

· 基础研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.04.001

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240105.1804.006\(2024-01-08\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240105.1804.006(2024-01-08))卵巢癌顺铂耐药转录组学分析和拮抗剂筛选的研究^{*}王晓晓¹,杜佳慧¹,李莉蓉¹,郭伟强²,刘松柏^{1△}

(1. 苏州卫生职业技术学院苏州检验医学生物技术重点实验室,江苏苏州 215009;

2. 苏州科技大学,江苏苏州 215009)

[摘要] **目的** 探讨卵巢癌细胞顺铂(DDP)耐药后的转录组差异,并基于此筛选找寻潜在的拮抗剂。**方法** 以 A2780 细胞为研究对象,构建 DDP 耐药细胞 A2780-DDP;通过转录组学测序分析,找寻 DDP 耐药的关键因素,并以实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 实验进行验证;通过小分子抑制剂筛选,采用 CCK-8 细胞活力检测的方法找寻潜在拮抗剂。**结果** 成功构建了 A2780-DDP 细胞株,发现耐药后细胞增殖无差异,但细胞侵袭和迁移能力增强;通过转录组学测序分析,发现 ITGB7、Akt 等可能是 DDP 耐药的关键基因,且 qPCR 和 Western blot 验证发现两者在 A2780-DDP 细胞株中存在高表达。CCK-8 结果显示,雷公藤内酯醇(TPL)、奥拉帕尼等在 A2780-DDP 细胞株中具有较好的抑制效果。**结论** ITGB7/Akt 通路在 DDP 耐药中发挥重要作用,TPL、奥拉帕尼等潜在的 DDP 耐药拮抗剂可为卵巢癌治疗提供新思路。

[关键词] 顺铂;小分子抑制剂;卵巢癌;RNA-seq;耐药机制**[中图法分类号]** R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)04-0481-06

Transcriptomic analysis and antagonist screening of cisplatin resistance in ovarian cancer^{*}

WANG Xiaoxiao¹,DU Jiahui¹,LI Lirong¹,GUO Weiqiang²,LIU Songbai^{1△}

(1. Suzhou Key Laboratory of Medical Biotechnology, Suzhou Vocational Health College,

Suzhou, Jiangsu 215009, China; 2. Suzhou University of Science and

Technology, Suzhou, Jiangsu 215009, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the transcriptome differences of ovarian cancer cells after cisplatin (DDP) resistance, and to find potential antagonists based on this screening. **Methods** DDP-resistant cell line A2780-DDP was constructed with A2780 cells as the research object. Through transcriptome sequencing analysis, the key factors of DDP resistance were found and verified by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot experiments. Through the screening of small molecule inhibitors, CCK-8 cell viability assay was used to find potential antagonists. **Results** A2780-DDP were successfully constructed, and it was found that there was no difference in cell proliferation after drug resistance, but the ability of cell invasion and migration was enhanced. Through transcriptome sequencing analysis, it was found that ITGB7 and Akt may be the key genes of A2780-DDP, and qPCR and Western blot showed that they were highly expressed in A2780-DDP. CCK-8 results showed that triptolide (TPL) and Olaparib had good inhibitory effects in DDP-resistant cell lines. **Conclusion** The ITGB7/Akt pathway plays an important role in DDP resistance, and potential DDP resistance antagonists such as TPL can provide new ideas for the treatment of ovarian cancer.

[Key words] cisplatin; small molecule inhibitor; ovarian cancer; RNA-seq; drug resistance mechanism

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一^[1], 癌和子宫内膜癌,但死亡率居第 1 位^[2]。由于早期卵巢癌患者没有或只有很少的特定症状,同时缺乏有效

^{*} **基金项目:**江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(YY-170);江苏省 333 人才项目(BRA2019329);江苏省苏州市科技局民生科技医疗卫生科技创新关键技术攻关项目(SKY2021029);江苏高校“青蓝工程”中青年学术带头人(2021);苏州卫生职业技术学院自然科学研究项目(szwzy201904);2021 年度省高校优秀科技创新团队(血液肿瘤新型标志物的鉴定及应用)。△ **通信作者,** E-mail: liusongbai@126.com。

