

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.20.002

## CIK 细胞对卵巢癌化疗耐药的逆转作用及对 ERCC 表达的影响\*

王亚军<sup>1</sup>,袁越<sup>2</sup>,柳海燕<sup>1</sup>,张琼<sup>1</sup>,周航<sup>1△</sup>

(1.遵义医学院附属肿瘤医院腹部肿瘤科,贵州遵义 563000;2.黔西南布依族苗族自治州人民医院肿瘤科,贵州黔西南州 562400)

**[摘要]** **目的** 探讨细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞在杀伤人卵巢癌耐顺铂(DDP)细胞株(SKOV3/DDP)的效应当中是否存在逆转化疗耐药作用及其对切除修复交叉互补基因组 1(ERCC1)、切除修复交叉互补基因组 2(ERCC2)表达的影响。**方法** 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测 DDP、CIK 细胞、无毒剂量 CIK 细胞联合顺铂对人卵巢癌亲本细胞株(SKOV3)和 SKOV3/DDP 的体外杀伤活性。实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)和 Western-blot 分别检测经无毒剂量 CIK 细胞作用下两组细胞中 ERCC1、ERCC2 基因表达的变化。**结果** DDP 和 CIK 细胞对 SKOV3、SKOV3/DDP 两组细胞均有杀伤效应,且随 DDP 浓度和效靶细胞比值的升高呈依赖性增加;与单纯 DDP 作用相比,无毒剂量 CIK 细胞联合 DDP 对 SKOV3/DDP 细胞具有较明显的协同作用( $P<0.05$ )。CIK 细胞作用 SKOV3/DDP 细胞后,靶细胞中 ERCC1 mRNA 和蛋白的表达量较干预前降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );ERCC2 mRNA 和蛋白的表达量较干预前降低,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** CIK 细胞可以部分逆转 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 的耐药性,且 CIK 细胞逆转 SKOV3/DDP 的耐药作用可能与 ERCC1 表达下调有关联,而与 ERCC2 表达下调无关联。

**[关键词]** 人卵巢上皮癌;逆转耐药;细胞因子诱导的杀伤细胞;切除修复交叉互补基因组 1;切除修复交叉互补基因组 2

**[中图分类号]** R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)20-2649-05

## The reversal effect of CIK cells on chemoresistance in ovarian cancer and the effect on ERCC expression\*

WANG Yajun<sup>1</sup>,YUAN Yue<sup>2</sup>,LIU Haiyan<sup>1</sup>,ZHANG Qiong<sup>1</sup>,ZHOU Hang<sup>1△</sup>

(1. Department of Abdominal Oncology, the Cancer Hospital Affiliated to Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Department of Oncology, Qianxinan People's Hospital, Qianxinan, Guizhou 562400, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the anti-tumor effect of cytokine induced killer (CIK) cells against cisplatin (DDP) resistant human ovarian cancer cell line (SKOV3/DDP), and its effect on the expression of excision repair cross-complementation genome 1 (ERCC1) and excision repair cross-complementation genome 2 (ERCC2). **Methods** The cytotoxic effects of DDP, CIK, non-toxic CIK combined with DDP against human ovarian cancer parental cell lines (SKOV3) and SKOV3/DDP were detected by MTT assay in vitro. Real-time PCR and Western-blot were used to detect the expression of ERCC1 and ERCC2 genes in the two groups of cells treated with non-toxic CIK. **Results** DDP and CIK had cytotoxic effects on both SKOV3 and SKOV3/DDP cells, in ratio of DDP concentration and target cells increased dependence. Compared with DDP alone, non-toxic CIK combined with DDP had a significant synergistic effect on SKOV3/DDP cells ( $P<0.05$ ). The expression of ERCC1 mRNA and protein in SKOV3/DDP cells were lower than those before intervention ( $P<0.05$ ). The expression of ERCC2 mRNA and protein were lower, but the difference was not statistically significant ( $P>0.05$ ). **Conclusion** CIK cells can partially reverse the drug resistance of SKOV3/DDP cells to DDP, and it may be related to the down-regulation of ERCC1 expression but not to down-regulation of ERCC2 expression.

