

MiR-125a 靶向调节 P53 表达对人喉癌细胞增殖、凋亡以及放射治疗敏感性的影响

常 远,谭立君,王启威,赵剑南,周晓杰,于天娇,刘江涛
(哈尔滨医科大学附属第一医院,黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: [目的] 探究 miR-125a 通过靶向调节 p53 的表达对人喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡以及放射治疗敏感性的影响。[方法] 培养人喉癌 Hep-2 细胞系,利用慢病毒分别转染 miR-125a 与空白质粒,RT-PCR 法检测转染后各组细胞中 miR-125a 水平,采用 MTT 法检测细胞增殖情况。X 线照射各组细胞后,行克隆形成实验、微核检测和流式细胞检测法检测转染细胞凋亡水平及放射敏感性,通过在线软件预测 p53 基因为 miR-125a 直接调控的靶基因,Western blot 检测凋亡相关蛋白水平并进一步验证 miR-125a 与 p53 的关系,及在喉癌细胞放射治疗中的作用。[结果] MTT 实验结果显示,转染 miR-125a 后 Hep-2 细胞增殖能力明显下降 ($P<0.05$)。克隆形成实验与微核检测结果表明高表达 miR-125a 可使 Hep-2 细胞放射敏感性显著提高。流式细胞仪检测结果 0Gy 下 Hep-2-miR-125a、Hep-2-con220 组,10Gy 下 Hep-2-miR-125a、Hep-2-con220 组凋亡率分别为 $(6.30\%\pm0.11\%)$, $(0.09\%\pm0.02\%)$, $(18.15\%\pm2.49\%)$, $(1.95\%\pm0.08\%)$ ($P<0.01$)。TargetScan 软件预测 TRIAP1 (TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1) 为 miR-125a 的直接调控的靶基因,Western blot 实验结果显示高表达 miR-125a 可正向调控 p53 的表达,从而增强 Hep-2 细胞对 X 线的放射敏感性。[结论] MiR-125a 表达上调后可能通过上调 p53 的表达使 Hep-2 细胞增殖受到抑制,诱使其发生凋亡,并提高放射敏感性。

关键词: miR-125a; p53; 增殖; 凋亡; 放射敏感性; 喉癌

中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2020)09-0708-07
doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2020.09.A012

Effect of MiR-125a on Proliferation, Apoptosis and Radiosensitivity of Human Laryngeal Cancer Cells and Its Mechanism

CHANG Yuan, TAN Li-un, WANG Qi-wei, ZHAO Jian-nan, ZHOU Xiao-jie, YU Tian-jiao, LIU Jiang-tao

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of miR-125a on the proliferation, apoptosis and radiosensitivity of human laryngeal carcinoma cells and its relation with p53 expression. [Methods] Human laryngeal carcinoma Hep-2 cells were cultured and transfected with miR-125a and blank plasmids respectively by lentivirus. The level of miR-125a in each group of cells after transfection was detected by RT-PCR, and the cell proliferation was detected with MTT. After X-ray irradiation, the level of apoptosis and radiosensitivity of transfected cells were detected by clone formation test, micronucleus test and flow cytometry. P53 gene was predicted as a directly regulated target gene of miR-125a by online software. The level of apoptosis related proteins was detected, and the relationship between miR-125a and p53 and the role of miR-125a in radiotherapy of laryngeal cancer cells were verified by Western blot method. [Results] MTT assay showed that the cell proliferation capacity of Hep-2 cells decreased significantly after miR-125a transfection ($P<0.05$). The results of clone formation test and micronucleus test showed that overexpression of miR-125a significantly increased the radiosensitivity of Hep-2 cells. The results of flow cytometry showed that the apoptotic rates of Hep-2-miR-125a and Hep-2-con220 groups were $(6.30\%\pm0.11\%)$ and $(0.09\%\pm0.02\%)$ at 0Gy, and $(18.15\%\pm2.49\%)$ and $(1.95\%\pm0.08\%)$ at 10Gy, respectively ($P<0.01$). TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1 (TRIAP1) was predicted to be the target gene of miR-125a by TargetsSan software. Western blotting showed that high expression of miR-125a positively regulated the expression of p53, and enhanced the radiosensitivity of Hep-2 cells to X-ray. [Conclusion] Overexpression of miR-125a might inhibit Hep-2 cell proliferation, induce apoptosis and enhance its radiosensitivity by up-regulating p53 expression.

