

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.007

L- 左旋肌肽诱导人肾癌 Caki-2 细胞凋亡的体外研究 *

薛 庆¹ 王 佳¹ 倪建鑫¹ 李纪君² 秦卫军¹ 袁建林^{1Δ}

(1 第四军医大学附属西京医院泌尿外科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学学员一旅 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 研究 L- 左旋肌肽诱导人肾癌 Caki-2 细胞凋亡的作用及可能机制。**方法:** 常规培养肾癌 Caki-2 细胞, 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种, 取对数生长期 Caki-2 细胞分为 L- 左旋肌肽 5、20、50 mM 处理组和空白对照组, 分别采用 L- 左旋肌肽 5、20、50 mM 和生理盐水处理 24、48h 后, 采用 MTT 法检测各组 Caki-2 细胞的增殖情况, 采用流式细胞法检测各组细胞周期和细胞凋亡情况, 采用 Western blot 方法检测各组 Caki-2 细胞 caspase-3、Bcl-2 及 HIF-1 α 蛋白的表达情况。**结果:** 与空白对照组相比, L- 左旋肌肽 5、20、50 mM 处理组在 24 h 和 48 h 的细胞存活率均显著降低($P < 0.05$), 且其对 Caki-2 细胞的生长抑制作用呈现明显的时间 - 剂量依赖关系, 其中 50 mM L- 左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 48 h 后, 细胞存活率最低。L- 左旋肌肽 5、20、50 mM 处理组在作用 48 h 后, Caki-2 细胞随着 L- 左旋肌肽作用浓度的增加, Bcl-2 和 HIF-1 α 的蛋白表达水平依次降低($P < 0.05$), 而 caspase-3 蛋白表达水平逐次提高($P < 0.05$)。**结论:** L- 左旋肌肽在体外可抑制人肾癌 Caki-2 细胞的增殖, 并诱导人肾癌 Caki-2 细胞的凋亡, 其作用机制可能与抑制 HIF-1 α 表达及激活 caspase-3 表达相关。

关键词: L- 左旋肌肽; 肾癌; 凋亡; 增殖

中图分类号: R-33; R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)04-634-05

A Study on L-carnosine-induced Apoptosis in Kidney Cancer Caki-2 Cells *in vitro**

XUE Qing¹, WANG Jia¹, NI Jian-xin¹, LI Ji-Jun², QIN Wei-jun¹, YUAN Jian-lin^{1Δ}

(1 Department of Urology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 The First Brigade, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the L-carnosine-induced apoptosis in human kidney cancer Caki-2 cells *in vitro* and its mechanism.

Methods: Human kidney cancer Caki-2 cells were cultured to $1 \times 10^4 / \text{mL}$ cell density and divided into 5, 20, 50 mM L-carnosine group and control group which were treated with 5, 20 50 mM L-carnosine and saline respectively. At 24, 48 h after treatment, MTT assay was used to detect the proliferation of Caki-2 cells, flow cytometry assay was conducted to detect the apoptosis and cell cycle of Caki-2 cells, western blot was performed to detect the protein expression of Bcl-2, HIF-1 α and caspase-3. **Results:** MTT assay showed that 5, 20, 50 mM L-carnosine could inhibit the growth of Caki-2 cells at 24 h and 48 h after treatment in a time and dose dependent manner as compared with the control group, of the cell growth inhibition ratio was the highest in the 50 mM-treated group. After Caki-2 cells were treated with 5, 20, 50 mM L-carnosine and saline for 48 h, the protein expressions of Bcl-2, HIF-1 α were gradually reduced and caspase-3 was increased correspondingly. **Conclusion:** L-carnosine could inhibit the proliferation and promote apoptosis of Caki-2 cells *in vitro*. The mechanism of which may be related to the inhibition of HIF-1 alpha signaling pathways and activation of caspase-3 signaling pathways.

