

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.005

· 基础研究 ·

维生素C逆转口腔鳞状细胞癌顺铂耐药的作用

周建军, 赵云富, 王国栋(海军军医大学长征医院 口腔科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 探讨维生素C(vitamin C, VC)逆转口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC或口腔鳞癌)顺铂(cisplatin, DDP)耐药的作用及其机制。**方法:** 选用体外培养的人口腔鳞癌CAL27细胞, 用浓度梯度递增法筛选出耐DDP的CAL27/DDP细胞株, 用平板克隆形成实验、CCK-8、划痕愈合实验、Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术分别检测单独应用DDP以及联合VC对CAL27/DDP细胞克隆形成、细胞增殖、迁移和凋亡的影响, Western blotting分别检测CAL27、CAL27/DDP和VC处理后CAL27/DDP细胞中P-gp蛋白的表达变化。**结果:** DDP对CAL27/DDP细胞的 IC_{50} 比CAL27细胞显著上升($P<0.05$), CAL27/DDP细胞对DDP耐药; 联合VC后, DDP对CAL27/DDP细胞的 IC_{50} 比DDP单用时显著降低($P<0.05$)。DDP联合VC能显著抑制CAL27/DDP细胞的迁移能力($P<0.01$), 同时提高细胞的凋亡率($P<0.01$)。CAL27/DDP细胞中P-gp蛋白表达水平相对CAL27细胞升高($P<0.05$), 在VC干预后其表达水平下降($P<0.05$)。**结论:** VC可逆转口腔鳞癌细胞DDP耐药, 此种逆转作用是通过抑制P-gp蛋白表达实现的。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; CAL27细胞; CAL27/DDP细胞; 维生素C; 顺铂; 耐药; P-gp

[中图分类号] R739.85; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)01-0031-06

Effects of vitamin C on reversing cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma

ZHOU Jianjun, ZHAO Yunfu, WANG Guodong (Department of Stomatology, Changzheng Hospital of Naval Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of vitamin C (VC) on reversing cisplatin (DDP) resistance in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and the mechanism. **Methods:** Human OSCC CAL27 cells were cultured *in vitro* and DDP-resistant CAL27 cell line (CAL27/DDP) was screened by increasing concentration gradient method. Plate clone formation assay, CCK-8, Wound healing assay, Annexin V-FITC/PI staining flow cytometry were used to determine the effects of DDP alone or in combination with VC on colony formation, proliferation, migration and apoptosis of CAL27/DDP cells. Western blotting was used to detect the expression level of P-gp protein in CAL27 cells, CAL27/DDP cells and VC treated CAL27/DDP cells. **Results:** The inhibition concentration (IC_{50}) of DDP increased significantly in CAL27/DDP cells as compared with that in CAL27 cells ($P<0.05$), indicating CAL27/DDP was DDP-resistant. After the combination with VC, the IC_{50} of DDP on CAL27/DDP cells was significantly reduced compared with that of DDP alone ($P<0.05$). DDP combined with VC significantly inhibited the migration of CAL27/DDP cells ($P<0.01$), and promoted the apoptosis rate ($P<0.01$). The expression level of P-gp protein in CAL27/DDP cells was increased compared with that in CAL27 cells ($P<0.05$), but decreased after VC intervention ($P<0.05$). **Conclusion:** VC can reverse DDP-resistance in OSCC cells by inhibiting P-gp protein expression.

