

iNOS抑制剂1400W通过p53途径增强顺铂对 宫颈癌SiHa细胞的化疗效果

叶君¹ 成雁² 陈亚萍^{1*}

(¹复旦大学附属上海市第五人民医院妇产科, 上海 200240; ²江苏省太仓市人民医院妇产科, 太仓 215400)

摘要 该文探讨了iNOS抑制剂1400W联合顺铂对宫颈癌SiHa细胞株生长抑制作用及其机制。应用MTT法检测1400W及顺铂对宫颈癌SiHa细胞生长的抑制作用; 流式细胞仪检测1400W及顺铂对宫颈癌SiHa细胞凋亡的影响; quantitative RT-PCR和Western blot检测1400W及顺铂对宫颈癌SiHa细胞p53、鼠双微基因2(murine double minut 2, MDM2)、DNA依赖蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)蛋白及mRNA表达的影响。结果显示, 通过iNOS抑制剂1400W联合顺铂作用于宫颈癌SiHa细胞株发现, 1400W联合顺铂能明显抑制SiHa细胞生长, 其抑制作用与剂量呈正相关。1400W可以增强顺铂诱导的细胞凋亡作用。进一步研究证实, 1400W可以抑制顺铂诱导的p53积聚, 增加鼠双微基因2及DNA依赖蛋白激酶的表达。该实验结果为治疗宫颈癌患者提供了新的治疗策略, 即通过联合使用iNOS抑制剂, 可以增强顺铂对宫颈癌细胞的杀伤作用, 提高顺铂对宫颈癌患者的治疗作用。

关键词 顺铂; 1400W; p53; iNOS; 宫颈癌SiHa细胞株

iNOS Inhibitor 1400W Enhanced Chemotherapeutic Effect of Cisplatin by p53 Signal in SiHa Cervical Cancer Cells

Ye Jun¹, Cheng Yan², Chen Yaping^{1*}

(¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Shanghai 5th People's Hospital of Fudan University, Shanghai 200240, China; ²Department of Gynaecology, the First People's Hospital of Taicang, Taicang 215400, China)

Abstract The aim of this paper was to explore the effects of iNOS inhibitor 1400W combined with cisplatin to cervical cancer cell line SiHa and the mechanisms. The effects of 1400W and cisplatin on SiHa cell growth were investigated by MTT. The SiHa cell apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expressions of p53, MDM2 (murine double minut 2) and DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) mRNA and protein in SiHa cell were detected by quantitative RT-PCR and Western blot. The results showed that 1400W combined with cisplatin could obviously inhibit SiHa cell growth, and showed a dose-dependent inhibitory effect on SiHa cell proliferation. 1400W enhanced the effect of DDP-induced cell apoptosis. Further study revealed that 1400W could inhibit DDP-induced over-accumulation of p53 and increased the expression of MDM2 and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). All of our data suggested that the combinational usage of iNOS inhibitor and DDP was an new strategy in cervical cancer treatment, which could improve the therapeutic effect of DDP on cervical cancer.

Keywords cisplatin; 1400W; p53; iNOS; SiHa cervical cancer cell line

收稿日期: 2014-10-28 接受日期: 2015-01-24

上海市闵行区自然科学基金(批准号: 2011MHZ44)

*通讯作者. Tel: 021-24289558, E-mail: chenying@5thhospital.com

Received: October 28, 2014 Accepted: January 24, 2015

This work was supported by Minhang District Shanghai Science and Technology Commission Nature Fund (Grant No.2011MHZ44)

*Corresponding author. Tel: +86-21-24289558, E-mail: chenying@5thhospital.com

网络出版时间: 2015-03-26 16:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150326.1603.004.html>

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一,在妇科恶性肿瘤发生中占第二位,其中鳞状细胞癌占宫颈癌的80%~85%,早期宫颈癌患者通过手术或放疗预后好,五年生存率达90%。而复发或晚期宫颈癌预后差,5年生存率仅为3.2%~13.0%^[1],且治疗常属姑息性,因而寻找更有效的治疗方案来提高晚期患者生存率非常有必要。目前,除了手术及放射治疗,系统性化疗仍是晚期宫颈癌标准治疗方案之一。顺铂(cisplatin, DDP)及铂类衍生物作为一线化疗药物而被广泛应用^[2],但是其毒性反应及耐药性是导致治疗失败的主要障碍。目前需要寻找新的化疗方案来提高顺铂对晚期宫颈癌患者的化疗效率,同时降低顺铂的毒副作用。

