

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.08.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220216.1053.026.html\(2022-02-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220216.1053.026.html(2022-02-16))HIF1 α /HIF2 α 经 EGF 调控胶质瘤细胞化疗抵抗机制研究*杜 军^{1,2}, 汪 攀¹, 龚 胜¹, 赵 璐¹, 郭海燕¹, 廖 彬^{1 Δ}

(1. 重庆市人民医院神经外科 401147; 2. 重庆市黔江中心医院神经外科 409000)

[摘要] **目的** 通过体外实验探讨低氧诱导因子 1 α (HIF1 α)和 HIF2 α 经表皮生长因子(EGF)调控胶质瘤细胞化疗抵抗的机制。**方法** 采用 CRISPR-CAS9 系统单独或同时敲除 U87 细胞 HIF1 α 和 HIF2 α 表达(分为 HIF1 α 单独敲除组、HIF2 α 单独敲除组、HIF1 α /HIF2 α 同时敲出组),另设未转染的 U87 细胞为对照组。缺氧或常氧培养各组细胞并给予替莫唑胺(TMZ)处理,检测各组细胞毒性率和凋亡率。缺氧培养 HIF1 α /HIF2 α 同时敲出组的 U87 细胞,RT-qPCR 检测 EGF mRNA 表达水平,进一步在培养基中添加 EGF 后予以 TMZ 处理,检测细胞毒性率和凋亡率。**结果** Western blot 提示 U87 细胞 HIF1 α 和 HIF2 α 敲除成功。缺氧条件下,HIF1 α 和 HIF2 α 单独敲除组及 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组 EGF 表达水平较对照组显著降低($P<0.05$),HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组 EGF 表达水平也低于 HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组($P<0.05$)。缺氧条件下,TMZ 处理的 HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组的细胞毒性率与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞毒性率高于对照组及 HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组($P<0.05$);TMZ 处理的 HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组及 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞凋亡率均高于对照组($P<0.05$),HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞凋亡率高于 HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组。缺氧条件下,HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组添加 EGF 后,TMZ 处理的细胞毒性率和细胞凋亡率均低于未添加 EGF 的 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组($P<0.05$)。**结论** HIF1 α 和 HIF2 α 经 EGF 促进胶质瘤细胞化疗抵抗。

[关键词] 胶质瘤;低氧诱导因子 1 α ;低氧诱导因子 2 α ;表皮生长因子;缺氧;化疗抵抗**[中图分类号]** R739.41**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)08-1261-05Study on the mechanism of HIF1 α /HIF2 α regulating glioma cell chemotherapy resistance via EGF*DU Jun^{1,2}, WANG Pan¹, GONG Sheng¹, ZHAO Lu¹, GUO Haiyan¹, LIAO Bin^{1 Δ}

(1. Department of Neurosurgery, Chongqing General Hospital, Chongqing 401147, China;

2. Department of Neurosurgery, Qianjiang Central Hospital, Chongqing 409000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) and HIF2 α via epidermal growth factor (EGF) on the chemotherapy resistance of glioma cells through in vitro experiments. **Methods** CRISPR-CAS9 system was used to knock out HIF1 α and HIF2 α in U87 cells alone or simultaneously (the HIF1 α knockout alone group, the HIF2 α knockout alone group, the HIF1 α /HIF2 α simultaneously knockout group), and additional untransfected U87 cells were set as control group. Temozolomide (TMZ) was administered to detect the cytotoxicity and apoptosis rates in each group. After U87 cells of the HIF1 α and HIF2 α simultaneously knockout group were cultured under hypoxia, EGF mRNA expression level was detected by RT-qPCR. TMZ was treated after EGF was added, then the cytotoxicity and apoptosis of cells of the HIF1 α /HIF2 α simultaneously knockout group were detected. **Results** The results of Western blot showed that HIF1 α and HIF2 α were knocked out successfully in U87 cells. Under hypoxia, the expression level of EGF in HIF1 α and HIF2 α knockout alone groups and the HIF1 α /HIF2 α simultaneously knockout group were lower than that in the control group ($P<0.05$), the expression level of EGF in HIF1 α /HIF2 α knockout simultaneously group were lower than that in the HIF1 α and HIF2 α knockout alone groups ($P<0.05$). Under hypoxia, the cytotoxicity rate of TMZ to HIF1 α and HIF2 α knockout alones group was no different from that of the control group ($P>0.05$). The cytotoxicity rat of TMZ to HIF1 α /HIF2 α knockout simultaneously group