[Key words] oral squamous cell carcinoma (OSCC); CAL27 cell; CAL27/DDP cell; vitamin C (VC); cisplatin (DDP); drug resistance; P-gp

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(1): 31-36. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.01.005]

口腔颌面部恶性肿瘤是头颈部常见的恶性肿瘤, 其中约90%以上为口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC或口腔鳞癌)^[1]。目前OSCC的主要治疗方法为手术、放疗、化疗和免疫治疗, 对于复发、转移和晚期患者, 仍是以放、化疗为主要治疗方法^[2-3]。铂类化合物作为一线化疗药物被广泛应用于肿瘤治疗中, 含顺铂(cisplatin, DDP)的化疗方案一直是OSCC患者一线化疗方案。但近年来随着

[基金项目] 上海市自然科学基金资助项目(No. 17ZR1439200)。Project supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 17ZR1439200)

[作者简介] 周建军(1992-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事头颈部肿瘤化疗研究, E-mail: grimm1992@163.com

[通信作者] 王国栋(WANG Guodong, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事头颈部肿瘤的手术与放化疗研究, E-mail: louis_w@126.com

DDP的广泛使用,发现许多患者对DDP耐药,这严重地限制了其临床应用^[4]。因此,探讨与寻找口腔鳞癌DDP耐药的有效逆转剂,提高OSCC对DDP的敏感性具有十分重要的临床意义。维生素C(vitamin C, VC)是一种水溶性维生素,是人类和哺乳类动物的必需营养素,具有抗氧化、抗炎、提高免疫力等多种生物活性作用^[5]。VC能否逆转OSCC细胞的DDP耐药性,目前尚未见研究报道。本研究通过体外实验观察DDP联合VC对口腔鳞癌CAL27/DDP细胞增殖、迁移和凋亡的影响,并用分子生物学的方法对其逆转口腔鳞癌DDP耐药的分子机制进行初步探讨,旨在为口腔鳞癌DDP耐药逆转剂的研发提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人口腔鳞癌细胞株CAL27购自美国模式培养物集存库,CAL27/DDP细胞由本课题组利用CAL27细胞DDP诱导培养获得。DPBS、DMEM购自美国Hyclone公司,胎牛血清(FBS)、青霉素、链霉素购自美国Gibco公司,DDP购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,VC购自上海生工生物工程股份有限公司,CCK8试剂盒、RIPA裂解液和BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,FITC细胞凋亡检测试剂盒I购自美国BD生物科学公司,胰蛋白酶消化液购自美国Thermo Scientific公司,抗P-gp抗体、抗GAPDH抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗购自美国SAB公司。

1.2 细胞培养及CAL27/DDP株的建立

细胞培养:将CAL27和CAL27/DDP细胞置于含10%FBS、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM高糖培养基中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养。当细胞汇合度达90%时,以1:4比例传代。

CAL27/DDP细胞株的建立:采用体外药物浓度递增法(含2、4、8、16、32 μmol/L DDP完全培养基)对CAL27细胞系反复进行筛选,预期获得一株对DDP耐药的CAL27/DDP细胞。

1.3 克隆形成实验检测CAL27/DDP细胞的克隆形成能力

取对数生长期的CAL27和CAL27/DDP细胞,0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞并稀释,接种于6孔板(1.5×10²个细胞/孔),每组3个复孔。分别于含0、1 μmol/L DDP的完全培养基孵育24 h。同时再设置一组CAL27/DDP细胞,于含1 μmol/L DDP和0.3 mg/ml VC的完全培养基孵育24 h后,撤去上述药物换正常完全培养基继续培养2周,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤

细胞,4%多聚甲醛室温固定10 min,0.2%结晶紫染色液染色后拍照,计数克隆形成数。

1.4 细胞形态学观察及CCK-8检测CAL27/DDP细胞的增殖能力

取对数生长期CAL27和CAL27/DDP细胞,0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞,制成密度为5×10³细胞悬液,接种于96孔板(100 μl/孔),每组设6个复孔。两种细胞分别于含有不同浓度梯度DDP的完全培养基中培养48 h,同时再设置一组CAL27/DDP细胞,于含有不同浓度梯度DDP(0、2、4、8、16和32 μmol/L)且含有0.3 mg/ml VC的完全培养基中培养。48 h后,在倒置相差显微镜下观察细胞的形态并拍照,后每孔加入10 μl CCK-8溶液继续培养2 h,酶标仪检测在450 nm处的光密度(D)值。计算细胞增殖抑制率,以抑制率为纵坐标,药物浓度为横坐标绘制药物增殖抑制曲线图。