Key words: miR-125a; p53; proliferation; apoptosis; radiosensitivity; laryngeal carcinoma

喉癌作为常见的头颈部恶性肿瘤,其发病率、死

亡率均较高,且近年来明显上升,对人类的生命健康造成严重影响^[1]。放射治疗是喉癌的主要治疗方式之一^[2],有效地提高放射治疗的疗效是延长喉癌患

收稿日期:2020-02-05;修回日期:2020-07-21
基金项目:黑龙江省自然科学基金(H2017033)
通信作者:刘江涛, E-mail: ljt89103@aliyun.com

者生存期亟待研究和解决的重要课题。

MicroRNA(miRNA,miR)长度约22个核苷酸,是一类新发现的单链非编码小RNA,在动植物基因调控中十分重要。在肿瘤发生发展过程中,miRNA可以作为癌基因或抑癌基因介入到肿瘤细胞的发生、浸润、转移过程当中,近年来多项研究显示miRNA对于判断不同肿瘤的预后及治疗效果的预测起重要作用^[3-4]。有研究证实^[5-8],miR-125a作为抑癌基因,在喉癌、乳腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤中抑制肿瘤的发生与发展。另有研究发现^[9],上调miR-125a的表达,对鼻咽癌细胞的凋亡有促进作用,并可提高对放疗的敏感性。

p53基因为一种抑癌基因,其表达在肿瘤发生发展的过程中可启动并促进肿瘤细胞发生凋亡,而随肿瘤发展致大部分细胞p53基因突变后,给予放射治疗,细胞凋亡仍难以启动,即导致放射抗拒的发生。因此,对p53介导的细胞凋亡途径进行重新构建,有可能实现放射增敏的效果^[10]。生物学信息库TargetScan预测TRIAP1(TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1)可能是miR-125a的靶基因,即可能通过上调miR-125a的表达调节p53蛋白的表达量。本研究以近年常用的喉癌Hep-2细胞株为研究对象,通过构建miR-125a表达载体转染Hep-2细胞株,使用X射线照射,观察细胞凋亡能力的变化,并初步对其分子生物学机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

原代人喉癌Hep-2细胞株(购自丰晖生物)用含10%的新生牛血清(ATLAS)的DMEM(ATLAS)培养基培养,置于37℃、5%CO₂条件下培养至细胞对数生长期。

1.2 实验分组及转染

使用重组慢病毒LV-has-miR-125a、LV-has-con220(购自吉凯基因)进行转染。根据说明书以80%的转染质粒细胞密度接种于96孔板中,24h后使用Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen)将LV-has-miR-125a、LV-has-con220转染至细胞中;转染同时另选一组未进行转染的Hep-2细胞株作为对照,除转染过程不进行外,其他操作过程同前。分别将转染miR-125a组、空白质粒组和未转染组标记为Hep-2-

miR-125a组、Hep-2-con220组和Hep-2组。转染48h后,收集细胞,用嘌呤霉素筛选稳定表达的miR-125a。

1.3 RT-PCR法检测转染情况

根据产品说明书,用Trizol溶液分别提取Hep-2-miR-125a组和Hep-2-con220组的总RNA。取各组RNA样本10μl反转录为cDNA,实时PCR检测系统为QuantStudio®3,使用Faststart Universal Sybr Green Master (Roche)进行RT-PCR实验,以U6 snRNA作为内参基因,反应体系共20μl,包括:SYBR Green I(Roche)10μl、水7μl、模板1μl(100ng/μl)、上游引物1μl(10pm)、下游引物1μl(10pm),采用标准的三步法程序进行反应。引物序列如下:

U6正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',

反向引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';

