

引用本文:赵婷,石琴.双调控肿瘤特异性溶瘤腺病毒对卵巢癌靶向治疗的研究[J].安徽医药,2021,25(1):4-8.

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.01.002.

◇ 药学研究 ◇



双调控肿瘤特异性溶瘤腺病毒对卵巢癌靶向治疗的研究

赵婷,石琴

作者单位:上海市嘉定区中心医院妇产科,上海201800

通信作者:石琴,女,主任医师,研究方向为妇科常见疾病的诊治,E-mail:shiqin 0901@126.com

基金项目:上海市嘉定区卫健委青年项目(2018-QN-01)

摘要: **目的** 构建表达携带切除修复交叉互补基因1(ERCC1)siRNA的人端粒酶反转录酶启动子(hTERT)及缺氧诱导因子(HIF)的双调控肿瘤特异性溶瘤腺病毒(RSOAds-hTERT/HIF-ERCC1,以下简称双调控腺病毒),作用于卵巢癌细胞后研究其抑瘤作用及相关分子机制,为卵巢癌的基因治疗奠定基础。**方法** 2018年1—12月,以人端粒酶反转录酶启动子(hTERT)调控腺病毒Ela基因,缺氧调控元件序列(HRE)调控E1b基因,重组hTERT/HIF双调控双功效的肿瘤特异性溶瘤腺病毒载体;于E1区插入ERCC1基因序列设计特异基因构建双调控腺病毒。将构建好的病毒增加荧光载体,荧光显微镜下观察SKOV3人卵巢癌细胞中病毒转染情况。以噻唑蓝(MTT)实验检测不同组别癌细胞增殖活性,流式细胞术检测不同组别癌细胞凋亡情况。蛋白质印迹法检测SKOV3细胞中ERCC1蛋白、JAK/STAT、PI3K/Akt通路蛋白表达情况。**结果** 成功构建了双调控腺病毒,病毒能够在卵巢癌中高效转染并快速增殖,屏蔽ERCC1耐药基因,并具明显的抑瘤作用。MTT结果显示,24 h后双调控腺病毒对SKOV3细胞株具有明显增殖抑制,随着病毒数目增加抑制率逐渐上升,感染强度(MOI) = 30时,卵巢癌SKOV3细胞增殖率下降到50%以下,且AD-ERCC1-siRNA组与AD-NC-siRNA组肿瘤抑制差异无统计学意义($P > 0.05$),AD-ERCC1-siRNA联合顺铂(74.19±3.04)%抑瘤作用较AD-NC-siRNA+DDP组(56.85±2.51)%更强。流式细胞术结果显示:AD-ERCC1-siRNA组细胞凋亡率(5.5±0.75)%较对照组(0.5±0.24)%明显升高。我们对病毒作用后的SKOV3细胞运用WB方法进行检测,结果显示作用后的细胞ERCC1蛋白表达(0.567±0.016)较对照组(1.612±0.072)下降($P < 0.01$),JAK2[(0.860±0.010)比(0.694±0.011)]、STAT3[(0.826±0.032)比(0.651±0.037)]显著高于对照组, ($P < 0.01$),而PI3K[(0.292±0.013)比(0.291±0.015)]、AKT[(0.810±0.018)比(0.813±0.024)]较对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示,当病毒接触卵巢癌细胞24 h后发挥出对卵巢癌细胞较明显的抑瘤作用,且AD-ERCC1-siRNA组与AD-NC-siRNA组无明显差异,在感染强度(MOI) = 30时,卵巢癌SKOV3细胞增殖抑制率下降到50%以下。**结论** 双调控腺病毒成功构建且具备高转染效率,该病毒对卵巢癌SKOV3细胞株有明显生长抑制及促凋亡作用,可能与JAK/STAT通路激活有关,而且该病毒能增强顺铂的用药效果,其机制可能与该病毒成功屏蔽ERCC1耐药基因有关。

关键词: 腺病毒; 切除修复交叉互补基因1(ERCC1); 转录启动子; 缺氧诱导因子; 转染; 顺铂; 质粒构建

Study on dual-regulated tumor-specific oncolytic adenovirus for targeted therapy of ovarian cancer

