

5-氮杂-2'-脱氧胞苷对卵巢癌细胞系 CP70 顺铂耐药性的逆转作用

张琳琳 辛晓燕[△] 张建芳 白露 高静

(第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探究 5-氮杂-2'-脱氧胞苷体外逆转卵巢癌铂类耐药细胞系 CP70 对顺铂的耐药性,并探讨与 SOCS-2 表达的关系。方法:免疫细胞化学和 Western blot 方法检测使用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理细胞前后细胞内 SOCS-2 表达水平。MTT 法检测单独使用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷或顺铂及两药联合使用对 CP70 细胞的抑制作用。结果 两药联合处理 CP70 细胞后顺铂耐药逆转倍数为 1.34、1.63、2.34 联合处理组的细胞中 SOCS-2 表达明显升高。结论 5-氮杂-2'-脱氧胞苷可以部分逆转 CP70 细胞对顺铂的耐药性,且此作用可能与增加细胞的 SOCS-2 表达有关。

关键词 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 卵巢癌 顺铂 耐药性

中图分类号 R737.31 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)09-1644-04

5-Aza-CdR Resensitizes Cisplatin-resistant Human Ovarian Carcinoma Cells CP70

ZHANG Lin-lin, XIN Xiao-yan[△], ZHANG Jian-fang, BAI Lu, GAO Jing

(Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Shanxi, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of 5-Aza-CdR on resensitizing cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cells CP70 and discuss the related mechanism. **Methods:** Immunohistochemical analysis and Western blot were used to detect the expression of SOCS-2 in different groups. MTT assay was used to assess the inhibitory effects of 5-Aza-CdR, cisplatin alone or a combination of both on CP70 cells. **Results:** The resensitizing fold of cisplatin combined with 5-Aza-CdR was 1.34, 1.63, 2.34. The expression of SOCS-2 had the most prominent decrease in CP70 cells in the combination group. **Conclusion:** 5-Aza-CdR can partly resensitize cisplatin-resistant CP70 cells, which might be related to the down-regulation of SOCS-2.

Key words: 5-Aza-CdR; Ovarian carcinoma; Cisplatin; Drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1644-04

前言

卵巢癌是威胁女性健康最常见的恶性肿瘤之一,死亡率在女性生殖器恶性肿瘤中占第 1 位。75% 卵巢癌患者确诊时已发生转移,术后患者 5 年生存率一直居高不下^[1]。卵巢癌对铂类化疗药物的耐药是影响化疗效果,造成肿瘤复发、转移及死亡率居高不下的重要原因。近年来明确卵巢癌耐药的分子机制及寻找有效的耐药逆转剂已成为近年妇科肿瘤学关注的热点。

DNA 甲基化是一种表观遗传修饰,DNA 甲基化能关闭某些基因的活性。去甲基化则可诱导基因的重新活化和表达。本研究中,我们选用去甲基化制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理人卵巢癌顺铂耐药细胞系 CP70,检测药物处理前后细胞中 SOCS-2 的表达,初步探讨 SOCS-2 在卵巢癌顺铂耐药发生中的作用。

1 材料与方方法

1.1 材料

作者简介 张琳琳(1984-),女,硕士研究生,主要从事妇科肿瘤研究工作。电话 13299051830, E-mail fouears@sina.com

[△]通讯作者 辛晓燕(1952-),女,江苏徐州人,教授,博士生导师。主要从事妇科肿瘤及子宫内膜异位症的诊治与研究

(收稿日期 2011-11-23 接受日期 2011-12-17)

人卵巢癌铂类耐药细胞株 CP70 为第四军医大学西京医院妇产科实验室培养,DMEM 培养液购自 GIBICO 公司,无支原体胎牛血清为杭州四季青公司,胰蛋白酶美国 sigma 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)为北京中杉金桥生物技术有限公司。青霉素、链霉素购自华北制药股份有限公司,5-氮杂-2'-脱氧胞苷购自美国 Sigma 公司,顺铂购自山东齐鲁制药有限公司,兔抗 SOCS-2 多克隆抗体为美国 ABCOM 公司,内参 β -actin 为 Santa cruz 公司产品,免疫组化试剂盒,二抗辣根过氧化物酶标记的 IGg、MTT 试剂购自北京中山试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 将卵巢癌细胞株快速复苏后,置于 37℃,饱和湿度,含 5% CO₂ 的孵箱中常规培养,培养液为含有 10%FBS 和 100 U/ml 青霉素和链霉素的低糖 DMEM,根据细胞生长状况每 1~2 天换液,用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化后传代。当细胞生长状态稳定,呈对数生长期时,用于实验。

