

· 中(蒙)医药论坛 ·

红花提取物对柯萨奇病毒感染心肌微血管内皮细胞的保护作用

范影¹,张坤²

(1.内蒙古自治区人民医院 心血管内科,内蒙古 呼和浩特 010017;

2.内蒙古医科大学第二附属医院 急诊科,内蒙古 呼和浩特 010012)

【摘要】目的 探讨柯萨奇病毒B3(coxsackie virus B3, CVB3)对心肌微血管内皮细胞(cardiac myocardial microvascular endothelial cell, CMEC)的感染途径及红花提取物(主要有效成分为红花黄色素B, Safflower Yellow B, SYB)是否通过该途径对感染过程起到保护作用。方法 将CMEC分为四组,分别为CVB3组、SYB组、CVB3+SYB组、对照组,采用TCID₅₀浓度为10^{-6.285}/mL的病毒液对CVB3组及CVB3+SYB组的细胞进行干预,采用100 nmol/L的SYB对SYB组及CVB3+SYB组的细胞进行干预,分别在0 min、20 min、40 min、60 min提取细胞总蛋白和RNA,采用WB及RT-PCR方法测定每组细胞中Toll-样受体4(toll-like receptors 4, TLR4)、髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)及核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)表达,进行统计学分析。结果 与对照组相比, CVB3组细胞中TLR4、MyD88及NF- κ B的蛋白表达量在40 min、60 min存在差异, mRNA的表达量在20 min、40 min、60 min时存在差异;与对照组相比, SYB组细胞中TLR4、MyD88及NF- κ B在各时间段的蛋白表达量以及mRNA表达量均无差异;与CVB3组对比, SYB+CVB3组细胞中TLR4、MyD88及NF- κ B蛋白表达量在40 min与60 min时存在差异, mRNA表达量在20 min、40 min、60 min时存在差异。结论 CVB3通过TLR4/NF- κ B通路损伤CMEC, TLR4/NF- κ B通路是CVB3导致VMC的信号通路,而SYB可通过该通路对CVB3感染后CMEC起到一定的保护作用。

【关键词】红花提取物;柯萨奇病毒B3;心肌微血管内皮细胞;TLR4/NF- κ B通路

中图分类号: R917

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2023)02-0124-05

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是一种由病毒感染导致心脏损伤的感染性疾病,经研究证实其在多年后与扩张型心肌病的发生及发展存在密切相关性,而扩张型心肌病成为青少年的重要死因^[1]。因此关于病毒性心肌炎的发病机制及可能的治疗方法的研究,对于临床上针对VMC的治疗及严重并发症的预防具有重要的意义。柯萨奇病毒B3(coxsackie virus B3, CVB3)是病毒性心肌炎的主要致病病毒,但CVB3导致病毒性心肌炎的具体机制目前仍不清楚。

Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)是一类在先天免疫系统中起关键作用的跨膜非催化性蛋白质,主要在巨噬细胞、树突状细胞、肠内皮细胞、心肌细胞的细胞膜上表达,与特定微生物结合,TLRs通过其胞内区募集下游接头蛋白,进行信号转导^[2]。TLRs家族包括13个成员,TLR4是介导内毒素和脂多糖应答的最主要受体。TLR4被激活后,其胞内区和MyD88的C端区域结合,然后IRAK4、IRAK1和

TRAF6募集到TLR-MyD88复合体,导致IRAK1和TRAF6磷酸化,进而激活下游的MAPK和NF- κ B信号通路,最终调控多种炎症因子的表达。

病毒性心肌炎发病过程中心肌微血管内皮细胞最早受到损伤。在CVB3损伤心肌微血管内皮细胞(cardiac myocardial microvascular endothelial cell, CMEC)的过程中,TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路是否参与了疾病的发展仍不明确。文献报道^[3],红花具有改善冠状动脉供血以及调节免疫功能等作用,但其对病毒性心肌炎是否通过TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路发挥治疗作用尚未明确。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CVB3质粒(ScienCell Research, 美国); CMEC(ScienCell Research, 美国);红花(内蒙古北域药业有