1.5 划痕愈合实验检测CAL27/DDP细胞的迁移能力

取对数生长期CAL27和CAL27/DDP细胞,0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞,接种于6孔板(1×10⁵个细胞/孔),37℃、5%CO₂培养箱中培养至细胞汇合度为90%,换成含0.5%(V/V)FBS的DMEM培养基培养24 h。使用200 μl无菌枪头轻划孔板,PBS洗涤后加药。CAL27细胞组加入含4 μmol/L DDP的DMEM培养基,CAL27/DDP细胞组,一组加入含4 μmol/L DDP的DMEM培养基,另一组加入含4 μmol/L DDP和0.3 mg/ml VC的DMEM培养基。上述每组设置3个复孔,37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h。分别在加药0和24 h拍照,运用Image J软件分析两个时间点上划痕面积的变化。

1.6 Annexin-V/PI染色流式细胞术检测CAL27/DDP细胞的凋亡率

取对数生长期CAL27和CAL27/DDP细胞,0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞并稀释,分别接种于6孔板(1×10⁵个细胞/孔),37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h后分别加入含0、32 μmol/L DDP的完全培养基。同时再设置一组CAL27/DDP细胞,加入含32 μmol/L DDP和0.3 mg/ml VC的完全培养基。上述每组3个复孔,培养48 h后,0.25%胰蛋白酶消化收集所有细胞,按照试剂盒说明书依次加入Annexin-V和PI染色液,室温避光孵育15 min后,上流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

1.7 Western blotting(WB)检测CAL27/DDP细胞中P-gp蛋白的表达水平

分别收集正常培养条件下的CAL27、CAL27/DDP细胞和VC(0.3 mg/ml)处理48 h的CAL27/DDP细胞,PBS洗涤后,分别加入RIPA裂解液提取细胞中

总蛋白,并用BCA试剂盒对蛋白质进行定量分析并调平。进行SDS-PAGE,将分离的蛋白转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,后加入兔来源P-gp一抗(1:1 500),4 °C孵育过夜。次日,TBST洗涤3次后,加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:3 000),室温孵育2 h,TBST洗涤3次后,加入ECL化学发光液进行曝光,后在Bio-Rad凝胶成像系统显影,运用Image Lab分析蛋白条带的灰度值,以GAPDH作为内参进行比较。

1.8 统计学处理

1.3、1.5~1.7实验均重复3次,1.4实验重复6次。应用SPSS 17.0软件系统进行统计学分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

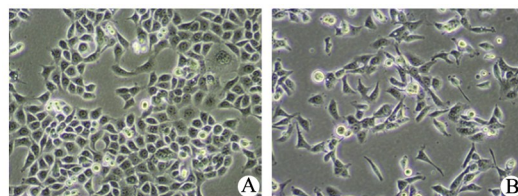
2.1 CAL27/DDP细胞由上皮样细胞形态转变为间质细胞形态

倒置显微镜下(图1)所见,经过体外药物浓度递增法筛选出的CAL27/DDP细胞丧失了上皮细胞的极性,获得间质细胞的特性。相对CAL27细胞CAL27/DDP细胞的形态由多边形变成不规则的梭形,细胞连接由紧密变得疏松。结果表明,CAL27/DDP细胞具有间质细胞的表型特征。

