

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.009

· 基础研究 ·

## 下调 miR-221 表达抑制宫颈癌细胞恶性生物学行为及其作用机制

潘雨露<sup>1</sup>, 石翠格<sup>2</sup>, 吴淑霞<sup>1</sup>, 任兴业<sup>1</sup> (1. 济南市第五人民医院 妇产科, 山东 济南 250022; 2. 中国计划生育研究所 细胞生物实验室, 北京 100081)

**[摘要]** **目的:** 探讨下调 miR-221 表达对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响及其作用机制。**方法:** 运用脂质体 2000 转染法将 miR-221 抑制剂和阴性对照核苷酸片段 (NC) 转染宫颈癌细胞 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞, 用 Western blotting 和 Real-time PCR 分别检测 ARID1A (miR-221 靶蛋白)、cleaved caspase 3、caspase 3、cleaved PARP、PARP、MMP-9、MMP-13、TIMP-3 蛋白表达水平和 miR-221、MMP-9、MMP-13、TIMP-3 mRNA 的表达水平; 用 MTT 法、克隆形成实验、AnnexinV-FITC/PI 染色结合流式细胞术分别测定细胞增殖、克隆形成率和细胞凋亡率。**结果:** 与阴性对照组比较, (1) miR-221 抑制剂转染的 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞 miR-221 表达量均显著降低 [ (0.23 ± 0.01)、(0.31 ± 0.02)、(0.34 ± 0.01)、(0.37 ± 0.02) ],  $F = 25.44, P < 0.05$ ; (2) 转染的细胞随着培养时间的增加细胞存活率逐渐下降, 具有时间依赖效应, 48 h 之后细胞存活率显著低于阴性对照组 ( $F = 37.42, P < 0.05$ ); 细胞的克隆形成率显著降低 ( $F = 43.58, P < 0.05$ ); 培养 72 h 时细胞凋亡率分别为: HeLa (27.92 ± 3.47)%、C33A (20.84 ± 4.31)%、SiHa (18.81 ± 2.18)%、Caski (19.86 ± 3.82)% , 均显著高于对照组 ( $F = 54.78, P < 0.05$ ); (3) 转染细胞下调 miR-221 表达后促进 cleaved caspase 3、cleaved PARP、TIMP-3 蛋白表达, 抑制 MMP-13 蛋白表达; 降低 MMP-13 mRNA 表达 ( $t = 37.50, P < 0.05$ ), 增加 TIMP-3 mRNA 表达 ( $t = 46.30, P < 0.05$ )。**结论:** 下调 miR-221 表达能抑制宫颈癌细胞的恶性生物学行为, 其机制与激活 caspase 信号通路从而诱导细胞凋亡以及调控 MMP-13 和 TIMP-3 的表达有关。

**[关键词]** 宫颈癌; miR-221 抑制剂; 细胞凋亡; 恶性生物学行为; 作用机制

**[中图分类号]** R739.5; R730.51; R967

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)05-0640-06

## Inhibition of down-regulating miR-221 expression to malignant biologic behaviors of cervical cancer cells and mechanism of the action

PAN Yulu<sup>1</sup>, SHI Cuige<sup>2</sup>, WU Shuxia<sup>1</sup>, REN Xingye<sup>1</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, The 5th People's Hospital of Jinan, Jinan 250022, Shandong, China; 2. Laboratory of Cell Biology, Institute of Family Planning of China, Beijing 100081, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore effect of down-regulating miR-221 expression on malignant biologic behaviors of cervical cancer cells and its mechanism. **Methods:** Liposome 2000 transfection method was used to transfect miR-221 inhibitor and negative control nucleotide fragment (NC) into cervical cancer HeLa, C33A, SiHa and Caski line cells. Protein expression levels of ARID1A (target protein of miR-221), cleaved caspase 3, caspase 3, cleaved PARP, PARP, MMP-9, MMP-13 and TIMP-3, as well as expression levels of miR-221, MMP-9, MMP-13, TIMP-3 mRNAs were respectively detected by Western blotting and Real-time PCR assays. Proliferation of the cells, clone formation rate and apoptosis rate of the cells were separately determined by MTT assay, clone formation experiment and flow cytometry assay plus AnnexinV-FITC/PI staining. **Results:** Comparing with the control group, (1) expression amounts of miR-221 in HeLa, C33A, SiHa and Caski cells which transfected with miR-221 inhibitor were significantly decreased [ (0.23 ± 0.01), (0.34 ± 0.02), (0.34 ± 0.01) and (0.37 ± 0.02) ],  $F = 25.44, P < 0.05$ ; (2) survival rates of the transfected cells gradually decreased with increase of culture time, and had a time dependent effect, survival rates of the cells were significantly low-

