

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.12.009

· 基础研究 ·

## miR-3195 对人喉癌 Hep-2 细胞增殖的抑制作用及其机制

雷梓巍<sup>a</sup>, 陈艳华<sup>b</sup>, 樊超<sup>b</sup>, 王蕊<sup>a</sup>, 谢海龙<sup>a</sup> (南华大学 a. 肿瘤研究所; b. 附属第二医院 肿瘤内科, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-3195 对喉癌 Hep2 细胞增殖的影响及其分子机制。**方法:** 选取 2008 年 1 月至 2012 年 8 月期间在南华大学教学医院郴州市第一人民医院耳鼻喉科收治的 29 例喉癌患者的喉癌组织及其相应的癌旁组织标本, 采用 qPCR 检测 miR-3195 在喉癌和癌旁组织中的表达; 构建 miR-3195 在喉癌 Hep-2 细胞中稳定高表达的细胞株, 采用 MTT 法观察 miR-3195 稳定高表达组和对照组的增殖情况; 建立裸鼠移植瘤模型, 观察 miR-3195 稳定高表达的人喉癌细胞株 Hep-2 在裸鼠体内增殖的情况。利用生物信息学预测 miR-3195 的靶基因, 构建 TBX1 3'UTR 的荧光素酶载体, 双荧光素酶检测系统检测其荧光素酶活性; Western blotting 检测稳定高表达 miR-3195 组和对照组细胞株的 TBX1 蛋白表达水平。**结果:** miR-3195 在喉癌组织中的表达明显低于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ); miR-3195 上调可抑制 Hep-2 细胞的增殖 ( $P < 0.01$ ), 且可明显抑制裸鼠移植瘤体的生长 ( $P < 0.05$ ); 双荧光素酶报告基因检测结果表明 miR-3195 可能与 TBX1 靶向结合 ( $P < 0.05$ ), 同时 Western blotting 法验证了 miR-3195 能够抑制 TBX1 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。 **结论:** miR-3195 对 Hep2 细胞有明显的增殖抑制作用, 其分子机制可能与负性调控 TBX1 的表达有关。

**[关键词]** miR-3195; 喉癌; Hep-2 细胞; 增殖; 抑制; TBX1

[中图分类号] R739.65; R730.54 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2020)12-1372-06

## Inhibitory effect of miR-3195 on the proliferation of human laryngeal carcinoma Hep-2 cells and its mechanism

LEI Ziwei<sup>a</sup>, CHEN Yanhua<sup>b</sup>, FAN Chao<sup>b</sup>, WANG Rui<sup>a</sup>, XIE Hailong<sup>a</sup> (a. Institute of Oncology; b. Department of Medical Oncology, the Second Affiliated Hospital of the University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the effect of miR-3195 on the proliferation of laryngeal carcinoma Hep-2 cells and its molecular mechanism. **Methods:** From January 2008 to August 2012, the laryngeal cancer tissues and their corresponding paracancerous tissues from 29 patients with laryngeal cancer who were admitted to the Department of Otorhinolaryngology, Chenzhou First People's Hospital Affiliated to teaching hospital of University of South China were selected for this study. qPCR was used to detect the expression of miR-3195 in laryngeal carcinoma and the paracancerous tissues; Hep-2 cell line with stable and high expression of miR-3195 was constructed. The proliferation of miR-3195 over-expressed Hep-2 cells and the control cells was observed by MTT method. A nude mouse xenograft model was established to observe the proliferation of miR-3195 overexpressed Hep-2 cells in nude mice. Bioinformatics tools were used to predict the target gene of miR-3195; the luciferase vector of TBX1 3'UTR was constructed, and its luciferase activity was examined with dual luciferase detection system; Western blotting was used to detect the TBX1 protein expression in miR-3195 over-expressed cells and control cells. **Results:** The expression of miR-3195 in laryngeal carcinoma tissues was significantly lower than that in paracancerous tissues ( $P < 0.01$ ); miR-3195 up-regulation could inhibit the proliferation of Hep-2 cells ( $P < 0.01$ ) and significantly inhibit the growth of transplanted tumors in nude mice ( $P < 0.05$ ); The results of the Dual luciferase reporter gene assay indicated that miR-3195 might targetedly bind to TBX1 ( $P < 0.05$ ), and Western blotting proved that miR-3195 could inhibit the expression of TBX1 protein ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miR-3195 has a significant inhibitory effect on the proliferation of Hep-2 cells, and its molecular mechanism may be related to the negative regulation of TBX1 expression.