的筛查方法,70%以上的卵巢癌患者在晚期(Ⅲ、Ⅳ期)才被诊断出来^[3-4]。手术联合化疗是目前治疗卵巢癌的主要方法,但由于耐药和复发率较高,导致患者的生存率很低,2007—2013 年Ⅲ、Ⅳ期卵巢癌患者的 5 年生存率分别为 42%和 26%^[5-6]。因此,研究卵巢癌新的替代治疗策略势在必行。

铂类化疗药是临床上最常用的化疗药物,共分为 3 代。顺铂(DDP)作为第一代铂类化疗药,它可以用于多种癌症的治疗,如睾丸癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、宫颈癌、头颈部癌症、胃癌等^[7-9]。DDP 主要通过 DNA 合成 DNA-铂加合物诱导 DNA 损伤反应来杀死肿瘤细胞^[7]。以 DDP 为基础的化疗在卵巢癌的早期治疗中效果很好,然而耐药是卵巢癌化疗中最常见的现象之一^[8-9]。针对 DDP 耐药,目前临床多应用 DDP 联合其他化疗药物治疗,成功降低了药物毒性和肿瘤的耐药性。临床研究表明,在 DDP 治疗各种肿瘤的基础上加入 5-氟尿嘧啶、紫杉醇、吉西他滨、阿霉素等都可获得良好的疗效并减少不良反应^[10-12],但仍需要更多的研究来提高抗癌活性,降低毒性和交叉耐药性或改善药理特性。因此,了解卵巢癌 DDP 耐药的发生机制及寻找拮抗 DDP 耐药的新疗法或新药成为卵巢癌治疗研究的热点和重点之一。

转录组是特定细胞在某一功能状态下所能转录出来的所有 RNA 的总和,包括编码的 mRNA 和非编码 RNA。转录组测序是基于 Illumina 测序平台,研究特定组织或细胞在某个时期转录出来的所有 mRNA,转录组研究是基因功能及结构研究的基础和出发点,通过新一代高通量测序,能够全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下的几乎所有转录本序列信息,已广泛应用于基础研究、临床诊断和药物研发等领域。有研究表明,细胞外基质(ECM)不仅在调节细胞黏附、形态和运动方面发挥关键作用,而且还介导肿瘤的发生、进展和转移扩散^[13],"ECM-受体相互作用通路""PI3K/Akt 信号通路"和"细胞黏附分子(CAMs)"通路与细胞行为相关,并可能在调节细胞迁移和死亡中发挥核心作用,且在这几条通路中的整合素亚基基因家族(ITG)在肿瘤进展和癌症治疗中发挥重要作用^[14-15]。本研究旨在探讨卵巢癌 DDP 耐药的分子机制,并寻找克服卵巢癌耐药的新策略及 DDP 耐药的新方向,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

卵巢癌细胞系 A2780 购自北纳生物科技公司;1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自德国 SERANA 公司;胰酶和双抗均购自美国 Hyclone 公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;逆转录和实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒购自

日本 Takara 公司;引物由金斯瑞生物科技股份有限公司合成;单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;山羊抗小鼠及山羊抗兔抗体购自上海碧云天生物有限公司;OTS964、CPT、AZD7648、雷公藤内酯醇(TPL)及奥拉帕尼等小分子抑制剂购自上海陶术生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及耐药细胞构建

用不同浓度的 DDP 刺激 A2780,在培养箱中培养 48 h 后换不含药培养基继续培养,待达到对数生长期后重复剂量诱导,诱导剂量为 0.2~64.0 $\mu\text{g/mL}$,最终获得 DDP 耐药细胞 A2780-DDP,诱导成功后,需在培养基中添加 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 DDP 以维持其耐药性。A2780 和 A2780-DDP 均使用含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 1640 培养基,并在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 CCK-8 细胞活力检测