MiR-125a-3p的引物为:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCTCC,

MiR-125a-3p正向引物:5'-AGCGCGACAGGTGAGGTTCTTG-3',

MiR-125a-3p反向引物:5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3';

MiR-125a-5p的引物为:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACAG,

MiR-125a-5p正向引物:5'-CGCCGTCCTGAGACCTTTAAC-3',

MiR-125a-5p反向引物:5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'(均来自生工生物工程(上海)股份有限公司)。

反应程序为95℃15s,60℃1min,50℃2min;40个PCR循环。2^{-ΔΔCt}法计算miR-125a的相对表达量。

1.4 细胞增殖实验

使用3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)测定细胞增殖水平。以Hep-2组作为对照,选取转染后的Hep-2-miR-125a组与Hep-2-con220组处于对数生长期的细胞进行单层细胞培养,调节细胞密度,在96孔板中加入1×10³个/孔细胞,把100μl的细胞培养基加入每孔,于5%CO₂培养箱内以37℃进行常规培养。各组设8个复孔,每个板另有一个孔仅有细胞培养基不添加细胞作为背景对照。在24、48、72、96h后,分别向每孔加入20μl MTT(5mg/ml)孵育4h。弃上清每孔加入150μl DMSO,摇床上低速震荡10min,以完全溶解晶体。选择

490nm 波长,在 iMark 微板阅读器(Biorad)上测定各孔吸光度值,记录结果。

1.5 细胞照射与处理

分别用 0.25% 的胰酶消化 Hep-2 组、Hep-2-con220 组和 Hep-2-miR-125a 组三组对数生长期细胞,以 1.5×10^5 个细胞/皿接种于 35mm 培养皿中,于 37℃、5%CO₂ 浓度、饱和湿度条件下培养。细胞充分贴壁后,以 0、2、4、6、8、10Gy 不同放射量以 X 射线直线加速器照射培养细胞。

1.6 细胞生长曲线测定

取胰蛋白酶制备单细胞悬液,浓度为 100 个/ml 计数后,用含胎牛血清 1640 培养基梯度稀释,按照照射剂量不同将细胞分别接种于培养皿中。不同照射剂量接种的细胞数具体如下:0Gy (500 个),2Gy (1×10^3 个),4Gy (2×10^3 个),6Gy (4×10^3 个),8Gy (8×10^3 个),10Gy (1.6×10^4 个)。

各组细胞分别以 6MV X 线单剂量照射,37℃下培养,待肉眼可见集落时终止培养。弃培养基,PBS 清洗,甲醇固定,Giemsa 工作液染色后,以流水缓慢冲洗染色液,室温下干燥,显微镜下细胞计数大于 50 的集落数。对照 0Gy 组集落形成率,计算不同照射剂量下的细胞存活分数(surviving fraction,SF)。贴壁率(plating efficiency,PE)=对照组克隆数/细胞接种数 $\times 100\%$,SF=实验组克隆数/(接种细胞数 $\times$ PE)。用 Graphpad Prism4.0 按单击多靶模型 $SF=1-(1-e^{-D/D_0})^N$ 拟合并绘制细胞存活曲线。

1.7 细胞微核的检测

收集三组对数生长期细胞,在 6 孔板中以 1×10^5 个/孔加入细胞,加入细胞培养基 2ml/孔,37℃、5%CO₂ 培养箱内常规培养,每组设 3 个复孔。将三组分别给予 0、4、10Gy 低剂量、中度剂量和高剂量 X 线照射,之后立即用 1μg/ml 松胞素 B(CB)处理,并培养于 37℃、5%CO₂ 浓度、饱和湿度下,28h 后弃培养液,PBS 清洗,改良的细胞固定液(甲醇:冰醋酸=9:1)固定 20min,室温晾干备用。用 Giemsa 工作液染色 5min,40 倍荧光显微镜观察至少 500 个微核数不大于 3 个的双核细胞,记录细胞数及双核微核细胞数。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡率