**[基金项目]** 山东省医药卫生资助项目 (No. 2013WS0010)。Project supported by the Medicine and Hygiene of Shandong Province (No. 2013WS0010)

**[作者简介]** 潘雨露 (1967 -), 山东济南人, 副主任医师, 从事妇科多囊卵巢综合征分子靶向治疗, E-mail: pylpyl0812@163.com

**[通信作者]** 任兴业 (REN Xingye, corresponding author), E-mail: wuyuanrenxingye@163.com

er than that of the negative control group after culture for 48 h ( $F = 37.42, P < 0.05$ ); clone formation rates of the cells obviously reduced ( $F = 43.58, P < 0.05$ ); as culture for 72 h, apoptosis rates of the cells were ( $27.92 \pm 3.47$ )% for HeLa, ( $20.84 \pm 4.31$ )% for C33A, ( $18.81 \pm 2.18$ )% for SiHa and ( $19.86 \pm 3.82$ )% for Caski, obviously higher than that of the control group ( $F = 54.78, P < 0.05$ ); (3) after expression of miR-221 in the transfected cells was down-regulated, expressions of cleaved caspase 3, cleaved PARP and TIMP-3 proteins were promoted, expression of MMP-13 protein was inhibited, expression of *MMP-13* mRNA was depressed ( $t = 37.5, P < 0.05$ ), and expression of *TIMP-3* mRNA was increased ( $t = 46.3, P < 0.05$ ). **Conclusion:** Down-regulation of miR-221 could inhibit malignant biologic behaviors of cervical cancer cells, its mechanism might be associated with activation of caspase signaling pathway which could induce apoptosis of the cancer cells and related with regulating and controlling expressions of MMP-13 and TIMP-3 proteins.

[ **Key words** ] cervical cancer; miR-221 inhibitor; cell apoptosis; malignant biologic behavior; action mechanism

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 640-645. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.009 ]

子宫颈癌是造成妇女死亡的主要恶性肿瘤之一,全球每年有近 50 万新增子宫颈癌病例,85% 患者发生在发展中国家<sup>[1-2]</sup>。目前,我国子宫颈癌患者趋于年轻化<sup>[3]</sup>。该病的主要治疗方法是手术、放疗和化疗,但转移、易复发的子宫颈癌却很难治愈。此外,对于未婚未育患者以及不能耐受手术、放化疗者,迫切需要一种温和有效的治疗方法。因此,寻找和研发特异性治疗子宫颈癌的靶向药物已成为亟待解决的问题。miRNAs 的发现给予宫颈癌患者带来了希望。研究<sup>[4-6]</sup>表明,miRNAs 异常表达与大多数肿瘤的发生发展密切相关。miR-221 在黑色素瘤<sup>[7]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>、前列腺癌<sup>[9]</sup>等多种肿瘤中高表达,提示 miR-221 是一种肿瘤相关因子。上调 miR-221 会干扰生长因子信号途径,促进细胞增殖<sup>[10]</sup>。miR-221 能在体内外减弱抑癌基因 *p27Kip1* 的表达,激活 Akt 通路,从而促进胶质瘤细胞增殖和恶性表型<sup>[11]</sup>。鉴于目前有关 miRNA 在子宫颈癌中的表达的报道仅限于癌与正常组织之间的差异比较,未见 miR-221 表达变化对子宫颈癌细胞恶性生物学行为的研究。本课题以子宫颈癌细胞系为研究对象,体外研究 miR-221 表达对子宫颈癌细胞恶性表型的影响及其作用机制,旨在为以 miR-221 为靶点研发治疗子宫颈癌的分子靶向药物提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