* 基金项目:重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(20200133);重庆市人民医院医学科技创新基金(Y2020MSXM03)。 作者简介:杜军(1977—),副主任医师,本科,主要从事肿瘤耐药机制方面研究。 Δ 通信作者, E-mail: liaobin@tmmu.edu.cn。

was higher than that of the control group, the HIF1 α and HIF2 α knockout alone groups ($P < 0.05$). The apoptosis of HIF1 α and HIF2 α knockout alone and simultaneously groups were higher than that of control group ($P < 0.05$), while the apoptosis rate of HIF1 α /HIF2 α simultaneously knockout group was higher than that of HIF1 α and HIF2 α knockout alone groups. Under hypoxia, the cytotoxicity and apoptosis of HIF1 α /HIF2 α knockout simultaneously group supplemented with EGF were lower than those without EGF ($P < 0.05$). **Conclusion** HIF1 α and HIF2 α can promote chemotherapy resistance in glioma cells by regulating the expression of EGF.

[Key words] glioma; hypoxia-inducible factor 1 α ; hypoxia-inducible factor 2 α ; epidermal growth factor; hypoxia; resistance to chemotherapy

胶质瘤作为颅内常见的肿瘤,预后差并且易复发,既往研究认为这与肿瘤组织的缺氧微环境关系密切^[1-2]。肿瘤组织缺氧微环境主要由低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF1 α) 和低氧诱导因子 2 α (hypoxia inducible factor-2 α , HIF2 α) 参与调控^[3-5], 随着肿瘤的进展, HIF2 α 对肿瘤生长的影响减弱, 而 HIF1 α 变得越来越重要^[6-7]。因此针对 HIF1 α 的药物开发成为研究热点之一, 旨在抑制患者肿瘤的生长^[8]。不幸的是, 这种靶向治疗并不成功, 它并不能显著抑制肿瘤体积, 因此, 本研究通过 HIF1 α 和 HIF2 α 单独敲除以及同时敲除来探究其原因。

表皮生长因子 (Epidermal growth factor, EGF) 在缺氧条件下高水平表达, 并通过 EGF 受体 (EGFR) 和磷脂酰肌醇激酶/丝氨酸苏氨酸激酶 (PI3K/AKT) 信号通路调控胶质瘤生长^[9-10]。有研究认为, 缺氧微环境下肿瘤高表达 EGF, 其与 EGFR 结合, 从而激活 PI3K/AKT 信号通路, 诱导 HIF1 α 稳定表达, 促进肿瘤恶性进展^[11-12]。然而, 很少有研究 HIF1 α /HIF2 α 与 EGF 之间的相互关系, 本研究旨在通过体外实验探讨 HIF1 α 和 HIF2 α 经 EGF 调控胶质瘤细胞化疗抵抗的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

U87 细胞和 293T 细胞购于中国科学院上海细胞库。DMEM 高糖培养基、0.25% 胰酶和胎牛血清购于美国 Gibco 公司。乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 购于中国阿拉丁公司。鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自上海生工生物科技股份有限公司, 鼠抗人 HIF1 α 单克隆抗体和鼠抗人 HIF2 α 单克隆抗体购于美国 Abcam 公司。人 EGF 细胞因子购于美国 R&D Systems 公司。LentiCRISPRv2、pMD2.G 及 psPAX2 质粒购于美国 Addgene 公司。

1.2 细胞培养及 HIF1 α 和 HIF2 α 基因敲除

U87 细胞采用含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基, 于饱和湿度、5% CO₂、95% N₂、37 °C 条件下培养。缺氧培养条件为饱和湿度、1% O₂、5% CO₂、94% N₂、37 °C。在 <https://chopchop.cbu.uib.no/> 网站查得 CRISPR/CAS9 敲除靶序列, HIF1 α 的靶序列为: 5'-GAA CTC ACA TTA TGT GGA AGT GG-