Key words: L-carnosine; Kidney cancer; Apoptosis; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)04-634-05

前言

肾癌又称肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC), 起源于肾实质泌尿小管上皮, 约占成人恶性肿瘤的 2 %-3 %^[1], 是最致命的泌尿系统恶性肿瘤。肾癌并非单一种类的实体瘤, 是一类异质肿瘤群体。2004 年, 世界卫生组织将肾癌分为几个不同的亚

型: 透明细胞癌、乳头状肾细胞癌以及嫌色细胞癌, 比例分别为 70 %、10 %-15 % 和 5 %^[2]。在过去的 65 年中, 肾癌发病率以每年 2 % 的比例增长^[3], 并且根据流行病学数据, 肾癌可在所有年龄段人群发病, 但是在 35 岁以上人群发病率迅速上升, 到 75-80 岁时达到峰值。大多数的肾癌没有明显的临床症状而在体检时通过影像学发现异常^[4]。患者出现血尿、疼痛或肿块的症状。

* 基金项目: 陕西省协同创新计划项目(2015XT-53)

作者简介: 薛庆(1971-), 男, 学士, 主治医师, 主要研究方向: 泌尿系肿瘤, 男科显微镜手术、尿道类疾病、肾移植,

电话: 18602990620, E-mail: xueqing7106@126.com

Δ 通讯作者: 袁建林(1964-), 男, 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 泌尿系肿瘤诊治, E-mail: jianliny@fmmu.edu.cn, 电话: 13609123155

(收稿日期: 2017-04-27 接受日期: 2017-05-20)

状时多已属晚期。

目前,针对肾癌的治疗包括肾脏外科手术法、化疗以及放疗等。外科手术治疗肾癌主要通过肾脏全切或部分切除的方式,但治疗效果仍不甚满意;放疗和化疗副作用较大,且肾癌细胞对其均不敏感,具有较高的耐受性,因此肾癌治疗亟待更有效的治疗方式^[5]。L-左旋肌肽是一种天然的大量存在于骨骼肌当中的水溶性二肽,在肌肽合成酶的作用下由 β -丙氨酸和L-组氨酸合成^[6]。除了可作为抗氧化剂、金属螯合剂外,还具有抗蛋白质糖基化及抗炎等生物学功能^[7-13]。近年来,有研究资料表明L-左旋肌肽对肿瘤细胞的生长具有选择性抑制及细胞毒作用^[14-17],该特点对开发针对肾癌的天然抗癌制剂具有重要意义。

本研究采用人肾癌 Caki-2 细胞株在体外探讨 L-左旋肌肽对 Caki-2 细胞活力、细胞周期和凋亡的影响并初探了其相关机制,现报道如下。

1 材料与试剂

1.1 材料

人肾癌 Caki-2 细胞株(美国细胞库, ATCC);青霉素、链霉素(Salabio, 中国);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; Gibco, 美国); RPMI1640 培养基 (Gibco, 美国);BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce, 美国);Bio-Rad protein assay 和预染蛋白质分子量标准 (Bio-Rad, 美国);MTT(Sigma, 美国);Annexin V-FITC/PI 双染检测凋亡试剂盒(Beckman Coulter, 美国);碘化丙啶(propidium iodide, PI; Sigma, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肾癌 Caki-2 细胞株培养于含 10 % FBS 以及含 1 %双抗(青霉素、链霉素)的 RPMI1640 培养基中,置于 5 % CO₂、37℃孵箱中进行常规培养,并选取对数生长期细胞进行后续实验。实验分组如下:取对数生长期 Caki-2 细胞分为 L-左旋肌肽 5、20、50 mM 组和空白对照组, 分别采用 L-左旋肌肽 5、20、50 mM 和生理盐水处理。

1.2.2 MTT 法检测 L-左旋肌肽对 Caki-2 细胞活力的影响 取对数生长期 Caki-2 细胞以 1×10^4 个/孔细胞数接种于 96 孔板,按照分组条件加入 L-左旋肌肽及生理盐水,每组设 5 个复孔,处理 24、48 h 后,每孔细胞分别加入 5 mg/mL MTT 20 μ L, 37℃孵箱中培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,摇床振荡 20 min,酶标仪 490 nm 处测定吸光度(A)值,检测

