

低氧环境下生长的卵巢癌细胞株 SKOV3 的转录组分析*

王鑫¹ 杜珍武² 李晶¹ 祝贺^{1**}

¹吉林大学第二医院妇产科, 长春 130041; ²吉林大学第二医院骨科研究所, 长春 130041

[摘要] 目的 探讨卵巢癌细胞在常氧与低氧环境培养下 mRNA 表达谱的差异。方法 将卵巢癌细胞株 SKOV3 置于低氧 (2%) 与常氧 (21%) 环境下培养, 应用氧探针进行细胞缺氧状态检测, 应用高通量测序对细胞内整体的 mRNA 进行测序, 应用生物信息学分析工具对测序结果进行基因表达差异分析与功能富集分析, 应用逆转录实时荧光定量 PCR 进行相关差异基因表达的进一步验证。结果 与常氧培养的细胞相比, 在低氧环境下培养的细胞共有 999 个基因表达显著上调, 646 个基因表达显著下调。这些表达差异基因参与细胞外基质形成、细胞黏附、糖酵解、纤毛组装等生物学过程以及癌症信号、PI3K - AKT 信号、RNA 转运以及肿瘤胆碱代谢等信号通路。逆转录实时荧光定量 PCR 结果验证了低氧组的 HILPDA、MT1B、CA9、MT1X 与 LOX - L2 基因表达明显高于常氧组, 而低氧组的 WARS1、CHAC1、PSAT1、UPP1 与 DDX5 基因表达明显低于常氧组。结论 本研究揭示了在不同浓度氧环境下卵巢癌细胞 mRNA 转录水平差异表达的相关基因及分子通路, 为进一步探讨低氧环境对卵巢癌细胞生长影响的潜在分子机制提供实验基础。

[关键词] 低氧; 转录组; 卵巢癌; SKOV3 细胞

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2024.03.016

Transcriptome Analysis of Ovarian Cancer Cell Line SKOV3 Grown in a Hypoxic Environment

Wang Xin¹, Du Zhenwu², Li Jing¹, Zhu He^{1**}

¹Department of obstetrics and gynecology, the Second Norman Bethune Hospital of Jilin University, ChangChun 130041; ²Department of orthopedics research institute, the Second Norman Bethune Hospital of Jilin University, ChangChun 130041

** Corresponding author: Zhu He, email: zhuhe@jlu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To explore the differences in mRNA expression profiles of ovarian cancer cells cultured in normoxic and hypoxic environments. **Methods** The ovarian cancer SKOV3 cells were cultured separately in low oxygen (2% oxygen) and normal oxygen (21% oxygen) environments. Oxygen probes were used to detect cellular hypoxia status. The whole mRNAs expressed within cells were detected using high-throughput RNA sequencing, and bioinformatics analysis tools were used to analyze gene expression differences and functional enrichment of the genes, and reverse transcription quantitative real-time PCR was used to further verify the related differential gene expression. **Results** Compared with cells cultured under normal oxygen, cells cultured under low oxygen environment showed a total of 999 significantly upregulated gene expressions and 646 significantly downregulated gene expressions. These differentially expressed genes were involved in biological processes such as extracellular matrix formation, cell adhesion, glycolysis, ciliary assembly, as well as signaling pathways such as cancer signaling, PI3K - AKT signaling, RNA transport, and tumor choline metabolism. The reverse transcription quantitative real-time PCR results confirmed that the expression of HILPDA, MT1B, CA9, MT1X and LOX - L2 genes in the hypoxic group were significantly higher than those in the normoxic group, while the expression of WARS1, CHAC1, PSAT1, UPP1 and DDX5 genes in the hypoxic group were significantly lower than those in the normoxic group. **Conclusion** This study revealed the differentially expressed genes and molecular pathways of mRNA transcription levels in ovarian cancer cells under different oxygen concentrations environments, providing an experimental basis for further exploring the potential molecular mechanisms of the impact of low oxygen environments on the growth of ovarian cancer.