3', HIF2 α 的靶序列为: 5'-CTT GGA GGG TTT CAT TGC CGT GG-3'。根据 LentiCRISPRv2 质粒说明书合成带 BsmB I 酶切位点的靶序列 DNA 片段, 进一步克隆至 LentiCRISPRv2 质粒中, 对上述质粒测序并验证插入片段, 测序结果正确后将其与 pMD2.G 和 psPAX2 质粒共转染至 293T 细胞行慢病毒包装。浓缩纯化的病毒感染细胞后添加嘌呤霉素予以药物抗性筛选。根据敲除情况分为 HIF1 α 单独敲除组、HIF2 α 单独敲除组、HIF1 α /HIF2 α 同时敲出组, 另设未转染的 U87 细胞为对照组。

1.3 Western blot 检测 HIF1 α 和 HIF2 α 表达

各组细胞常氧或缺氧培养 24 h 后, 收集细胞提取总蛋白并用 BCA 法测浓度, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳 1 h, 再冰浴电转 2 h 至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜。10% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。一抗 β -actin (1:2 000)、HIF1 α (1:1 000) 和 HIF2 α (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, 洗涤后化学发光拍照, 分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为内参。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 EGF mRNA 表达变化

各组细胞常氧或缺氧培养 24 h 后, 收集细胞使用 TRIzol 提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 以 β -actin 作为内参。引物序列为, EGF 正向引物 5'-GCC CCC CTG CCT CCT CCA AGT G-3', 反向引物 5'-GGG GGT GGA GTA GAG TCA GGG CAA -3'; β -actin 正向引物 5'-ACC CGC CGC CAG CTC ACC-3', 反向引物 5'-GGG GGG CAC GAA GGC TCA TC-3'。反应条件: 95 °C, 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 反应体系: 2 $\times$ SYBR Mix (10.0 μ L)、正向引物 (0.4 μ L)、反向引物 (0.4 μ L)、cDNA (50 ng)、ddH₂O 补至 20 μ L。通过 Bio-Rad CFX Manager Software 软件分析得到 EGF mRNA 表达水平。

1.5 ELISA 检测培养上清液中 EGF 水平变化

各组细胞常氧或缺氧培养 72 h, 收集上清液 500 $\times$ g 离心 5 min 去掉细胞碎片。标准品及标本 100 μ L 加入孔中, 37 °C 孵育 1 h; 吸取上清液后加入 100 μ L 检测溶液 A, 37 °C 孵育 1 h; 洗板 3 次后, 加入 100 μ L 检测溶液 B, 37 °C 孵育 30 min; 洗板 3 次后, 加入 90 μ L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物溶液, 37

℃避光显色 10~20 min,加入 50 μ L 终止液后用酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A)值。根据标准品 A 值,建立浓度-A 值标准曲线,计算出各组细胞培养上清液中 EGF 浓度。

1.6 细胞毒性检测

各组细胞按 1×10^4 /孔细胞接种 96 孔板,加入不同浓度 TMZ(400、800 μ mol/L)再常氧或缺氧培养 72 h 再进行乳酸脱氢酶(LDH)释放检测,96 孔板 $400 \times g$ 离心 5 min,取 120 μ L 上清液于另一 96 孔板,各孔加入 60 μ L LDH 检测工作液,室温避光孵育 30 min,酶标仪检测 490 nm 处 A 值。计算各组细胞毒性:细胞毒性率(%)=(处理样品 A 值-样品对照孔 A 值)/(细胞最大酶活性 A 值-样品对照孔 A 值) $\times 100$ 。细胞最大酶活性 A 值为 TMZ 药物处理的细胞孔经裂解后检测 LDH 的 A 值。

1.7 细胞凋亡率检测

各组细胞缺氧培养 24 h 后,添加 TMZ(200 μ mol/L)再缺氧培养 72 h,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。细胞经消化为单个细胞后取 1×10^5 个细胞重悬于 100 μ L 预冷 PBS 中, $300 \times g$ 离心 5 min,弃上清液;加入 195 μ L 结合缓冲液和 5 μ L Annexin V-FITC 重悬细胞,室温避光孵育 15 min, $300 \times g$ 离心 5 min,弃上清液;加入 190 μ L 结合缓冲液及 10 μ L 碘化丙啶(PI)溶液重悬细胞,室温避光孵育 10 min 后冰上放置并进行流式检测,保存数据并进行统计分析。