2.2 VC联合DDP显著降低CAL27/DDP细胞的增殖能力

增殖能力

CCK8实验(图2)结果显示,单用DDP 48 h后,CAL27细胞 IC_{50} 为 $(4.28\pm 0.88)\mu\text{mol/L}$,CAL27/DDP细胞 IC_{50} 为 $(14.67\pm 1.01)\mu\text{mol/L}$,CAL27/DDP细胞较CAL27细胞对DDP的耐药性增强($t=17.914$, $P<0.05$),表明体外浓度梯度递增法筛选出的CAL27/DDP细胞株符合DDP耐药的要求;联合VC处理后,DDP对CAL27/DDP细胞 IC_{50} 为 $(8.52\pm 0.92)\mu\text{mol/L}$ 较单用DDP的显著下降,差异具有统计学意义($t=11.247$, $P<0.05$),表明CAL27/DDP细胞对DDP耐药性降低而敏感性提高。同时,细胞克隆形成实验结果(图3)表明,VC联合DDP处理相对单用DDP,CAL27/DDP细胞克隆数明显减少($t=14.31$, $P<0.01$),表明VC联合DDP可显著抑制CAL27/DDP细胞的克隆形成能力。



A:CAL27 cells; B: CAL27/DDP cells

图1 CAL27与CAL27/DDP细胞倒置显微镜下的形态($\times 100$)
Fig.1 Morphology of CAL27 and CAL27/DDP cells under an inverted microscope ($\times 100$)

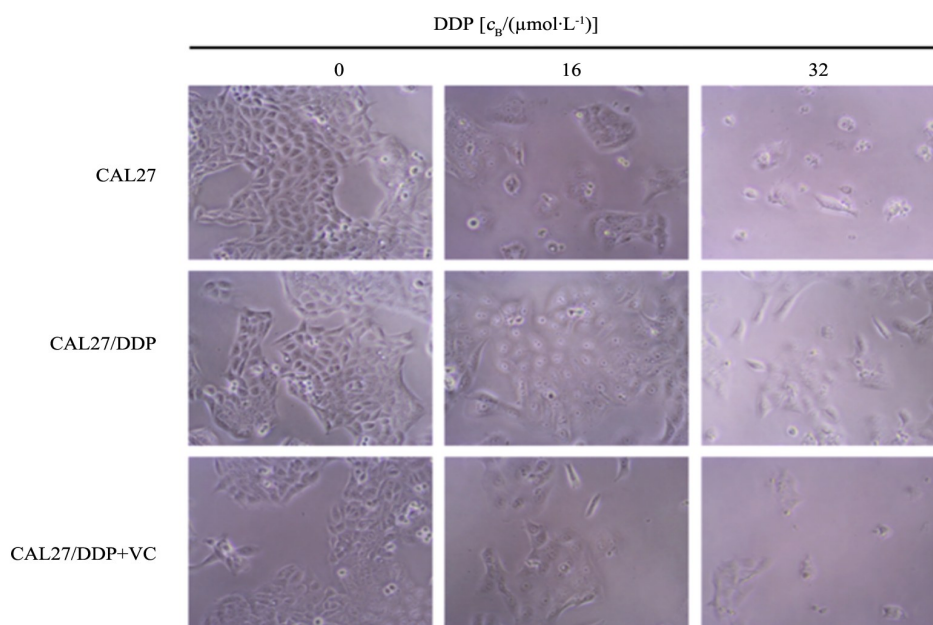


图2 加药处理48 h后CAL27与CAL27/DDP细胞的形态($\times 100$)

Fig.2 The morphology of CAL27 and CAL27/DDP cells after 48 h of drug treatment ($\times 100$)

2.3 VC联合DDP显著降低CAL27/DDP细胞的迁移能力

划痕愈合实验结果(图4)显示,CAL27细胞DDP处理后伤口愈合率为 $(28.72\pm 4.67)\%$,CAL27/DDP细

胞 DDP 处理后伤口愈合率为(87.97±5.25)%, CAL27/ DDP 细胞相对 CAL27 细胞迁移能力显著提高 ($t=25.27, P<0.01$)。而在 VC 联合 DDP 处理后, CAL27/DDP 细胞伤口愈合率为(35.44±3.91)%, 相对 单用 DDP 处理时细胞迁移能力显著下降($t=24.036, P<0.01$)。结果表明, VC 联合 DDP 能明显降低 CAL27/DDP 细胞的迁移能力。