[Key words] Hypoxic; Transcriptome; Ovarian cancer; SKOV3 cell

* 吉林省科技厅重点研发项目 (20210204025YY)

** 通讯作者: 祝贺, 电子邮箱 zhuhe@jlu.edu.cn

卵巢癌占女性生殖系统癌症相关死亡率的首位^[1-2]。卵巢癌患者中多数为老年女性,这部分患者由于身体状态差,常伴有其他疾病,所以对治疗响应差,成为卵巢癌治疗值得关注的人群^[3-4]。当前针对卵巢癌患者的化疗方案为铂类药物联合紫杉醇,部分患者在治疗初期时得到缓解,但仍有许多患者复发并出现化疗耐药性^[5-6]。肿瘤细胞在体内生长的内环境即肿瘤的微环境,对肿瘤细胞生长发育及药物治疗的反应均可产生调控作用,其中肿瘤组织的低氧状态是其内环境的重要特征^[7-8]。在低氧环境下可诱发肿瘤组织新生血管,提高肿瘤细胞抗凋亡、抗药物治疗及转移能力^[9-11]。但低氧诱导肿瘤细胞分子信号的转变及对化疗药物产生抗性的分子机制尚未完全阐明^[12]。在过去的几十年里,转录组分析已成为在分子水平上研究人类疾病最常用的方法之一,通过该方法在多种疾病中发现了许多分子生物标志物和治疗靶点^[13]。通过转录组学方法进行细胞内全体 mRNA 转录情况的观察将有助发现低氧状态下细胞转变的关键基因与分子通路^[14-15]。本研究将通过高通量 RNA 测序检测在常氧与低氧状态下的 SKOV3 卵巢癌细胞的全局 mRNA 表达谱,旨在揭示常氧与低氧环境下卵巢癌细胞的表达差异基因与相关调控的重要分子途径,为明确卵巢癌细胞在低氧环境下产生化疗药物抗性的分子机制提供实验依据,为低氧环境为目标的药物开发提供分子靶点。

1 材料与方法

1.1 SKOV3 卵巢癌细胞的低氧培养与低氧状态验证

SKOV3 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔细胞培养板,置于 MIC-101 缺氧培养小室,小室内含有 2% O_2 、5% CO_2 及 93% N_2 。将小室与同步接种 SKOV3 细胞的 24 孔板置于 37℃、5% CO_2 培养箱内培养(含有 21% O_2 ,常氧组)。培养 24 h 后,应用 ROS-ID® Hypoxia/Oxidative Stress Detection Kit(购自美国 Enzo Life Sciences 公司)进行细胞低氧状态检测。

1.2 细胞内 mRNA 表达谱高通量测序

将 SKOV3 细胞以 1×10^5 个/mL 细胞数接种于 25 cm^2 培养瓶,分别在常氧与低氧环境培养 72 h(每组 3 瓶),然后吸去培养基,加入 1 mL Trizol 溶液(购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司),用吸头吹打,充分裂解细胞,将细胞裂解液置于冻存管内置于液氮内迅速冷冻。检测样本置于干冰保存运输至武汉华大基因测序公司,委托进行细胞全转录组的 RNA 测序。

1.3 RNA 测序结果分析

测序获得原始数据,根据数据质控进行初步过

滤,高质量序列数据针对参考序列进行比对,完成测序数据在参考序列上的分布情况,根据判断比对结果完成基因表达数据获取。所得基因的表达值表示为每千个碱基的转录每百万映射的 Transcript (TPM) 值,该值通过归一化映射读数的量化数量来计数。两个不同组之间 RNA-seq 数据的差异表达分析通过 Dr. tom-web 进行(<https://bio-sys.bgi.com/#/report/project/projectList>)。低氧组与常氧组之间的差异表达基因判定标准为 Q 值(P 值的校正) < 0.05 、 $|\log_2(\text{TPM}_{\text{低氧组}}/\text{TPM}_{\text{常氧组}})| \geq 2$ 。