**[Key words]** MiR-3195; laryngeal cancer; Hep-2 cells; proliferation; inhibit; TBX1

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(12): 1372-1377. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.12.009]

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金资助项目(No.2018JJ23388); 湖南省科技厅临床医疗技术创新引导项目(No.2018SK51503)。Project supported by the National Natural Science Foundation of Hunan Province (No.2018JJ23388), and the Clinical Medical Technology Innovation Guidance Project of Hunan Provincial Science and Technology Department (No.2018SK51503)

**[作者简介]** 雷梓巍(1993-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤相关基因功能的基础与临床研究, E-mail: 364371277@qq.com

**[通信作者]** 谢海龙(XIE Hailong, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤相关基因功能的基础与临床研究, E-mail: xhl0078@sina.com.cn

喉癌是第二大常见的呼吸道恶性肿瘤,其中喉鳞状细胞癌占喉癌的85%~95%<sup>[1]</sup>。近20年来,尽管喉癌的治疗取得了很大进展,但大多数晚期喉癌患者并未取得理想的疗效<sup>[2]</sup>。因此,深入而详细地了解喉癌发生和发展的内在分子机制是迫切需要的。

MicroRNAs(miRNAs)是经典的内源性非编码RNA,通常通过与靶基因3'UTR的特异性结合,在转录后机制的不同生理和病理过程中发挥关键调节作用<sup>[3]</sup>。研究表明,miRNAs在肿瘤的发生和发展中起着至关重要的作用。miRNAs通过调节他们各自的靶基因来发挥癌基因或肿瘤抑制因子的作用,而这些靶基因在不同类型的癌症中通常是不受调控的<sup>[4-5]</sup>。有研究报道,miRNAs在喉癌中起到肿瘤抑制因子<sup>[6-10]</sup>或促癌因子<sup>[11-13]</sup>的作用。课题组前期采用Exqion LNATMmiRNA芯片检测4对喉癌及癌旁组织中miRNA的表达,发现2倍以上差异表达的miRNAs有miR-21-5p、miR-3651、miR-222-3p、miR-1246、miR-181d、miR-193b-3p等22个上调的miRNAs(Foldchange>2, P<0.05)和miR-99a-5p、miR-195-5p、miR-3195、miR-101-3p、miR-126-3p等20个下调的miRNAs(Foldchange<0.5, P<0.05)。在此基础上,课题组进一步用qPCR检测29对喉癌组织和相应的癌旁组织中5个miRNA的表达水平,发现其中miR-3195的表达显著降低,推测其可能与喉癌的发生发展有关。本研究旨在探讨miR-3195和喉癌的关系,寻找调控miR-3195的靶基因,探索miR-3195对靶基因的调控作用,为后续的喉癌基因治疗奠定实验基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

采集2008年1月至2012年8月期间在南华大学教学医院郴州市第一人民医院耳鼻喉科收治的29例喉癌患者手术切除癌组织及其相应离癌灶边缘5 cm以上的癌旁组织,其中男性18例、女性11例;年龄49~76岁,平均年龄(60±2)岁。所有患者手术前均未进行抗肿瘤治疗,并于术后经病理首次确诊为喉癌低分化鳞癌。根据UICC分级标准对患者进行TNM分期,其中I期3例,II期5例,III期10例,IV期11例。所有标本及临床资料的收集均经南华大学郴州市第一人民医院医学伦理委员会批准,征得患者或家属同意并签署知情同意书。

### 1.2 细胞株、动物和主要试剂

人喉癌鳞状细胞癌Hep2细胞由湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室的何春梅老师惠赠,人肾上皮HEK 293T细胞由上海市肿瘤研究所惠

赠。雄性、体质量(18~20)g、6周龄的SPF级BALB/c裸鼠18只(动物合格证号:BJVRL-MR-20160405)购自北京维通利华有限公司,饲养于南华大学实验动物中心SPF环境(动物中心饲养合格证书号:SYXK湘2015-0001)。

胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,RPMI 1640培养基购自美国HyClone公司,TRIzolol®Reagent试剂购自美国Invitrogen Life Technologies公司,SYBR Premix EX Taq™试剂盒及PrimeScript™RT Reagents Kit逆转录试剂盒均购自日本TaKaRa公司,双荧光素酶报告基因试剂盒购自美国Promega公司,BCA试剂盒购自美国Pierce公司,TBX1和β-actin抗体购自英国Abcam公司,qPCR引物(内参SnRNA U6及miR-3195)购自广州锐博生物技术有限公司。

### 1.3 细胞培养和慢病毒载体构建

将人喉癌鳞状细胞癌Hep-2细胞和人肾上皮HEK 293T细胞分别置于含有10%胎牛血清和1%双抗的培养基中,在37℃ 5%CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养。当细胞汇合至培养瓶的80%~90%时用5%的胰蛋白酶消化细胞进行传代,取对数生长期的细胞用于后续实验。

构建慢病毒包装载体pshRNA-miR3195,上游序列为5'-GATCCGCAGCCGCCGCGCCGGGCCCGGGTTGGCCGCTGACCCCGCGGGGCCCGCGCGGCCGGGGCGGGGCGGGGGCTGCCCGGTTTTTG-3',下游序列为5'-AATTCAAAAACCGGGCAGCCCCCGCCCCGCCCCGCGCCCGGGGGCCCCGCGGGGGTCAGCGCCAACCCGGGCCCGCGCGCGCGGCTGCG-3',加入BamH I/EcoR I酶切位点,克隆至pshRNA-miR慢病毒载体中测序,包装慢病毒,稳定转染Hep2细胞,筛选出过表达miR-3195的Hep-2人喉癌细胞株。将细胞分为3组:miR-3195过表达Hep-2组(miR-3195 up/Hep-2)、空载体Hep-2组(NC/Hep-2)和Hep-2组。以qPCR法检测转染效果。

### 1.4 qPCR法检测喉癌及癌旁组织和Hep-2细胞中miR-3195的表达

提取喉癌及癌旁组织和上述3组Hep-2细胞总RNA后,测定总RNA的浓度,用逆转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA,参照TaKaRa公司SYBR Premix EX Taq™试剂盒说明书配置反应体系。反应条件:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s。实验结果以2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算miR-3195的相对表达量。

### 1.5 建立裸鼠移植瘤模型

将18只裸鼠随机分为3组:miR-3195过表达

Hep-2组,空载体Hep-2组和Hep-2组,每组6只。选择对数生长期的miR-3195过表达Hep-2、空载体Hep-2和Hep-2细胞,调整细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个/ml。取0.2 ml的细胞悬液,接种于裸鼠左大腿背侧皮下。接种后观察裸鼠一般情况及成瘤情况,肉眼可见移植瘤出现后,每3 d用游标卡尺测量移植瘤的长(a)短(b)径并计算移植瘤的体积( $V$ )= $1/2ab^2$ 。当移植瘤体积达到 $100 \text{ mm}^3$ 左右时(接种后20 d左右),采用颈椎脱位法处死裸鼠,完全剥离肿瘤,用电子秤称量移植瘤的瘤体质量。各组取部分移植瘤组织用10%甲醛固定,其余部分在 $-80^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存。将固定好的3组肿瘤组织脱水、石蜡包埋、切片,H-E染色,然后在10倍的光镜下观察组织学变化。

#### 1.6 MTT法检测各组Hep2细胞的增殖能力

将miR-3195过表达Hep-2组、空载体Hep-2组和Hep-2组3组细胞以 $5 \times 10^3$ 个/孔接种到96孔板中,设5个平行孔,于 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 恒湿培养箱中培养。分别于接种后24、48、72、96、120 h每孔加入20  $\mu\text{l}$  MTT液(注意避光),继续孵育4 h后,弃掉孔内的混合液,每孔加入150  $\mu\text{l}$  DMSO,振荡10 min后上酶标仪检测490 nm波长处的光密度(D)值,并绘制细胞生长曲线。