2.4 VC 联合 DDP 显著提高 CAL27/DDP 细胞的凋亡率

流式细胞术检测结果(图 5)显示, 单用 DDP 处理, CAL27/DDP 细胞凋亡率显著低于 CAL27 细胞 ($t=7.824, P<0.01$), 但当 DDP 联合 VC 处理后, 相对 单用 DDP, CAL27/DDP 细胞凋亡率则显著上升 ($t=6.665, P<0.01$)。结果表明, DDP 联合 VC 可显著

提高 CAL27/DDP 细胞的凋亡率。

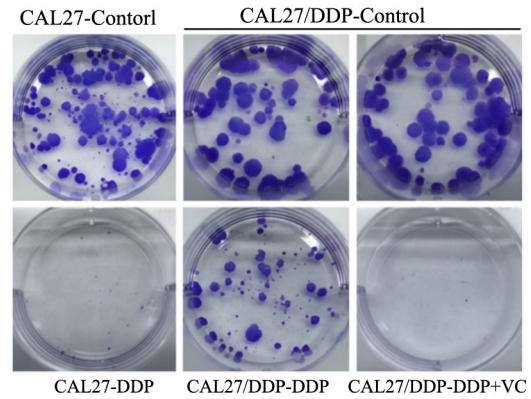


图 3 CAL27 与 CAL27/DDP 细胞的克隆形成
Fig.3 Colony formation of CAL27 and CAL27/DDP cells

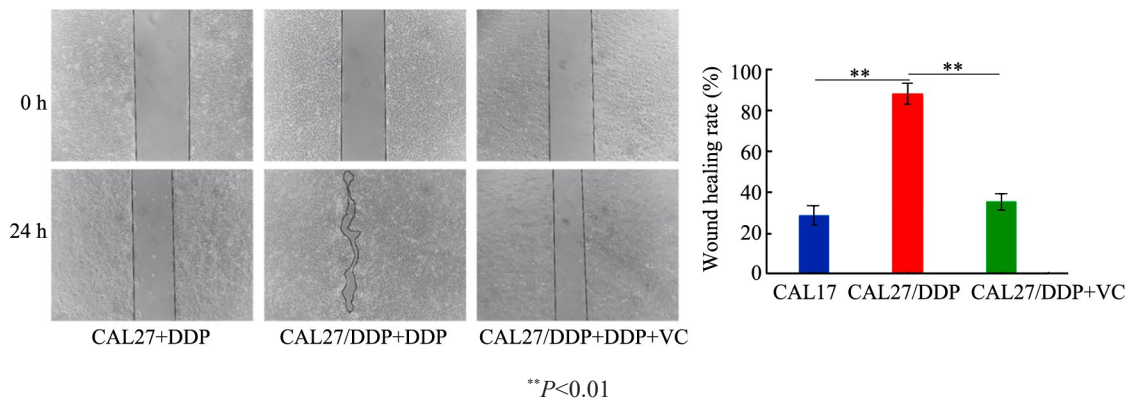


图 4 CAL27 与 CAL27/DDP 细胞加药处理后迁移能力的变化
Fig.4 Cell migration ability of CAL27 and CAL27/DDP cells after drug treatment