一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在多种肿瘤中高表达,其中包括宫颈癌^[3]。iNOS上调表达与肿瘤恶性程度相关,且可预测不良预后^[4]。在本实验中,我们选取宫颈鳞癌SiHa细胞株来探讨顺铂单独或联合1400W对SiHa细胞的影响。结果证实,1400W可以通过增加MDM2(murine double minut 2)表达,与积聚的p53相互作用增强顺铂诱导的宫颈癌细胞的死亡。实验结果为治疗宫颈癌患者提供了新的治疗策略,即通过联合使用iNOS抑制剂可以提高顺铂对晚期宫颈癌的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

宫颈癌SiHa细胞株购自中国科学院上海细胞库。用含有10%胎牛血清的DMEM培养基,在37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养。2~3 d更换一次培养液。当细胞生长到80%时进行接种实验。

1.2 药物与试剂

1400W、顺铂购自Sigma-Aldrich公司。总一氧化氮检测试剂盒、一氧化氮合成酶检测试剂盒购自碧云天生物技术研究。兔抗人p53、DNA-PK(DNA-dependent protein kinase)单抗和MDM2多克隆抗体购自Epitomics公司。抗GAPDH抗体、羊抗兔抗体购自Cell Signaling Technology公司。流式法细胞凋亡检测试剂盒购自Invitrogen公司。PCR引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

1.3 一氧化氮合成酶活性及一氧化氮浓度检测

将SiHa细胞株接种到96孔板内,当细胞生长到80%时,分设对照组和不同浓度1400W组(浓度分别为0.5, 5, 50, 500 μmol/L),每组设6个复孔培养。培养

6 h后按照一氧化氮合成酶检测试剂盒说明书检测其活性,以没有细胞的孔为空白对照,激发波长为495 nm,发射波长为515 nm,取该96孔板用荧光酶标仪检测,并计算相对活性。总一氧化氮含量也按照检测试剂盒说明书进行,检测每组细胞培养上清及标准曲线的D₅₄₀,通过标准曲线算出每个样本的一氧化氮的含量。根据实验结果确定后续实验中1400W浓度。

1.4 MTT试验

按照密度5×10⁴/mL将SiHa细胞接种于96孔板。设对照组和不同浓度药物组:顺铂组(10 μmol/L)、1400W组(50 μmol/L)和联合用药组[顺铂(10 μmol/L)+1400W组(50 μmol/L)]。在培养24 h或48 h后,每孔加入10 μL MTT(5 mg/mL)继续孵育4 h,每孔加入100 μL DMSO,低速振荡10 min,用酶联免疫检测仪测量490 nm处各孔的吸光度。以对照组细胞活力为100%,按公式:细胞抑制率=1-(药物组吸光度/对照组吸光度)×100%,计算各组细胞存活率。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞在相应组别中培养24 h后饥饿处理,使用PBS冲洗2次,每次3 min,洗净液体。细胞在结合缓冲液中震荡,按照Annexin V/PI凋亡检测试剂盒说明书检测细胞凋亡率。

1.6 蛋白免疫印迹实验(Western blot)

使用Trizol法提取各组中总蛋白。灌制8%或10%的SDS-PAGE胶(抗p53、抗MDM2用10%胶,抗DNA依赖蛋白激酶用8%胶),常规电泳,转膜,封闭,加入一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育1 h, ECL化学发光检测显影,在凝胶成像系统上拍照并分析。

1.7 Quantitative RT-PCR

用Trizol法提取各组的总RNA,逆转录成cDNA,然后进行实时定量PCR。反应条件:95℃预变性2 min;95℃变性15 s,60℃延伸34 s,40个循环。具体各基因的PCR引物见表1。

1.8 统计方法

应用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析,所有数据采用单因素方差分析,各指标均用平均数±标准差表示,以P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 iNOS抑制剂1400W能增强DDP对宫颈癌SiHa细胞株的细胞毒性作用