#### 1.7 双荧光素酶报告质粒的构建及检测

利用miRNA靶基因预测软件miRanda、miRDB预测可能受miR-3195 3' UTR调控的特异性靶基因(网址为miRDB:<http://www.mirdb.org/>)。

双荧光素酶报告基因检测miR-3195与TXB1之间的靶向关系,通过PCR技术将软件预测的TXB1基因3' UTR序列中与miR-3195的结合位点前后所需的序列从Hep-2细胞中扩增出来,插入荧光素酶报告载体pcDNA3.1-Luci,获得重组载体pcDNA3.1-Luci/TXB1 3' UTR。上游引物:5'-CGGAATTCAGGTAAGTCTAGGTTTCAGAGCCCC-3',下游引物:5'-GCTCTAGATGACAGGGACCAGAGAATTTT-3',引入EcoR I、Xba I双酶切位点。将重组TXB1基因3' UTR荧光素酶报告基因质粒和miRNA mimics共转染293T细胞,按照双荧光素酶报告基因试剂盒操作方法测定荧光素酶活性。

#### 1.8 Western blotting法检测各组Hep-2细胞TBX1蛋白的表达

各组细胞用预冷的PBS缓冲液洗涤2次,然后加入预冷的蛋白裂解液提取蛋白。用BCA试剂盒测定上清液中蛋白质浓度。样品孔内分别加入20  $\mu\text{g}$  各组样品,用SDS-PAGE分离,转至PVDF膜,封闭液封闭15 min,相应一抗 $4^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗膜3次,相应二抗(鼠抗IgG)在室温下摇床孵育1.5 h,洗膜3次,显

影剂显影。

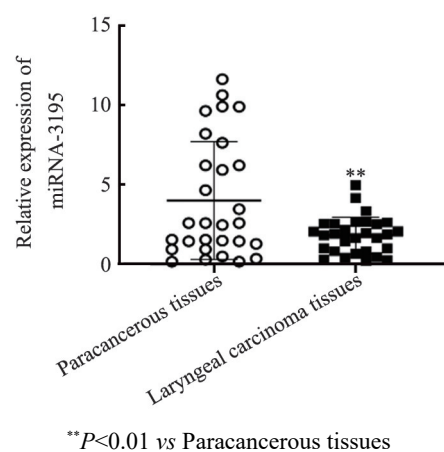
#### 1.9 统计学处理

上述相关实验均进行3次重复。采用SPSS 19.0统计学软件进行分析,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间比较采用t检验,多组间均数比较先行方差齐性检验后再行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-3195在喉癌组织中低表达

qPCR检测结果(图1)显示,29例患者喉癌组织中miR-3195的表达水平显著低于相应的癌旁组织[( $1.821 \pm 1.145$ ) vs ( $4.031 \pm 3.654$ )],  $P < 0.01$ 。



\*\* $P < 0.01$  vs Paracancerous tissues

图1 miR-3195在喉癌组织中低表达

Fig.1 miR-3195 was low expressed in laryngeal carcinoma tissues

### 2.2 pshRNA-miR3195/Hep-2转染后Hep-2细胞中的miR-3195表达显著升高

构建慢病毒包装载体pshRNA-miR3195,并稳定转染喉癌细胞系Hep-2后,用qPCR法检测miR-3195 up/Hep-2组、NC/Hep-2组和Hep-2组3组细胞中miR-3195的表达水平(图2),miR-3195 up/Hep-2组细胞中的miR-3195的表达明显升高( $P < 0.01$ )。

### 2.3 miR-3195稳定高表达后显著抑制喉癌Hep-2细胞的增殖

MTT法检测结果(图3)显示,miR-3195 up/Hep-2组、NC/Hep-2组和Hep-2组3组细胞培养5 d后,miR-3195 up/Hep-2组细胞在每个时间点的增殖均明显低于NC/Hep-2组和Hep-2组( $P < 0.01$ ),说明miR-3195的高表达可显著抑制喉癌Hep-2细胞的增殖。