各组细胞增殖情况。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡情况 取对数生长期 Caki-2 细胞接种于 6 孔板中,细胞贴壁后,按照分组条件进行相应处理,处理 48 h 后每组收集 1×10^5 个细胞, PBS 清洗后离心收集细胞,加入 500 μ L 含 50 μ g/mL PI、100 μ g/mL RNase A、0.2 % Triton X-100 的 PBS,避光放置 30 min,流式细胞仪检测细胞周期;同法收集洗涤细胞,100 μ L $1 \times$ binding buffer 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 10 μ L,冰上避光反应 15 min,加入 380 μ L $1 \times$ binding buffer 以及 10 μ L PI,混匀后将样本避光置于冰上 15 min, PBS 清洗后,1 mL PBS 重悬细胞流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blot 检测 L-左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 48 h 后相关蛋白的表达 按照分组条件将干预处理完成的 Caki-2 细胞收集,冰上条件细胞裂解液裂解细胞。BCA 试剂盒蛋白定量,以总蛋白量 20 μ g/孔进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜。加入 Bcl-2、Caspase-3、HIF-1 α 和 β -actin 单克隆抗体,二抗为山羊抗小鼠 IgG-HRP,电化学发光法显影后分析扫描。

1.3 统计学处理方法

数据通过 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,多组间计量资料的比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 L-左旋肌肽处理 24 和 48 h 对 Caki-2 细胞活力的影响

通过 MTT 法测定不同浓度 L-左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 24、48 h 对其细胞活力的影响,结果如图 1 所示:L-左旋肌肽 5、20、50 mM 处理组在 24 h 和 48 h 均可降低细胞存活率。在同一作用浓度下,L-左旋肌肽的处理时间越长,肾癌细胞 Caki-2 的存活抑制率越高。处理 24 h 及 48 h 后,L-左旋肌肽 5、20、50 mM 组细胞存活率同空白对照组相比依次降低,5 mM 处理 L-左旋肌肽 Caki-2 细胞 24 h 后虽对细胞生长有一定作用,但与空白对照组相比无统计学差异($P > 0.05$),而其他各组均可显著抑制细胞生长,其中 50 mM L-左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 48 h 后,细胞生长抑制作用最强。以上结果表明 L-左旋肌肽对肾癌细胞 Caki-2 增殖具有抑制作用,且该作用依赖于药物浓度和

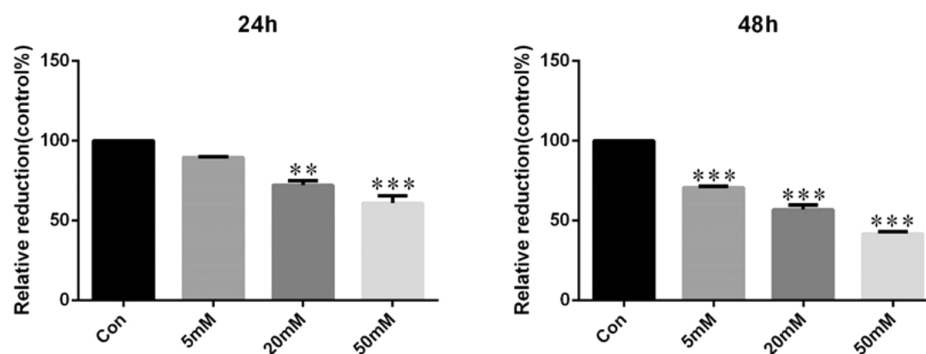


图 1 MTT 法检测 0、5、20、50 mM L-左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 24、48 h 的细胞生长情况

Fig.1 MTT assay was used to detect the proliferation of 5, 20, 50 mM L-carnosine group after 24 and 48 h treatment