2.1.1 1400W对宫颈癌SiHa细胞一氧化氮合成酶活

表1 PCR引物序列

Table 1 The sequences of primers for PCR

目标基因 Target genes	引物(5'→3') Primers (5'→3')	片段长度(bp) Fragment length (bp)
<i>p53</i>	F: GCT GAA TGA GGC CTT GGA AC	167
	R: GAA GTG GAG AAT GTC AGT CTG	
<i>MDM2</i>	F: GGC TGT GTT CAA GTG GTT CT	190
	R: ACG CCT GTA ATC ACA GCA CT	
<i>DNA-PK</i>	F: GTG CCA ATC CAG CAG TCA TT	165
	R: TCA GGC ACT TCA CTT GAG TC	
<i>GAPDH</i>	F: GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CAG	214
	R: CTC TCT TCC TCT TGT GCT CTT GCT	

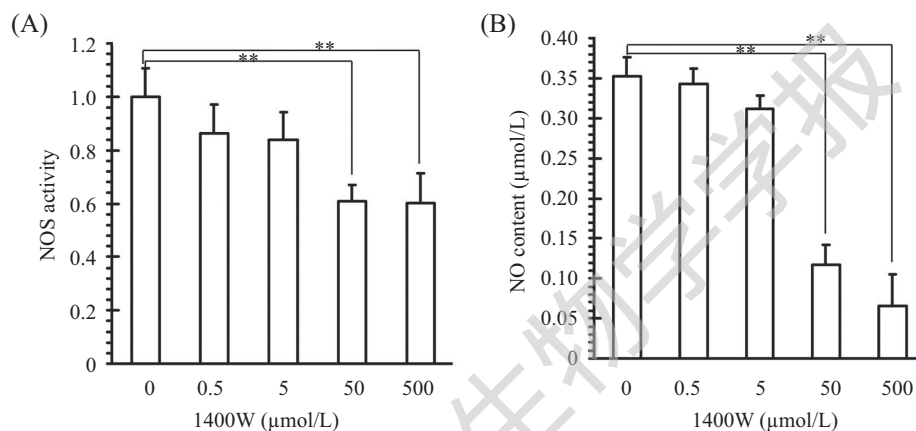
** $P < 0.01$.

图1 一氧化氮合成酶活性及NO浓度检测

Fig.1 Measurements of NOS activity and NO content

性及NO浓度的影响 将SiHa细胞接种于96孔板, 24 h后分别用0.5, 5, 50, 500 $\mu\text{mol/L}$ 的1400W作用于SiHa细胞, 检测一氧化氮合成酶活性, 结果显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ 及500 $\mu\text{mol/L}$ 的1400W均能显著抑制一氧化氮合成酶的活性, 且这两个浓度的抑制效果没有明显差别(图1A)。取细胞上清检测NO浓度, 结果显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ 及500 $\mu\text{mol/L}$ 的1400W均能显著降低NO的浓度, 且这两组抑制效果没有显著差异(图1B)。以上结果证实, 1400W可抑制宫颈癌细胞SiHa的一氧化氮合成酶活性及降低NO浓度, 并且50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度是有效的工作浓度, 因此接下来选择此浓度进行处理。

2.1.2 MTT检测 1400W和顺铂对宫颈癌 SiHa 细胞生存率的影响 各实验组SiHa细胞分别用1400W(50 $\mu\text{mol/L}$)和DDP(10 $\mu\text{mol/L}$)刺激24, 48 h。1400W+DDP组中先用1400W孵育16 h, 此后再加入DDP继续孵育。用MTT检测细胞增殖抑制情况并计算存活率, 对照组存活率设为1。结果显示, 单独

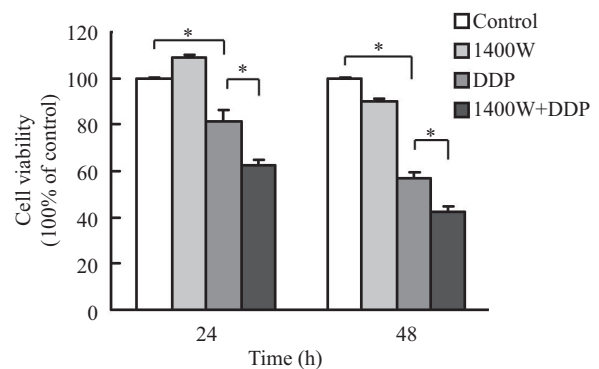
* $P < 0.05$.

