

# DNA 损伤应答靶向抑制剂对卵巢癌细胞的化疗增敏作用\*

蔡思源<sup>1,2</sup>, 唐子执<sup>2</sup>, 曾 鸣<sup>2</sup>, 王小军<sup>2</sup>, 楼江燕<sup>1</sup>, 刘 聪<sup>2</sup>, 陈 杰<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 四川大学 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 观察 DNA 损伤应答抑制剂及其联合常规化疗药物(顺铂等)在卵巢癌耐药细胞株 OVCAR-8 中的作用,研究其化疗致敏效应。方法 利用针对 DNA 损伤应答关键信号蛋白质的抑制剂,与顺铂等连用处理卵巢癌细胞,分析这些药物处理方式对卵巢癌细胞的杀伤能力。MTT 法检测不同药物作用后 OVCAR-8 的增殖抑制情况;免疫荧光法检测 OVCAR-8 中磷酸化组蛋白 2A 变体( $\gamma$ H2AX)和 p53 结合蛋白 1(53BP1)的表达,观察二者在 DNA 损伤位点的募集和形成灶点的能力。结果 毛细血管扩张共济失调突变蛋白(ATM)/ATM 和 Rad 3 相关蛋白(ATR)抑制剂与顺铂联用能抑制损伤修复机制的活化,明显减弱 OVCAR-8 细胞的增殖活力( $P < 0.01$ ),促进其凋亡;在羟基脲和 Wortmannin 联合处理时,OVCAR-8 细胞的 ATR 转导信号(如  $\gamma$ H2AX)减弱,细胞生存率明显降低( $P < 0.05$ );多聚 ADP-核糖聚合酶(PARP)抑制剂与顺铂联合处理 OVCAR-8 细胞未发现明显的增敏作用( $P > 0.05$ )。结论 适当的 DNA 损伤应答抑制剂有潜力提高常规化疗药物的抗肿瘤效果,以达到快速清除肿瘤细胞和防止产生耐药性的效果。

**【关键词】** 卵巢肿瘤 顺铂耐药 DNA 损伤应答 抑制剂

**Employing DNA Damage Response Inhibitors to Enhance Chemosensitivity of Ovarian Carcinoma Cells** CAI Si-yuan<sup>1,2</sup>, TANG Zi-zhi<sup>2</sup>, ZENG Ming<sup>2</sup>, WANG Xiao-jun<sup>2</sup>, LOU Jiang-yan<sup>1</sup>, LIU Cong<sup>2</sup>, CHEN Jie<sup>1△</sup>. 1. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: cjzb@sina.com

**【Abstract】** **Objective** To assess the sensitisation effects of DDR inhibitors combined with conventional chemotherapeutics agents (cisplatin *et al*) in a drug-resistant ovarian cancer cell line (OVCAR-8). **Methods** Inhibitors of DDR regulators with cisplatin were applied to challenge OVCAR-8, and evaluated the DNA damage response (DDR) and cytotoxic effects of different combination of chemicals. Inhibition of proliferation to OVCAR-8 of different drugs was evaluated by MTT assay. The activation of phosphorylation of histone family 2A variant ( $\gamma$ H2AX) and p53 binding protein 1 (53BP1) in OVCAR-8 were evaluated by immunofluorescence to observe their ability of recruitment and forming foci at DNA damage site. **Results** We observed that combined treatment of ataxia-telangiectasia mutated (ATM)/ATM and Rad 3-related (ATR) inhibitor and cisplatin can suppress the activation of damage repair mechanisms and weakened the proliferative activity of OVCAR-8 cells ( $P < 0.01$ ); ATR pathway was suppressed and the signal of  $\gamma$ H2AX weakened and cell survival rate significantly reduced when combination therapy of HU and Wortmannin ( $P < 0.05$ ); poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitor could not enhance chemosensitivity in OVCAR-8 cells when combined with cisplatin ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** We substantiated that appropriate inhibitors of DNA damage response may have a potential to improve the anti-tumor effect of conventional chemotherapy drugs and prevent drug resistances.