将对数生长期的卵巢癌耐顺铂细胞系 CP70 接种于六孔板细胞培养板进行细胞爬片,接种细胞数控制在 5×10^5 孔。分别以 0 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M 的 5-Aza-CdR 浓度处理两种卵巢癌细胞,将细胞放于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养 24 h。将对数生长期的卵巢癌细胞接种于六孔板中,每孔 5×10^5 个细胞,培养 24 h,分别以 0 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M 的 5-Aza-CdR 浓度处理两种卵巢癌细胞,继续培养 48 h。

1.2.2 免疫细胞化学染色 吸弃原培养液,取出细胞爬片,PBS液清洗细胞,加入预冷的4℃95%乙醇固定30分钟,PBS中漂洗5 min×3次,将已固定的细胞爬片置于3%过氧化氢中,室温孵育10 min,以消除内源性过氧化物酶活性,PBS漂洗5 min×3次,滴加1% triton-X,室温孵育10 min,PBS漂洗5 min×3次,加入一抗(兔抗人SOCS-2多克隆抗体,工作浓度1:100),湿盒内4℃冰箱过夜,PBS漂洗3 min×3次,滴加1:300生物素标记鼠抗兔IgG,37℃孵育30 min,PBS漂洗3 min×3次,滴加1:300辣根酶标记的链酶卵白素,37℃孵育30 min;PBS漂洗2 min×3次,DAB显色10 min,自来水冲洗,苏木素复染15 s~30 s,1%盐酸酒精分化,饱和碳酸锂蓝化。常规梯度酒精脱水、二甲苯透明,DPX封片保存。

1.2.3 western blot 检测 SOCS-2 蛋白表达 弃掉细胞培养液, PBS 漂洗 2 次,加以预冷的 RIPA 裂解液冰上裂解,以 BCA 法测定细胞蛋白浓度。细胞蛋白样品与 1/5 体积 5× SDS 上样缓冲液,混合后 100℃水浴 5 min,不同体细胞蛋白样品取等量(20 μl)。于 12%聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离。将凝胶上的蛋白质电转印至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜置于 5%脱脂奶粉中室温封闭 1 h。分别加入 SOCS-2 多克隆抗体(1:1000)和 β-actin 单克隆抗体(1:800)。4℃孵育过夜,洗涤,二抗(1:1000)室温孵育 1 h,洗涤,化学发光法显色,压片。GELPRO45 软件分析。实验重复三次。

1.2.4 MTT 法检测细胞的增殖活性 取对数生长期的卵巢癌耐顺铂细胞 CP70,0.25%胰蛋白酶消化法制备的肿瘤细胞悬液,用 10%FBS 的 DMEM 培养液调整细胞浓度为 10⁵/ml,实验组分为顺铂组,浓度为 1 μM、2 μM、4 μM、8 μM、16 μM、32 μM、64 μM、128 μM 顺铂联合 2.5 μM 浓度 5-Aza-CdR 组,顺铂联合 5 μM 浓度 5-Aza-CdR 组,顺铂联合 10 μM 浓度 5-Aza-CdR 组分。于 4 块 96 孔板中每孔加 100ul,37℃,5%CO₂ 培养箱培养 24 小时后进行处理。各组细胞分别加不同剂量顺铂 100 ul/孔。剂量为 2 μM、4 μM、8 μM、16 μM、32 μM、64 μM、128 μM、256 μM,设阴性对照组和调零孔,每组 3 个平行孔,继续培养 48 小时,实验终止前,每孔加入 MTT 溶液(MTT 5mg/ml) 20 μl/孔,孵育 4 h,弃上清,加入 DMSO 150 μl,均匀振荡 10 分钟后,于酶标仪上检测吸光度(Optical density, OD)值(波长=490 nm),以不加药的阴性对照组 A490 的 OD 值均数作为对照,按下列公式计算细胞存活率及药物对细胞的抑制率,细胞生长抑制率(%)=(对照组 OD 值 - 用药组 OD 值)/对照组 OD 值×100%用细胞存活率对剂量对数作图,并按作图法求出 IC₅₀(半数致死药物浓度)值,以药物浓度对数为横轴,细胞生长抑制率为纵轴绘制浓度效应曲线。