图2 MTT检测iNOS抑制剂1400W和/或顺铂对宫颈癌SiHa细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of 1400W and/or DDP on cytotoxicity of SiHa cells measured by MTT assay

使用1400W对细胞增殖的抑制作用不明显。当其与DDP联合使用于SiHa细胞时能够有效增强DDP的细胞毒性作用(图2)。

2.1.3 流式细胞仪检测1400W和顺铂对宫颈癌SiHa细胞凋亡的影响 使用流式细胞技术进一步检测

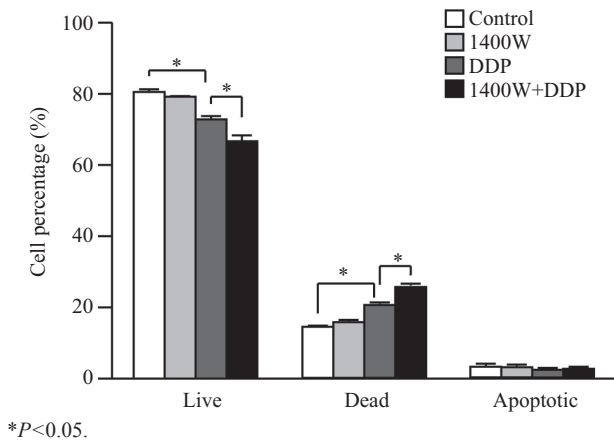
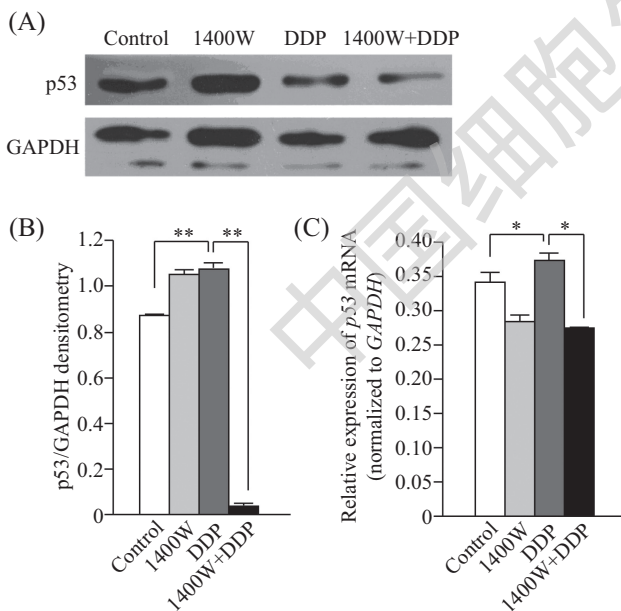
* $P < 0.05$.

图3 流式细胞仪检测1400W和/或顺铂对宫颈癌SiHa细胞凋亡的影响

Fig.3 Effects of 1400W and/or DDP on cytotoxicity of SiHa cells by flow cytometry analysis

药物刺激24 h后细胞的凋亡情况, 使用Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒进行检测, 可以同时监测到活细胞、早期凋亡细胞和死细胞的比率。结果显示, 细胞的存活率与MTT的结果相类似, 而联合处理组的死亡率显著高于DDP单独处理组, 进一步证实了1400W能够有效增强DDP的细胞毒性作用(图3)。



A: Western blot检测处理24 h后各组中p53蛋白表达变化; B: 定量分析A中Western blot的条带强度, ** $P < 0.01$; C: quantitative RT-PCR分析p53 mRNA表达水平, * $P < 0.05$ 。

A: Western blot analysis of the expressions of p53 in SiHa cells treated with vehicle control, 1400W, DDP or combination of 1400W and DDP; B: quantitative analysis of graph Western blot band intensity of p53, ** $P < 0.01$; C: expression of p53 mRNA in SiHa cells detected by quantitative RT-PCR, * $P < 0.05$ 。