**【Key words】** Ovarian cancer Cisplatin resistance DNA damage response Inhibitors

目前,肿瘤治疗主要依赖于手术切除、放射线、化学药物和免疫治疗。其中,以 DNA 代谢通路和核苷酸化学结构为靶标的药物,如烷化剂、DNA 聚

合酶抑制剂和双链交联剂等,是一类传统但是仍然重要的抗肿瘤药物。这类药物体现出较高的毒性、特异性较低、易于产生耐药性等缺点,因此在靶向治疗这一大趋势下,DNA 代谢类抗肿瘤药物面临更新换代的挑战<sup>[1-2]</sup>。

研究显示,2012 年在全球范围内,约 239 000 名女性被诊断出患有卵巢恶性肿瘤,约有 152 000 名女

\* 四川省科技厅应用基础计划项目(No. 2012JY0011)和四川省杰出青年学术技术带头人资助计划(No. 2012JQ0005)资助

△ 通信作者, E-mail: cjzb@sina.com

性因此死亡<sup>[3]</sup>。卵巢癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一,致死率居妇科恶性肿瘤首位,5年生存率低于30%<sup>[4]</sup>。卵巢癌是对化疗最敏感的恶性肿瘤之一,目前的治疗措施是以肿瘤细胞减灭术为主的手术治疗,辅以铂类为基础的联合化疗<sup>[5]</sup>。卵巢癌细胞对化疗药物的敏感度对患者生存率有很大的影响。随着肿瘤细胞对顺铂等化疗药物获得性耐药的产生,化疗总体效果明显受到影响<sup>[6]</sup>。研究认为,顺铂引起的DNA损伤后发生的DNA修复是顺铂耐药的主要原因之一<sup>[7]</sup>。因此,全面了解耐药产生的分子机制,对于研究新的药物增加化疗药物敏感性尤为重要。

本研究中,我们将毛细血管扩张共济失调突变蛋白(ATM)/ATR和Rad3相关蛋白(ATR)等DNA损伤应答(DDR)抑制剂对顺铂的细胞毒增敏作用应用到卵巢癌耐药细胞株中,验证提升一线常规化疗药物治疗效果的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胎牛血清(FBS, Gibco),青霉素(100 U/L)/链霉素(100mg/L)(Invitrogen),磷酸盐缓冲液(PBS, 国产), TritonX-100 (Keygen),二甲亚砜(DMSO, Sigma),顺铂(DDP, 国产),Wortmannin(Selleck),多聚ADP-核糖聚合酶(PARP)抑制剂(Olaparib, Selleck),磷酸化组蛋白2A变体( $\gamma$ H2AX)鼠抗人抗体(Millipore),p53结合蛋白1(53BP1)兔抗人抗体(Bethyl),荧光素FITC标记抗鼠二抗(Santa),RPMI-1640培养液、0.0025 g/mL胰蛋白酶、体积分数为4%多聚甲醛(PFA)、羟基脲(HU)、喜树碱(CPT)、ATM/ATR抑制剂(CGK733, Sigma)、荧光素Cy3标记抗兔二抗(Sigma),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, Vector),荧光显微镜(Olympus, BX51)等。卵巢癌细胞株OVCAR-8由本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** OVCAR-8细胞为贴壁生长细胞,将其置于37℃、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>培养箱中,用含10%FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640培养液培养,0.0025 g/mL胰蛋白酶消化传代。

**1.2.2 实验分组及处理** 顺铂、羟基脲溶于水,实验前用RPMI-1640稀释配成相应的工作浓度。CPT、PARP抑制剂、Wortmannin、ATM/ATR抑

制剂用适量DMSO溶解后,用RPMI-1640稀释至工作浓度。

MTT实验分组:CPT组、顺铂组、PARP抑制剂组、PARP抑制剂+顺铂组、Wortmannin组、Wortmannin+羟基脲组、ATM/ATR抑制剂组和顺铂+ATM/ATR抑制剂组。单药组中CPT终浓度分别为25、50、75、100 nmol/L,顺铂终浓度分别为5、10、15、20、25  $\mu$ g/mL,PARP抑制剂终浓度分别为0.25、0.5、1、1.5  $\mu$ mol/L,Wortmannin终浓度分别为2.5、5、10、20  $\mu$ mol/L,ATM/ATR抑制剂终浓度分别为1、2、3、4  $\mu$ g/mL;联合用药PARP抑制剂+顺铂组中PARP抑制剂终浓度分别为0.25、0.5、1、1.5  $\mu$ mol/L,顺铂终浓度为5  $\mu$ g/mL;Wortmannin+羟基脲组中Wortmannin终浓度分别为2.5、5、10、20  $\mu$ mol/L,羟基脲终浓度为1 mmol/L;顺铂+ATM/ATR抑制剂组中顺铂终浓度分别为5、10、15、20  $\mu$ g/mL,ATM/ATR抑制剂终浓度为1  $\mu$ g/mL。对照组加入对应浓度的溶剂。