ZHAO Ting, SHI Qin

Author Affiliation: Department of gynecology and obstetrics, Jiading District Central Hospital Affiliated Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai, 201800, China

Abstract: **Objective** To construct a dual-regulated dual-effect tumor-specific oncolytic adenovirus (RSOAds-hTERT/HIF-ERCC1, hereinafter referred to as double-regulated adenovirus), which expresses hTERT/HIF carrying ERCC1 gene siRNA, then to study the anti-tumor effect and related molecular mechanisms of it which lays a foundation for gene therapy of ovarian cancer. **Methods** January to December 2018, The human telomerase reverse transcriptase promoter (hTERT) was used to regulate the adenovirus Ela gene, the hypoxia regulatory element sequence (HRE) regulates the E1b gene, and the recombinant hTERT/HIF double-regulated double-effect tumor-specific oncolytic adenovirus vector; The ERCC1 gene sequence was designed into the E1 region to design a specific gene to construct a double regulatory adenovirus. MTT was used to detect the inhibition of cell proliferation after SKOV3 cells were treated with different concentrations of virus. Flow cytometry to detect cancer cell apoptosis in different groups. The expression of JAK/STAT and PI3K/Akt pathway proteins in SKOV3 cells was detected by Western blot. **Results** A double-reg-

ulated adenovirus was successfully constructed, and the virus which could proliferate in ovarian cancer had obvious antitumor effect. The results of MTT showed that after 24 hours, the double-regulated adenovirus had obvious proliferation inhibition on SKOV3 cell line, and the inhibition rate increased with the increase of concentration ($P < 0.05$). When the intensity of infection (MOI) = 30, the proliferation rate of ovarian cancer SKOV3 cells dropped below 50%. And there was no difference in AD-ERCC1-siRNA group and AD-NC-siRNA group ($P > 0.05$). The anti-tumor effect of AD-ERCC1-siRNA+DDP group (74.19 ± 3.04)% is stronger than that of AD-NC-siRNA+DDP group (56.85 ± 2.51)% ($P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of AD-ERCC1-siRNA group (5.5 ± 0.75)% was significantly higher than that of the control group (0.5 ± 0.24)% ($P < 0.01$). We performed WB assay on SKOV3 cells after viral action. The results showed that the ERCC1 protein expression of cells (0.567 ± 0.016) was significantly lower than that of the control group (1.612 ± 0.072) ($P < 0.01$). The expression of JAK2, STAT3 in the cells after treatment was increased compared with the control group [(0.860 ± 0.010) vs. (0.694 ± 0.011) , (0.826 ± 0.032) vs. (0.651 ± 0.037)] ($P < 0.01$). The expressions of PI3K and AKT were not statistically different from those of the control group [(0.292 ± 0.013) vs. (0.291 ± 0.015)], AKT [(0.810 ± 0.018) vs. (0.813 ± 0.024)] ($P > 0.05$). The results suggest that when the virus is exposed to ovarian cancer cells for 24 hours, it exerts a significant anti-tumor effect on ovarian cancer cells, and there is no significant difference between the AD-ERCC1-siRNA group and the AD-NC-siRNA group. When the infection intensity (MOI) = 30, the proliferation inhibition rate of ovarian cancer SKOV3 cells dropped below 50%. **Conclusions** The dual-regulated adenovirus was successfully constructed and has high transfection efficiency, which laid the foundation for gene therapy of ovarian cancer. The virus has a significant growth inhibitory and pro-apoptosis effect on ovarian cancer SKOV3 cell line, which may be related to JAK/STAT pathway. The ERCC1-siRNA-containing dual-regulated virus can enhance the drug effect of cisplatin more than AD-NC-siRNA. The mechanism may be related to the successful screening of ERCC1-resistant genes.