子宫颈癌 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞株购自 ATCC。高糖型 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、双抗购自北京金博益生物技术有限公司,miR-221 抑制剂、阴性对照核苷酸片段(NC)购自 Sigma-Aldrich 公司,AnnexinV-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公

司, MicroRNA 提取试剂盒、Taqman miRNA 试剂盒购自 Applied Biosystems 公司, Real-time PCR 试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™ II)购于 Takara 公司,脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司, miR-221 靶蛋白(ARID1A)抗体购自 BD 公司,cleaved caspase 3、caspase 3、cleaved PARP 和 PARP 抗体购自 Cell Signaling Technology, MMP-9、MMP-13、TIMP-3 抗体购自 Abcam 公司,β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。

### 1.2 子宫颈癌细胞的培养

HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% FBS、1% 青霉素、1% 链霉素)中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中培养至细胞汇合度达到 90% 时,进行细胞传代。

### 1.3 miR-221 抑制剂细胞的转染

将生长良好的 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞消化计数后,以细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/孔接种到 6 孔板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中,待细胞汇合度达到 80% 时按照脂质体 2000 说明书进行 miR-221 抑制剂细胞转染。转染的细胞培养 4 h 后换完全培养基;以转染阴性对照核苷酸片段为阴性对照(NC),置于培养箱中培养。

### 1.4 TaqMan Real-time PCR 检测转染子宫颈癌细胞 miR-221 表达

转染细胞培养 48 h 时经胰酶消化、离心收集细胞,按照 Mir Vana miRNA 分离试剂盒提取细胞中 miRNA;运用 TaqMan miRNA 检测试剂盒检测 miR-221 的表达,采用 SYBR® Green II 荧光染料法和 IQ5™ Real-time PCR Detection System(Bio-Rad)进行数据分析,结果经 U6RNA 内参校正,miR-221 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示,进行 3 次独立重复实验。

### 1.5 MTT 法检测转染子宫颈癌细胞的增殖率

转染的细胞经消化计数后,以  $2.5 \times 10^4$  个/孔

接种于 96 孔板中,分别培养 24、48、72、96 h 时进行 MTT 实验,同时设空白对照组。每孔加入 20 μl 5 mg/ml MTT,37 °C 继续培养 4 h,去除培养液,每孔加入 150 μl DMSO,置于摇床上室温震荡 5 min,用酶标仪测定 492 nm 处的 D 值,按下式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(对照组 D 值 - 实验组 D 值)/实验组 D 值 × 100%。

1.6 克隆形成实验检测转染宫颈癌细胞的克隆率

转染细胞经胰酶消化计数后,以 500 个/皿接种于 90 mm 细胞培养皿中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中,每个剂量设 3 个平行皿,培养直到通过肉眼能清晰观察到可见的细胞克隆(约 12 d);将培养基倒掉,PBS 洗涤,甲醇固定 10 min,PBS 洗涤,吉姆萨染色 10 min,自来水清洗,晾干后计数。按下式计算细胞克隆形成率:克隆形成率(%)=细胞克隆数平均值/铺板细胞总数 × 100%。

1.7 流式细胞术检测转染宫颈癌细胞的凋亡率

转染的细胞消化计数后接种到 6 孔板中(4.5 × 10<sup>5</sup> 个/孔),培养 72 h 后弃掉培养基,PBS 洗涤,用无 EDTA 的胰酶消化收集细胞,加入 PBS 制成细胞悬液。按照 Annexin-V 试剂盒说明书操作,先加入 500 μl 的结合缓冲液重悬细胞,再加入 5 μl FITC 标记的 Annexin-V 和 5 μl PI 混匀,室温下避光孵育 15 min,流式细胞术检测细胞凋亡。

1.8 Western blotting 法检测转染宫颈癌细胞的凋亡相关蛋白和 mRNA 表达

转染的细胞经消化、离心收集细胞,用 RIPA(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,150 mmol/L NaCl,1% NP-40,0.5% 脱氧胆酸钠,0.1% SDS)重悬细胞,超声破碎,13 400 × g 4 °C 离心 10 min,按照 BCA 试剂盒说明书测定总蛋白浓度。每个样本取 30 μg 进行 SDS-PAGE,将蛋白转移到 PVDF 膜上,10% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别孵育一抗(ARID1A、cleaved caspase 3、caspase 3、cleaved PARP、PARP、MMP-9、MMP-13、TIMP-3),β-actin 为内参,4 °C 过夜。TBST 洗膜、孵育二抗,室温 1 h。ECL 显影后扫描,蛋白相对表达量经内参校正后由 Quantity-One 软件分析。