**[Key words]** human ovarian epithelial carcinoma; reversal of drug resistance; CIK; ERCC1; ERCC2

卵巢癌是恶性程度最高的妇科肿瘤,一般早期没有症状,确诊时有 60%~70% 的患者已属晚期,故卵

巢癌 5 年的生存率仅为 30%<sup>[1]</sup>。卵巢癌的主要治疗手段是肿瘤细胞减灭术和以铂类药物为基础的联合

\* 基金项目:贵州省科技社会发展攻关计划重点项目(黔科合 SY 字《2011》3028 号)。 作者简介:王亚军(1987-),主治医师,硕士,主要从事宫颈癌化疗耐药研究。 △ 通信作者,E-mail:zhouhang6618@sin.com。

化疗,铂类药物抗肿瘤疗效确切,约 80% 的初治患者获得显著临床缓解,但仍有部分患者初次化疗不能控制病情,或者缓解后又发生肿瘤复发及转移情况但再次化疗效果欠佳,即出现多药耐药现象(multidrug resistance,MDR),最终导致化疗失败<sup>[2-3]</sup>。因此探寻新的治疗手段以逆转化疗耐药是卵巢癌治疗研究的必然选择。

DNA 损伤修复能力增强是导致卵巢癌顺铂耐药的主要原因之一,由铂-DNA 加合物引起的 DNA 损伤修复主要通过核苷酸切除修复途径,而切除修复交叉互补基因组 1(ERCC1)和切除修复交叉互补基因组 2(ERCC2)是该途径的重要参与因子<sup>[4-8]</sup>。生物治疗是近年来肿瘤治疗中的重要进展之一,CIK 细胞就是一种肿瘤过继免疫治疗方法。目前,国内外临床上以 CIK 细胞为主导的肿瘤免疫细胞治疗不断取得新的进展<sup>[9-10]</sup>,但有关 CIK 细胞是否能够抑制肿瘤细胞的 DNA 修复能力而逆转肿瘤化疗耐药的研究少见报道。本研究就 CIK 细胞对卵巢癌耐药细胞灵敏度的影响及其与 ERCC1、ERCC2 基因表达变化情况的关系进行研究,探索 CIK 细胞的治疗作用是否与部分逆转卵巢癌化疗耐药现象有关,为其治疗卵巢癌可能提供新的机制和理论补充。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养** 人卵巢上皮癌细胞耐顺铂株(SK-OV3/DDP 细胞)及敏感亲本细胞株(SKOV3 细胞)均购自中国医学科学院肿瘤细胞库,其中 SKOV3/DDP 细胞株是以对顺铂敏感的 SKOV3 为亲本,使用顺铂连续作用并逐步提高药量而形成的耐药株。两组细胞均用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的孵箱内进行培养。CIK 细胞是直接由本院细胞工程实验室(负责完成 CIK 细胞体外诱导及质量控制工作)提供。

**1.2 试剂与药品** RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购自美国 Hyclon 公司,MTT 试剂购自美国 Sigma 公司,聚合酶链反应(PCR)引物、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)反应试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司,兔抗 ERCC 1、兔抗 ERCC 2 (XPD)购自美国 Cell Signaling 公司,兔抗  $\beta$ -actin 购自博士德生物工

程有限公司,山羊抗兔辣根酶标记购自北京中衫公司,PVDF 膜购于美国 Millipore 公司,顺铂(DDP)购自德州德药制药有限公司。

### 1.3 MTT 法检测 CIK 细胞作用靶细胞前、后对 DDP 化疗敏感性的变化

**1.3.1** 将对数生长期的 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞制成  $5 \times 10^4$  /mL 的细胞悬液接种于无菌 96 孔培养板中,每孔 100  $\mu$ L。24 h 后将不同浓度 DDP(DDP 药物终浓度分别为 48.00、24.00、12.00、6.00、3.00、1.50、0.75  $\mu$ g/mL)加入 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,每组设 6 个复孔。同时设置阴性对照组(不加顺铂)和调零组,放置在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱中培养 24 h。MTT 法测光密度(OD)值,计算两组细胞的抑制率。