细胞增殖能力及药物敏感性使用 CCK-8 试剂进行检测,将 A2780 和 A2780-DDP 按照 5 000/孔的密度接种到 96 孔板中,24 h 后在培养基中加入不同浓度的 DDP,72 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,2 h 后使用酶标仪检测 450 nm 处吸光度,绘制细胞生长抑制曲线,并计算半抑制浓度(IC_{50})值。按上述方法将细胞接种到 96 孔板中,使用 CCK-8 试剂分别检测 0、24、48、72、96 h 的细胞活力,并绘制细胞增殖曲线。

1.2.3 细胞划痕实验

细胞迁移能力通过划痕实验进行验证,分别将 A2780 和 A2780-DDP 按照 1.0×10^7 个每孔的密度接种到 6 孔板中,培养至细胞密度 80%,用 200 μL 的移液器吸头做划痕,磷酸盐缓冲液清洗细胞并拍照;24 h 后再次拍照,测量划痕的距离,与 0 h 进行比较,验证细胞的迁移能力。

1.2.4 细胞迁移和侵袭能力检测

使用 Transwell 小室(Costar)检测细胞迁移和侵袭能力,胰酶消化细胞,800 r/min 离心 3 min 后用磷酸盐缓冲液洗 1 遍,再次离心后,用无血清培养基重悬,吹散混匀并计数,将细胞密度稀释至 50 万/mL;在 24 孔 Transwell 板中加入 500 μL 含 10%血清的正常培养基,放入小室,加入 200 μL 无血清培养基稀释好的细胞悬液。24 h 后取出小室,吸去上层培养液并用棉签轻轻擦拭除去上层细胞,加入磷酸盐缓冲液洗 1 遍,加入时注意不要碰到膜。然后用 0.1%的结晶紫染色液染色 10 min,吸弃染色液,磷酸盐缓冲液清洗 3 次,用镊子小心揭下膜,吸干残留液体并晾干后转移至载玻片上,用中性树胶封片,显微镜拍照并计数,比较细胞迁移和侵袭能力。

1.2.5 RNA-Seq 分析

分别收集 A2780 和 A2780-DDP 进行了转录组学

测序,将 A2780 作为对照对象,A2780-DDP 作为实验对象,各重复 3 次。对测序结果原始图像数据利用软件 Bcl2fastq(v2.17.1.14)进行图像碱基识别和初步质量分析后得到原始测序数据。对测序数据进行参考序列比对分析,可变剪切分析,新转录本预测及 SNV 和 InDel 分析,并通过 Htseq 软件计算基因表达水平,该软件采用 RSEM 软件计算基因表达水平,衡量基因表达水平的标准为 FPKM 值,通过所有基因的 FPKM 的分布图及盒形图对不同实验条件下的基因表达水平进行比较。对检测的结果按照差异显著性标准进行筛选,即差异基因表达变化 2 倍以上且 q 值[错误发现率(FDR)/校正后的 P 值(P_{adj})]统计基因显著性差异表达上下调情况。最后,通过差异基因 GO 富集分析和 KEGG 富集分析对差异表达基因进行聚类分析。

1.2.6 qPCR

根据高通量测序结果,筛选出 6 个预测有表达差异的基因,利用 Primer premier5.0 软件进行引物设计,并经上海生工生物工程技术服务有限公司进行合成。采用 SYBR Green I 法进行 qPCR,验证转录组测序结果的准确性。以逆转录产物 cDNA 为模板,严格按照罗氏 qPCR 试剂盒说明书进行实验操作。每个模板设置 3 个重复,每个基因设置 3 个阴性对照,总反应体系为 20 μ L,反应条件是 95 $^{\circ}$ C,15 s;57 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环。

1.2.7 Western blot

从标本中提取蛋白质并用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度,然后通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,再用 5% 的脱脂奶粉封闭,一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,用 PBST 洗涤膜 3 次,并与辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育 1 h。然后将 PVDF 膜在 PBST 中再次洗涤并使用增强化学发光试剂盒显影,显影结果用 ImageJ 软件进行条带定量分析。