Key words: Adenovirus; The excision repair cross-complementation group 1(ERCC1); Transcription initiation site; Hypoxia-inducible factor; Transfection; Cisplatin; Plasmid construction

卵巢恶性肿瘤是全世界女性生殖器官最常见的恶性肿瘤之一,其发病率仅次于宫颈癌和子宫内膜癌,但是死亡率居三大妇科恶性肿瘤之首^[1-3]。卵巢癌治疗主要采取肿瘤细胞减灭术联合以铂类为基础的化疗^[4-5]。其中,化疗耐药是卵巢癌高死亡率的重要原因之一。切除修复交叉互补基因1(Excision repair cross complementing group1, ERCC1)是铂类耐药最为关键的因子^[6],也是目前研究较多的DNA修复基因之一。2018年1—12月,本研究构建了一种双重调控的新型肿瘤特异性增殖溶瘤腺病毒并以此为载体转染ERCC1小干扰RNA,来靶向杀灭卵巢癌细胞,进一步研究其灭瘤分子机制,并初步探讨其卵巢癌化疗增敏效果,以期研究出卵巢癌治疗及化疗辅助新方案。

1 资料与方法

1.1 主要试剂和设备 实验用质粒载体由上海吉凯基因公司实验构建并保存。正常的卵巢癌细胞系SKOV3购自美国ATCC公司,人胚胎肾细胞293t细胞株购自加拿大Microbix Biosystem公司,DEME培养基、胎牛血清购自GIBCO BRL公司,噻唑蓝(MTT)购自美国Genview公司,RIPA裂解液购自碧云天生物公司,磷酸酶抑制剂购自美国Sigma公司,二甲基亚砜(DMSO)购自上海试一化学试剂厂,D-Hanks由上海吉凯基因技术有限公司配制,酶标仪购自Tecan infinite公司细胞凋亡试剂盒购自南京凯

基生物科技发展有限公司,ERCC1、 β -actin、JAK2、STAT、PI3K、Akt抗体皆购买于美国Abcam公司,二抗为山羊抗兔IgG(H+L)、山羊抗小鼠IgG(H+L),均购自Thermo Pierce公司,ERCC1干扰序列(siRNA-ERCC1)、阴性对照序列均由上海吉凯基因有限公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 双调控腺病毒构建及鉴定 使用吉凯基因有限公司提供的pXC-1载体进行改造,其E1a基因上游插入了人端粒酶逆转录酶启动子(hTERT),E1b基因上游插入了缺氧调控元件序列(HRE),于E1a表达盒上游预留了酶切位点(具体结构模式图如图1)。根据Genbank的ERCC1基因序列涉及特异siRNA。ERCC1-siRNA序列为5'-ccAAGCCCT-TATTCCGATCTA-3'。同时设计阴性对照序列5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。编码siRNA的DNA(由吉凯基因有限公司合成)结构为:AgeI+U6启动子+Sense DNA+Loop(TTCAAGAGA)+Antisense DNA+TTTTT+NotI,将双酶切线性化的载体和退火双链DNA进行连接反应,连接后的产物进行转化、PCR鉴定及测序、质粒提取后与腺病毒包装质粒(PBHGE3)一起转染293细胞,重组出携带ERCC1-siRNA的双调控腺病毒(AD-ERCC1-siRNA)及未携带ERCC1-siRNA的对照腺病毒(AD-NC-siRNA)。

1.2.2 鉴定 各腺病毒经PCR扩增鉴定E1a序列

后,于293细胞中反复扩增,氯化铯密度梯度离心纯化,TCID₅₀法检测病毒滴度;挑取病毒克隆噬斑,提取腺病毒DNA,鉴定腺病毒E1a和hTERT序列。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖能力 将对数期生长细胞离心后,重悬细胞,于96孔板接种(密度 5×10^4 个/孔),继续培养,用无血清培养液稀释病毒AD-ERCC1-siRNA、AD-NC-siRNA,按照MOL=5.00、10.00、20.00、40.00、60.00加入100 μ L稀释好的病毒液分别感染细胞,对应于每个病毒感染复数(MOI)值设3个复孔,于24 h后向各孔加入MTT液(5 mg/mL)20 μ L,孵育4 h,终止培养,小心的将孔内上清液吸弃,将100 μ L二甲基亚砷加入各孔,振荡15 min,待结晶物完全溶解后,利用酶标仪检测各孔在492 nm波长处的吸光度A值。