1.4 基因功能富集分析

表达差异基因应用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因本体论(Gene ontology, GO)分析及京都基因百科全书(Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome, KEGG)分析。

1.5 差异基因 PCR 检测验证

应用 TRIzol 试剂(购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司)分别从低氧与常氧培养 72 h 的 SKOV3 细胞分离总 RNA。使用 TranScript Uni All-in-One SuperMix cDNA 合成试剂盒(购自北京全式金生物技术股份有限公司)将总细胞 RNA 逆转录为 cDNA,以获得 cDNA 为模板应用 Rans-Start® Green qPCR SuperMix(购自北京全式金生物技术股份有限公司)试剂进行逆转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)反应检测细胞内每个基因的 mRNA 表达水平。检测引物序列参考 Huang 等^[16]文献,引物委托上海生工合成, WARS1 正向引物 5'-GCAGGAAGGGAAACTGAAAGA-3',反向引物 5'-GACGAGTCAAGACCAGGTTG-3'; DDX5 正向引物 5'-AGAGAGGCGATGGCCTATTT-3',反向引物 5'-CTCAAGCGACATGCTCTACAA-3'; UPP1 正向引物 5'-AACAGAGCAGGCAGTGGAT A-3',反向引物 5'-ATACGCTGCTTGTCCTTC T-3'; PSAT1 正向引物 5'-GTCCAGTGGAGC-CCCAAAA-3',反向引物 5'-TGCCTCCCA-CAGACCTATGC-3'; CHAC1 正向引物 5'-GTGT-GGTGACGCTCCTTGAA-3',反向引物 5'-TGG-TATCGTAGCCACCAAGC-3'; MT1B 正向引物 5'-GATCCCAACTGCTCCTGCACCACA-3',反向引物 5'-AAGAATGTAGCAAACCGGTCAGGGTAGTT-3'; CA9 正向引物 5'-TAAGCAGCTCCACACCCTC T-3',反向引物 5'-TCTCATCTGCACAAGGAAC G-3'; MT1X 正向引物 5'-GACCCCAACTGCTC-CTGCTCG-3',反向引物 5'-GATGTAG-CAAACGGGTCAGGGTTGTAC-3'; HILPDA 正向引物 5'-CCGACTTTCCTCCGGACT-3',反向引物 5'-CCTTCTGAAAGGCCTCTGG-3'; LOXL2 正向

引物 5' - CATCTGGATGTACAACTGCCACATA - 3', 反向引物 5' - AGCCCCGCTGAAGTGCTCAA - 3'。PCR 反应体系为 20 μ L, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C、5 min, 94 $^{\circ}$ C、15 s, 55 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 共计 40 个循环, 循环后设置熔解曲线反应。RT - qPCR 反应通过 ABI 7500 FAST 实时定量 PCR 仪完成, 检测结果应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行定量分析。

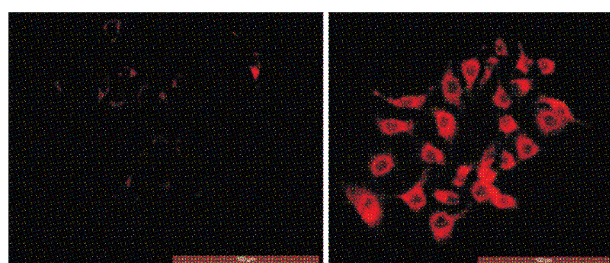
1.6 统计学方法

应用 SPSS21.0 统计学软件进行数据分析, 两组间采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SKOV3 细胞低氧状态检测结果

SKOV3 细胞置于低氧装置 (含 2% O_2) 及常氧 (含 21% O_2) 培养 24 h 后, 通过低氧探针检测细胞缺氧状态, 结果显示低氧培养的细胞的细胞质中红色荧光显著强于常氧组, 见图 1。说明通过该缺氧装置可诱导细胞处于低氧状态, 后续实验 O_2 采取 2% 浓度模拟低氧环境。