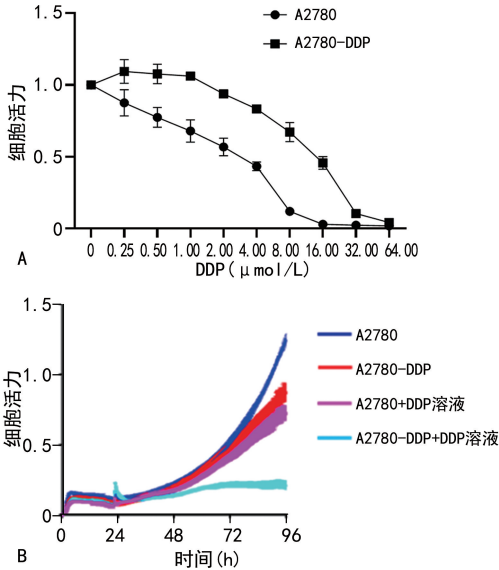
1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,GraphPad Prism 作图,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算基因相对表达;计数资料以例数或百分比表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A2780-DDP 细胞株的构建

通过药物浓度递增的方法成功构建了耐药细胞株 A2780-DDP。CCK-8 结果发现,随着 DDP 浓度的增加,A2780 的生长受到抑制,而 A2780-DDP 则表现出明显的耐药性,且使用实时细胞分析仪器检测发现 A2780 和 A2780-DDP 的细胞增殖无差异,见图 1。



A: CCK-8 检测细胞耐药性;B: RTCA 方法检测 A2780 和 A2780-DDP 细胞增殖及耐药性差异。

图 1 细胞耐药性和增殖检测结果

2.2 耐药细胞迁移和侵袭能力提高

细胞划痕和 Transwell 实验结果显示,与 A2780 比较,A2780-DDP 的细胞迁移和侵袭能力明显提高,见图 2。

2.3 ITGB7/Akt 通路在耐药细胞中存在着高表达和高活性

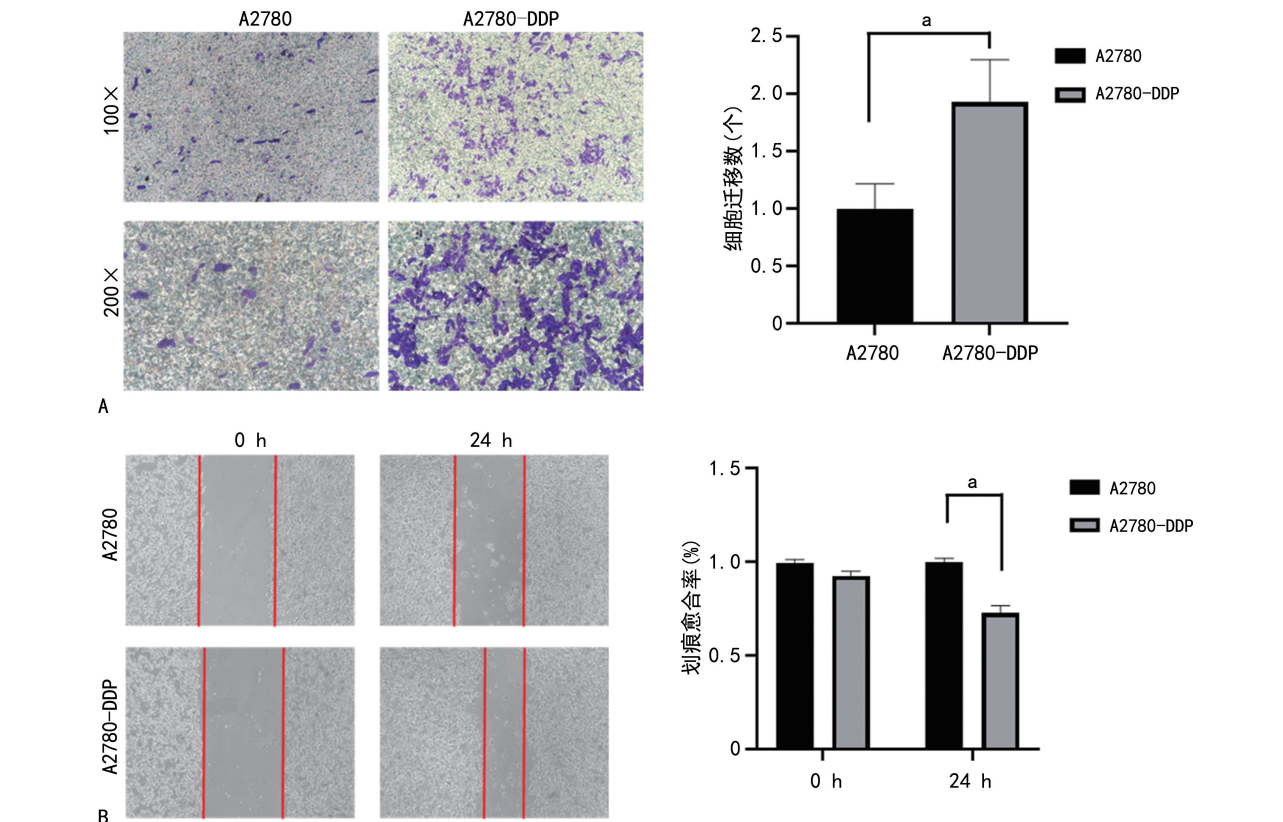
通过差异基因表达分析,选取了 IGF1R、PIK3CG、PDGFRA 3 个表达降低的基因及 PDGFC、ITGB7、ITGA8 3 个表达升高的基因进一步分析验证。通过设计合成定量 PCR 引物(表 1),qPCR 结果与 RNA-Seq 分析结果一致,A2780-DDP 的 ITGB7 表达水平明显高于 A2780;Western blot 结果显示,与 A2780 比较,A2780-DDP 的 p-Akt 蛋白表达水平升高,见图 3。