**1.3.2** 按上述方法加 CIK 细胞,将 CIK 细胞以不同效靶比(80 : 1、40 : 1、20 : 1、10 : 1)加入 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,每组设 6 个复孔。同时设置阴性对照组(不加 CIK 细胞)和调零组。计算两组细胞的抑制率、IC<sub>10</sub> 值(即非细胞毒性剂量)。

**1.3.3** 按上述方法加入无毒剂量 CIK 细胞后,再加入 DDP。实验组中的两组细胞均加入各自 IC<sub>10</sub> 对应效靶比的 CIK 细胞,每孔 100  $\mu$ L,每组 6 个复孔,同时设置阴性对照组(等体积 RPMI-1640 培养液)和调零组。待培养 24 h 后,磷酸盐缓冲液(PBS)反复清洗去掉 CIK 细胞,再加入不同浓度 DDP(DDP 浓度同 1.3.1),每孔 100  $\mu$ L,继续孵育 24 h。计算两组细胞的抑制率及逆转倍数(RF)。

**1.4 real-time PCR 检测 ERCC1、ERCC2 mRNA 的表达** real-Time PCR 检测 DDP、无毒剂量 CIK 及 CIK 细胞分别作用两组细胞 24 h 后 ERCC1、ERCC2 mRNA 的表达情况。将上述细胞扩大培养,TRIzol 法分别提取总 RNA,反转录合成 cDNA,再进行 PCR 扩增(PCR 引物序列见表 1)。PCR 反应条件:预变性 95 °C 30 s,进行 1 个循环;PCR 反应 95 °C 5 s;60 °C 30 s,进行 40 个循环;55 °C 开始,每 0.4 °C 采集 1 次荧光,每次 10 s,共采集 100 次。在 PCR 扩增过程中设立无模板阴性对照。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行相对定量分析,以  $\beta$ -actin 为内参基因对上样量进行校正。每组设 3 个样本,重复 3 次。

表 1 引物制备及引物序列

基因名称	Oligo Name	序列
ERCC1	HA209274-F	5'-AAGATGTGTATCCTGGCCGACTG-3'
	HA209274-R	5'-AGGTCCgCTGGTTCCTGCTC-3'
ERCC2	HA137784-F	5'-CAAGAACTGTGCCAGAGATTGAGA-3'
	HA137784-R	5'-CTGTGAGGCTGTGGCATTTC-3'
$\beta$ -actin	HA067803-F	5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3'
	HA067803-R	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'

1.5 Western-blot 检测 ERCC1、ERCC2 蛋白的表达

Western-blot 检测 DDP、无毒剂量 CIK 及 CIK 细胞分别作用两组细胞 24 h 后 ERCC1、ERCC2 蛋白的表达情况。细胞裂解液冰浴细胞 5 min 提取总蛋白后,BCA 法对总蛋白进行定量。总蛋白加十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液后,沸水浴 3~5 min。以聚丙烯酰胺凝胶电泳(PVGE),凝胶上的蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉 37 °C 封闭 40 min,分别加入兔抗人 ERCC1 单克隆抗体、兔抗人 ERCC2 单克隆抗体和兔抗人 β-actin 单克隆抗体(均 1 : 1 000 稀释)一抗 4 °C 轻摇过夜,洗脱,辣根过氧化酶标记二抗室温轻摇 1 h,洗脱。PVDF 膜采用增强化学发光显影 X 胶片,暗室曝光。使用 Quantity one 图像分析软件测定蛋白质条带的灰度值,以 β-actin 作为内参后计算其蛋白相对表达水平。重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计分析软件进行数据分析,每组实验均重复 3 次,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组独立样本资料数据比较采用独立样本 *t* 检验,两组间处理前后数据资料的比较采用配对 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DDP、CIK 细胞、CIK 细胞联合 DDP 对 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞增殖的影响 DDP 对 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞均有杀伤效应,且两组靶细胞的杀伤率均随 DDP 浓度的增加而增强(表 2),DDP 对 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 值分别为 (2.47 ± 0.01)、(6.96 ± 0.03) μg/mL,相同浓度作用下,DDP 对 SKOV3 的杀伤活性高于 SKOV3/DDP,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。CIK 细胞对 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞均有杀伤效应,且杀伤活性随效靶比的增高而增强(表 3),CIK 细胞对 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞的 IC<sub>10</sub> 效靶比(即无毒剂量效靶比)分别为 16.92 : 1 和 14.09 : 1,相同效靶比作用下,CIK 细胞对 SKOV3/DDP 的杀伤活性高于 SKOV3,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。加用 CIK 细胞共培养后,发现 DDP 对 SKOV3 和 SKOV3/DDP 的体外杀伤活性显著增强(表 4),无毒剂量 CIK 细胞联合 DDP 作用后,SKOV3/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 降低为 (4.90 ± 0.02) μg/mL,RF = 1.42,即与单纯 DDP 作用相比,CIK 细胞联合 DDP 对 SKOV3/DDP 具有较明显的协同作用,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.2 CIK 细胞干预 SKOV3、SKOV3/DDP 前后 ERCC1 和 ERCC2 mRNA 的表达情况 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞株中 ERCC1 mRNA 的相对表达量分别为 0.78 ± 0.03 和 0.98 ± 0.13;ERCC2 mRNA 的相对表达量分别为 0.23 ± 0.03 和 0.56 ± 0.01,即 SKOV3/DDP 和 SKOV3 相比,ERCC1、ERCC2 mRNA 表达量均明显增高,差异有统计学意义 ( $P <$