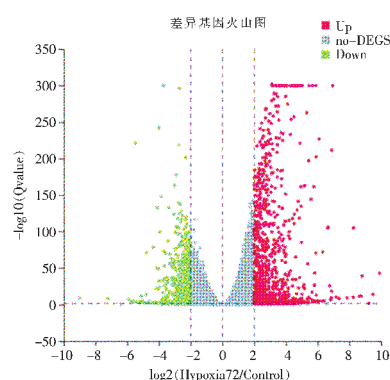
常氧组 低氧组
图 1 低氧探针检测不同氧环境下 SKOV3 缺氧状态 ($\times 200$)

Fig. 1 The hypoxic state of SKOV3 in different oxygen environments detected by hypoxic probe ($\times 200$)

2.2 低氧组相对常氧组细胞 mRNA 差异表达基因分析结果

以每个基因 mRNA 表达的定量 TPM 值为计算目标, 相对于常氧组, 低氧组共有 999 个基因表达显著上调, 646 个基因表达显著下调, 基因表达差异的火山图见图 2, 表达上调的前 5 个基因是 MT1B (Metallothionein 1B, 基因号 4490), CA9 (Carbonic anhydrase 9, 基因号 768), MT1X (Metallothionein 1X, 基因号 4501), HILPDA (Hypoxia inducible lipid droplet associate, 基因号 29923), LOXL2 (Lysyl oxidase like 2, 基因号 4017); 表达下调的前 5 个基因是 WARS1 (Tryptophanyl - tRNA synthetase 1, 基因号 7453), DDX5 (DEAD - box helicase 5, 基因号 54606), UPP1 (Uridine phosphorylase 1, 基因号 7378), PSAT1 (Phosphoserine aminotransferase 1, 基因号 29968), CHAC1 (ChaC

glutathione specific gamma - glutamylcyclotransferase 1, 基因号 79094)。



注: 红色点代表显著上调基因, 绿色点代表显著下调基因, 灰色点代表差异不显著的基因

图 2 低氧组相对常氧组细胞 mRNA 差异表达基因的火山图

Fig. 2 Volcanic map of mRNA differentially expressed genes in hypoxia group compared with normal - oxygen group