Note: ** $P < 0.01$, compared with control group(treated with 0 mM L-carnosine); *** $P < 0.001$, compared with control group(treated with 0 mM L-carnosine)

作用时间。

2.2 不同浓度 L-左旋肌肽处理对 Caki-2 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果表明 L-左旋肌肽处理后, Caki-2 细胞更多地停留在细胞周期中的 G2/M 期, G0/G1 的细胞比例降低, L-左旋肌肽 20 和 50 mM 组在干预 48 h 时与空白对照组相比, 细胞更显著地停留于 G2/M 期, 5 mM 干预组虽然显示对 Caki-2 细胞进入 G2/M 期有一定地促进作用, 但是与空白对照组相比差异不明显, 其中, 50 mM 干预组的作用比 20 mM 干预组强, 呈现剂量依赖关系。因此, L-左旋肌肽主要通过将细胞周期阻滞于 G2/M 期, 抑制 Caki-2 细胞的增殖。

2.3 不同浓度 L-左旋肌肽处理对 Caki-2 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示: 不同浓度 L-左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 48 h 后能够促进细胞凋亡。其中, 与生理盐水组相比, L-左旋肌肽 20 和 50 mM 组在 48 h 时可显著促进 Caki-2 细胞凋亡, 且随着 L-左旋肌肽浓度的提高, 细胞凋亡率逐渐提高, 5 mM L-左旋肌肽干预虽然对 Caki-2 细胞有一定的促凋亡作用, 但是与空白对照组相比差异不明显。结果表明 L-左旋肌肽对肾癌细胞 Caki-2 有促凋亡的作用, 该作用对药物浓度具有依赖性。