免疫荧光实验分组:实验组共分为CPT组、顺铂组、PARP抑制剂组、PARP抑制剂+顺铂组、羟基脲组、羟基脲+Wortmannin组、ATM/ATR抑制剂组和ATM/ATR抑制剂+顺铂组。CPT终浓度为50 nmol/L,顺铂终浓度为20  $\mu$ g/mL,PARP抑制剂终浓度为1  $\mu$ mol/L,羟基脲终浓度为1 mmol/L,Wortmannin终浓度分别为5、10  $\mu$ mol/L,ATM/ATR抑制剂终浓度为2  $\mu$ g/mL。对照组加入对应浓度的溶剂。

**1.2.3 MTT法测定细胞增殖抑制情况** 将处于对数期的OVCAR-8细胞以每孔5000个细胞数接种于96孔板,每孔加入RPMI-1640培养液100  $\mu$ L。培养24 h后,实验组分别加入不同终浓度的药物,具体见1.2.2所述。对照组加入对应浓度的溶剂。每组设5个平行复孔。置于培养箱中培养72 h后,每孔加入5 mg/mL MTT液20  $\mu$ L,继续培养4 h;弃去上清后,每孔加入DMSO 200  $\mu$ L,振荡10 min。用酶联免疫检测仪在570 nm波长处测定各孔吸光度(A)值,重复实验3次取平均值。OVCAR-8细胞存活率(%)=实验组A值/对照组A值 $\times$ 100%。

**1.2.4 免疫荧光** 将处于对数生长期的细胞以每孔 $1\times 10^5$ 的细胞数加入放有爬片的24孔板内,待24 h细胞贴壁后于实验组各加入不同终浓度的药物,具体见1.2.2所述。对照组加入对应浓度的溶剂。作用相应时间后收取细胞,PFA固定后行免疫

荧光染色。

免疫荧光染色步骤:用 PBS 缓冲液将已固定好的细胞爬片清洗 3 次,体积分数为 0.3% 的 Tritonx-100 通透 10 min, PBS 洗涤后 Blocking Buffer 封闭 30 min, 加入一抗(兔抗人 53BP1, 1:2 000 或鼠抗人  $\gamma$ H2AX, 1:1 000) 4 °C 过夜或 37 °C 恒温箱孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次后加入 Cy3 标记的抗兔或 FITC 标记的抗鼠荧光标记抗体(1:300), 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次后, 用 DAPI 抗荧光淬灭液封片, 于荧光显微镜下观察结果并拍照。1000 倍视野下每个爬片取 10 个视野采图。