收稿日期:2022-07-22;修回日期:2023-02-21

第一作者:范影(1984—),女,硕士,主任医师。研究方向:心律失常、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心力衰竭。

E-mail:zhangfanq@163.com

限公司);DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶和 PBS (Gibico, 美国); NF-κB-p65 单克隆抗体、TLR-4 单克隆抗体和 MyD88 单克隆抗体(Sigma, 美国);cDNA 逆转录试剂盒和 PCR 扩增试剂盒(上海普洛麦格生物产品有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 SYB 的制备 红花药材中加入 8 倍量的蒸馏水,加热至 90℃ 浸泡 60 min,浸泡 2 次,然后将浸泡过的红花置于烘箱中烘干,再次将红花放入 60℃ 蒸馏水中浸泡 60 min,合并 3 次浸提液,烘干。然后将红花提取物置于液氮中,研磨得到红花提取物(SYB)。以红花提取物中主要成分红花黄色素 B 为指标成分,制备浓度为 100 nmol/L 的红花提取物溶液。预实验结果显示 100 nmol/L 的 SYB 作用后可使 CMEC 避免被 CVB3 感染。

1.2.2 CVB3 感染 CMEC 的 TCID₅₀ 的测定 用浓度分别为 10⁻¹/mL、10⁻²/mL、10⁻³/mL、10⁻⁴/mL、10⁻⁵/mL、10⁻⁶/mL、10⁻⁷/mL 以及 10⁻⁸/mL 的 CVB3 转染 CMEC 24 h 后检测细胞吸光度值(optical density, OD),并计算感染率。细胞感染率为 50% 时对应的 CVB3 浓度即为 TCID₅₀ 值。

1.2.3 SYB 对 CVB3 感染 CMEC 的保护作用研究 将 CMEC 细胞分为四组:对照组、SYB 组、CVB3 组、SYB+CVB3 组。用 100 μL 浓度为 10^{-6.285}/mL 的 CVB3 处理 CVB3 组和 SYB+CVB3 组的 CMEC;用 100 μL 浓度为 100 nmol/L 的 SYB 处理 SYB 组和 SYB+CVB3 组的 CMEC。培养 6 d 后观察细胞形态。

1.2.4 Western-Blot 检测 SYB 对 CVB3 感染后 CMEC 中的 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达的影响 将 CMEC 细胞分为四组:对照组、SYB 组、CVB3 组、SYB+CVB3 组。用 100 μL 浓度为 10^{-6.285}/mL 的 CVB3 处理 CVB3 组和 SYB+CVB3 组的 CMEC;用 100 μL 浓度为 100 nmol/L 的 SYB 处理 SYB 组和 SYB+CVB3 组的 CMEC。干预 0 min、20 min、40 min、60 min 后,将各组细胞裂解后离心,取上清液提取蛋白。按照说明书方法测定提取上清液中细胞蛋白浓度,达标后再将各蛋白提取液稀释至同一浓度,并加入 SDS-PAGE 蛋白缓冲液和样本液充分混匀,通过配胶及上样、SDS-PAGE 电泳、转膜、抗体孵育、ECL 显色等步骤,得到条带图,通过 Image J 软件进行条带灰度分析。

1.2.5 RT-PCR 检测 SYB 对 CVB3 感染后 CMEC 中的 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达的影响 将 CMEC 细胞分为四组:对照组、SYB 干组、CVB3 组、

SYB+CVB3 组。用 100 μL 浓度为 10^{-6.285}/mL 的 CVB3 处理 CVB3 组和 SYB+CVB3 组的 CMEC;用 100 μL 浓度为 100 nmol/L 的 SYB 处理 SYB 组和 SYB+CVB3 组的 CMEC。干预 0 min、20 min、40 min、60 min 后,提取各组细胞中 RNA,按照试剂盒标准计算配置逆转录液,采用标准方法进行 cDNA 合成,β-actin 作为内参,RT-PCR 所用引物见表 1,采用标准方法进行 PCR 扩增,测算 mRNA 含量。