选用胰酶消化后的三组对数生长期的细胞 1×10^6 个,加入 500μl Binding buffer 重悬。加入 5ul Annexin V-FITC,轻轻混匀,再加入 10μl 碘化丙啶(Propidium

Iodide,PI)混匀。室温避光孵育 10min。离心后弃上清,再次加入 Annexin V-FITC 190ul,并轻轻重悬。加入 10μl PI 染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。MoFlo-XDP 流式细胞仪(BeckMan)检测,CellQuest 软件系统收获细胞,ModFit LT for Mac V3.0 软件系统分析凋亡率。

1.9 Western Blot 法检测 p53、γ-H2AX 蛋白表达

取 X 射线处理 24h 后不同放射量的 Hep-2、Hep-2-miR-125a、Hep-2-con220 细胞,用标准的 RIPA 缓冲液(Solarbio PMSF)提取总蛋白,以 BCA 法测蛋白浓度,制备 SDS-PAGE 凝胶(Millipore),总蛋白中加入 5 $\times$ 蛋白质负载缓冲液(SDS),沸水浴加热 5min,4℃下 12 000r/min 离心 10min,恢复至室温后,进行 SDS-PAGE、转膜(NC 膜,微孔),将膜用 TBS-T 冲洗 10min 后,移至 10%牛血清白蛋白在 TBS-T 缓冲液中封膜,室温下摇床上摇动封闭 2h。将膜置于装有一级抗体稀释液的小袋中,具体一抗为 γH2AX (微孔,1:1000)、p53(Abcam,1:1000)、GAPDH(Zsbio,1:5000),于含 5%牛血清白蛋白的 TBS-T 中摇床 4℃下孵育过夜。TBS-T 洗膜 3 次,每次 5min,加入二级抗体稀释液(Zsbio,1:5000)。TBS-T 再次洗膜,用化学发光增强剂 ChemiDoc-XRS+蛋白印迹实验,用凝胶成像系统进行蛋白成像,拍照记录。以 GAPDH 为内参,Image J 定量分析蛋白条带灰度值。

1.10 统计学处理

使用 SPSS17.0 统计学软件、Graphpad Prism8.0、Microsoft Office Excel 处理数据、统计分析及绘制曲线。计量数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MiR-125a 抑制 Hep-2 细胞增殖

RT-PCR 实验结果(Figure 1)显示,与转染空白片段的 Hep-2-con220 细胞组比较,转染 miR-125a 的 Hep-2-miR-125a 组 miR-125a 表达显著提高,重组质粒成功转染至 Hep-2 细胞 (*P*<0.05)。另外 MTT 实验显示(Figure 2),与未进行转染的 Hep-2 组及转染空白质粒的 Hep-2-con220 组相比较,稳定转染 miR-125a 后的 Hep-2-miR-125a 细胞增殖能力显著下降(*P*<0.01),而 Hep-2 组与 Hep-2-con220 组相比

较, 两组细胞增殖水平无明显差异。上述结果表明, 过表达 miR-125a 可抑制 Hep-2 细胞的增殖能力。

2.2 MiR-125a 增强 Hep-2 细胞放射敏感性

细胞照射剂量存活实验表明(Figure 3), 随着放射量提高, 各组 SF 均下降, 即各组 Hep-2 细胞增殖能力均明显降低, 同时 Hep-2-miR-125a 组细胞增殖能力更是明显低于 Hep-2 组和 Hep-2-con220 组。

X 射线照射后, 各组细胞双核微核细胞形成结果见表 1、图 4(Table 1; Figure 4)。由表 1(Table 1)示, 未进行照射时 Hep-2-miR-125a 组双核细胞即较另两组更多, 在给予 0、4、10Gy 剂量的 X 线照射后, 各组双核细胞数均随剂量增加而增多, Hep-2-miR-125a 组仍较 Hep-2-con220 组及 Hep-2 组更多, 即 Hep-2-miR-125a 组较 Hep-2-con220 组及 Hep-2 细胞组放射敏感性更高。