### 2.4 过表达miR-3195显著抑制裸鼠移植瘤的生长

建立了裸鼠皮下移植瘤模型,成瘤率为100%。



测量结果显示, NC/Hep-2 组和 Hep-2 组肿瘤组织持续生长, 体积明显增大, 而 miR-3195 up/Hep-2 组肿瘤生长缓慢、肿瘤体积均明显小于 NC/Hep-2 组和 Hep-2 组: 第 21 天为 (12.713±6.203) vs (124.057±55.97)、(87.468±19.65) mm<sup>3</sup>, *P*<0.05; 第 24 天为 (37.268±15.94) vs (252.708±126)、(164.742±32.30) mm<sup>3</sup>, *P*<0.05; 第 27 天为 (84.858±30.81) vs (526.242±291.0)、(270.69±51.85) mm<sup>3</sup>, *P*<0.05。详见移植瘤生长曲线(图 4A)。

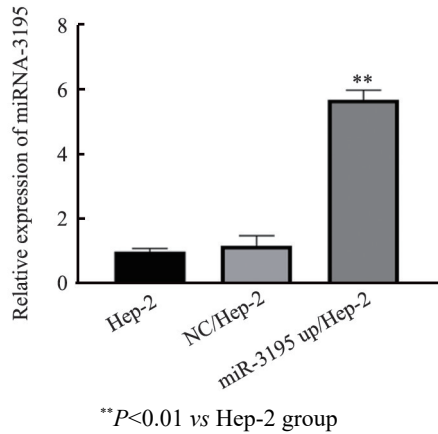


图 2 miR-3195 过表达 Hep-2 组细胞中的 miR-3195 表达升高  
Fig.2 The expression of miR-3195 in the miR-3195 up/Hep-2 group was increased

接种后第 30 天, 采用颈椎脱位法处死裸鼠, 剥离肿瘤, 移植瘤边界清晰, 表面凹凸不平, 多个结节融合, 表面均无破裂(图 4B)。用电子秤称瘤体质量, 结果(图 3C)显示, miR-3195 up/Hep-2 组的平均瘤体质量明显低于 NC/Hep-2 组和 Hep-2 组 [(0.1433±0.0409) vs (0.4550±0.01692)、(0.3517±0.0806)g, 均 *P*<0.05]。同时测量各组移植瘤的最终体积, 结果(图 4D)显示, miR-3195 up/HEP-2 组肿瘤的平均体积显著低于 NC/Hep-2 组和 Hep-2 组 [(186.125±59.2) vs (779.775±440.2)、(398.148±71.47) mm<sup>3</sup>, 均 *P*<0.05]。

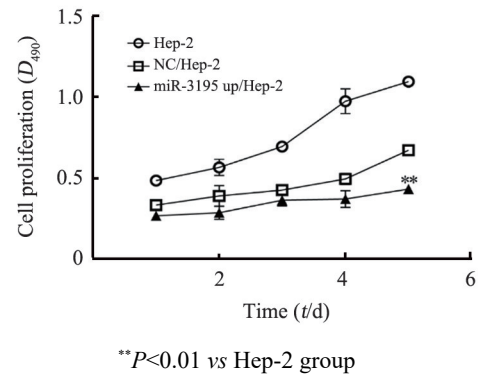
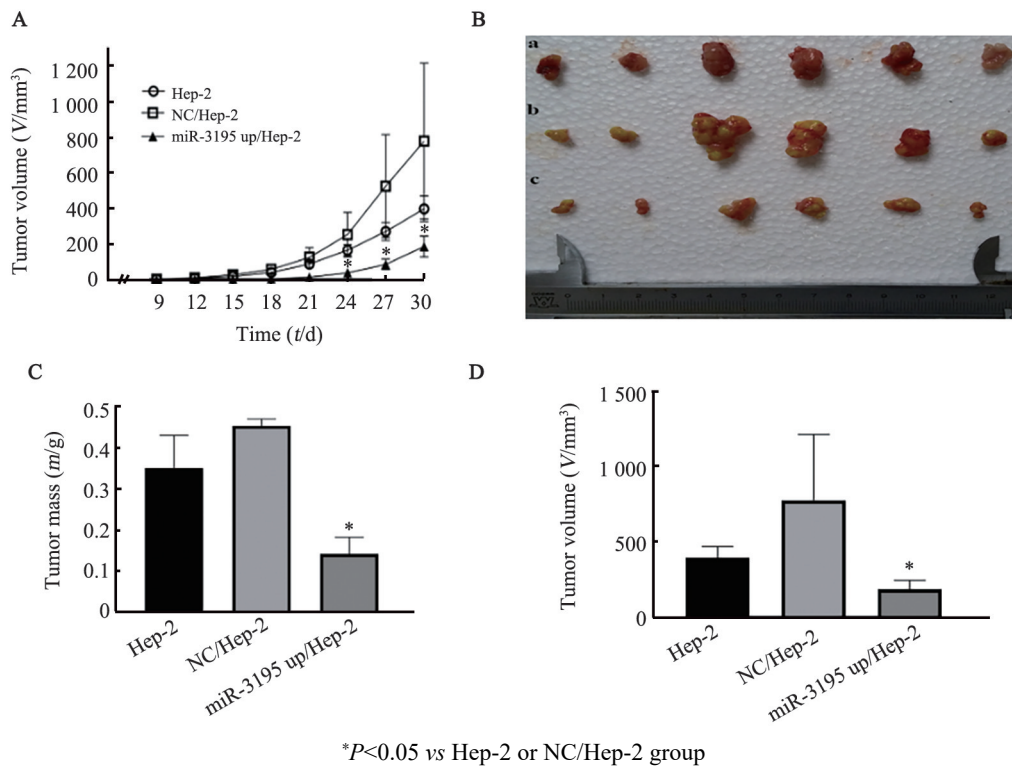