表 1 RT-PCR 中所用引物

基因名称	引物序列 5'—3'
β-actin-forward	5'-TGGCACCCAGCAATGAA-3'
β-actin-reverse	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'
TLR4-forward	5'-CAGAAGAGGCAAGGCGACAG-3'
TLR4-reverse	5'-TGGCATAACCACATAGAGAACTG-3'
NF-B-forward	5'-GACATTGAGGTGTATTTACACGGG-3'
NF-B-reverse	5'-CTCTTGAAGGTCTCATAGGTC-3'
MyD88-forward	5'-GTTCTTACTGACTGGCATGAG-3'
MyD88-reverse	5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'

1.2.6 统计学方法 实验数据分析通过 SPSS 20.0 (IBM) 统计学软件处理,统计描述符合正态分布计量资料采用(均数 ± 标准差)表示,正态及方差齐性检验后通过独立样本 *t* 检验。实验制图分析采用 GraphPad 8.0 软件绘制分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CVB3 感染 CMEC 的 TCID₅₀

实验结果显示:CVB3 的浓度为 10⁻⁵/mL 时,细胞几乎全部被感染;CVB3 的浓度为 10^{-6.285}/mL 时,50% 的细胞被感染。因此 CVB3 对 CMEC 的 TCID₅₀ 为 10^{-6.285}/mL,实验数据见图 1。

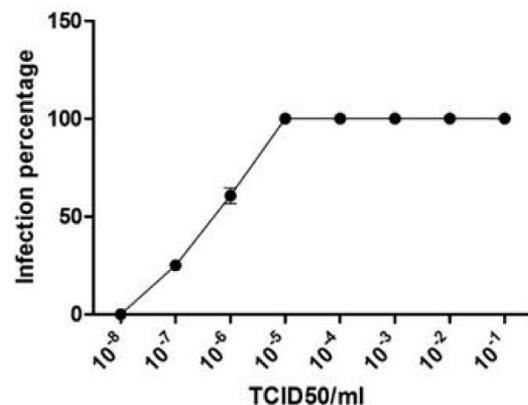


图 1 CVB3 感染 CMEC 的 TCID₅₀

2.2 SYB对CVB3感染CMEC的保护作用

培养6 d后SYB组细胞和对照组细胞对比,形态均无明显变化,说明SYB对正常CMEC形态无影响;CVB3组的细胞密度变稀疏且部分细胞漂浮于液体表面,说明CVB3能够感染CMEC;SYB+CVB3组细胞形态与对照组相比无明显不同,说明SYB对CVB3感染的CMEC具有保护作用。

2.3 SYB对CVB3感染后CMEC中的TLR4、MyD88和NF-κB蛋白表达的影响

实验结果显示:对照组细胞中不同时间点TLR4、MyD88和NF-κB的蛋白表达水平无明显变化;CVB3组细胞40 min和60 min时的TLR4、MyD88和NF-κB蛋白表达水平高于对照组,差异有统计学意义,说明CVB3感染CMEC与细胞中TLR4、MyD88和NF-κB蛋白表达升高相关;SYB+CVB3组细胞40 min和60 min时的TLR4、MyD88和NF-κB蛋白表达水平低于CVB3组,差异有统计学意义,说明SYB处理CVB3感染的CMEC后细胞中TLR4、MyD88和NF-κB蛋白表达水平降低,实验数据见图2。