1.9 统计学处理

每个实验进行 3 次独立重复试验。应用 SPSS17.0 统计软件进行相关数据分析,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间的比较采用 t 检验,多组间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-221 抑制剂转染宫颈癌细胞 miR-221 低表达

TaqMan Real-time PCR 结果显示,转染 miR-221 抑制剂后 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞中 miR-221 表达量分别为(0.23 ± 0.01)、(0.31 ± 0.02)、(0.34 ± 0.01)、(0.37 ± 0.02),显著低于阴性对照组(F = 25.44,均 P < 0.05)。Western blotting 检验结果(图 1)进一步显示,转染 miR-221 抑制剂后宫颈癌细胞中 miR-221 的靶蛋白 ARID1A 蛋白表达量低于阴性对照组。表明 miR-221 抑制剂能抑制 miR-221 和 ARID1A 蛋白的表达。

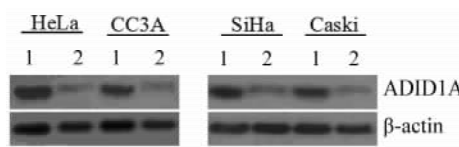


图 1 宫颈癌细胞中 miR-221 靶蛋白的表达  
Fig. 1 Expression of miR-221 mRNA and target proteins in cervical cancer cells  
1:NC; 2: miR-221 inhibitor

2.2 下调 miR-221 表达抑制宫颈癌细胞的增殖

MTT 结果显示,转染 miR-221 抑制剂的 HeLa、CC3A、SiHa 和 Caski 细胞随着培养时间的增加细胞存活率逐渐降低,并呈时间依赖效应;除 HeLa 细胞 24 h 的细胞存活率外,其他 miR-221 转染宫颈癌细胞存活率均被显著抑制(P < 0.05)(图 2)。结果表明,下调 miR-221 表达抑制宫颈癌细胞增殖。

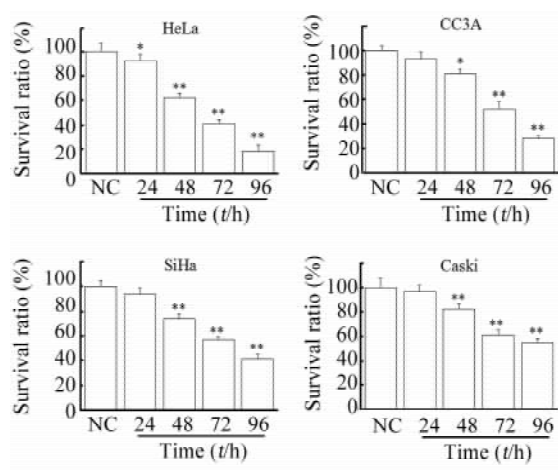


图 2 转染 miR-221 抑制剂对宫颈癌细胞增殖的影响  
Fig. 2 Effect of transfected miR-221 inhibitor on growth of cervical cancer cells  
\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs NC group

### 2.3 下调 miR-221 表达抑制子宫颈癌细胞的克隆形成能力

克隆形成实验结果(图 3)显示,转染 miR-221 抑制剂的 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞克隆形成率显著低于阴性对照组[ HeLa:( $57.4 \pm 11.3$ )% vs ( $100.0 \pm 5.5$ )%; C33A:( $68.2 \pm 2.4$ )% vs ( $100.0 \pm 4.6$ )%, SiHa:( $73.3 \pm 4.5$ )% vs ( $100.0 \pm 3.8$ )%; Caski:( $58.5 \pm 3.0$ )% vs ( $100.0 \pm 4.4$ )%,  $F = 43.58, P < 0.05$  ]。结果表明,下调 miR-221 表达抑制子宫颈癌细胞的克隆形成能力。

