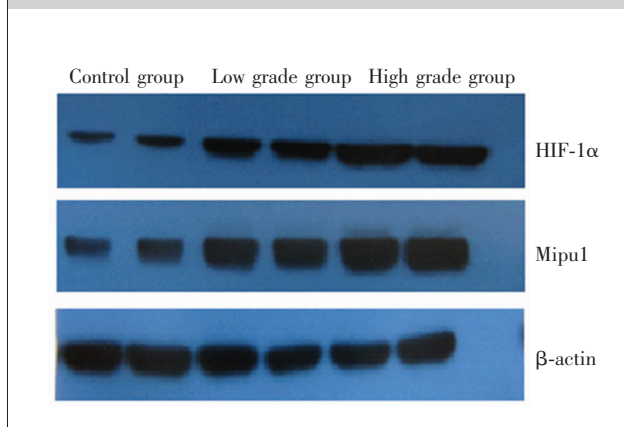


Figure 3 Western-blot detection results of HIF-1 $\alpha$  and Mipu1 in different group

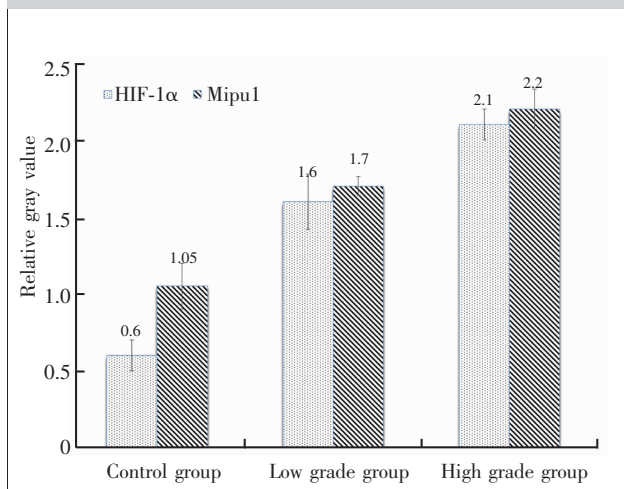


Figure 4 Expression of HIF-1 $\alpha$  and Mipu1 in different group

的在于探讨胶质瘤细胞中是否存在 HIF-1 $\alpha$  与 Mip1 抑制细胞凋亡通路的可能。

本实验通过对不同级别胶质瘤组织标本中的 HIF-1 $\alpha$  及 Mip1 进行免疫组化检测,在镜下可以明确 HIF-1 $\alpha$  以及 Mip1 大部分着色于细胞核中,且随着胶质瘤级别升高,染色的细胞核越多;说明 Mip1 与 HIF-1 $\alpha$  均是定位于核内并发挥相关作用,这与袁盾等<sup>[14,15]</sup>在 Mip1 的前期研究结论,即 Mip1 是定位于细胞核内并发挥转录调节作用结果一致。同时本研究也直观的发现随着胶质瘤级别的升高, HIF-1 $\alpha$  及 Mip1 的表达阳性程度均明显增强。

为了进一步证明两者表达随着胶质瘤级别升高而升高,针对同一批标本中不同级别组的胶质瘤组织同时进行 HIF-1 $\alpha$  和 Mip1 的 QPCR 及 West-bolt 检测。通过对检测获得的数据进行统计学分析,在实时荧光定量核酸扩增后发现 HIF-1 $\alpha$  以及 Mip1 的 mRNA 相对表达量随着胶质瘤的病理级别升高而变化。而 West-blot 中 HIF-1 $\alpha$  及 Mip1 的蛋白相对表达量结果也有相同变化;由此证实 HIF-1 $\alpha$  及 Mip1 蛋白表达量随着胶质瘤级别升高而增高。

且本研究显示两者在人脑胶质瘤发生中呈明显正相关,说明两者在胶质瘤细胞的发生发展中可能存在着不可忽视的相关联系。现有关于 HIF-1 $\alpha$  的研究一直提示在细胞缺氧的环境中,其发挥着双重作用,而对这种作用机制的了解仍在持续深入。虽然本实验表明了 HIF-1 $\alpha$  与 Mip1 在胶质瘤的发生发展可能存在正相关,而关于 HIF-1 $\alpha$  与 Mip1 在胶质瘤中以何种途径发挥作用尚缺乏研究,希望未来进一步的研究可以阐明两者的靶向分子作用机制。本研究为 HIF-1 $\alpha$  在胶质瘤细胞凋亡中的作用提供了一种新的思路,由于 HIF-1 $\alpha$  在多种细胞中表达,针对 HIF-1 $\alpha$  为靶点的治疗可能产生较大的副作用,而 Mip1 在心、脑中特异性大量表达,针对 Mip1 为靶点的治疗可能在未来成为针对胶质瘤治疗新的研究方向。