0.05)。当 CIK 细胞干预 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞株后,ERCC1 mRNA 的相对表达量分别为 1.11 ± 0.02 和 0.71 ± 0.02;ERCC2 mRNA 的相对表达量分别为 0.39 ± 0.08 和 0.45 ± 0.06,即 CIK 细胞干预 SKOV3/DDP 细胞株后,与未干预组相比,ERCC1 mRNA 表达量显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );ERCC2 mRNA 表达水平下降,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1、2。

表 2 DDP 作用 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞 24 h 后的抑制率 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ , %)

顺铂浓度(μg/mL)	SKOV3 细胞	SKOV3/DDP 细胞
0.75	0.27 ± 0.01	0.03 ± 0.01*
1.5.0	0.36 ± 0.01	0.24 ± 0.02*
3.00	0.56 ± 0.01	0.37 ± 0.03*
6.00	0.68 ± 0.01	0.44 ± 0.03*
12.00	0.79 ± 0.01	0.59 ± 0.02*
24.00	0.90 ± 0.02	0.75 ± 0.03*
48.00	0.96 ± 0.03	0.90 ± 0.02*

\* :  $P < 0.05$ , 与 SKOV3 细胞比较

表 3 CIK 细胞作用 SKOV3 细胞、SKOV3/DDP 细胞 24 h 的抑制率 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ , %)

CIK 细胞效靶比	SKOV3 细胞	SKOV3/DDP 细胞
5 : 1	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01*
10 : 1	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.02*
20 : 1	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.04*
40 : 1	0.27 ± 0.03	0.33 ± 0.06*
80 : 1	0.64 ± 0.02	0.66 ± 0.01*

\* :  $P < 0.05$ , 与 SKOV3 细胞比较

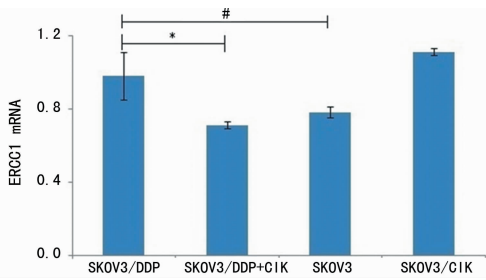
表 4 无毒剂量 CIK 细胞联合顺铂作用 SKOV3 细胞、SKOV3/DDP 细胞 24 h 的抑制率 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ , %)

无毒剂量 CIK+不同浓度顺铂(μg/mL)	SKOV3 细胞	SKOV3/DDP 细胞
0.75	0.32 ± 0.02	0.03 ± 0.01*
1.50	0.52 ± 0.01	0.32 ± 0.03*
3.00	0.61 ± 0.02	0.48 ± 0.01*
6.00	0.70 ± 0.01	0.61 ± 0.02*
12.00	0.80 ± 0.02	0.75 ± 0.04*
24.00	0.92 ± 0.02	0.87 ± 0.01*
48.00	0.98 ± 0.03	0.96 ± 0.01*