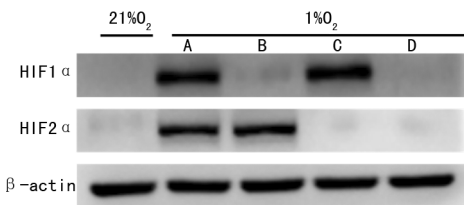
1.8 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Western blot 验证 U87 细胞 HIF1 α 、HIF2 α 敲除效果

缺氧条件下,HIF1 α 单独敲除组 HIF1 α 表达水平降低,HIF2 α 单独敲除组 HIF2 α 表达水平降低,HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组 2 个蛋白表达水平均降低,见图 1。



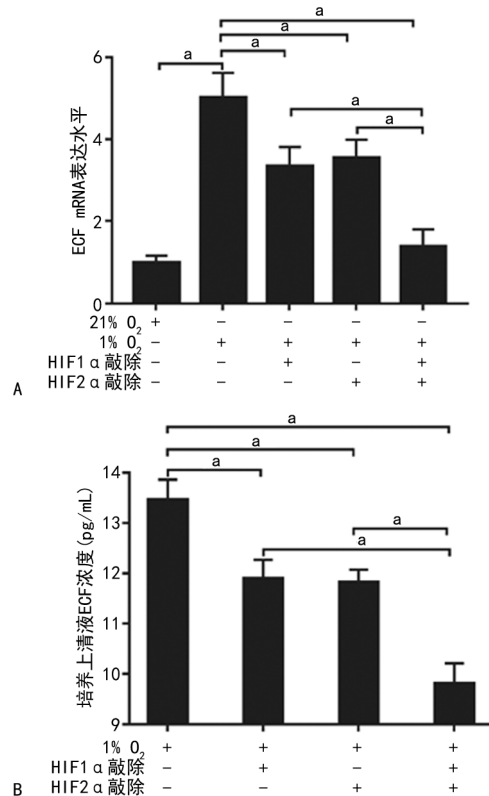
A: 对照组; B: HIF1 α 单独敲除组; C: HIF2 α 单独敲除组; D: HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组。

图 1 U87 细胞 HIF1 α 和 HIF2 α 敲除后 Western-blot 检测

2.2 U87 细胞 HIF1 α 和 HIF2 α 敲除后 EGF 表达检测

U87 细胞 EGF mRNA 表达水平缺氧条件较常氧条件显著升高($P < 0.05$);缺氧培养 24 h 后,

HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组及 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组 EGF mRNA 表达水平低于对照组($P < 0.05$),且 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组也低于 HIF1 α 和 HIF2 α 单独敲除组($P < 0.05$);缺氧培养 72 h 后,HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除及 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞培养上清液中 EGF 浓度低于对照组($P < 0.05$),同时 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组 EGF 浓度也低于 HIF1 α 和 HIF2 α 单独敲除组($P < 0.05$)。见图 2。