流式细胞术检测结果如图 5(Figure 5)示, 0Gy 下 Hep-2-miR-125a, Hep-2-con220, 10Gy 下 Hep-2-miR-125a, Hep-2-con220 组凋亡率分别为 $(63.0\% \pm 0.11\%)$, $(0.09\% \pm 0.02\%)$, $(18.15\% \pm 2.49\%)$, $(1.95\% \pm 0.08\%)$ ($P < 0.01$), 各组 Hep-2 细胞凋亡率随着放射强度增强而显著提高, 且 Hep-2-miR-125a 组细胞凋亡水平显著高于 Hep-2-con220 组 ($P < 0.01$)。

上述结果表明, 过表达 miR-125a 可抑制 Hep-2 细胞增殖及侵蚀能力, 并增强 Hep-

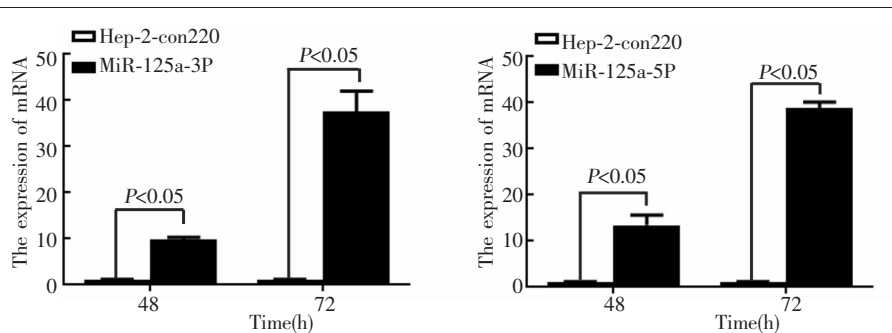
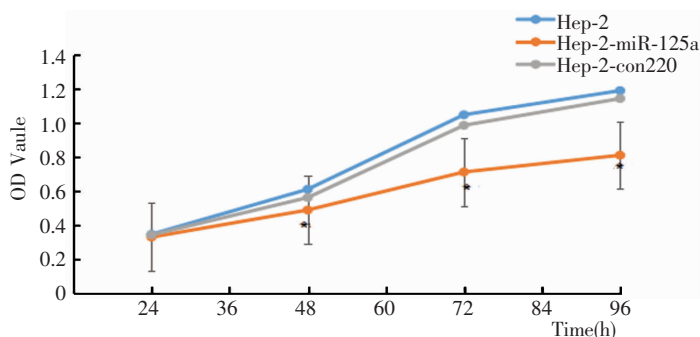
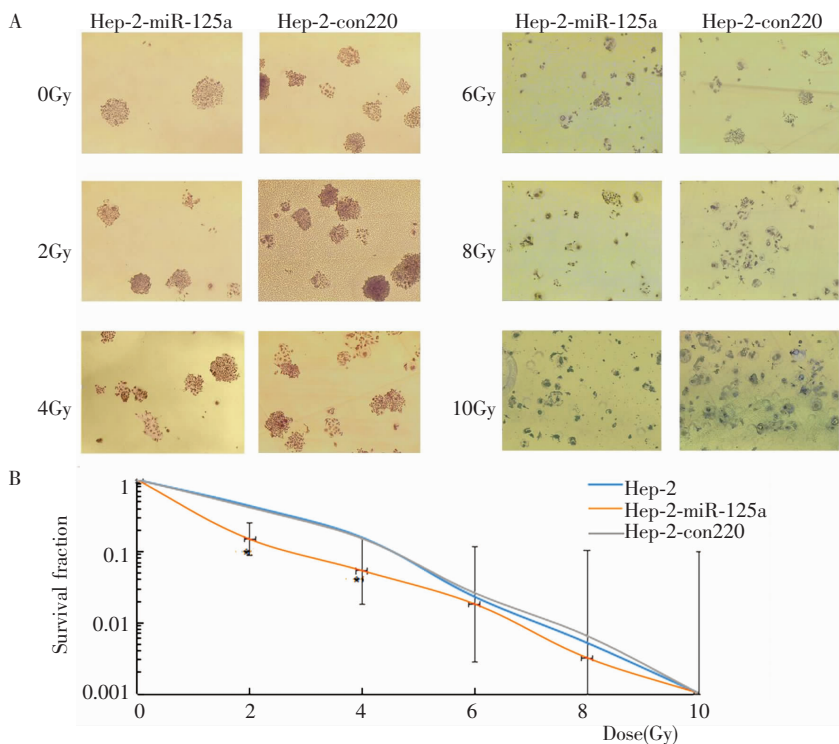