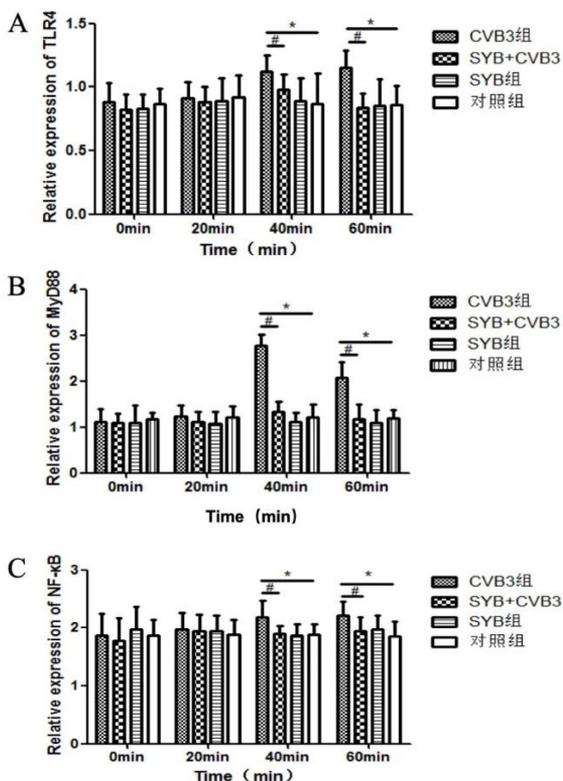


图2 SYB、CVB3处理CMEC后细胞TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白灰度值分析
A: TLR4蛋白灰度值分析; B: MyD88蛋白灰度值分析;
C: NF-κB蛋白灰度值分析

2.4 SYB对CVB3感染后CMEC中的TLR4、MyD88和NF-κB mRNA表达量的影响

实验结果显示: CVB3组细胞20 min、40 min和60 min时的TLR4、MyD88和NF-κB mRNA表达水平高于对照组,差异有统计学意义;而且40 min时3种基因的表达量达到峰值,说明CVB3感染CMEC与细胞中TLR4、MyD88和NF-κB mRNA表达水平升高相关;SYB+CVB3组细胞20 min、40 min和60 min时的TLR4、MyD88和NF-κB mRNA表达水平低于CVB3组,差异有统计学意义,说明SYB处理CVB3感染的CMEC后细胞中TLR4、MyD88和NF-κB mRNA表达水平降低,实验数据见图3。

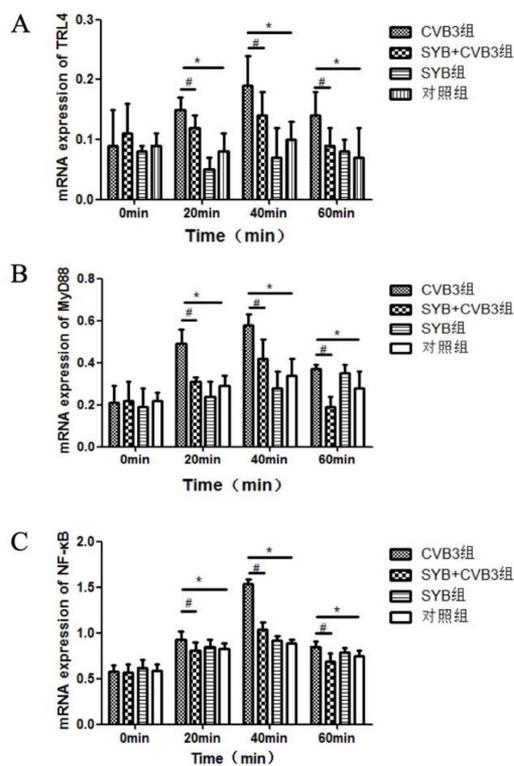


图3 SYB、CVB3作用CMEC后细胞TLR4/NF-κB信号通路相关基因mRNA表达量分析
A: TLR4 mRNA表达量分析; B: MyD88 mRNA表达量分析;
C: NF-κB mRNA表达量分析