A:PCR 检测 EGF mRNA 结果分析;B:ELISA 检测培养上清液中 EGF 浓度结果分析;^a: $P < 0.05$ 。

图 2 U87 细胞 HIF1 α 和 HIF2 α 敲除后 EGF 表达检测

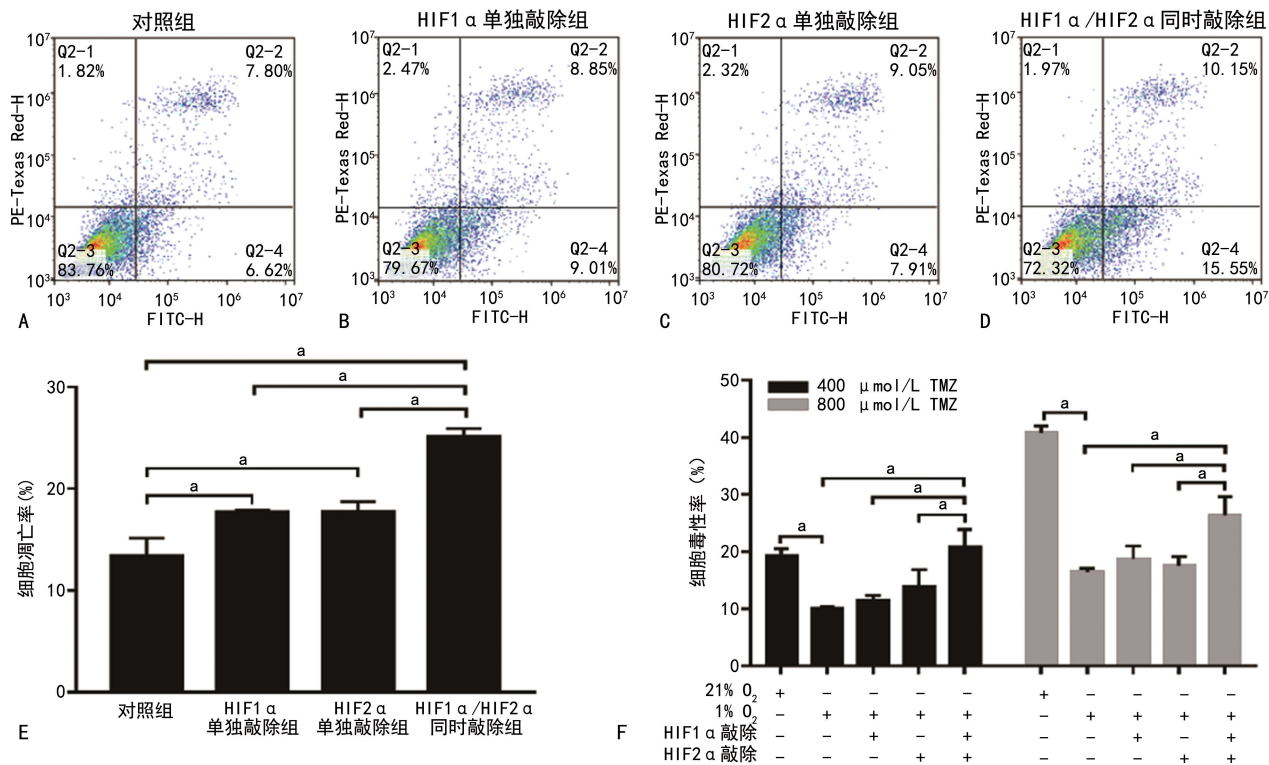
2.3 U87 细胞 HIF1 α 和 HIF2 α 敲除后 TMZ 对其细胞毒性的检测

TMZ(400、800 μ mol/L)处理对 U87 细胞毒性率缺氧培养比常氧培养明显降低($P < 0.05$);缺氧培养 72 h,HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组细胞毒性率较对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞毒性率较对照组及 HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组升高($P < 0.05$)。TMZ(200 μ mol/L)处理并缺氧培养 72 h,HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组及 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞凋亡率均高于对照组($P < 0.05$),且 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞凋亡率高于 HIF1 α 、HIF2 α 单独敲除组($P < 0.05$)。见图 3。

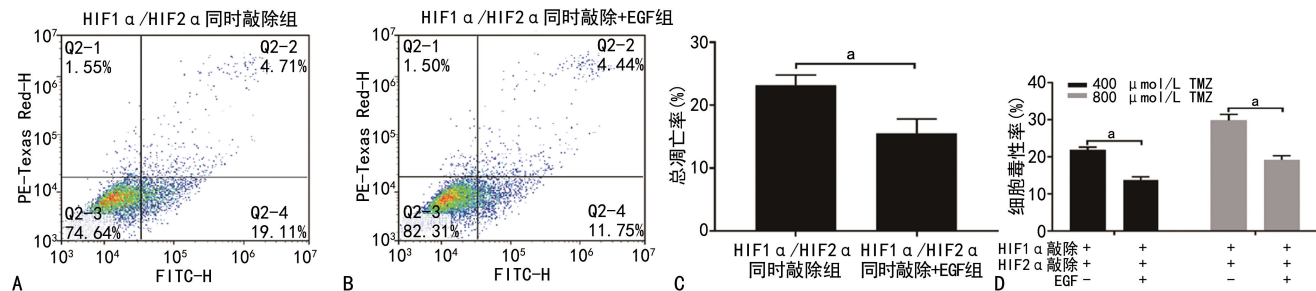
2.4 EGF 对 HIF1 α 和 HIF2 α 同时敲除组细胞毒性率和凋亡率的影响