图 3 过表达 miR-3195 显著抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖  
Fig.3 Over-expression of miR-3195 significantly inhibited the proliferation of laryngeal cancer Hep-2 cells

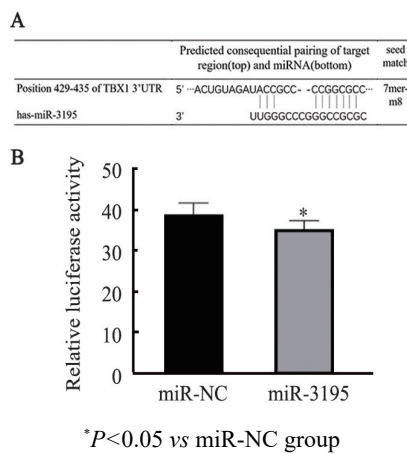


A and D: Statistics of xenografts' volume in nude mice; B: The images of xenografts in nude mice; C: Statistics of xenografts' mass in nude mice; a: Hep-2 group; b: NC/Hep-2 group; c: miR-3195 up/Hep-2 group

图 4 过表达 miR-3195 显著抑制裸鼠移植瘤的生长  
Fig.4 Over-expression of miR-3195 significantly inhibited the growth of xenografts in nude mice

### 2.5 miR-3195靶向结合TBX1的3'UTR

利用 miRNA 靶基因预测软件 miRanda、miRDB 对 miR-3195 可能调控的特异性靶基因进行预测, 结果(图 5A)显示, TBX1 基因可能为 miR-3195 调控的靶基因。通过构建 TBX1 基因 3'UTR 与 miR-3195 结合位点的荧光素酶报告载体, 实验验证 miR-3195 与 TBX1 基因的靶向关系。双荧光素酶报告基因检测结果(图 5B)显示, 与 miR-NC 组相比, miR-3195 组的荧光酶活性值明显降低( $P < 0.05$ ), 结果表明, miR-3195 与 TBX1 基因的 3'UTR 存在碱基序列互补作用, 从而下调荧光素酶的活性。



A: Bioinformatics analysis demonstrated a complementary relationship between miR-3195 and TBX1 gene; B: Luciferase experiments verified the targeted relationship between Mir-3195 and TBX1 gene

图 5 双荧光素酶报告基因检测荧光素酶活性

Fig. 5 The luciferase activity was detected by Dual-luciferase reporter gene assay

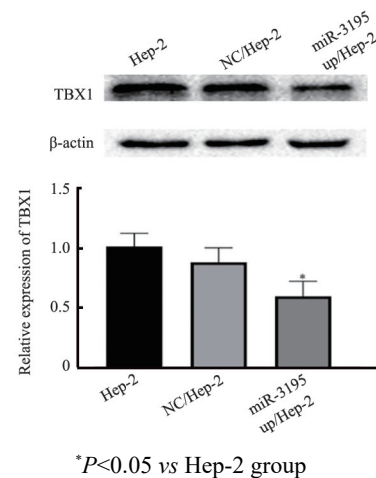
### 2.6 过表达 miR-3195 显著抑制 Hep2 细胞中 TBX1 蛋白的表达