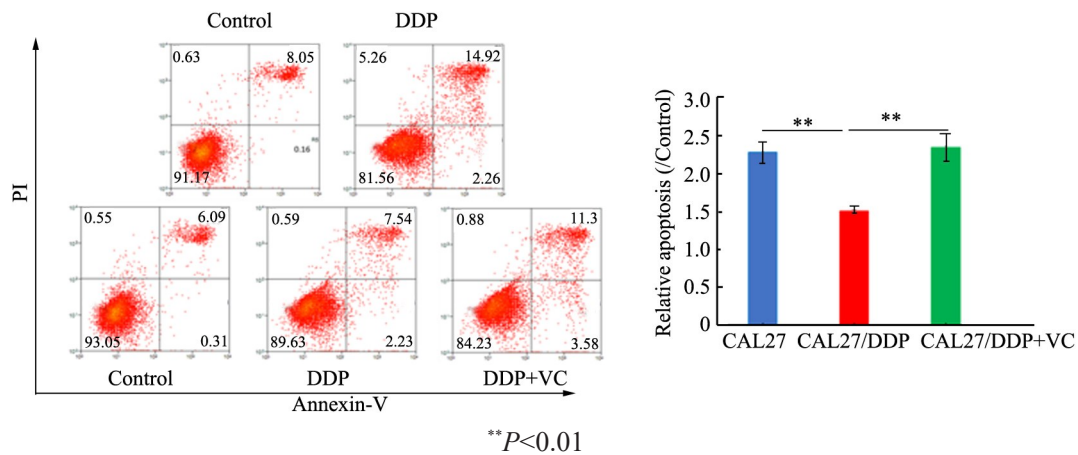


图 5 CAL27 与 CAL27/DDP 细胞加药处理前后细胞凋亡率的变化
Fig.5 Apoptosis rate of CAL27 and CAL27/DDP cells before and after treatment

2.5 VC 联合 DDP 对 CAL27/DDP 细胞中 P-gp 蛋白表达的影响

WB 实验结果(图 6)显示, 与 CAL27 细胞相比, CAL27/DDP 细胞中 P-gp 蛋白表达水平上调, 在 VC 干预后, CAL27/DDP 细胞中 P-gp 蛋白表达水平下调

($t=2.807, P<0.05$)。其中 CAL27/DDP 细胞中 P-gp 蛋白表达水平相对 CAL27 细胞上调($t=4.237, P<0.05$)。结果表明, 在 VC 处理后可下调 CAL27/DDP 细胞中 P-gp 蛋白的表达。

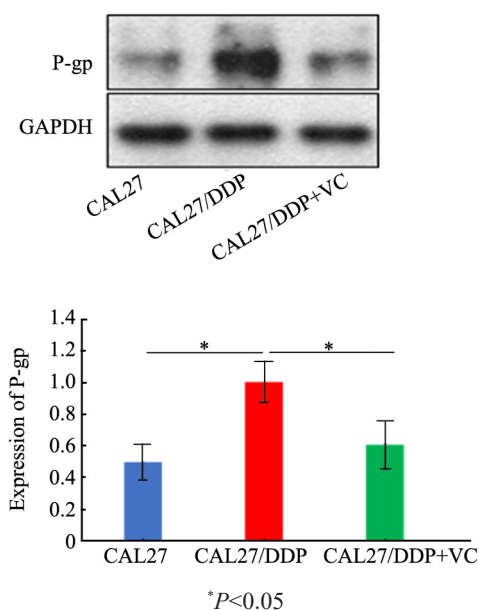


图6 VC干预对CAL27/DDP细胞P-gp蛋白表达的影响
Fig.6 Effect of VC intervention on P-gp protein expression in CAL27/DDP cells

3 讨论

OSCC占口腔颌面部恶性肿瘤90%以上,是世界第8大恶性肿瘤,主要采取以手术为主的综合治疗方法,化疗是其重要的组成部分,其中含DDP的化疗方案也是OSCC患者的一线化疗方案^[4]。然而随着DDP的广泛使用,许多患者出现DDP耐药,这不仅可导致化疗失败,也会因随着DDP用量的增加而使不良反应增强^[6]。因此,寻找一种效果好、不良反应少、能够有效逆转DDP耐药的化合物是OSCC临床治疗中亟待解决的问题之一。

VC是一种水溶性维生素,是人类和哺乳类动物的必需营养素之一,在人体内参与胶原蛋白的合成、促进肠道对铁的吸收发挥着重要的作用^[7]。已有研究^[8]表明,VC能够显著提高肿瘤干细胞的化疗敏感性。随着对VC生物学作用认识的不断加深,将其作为肿瘤化疗增敏剂或耐药逆转剂越来越受到重视。