**1.2.5 统计学方法** 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卵巢癌细胞对化疗药物(CPT、DDP)的 DNA 损伤应答反应

免疫荧光结果显示(图 1A), OVCAR-8 细胞在 CPT 处理后, 53BP1 和  $\gamma$ H2AX 的荧光信号均增

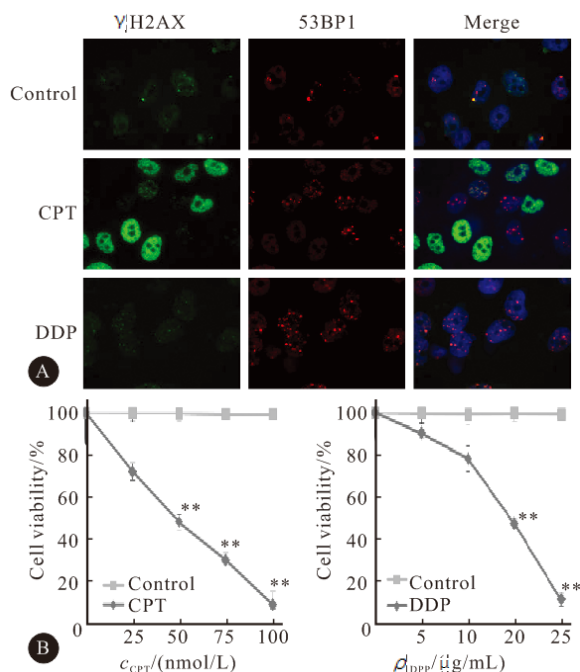


图 1 OVCAR-8 细胞在 CPT 和顺铂处理后的 DNA 损伤应答和生存实验

Fig 1 The DDR and survival test in OVCAR-8 cells after treatment with CPT or DDP

A: The immunofluorescence (IF) of  $\gamma$ H2AX and 53BP1 after 3 h treatment of CPT (50 nmol/L) or DDP (20  $\mu$ g/mL); B: The cell survival rate after 72 h different concentrations treatment of CPT or DDP evaluated by MTT assay; Control: Corresponding concentration of solvent. \* \*  $P < 0.01$ , vs. control group

强, 而顺铂仅引起明显的 53BP1 灶点的形成, 提示 OVCAR-8 细胞对两种药物的应答方式有明显不同。MTT 结果显示(图 1B), 两种化疗药物对 OVCAR-8 细胞的毒性作用也略有不同: CPT 细胞毒性较高, 杀伤力较强, 而 OVCAR-8 对顺铂的生存曲线表明, 顺铂在较高浓度才表现出杀伤能力, 说明其细胞毒性较弱, 具有浓度依赖性。由于顺铂是临床治疗卵巢癌的一线药物, 故后续的药物致敏实验主要采用顺铂来处理。

### 2.2 PARP 抑制剂对顺铂的致敏作用

免疫荧光结果显示(图 2A), PARP 抑制剂单独处理 OVCAR-8 不会引起 DNA 损伤应答的激活,  $\gamma$ H2AX 和 53BP1 均未向灶点聚集; 而 PARP 抑制剂与顺铂联用 3 h 后,  $\gamma$ H2AX 和 53BP1 免疫荧光染色模式依然与单用顺铂处理相同。MTT 实验发

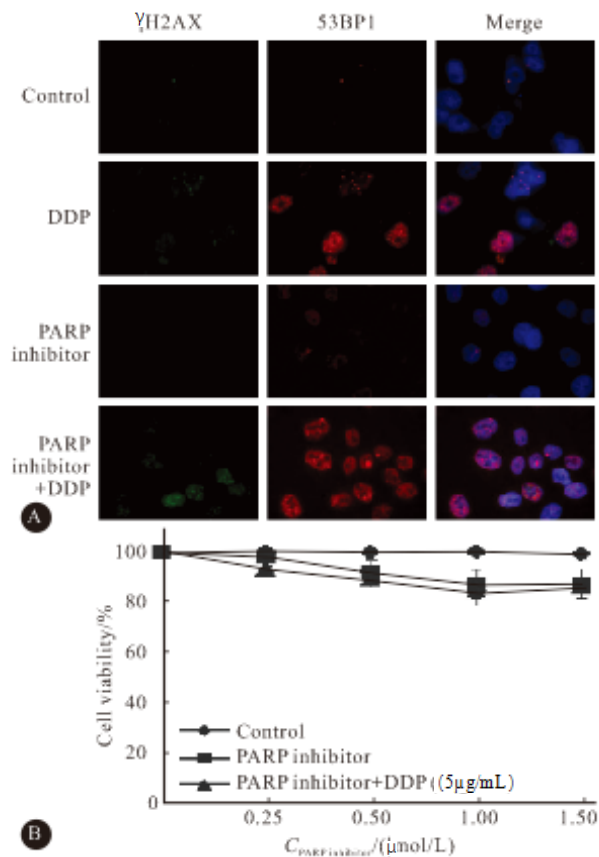


图 2 PARP 抑制剂对顺铂处理的 OVCAR-8 细胞 DNA 损伤应答和存活率的影响

Fig 2 The influence on the DDR and survival rate when employed PARP inhibitor in OVCAR-8 cells after treatment with DDP

A: The IF of  $\gamma$ H2AX and 53BP1 after 3 h treatment with DDP (20  $\mu$ g/mL) or PARP inhibitor (1  $\mu$ mol/L) or PARP inhibitor (1  $\mu$ mol/L) + DDP (20  $\mu$ g/mL); B: The cell survival rate after 72 h different concentrations treatment evaluated by MTT; Control: Corresponding concentration of solvent