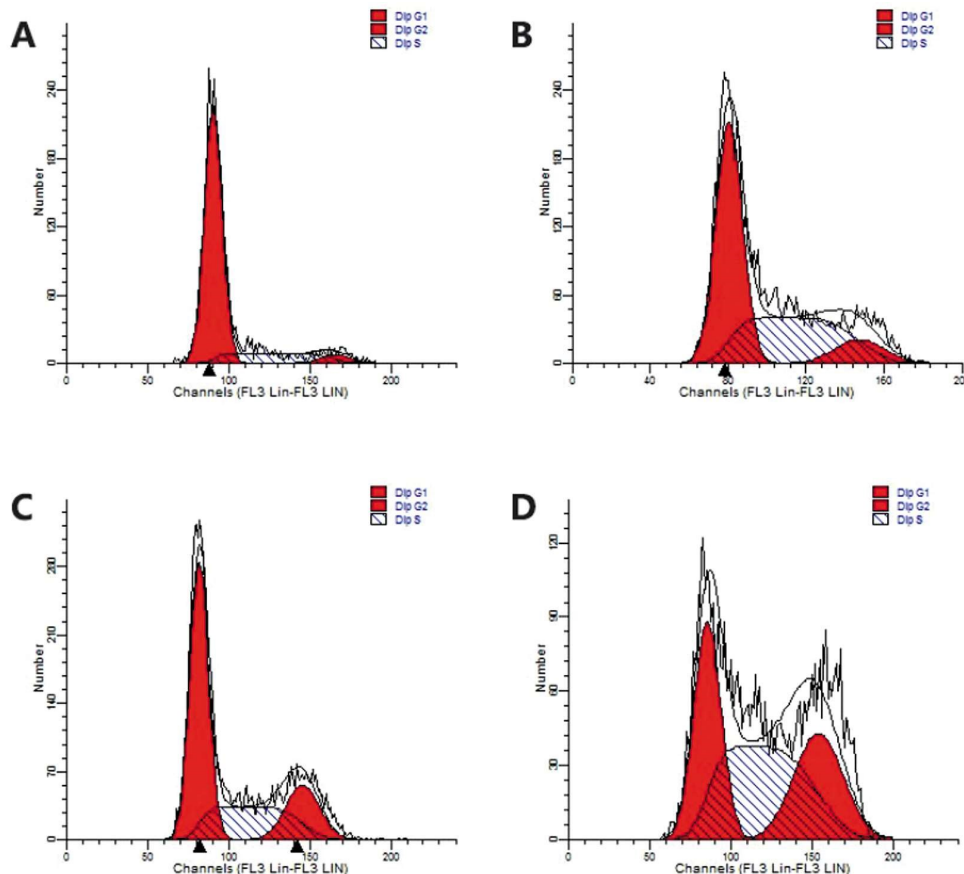


图 2 L-左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 48 h 对细胞周期的影响

Fig.2 Effects of L-carnosine on the cell cycle of Caki-2 cells treated for 48 h

Note: A-D was the effects of cell cycle on Caki-2 cells after treated with 0, 5, 20, 50 mM L-carnosine for 48 h.

2.4 L-左旋肌肽处理对 Caki-2 细胞 caspase-3、Bcl-2 及 HIF-1 α 蛋白表达的影响

L-左旋肌肽 5、20、50 mM 和生理盐水处理 Caki-2 细胞 48 h 后, 检测 caspase-3、Bcl-2 和 HIF-1 α 的蛋白表达, 结果显示: 随着 L-左旋肌肽作用浓度的增加, Bcl-2 和 HIF-1 α 的蛋白表达水平依次降低, 而 caspase-3 的表达水平逐次提高, 提示 L-左旋肌肽可通过抑制 HIF-1 α 通路, 激活 caspase-3 诱导肾癌细胞 Caki-2 凋亡。

3 讨论

L-左旋肌肽作为一种水溶性二肽天然存在于骨骼肌、脑、肾脏等新陈代谢较为旺盛的组织中, 在被分离的 100 多年以来其诸多生理学特性引起国内外学者的广泛关注。L-左旋肌肽已

被证实具有抗氧化活性、螯合金属离子、抑制蛋白质糖基化、抗炎、抗衰老的功能, 因此被广泛应用于食品、医药及化妆品等行业中。除此之外, 近年来越来越多资料报道 L-左旋肌肽在体外对肿瘤细胞的生长具有抑制作用, 包括人胃癌细胞^[18,19]、结肠癌细胞^[20]、卵巢癌细胞^[21]及人胶质瘤细胞^[22]等。对于 L-左旋肌肽靶向肿瘤细胞时发挥作用的主要分子机制现还尚未明确, 但前期的实验结果提示 L-左旋肌肽对肿瘤细胞糖酵解产生 ATP 这一过程的影响在肿瘤细胞的能量代谢中起了关键性的作用^[23]。

虽然 L-左旋肌肽被报道在多种体外培养的肿瘤细胞中发挥了抑制肿瘤的效果, 但是目前 L-左旋肌肽在肾癌中作用的相关机制报道较少。因此, 本研究通过 L-左旋肌肽处理人肾癌 Caki-2 细胞, 探究 L-左旋肌肽对人肾癌细胞增殖活力、细胞凋亡及周期的影响。实验结果显示 L-左旋肌肽能够显著抑制肾