根据DDP作用于SKOV3预实验结果,得出DDP IC₁₀(2.26 mg/L),并设置五个组别DDP IC₁₀(2.26 mg/L)、AD-ERCC1-siRNA(MOI 30)、AD-NC-siRNA(MOI=30)、DDP IC₁₀+AD-NC-siRNA(MOI 30)、DDP IC₁₀+AD-ERCC1-siRNA(MOI=30),MTT法比较各组的吸光度(A)值及细胞增殖抑制率。

1.2.4 AnnexinV-FITC双染结合流式细胞术检测SKOV3细胞的凋亡 收集不同作用组的细胞及细胞培养液,按照AnnexinV-FITC试剂盒说明,1 000 r/min离心5 min(TGL-16B台式离心机上海安亭科学仪器厂),弃上清,用PBS轻轻重悬细胞并计数。取 1×10^6 个重悬的细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入195 μ L AnnexinV-FITC结合液重悬细胞。加入5 μ L AnnexinV-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育10 min。1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入190 μ L Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。加入10 μ L碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western Blot) 检测细胞中JAK2、STAT、PI3K、Akt蛋白表达各组细胞转染后培养24 h,用预冷的RIPA裂解液和磷酸酶抑制剂分别提取总蛋白并检测纯度。取总蛋白30 μ L,进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,用3%牛血清白蛋白室温下封闭60 min, TBST冲洗3次,加入一抗JAK2、STAT、PI3K、Akt,4 $^{\circ}$ C过夜孵育, TBST冲洗3次,将二抗加入,37 $^{\circ}$ C孵育60 min,用TBST冲洗3次,暗室下用ECL反应15 min,用Image J软件分析,计算细胞中JAK2、STAT、PI3K、Akt蛋白表达量。

1.3 统计学方法 使用SPSS和GraphPad Prism软件进行统计分析和制作图表。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

两组间比较采用成组 t 检验,多组间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较用Lsd- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSOAds-hTERT/HIF-ERCC1双调控腺病毒成功构建并可以高效转染卵巢癌细胞 我们将携带ERCC1-siRNA基因的工具载体质粒(载体顺序为pU6-MCS-phTERT-E1A-pHRE1B55K-pIX-E2B,克隆位点:Age I、Not I),与腺病毒包装质粒-PBHGE3一起转染293细胞,成功构建双调控溶瘤腺病AD-ERCC1-siRNA,见图1。我们将构建成功的AD-ERCC1-siRNA病毒增加荧光载体,置于荧光显微镜下进行观察,病毒转染效率较高,见图2。

2.2 RSOAds-hTERT/HIF-ERCC1双调控腺病毒对卵巢癌细胞有增殖抑制作用 MTT方法检测双调控腺病毒对卵巢癌细胞SKOV3细胞的增殖抑制作用,结果提示,当病毒接触卵巢癌细胞24 h后发挥出对卵巢癌细胞较明显的增殖抑制作用,且AD-ERCC1-siRNA组与AD-NC-siRNA组无明显差异,在感染强度(MOI)=30时,卵巢癌SKOV3细胞增殖率下降到50%以下,见图3和表1。

表1 双调控腺病毒对SKOV3细胞的半数抑制率病毒浓度

组别	IC ₅₀ (MOI值)	95%置信区间(MOI值)
AD-NC-siRNA	29.75 $\pm$ 3.21	25.86~34.22 $\pm$ 2.41
AD-ERCC1-siRNA	29.06 $\pm$ 2.62	26.06~32.41 $\pm$ 1.69

注:AD-ERCC1-siRNA为携带ERCC1-siRNA的双调控腺病毒,AD-NC-siRNA为未携带ERCC1-siRNA的对照腺病毒,MOI为病毒感染强度值。

2.3 RSOAds-hTERT/HIF-ERCC1双调控腺病毒对卵巢癌细胞促凋亡作用 将AD-ERCC1-siRNA病毒对卵巢癌细胞作用效果进行了图像观察及细胞凋亡实验,与空白细胞对照组相比,细胞培养24 h后,可见大量SKOV3细胞形态不规则,细胞体老化分解或者萎缩聚集,胞核深染(显微镜放大倍数40倍)。流式细胞实验显示AD-ERCC1-siRNA组细胞凋亡率(5.5 $\pm$ 0.75)%较对照组(0.5 $\pm$ 0.24)%明显升高($P < 0.01$)。见图4。