现(图 2B), PARP 抑制剂对细胞没有明显毒性, 而将 PARP 抑制剂与顺铂联合处理 OVCAR-8 细胞, 亦未发现明显的增敏作用。说明 PARP 抑制剂对同源重组功能健全的卵巢癌细胞不能进行化疗增敏。

### 2.3 Wortmannin 对 OVCAR-8 细胞的化疗增敏作用

免疫荧光实验发现(图 3A), 羟基脲单独处理 OVCAR-8 激活依赖 ATR 激酶的 DNA 复制应激反应, 活化  $\gamma$ H2AX, 而代表双链断裂应答的 53BP1 未向灶点集聚。在 Wortmannin 联合处理的时候, ATR 被抑制,  $\gamma$ H2AX 信号减低, 但是 53BP1 灶点增多, 说明 ATR 激酶抑制导致 OVCAR-8 细胞双链断裂增多。MTT 结果显示(图 3B), 不同浓度的

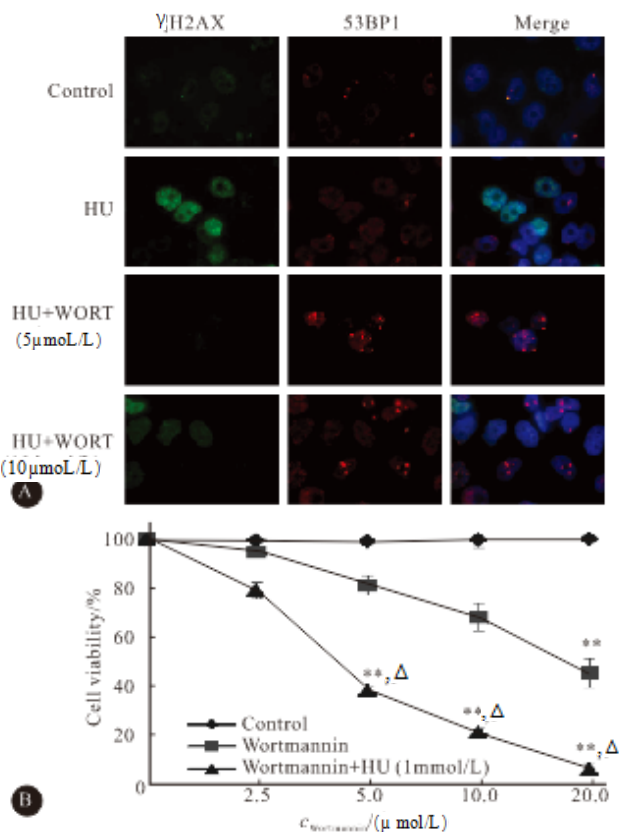


图 3 Wortmannin 对羟基脲处理的 OVCAR-8 细胞 DNA 损伤应答和存活率的影响

Fig 3 The influence on the DDR and survival rate when employed Wortmanninin (WORT) in OVCAR-8 cells after treatment of HU

A: The IF of  $\gamma$ H2AX and 53BP1 after 24 h treatment of HU (1 mmol/L) or HU + Wortmannin (5, 10  $\mu$ mol/L); B: The cell survival rate after 72 h different concentrations treatment evaluated by MTT; Control: Corresponding concentration of solvent. \* \*  $P < 0.01$ , vs. control group;  $\Delta$   $P < 0.05$ , vs. Wortmannin group

Wortmannin 处理具有轻微细胞毒性; 在羟基脲和 Wortmannin 共同处理的情况下, OVCAR-8 细胞的生存率明显减低, 说明在 DNA 复制应激反应缺陷的时候, Wortmannin 对卵巢癌细胞有明显毒性。