### 2.4 下调 miR-221 表达诱导子宫颈癌细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 4)显示,转染 miR-221 抑制剂的 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞培养 72 h 时,细胞凋亡率高于阴性对照组[( $27.92 \pm 3.47$ )% vs ( $3.05 \pm 0.45$ )%, ( $20.84 \pm 4.31$ )% vs ( $3.29 \pm 0.46$ )%, ( $18.81 \pm 2.18$ )% vs ( $3.90 \pm$

$0.27$ )%、( $19.86 \pm 3.82$ )% vs ( $3.52 \pm 0.41$ )%,  $F = 54.78, P < 0.05$  ]。结果表明,下调 miR-221 表达诱导子宫颈癌细胞凋亡。

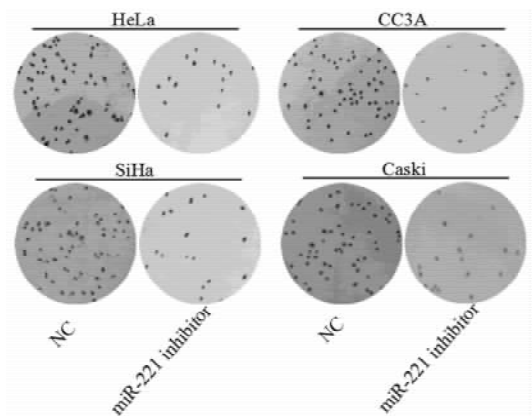


图 3 miR-221 低表达对子宫颈癌细胞克隆形成能力的影响  
Fig. 3 Effect of down-regulated miR-221 expression on colony formation abilities of cervical cancer cells

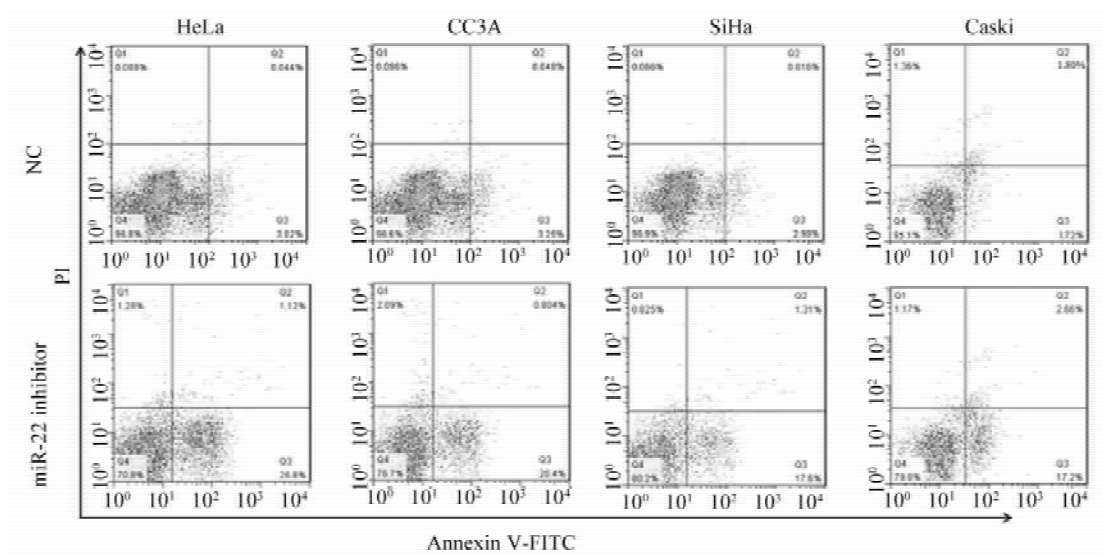


图 4 下调 miR-221 表达对子宫颈癌细胞凋亡的影响  
Fig. 4 Effect of downregulated miR-221 on apoptosis of cervical cancer cells

### 2.5 下调 miR-221 表达激活细胞凋亡信号通路

Western blotting 结果(图 5)发现,与阴性对照组比较,miR-221 抑制剂转染的 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞培养 72 h 时,其 cleaved caspase 3 和 cleaved PARP 蛋白水平增加,表明 miR-221 表达下调激活 caspase 3 通路。