Western blotting 法检测喉癌 Hep-2、NC/Hep-2 和 miR-3195 up/Hep-2 细胞组中 TBX1 蛋白的表达, 结果(图 6)显示, miR-3195 up/Hep-2 组的平均灰度值明显小于 Hep-2 和 NC/Hep-2 [ $(0.602 \pm 0.088)$  vs  $(1.018 \pm 0.079)$ 、 $(0.887 \pm 0.085)$ ,  $P < 0.05$ ], 表明 miR-3195 up/Hep-2 组 TBX1 蛋白表达明显减少, 结果提示, 过表达 miR-3195 可显著抑制 Hep-2 细胞中 TBX1 蛋白的表达。

### 3 讨论

喉癌是一种侵袭性恶性肿瘤, 在所有头颈部癌症中发病率位居第二<sup>[14]</sup>, 喉癌给全世界人民带来了巨大的经济压力和极高的健康风险。尽管喉癌的诊断和治疗取得了很大进展, 但远期预后仍然较差<sup>[15]</sup>。为了探讨 miR-3195 在喉癌中的表达, 本课题组用 qPCR

检测 29 对喉癌组织和相应的癌旁组织中 miR-3195 的表达水平, 结果表明, miR-3195 在喉癌组织中表达下调。有文献<sup>[16]</sup>报道, 非小细胞肺癌患者血清中 miR-3195 的表达明显下调, 且 miR-3195 高表达的患者 OS 明显延长。同时有研究<sup>[17]</sup>报道, 发现相较于正常组织, 年轻患者前列腺癌中 miR-3195 的表达显著下调。本课题组研究也发现在喉癌中 miR-3195 表达下调。为了探索 miR-3195 在喉癌发生发展中的作用及其可能的机制, 课题组构建了 miR-3195 稳定高表达的细胞株, 开展了体外 (MTT 实验) 和体内 (裸鼠移植瘤) 实验, 结果发现 miR-3195 过表达的细胞株相较于对照组与空白组生长缓慢, 移植瘤也相对较小。结果说明, miR-3195 过表达后能够抑制喉癌细胞生长, miR-3195 在喉癌中具有抑癌作用。



A: Western blotting detection; B: Statistics of relative expression of TBX1

图 6 过表达 miR-3195 显著抑制 Hep-2 细胞 TBX1 蛋白的表达  
Fig. 6 Over-expression of miR-3195 significantly inhibited the expression of TBX1 protein in Hep-2 cells

为了进一步研究 miR-3195 在喉癌中的作用机制, 用生物信息学分析和荧光素酶实验发现 TBX1 基因为 miR-3195 调控的靶基因。TBX1 是转录因子 T-box 家族的成员, 其特征被称为是 T-box 的保守 DNA 结合域<sup>[18]</sup>。在最近研究<sup>[19]</sup>中发现, TBX1 水平失调与甲状腺肿瘤模型相关。沉默细胞内的 TBX1 可以诱导细胞周期阻滞于 G0/G1 期, TBX1 可能通过细胞周期调控来调节细胞生长<sup>[18]</sup>。本研究荧光素酶实验提示 TBX1 受 miR-3195 的调控, Western blotting 法检测过表达 miR-3195 可显著降低喉癌 Hep-2 细胞中 TBX1 蛋白的表达, 结果提示, miR-3195 可以靶向调控 TBX1 并抑制其表达。

综上所述, miR-3195 在喉癌中低表达, 并可能通过靶向 TBX1 抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖, 本研究为