### 2.4 ATM/ATR 抑制剂与顺铂对 OVCAR-8 细胞的联合致死效应

免疫荧光实验显示(图 4A), ATM/ATR 丝氨酸/苏氨酸抑制剂单独处理 OVCAR-8 不会引起 DNA 损伤应答的激活,  $\gamma$ H2AX 和 53BP1 均未向灶点聚集; 顺铂单独处理 OVCAR-8 时, 53BP1 向灶点聚集, 激活依赖 ATM/ATR 激酶的检验点和修复机制; 在 ATM/ATR 抑制剂的作用下, 顺铂诱导的 53BP1 的灶点募集被抑制, 说明应对顺铂的检验点激活和修复机制被抑制剂消除, 细胞不能有效地消除损伤; 细胞毒实验也一致地表明(图 4B), ATM/

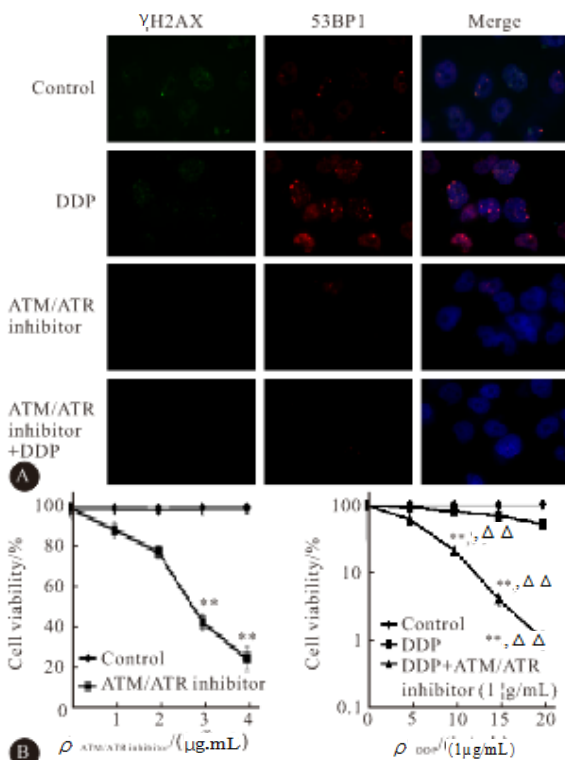


图 4 ATM/ATR 抑制剂对顺铂处理的 OVCAR-8 细胞 DNA 损伤应答及协同增敏效应

Fig 4 The influence on the DDR and synergistic sensitization effect when employed ATM/ATR inhibitor in OVCAR-8 cells after treatment of DDP

A: The IF of  $\gamma$ H2AX and 53BP1 after 6 h treatment of DDP (20  $\mu$ g/mL), ATM/ATR inhibitor (2  $\mu$ g/mL) or ATM/ATR inhibitor (2  $\mu$ g/mL) + DDP (20  $\mu$ g/mL); B: The cell survival rate after 72 h different concentrations treatment evaluated by MTT; Control: Corresponding concentration of solvent. \* \*  $P < 0.01$ , vs. control group;  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$ , vs. DDP group

ATR 抑制剂细胞毒性较弱,在较高浓度才表现出杀伤能力,具有浓度依赖性;低浓度 ATM/ATR 抑制剂可以有效地增强顺铂对 OVCAR-8 细胞的杀伤效果,并表现出协同效应,说明其对顺铂具有较好的药物致敏能力。

### 3 讨论

分子细胞水平上的 DNA 损伤应答反应(或基因组稳定性机制)是 DNA 代谢药物的设计和药效提升的理论依据。在化疗药物的作用下,DNA 复制与损伤修复机制被抑制,DNA 化学结构被化学修饰并产生大量异常核酸结构,如 DNA 双链断裂、鸡脚状结构(chicken-foot)和星型染色体等。这些异常的 DNA 和染色体结构使细胞不能执行其正常的遗传功能,进一步诱发细胞凋亡等自我保护程序,导致肿瘤和正常细胞的死亡和清除。另一方面,这类 DNA 损伤亦可被修复,从而保护细胞的遗传和生理活性,使细胞得以继续生存<sup>[8]</sup>。然而,肿瘤细胞的复制机制的不稳定和损伤修复机制有别于高保真的正常细胞,其损伤修复往往导致大量突变,使肿瘤细胞快速进化适应药物治疗的不良环境,最终导致耐药性的产生<sup>[9,10]</sup>。因此,对 DNA 代谢毒性药物而言,在较短时间内提高肿瘤细胞的杀伤效率是一项重大的挑战。