\* :  $P < 0.05$ , 与 SKOV3 细胞比较

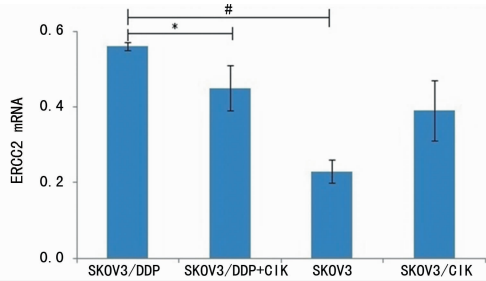
2.3 CIK 细胞干预 SKOV3、SKOV3/DDP 前后 ERCC1 和 ERCC2 蛋白的表达情况 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞株中 ERCC1 蛋白的相对表达水平分别为 0.39 ± 0.01 和 0.59 ± 0.00;ERCC2 蛋白的相对表达水平分别为 0.69 ± 0.00 和 0.59 ± 0.00,即 SK-

OV3/DDP 和 SKOV3 相比, ERCC1、ERCC2 蛋白表达水平均增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。当 CIK 细胞干预 SKOV3 和 SKOV3/DDP 细胞株后, ERCC1 蛋白的相对表达水平分别为  $0.39 \pm 0.08$  和  $0.45 \pm 0.06$ ; ERCC2 蛋白的相对表达水平分别为  $0.41 \pm 0.08$  和  $0.33 \pm 0.01$ 。Western-blot 提示 CIK 细胞干预 SKOV3/DDP 细胞后, ERCC1、ERCC2 蛋白均表达下降, 但 ERCC1 蛋白表达量下降差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 ERCC2 蛋白表达水平下降, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3、4。



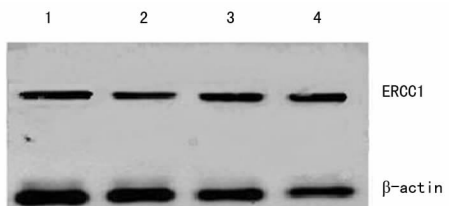
\*:  $P < 0.05$ , 与 SKOV3/DDP+CIK 比较; #:  $P < 0.05$ , 与 SKOV3 比较

图 1 各组细胞中 ERCC1 mRNA 的表达



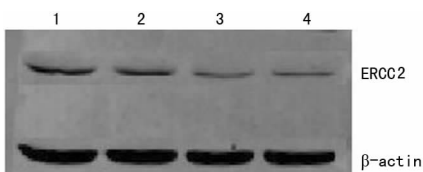
\*:  $P < 0.05$ , 与 SKOV3/DDP+CIK 比较; #:  $P < 0.05$ , 与 SKOV3 比较

图 2 各组细胞中 ERCC2 mRNA 的表达



1: SKOV3/DDP; 2: SKOV3/DDP + CIK; 3: SKOV3; 4: SKOV3 + CIK

图 3 各组细胞中 ERCC1 蛋白的表达



1: SKOV3/DDP; 2: SKOV3/DDP + CIK; 3: SKOV3; 4: SKOV3 + CIK

图 4 各组细胞中 ERCC2 蛋白的表达

### 3 讨论

卵巢癌是病死率最高的妇科恶性肿瘤, 肿瘤细胞

减灭术和以铂类药物为基础的联合化疗是治疗卵巢癌的主要手段, 其中铂类药物抗肿瘤疗效确切, 但长期应用所产生的耐药性, 成为卵巢癌治疗难以获得显著效果的主要瓶颈。细胞免疫治疗是一种被认为有可能治愈癌症的方法, 它通过打破机体对肿瘤细胞的免疫耐受, 增强机体免疫系统对肿瘤的免疫反应<sup>[11-12]</sup>。关于细胞免疫治疗联合化疗协同治疗恶性肿瘤已有相关报道<sup>[13-14]</sup>, 但对 MDR 肿瘤的协同治疗报道较少, 且尚未阐明这一互补性杀伤的机制。