表 1 定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物(bp)
IGF1R	正向:AGG ATA TTG GGC TTT ACA ACC TG	80
	反向:GAG GTA ACA GAG GTC AGC ATT TT	
PIK3CG	正向:GGC GAA ACG CCC ATC AAA AA	150
	反向:GAC TCC CGT GCA GTC ATC C	

续表 1 定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5′-3′)	产物(bp)
PDGFRA	正向:TTG AAG GCA GGC ACA TTT ACA	119
	反向:GCG ACA AGG TAT AAT GGC AGA AT	
PDGFC	正向:ATT CAC AGC CCA AGG TTT CCT	125
	反向:GGG TCT TCA AGC CCA AAT CTT	
ITGB7	正向:AGA ATG GCG GAA TCC TCA CCT	113
	反向:TGA AGT TCA GTT GCT TGC ACC	
ITGA8	正向:TCA GGC GTT CAA CCT GGA C	96
	反向:GCG TCG GGT ATG TGG AAG TC	



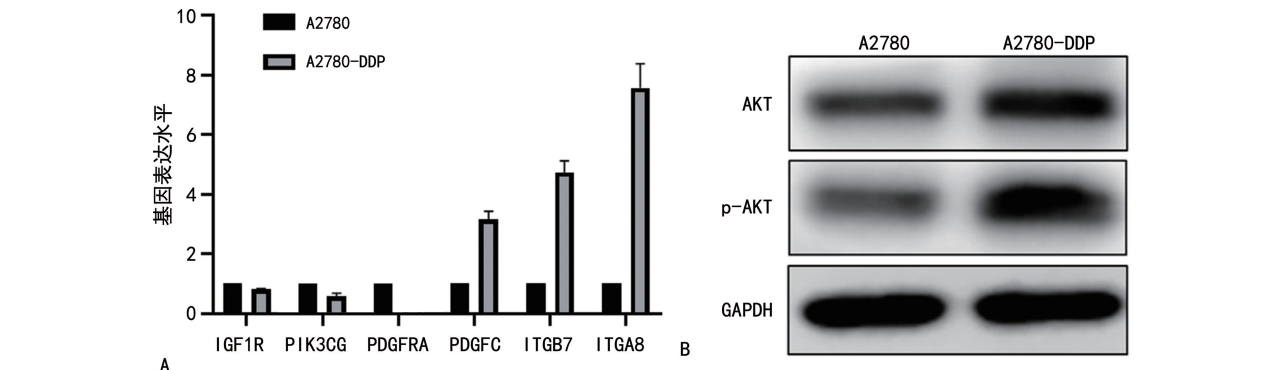
A:Transwell 实验检测细胞侵袭能力,结晶紫染色观察;B:划痕实验检测细胞迁移能力,100×;^a:*P*<0.05。