3 讨论

CMEC在心脏损伤性相关疾病病理进程中的作用越来越受到研究人员的关注。近年来随着病理学及细胞生物学观测技术的进步,内皮细胞的作用逐渐得到深入了解^[4-6]。在VMC的发病过程中, CVB3最初感染的细胞即为CMEC,通过CMEC的屏障作用后, CVB3才能够感染心肌细胞。CVB3在通过CMEC的同时也激活了与心肌损伤相关的信号通路^[7-9]。

CVB3 在进入宿主机体后,首先与 CMEC 接触,而 CMEC 表达柯萨奇病毒受体和组织侵袭性受体, CVB3 以胞吞的方式进入细胞内,同时激活机体的固有免疫系统,发动抗原提呈作用,并分泌大量的炎症因子以及趋化因子,抵抗病毒的同时也损伤了正常的心肌组织^[10-12]。有研究证实, CVB3 感染与 TLRs 的表达量明显相关, VMC 大鼠模型心肌细胞中的 TLRs 表达量明显高于对照组大鼠的心肌细胞^[13, 14]。20 世纪 80 年代 Cell 杂志上发表了针对 TLR4 的相关研究结果,首次证实了 TLR 在心肌炎症反应过程中重要的价值。在动脉粥样硬化的大鼠中, TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 等蛋白的表达量明显高于对照组大鼠,而加入脂联素抑制大鼠动脉斑块后,其主动脉内 NF- κ B 蛋白表达量明显下调,其下游调控的炎症因子如 TNF- α 、IL-6 等表达量也明显降低,表明 TLR4/NF- κ B 通路及血管内皮细胞的损伤及炎症反应密切相关^[15-17]。研究表明单味中药中对 VMC 有效的药物有黄芪、丹参、西洋参、红花、三七等^[18, 19]。中医药针对 VMC 的治疗能够有效地缓解症状,有效清除宿主体内病毒,控制心肌损害程度,有较高安全性,弥补了西医支持治疗的不足。

本研究中,对照组与 SYB 组相比较, TLR4、MyD88 和 NF- κ B 3 种蛋白在 0~60 min 的 4 个时间段的蛋白表达量均无明显差异,表明 SYB 对于 CMEC 本身无明显干扰作用。 CVB3 干预的 CMEC 在 40 min 及 60 min 时 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 3 种蛋白表达量与对照组相比存在差异,结果表明 CVB3 损伤 CMEC 的过程中, TLR4/NF- κ B 通路被激活参与了损伤的过程。 SYB+CVB3 组 3 种蛋白的表达量相较于 CVB3 组降低,在 40 min 与 60 min 时两组存在差异,结果表明 SYB 可以通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路对 CVB3 感染后 CMEC 起到保护作用。 CVB3 组的 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 的 mRNA 的表达量在 20 min、40 min 与 60 min 时升高,与对照组对比存在统计学差异,再次证实了 CVB3 能够通过 TLR4/NF- κ B 通路干预 CMEC 的生长。 SYB 干预组在 0 min、20 min、40 min 和 60 min 时 3 种基因的 mRNA 的表达量与对照组相比无明显差异,表明 SYB 对于 CMEC 本身无明显干扰作用。 SYB+CVB3 组与 CVB3 组比较, 3 种基因的 mRNA 的表达量在 20 min、40 min 和 60 min 时存在差异,表明 SYB 能够有效的干预 CVB3 对于 CMEC 的损伤作用,对 CMEC 起到保护作用。在本研究中 SYB 表现出明显的干预效果,不仅能够改善 CVB3 感染后的 CMEC 的生长情况,同时能够干预 TLR4/NF- κ B 通路相关信