理解喉癌发生和发展的分子机制提供了新的见解, miR-3195 可能成为喉癌新的预后标志物和潜在的治疗靶点。

### [参考文献]

- [1] ZHANG J Z, HU H Y, ZHAO Y X, et al. CDR1as is overexpressed in laryngeal squamous cell carcinoma to promote the tumour's progression via miR-7 signals[J/OL]. *Cell Prolif*, 2018, 51(6): e12521[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6528957/>. DOI:10.1111/cpr.12521.
- [2] LI P, LIN X J, YANG Y, et al. Reciprocal regulation of miR-1205 and E2F1 modulates progression of laryngeal squamous cell carcinoma [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 916[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893029/>. DOI:10.1038/s41419-019-2154-4.
- [3] WILCZYNSKA A, BUSHELL M. The complexity of miRNA-mediated repression[J/OL]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(1): 22-33[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262769/>. DOI: 10.1038/cdd.2014.112.
- [4] HUI A B, LENARDUZZI M, KRUSHEL T, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4): 1129-1139. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2166.
- [5] CALIN G A, CROCE C M. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7390-7394. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-06-0800.
- [6] LI P, YANG Y, LIU H, et al. MiR-194 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting Wee1 [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 32[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5264457/>. DOI:10.1186/s13045-017-0402-6.
- [7] LI M H, TIAN L L, REN H, et al. MicroRNA-101 is a potential prognostic Indicator of laryngeal squamous cell carcinoma and modulates CDK8[J/OL]. *J Transl Med*, 2015, 13:271 [2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4545549/>. DOI: 10.1186/s12967-015-0626-6.
- [8] LI W, MA H P, SUN J. MicroRNA-34a/c function as tumor suppressors in Hep-2 laryngeal carcinoma cells and may reduce GALNT7 expression[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1293-1298. DOI:10.3892/mmr.2014.1929.
- [9] LUO J, WU J H, LI Z H, et al. MiR-375 suppresses IGF1R expression and contributes to inhibition of cell progression in laryngeal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 374598[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4145380/>. DOI:10.1155/2014/374598.
- [10] 刘扬帆, 屈中玉, 王文廉, 等. miR-135a 通过下调 SOX2 抑制喉癌 Hep-2 细胞的恶性生物学行为和增强对奥沙利铂的敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(9): 955-961. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.004.
- [11] ZHAO X D, ZHANG W, LIANG H J, et al. Overexpression of miR-155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56395[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3577898/>. DOI:10.1371/journal.pone.0056395.
- [12] XIAO X Y, ZHOU L, CAO P Y, et al. MicroRNA-93 regulates cyclin G2 expression and plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1): 161-174. DOI:10.3892/ijo.2014.2704.
- [13] TIAN Y, FU S, QIU G B, et al. MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma [J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 678[2020-08-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4177177/>. DOI: 10.1186/1471-2407-14-678.
- [14] SHUANG Y, ZHOU X, LI C, et al. MicroRNA-503 serves an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma via targeting programmed cell death protein 4[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 5249-5256[2020-08-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5647079/>. DOI:10.3892/mmr.2017.7278.
- [15] ZHOU Z X, ZHANG Z P, TAO Z Z, et al. MiR-632 promotes laryngeal carcinoma cell proliferation, migration, and invasion through negative regulation of GSK3β[J]. *Oncol Res*, 2020, 28(1): 21-31. DOI:10.3727/096504018X15213142076069.
- [16] KUMAR S, SHARAWAT S K, ALI A, et al. Differential expression of circulating serum miR-1249-3p, miR-3195, and miR-3692-3p in non-small cell lung cancer[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(3): 839-849. DOI:10.1007/s13577-020-00351-9.
- [17] VALERA V A, PARRA-MEDINA R, WALTER B A, et al. MicroRNA expression profiling in young prostate cancer patients[J/OL]. *J Cancer*, 2020, 11(14): 4106-4114 [2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7196262/>. DOI:10.7150/jca.37842.
- [18] WANG N, LI Y Q, WEI J, et al. TBX1 functions as a tumor suppressor in thyroid cancer through inhibiting the activities of the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways[J]. *Thyroid*, 2019, 29(3): 378-394. DOI:10.1089/thy.2018.0312.
- [19] VERDELLI C, AVAGLIANO L, GUARNIERI V, et al. Expression, function, and regulation of the embryonic transcription factor TBX1 in parathyroid tumors[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(12): 1488-1499. DOI:10.1038/labinvest.2017.88.

[收稿日期] 2020-08-15

[修回日期] 2020-11-25

[本文编辑] 阮芳铭