图 2 细胞划痕和 Transwell 实验结果

2.4 TPL 等小分子药物可以有效拮抗 DDP 耐药

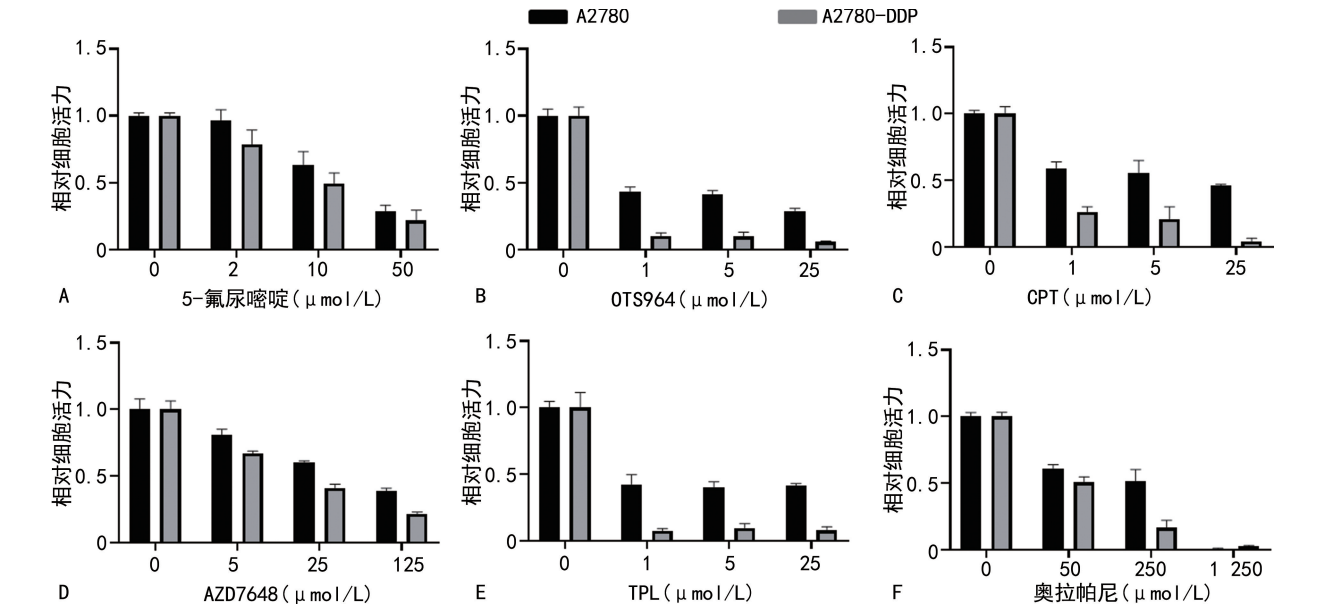
为找寻潜在 DDP 拮抗剂,通过文献查阅及 CCK-8 验证,发现 TPL、奥拉帕尼等抑制剂对 A2780-DDP

具有较好的抑制效果,其中 TPL 的拮抗效果尤为明显,A2780-DDP 的 IC₅₀ 约为 0.17 μmol/L,与 A2780 差异明显,具有继续研究的价值,见图 4。