图4 SiHa细胞中p53的表达情况

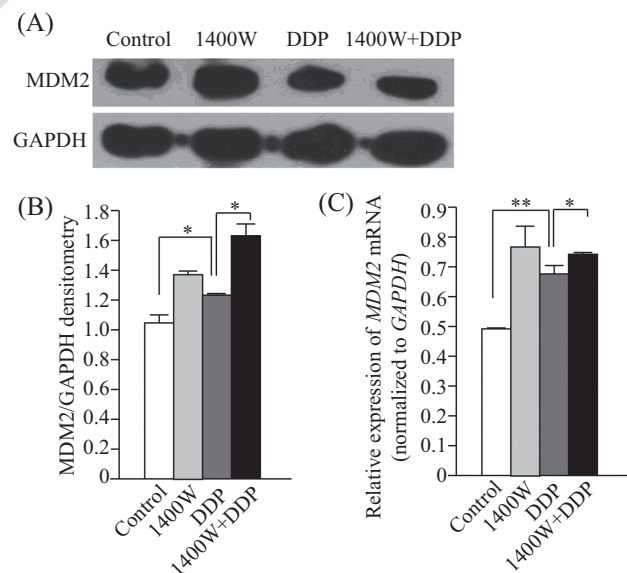
Fig.4 The expressions of p53 in SiHa cells

2.2 1400W和顺铂对宫颈癌SiHa中p53、MDM2及DNA-PK蛋白表达的影响

2.2.1 Western blot及quantitative RT-PCR检测各组中p53蛋白表达情况 Western blot检测各处理组中p53蛋白表达变化, GAPDH作为内参。1400W+DDP组的p53表达量明显低于对照组、1400W组和DDP组, 而且蛋白水平的差异比基因水平的明显(图4)。

2.2.2 Western blot及quantitative RT-PCR检测各组中MDM2蛋白表达情况 为了进一步研究1400W对p53通路的影响, 我们检测了p53的负调控蛋白MDM2的表达情况。结果显示, 在mRNA水平和蛋白水平, DDP处理组中MDM2的表达均显著高于对照组($P < 0.01$), 而1400W和DDP共同处理组中MDM2的表达水平明显高于DDP单独处理组($P < 0.05$)(图5)。

2.2.3 Western blot及quantitative RT-PCR检测各组中DNA-PK蛋白表达情况 DNA-PK蛋白表达是DNA受损后p53表达的上游调节因子, 因此我们进一步检测了DNA-PK的表达。我们利用Western blot和定量PCR的方法分别检测各组中DNA-PK的表达,

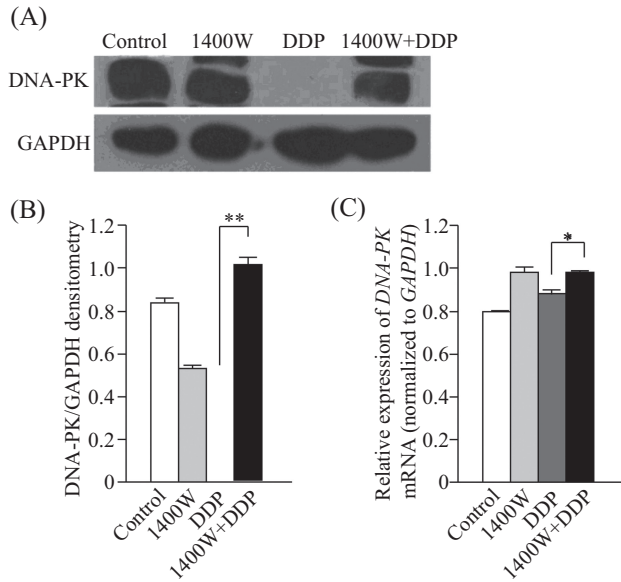


A: Western blot检测各组中MDM2蛋白表达水平; B: 定量分析图A中Western blot的条带强度, * $P < 0.05$; C: quantitative RT-PCR分析MDM2 mRNA表达水平, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: Western blot analysis of MDM2 expression in SiHa cells treated with vehicle control, 1400W, DDP or combination of 1400W and DDP; B: quantitative analysis of graph Western blot band intensity of MDM2, * $P < 0.05$; C: expression of MDM2 mRNA in SiHa cells detected by quantitative RT-PCR, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 SiHa细胞中MDM2的表达情况

Fig.5 The expressions of MDM2 in SiHa cells



A: Western blot检测各组中DNA-PK蛋白表达水平; B: 定量分析图A中Western blot的条带强度, ** $P < 0.01$; C: quantitative RT-PCR分析DNA-PK mRNA表达水平, * $P < 0.05$ 。