1.3 统计学处理

数据使用 SPSS 16.0 统计软件处理和 Excel 软件的加权线性分析,检验进行统计分析。

2 结果

2.1 免疫细胞化学

采用积分光密度值分析,应用组织图像分析软件(美国产 Image-ProPlus,德国产 Kontron IBAS 2.5 全自动图像分析仪等)进行图像处理,对选定的目的测量区域(如阳性细胞或阳性区

域)进行积分光密度(IOD)分析来反映目标抗原的量。SOCS-2 的含量越多 IOD 值越大。SOCS-2 呈棕黄色颗粒。未用 5-Aza-CdR 处理时 SOCS-2 主要表达于细胞浆 (IOD 值为 7.42± 0.73),用不同浓度 5-Aza-CdR 处理后 SOCS-2 染色增强,并且表达于细胞浆和细胞核。(IOD 值分别为 15.09± 1.33 17.66± 1.52,38.87± 2.74) 联合用药组与对照组比较差异具有统计学意义(P<0.05),见图 1、图 2。

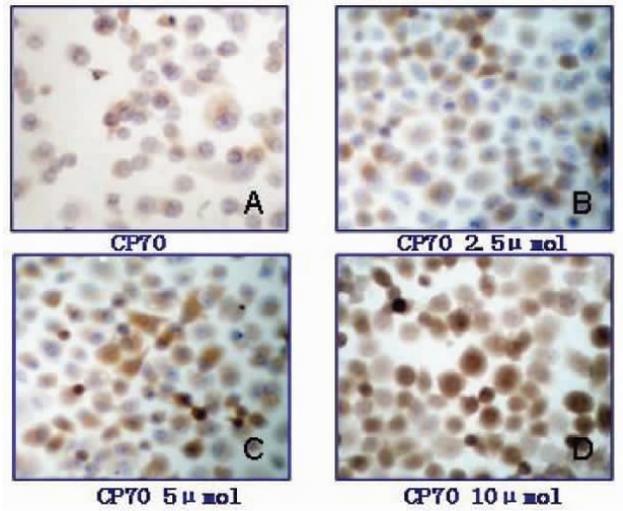


图 1 5-Aza-CdR 处理 CP70 后细胞内 SOCS-2 蛋白表达水平 (DAB, 400×)

A 为未做处理组 B 为 2.5 μmol/L 5-Aza-CdR 组 C 为 5 μmol/L 5-Aza-CdR 组 D 为 10 μmol/L 5-Aza-CdR 组

Fig.1 Immunohistochemistry staining of SOCS-2 protein expression in CP70 cells treated by 5-Aza-CdR

A : treated group B 2.5 μmol/L 5-Aza-CdR treated group C 5 μmol/L 5-Aza-CdR D : 10 μmol/L 5-Aza-CdR treated group

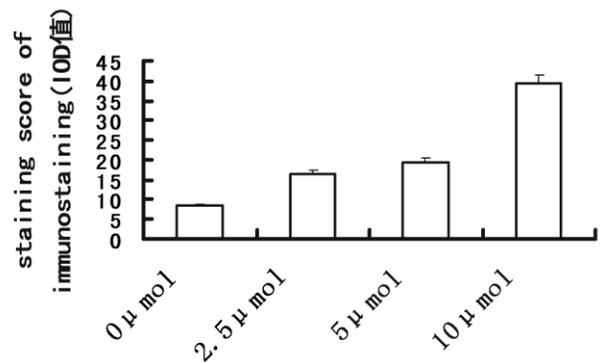


图 2 5-Aza-CdR 处理 CP70 后细胞内 SOCS-2 蛋白光密度值

Fig.2 Immunohistochemistry staining of SOCS-2 protein IOD in CP70 cells treated by 5-Aza-CdR

2.2 Western blot 检测 SOCS-2 蛋白表达结果

5-Aza-CdR 作用于耐药细胞株 CP70 48h 后。可见 SOCS-2 蛋白表达量比未处理前明显增加 (未处理前灰度值 51.66± 3.8, 处理后灰度值分别 187.32± 7.07,347.42± 14.85,474.43± 25.97) 并具有明显的剂量依赖性,这种差异具有统计学意义(P<0.05)。如图 3。