A:qPCR 检测相关基因的表达水平;B:Western blot 检测 Akt 和 p-Akt 蛋白的表达。

图 3 qPCR 和 Western blot 验证转录组学结果



A:5-氟尿嘧啶对细胞活力的影响;B:OTS964 对细胞活力的影响;C:CPT 对细胞活力的影响;D:AZD7648 对细胞活力的影响;E:TPL 对细胞活力的影响;F:奥拉帕尼对细胞活力的影响。

图 4 CCK-8 方法筛选 DDP 耐药潜在抑制剂

3 讨 论

DDP 耐药是卵巢癌化学治疗中的常见阻碍之一，严重影响患者的治疗效果。因此，深入讨论卵巢癌 DDP 耐药的产生机制和关键因素，具有重要意义和价值。本研究基于转录组学方法，首次发现 ITGB7/Akt 通路在 DDP 耐药中存在高表达、高活性，并筛选出 TPL 等潜在的 DDP 耐药拮抗剂。

ITGB7/Akt 在肿瘤的发生、发展等多个过程中发挥调控作用。ITGB7 是整合素超家族的成员，主要与细胞黏附功能相关。整合素家族是 ECM 分子(如胶原蛋白 IV)中的主要细胞表面受体。细胞膜上的整合素受体与 ECM 相互作用，传递信号以控制细胞生长、代谢、迁移、增殖、分化和其他行为和功能^[10]。据报道，整合素的失调与癌症的发生和进展密切相关，可以用作癌症治疗的靶点^[11-12]。整合素亚基基因(ITG)包含一系列 α(ITGA1、ITGA10、ITGA11、ITGA2、ITGA2B、ITGA3、ITGA4、ITGA5、ITGA6、ITGA7、ITGA8、ITGA9、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAV 和 ITGAX)和 β(ITGB1、ITGB1BP1、ITGB1BP2、ITGB2、ITGB3、ITGB3BP、ITGB4、ITGB5、ITGB6、ITGB7、ITGB8 和 ITGBL1)基因。有研究表明，一些 ITG 基因与表观遗传变化相关，并在肿瘤进展和肿瘤治疗中发挥重要作用^[16-19]。ITGB7 在各种癌症中广泛表达，如胃癌和结肠癌，且可以通过维持抗肿瘤免疫来抑制结直肠癌发病^[20]。

Akt 是细胞中一个经典的信号通路，在细胞生存当中发挥着重要作用，在原发性乳腺癌中发现 Akt 信号通路被激活^[21-23]。已经发现抑制 Akt 可能导致卵巢癌细胞生长停滞，这表明 Akt 在卵巢肿瘤的发展中发挥了作用^[23-24]。本研究的 Western blot 结果证实，ITGB7 的蛋白水平和 p-Akt 水平在 DDP 耐药细胞中

明显提高，这表明 ITGB7 和 Akt 可能是 DDP 耐药发生的关键因素和可能的检测标志物，更为后续基于 ITGB7/Akt 通路的 DDP 耐药拮抗剂的开发和临床研究提供了重要数据支持。

针对 DDP 耐药，目前临床多应用 DDP 联合药物治疗成功地降低了药物毒性和肿瘤的耐药性。临床研究表明，在 DDP 治疗各种肿瘤的基础上加入 5-氟尿嘧啶、紫杉醇、吉西他滨、阿霉素等都可获得良好的疗效或减少不良反应^[25]，需要更多的研究来提高抗癌活性，降低毒性和交叉耐药性或改善药理特性。为此，本研究基于 CCK-8 检测，筛选发现 TPL、奥拉帕尼等对 DDP 耐药具有较好的抑制效果，但其拮抗机制仍有待进一步分析。

综上所述，本研究通过构建 DDP 耐药卵巢癌细胞株探讨了耐药后细胞转录组学的差异，并进行小分子药物筛选，为寻找 DDP 耐药的发生机制及治疗耐药的新方法。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] MAFRA D C A, HERNANDES I C P, WEIDERPASS E, et al. Cancer statistics over time in Northwestern São Paulo State, Brazil: incidence and mortality[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2022, 31(4): 707-714.