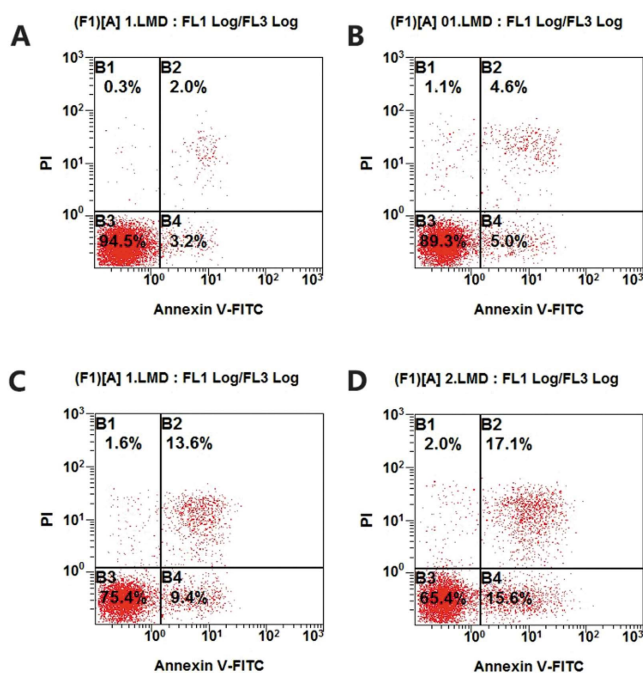


图3 L-左旋肌肽处理 Caki-2 细胞 48 h 对细胞凋亡的影响

Fig.3 Effects of L-carnosine on the apoptosis of Caki-2 cells treated for 48 h

Note: A-D was the effects of apoptosis on Caki-2 cells after treated with 0, 5, 20, 50 mM L-carnosine for 48 h.

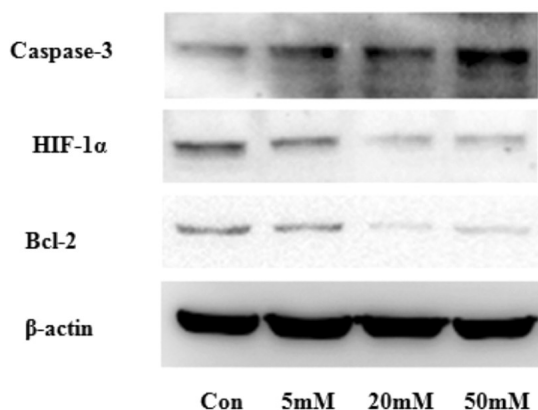


图4 L-左旋肌肽 0、5、20、和 50 mM 处理 Caki-2 细胞 48 h 对 caspase-3、Bcl-2 和 HIF-1α 蛋白表达的影响

Fig.4 The protein expression of caspase-3, Bcl-2 and HIF-1α in 0, 5, 20, 50 mM L-carnosine group after 48 h treatment

癌 Caki-2 细胞的增殖、将细胞周期阻滞于 G2/M 期、促进及诱导 Caki-2 细胞的凋亡。随后我们检测了 Caki-2 细胞 caspase-3、Bcl-2 及 HIF-1α 的蛋白表达,对其产生该影响的机制进行初步的探讨。结果表明随着 L-左旋肌肽作用浓度的增加,Caki-2 细胞的 Bcl-2 和 HIF-1α 的蛋白表达水平依次降低,而 caspase-3 的表达水平逐次提高。因此,我们推测 L-左旋肌肽可通过抑制 HIF-1α 通路,激活 caspase-3 诱导肾癌细胞 Caki-2 凋亡。

缺氧诱导因子-1(Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是在低氧情况下机体参与适应性反应的主要转录因子,由 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚基组成。研究报道在多种人类肿瘤细胞中,HIF-1α 都呈现高表达水平,特别是脑部(少突神经胶质瘤)、乳