2.4 RSOAds-hTERT/HIF-ERCC1双调控腺病毒高效屏蔽ERCC1耐药基因,并可能通过JAK/STAT通路介导杀伤上皮性卵巢癌细胞 我们采用传统WB方法对病毒作用后的SKOV3细胞进行细胞收集以及蛋白提取后检测。结果显示AD-ERCC1-siRNA组作用后细胞ERCC1蛋白(0.553 $\pm$ 0.036)表达较对照组(1.607 $\pm$ 0.102)明显减少($P < 0.01$)。JAK2、STAT3表达量较对照组表达明显增加($P <$

0.01)。同时我们也进行了PI3K/Akt通路的相关蛋白检测,其表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图5、表2。

表2 AD-ERCC1-siRNA病毒作用后对ERCC1蛋白及细胞凋亡蛋白影响 $\bar{x} \pm s$

组别	ERCC1	JAK2	STAT3	PI3K	AKT
NC(对照组)	1.612±0.072	0.694±0.011	0.651±0.037	0.291±0.015	0.813±0.024
AD-ERCC1-siRNA组	0.567±0.016	0.860±0.010	0.826±0.032	0.292±0.013	0.810±0.018
P值	<0.001	<0.001	0.003	0.834	0.844

注:ERCC1为核苷酸切除修复交叉互补修复缺陷偶联因子,JAK2为非受体酪氨酸蛋白激酶,STAT3为信号传导及转录激活因子,PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,AKT为蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶。

2.5 携带ERCC1-siRNA的双调控病毒较AD-NC-siRNA更能增强顺铂的用药效果,其机制可能与ERCC1耐药基因成功屏蔽有关 我们采用MTT方法检测单药顺铂组、病毒组、联合组等组别对卵巢癌细胞SKOV3细胞的杀灭作用,结果提示,五组卵巢癌细胞SKOV3增殖率均被明显抑制($P < 0.01$),其中携带ERCC1-siRNA的双调控病毒联合顺铂组较其余各组抑瘤作用更强,较AD-NC-siRNA+DDP组更能增强顺铂的用药效果($P < 0.01$),而AD-NC-siRNA组与AD-ERCC1-siRNA组对肿瘤细胞作用差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 噻唑蓝检测DDP组、病毒组、联合组等组别对卵巢癌细胞SKOV3的增殖抑制率

组别	D492 nm	细胞增殖抑制率(%)
对照组	0.993±0.02	
DDP	0.888±0.02 ^{①②}	10.70±2.27 ^②
AD-NC-siRNA	0.610±0.03 ^{①②}	38.63±7.47 ^②
AD-ERCC1-siRNA	0.598±0.02 ^{①②}	40.00±7.06 ^{②③}
DDP+AD-NC-siRNA	0.428±0.01 ^{①②}	56.85±2.51 ^②
DDP+AD-ERCC1-siRNA	0.256±0.03 ^①	74.19±3.04

注:①与对照组相比, $P < 0.01$ 。②与DDP+AD-ERCC1-siRNA组相比, $P < 0.01$ 。③与AD-NC-siRNA组相比, $P > 0.05$ 。

3 讨论

卵巢癌以盆腔种植及转移为主,因病灶位置较深,化疗药物静脉用药盆腔局部难以达到有效浓度,治疗效果不佳,盆腔灌注的方法亦对正常组织和细胞造成很大损伤。且肿瘤细胞对铂类药物产生耐药性更是阻碍了药物的抗肿瘤效应,使术后5年生存率徘徊在30%~50%之间^[6]。因此,一种肿瘤靶向性强且能逆转耐药的卵巢癌治疗新方案已经成为妇科肿瘤学重要的研究目标之一。

肿瘤特异性增殖溶瘤腺病毒(RSOAds)载体因其高度肿瘤靶向性及杀伤力引起我们关注,它能感染肿瘤细胞,在其中复制、增殖、裂解、杀伤肿瘤细胞并释放出更多病毒,感染其他肿瘤细胞进行链式杀伤反应,且复制、增殖仅限于肿瘤细胞,对正常宿主组织几乎无破坏^[7]。