### 2.6 下调 miR-221 表达调控转移相关基因的表达

Western blotting 检测结果(图 6A)发现,转染 miR-221 抑制剂的 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞中 MMP-13 蛋白表达量降低,而 TIMP-3 蛋白表达量

升高;相同条件下 MMP-9 蛋白表达量无显著变化。

Real-time PCR 结果(图 6B)进一步证实,miR-221 抑制剂介导 miR-221 表达下调后,HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞中 MMP-13 mRNA 水平显著降低[( $0.52 \pm 0.02$ ) vs ( $1 \pm 0.06$ ),  $t = 37.50, P < 0.05$ ],TIMP-3 mRNA 水平显著增加[( $1.52 \pm 0.11$ ) vs ( $1 \pm 0.05$ ),  $t = 46.30, P < 0.05$  ]。结果提示,下调 miR-221 的表达通过调控靶基因的表达从而抑制子宫颈癌细胞的表型。

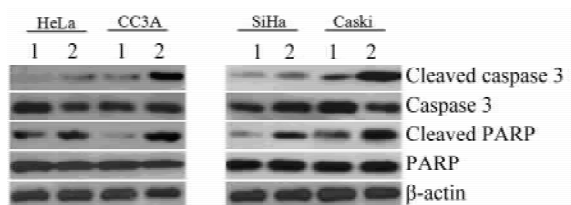


图 5 下调 miR-221 表达对细胞凋亡相关蛋白表达的影响  
Fig. 5 Effect of downregulated miR-221 expression on expression of apoptosis-associated proteins in cervical cancer cells

1: NC; 2: miR-221 inhibitor

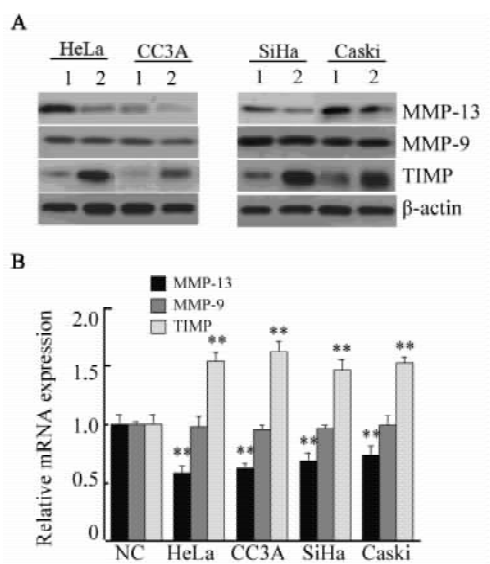


图 6 下调 miR-221 表达对靶基因和靶蛋白表达的影响  
Fig. 6 Effect of downregulated miR-221 on expression of target genes and proteins in cervical cancer cells

A: Western blotting assay, 1: NC; 2: miR-221 inhibitor;

B: Real-time PCR

\*\*  $P < 0.01$  vs NC group

### 3 讨论

研究<sup>[12-15]</sup>发现, miRNAs 在癌细胞增殖、转移、侵袭、细胞凋亡、周期调控、血管生成和癌细胞耐药性方面发挥重要作用。miR-221 属于 miR-221/222 基因家族, 研究<sup>[16]</sup>发现 miR-221 在前列腺癌和甲状腺乳头状癌中表达明显增高, 是一个促癌因子; 敲低 miR-221 可以抑制胶质瘤的发生发展<sup>[17]</sup>。大量研究<sup>[18-20]</sup>发现, miR-221/222 过表达促进白血病、乳腺癌和膀胱癌的发生。上述研究提示, miR-221 作为一种肿瘤促进因子与多种肿瘤的发生发展、癌细胞增殖和耐药密切相关, 但在宫颈癌中的研究甚少。本研究结果发现, 下调 miR-221 的表达显著抑制子