A: Western blot analysis of DNA-PK expression in SiHa cells treated with vehicle control, 1400W, DDP or combination of 1400W and DDP; B: quantitative analysis of graph Western blot band intensity of DNA-PK, ** $P < 0.01$; C: expression of DNA-PK mRNA in SiHa cells detected by quantitative RT-PCR, * $P < 0.05$ 。

图6 SiHa细胞中DNA-PK的表达情况

Fig.6 The expressions of DNA-PK in SiHa cells

结果显示, 在mRNA水平和蛋白水平, 1400W和DDP共同处理组中DNA-PK的表达水平明显高于DDP单独处理组(图6)。

3 讨论

肿瘤细胞可以合成一氧化氮(nitric oxide, NO), 且NO在肿瘤的发生发展过程中起到重要作用。NO由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)合成, 其同功酶有三种亚型, 即神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)以及在损伤后诱导表达的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)。研究证实, iNOS在许多肿瘤细胞系和实体瘤组织中都有较高的表达, 如卵巢癌^[5]、前列腺癌^[6]、胃癌^[7]、结肠癌^[8]、头颈部肿瘤^[9]以及非上皮性肿瘤如肉瘤^[10]等。iNOS与肿瘤的发生、肿瘤血管生成、肿瘤进展及转移均相关。iNOS高表达多与肿瘤预后不良有关^[11-13]。Silva等^[14]发现, iNOS表达情况可以作为监测宫颈癌预后指标之一。在结肠癌及乳腺癌临床前研究中发现, 抑制iNOS表达可以有效预防肿瘤进展^[15-16]。iNOS在妇科肿瘤中表达情况研究较多,

但是iNOS在妇科肿瘤中的作用机制及对预后的影响研究甚少。1400W是iNOS的高度选择性抑制剂。iNOS的抑制能力比对eNOS和nNOS的抑制能力分别高5 000倍和200倍^[17]。在对小鼠进行放射诱导肿瘤形成实验中, 口服1400W 3 d后, 与对照组相比, 实验组小鼠肿瘤发生率下降1/3^[18]。本实验结果提示, 1400W通过抑制iNO合成NO, 增强了顺铂的细胞毒作用, 两者联合可提高化疗药物顺铂的抗肿瘤作用。

研究发现, 顺铂耐药主要是由于诱导肿瘤细胞凋亡作用失败导致的^[19-21]。顺铂多通过DNA交联上调p53表达, 从而通过依赖p53途径诱导肿瘤细胞凋亡。然而研究发现, 在卵巢癌、黑色素瘤细胞株中p53过多积聚与顺铂耐药相关^[21-23]。通过对新辅助化疗凋亡相关敏感蛋白的分析结果显示, p53过度积聚与宫颈腺癌患者化疗耐药相关, 而且该研究证实p53表达上调的宫颈癌患者更易发生耐药, 预后更差^[24]。本实验证明, 1400W抑制iNOS合成可以增强顺铂的细胞毒作用, 同时可以明显减少顺铂诱导的p53积聚作用。Tang等^[23]对黑色素瘤细胞株的研究证实, NO可以增加肿瘤细胞对顺铂的耐药性, 使用1400W清除内源性NO后可以增强顺铂通过p53途径诱导细胞凋亡。这些研究结果与我们的实验结果一致, 即通过1400W抑制iNOS合成, 抑制p53积聚, 增强顺铂对宫颈癌细胞株的毒性作用。在流式细胞方法检测SiHa细胞凋亡的实验中发现, 1400W联合顺铂组中SiHa细胞死亡率明显增加, 进一步证实了1400W能够有效增强DDP的细胞毒性作用。

在正常细胞中, MDM2通过与p53蛋白形成复合物, 使p53不断被降解, 起到负反馈的调节作用, 当DNA遭到损伤时, p53被磷酸化, 不再与MDM2蛋白结合, 此时p53不再被降解, 细胞中p53蛋白表达增加, 增加的p53蛋白主要是由于蛋白降解受到抑制而不是转录或翻译的增加。因此, MDM2是一个重要的负反馈调节因子, 它既能够抑制p53转录活性, 也能直接降低p53蛋白表达水平^[25]。NO可以通过调节MDM2半胱氨酸残基和阻断MDM2-p53结合使p53失活^[23], 通过以上途径, NO可以诱导p53积聚促进肿瘤进展。本实验结果证实, 在联合组中p53负调节因子MDM2表达明显增强, 提示1400W可通过上调MDM2的表达, 使其与p53泛素化结合抑制p53过多积聚, 恢复p53抑制肿瘤生长的作用。但是, 单独使用1400W并没有明显改变p53表达或增加细胞死亡,