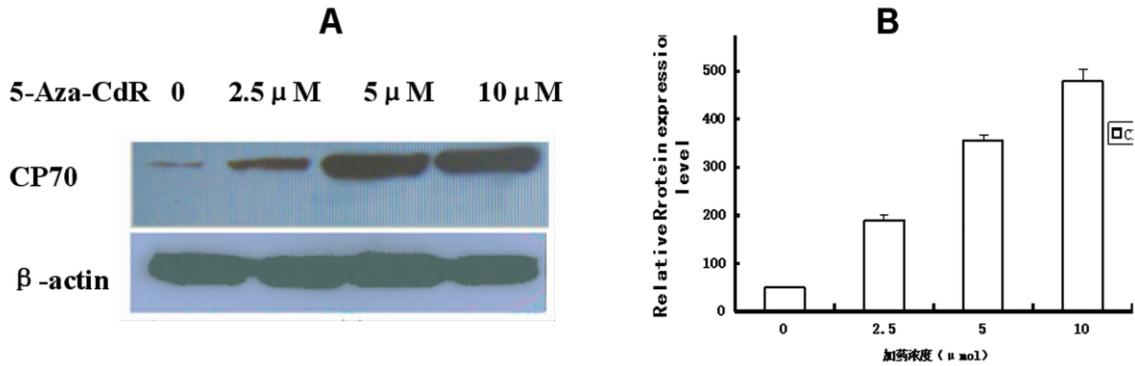


图3 5-Aza-CdR 处理 CP70 细胞 48 h 后细胞蛋白 SOCS-2 表达

A 为蛋白印迹结果, B 为灰度比值, 图中 0 表示未处理组, 2.5 μmol/L 5-Aza-CdR 处理组; 5 μmol/L 5-Aza-CdR 处理组; 10 μmol/L 5-Aza-CdR 处理组

Fig.3 Expression of SOCS-2 protein in CP70 cells treated by 5-Aza-CdR for 48 h

A :Western blotting B :The ratio of total gray values between SOCS-2 and β-actin ;A:no treated group ;2.5 μmol/L 5-Aza-CdR treated group ;5 μmol/L 5-Aza-CdR treated group ;10 μmol/L 5-Aza-CdR treated group

2.3 药物作用 48h 后对 CP70 生长抑制情况

MTT 结果表明 (图 4), 单独使用顺铂对 CP70 的 IC50 为 98.13μmol/L, 顺铂联合 5-Aza-CdR 组对 CP70 的 IC50 分别降低为 73.3μmol/L、60.31μmol/L、42.02μmol/L。逆转倍数分别为 1.34、1.63、2.34。顺铂联合 5-Aza-CdR 细胞的生长抑制率高于单一顺铂组的生长抑制率(P<0.05)。联合应用 5-Aza-CdR 和顺铂能逆转 CP70 细胞的顺铂耐药性, 增强 CP70 细胞对顺铂的敏感性。说明两药联合使用具有协同作用, 并且随着 5-Aza-CdR 浓度的增强而对 CP70 的生长抑制作用越明显。

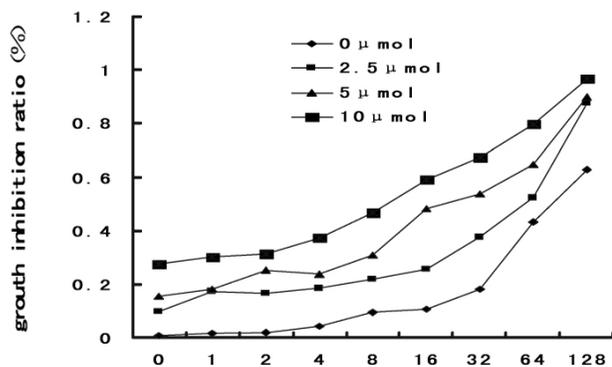


图 4 药物处理细胞 48h 后细胞生长抑制情况 : 单用顺铂组浓度为 0、1、2、4、8、16、32、64、128 μmol/L ; 2.5 μmol/L 5-Aza-CdR 合用顺铂组 ; 5 μmol/L 5-Aza-CdR 合用顺铂组 ; 10 μmol/L 5-Aza-CdR 合用顺铂组
Fig.4 Cell proliferation inhibition treated by different drug for 48 hours : Cisplatin group: treated by 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μmol/L cisplatin; Combination group: 2.5 μmol / L 5-Aza-CdR and cisplatin; 5 μmol/L 5-Aza-CdR and cisplatin; 10 μmol/L 5-Aza-CdR and cisplatin

3 讨论

本研究发现 5-Aza-CdR 使 CP70 细胞的 SOCS-2 表达水平显著增强。推测 CP70 细胞耐药性的改变可能与 SOCS-2 水平升高促进了肿瘤细胞的凋亡有关。这提示 细胞内 SOCS-2 表达水平升高可能与卵巢癌顺铂耐药细胞 CP70 的增殖能力下