在 TMZ(400、800 μ mol/L)处理并缺氧培养 72 h 的 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞加入 EGF(20 ng/mL),细胞的细胞毒性率和细胞凋亡率(TMZ 200

$\mu\text{mol/L}$ 明显低于未加入 EGF 的细胞($P<0.05$)。见图 4。



A~D:细胞凋亡检测图;E:细胞凋亡检测统计分析结果;F:细胞毒性检测统计分析结果;^a: $P<0.05$ 。
图 3 U87 细胞 HIF1 α 和 HIF2 α 敲除后细胞凋亡和细胞毒性检测



^a: $P<0.05$;A,B:细胞凋亡检测图;C:细胞凋亡检测统计分析结果;D:细胞毒性检测统计分析结果。

图 4 EGF 对 HIF1 α /HIF2 α 同时敲除组细胞毒性和细胞凋亡的影响

3 讨 论

由于肿瘤组织血管无序化和肿瘤细胞高代谢,所以胶质瘤细胞始终处于一个缺氧的微环境中^[13]。已有研究证实,缺氧微环境可促进肿瘤细胞增殖及维持胶质瘤干细胞干性从而抑制凋亡及产生化疗抵抗^[14]。而在缺氧微环境中,HIF1 α 和 HIF2 α 起主要调控作用^[5]。因此,抑制 HIF1 α 或 HIF2 α 可抑制肿瘤的发生发展及复发。例如,抑制 HIF1 α 表达可增加胶质瘤细胞对化疗药物的敏感性^[7],而靶向胶质瘤干细胞中的 HIF2 α 可降低肿瘤的复发^[15]。因此,这些研究强烈支持开发 HIF 抑制剂治疗胶质瘤,因为在理论上可以抑制肿瘤的进展。一些 HIF 抑制剂已经被批准进入了临床试验阶段。然而,截至目前,还没有 HIF 靶向治疗成功治愈胶质瘤的报道。本研究在对 HIF1 α 和 HIF2 α 单独敲除之后又进行了同时敲除,均检测了在缺氧条件下 TMZ 处理对细胞毒性和凋亡的影响。

结果证实单独敲除 HIF1 α 和 HIF2 α 缺氧条件下 TMZ 处理后的细胞毒性率与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而同时敲除组较两单独敲除组和对照组细胞毒性率和细胞凋亡率均显著增高。笔者认为 HIF1 α 和 HIF2 α 均参与调控胶质瘤细胞化疗抵抗。结合课题组前期研究,缺氧条件下 HIF1 α 敲除之后 HIF2 α 蛋白表达水平升高,同时 HIF2 α 敲除之后 HIF1 α 蛋白表达水平升高^[16],所以单独敲除其中一个蛋白后另一个蛋白表达升高弥补了敲除蛋白的作用继续产生化疗抵抗。

在胶质瘤中已有报道 EGF 是 HIF1 α 的上游蛋白^[17]。而在本研究中,敲除 HIF1 α 和 HIF2 α 之后,EGF 表达水平下降。同时 HIF1 α 和 HIF2 α 同时敲除细胞培养基中添加 EGF 因子,缺氧条件下 TMZ 对细胞的毒性和细胞凋亡均降低。HIF1 α 和 HIF2 α 具有高度的同源性,并具有一些相同的靶基因,这表明它

们可能与相同的 HRE 序列结合。HIF1 α 和 HIF2 α 都含有一个保守的 DNA 结合区域,称为 bHLH-PAS 结构域,其与靶基因启动子里面 HREs 结合后促进该基因表达^[18]。因此,笔者前期研究中,已验证了在缺氧胶质瘤细胞中 HIF1 α 和 HIF2 α 可通过结合 EGF 启动子上 HRE 序列 AGGCGTGG 和 GGGCGTGG 影响 EGF 启动子活性。因此,HIF1 α 和 HIF2 α 与 EGF 之间存在反馈调控。EGF 促进 HIF1 α 的表达,相反,HIF1 α 和 HIF2 α 的上调促进 EGF 的表达。总之,HIF1 α 和 HIF2 α 可通过 EGF 调控胶质瘤的发生发展和复发,这为胶质瘤的治疗提供了新的靶点和策略。