本研究首先采用体外药物浓度递增法,筛选了一株对DDP耐药的CAL27/DDP细胞。显微镜下见CAL27/DDP细胞丧失了上皮细胞极性,获得间质细胞的特性,细胞形态由多边形变成不规则梭形,细胞连接由紧密变得疏松,表现出典型的EMT特性^[9]。通过细胞增殖-毒性实验和克隆形成实验,观察DDP对口腔鳞癌CAL27和CAL27/DDP细胞的体外增殖能力的影响。结果显示,CAL27/DDP细胞对DDP敏感性显著下降,表现出DDP耐药,而将DDP联合VC干预后,对CAL27/DDP细胞的增殖抑制率则显著上升,

VC可以提高DDP对CAL27/DDP细胞的增殖抑制能力。有研究^[8, 10-12]证明,VC可提高肝癌、前列腺癌和卵巢癌的化疗敏感性,但VC逆转口腔鳞癌DDP耐药作用的研究还尚未见报道。细胞划痕愈合实验结果显示,单用DDP时,CAL27/DDP细胞划痕愈合率相对CAL27细胞明显上升,这既是由于CAL27/DDP细胞对DDP敏感性下降的原因所导致,也同时符合EMT的特性。在DDP联合VC干预后,CAL27/DDP的细胞划痕愈合率则下降。结果表明,DDP联合VC可影响CAL27/DDP细胞部分生物学行为,在一定程度上可能对患者的预后产生积极的作用。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡,涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用^[13]。流式细胞术检测结果显示,单用DDP时,CAL27/DDP细胞凋亡率较CAL27细胞低,而在DDP联合VC后,CAL27/DDP细胞的凋亡率则明显上升,表明VC通过某种方式提高了DDP诱导CAL27/DDP细胞凋亡。这提示VC提高DDP对CAL27/DDP细胞增殖抑制能力主要是通过增加化疗药物诱导细胞凋亡来实现的。

目前研究^[14-16]表明,OSCC化疗耐药涉及了药物转运蛋白、细胞凋亡抑制、DNA损伤修复和EMT在内的多种因素。多药转运蛋白是一类穿膜蛋白,在多药耐药(multidrug resistance, MDR)中发挥着重要作用。其中P-gp蛋白是一个重要的与化疗耐药有关的多药转运蛋白^[17]。KIM等^[18]研究发现,在OSCC组织中P-gp的表达较正常口腔黏膜有所增加,并且P-gp的表达水平与患者的预后密切相关。随后有研究^[19]发现,DDP可诱导OSCC细胞高表达P-gp,同时发现激活Wnt/ β -catenin通路可过表达P-gp,从而促进OSCC细胞对DDP耐药。本研究发现,利用体外药物浓度递增法筛选的CAL27/DDP细胞株对DDP耐药,同时CAL27/DDP细胞的P-gp蛋白表达水平增高,这都与之前的研究结果一致。在VC干预后,CAL27/DDP细胞的P-gp蛋白表达水平下降,表明VC逆转CAL27/DDP细胞DDP耐药,可能是部分通过抑制P-gp蛋白的表达,从而提高了CAL27/DDP细胞对DDP的敏感性。

DDP目前仍是临床上常用的一线化疗药物,但DDP耐药不仅影响着患者的生存质量,也是5年生存率难以进一步提高的因素之一。本研究发现,VC可通过抑制P-gp蛋白的表达逆转OSCC细胞DDP耐药,协同DDP发挥抑制OSCC细胞增殖并诱导凋亡的作用,VC有望成为口腔鳞癌DDP耐药的逆转剂。但对于VC是如何抑制P-gp蛋白的表达及相关具体的机制尚不明确,有待更深入地研究。

[参 考 文 献]