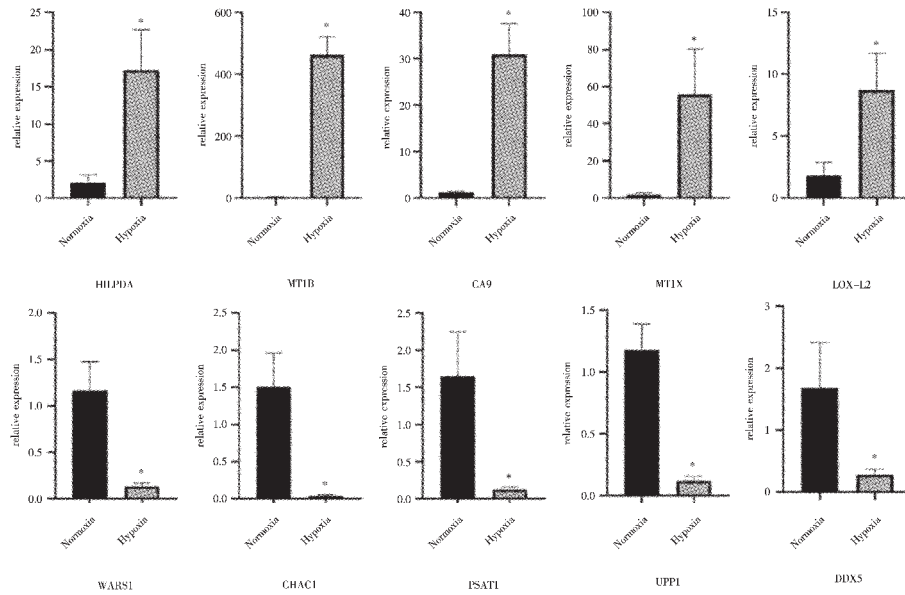
2.3 基因表达谱分析差异表达基因的 RT - qPCR 验证

为进一步证实基因测序 mRNA 表达谱的正确性, 对 5 个上调基因与 5 个下调基因应用 RT - qPCR 进行检测, 结果显示低氧组的 HILPDA、MT1B、CA9、MT1X 与 LOX - L2 基因表达明显高于常氧组, 而低氧组的 WARS1、CHAC1、PSAT1、UPP1 与 DDX5 基因表达明显低于常氧组, 该结果趋势与 RNA 测序结果相一致, 见图 3。

2.4 低氧组相对常氧组细胞 mRNA 差异表达基因的 GO 分析

应用 DAVID 数据库对 999 个上调基因与 646 个下调基因进行 GO 分析, 包括基因的生物学过程、基因表达蛋白的细胞定位与基因的分子功能。结果显示上调基因涉及的生物学过程包括细胞外基质形成、细胞黏附、经典糖酵解、血小板脱颗粒、炎症反应等; 分子功能涉及蛋白酶结合、丝氨酸内肽酶抑制因子活性、胶原蛋白结合、钙离子结合、糖胺聚糖结合等; 基因表达产物的位置包括细胞外区域、细胞外间隙、细胞外泌体、细胞外基质、细胞质膜组成部分, 见图 4。

下调基因涉及的生物学过程包括纤毛组装、以 DNA 为模板的转录、负向调节蛋白磷酸化、以 DNA 为模板的转录调节、纤毛形成等; 分子功能显著富集于金属离子结合、核酸结合、ATP 结合、DNA 结合、核苷酸结合等; 基因表达产物的位置包括细胞质、核质、中心体、细胞核、纤毛基体, 见图 5。



注: Normoxia 为常氧组, Hypoxia 为低氧组, 与常氧组相比 * $P < 0.05$

图 3 表达差异基因的 RT-qPCR 检测的相对定量结果

Fig. 3 Relative quantitative results of RT-qPCR detection of differentially expressed genes

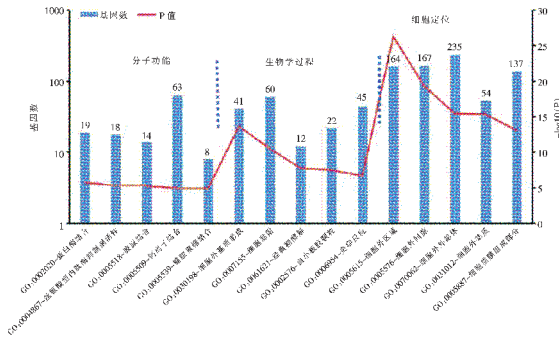


图 4 低氧组相对常氧组细胞 mRNA 差异表达显著上调基因中前 5 位的 GO 分析

Fig. 4 GO term analysis of significantly up-regulated mRNA differential expression in cells of hypoxia group compared with normal-oxygen group

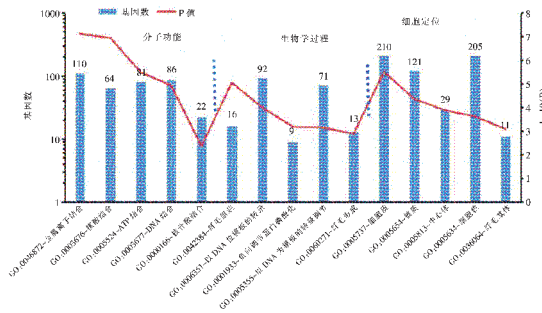


图 5 低氧组相对常氧组细胞 mRNA 差异表达显著下调中前 5 位的基因的 GO 分析

Fig. 5 GO term analysis of significantly down-regulated mRNA differential expression in cells of hypoxia group compared with normal-oxygen group