在已知的 DNA 损伤应答机制中,ATM 和 ATR 苏氨酸/丝氨酸激酶是 DNA 应激反应的早期开关,对细胞周期检验点和同源重组、非同源末端链接修复通路起着重要的调控作用<sup>[11]</sup>。在 ATM/ATR 激酶被抑制的情况下,细胞对 DNA 代谢毒物(化疗药物)表现出高度的敏感性<sup>[12]</sup>。顺铂造成 DNA 双链的交联以实现细胞的杀伤作用,这种 DNA 损伤的应答和修复主要依赖于 ATM/ATR 激酶的活化和双链断裂修复机制。本实验结果也表明,在 ATM/ATR 激酶均被抑制的时候,顺铂的细胞毒性会明显增强。

PARP 对 DNA 复制过程中产生的 DNA 损伤具有强力的修复功能,当同源重组修复缺陷的情况下,抑制 PARP 酶活性可以基于合成致死的原理有效杀伤肿瘤细胞<sup>[13]</sup>。目前已开发出有效的 PARP 抑制剂(奥拉帕尼),用于同源重组缺陷类型的卵巢癌和乳腺癌的靶向治疗。本研究发现,PARP 抑制剂对同源重组功能健全的卵巢癌细胞不能进行化疗增敏。

本研究使用羟基脲,一种合成 dNTP 的关键酶

核糖核苷酸还原酶(ribonucleotidereductase, RNR)的抑制剂处理 OVCAR-8 细胞,用以诱发 DNA 复制的功能紊乱<sup>[14]</sup>;同时,用 Wortmannin 破坏 DNA 复制检验点,观察 OVCAR-8 细胞的存活情况。DNA 复制主要由 DNA 聚合酶及其辅助因子完成,当抑制 DNA 聚合酶所需的脱氧核糖核苷酸(dNTP)原料的时候,DNA 复制产生大量不稳定结构并依赖于 ATR 激酶的 DNA 复制检验点。结果发现,Wortmannin 在 DNA 复制应激反应缺陷的时候,可以有效抑制该检验点的激活,并导致卵巢癌细胞的死亡。

本研究中在已知的 DNA 损伤信号通路的基础上,利用研究得较为成熟的 DDR 抑制剂(Wortmannin、PARP 抑制剂和 ATM/ATR 激酶抑制剂)对治疗卵巢癌的常规化疗药物进行药物增敏实验,以尝试提升这些一线药物化疗效果。结果显示,在阻断 DDR 的一些关键信号通路的情况下,DNA 损伤应答机制出现紊乱甚至崩溃;同时用顺铂等化疗药物诱导大量 DNA 损伤,不能有效进行 DNA 损伤应答的肿瘤细胞会迅速死亡。虽然本研究没有描述这些细胞死亡的原因是经典的凋亡程序或是由于大量染色体断裂造成的细胞机制崩溃,不过有文献提示,使用化疗增敏剂的情况下至少有一部分细胞的死亡有别于细胞凋亡,这些细胞的死亡和清除不依赖于凋亡通路的启动<sup>[15]</sup>。上述结果初步说明,化疗增敏剂能够增强常规化疗药物的抗肿瘤作用,并且可能依赖于新的细胞生物学机理杀伤肿瘤细胞。

综上所述,本研究说明使用基于 DDR 信号通路特征的化疗增敏剂有助于快速、有效地杀灭肿瘤细胞,有可能提高用于治疗卵巢癌的常规化疗药物的临床治疗效果,并为优化卵巢癌化疗方案提供了一定的前瞻性理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] KARST AM, DRAPKIN R. The new face of ovarian cancer modeling: better prospects for detection and treatment. *F1000 Med Rep*, 2011(3): 22. doi:10. 3410/M3-22.
- [2] ARGENTO M, HOFFMAN P, GAUCHEZ AS. Ovarian cancer detection and treatment: current situation and future prospects. *Anticancer Res*, 2008, 28(5B): 3135-3138.
- [3] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386. (下转第 336 页)