Figure 1 Expression of miR-125a-3p and miR-125a-5p in Hep-2-miR-125a group and Hep-2-con220 group by RT-PCR



*: Comparison of Hep-2-miR-125a group with Hep-2 and Hep-2-con220 groups, $P < 0.01$

Figure 2 Growth curve of Hep-2, Hep-2-con220, Hep-2-miR-125a cells



A. Cell proliferation of Hep-2-miR-125a group and Hep-2-con220 group under different radiation doses; B. Log plot of dose-survival fraction

*: Comparison of Hep-2-miR-125a group with Hep-2 and Hep-2-con220 groups, $P < 0.05$

Figure 3 Effect of radiation on cells in Hep-2-miR-125a and Hep-2-con220 groups

Table 1 The number of binucleate cells and the number of binuclear cells with micronuclei less than 3 in Hep-2-miR-125a group and Hep-2-con220 group under 0,4 and 10 Gy radiation dose

Dose (Gy)	Hep-2		Hep-2-miR-125a		Hep-2-con220	
	Number of binucleate cells	Number of binuclear micronucleus cells	Number of binucleate cells	Number of binuclear micronucleus cells	Number of binucleate cells	Number of binuclear micronucleus cells
0	523	21	562	40	537	37
4	525	35	541	47	520	38
10	556	39	506	49	513	42

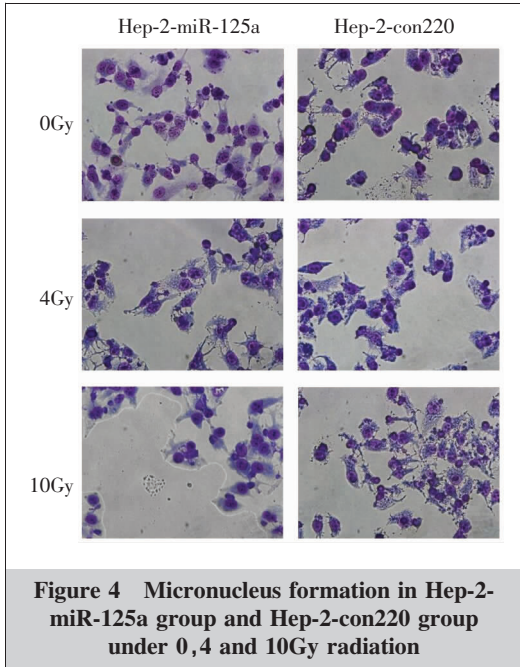


Figure 4 Micronucleus formation in Hep-2-miR-125a group and Hep-2-con220 group under 0,4 and 10Gy radiation

2 细胞放射敏感性,促进细胞凋亡。

2.3 MiR-125a/p53 分析轴对于 Hep-2 细胞放疗敏感性的影响

生物信息学 TargetScan 数据库预测结果显示 (Figure 6),miR-125a 能结合 *TP53* 基因的 *TRIAP1* (TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1) 的 3'UTR 区域。

蛋白印迹实验结果如图 7、表 2 (Figure 7; Table 2) 示,进行放射处理后,各组 p53 及 γ H2AX 表达均较未进行放射处理组增高 ($P<0.05$)。由表 2 (Table 2) 示,0Gy 与 10Gy 下,Hep-2-miR-125a 组与 Hep-2-con220 组相比 p53 表达分别升高 8%、6% ($P<0.05$)。图 7 (Figure 7) 示 Hep-2-miR-125a 组 γ H2AX 较 Hep-2-con220 组表达增高 ($P<0.05$)。结果显示 miR-125a 的高表达可能通过促进 p53 的表达,从而增加 Hep-2 细胞的 X 射线放射敏感性。