本研究中采用了 MTT 法检测 DDP 对人卵巢癌细胞 SKOV3 及卵巢癌耐 DDP 细胞 SKOV3/DDP 两组细胞的体外杀伤效应。结果显示 DDP 对 SKOV3 及 SKOV3/DDP 的杀伤活性均随 DDP 浓度的增高而增强, 但与 SKOV3 细胞相比, 同浓度 DDP 对 SKOV3/DDP 细胞的体外杀伤活性更低, 说明与亲代敏感细胞相比, DDP 杀伤耐药卵巢癌细胞效应的能力显著下降。以往的研究已证明 DDP 是一种与细胞 DNA 结合, 诱导细胞凋亡的铂类化合物, 本研究结果亦证实卵巢癌敏感和耐药细胞凋亡是 DDP 发挥细胞毒效应的结果。本研究还显示 CIK 细胞对耐药细胞 SKOV3/DDP 的杀伤效应高于 SKOV3, 与文献<sup>[15]</sup>报道相符。石永进等<sup>[16]</sup>研究认为 CIK 细胞可能是导致化疗药物在 MDR 肿瘤细胞内积累量明显增加的主要原因之一, 尤其是 MCF7<sup>adr</sup> 核膜上 P-gp 表达的降低, 必将导致化疗药物更易于进入其作用靶点-细胞核, 进而引起免疫效应细胞联合低于 IC<sub>50</sub> 剂量的化疗药物, 对 MDR 肿瘤细胞的杀伤活性明显高于单纯用同等剂量化疗药物或单纯用相同效靶比的 CIK 细胞杀伤活性。本研究结果发现, CIK 细胞联合 DDP 对两种靶细胞的杀伤活性均随 DDP 浓度的升高而增加, 且较单纯使用 DDP 或 CIK 细胞的杀伤活性明显增加, 且在低效靶比 CIK 细胞联合化疗药物作用于 SKOV3/DDP 细胞的情况下, 仍可大幅度提高耐药细胞对化疗药物的灵敏度, 提示 CIK 细胞存在部分逆转化疗药物耐药的作用。因此, CIK 细胞联合 DDP 治疗耐药性卵巢癌患者有可能会成为发展前景良好的综合治疗方案, 值得进一步研究探讨。

DNA 损伤修复能力增强是铂耐药的主要原因, 核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 是 DNA 修复机制中的一条重要途径<sup>[4]</sup>。ERCC1 是 NER 途径的限速酶, 有研究显示 ERCC1 基因的高表达与 DDP 在多种肿瘤中的耐药性相关, 还可作为判断肿瘤患者铂类药物化疗灵敏度的指标<sup>[16-17]</sup>; 封闭或下调 ERCC1 基因可逆转卵巢癌细胞铂耐药<sup>[18]</sup>。ERCC2 是 NER 通路中一种重要 DNA 修复基因, 它能使受损的 DNA 被特异性核酸内切酶切除, 进而使受损 DNA 得以修复<sup>[19-20]</sup>。肺癌中 ERCC2 各基因型与铂类化疗缓解率相关性的研究结果报道不一, 甚至有研究报道称, ERCC2 的单核苷酸多态性 (SNP) 与化疗灵

敏度无关<sup>[21]</sup>,然而 ERCC2 基因在卵巢癌组织中的表达与药物化疗疗效、耐药之间关系的报道尚无定论。本次实验利用 Real-time PCR 及 Western blot 检测 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞经无毒剂量的 CIK 细胞干预前后 ERCC1、ERCC2 mRNA 及蛋白的表达情况,结果提示 CIK 细胞逆转卵巢癌细胞的耐药性可能与 ERCC1 mRNA 表达下调有关,同时佐证了 ERCC1 基因在肿瘤细胞耐药中的重要作用,为今后临床应用 CIK 细胞提高卵巢癌化疗药物灵敏度及改善患者的生存和预后提供更有力的实验证据。但肿瘤的发生、发展及转移是由多基因、多因素共同作用的结果,因此还需要深入研究与 ERCC1 共同作用的相关基因及其导致卵巢癌耐药的作用机制。本研究结果还显示,SKOV3/DDP 细胞内 ERCC2 mRNA 及蛋白的表达均明显高于 SKOV3 细胞,说明 ERCC2 可能与 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 耐药相关,但 CIK 细胞未能降低 SKOV3/DDP 中 ERCC2 的 mRNA 及蛋白表达,提示 CIK 细胞逆转 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 的耐药作用可能与 ERCC2 无相关性。目前有关 ERCC2 基因与卵巢癌耐药疗效判断的相关数据十分有限,DDP 的耐药性及逆转耐药作用与 ERCC2 关系还有待进一步扩大样本量研究,并与其他 DNA 修复基因进行联合分析。