2.5 低氧组相对常氧组细胞 mRNA 差异表达基因的 KEGG 通路分析结果

DAVID 在线软件结果显示: 上调组基因富集于 PI3K-AKT 信号通路、细胞因子及细胞因子受体相互作用、癌症信号通路、HTLV1 感染、黏着斑等, 见图 6A; 下调组基因富集于脂肪细胞因子信号通路、肿瘤胆碱代谢、RNA 转运、ErbB 信号通路、氨基酸生物合成等, 见图 6B。

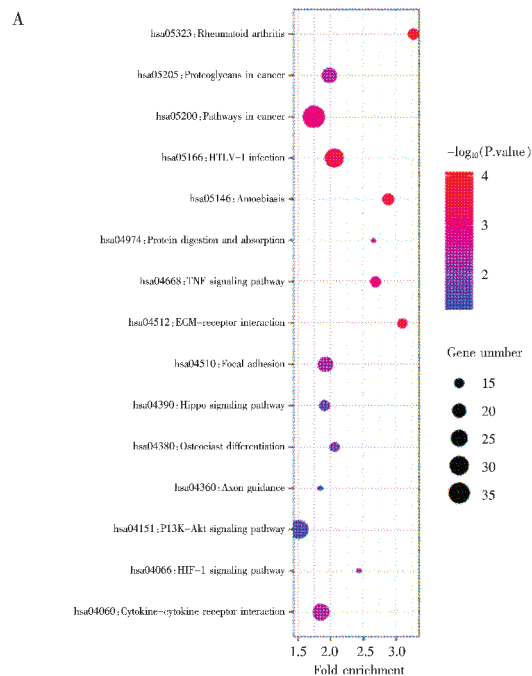
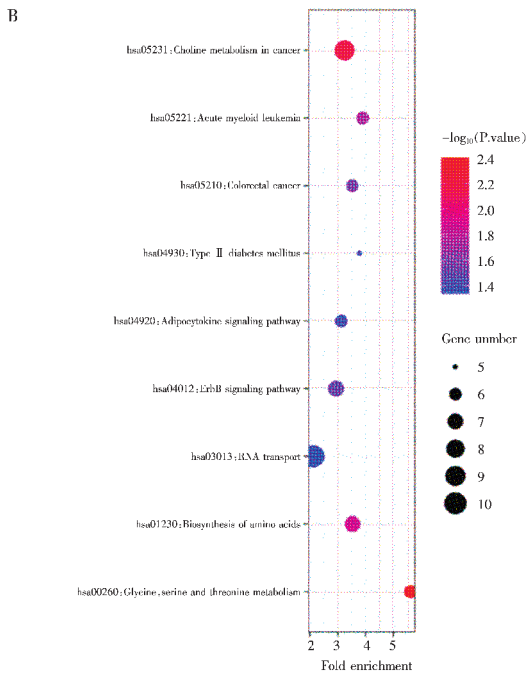


Fig. 6A KEGG pathway analysis of significantly up-regulated genes



注：A 为上调基因，B 为下调基因

图 6 低氧组相对常氧组细胞 mRNA 差异表达显著基因通路分析的气泡图

Fig. 6 Bubble map of pathways for mRNA differentially expressed genes significant in hypoxia group compared with normal - oxygen group

3 讨论

在本研究中，通过 RNA 测序方法检测了上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞在常氧与低氧环境中的基因 mRNA 表达谱。鉴定了 SKOV3 细胞在低氧培养环境相对于常氧培养共计 999 个基因表达显著上调，646 个基因表达显著下调，其中 10 个基因表达差异通过 RT - qPCR 得到验证。应用 GO 和通路富集分析明确差异基因所在的信号通路与所产生的生物学功能。