宫颈癌细胞系 HeLa、C33A、SiHa 和 Caski 细胞的增殖和克隆形成, 结果证明 miR-221 是一个肿瘤促进因子, 与文献<sup>[16-18]</sup>报道一致。流式细胞术结果显示, 下调 miR-221 表达显著诱导子宫颈癌细胞凋亡。研究<sup>[21]</sup>发现, miR-221 过表达能靶向抑制胶质瘤细胞促凋亡基因 *PUMA* 的表达。在非小细胞肺癌的研究发现, 下调 miR-221/222 的表达通过促进 *PTEEN* 和 *TIMP-3* 的表达激活 TNF 相关的细胞凋亡通路<sup>[22]</sup>。本研究发现, 下调 miR-221 的表达能促进 cleaved caspase 3 和 cleaved PARP 蛋白表达, 表明 caspase 通路被激活, 结果提示抑制 miR-221 表达可激活细胞凋亡通路进而诱导细胞凋亡。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 活性在肿瘤细胞转移过程中发挥关键作用<sup>[23]</sup>。MMP 基因家族成员的表达与恶性肿瘤的高转移活性密切相关<sup>[24]</sup>。研究<sup>[19, 25]</sup>发现, *MMP-13* 在头颈部肿瘤、膀胱癌、软组织瘤组织或细胞中过表达。体内存在天然的组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs) 能抑制相应的 MMPs 表达<sup>[26]</sup>。乳腺癌和非小细胞肺癌中的研究<sup>[22, 27]</sup>证实, *TIMP-3* 是 miR-221/222 基因家族的靶基因, 下调 miR-221/222 的表达可通过上调 *TIMP-3* 的表达增强 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞对他莫西芬的敏感性<sup>[28]</sup>。本研究发现, 下调 miR-221 的表达能抑制 *MMP-13* 的表达, 而 *MMP-9* 的表达水平无明显变化; 相同条件下, *TIMP-3* 的表达显著增加, 提示 miR-221 通过调控 *MMP-13* 和 *TIMP-3* 的表达影响子宫颈癌细胞的恶性生物学行为, 与文献<sup>[28]</sup>报道相符。本研究结果表明, miR-221 作为一个肿瘤促进因子在子宫颈癌细胞恶性生物学行为发生中发挥重要作用, 其机制至少部分与细胞凋亡通路、MMPs 基因表达调控相关, 但其详细的分子机制有待深入研究。

### [参考文献]

[1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.

[2] FERLY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2011, 127(12):2893-2917. DOI:10.1002/ijc.25516.

[3] SUPRASERT P, CHAROENKWAN K, SIRIAREE S, et al. Outcome of cervical cancer patients with single-node compared with no nodal involvement treated with radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2013, 121(1):45-48. DOI:10.1016/j.ijgo.2012.11.010.