降有关, SOCS-2 可能与卵巢癌细胞顺铂耐药有一定的关系。而 5-Aza-CdR 能上调细胞内 SOCS-2 表达水平, 抑制耐药细胞的增殖生长。与顺铂合用减少了顺铂使用剂量, 降低耐药性。

人的 SOCS-2 基因定位于 12q21.3-q23 区, 是细胞因子信号传到阻抑蛋白分子 (suppressors of cyto-kine signaling, SOCS) 家族成员之一, 目前发现该家族有 CIS、SOCS1-7 等 8 个成员分子^[12]。该家族最早由 Yoshimura 发现, 是一种由细胞因子诱导产生的蛋白质^[4]。主要通过参与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关的贾纳斯激酶信号传导及转录激活因子途径 (JAK/STAT) 的负性调节而抑制信号传导, 对 JAK/STAT 信号通路起下调作用^[5,6]。SOCS-2 编码 198 个氨基酸, 由 N 区、SH2 区和 C- 端的 SOCS 盒区组成, 其功能的发挥主要是通过 SH2 结构与 JAK 蛋白或细胞因子受体中磷酸化的酪氨酸相结合, 抑制细胞信号传导的级联反应^[7,8]。SOCS 家族与很多疾病的发生发展关系密切。Koeberlein 等发现慢性乙型肝炎患者肝样本中 SOCS-3 蛋白表达增加, 并与肝脏炎症程度相关^[9]。SOCS-3 与骨质疏松等多种疾病相关, 都表现为影响疾病进程的重要作用^[10]。Shen 等报道, 通过 siRNA 技术使 SOCS1 在 DC 中沉默, 可以增强抗原特异性的抗肿瘤免疫^[11]。针对 SOCS-2 的研究发现它与 GH、IGF1、IFN、PRL、IL-6 细胞因子的作用关系的报道颇多, 其中与 GH 相互作用关系极为密切, 试验发现雌激素可通过刺激 SOCS-2 表达来抑制 GH 诱导的 JAK2/STAT5b 信号^[12]。SOCS-2 作用广泛, 对脂肪沉积、骨骼肌发育、中枢神经系统作用、免疫应答、癌症发生都有重要作用^[13]。研究发现 SOCS 的异常甲基化和基因沉默在很多肿瘤如: 肝癌、肺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病等中均有发现。Sutherland 等发现 SOCS-1、SOCS-2 在乳腺癌细胞中表现为生长抑制作用, 乳腺癌中 SOCS 基因的高甲基化相关 " 沉默 " 增强了这些组织中细胞因子的反应, 从而导致肿瘤的发生。在乳腺肿瘤组织和乳腺癌细胞系中有部分 SOCS-1 基因的启动子甲基化, 原发性卵巢癌组织中同样有 SOCS-2 基因的甲基化而沉默^[14]。在原发性卵巢癌和乳腺癌细胞系中 SOCS-2 的异常甲基化与基因转录沉默是相关的, 这也表明 SOCS-2 基因的甲基化可能是反应卵巢癌发生发

展的标志物。

表观遗传学包含了 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 调控 3 个层次。其中 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化是表观遗传学修饰的重要方式。后天基因沉默是关闭基因活性的一种主要决定性因素。表现为基因组整体甲基化程度降低和局部甲基化程度的增高^[15]。肿瘤中常伴随基因组整体甲基化水平降低和某些基因 CpG 岛区域甲基化水平异常升高(如抑癌基因) 并且这两种变化可在一种肿瘤中同时发生。Widschwendter 等研究发现 结肠腺瘤性息肉病(APC)基因启动子的甲基化可预示宫颈癌的转移和复发 并提示患者处于高危状态^[16]。Kwon 等研究发现了肝细胞癌中上皮细胞钙黏蛋白基因的甲基化与血管浸润和肿瘤转移呈正相关并且该基因高甲基化的患者预后不良^[17]。Stanganelli 等研究发现 SOCS-1 基因甲基化可能是原因不明的单克隆免疫球蛋白血症(MGUS)发展为多发性骨髓瘤克隆进程中很重要的一步^[18]。