## 参考文献:

- [1] Li B, Zhao G, Cheng P, et al. The accuracy of survival time prediction for patients with glioma is improved by measuring mitotic spindle checkpoint gene expression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):625-631.
- [2] Abdullah A, El Shitany H, Abbass W, et al. Surgical resection of low-grade gliomas in eloquent areas with the guidance of the preoperative functional magnetic resonance imaging and craniometric points [J]. *J Neurosci Rural Pract*, 2016, 7(4):571-576.
- [3] Tovar-Spinoza Z, Choi H. MRI-guided laser interstitial thermal therapy for the treatment of low-grade gliomas in children: a case-series review, description of the current technologies and perspectives [J]. *Childs Nerv Syst*, 2016, 32(10):1947-1956.
- [4] Ducassou A, Gambart M, Munzer C, et al. Long-term side effects of radiotherapy for pediatric localized neuroblastoma[J]. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 2015, 191(7):1-9.
- [5] Seidlitz A, Siepmann T, Löck S, et al. Impact of waiting time after surgery and overall time of postoperative radiochemotherapy on treatment outcome in glioblastoma multiforme[J]. *Radiat Oncol*, 2015, 10(1):1-10.
- [6] Castro MG, Candolfi M, Kroeger K, et al. Gene therapy and targeted toxins for glioma[J]. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(3):155-180.
- [7] Reisoli E, Gambini E, Appolloni L, et al. Efficacy of HER2 retargeted herpes simplex virus as therapy for high-grade glioma in immunocompetent mice [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(11):788-795.
- [8] Ai Z, Lu Y, Qiu S, et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism[J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(1):36-44.
- [9] Huang X, Yang K, Zhang Y, et al. Quinolinic acid induces cell apoptosis in PC12 cells through HIF-1-dependent RTP801 activation[J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(2):435-444.
- [10] López-Hernández B, Ceña V, Posadas I. The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signalling pathways are involved in the neuronal damage caused by chemical hypoxia[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(11):2838-2851.
- [11] Yuan C, LV QL, Chen GW, et al. Identification of genes up-regulated during myocardial ischemic preconditioning in rats [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2003, 30(3):390-394. [袁灿, 吕青兰, 陈广文, 等. 大鼠心肌缺血预适应诱导表达上调基因的筛选和鉴定. *生物化学与生物物理进展* [J]. 2003, 30(3):390-394.]
- [12] Wang G1, Zuo X, Liu J, et al. Expression of mip1 in response to myocardial infarction in rats [J]. *Mol Sci*, 2009, 10(2):492-506.
- [13] Yuan C, Wang QP, Liu Y, et al. Effects of new gene Mip1 over-expression on the cell growth cycle of c2c12 cells cultured under condition of serum withdrawal [J]. *Journal of Clinical Research*, 2004, 22 (s):837-839. [袁灿, 王秋

- 鹏,刘瑛,等.新基因 Mip1 的过表达对去血清培养条件下 C2C12 细胞生长周期的影响 [J]. 医学临床研究, 2004,22(s):837-839.]
- [14] Yuan D,Yuan XR,Liu Y,et al. The subcellular localization of Mip1 in brain astrocytoma cells[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery,2006,12(3):164-167.[袁盾,袁贤瑞,刘瑛,等.Mip1 蛋白在脑星形细胞瘤中的亚细胞定位[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2006,12(3):164-167.]
- [15] Wang Z,Gu LB,Liu HH,et al. Expression of Mip1 in human brain astrocytomas and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research, 2013,12(1):37-40.[王智,谷良标,刘鸿慧,等. Mip1 在人脑星形细胞瘤中的表达及临床意义初步探讨[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2013,12(1):37-40.]
- [16] Wang K,Lei J,Zou J,et al.Mip1,a novel direct target gene,is involved in hypoxia inducible factor 1 mediated cytoprotection.[J]. PLoS One,2013,8(12):e82827.
- [17] Friedrichs K,Gluba S,Eidtmann H,et al. Overexpression of P53 and prognosis in breast cancer [J]. Cancer, 1993,72:3641-3647
- [18] Gzell C,Wheeler H,Huang D,et al. Proliferation Index predicts survival after second craniotomy within 6 months of adjuvant radiotherapy for high-grade glioma[J]. Clin Oncol(R Coll Radiol),2016,28(3):215-222.
- [19] Kitajima Y,Miyazaki K. The critical impact of HIF-1α on gastric cancer biology[J]. Cancers(Basel),2013,5(1):15-26.
- [20] Zhang J,Lu A,Li L,et al.p16 Modulates VEGF expression via its interaction with HIF-1α in breast cancer cells [J].Cancer Invest,2010,28(6):588-597.
- [21] Cheng Y,Chen G,Hong L,et al. How does hypoxia inducible factor-1α participate in enhancing the glycolysis activity in cervical cancer? [J]. Ann Diagn Pathol,2013,17(3):305-311.
- [22] Li Z,Bao S,Wu Q,et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells [J]. Cancer Cell,2009,15(6):501-513.
- [23] Yuan C,Zhang HL,Liu Y,et al.Cloning and characterization of a new gene Mip1 up-regulated during myocardial ischemia-reperfusion [J].Progress in Biochemistry and Biophysics,2004,31(3):231-236.[袁灿,张华莉,刘瑛,等.一个大鼠心肌缺血-再灌注诱导表达上调的新基因 Mip1 的克隆和特性分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004,31(3):231-236.]
- [24] Wang G,Zuo X,Yuan C,et al. A novel rat zinc-finger protein,inhibits transcriptional activities of AP-1 and SRE in mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem,2009,322(1-2):93-102.
- [25] Jiang L,Wang H,Shi C,et al. ZNF667/Mip1 is a novel anti-apoptotic factor that directly regulates the expression of the rat Bax gene in H9c2 cells.[J]. PLoS One,2014,9(11):e111653.

## 《肿瘤学杂志》关于提交“作者投稿无学术不端行为承诺书”的申明

本刊已开通网上在线投稿系统(<http://www.chinaoncology.cn>),作者登录网站后,请在左上角选择《肿瘤学杂志》,选中后进入首页,首次投稿作者请先注册,在完成稿件上传、作者信息填写等程序后,请您在网站首页(<http://www.chinaoncology.cn>)“下载中心”栏中下载《肿瘤学杂志》的“作者投稿无学术不端行为承诺书文档”,填写后1周内连同单位介绍信、基金证明复印件快递寄至本刊编辑部,本刊确认收到上述材料后,该文稿才能进入审稿编辑流程。