当前大多数在体外针对肿瘤开展的实验研究是在约大气中氧含量（21%）条件下进行的，而体内不同器官的生理氧含量通常在 3% ~ 10%，特别是大多数肿瘤在体内处于缺氧或 1% ~ 2% 的氧环境中^[17]。这种体内外不同氧含量环境造成肿瘤细胞内基因表达与信号网络激活表现出明显的差异，从而造成体外研究的肿瘤细胞生物学功能及对药物治疗敏感性均与体内不同。因此，在低氧环境下进行对肿瘤的实验研究将更接近肿瘤在体内微环境中的生理病理状态^[18-19]。本实验通过将卵巢癌细胞株置于含有 2% O₂（生理性缺氧状态）的小室内，通过低氧探针检测到细胞处于一种缺氧状态，从而成功建立细胞的低氧模型，为进一步探讨低氧环境下细胞内的基因变化提供实验基础。

SKOV3 细胞为人卵巢癌腺癌细胞系，是从一位白人女性卵巢腺癌患者的腹腔积液中分离得到，属于上皮浆液性肿瘤来源，该细胞对几种化疗药物都耐药，包括顺铂和阿霉素等^[20]。由于上皮高级别浆液癌占整个卵巢肿瘤的 60% 以上，因此在研究人卵巢癌的病理生理及药物治疗的模型时多采用该肿瘤细胞株为体外研究模型。Olbryt 等^[21]应用基因芯片检测方法探讨了卵巢癌细胞 SKOV3 在不同低氧环境下（间隔低氧与持续慢性低氧）与大气氧环境生长的转录组 mRNA 表达的差异，发现间隔缺氧改变的基因表达数少于慢性缺氧，并且具有较低的倍数变化。然而在间隔缺氧表达的基因对于细胞的影响明显大于在长期缺氧环境表达的基因，包括白细胞介素 - 8、纤溶酶原激活剂和表皮生长因子通路相关基因。Zhang 等^[22]对 Olbryt 等^[21]上传在 GEO 数据库的数据（GSE53012）重新进行分析，筛选出 9 个 hub 基因，包括 ESR1、MMP2、ErbB2、MYC、VIM、CYBB、EDN1、SERPINE1 和 PDK，这些基因主要参与增殖对卵巢癌细胞的作用，包括调节细胞增殖、细胞黏附、细胞迁移的正向调节、局灶性黏附和细胞外基质结合。本研究通过 RNA 测序发现了在低氧环境下高表达的 5 个基因（HILPDA、MT1B、CA9、MT1X 与 LOX - L2）与低表达的 5 个基因（WARS1、CHAC1、PSAT1、UPP1 与 DDX5），通过 RT - qPCR 证实这 10 个基因在低氧环境下与常氧环境下表达差异，这些基因生物学功能与细胞增殖功能相关，包括细胞外基质形成、细胞黏附、经典糖酵解、血小板脱颗粒、炎症反应等，为进一步探索低氧环境下卵巢癌生长与发展提供分子靶点。

本研究通路分析显示上调基因主要富集于癌症通路、PI3K - AKT 信号通路、ECM - 受体相互作用、HIF - 1 信号通路等信号通路，而下调基因则主要富集于肿瘤胆碱代谢、氨基酸生物合成等信号通路，说明在低氧环境下增殖能力增强，而分化能力下降。PI3K - AKT 信号通路是肿瘤细胞增殖的经典通路，促进卵巢癌细胞增殖、转移^[23]。在一项对比铂耐药及铂敏感患者的转录组测序的研究中，铂耐药患者表达改变的基因同样也富集于 PI3K - AKT 信号通路^[24]。另一项研究中铂耐药细胞的表达改变基因则显著富集于 ECM - 受体相互作用信号通路^[25]。这些研究结果说明低氧环境下细胞转录组转变成抑制药物治疗的基因表达模式。