## 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] KAUR T, SLAVCEV R A, WETTIG S D. Addressing the challenge: current and future directions in ovarian cancer therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2009, 9(6): 434-458.
- [3] LUBIN J, MARKOWSKA A, KNAPP P. Factors affecting response of chemotherapy in women with ovarian cancer[J]. *Eur Gynaecol Oncol*, 2012, 33(6): 644.
- [4] LI F Y, REN X B, XIE X Y, et al. Meta-analysis of Excision Repair Cross-complementation Group 1 (ERCC1) Association with Response to Platinum-based Chemotherapy in Ovarian Cancer[J]. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2013, 14(12): 7203-7206.
- [5] 赵丹, 张伟, 李晓, 等. 乳腺癌易感基因 1, 核苷酸切除修复交叉互补基因 1,  $\beta$ -微管蛋白 III 和富脯氨酸多肽 13 基因 mRNA 的表达与原发卵巢上皮性癌临床化疗敏感性的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2012, 34(3): 196-200.
- [6] MUSTAFA Z M, IOANA B, MANI N, et al. ERCC1 expression as a predictor of resistance to platinum-based chemotherapy in primary ovarian cancer[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(1): 393-400.
- [7] COLEMAN R L, MONK B J, SOOD A K, et al. Latest research and treatment of advanced, stage epithelial ovarian cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(4): 211-224.
- [8] KIM J, MOUW K W, POLAK P, et al. Somatic ERCC2 mutations are associated with a distinct genomic signature in urothelial tumors[J]. *Nat Genet*, 2016, 48(6): 600-606.
- [9] ROSELL R, DANENBERG K, ALBEROLA V, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 1318-1325.
- [10] RABIK C A, DOLAN M E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents[J]. *Cancer Treat Rev*, 2002, 33(1): 9-23.
- [11] ANGELOVA M, CHAROENTONG P, HACKL H, et al. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy[J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 64.
- [12] CHANG M C, CHEN C A, CHEN P J, et al. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways[J]. *Biochem J*, 2012, 442(2): 293-302.
- [13] WANG Z H. CIK-cell therapy for cancer: Current status of international clinical trials and future prospects[J]. *Chin J Cancer Biother*, 2013, 20(2): 129-137.
- [14] NIU Q, WANG W, LI Y, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4): 449-456.
- [15] 李琳, 许崇安, 田大力, 等. 非小细胞肺癌组织 ERCC1 表达及其与预后的相关性分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17(3): 186-190.
- [16] 石永进, 虞积仁, 朱平, 等. 细胞因子诱导的杀伤细胞降低乳腺癌耐药细胞系对阿霉素的耐受效应[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2001, 33(5): 415-418.
- [17] OLAUSSEN K A, FOURET P, KROEMER G. ERCC1-specific immune staining in non-small cell lung cancer[J]. *New Engl J Med*, 2007, 357(15): 1559-1561.
- [18] 陈慧雁, 沈宗姬, 等. ERCC1 基因在卵巢癌中作用的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(4): 453-456.
- [19] BENHAMOU S, SARASIN A. ERCC2/XPD gene polymorphisms and lung cancer: a huge review[J]. *Am J Epidemiol*, 2015, 161(1): 1-14.
- [20] QIN Q, ZHANG C, YANG X, et al. Polymorphisms in XPD gene could predict clinical outcome of platinum-based chemotherapy for non-small cell lung cancer patients: A Meta-analysis of 24 studies[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79864-79866.
- [21] 李代蓉, 杨燕青, 黄新华, 等. ERCC2 多态性与肺癌铂类化疗敏感性的关系[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 21(17): 2004-2020.