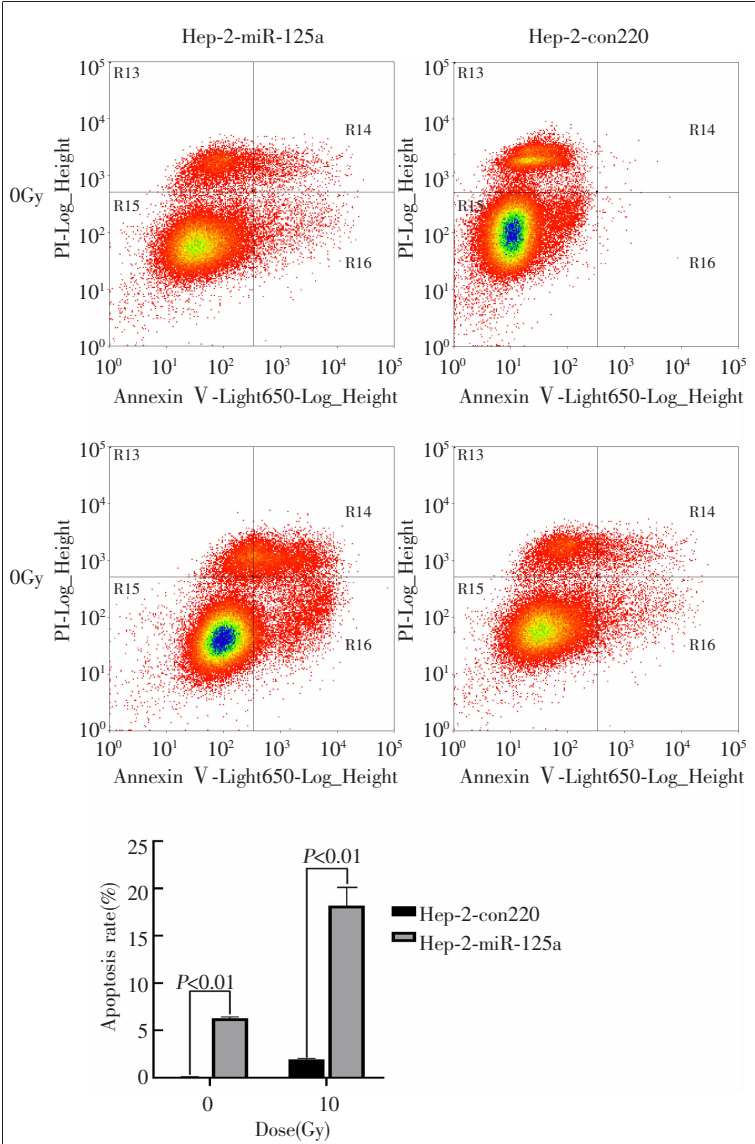


Figure 5 Effect of miR-125a on apoptosis rate of Hep-2 cells after irradiation

Position 419-426 of <i>TRIAP1</i> 3' UTR	5' ... ACCUCUUUUUUUCCUCAGGGA...	
hsa-miR-125a-5p	3' AGUGUCCAAUUUCCAGAGUCCU	

Figure 6 Putative miR-125a binding sequences in the *TRIAP1* 3'-UTR

3 讨论

喉癌在我国呈发病率、死亡率逐年升高并趋于年轻化的态势^[11],其发生与多种因素多基因相互作用相关,主要治疗方法包括手术切除、放射治疗等^[11-12]。临床数据表明,任意部位的早期喉癌(T₁、T₂、N₀)采用上述两种治疗方法后总体生存率相似。然而,放射治疗不仅可以达到与根治术相同的治疗效果,而且可以有效地保障患者发音和吞咽功能的完整性。对于放射治疗后残留或复发者,放疗后行挽救性手术也有一定的治愈率,晚期病变患者多采取放疗和手术相结合的综合治疗,无法手术者则以根治性放疗为主,综上所述放射治疗是喉癌治疗的重要方法。另外尽管近 30 年来,逐步提高的外科手术技术、更为先进的放射治疗设备以及更有效的三代化疗药物在喉癌的应用愈发广泛,同其他头颈部恶性肿瘤一样,喉癌患者的 5 年生存率,并未得到明显提高,仅约 50%,晚期喉癌的生存率更低达 30%~40%,相当大比例的局部晚期喉癌患者最终复发死亡^[2],所以研究喉癌的分子机制,寻求提高放射治疗效率的方法具有重要意义。