参考文献

- [1] YUE X, LAN F M, XIA T Y. Hypoxic glioma cell-secreted exosomal miR-301a activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes radiation resistance by targeting TCEAL7[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(11):1939-1949.
- [2] WANG P, LAN C, XIONG S L, et al. HIF1 α regulates single differentiated glioma cell de-differentiation to stem-like cell phenotypes with high tumorigenic potential under hypoxia[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17):28074-28092.
- [3] 汪攀, 赵秀文, 兰川, 等. 缺氧诱导胶质瘤细胞肿瘤干样细胞形成体外初步研究[J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(7):616-622.
- [4] BARTOSZEWSKI R, MOSZYNSKA A, SEROCKI M, et al. Primary endothelial cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 and their target gene expression profiles during hypoxia[J]. *FASEB J*, 2019, 33(7):7929-7941.
- [5] HOEFFLIN R, HARLANDER S, SCHÄFER S, et al. HIF-1 α and HIF-2 α differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):4111.
- [6] YU J, SHI X, YANG C, et al. A novel germline gain-of-function HIF2A mutation in hepatocellular carcinoma with polycythemia[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(7):5781-5791.
- [7] 王俊伟, 汪攀, 邹德伟, 等. 缺氧诱导因子 1 α 调控胶质瘤细胞缺氧致化疗抵抗机制的初步研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2019, 35(9):938-945.
- [8] WEI M, MA R, HUANG S, et al. Oroxylin A increases the sensitivity of temozolomide on glioma cells by hypoxia-inducible factor 1 α /hedgehog pathway under hypoxia[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):17392-17404.
- [9] PUDELEK M, KRÓL K, CATAPANO J, et al. Epidermal growth factor (EGF) augments the invasive potential of human glioblastoma multiforme cells via the activation of collaborative EGFR/ROS-dependent signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10):3605.
- [10] BAG A K, MANDLOI S, JARMALAVICIUS S, et al. Connecting signaling and metabolic pathways in EGF receptor-mediated oncogenesis of glioblastoma[J]. *PLoS Comput Biol*, 2019, 15(8):e1007090.
- [11] ZHAO F L, QIN C F. EGF promotes HIF-1 α expression in colorectal cancer cells and tumor metastasis by regulating phosphorylation of STAT3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3):1055-1062.
- [12] ZHENG H L, WANG L H, SUN B S, et al. Oligomer procyanidins (F2) repress HIF-1 α expression in human U87 glioma cells by inhibiting the EGFR/AKT/mTOR and MAPK/ERK1/2 signaling pathways in vitro and in vivo[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49):85252-85262.
- [13] SHEN H, COOK K, GEE H E, et al. Hypoxia, metabolism, and the circadian clock: new links to overcome radiation resistance in high-grade gliomas[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):129.
- [14] PRASAD P, MITTAL S A, CHONGTHAM J, et al. Hypoxia-mediated epigenetic regulation of stemness in brain tumor cells[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(6):1468-1478.
- [15] BHAGAT M, PALANICHAMY J K, RAMALINGAM P, et al. HIF-2 α mediates a marked increase in migration and stemness characteristics in a subset of Glioma cells under hypoxia by activating an Oct-4/Sox-2- Mena (INV) axis[J]. *Int J Biochem Cell Bio*, 2016, 74:60-71.
- [16] WANG P, ZHAO L, GONG S, et al. HIF1 α /HIF2 α -Sox2/Klf4 promotes the malignant progression of glioblastoma via the EGFR-PI3K/AKT signalling pathway with positive feedback under hypoxia[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):312.
- [17] LI J J, SHEN J Y, WANG Z, et al. ELTD1 facilitates glioma proliferation, migration and invasion by activating JAK/STAT3/HIF-1 α signaling axis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):13904.
- [18] MAN J H, YU X J, HUANG H D, et al. Hypoxic induction of vasorin regulates Notch1 turnover to maintain glioma stem-like cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 22(1):104-118.