[4] ROGERS L, SIU S S, LUESLER D, et al. Radiotherapy and che-

- moradiation after surgery for early cervical cancer [ J ]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 2012( 5 ):CD007583. DOI:10.1002/14651858.
- [ 5 ] LI Z, LEI H, LUO M, et al. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer [ J ]. *Gastric Cancer*, 2015, 18( 1 ): 43-54. DOI:10.1007/s10120-014-0340-8.
- [ 6 ] KAJIHARA I, JINNIN M, HARADA M, et al. miR-205 down-regulation promotes proliferation of dermatofibrosarcoma protuberans tumor cells by regulating LRP-1 and ERK phosphorylation [ J ]. *Arch Dermatol Res*, 2014, 306( 4 ):367-374. DOI:10.1007/s00403-014-1452-z.
- [ 7 ] JIANG K, REN C, NAIR V D. MicroRNA-137 represses Klf4 and Tbx3 during differentiation of mouse embryonic stem cells [ J ]. *Stem Cell Res*, 2013, 11( 3 ):1299-1313. DOI:10.1016/j.scr.2013.09.001.
- [ 8 ] FELICETTI F, ERRICO M C, SEGNALE P, et al. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression [ J ]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8( 11 ): 1759-1765. DOI:10.1586/14737140.8.11.1759.
- [ 9 ] LGVA G D, GASPARINI P, PIOVAN C, et al. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer [ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102( 10 ):706-721. DOI:10.1093/jnci/djq102.
- [ 10 ] SPAHN M, KNEITZ S, SCHOLZ C J, et al. Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence [ J ]. *Int J Cancer*, 2010, 127( 2 ): 394-403. DOI: 10.1002/ijc.24715.
- [ 11 ] ZHANG C, KANG C S, YOU Y, et al. Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo [ J ]. *Int J Oncol*, 2009, 34( 6 ): 1653-1660. DOI:10.3892/ijo.00000296.
- [ 12 ] ZHANG J, HAN L, GE Y, et al. MiR-221/222 promote malignant progression of glioma through activation of the Akt pathway [ J ]. *Int J Oncol*, 2010, 36( 4 ): 913-920. DOI: 10.3892/ijo\_00000570.
- [ 13 ] 周晖, 卢淮武, 彭永排, 等. 《2015 年 NCCN 子宫颈癌临床实践指南》解读 [ J ]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2015, 31( 3 ): 185-191. DOI:10.7504/fk201502101.
- [ 14 ] LIZ J, ESTELLER M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859( 1 ):169-176. DOI:10.1016/j.bbagr.2015.06.015.
- [ 15 ] WANG W, ZHANG E, LIN C. MicroRNAs in tumor angiogenesis [ J ]. *Life Sci*, 2015, 136( 1 ):28-35. DOI:10.1016/j.lfs.2015.06.025.
- [ 16 ] TIAN K, DI R, WANG L. MicroRNA-23a enhances migration and invasion through PTEN in osteosarcoma [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22( 7 ):351-359. DOI:10.1038/cgt.2015.27.
- [ 17 ] 常征. MiR-221 在前列腺癌雄激素非依赖转变过程中作用的研究 [ D ]. 第二军医大学, 2010.
- [ 18 ] 王培松. MiR-221、222 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义 [ D ]. 吉林大学, 2011.
- [ 19 ] FELLI N, FONTANA N, PALOSI E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102( 50 ): 18081-18086. DOI: 10.1073/pnas.0506216102.
- [ 20 ] NASSIRPOUR R, MEHTA P P, BAXI S M, et al. miR-221 promotes tumorigenesis in human triple negative breast cancer cells [ J/OL ]. *PLoS One*, 2013, 8( 4 ): e62170 [ 2016-07-20 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634767/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0062170.
- [ 21 ] ZHAO Y, ZHAO L, ISCHENKO I, et al. Antisense inhibition of microRNA-21 and microRNA-221 in tumor-initiating stem-like cells modulates tumorigenesis, metastasis, and chemotherapy resistance in pancreatic cancer [ J ]. *Target Oncol*, 2015, 10( 4 ):535-548. DOI:10.1007/s11523-015-0360-2.
- [ 22 ] ZHANG C Z, ZHANG J X, ZHANG A L, et al. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma [ J ]. *Mol Cancer*, 2010, 9( 1 ): 229-238. DOI:10.1186/1476-4598-9-229.
- [ 23 ] GAROFALO M, DI LEVA G, ROMANO G, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation [ J ]. *Cancer Cell*, 2009, 16( 6 ): 498-509. DOI:10.1016/j.ccr.2009.10.014.
- [ 24 ] YO J, WANG Y, DONG R, et al. Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion [ J ]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138( 4 ): 671-674. DOI:10.1007/s00432-012-1147-9.
- [ 25 ] 曾婷, 郝丽, 谢逸欣, 等. MicroRNA-34a 与非小细胞肺癌的关系及其可能调节机制 [ J ]. *中国医药导报*, 2012, 9( 23 ):5-7. DOI:10.3969/j.issn.1673-7210.2012.23.002.
- [ 26 ] JIANG F, ZHAO W, ZHOU L, et al. Mir-222 targeted puma to improve sensitization of um1 cells to cisplatin [ J ]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15( 12 ):22128-221241. DOI:10.3390/ijms151222128.
- [ 27 ] APTE S S, MATTEI M G, OLSEN B R. Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 ( TIMP-3 ) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22 [ J ]. *Genomics*, 1994, 19( 1 ):86-90. DOI:10.1006/geno.1994.1016.
- [ 28 ] GAN R, YANG Y, YANG X, et al. Downregulation of miR-221/222 enhances sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen through upregulation of TIMP3 [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2014, 21( 7 ): 290-296. DOI:10.1038/cgt.2014.29.
- [ 收稿日期 ] 2016 - 04 - 26 [ 修回日期 ] 2016 - 08 - 20
- [ 本文编辑 ] 党瑞山