- [1] CARNIELLI C M, MACEDO C C S, DE ROSSI T, et al. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3598[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6125363/>. DOI:10.1038/s41467-018-05696-2.
- [2] ZHONG L P, ZHANG C P, REN G X, et al. Randomized phase III trial of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil followed by surgery versus up-front surgery in locally advanced resectable oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(6): 744-751[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5569675/>. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.8820.
- [3] NISHIO-NAGAI M, SUZUKI S, YOSHIKAWA K, et al. Adoptive immunotherapy combined with FP treatment for head and neck cancer: an in vitro study[J/OL]. *Int J Oncol*, 2017, 51(5): 1471-1481[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5643067/>. DOI:10.3892/ijo.2017.4142.
- [4] BIDDLE A, GAMMON L, LIANG X, et al. Phenotypic plasticity determines cancer stem cell therapeutic resistance in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *EBioMedicine*, 2016, 4: 138-145[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4776071/>. DOI:10.1016/j.ebiom.2016.01.007.
- [5] BALLAZ S J, REBEC G V. Neurobiology of vitamin C: Expanding the focus from antioxidant to endogenous neuromodulator[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 146: 104321. DOI:10.1016/j.phrs.2019.104321.
- [6] CHOI H S, KIM Y K, YUN P Y. Upregulation of MDR- and EMT-related molecules in cisplatin-resistant human oral squamous cell carcinoma cell lines[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): E3034[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627081/>. DOI:10.3390/ijms20123034.
- [7] CIMMINO L, NEEL B G, AIFANTIS I. Vitamin C in stem cell reprogramming and cancer[J/OL]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(9): 698-708[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102081/>. DOI:10.1016/j.tcb.2018.04.001.
- [8] LV H, WANG C Z, FANG T, et al. Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2[J/OL]. *NPJ Precis Oncol*, 2018, 2(1): 1[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5871898/>. DOI:10.1038/s41698-017-0044-8.
- [9] LI W L, ZHU D D, QIN S H. SIRT7 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma metastasis by promoting SMAD4 deacetylation[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 148[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6044017/>. DOI:10.1186/s13046-018-0819-y.
- [10] CHEN Q, ESPEY M G, SUN A Y, et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(32): 11105-11109[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2516281/>. DOI:10.1073/pnas.0804226105.
- [11] VERRAX J, CALDERON P B. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit anti-tumoral effects[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(1): 32-40. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.016.
- [12] DU J, MARTIN S M, LEVINE M, et al. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 509-520[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2807999/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1713.
- [13] GREEN D R. The coming decade of cell death research: five riddles[J/OL]. *Cell*, 2019, 177(5): 1094-1107[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6534278/>. DOI: 10.1016/j.cell.2019.04.024.
- [14] MAKOVEC T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy[J/OL]. *Radiol Oncol*, 2019, 53(2): 148-158[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6572495/>. DOI:10.2478/raon-2019-0018.
- [15] GALLUZZI L, SENOVILLA L, VITALE I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. *Oncogene*, 2012, 31(15): 1869-1883. DOI:10.1038/onc.2011.384.
- [16] 赵艳霞, 孙臻峰. 头颈鳞状细胞癌化疗耐药分子机制研究进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(11): 888-891. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1781.2017.11.018.
- [17] FLETCHER J I, WILLIAMS R T, HENDERSON M J, et al. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology[J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 26: 1-9. DOI:10.1016/j.drup.2016.03.001.
- [18] KIM J W, PARK Y, ROH J L, et al. Prognostic value of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein expression in oral cavity cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2016, 21(5): 883-889. DOI: 10.1007/s10147-016-0973-1.
- [19] LI L, LIU H C, WANG C, et al. Overexpression of β -catenin induces cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 5378567[2019-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4978817/>. DOI:10.1155/2016/5378567.

[收稿日期] 2019-08-14

[修回日期] 2019-11-12

[本文编辑] 党瑞山