腺、子宫以及卵巢等部位的肿瘤组织其过表达情况和患者的死亡率之间具有重要联系^[24]。活化后的 HIF-1α 在肿瘤细胞中作为核心蛋白的转录因子,调节血管生成、肿瘤生长、进展、侵袭以及糖代谢等过程^[25-31]。除此之外,HIF-1α 在调节细胞周期和凋亡过程中也发挥至关重要的作用^[32-34]。近年来,研究者已注意到肾癌患者 HIF-1α 的高表达水平,并且 HIF-1α 表达情况被认为是影响肾癌预后的独立预后因素^[35]。有研究者通过 shRNA 干扰使 HIF-1α 基因沉默,发现肿瘤细胞生长、迁移以及侵袭能力均被抑制^[24]。因此,HIF-1α 已成为前景广阔的癌症治疗靶标。在人结肠癌细胞的体外研究中,L-左旋肌肽被发现具有降低 HIF-1α 蛋白水平,影响其稳定性以及降低 HIF-1 转录活性的作用。此外,L-左旋肌肽还参与泛素-蛋白酶体系,促进 HIF-1α 的降解^[17]。在本研究中,我们检测到 HIF-1α 随着 L-左旋肌肽作用浓度的增加,其表达水平依次降低,并且 Bcl-2 经过 L-左旋肌肽处理后和 HIF-1α 表达趋势一致,caspase-3 随 L-左旋肌肽浓度增加其表达水平逐次升高。因此,我们推测 L-左旋肌肽通过降解 HIF-1α,减少 HIF-1α 的蛋白表达,同时抑制抗凋亡基因 Bcl-2 的蛋白表达水平,诱导线粒体应答,使线粒体膜通透性增加,凋亡分子释放,最终触发 caspase 级联反应,导致 caspase-3 表达升高,细胞凋亡。另外,还有学者报道了在肾癌细胞中,L-左旋肌肽可通过对 caspase-3 结合位点的高亲和力而诱导 caspase-3 的活化,引起肾癌细胞的凋亡^[36]。

综上,本研究结果表明 L-左旋肌肽能够显著抑制肾癌 Caki-2 细胞的增殖、阻滞细胞周期于 G2/M 期、促进及诱导 Caki-2 细胞的凋亡,其作用机制可能与抑制 HIF-1α 蛋白和抗凋亡基因 Bcl-2 的蛋白表达,激活 caspase-3 等过程有关。对于 L-左旋肌肽对肾癌的具体干预机制尚不明确,还需后续进一步研究和探索。

参考文献(References)

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136: 359-386
- [2] Eble JN, Sauter G, Epstein JI, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs[J]. Lyon: ARC Press, 2005, 65(1): 214-215
- [3] Motzer RJ, Agarwal N, Beard C, et al. Kidney cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2011, 9: 960-977
- [4] Li M, He ZS, Gao JP, et al. Multicenter analysis of clinical features of renal cancer[J]. Chinese Journal of Urology, 2010, 31: 77-80
- [5] E. A. Singer, G. N. Gupta, D. Marchalik, et al. Evolving therapeutic targets in renal cell carcinoma [J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25: 273-280
- [6] Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications[J]. Mol Aspects Med, 1992, 13: 379-444
- [7] Hipkiss AR. Carnosine and its possible roles in nutrition and health[J]. Adv Food Nutr Res, 2009, 57: 87-154
- [8] Zhang ZY, Sun BL, Yang MF, et al. Carnosine attenuates early brain injury through its antioxidative and anti-apoptotic effects in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model [J]. Cell Mol