号蛋白的表达水平。

有研究表明, SYB 能够显著降低组织内的氧化应激、炎症因子表达,并且能够保护细胞内线粒体膜的稳定性^[20]。但是其具体的机制不是非常明确,本研究证实 SYB 可影响 TLR4/NF- κ B 通路的功能,表明该信号通路可能成为其治疗 VMC 的有效靶通路。针对 TLRs 的相关报道中指出, TLR 存在多种亚型,表达于淋巴细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞等细胞膜上,而同样存在于 CMEC 的细胞膜上。但其具体的调控机制以及上下游调控分子仍旧不是很明确^[21, 22]。针对本研究的试验结果猜测, CVB3 病毒首先经过肠道进入机体,经过血液循环系统与 CMEC 上的 TLRs 相结合,导致 TLR4 的 mRNA 的转录表达,并激活 NF- κ B 蛋白的表达。 TLR4/NF- κ B 通路激活直接介导心肌凋亡,多个研究表明氧化应激反应在该过程中起到了重要作用。另外, TLR4/NF- κ B 通路可以调控单核巨噬细胞,影响心肌微环境内炎症因子的表达水平, TNF- α 、IL-1、IL-6 明显上调,而 IL-10 水平逐渐下降,以上炎症因子的异常表达反过来可以激活心肌血管的收缩,并激活其他信号通路,放大心肌及血管炎症反应,造成心肌的持续性炎症损伤^[23]。

综上所述,我们将 CVB3 感染 CMEC,导致 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 等信号分子的蛋白及其 mRNA 表达上调。以上结果证实了 CVB3 能够通过 TLR4/NF- κ B 通路损伤 CMEC,而 SYB 可以抑制 TLR4/NF- κ B 通路对 CVB3 感染的 CMEC 起到保护作用。本研究在细胞水平对 CVB3 感染 CMEC 的途径以及 SYB 是否可通过该途径对感染过程起到保护作用进行了研究,在动物水平是否可以有同样的感染过程与保护作用,需进行进一步的实验与研究来证实。

参考文献

- [1]Olejniczak M, Schwartz M, Webber E, et al. Viral myocarditis -incidence, diagnosis and management[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2020, 34(6):1591-1601
- [2]Zhang Y, Liu J, Wang C, et al. Toll- like receptors gene polymorphisms in autoimmune disease[J]. Front Immunol, 2021, 12:e672346
- [3]姜建双. 红花化学成分及生物活性研究[D].北京:中国协和医科大学,2008
- [4]Lan S, Yi F, Shuang L, et al. Chemical constituents from the fibrous root of *Ophiopogon japonicus* and their effect on tube formation in human myocardial microvascular endothelial cells [J]. Fitoterapia, 2013, 85: 57-63
- [5]Wang Z, Zhang Q, Zhu W, et al. Angiogenic changes in co-cultures of mast cells and myocardial microvascular endothelial cells under hyperglycemic conditions[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5):1177-1185