目前认为,端粒酶的活化与卵巢癌的发生密切相关,其活性增加在卵巢癌的进展中具有重要意义^[8-9]。在肿瘤细胞的恶性增殖过程中,细胞耗氧量剧增,肿瘤内缺氧微环境诱导缺氧诱导因子(HIF-1)形成,HIF-1在包括卵巢癌在内的多种肿瘤中广泛存在,它与一系列缺氧反应元件(HRE)结合,从而启动目的基因的转录表达,在肿瘤发生、发展、凋亡、浸润及转移等方面起着十分重要的作用^[10]。有研究证明HIF-1在卵巢癌、脑癌、乳腺癌、肾癌、膀胱癌等一系列人体实体瘤中均高表达,而在相邻的正常组织或基质细胞中则无表达^[11-12]。

卵巢癌铂类耐药最为关键的因子是切除修复交叉互补基因1(ERCC1),也是目前研究较多的DNA修复基因之一^[13]。ERCC1位于人类19号染色体上,参与了DNA链的切割和损伤识别,ERCC1 mRNA水平可以反映肿瘤组织修复铂类药物所致DNA螺旋扭转的能力,是标志肿瘤病人预后和铂类化疗效果的重要指标。很多研究发现接受以铂类为基础的化疗病人中ERCC1表达越高,化疗效果及病人的预后越差^[14-15]。

综上所述,我们设想依据恶性实体肿瘤无限增殖和瘤内缺氧环境的存在这两个主要特征,构建一种人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子和HIF-1双重调控的新型肿瘤特异性增殖溶瘤腺病毒并以此为载体转染ERCC1 siRNA,靶向杀灭卵巢癌细胞同时初步探讨其卵巢癌化疗辅助效果,以期灭瘤同时增强肿瘤细胞化疗敏感性,两者相辅相成,有效预防肿瘤复发,并减少化疗药物用量,加强化疗效果并提高病人生活质量,延长病人生存期。

本研究将hTERT和HIF-1分别插入已删除病毒复制所必需的E1A、E1B基因启动子删除的腺病毒质粒,成功构建仅在肿瘤细胞内特异性增殖的双调控溶瘤腺病毒(RSOAd-hTERT-HIF),并以此为耐药基因ERCC1的siRNA基因载体,进一步包装成溶瘤腺病毒hTERT启动/HIF-ERCC1siRNA质粒(RSOAds-hTERT/HIF-ERCC1 siRNA),以抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡,达到提高肿瘤基因治疗的目的。经鉴定,本研究构建的双调控腺病毒能够在卵巢癌细胞中高拷贝增殖,并能成功屏蔽卵巢癌

SKOV3 细胞中 ERCC1 耐药基因, 且实现了针对恶性肿瘤端粒酶阳性和缺氧环境的双调控作用。

磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路是一个经典的抗凋亡、促存活的信号转导途径, 由 PI3K 家族、Akt 蛋白及其一系列底物组成。PI3K 是细胞膜上的表皮生长因子受体(EGFR)细胞内部分的下流分子, EGFR 激活后, PI3K 随后活化, 并进一步磷酸化激活 Akt, 磷酸化的 Akt 直接或间接参与许多生理和病理过程^[16-17]。目前研究表明, PI3K/Akt 转导途径是卵巢癌细胞对 DDP 敏感性的关键调控因素^[18]。

JAK-STAT 信号通路是一条由细胞因子刺激的信号转导通路, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程。JAK-STAT 信号通路功能广泛, 目前与疾病及药物创新相关的研究都集中于炎症性疾病及肿瘤性疾病^[19]。

我们选用卵巢癌 SKOV3 细胞进行该病毒的细胞学试验, 通过对细胞进行 MTT 检测发现此病毒对上皮性卵巢癌细胞株 SKOV3 具有一定的杀灭作用, 且携带 ERCC1 siRNA 后并不影响病毒灭瘤效果; 甚至屏蔽 ERCC1 基因后还具有明显顺铂增敏作用。同时进行了细胞凋亡通路的检测, JAK/STAT 通路的激活可能是该病毒诱导肿瘤细胞死亡的一条重要途径, PI3K/Akt 通路尚未发现参与其中。