- Neurobiol, 2015, 35(2): 147-157
- [9] Alsheblak MM, Elsherbiny NM, El-Karef A, et al. Protective effects of L-carnosine on CCL₄-induced hepatic injury in rats [J]. Eur Cytokine Netw, 2016, 27(1): 6-15
- [10] Pandurangan M, Enkhtaivan G, Kim DH. Therapeutic efficacy of natural dipeptide carnosine against human cervical carcinoma cells[J]. J Mol Recognit, 2016, 29(9): 426- 435
- [11] Iovine B, Oliviero G, Garofalo M, et al. The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96755
- [12] Erken G, Bor-Kucukatay M, KilicToprak E, et al. The effect of L-carnosine on erythrocyte deformability and aggregation according to the cell age in young and aged rats [J]. Acta Medica, 2013, 56(1): 23-28
- [13] Yapislari H, Aydogan S. Effect of carnosine on erythrocyte deformability in diabetic rats [J]. Arch Physiol Biochem, 2012, 118 (5): 265-272
- [14] Hayashi H, Kobayashi R, Suzuki A, et al. Preparation and clinical evaluation of a novel lozenge containing polaprezinc, a zinc-L-carnosine, for prevention of oral mucositis in patients with hematological cancer who received high-dose chemotherapy [J]. Med Oncol, 2016, 33(8): 91
- [15] Mikułaj-Pietrasik J, Książek K. L-Carnosine Prevents the Pro-cancerogenic Activity of Senescent Peritoneal Mesothelium Towards Ovarian Cancer Cells[J]. Anticancer Res, 2016, 36(2): 665-671
- [16] Rybakova YS, Kalen AL, Eckers JC, et al. Increased manganese superoxide dismutase and cyclin B1 expression in carnosine-induced inhibition of glioblastoma cell proliferation [J]. Biomed Khim, 2015, 61(4): 510-518
- [17] Ditte Z, Ditte P, Labudova M, Simko V, et al. Carnosine inhibits carbonic anhydrase IX-mediated extracellular acidosis and suppresses growth of HeLa tumor xenografts[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 358
- [18] Shen Y, Yang J, Li J, et al. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways [J]. PLoS ONE, 2014, 9: e104632
- [19] Zhang Z, Miao L, Wu X, et al. Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cells by Retarding Akt/ mTOR/ p70S6K Signaling[J]. J Cancer, 2014, 5: 382-389
- [20] Iovine B, Iannella ML, Nocella F, et al. Carnosine inhibits KRas-mediated HCT-116 proliferation by affecting ATP and ROS production[J]. Cancer Lett, 2011, 315: 122-128
- [21] Zayyan MS, Ahmed SA, Oguntayo AO, et al. Epidemiology of ovarian cancers in Zaria, Northern Nigeria: a 10-year study [J]. Int J Womens Health, 2017, 9: 855-860
- [22] Renner C, Seyffarth A, Garcia de Arriba S, et al. Carnosine Inhibits Growth of Cells Isolated from Human Glioblastoma Multiforme[J]. Int J Pept Res Ther, 2008, 14: 127-135
- [23] Renner C, Asperger A, Seyffarth A, et al. Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma [J]. Neurol Res, 2010, 32: 101-105
- [24] Xu K, Lu Y, Zhang Y, et al. Silencing of HIF-1alpha suppresses tumorigenicity of renal cell carcinoma through induction of apoptosis [J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(3): 212-222
- [25] Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumor growth [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 38-47
- [26] Velasco-Hernandez T, Hyrenius-Wittsten A, Rehn M, et al. HIF-1 α can act as a tumor suppressor gene in murine acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2014, 124(24): 3597- 607
- [27] Xu M, Zheng YL, Xie XY, et al. Sorafenib blocks the HIF-1 α /VEGFA pathway, inhibits tumor invasion, and induces apoptosis in hepatoma cells[J]. DNA Cell Biol, 2014, 33(5): 275-281
- [28] Borsi E, Perrone G, Terragna C, et al. HIF-1 α inhibition blocks the cross talk between multiple myeloma plasma cells and tumor microenvironment[J]. Exp Cell Res, 2014, 328(2): 444- 55
- [29] Zhang W, Shi X, Peng Y, et al. HIF-1 α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129603
- [30] Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, et al. HIF-1 α in colorectal carcinoma: review of the literature[J]. J BUON, 2015, 20(3): 680-689
- [31] Hubbi ME, Gilkes DM, Hu H, et al. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(32): E3325-3334
- [32] Thomas R, Kim MH. HIF-1 alpha: a key survival factor for serum-deprived prostate cancer cells [J]. Prostate, 2008, 68: 1405-1415
- [33] Liao HY, Wang GP, Huang SH, et al. HIF-1 α silencing suppresses growth of lung adenocarcinoma A549 cells through induction of apoptosis[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(3): 911-915
- [34] He G, Jiang Y, Zhang B, et al. The effect of HIF-1 α on glucose metabolism, growth and apoptosis of pancreatic cancerous cells[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2014, 23(1): 174-180
- [35] Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, et al. The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 1129-1135
- [36] Pandurangan M, Mistry B, Enkhataivan G, et al. Efficacy of carnosine on activation of caspase 3 and human renal carcinoma cell inhibition [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 92: 377-382