- [6]Li J, Zou Y, Ge J, et al. The effects of G-CSF on proliferation of mouse myocardial microvascular endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, **12**(2): 1306
- [7]Jois A, Zannino D, Curtis N, et al. Arterial structure and function following viral myocarditis[J]. *Pediatr Cardiol*, 2018, **40**(1): 133–137
- [8]Wang Y, Li J, Xuan L, et al. Astragalus Root dry extract restores connexin43 expression by targeting miR-1 in viral myocarditis[J]. *Phytomedicine*, 2018, **46**: 32–38
- [9]Qi X, Lu Q, Hu J, et al. Spontaneous C-cleavage of a truncated intein as fusion tag to produce tag-free VP1 inclusion body nanoparticle vaccine against CVB3-induced viral myocarditis by the oral route[J]. *Microb Cell Fact*, 2019, **18**(1): 1–14
- [10]Xiao Y, Liu T, Liu X, et al. Total astragalus saponins attenuates CVB3-induced viral myocarditis through inhibiting expression of tumor necrosis factor alpha and Fas ligand[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2019, **9**(4): 337–345
- [11]Luo XN, Yao HL, Song J, et al. Cocksackievirus B3 infection triggers autophagy through 3 pathways of endoplasmic reticulum stress[J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, **31**(12): 867–875
- [12]Dai K, Wang Y, Tai S, et al. Fasudil exerts a cardio-protective effect on mice with coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis[J]. *Cardiovasc Ther*, 2018, **36**(6): e12477
- [13]Liu J, Zhao H, Zhou X, et al. Antiviral activities of Janus-type nucleosides and their related oxime-intermediates[J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, **27**(12): 2332–2339
- [14]Yao H, Wang X, Song J, et al. Cocksackievirus B3 infection induces changes in the expression of numerous piRNAs[J]. *Arch Virol*, 2019, **165**(1): 105–114
- [15]Liu W, Wu YH, Zhang L, et al. MicroRNA-146a suppresses rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes proliferation and inflammatory responses by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling[J]. *Oncotarget*, 2018, **9**(35): 23944–23959
- [16]Wang W, Hu X, Shen P, et al. Sodium houttuynfonate inhibits LPS-induced inflammatory response via suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway in bovine mammary epithelial cells[J]. *Microb Pathog*, 2017, **107**: 12–16
- [17]Zhou ZB, Yang B, Li X, et al. Lysophosphatidic acid promotes expression and activation of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in THP-1 cells via Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B (TLR4/NF- κ B) signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2018, **24**: 4861–4868
- [18]郑恒, 张聪子, 徐金军, 等. 黄芪皂苷对病毒性心肌炎大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和心肌细胞凋亡的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, **32**(23): 3521–3526
- [19]许德星, 万发银, 张静怡, 等. 三七总黄酮通过 miR-223-3p/FOXO1 分子轴缓解病毒性心肌炎炎症反应和细胞损伤[J]. *病毒学报*, 2021, **37**(4): 781–789
- [20]张业昊, 姚明江, 丛伟红, 等. 西红花提取物对局灶型脑缺血/再灌注大鼠线粒体分裂融合的影响[J]. *中国药理学通报*, 2018, **34**(6): 770–775
- [21]Sang Y, Gu X, Pan L, et al. Melatonin ameliorates coxsackievirus B3-induced myocarditis by regulating apoptosis and autophagy[J]. *Front Pharmacol*, 2018, **9**: 1384
- [22]Ke S, Li N, Ke T, et al. Synthesis and evaluation of steroidal thiazoline conjugates as potential antiviral agents[J]. *Future Med Chem*, 2018, **10**(22): 112–114
- [23]Luo M, Yan D, Sun Q, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2020, **121**(4): 2994–3004

(上接第 123 页)

- [5]李昌峰. 胃癌肿瘤微环境靶向治疗的研究进展[J]. *武警医学*, 2022, **33**(7): 640–644
- [6]王雨枫, 徐岷. 细胞外基质与肿瘤干细胞相互作用的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, **29**(16): 2922–2926
- [7]杨婵君, 陈雯恬, 刘静. 胶原蛋白作为胃癌潜在生物标志物的生物信息学分析[J]. *癌变·畸变·突变*, 2021, **33**(6): 410–419
- [8]Okumura Y, Noda T, Eguchi H, et al. Hypoxia-induced PLOD2 is a key regulator in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, **25**(12): 3728–3737
- [9]Wang Z, Fan G, Zhu H, et al. PLOD2 high expression associates with immune infiltration and facilitates cancer progression in osteosarcoma[J]. *Front Oncol*, 2022, **12**: e980390
- [10]Gong X, Wang A, Song W. Clinicopathological significances of PLOD2, epithelial-mesenchymal transition markers, and cancer stem cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, **101**(34): e30112
- [11]Harrison H, Pegg HJ, Thompson J, et al. HIF1- α expressing cells induce a hypoxic-like response in neighbouring cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2018, **18**(1): 674
- [12]Eisinger TS, Zhang M, Qiu Q, et al. Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis[J]. *Cancer Discov*, 2013, **3**(10): 1190–1205
- [13]Tham E, Grigelionis G, Hammarsjö A, et al. Genotype-phenotype correlation of PLOD2 skeletal dysplasias using structural information[J]. *J Bone Miner Res*, 2018, **33**(7): 1377–1378
- [14]Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoe AF, et al. Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(42): 40967–40972