我们首例将双调控腺病毒应用于妇产科肿瘤, 致力构建一种靶向性极高的溶瘤腺病毒应用于卵巢癌的治疗, 探讨其溶瘤机制及化疗增敏效果, 为卵巢癌的基因治疗打下坚实的研究基础。当然, 后续还有一些问题亟待我们不断进行完善研究, 比如探讨目的病毒屏蔽 ERCC1 耐药基因后化疗增敏分子机制研究及完善相关动物实验等。

(本文图 1~5 见插图 1-1)

参考文献

- [1] JAYSON GC, KOHN EC, KITCHENER HC, et al. Ovarian cancer[J]. *Lancet*, 2014, 384(9951): 1376-1388.
- [2] 周琳, 何秀萍. 卵巢癌形成、诊断及治疗的研究进展[J]. *中国生育健康杂志*, 2018, 29(5): 491-493.
- [3] 李宁, 孔北华, 尹如铁, 等. 晚期上皮性卵巢癌一线维持治疗专家共识[J]. *现代妇产科进展*, 2019, 28(10): 721-723.
- [4] LÓPEZ-CAMARILLO C, RINCÓN DG, RUIZ-GARCÍA E, et al. DNA repair proteins as therapeutic targets in ovarian cancer[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(4): 316-323.
- [5] YANG F, GAO B, CHEN W, et al. Expression of resistance gene and prognosis of chemotherapy in primary epithelial ovarian cancer[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(41): e12364. DOI: 10.1097/MD.00000000000012364.
- [6] AMERI A, MORTAZAVI N, KHOSHBAKHT AHMADI H, et al. ERCC1 expression can predict response to platinum-based induction chemotherapy in head and neck cancer cases[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(S3): 87-91.
- [7] JIANG H, RIVERA-MOLINA Y, GOMEZ-MANZANO C, et al. Oncolytic adenovirus and tumor-targeting immune modulatory therapy improve autologous cancer vaccination[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(14): 3894-3907.
- [8] KIM SH, CHO KH, KIM YN, et al. Resveratrol attenuates norepinephrine-induced ovarian cancer invasiveness through downregulating hTERT expression[J]. *Arch Pharm Res*. 2016, 39(2): 240-248.
- [9] 徐惠昌, 晏红, 朱薇, 等. 特异性沉默 hTERT 基因表达对卵巢癌细胞增殖、凋亡及 p53、p21 的表达的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(23): 5583-5586.
- [10] HUANG Y, LIN D, TANIGUCHI CM. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe? [J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(10): 1114-1124.
- [11] SHIN JI, LIM HY, KIM HW, et al. Analysis of hypoxia-inducible factor-1 α expression relative to other key factors in malignant canine mammary tumours [J]. *J Comp Pathol*, 2015, 153 (2/3): 101-110.
- [12] VAUPEL P, MAYER A. Tumor oxygenation status: facts and fallacies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 977: 91-99.
- [13] CHEBOUTI I, KUHLMANN JD, BUDERATH P, et al. ERCC1-expressing circulating tumor cells as a potential diagnostic tool for monitoring response to platinum-based chemotherapy and for predicting post-therapeutic outcome of ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 24303-24313.
- [14] HEYZA JR, ARORA S, ZHANG H, et al. Targeting the DNA repair endonuclease ERCC1-XPF with green tea polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) and its prodrug to enhance cisplatin efficacy in human cancer cells [J/OL]. *Nutrients*, 2018, 10(11) DOI: 10.3390/nu10111644.
- [15] SONG P, YIN Q, LU M, et al. Prognostic value of excision repair cross-complementation group 1 expression in gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1393-1400.
- [16] BELKOUZ A, LABEUR TA, DIERKS J, et al. Prognostic immunohistochemical biomarkers of chemotherapy efficacy in biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 141: 82-94.
- [17] ALZHRANI AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019 59: 125-132.
- [18] EDIRIWEERA MK, TENNEKON KH, SAMARAKOON SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 147-160.
- [19] ROSKOSKI R JR. Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 784-803.

(收稿日期: 2019-10-10, 修回日期: 2019-12-12)