提示1400W在宫颈癌细胞株中仅为顺铂的增敏剂。

DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)是DNA损伤修复的关键酶, DNA-PK是DNA双链断裂修复的关键酶, 与化疗耐药密切相关^[26]。因为大部分抗肿瘤治疗方法包括放化疗都是通过损伤肿瘤细胞DNA导致细胞凋亡而杀死肿瘤细胞的, 如果肿瘤细胞DNA-PK过度表达, 将可能对放射线和基因毒性抗癌药产生耐受, 为肿瘤的治疗造成困难。研究发现, DNA-PK在宫颈癌Ib-IIb组织中表达明显高于正常组织。且表达越高者, 其对放疗的敏感性越差。抑制DNA-PK蛋白表达及活性后, 可以促进宫颈癌HeLa细胞株对放化疗的敏感性^[27-28]。NO及其活性氮衍生物除了可以直接作用于DNA使其发生突变外, 也可以通过使DNA相关修复蛋白如DNA-PK等蛋白质巯基亚硝基化影响其正常功能从而导致DNA突变^[29], 使肿瘤细胞逃脱导致DNA损伤的因子的作用(如放疗、博来霉素、顺铂等)^[30]。Woo等^[31]研究证实, 在缺乏DNA-PK的鼠免疫缺陷细胞及人glioma细胞株中, p53丧失与DNA的结合能力, 推测, DNA-PK是p53特异性连接DNA的必要条件, 因此DNA-PK蛋白表达是DNA受损后p53表达的上游调节因子。Hill等^[32]证实, 通过抑制DNA-PKcs表达合成可抑制p53磷酸化和积聚, 明显抑制caspase-3裂解从而减少细胞凋亡。本实验结果提示, DNA-PK在联合组的表达量较单药顺铂组增大, 可能是1400W抑制了p53过度积聚, 使p53活性增强, 从而增强p53依赖途径的细胞凋亡作用。肾毒性也影响了顺铂在妇科肿瘤治疗中的使用, Chirino等^[33]在动物实验中证实选择性iNOS抑制剂可以降低顺铂肾毒性作用, 同时降低试验动物体内亚硝化应激水平, 且对收缩压无影响。

本实验证实, iNOS抑制剂1400W联合顺铂作用于宫颈癌SiHa细胞, 能够增加DDP对SiHa细胞的毒性作用, iNOS抑制剂1400W具有化疗增敏作用。因此, 通过抑制iNOS合成NO, iNOS抑制剂可以增强顺铂对宫颈癌细胞的杀伤作用, 这为晚期或复发宫颈癌患者的治疗提供了新的思路: 即通过iNOS抑制剂与现有的化疗药物联合增强化疗药物的抗肿瘤活性, 并可减少化疗药物用量以增加患者对现有化疗药物的耐受性, 提高晚期宫颈癌患者的生存时间。

参考文献 (References)

1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani I. Estimating the world