综上所述，通过转录组测序分析，进一步明确了卵巢癌细胞在低氧环境下的整个基因表达改变以及涉及的信号通路，该研究结果为进一步研究老年卵巢癌治疗提供新的思路和突破点。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209–249.
- [2] Kuroki I, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer [J]. *BMJ*, 2020, 371: m3773.
- [3] Joueidi Y, Dion I, Bendifallah S, et al. Management and survival of elderly and very elderly patients with ovarian cancer: an age-stratified study of 1123 women from the FRANCOGYN group [J]. *J Clin Med*, 2020, 9 (5): 1451.
- [4] Fourcadier E, Trétarre B, Cras-Aygon C, et al. Under-treatment of elderly patients with ovarian cancer: a population based study [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 937.
- [5] Falandry C, Rousseau F, Mouret-Reynier MA, et al. Efficacy and safety of first-line single-agent carboplatin vs carboplatin plus paclitaxel for vulnerable older adult women with ovarian cancer: a GINECO/GCIG randomized clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7 (6): 853–861.
- [6] Pignata S, Breda E, Scambia G, et al. A phase II study of weekly carboplatin and paclitaxel as first-line treatment of elderly patients with advanced ovarian cancer. A Multicentre Italian Trial in Ovarian cancer (MITO-5) study [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 66 (3): 229–236.
- [7] Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 166.
- [8] Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61–68.
- [9] 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.
- [10] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. *Nat Med*, 2003, 9 (6): 677–684.
- [11] Khalifeh A, Berghella V. Not transabdominal! [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 215 (6): 739–744. e1.
- [12] Bakshi HA, Mkhalek M, Faruck HL, et al. Cellular signaling in the hypoxic cancer microenvironment: implications for drug resistance and therapeutic targeting [J]. *Cell Signal*, 2024, 113: 110911.
- [13] Casamassimi A, Federico A, Rienzo M, et al. Transcriptome profiling in human diseases: new advances and perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (8): 1652.
- [14] Singleton DC, Macann A, Wilson WR. Therapeutic targeting of the hypoxic tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18 (12): 751–772.
- [15] 王鑫. 基于不同氧环境下抗卵巢癌敏感性化疗药物体外筛选的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022. Wang X. Screening of chemotherapeutic drugs against ovarian cancer based on different oxygen environments [D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [16] Huang DW, Sherman BT, Tan Q, et al. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists [J]. *Genome Biol*, 2007, 8 (9): R183.
- [17] McKeown SR. Defining normoxia, physioxia and hypoxia in tumours – implications for treatment response [J]. *Br J Radiol*, 2014, 87 (1035): 20130676.
- [18] Adebayo AK, Nakshatri H. Modeling preclinical cancer studies under physioxia to enhance clinical translation [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 (23): 4313–4321.
- [19] Kumar B, Adebayo AK, Prasad M, et al. Tumor collection/processing under physioxia uncovers highly relevant signaling networks and drug sensitivity [J]. *Sci Adv*, 2022, 8 (2): eabh3375.
- [20] Petru E, Sevin BU, Perras J, et al. Comparative chemosensitivity profiles in four human ovarian carcinoma cell lines measuring ATP bioluminescence [J]. *Gynecol Oncol*, 1990, 38 (2): 155–160.
- [21] Olbryt M, Habryka A, Student S, et al. Global gene expression profiling in three tumor cell lines subjected to experimental cycling and chronic hypoxia [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e105104.
- [22] Zhang K, Kong X, Feng G, et al. Investigation of hypoxia networks in ovarian cancer via bioinformatics analysis [J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11 (1): 16.
- [23] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120–128.
- [24] Koti M, Gooding RJ, Nuin P, et al. Identification of the IGF1/PI3K/NF- κ B/ERK gene signalling networks associated with chemotherapy resistance and treatment response in high-grade serous epithelial ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 549.
- [25] Sherman-Baust CA, Becker K, Wood III WH, et al. Gene expression and pathway analysis of ovarian cancer cells selected for resistance to cisplatin, paclitaxel, or doxorubicin [J]. *J Ovarian Res*, 2011, 4 (1): 21.