[3] PENNY S M. Ovarian cancer: an overview[J].

- Radiol Technol, 2020, 91(6):561-575.
- [4] CHARDIN L, LEARY A. Immunotherapy in ovarian cancer: thinking beyond PD-1/PD-L1 [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:795547.
 - [5] GORSHKOV K, SIMA N, SUN W, et al. Quantitative chemotherapeutic profiling of gynecologic cancer cell lines using approved drugs and bioactive compounds [J]. *Transl Oncol*, 2019, 12(3):441-452.
 - [6] ZHANG J, LI Y, LIU H, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screen identifies PCMT1 as a critical driver of ovarian cancer metastasis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1):24.
 - [7] VALLET N, BOISSEL N, ELEFANT E, et al. Can some anticancer treatments preserve the ovarian reserve? [J]. *Oncologist*, 2021, 26(6):492-503.
 - [8] REVYTHIS A, LIMBU A, MIKROPOULOS C, et al. Recent insights into PARP and immuncheckpoint inhibitors in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(14):8577.
 - [9] RAY R, HIND A K, HADDAD B, et al. Regulation of cisplatin resistance in lung cancer cells by nicotine, BDNF, and a β -adrenergic receptor blocker [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21):12829.
 - [10] TANG Z, HE J, ZOU J, et al. Cisplatin-resistant HepG2 cell-derived exosomes transfer cisplatin resistance to cisplatin-sensitive cells in HCC [J]. *Peer J*, 2021, 9:e11200.
 - [11] YAJIMA S, SUZUKI T, NANAMI T, et al. Randomized phase II study to comparing docetaxel/nedaplatin versus docetaxel for 5-fluorouracil/cisplatin resistant esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 27(4):219-224.
 - [12] XIONG J, YAN L, ZOU C, et al. Integrins regulate stemness in solid tumor: an emerging therapeutic target [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1):177.
 - [13] COX T R. The matrix in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(4):217-238.
 - [14] KOSHIZUKA K, HANAZAWA T, KIKKAWA N, et al. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(8):1681-1692.
 - [15] MOHANTY A, NAM A, POZHITKOV A, et al. A non-genetic mechanism involving the Integrin $\beta 4$ /Paxillin axis contributes to chemoresistance in lung cancer [J]. *iScience*, 2020, 23(9):101496.
 - [16] FENG C, JIN X, HAN Y, et al. Expression and prognostic analyses of ITGA3, ITGA5, and ITGA6 in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26:e926800.
 - [17] ZHU T, CHEN R, WANG J, et al. The prognostic value of ITGA and ITGB superfamily members in patients with high grade serous ovarian cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:257.
 - [18] ZHANG Y, XIE R, ZHANG H, et al. Integrin $\beta 7$ inhibits colorectal cancer pathogenesis via maintaining antitumor immunity [J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(8):967-980.
 - [19] YU L, WEI J, LIU P. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85:69-94.
 - [20] KIM J, HONG S H, JEON S H, et al. The novel benzothiazole derivative PB11 induces apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway in human cancer cell lines [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5):2718.
 - [21] WANG M, ZHANG W, LIU Y, et al. PDIA4 promotes glioblastoma progression via the PI3K/Akt/m-TOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 597:83-90.
 - [22] HUSSAIN A R, AL-ROMAIZAN M, AHMED M, et al. Dual targeting of mTOR activity with Torin2 potentiates anticancer effects of cisplatin in epithelial ovarian cancer [J]. *Mol Med*, 2015, 21(1):466-478.
 - [23] GANDIN V, HOESCHELE J D, MARGIOTTA N. Special issue "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action 3. 0" [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9):7917.
 - [24] ZHANG C, XU C, GAO X, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies [J]. *Theranostics*, 2022, 12(5):2115-2132.
 - [25] KRYCZKA J, KRYCZKA J, CZARNECKA-HREBELSKA K H, et al. Molecular mechanisms of chemoresistance induced by cisplatin in NSCLC cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16):8885.