- 2 Siddik ZH. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47): 7265-79.
- 3 王 莉, 李雅丽, 吴 静. 诱导型一氧化氮合酶在宫颈癌组织表达及意义. *医药论坛杂志*(Wang Li, Li Yali, Wu Jing. Expression and clinical significance of iNOS in cervical cancer. *Journal of Medical Forum*) 2011; 32(21): 61-3.
- 4 Nomelini RS, Ribeiro LC, de Abreu BM, Adod SJ. Production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in ovarian cystic tumors. *Mediators Inflamm* 2008; 2008: 18658.
- 5 Raspollini MR, Amunni G, Villancci A, Boddi V, Baroni G, Taddei A, *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: Correlation with clinical outcome. *Gynecol Oncol* 2004; 92(3): 806-12.
- 6 Aaltoma SH, Lipponen PK, Kosma VM. Inducible nitric oxide synthase (i-NOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(4B): 3101-6.
- 7 Song ZJ, Gong P, Wu Y. Relationship between the expression of i-NOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002; 8(4): 591-5.
- 8 Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Schiavone N, Vannacci A, *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 2003; 162(3): 793-801.
- 9 Gallo O, Masini E, Vergari WA, Storch IF, Franch A, Morbidelli L, *et al.* Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(8): 587-96.
- 10 Weninger W, Rendl M, Pammer J. Nitric oxide synthases in Kaposi sarcoma are expressed predominantly by vessels and tissue macrophages. *Lab Invest* 1998; 78(8): 949-55.
- 11 Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 521-34.
- 12 Ridnour LA, Thomas DD, Donzelli S, Espey MG, Roberts DD, Wink DA, *et al.* The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid Redox Signal*, 2006; 8(7/8): 1329-37.
- 13 Mazibrada J, Rittà M, Mowww M, de Andreaa M, Azzimon B. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2008; 108(1): 112-20.
- 14 Silva CS, Michelin MA, Etchebehere RM, Adad SJ, Murta EF. Local lymphocytes and nitric oxide synthase in the uterine cervical stroma of patients with grade III cervical intraepithelial neoplasia. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; 65(6): 575-8.
- 15 Yang KX, Ou J, Liang ZQ. Association of clinicopathologic parameters with the expression of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Dis* 2011; 17(6): 590-6.
- 16 Naveena BI, Chinthalapally VR. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: Promise and progress. *Future Med Chem* 2012; 4(17): 2193-204.
- 17 Fedorov R, Hartmann E, Ghosh DK, Schlichting I. Structural basis for the specificity of the nitric-oxide synthase inhibitors W1400 and N-omega-propyl-L-Arg for the inducible and neuronal isoforms. *J Biol Chem* 2003; 278(46): 45818-25.
- 18 Inano H, Onoda M. Nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase is associated with mammary tumorigenesis in irradiated rats. *Nitric Oxide* 2005; 12(1): 15-20.
- 19 Sasaki H, Sheng Y, Kotsuji F. Down-regulation of X-linked

- inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2006; 60(20): 5659-66.
- 20 Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: Implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem* 2003; 278(26): 23432-40.
- 21 Fraser M, Leung BM, Yan X, Dan HC, Cheng JQ, Tsang BK. p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63(21): 7081-8.
- 22 Fraser M, Leung B, Jahani-Asl A, Yan X, Thompson WE, Tsang BK. Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 66.
- 23 Tang GH, Grimm EA. Depletion of endogenous nitric oxide enhances cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. *J Biol Chem* 2004; 279(1): 288-98.
- 24 Saito T, Takehara M. Correlation between responsiveness of neoadjuvant chemotherapy and apoptosis-associated proteins for cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92(1): 284-92.
- 25 庄亮, 于世英, 黄晓园, 曹阳, 熊慧华. DNA-PKcs、Ku80及ATM备选宫颈癌放疗增敏靶点的体外研究. *癌症* (Zhuang Liang, Yu Shiying, Huang Xiaoyuan, Cao Yang, Xiong Huihua. Potentials of DNA-PKcs, Ku80, and ATM in enhancing radiosensitivity of cervical carcinoma cells. *Chinese Journal of Cancer*) 2007; 26(7): 724-9.
- 26 Hill R, Lee PW. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle* 2010; 9(17): 3460-9.
- 27 Boldogh I, Roy G, Lee MS, Bacci A, Hazra TK, Bhakat KK, *et al.* Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNA-PKcs activity and low oxidative stress. *Toxicology* 2003; 193(1/2): 137-52.
- 28 Fuhrman CB, Kilgore J, LaCoursiere YD, Lee CM, Milash BA, Soisson AP, *et al.* Radiosensitization of cervical Cancer cells via double-strand DNA break repair inhibition. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1): 93-8.
- 29 Xu W, Liu Z, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 2002; 12(5/6): 311-20.
- 30 Xu W, Liu L, Smith GC, Charles IG. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumor agents. *Nat Cell Biol* 2000; 2(6): 339-45.
- 31 Woo RA, McLure KG, Lee-Miller SP, Lees-Miller, Derrick Rancourt, Patrick W, *et al.* DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 1998; 394(6694): 700-4.
- 32 Hill R, Leidal AM, Madureira PA, Gillis LD, Waisman D, Chiu A. Chromium-mediated apoptosis: involvement of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and differential induction of p53 target genes. *DNA Repair (Amst)* 2008; 7(9): 1484-99.
- 33 Chirino YI, Trujillo J, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Bobadilla NA, *et al.* Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol Lett* 2008; 176(1): 48-57.