研究表明 DNA 甲基化是可逆过程,用 DNA 甲基化酶抑制剂处理已经甲基化的目标基因后可使其甲基水平下调,去甲基化诱导了基因的重新活化和表达^[19-21]。研究认为 5-Aza-CdR 恢复某些甲基化基因的重新表达,最终导致细胞的凋亡。在对诸多肿瘤的研究中,用 DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-dC 处理癌细胞如:宫颈癌、乳腺癌、直肠癌、胃癌等可使基因启动子区去甲基化。应用多数有关 5-aza-dC 治疗卵巢恶性肿瘤的体外实验研究结果表明,它能够恢复一些沉默基因的表达,并且可以恢复对顺铂的敏感性,其中最引人注目的是 hMLH1 基因。Balch 等使用甲基化抑制剂 5-aza-dC 处理卵巢恶性肿瘤顺铂耐药细胞后给予顺铂治疗,发现此细胞对顺铂的敏感性增加 5 倍^[22]。因此,运用去甲基化药物 5-Aza-CdR 恢复 SOCS-2 基因的重新表达,有可能可以控制卵巢癌的发展,有效的抑制卵巢癌的耐药发生,为卵巢癌的耐药理论提供一定的依据,是很有前景的化疗辅助药物。

参考文献(References)

[1] Posadas EM, Davidson B, Kohn EC, et al. Proteomics and ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment: a critical review the recent literature[J]. *Curr Opin Oncol*, 2004, 16(5):478-484

[2] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7:454-465

[3] Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity[J]. *Trends Immunol*, 2009, 30: 392-400

[4] Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes all SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors[J]. *EMBO J*, 1995, 14: 2816-2826

[5] Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117:1281-1283

[6] Flores MA, Greenhalgh CJ, Norstedt G, et al. Negative regulation of GH receptor signaling[J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20: 241-253

[7] Babon JJ, Sabo JK, Soetopo A, et al. The SOCS box domain of SOCS3: structure and interaction with the elonginBC-cullin5 ubiqui-

tin ligase[J]. *J Mol Biol*, 2008, 381: 928-940

[8] Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19:414-422

[9] Koeberlein B, zur HA, Bektas N, et al. Hepatitis B virus overexpresses suppressor of cytokine signaling-3(SOCS3) thereby contributing to severity of inflammation in the liver[J]. *Virus Res*, 2010, 148: 51-59

[10] Ruan M, Pederson L, Bradley EW, et al. Transforming growth factor- β coordinately induces suppressor of cytokine signaling 3 and leukemia inhibitory factor to suppress osteoclast apoptosis [J]. *Endocrinology*, 2010, 151: 1713-1722

[11] Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, et al. Silencing of SOCS 1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1546-1553

[12] Leung K C, Johannsson R, Gary M, et al. Regulation of growth hormone signaling by selective estrogen receptor modulators Occurs through suppression of protein tyrosine phosphatases1[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(5): 2417-2423

[13] Zhang Y, Zhao JM, Zhang H, et al. The involvement of suppressors of cytokine signaling 2(SOCS2) in immune defense responses of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34: 42-48

[14] MatthiasLorentzon, Chris J. Greenhalf, et al. Reduced bonemineral density in SOCS-2-deficient mice [J]. *Pediatr Res*, 2005, 57 (2): 223-226

[15] Robertson KD. DNAmethylation,methyltransferases,andcancer [J]. *Oncogene*, 2001, 20(24): 3139-3155

[16] Widschwendter A, Mailer HM, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 565-571

[17] Kwon GY, Yoo BC, Koh KC, et al. Promoter methylation of E-cadherin in hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules[J]. *J Korean Med Sci*, 2005, 20(2): 242-247

[18] Stanganelli C, Arbelbide J, Fantl DB, et al. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in mono-clonal gammopathy of undetermined significance[J]. *Ann Hematol*, 2010, 89(2): 191-199

[19] Uhm KO, Lee ES, Lee YM, et al. A berrant promoter CpG islands methylation of tumor suppressor genes in cholangiocarcinoma [J]. *Onco Res*, 2008, 17(4): 151-157

[20] Miasaki FY, Vivaldi A, Ciampi R, et al. Retinoic acid receptor beta repression and growth inhibition in thyroid carcinoma cell lines after 5-aza-2,-deoxycytidine treatment [J]. *J Endocrinol invest*, 2008, 31 (8): 724-730

[21] Fan J, Yin WJ, Lu JS, et al. ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor[J]. *Cancer Res Clinoncol*, 2008, 134(8):883-890

[22] Balch C, Yan P, Craft T, et al. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4: 1505-1514