- candidate targeting molecule of insulin-like growth factor- I receptor for gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol*, 2010,16(46):5779-5789.
- [10] SCHEEN AJ, LEFEBVRE PJ. Insulin glargine and cancer: a storm in a glass of water? *Rev Med Liege*, 2009,64(9):440-445.
- [11] AUMILLER J. Relationship between diabetology and oncology. Cancer alarm initially without practical consequences. *MMW Fortschr Med*, 2009,151(42):16.
- [12] LOU J, CHU G, ZHOU G, *et al.* Comparison between two kinds of cigarette smoke condensates (CSCs) of the cytogenotoxicity and protein expression in a human B-cell lymphoblastoid cell line using CCK-8 assay, comet assay and protein microarray. *Mutat Res*, 2010,697(1/2):55-59.
- [13] MUMBA ND, MENTEN J, PYANA PP, *et al.* Stage determination in sleeping sickness: comparison of two cell counting and two parasite detection techniques. *Trop Med Int Health*, 2013,18(6):778-782.
- [14] HUMPE A, BECK C, SCHOCH R, *et al.* Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34<sup>+</sup> cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. *Transfusion*, 2005,45(7):1208-1213.
- [15] MAYLE A, LUO M, JEONG M, *et al.* Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry A*, 2013,83(1):27-37.
- [16] CHENAL J, PIERRE K, PELLERIN L. Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *Eur J Neurosci*, 2008,27(1):53-65.
- [17] WAHNER HAE, HALUSKA P, SCHNEIDER PA, *et al.* Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-I receptor in human acute myelogenous leukemia; effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 *in vitro*. *Cancer Res*, 2009,69(19):7635-7643.
- [18] NAVENOT JM, FUJII N, PEIPER SC. KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis. *Mol Pharmacol*, 2009,75(5):1074-1083.
- [19] MIRSHAHI P, RAFII A, VINCENT L, *et al.* Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 2009,23(6):1039-1048.
- [20] BACK K, BRANMARK C, STRALFORS P, *et al.* Differential effects of IGF- I , IGF- II and insulin in human preadipocytes and adipocytes--role of insulin and IGF- I receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 2011,339(1/2):130-135.
- [21] DENLEY A, CARROLL JM, BRIERLEY GV, *et al.* Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. *Mol Cell Biol*, 2007,27(10):3569-3577.
- [22] MENG D, SHI X, JIANG BH, *et al.* Insulin-like growth factor- I (IGF- I ) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 2007,42(11):1651-1660.
- [23] SURINYA KH, FORBES BE, OCCHIODORO F, *et al.* An investigation of the ligand binding properties and negative cooperativity of soluble insulin-like growth factor receptors. *J Biol Chem*, 2008,283(9):5355-5363.

(2015 - 07 - 06 收稿, 2015 - 11 - 06 修回)

编辑 余琳

(上接第 320 页)

- [4] GUBBELS JA, CLAUSSEN N, KAPUR AK, *et al.* The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 2010(3):8. doi:10.1186/1757-2215-3-8.
- [5] HAN LY, KIPPS E, KAYE SB. Current treatment and clinical trials in ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010,19(4):521-534.
- [6] MOSS C, KAYE SB. Ovarian cancer: progress and continuing controversies in management. *Eur J Cancer*, 2002,38(13):1701-1707.
- [7] ROSELL R, LORD RV, TARON M, *et al.* DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2002,38(3):217-227.
- [8] JORDAN P, CARMO-FONSECA M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, 2000;57(8-9):1229-1235.
- [9] BERNSTEIN C, BERNSTEIN H, PAYNE CM, *et al.* DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res*, 2002,511(2):145-178.
- [10] LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 1998,396(6712):643-649.
- [11] ABRAHAM RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 2001,15(17):2177-2196.
- [12] CRISTIANO BE, CHAN JC, HANNAN KM, *et al.* A specific role for AKT3 in the genesis of ovarian cancer through modulation of G(2)-M phase transition. *Cancer Res*, 2006,66(24):11718-11725.
- [13] HELLEDAY T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality; clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol*, 2011,5(4):387-393.
- [14] SNYDER AR, ZHOU J, DENG Z, *et al.* Therapeutic doses of hydroxyurea cause telomere dysfunction and reduce trf2 binding to telomeres. *Cancer Biol Ther*, 2009,8(12):1136-1145.
- [15] CREGAN SP, DAWSON VL, SLACK RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase independent cell death. *Oncogene*, 2004,23(16):2785-2796.

(2015 - 09 - 08 收稿, 2015 - 12 - 13 修回)

编辑 余琳