随着对 miRNA 研究的深入,目前在肿瘤治疗上,医学界以 siRNA 及 miRNA 为主要靶向部位的治疗方案备受青睐。多项研究表明 miR-125a 在抑制肿瘤的发生、发展中的作用十分重要^[13],例如乳腺癌^[6,8]、多发性骨髓瘤^[14]、肺癌^[7]、鼻咽癌^[9]。而 miR-125a 在抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡的同时也可起到放射增敏的作用^[9]。本研究显示,过表达 miR-125a 后 Hep-2 细胞增殖及侵蚀能力显著下降,放射敏感性显著增加,即 miR-125a 可能在 Hep-2 细胞中发挥抑癌基因的作用。

P53 是目前发现与人类肿瘤相关性最高的基因之一,对其研究亦比较成熟。P53 基因的表达不仅促进细胞凋亡,还对肿瘤细胞的生长产生抑制效应。当肿瘤进一步发展,大部分 p53 基因突变失活,其诱导凋亡能力受到抑制,放疗后 p53 基因介导的凋亡进

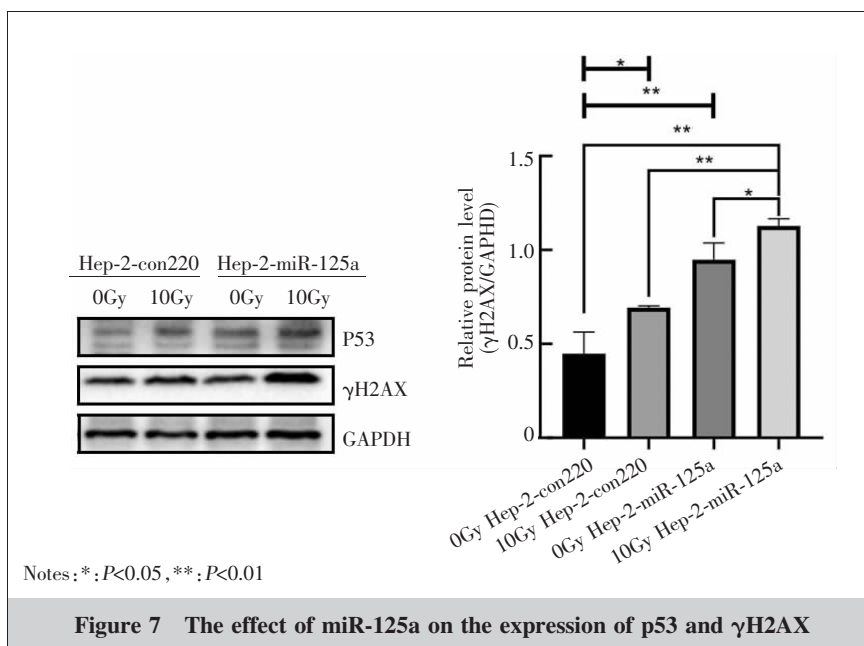


Figure 7 The effect of miR-125a on the expression of p53 and γH2AX

Table 2 Comparison of p53 expression between Hep-2-con220 group and Hep-2-miR-125a group under different radiation doses

Radiation dose (Gy)	Hep-2-con220	Hep-2-miR125a
0	1.00	1.08
10	1.27	1.34

程无法启动,即发生放射抗拒^[15]。有研究证实^[16-20],甲状腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、喉癌中 p53 失活可以促进肿瘤的生长,同时也会导致细胞分化的持续丧失。另外有研究发现 p53 表达欠缺致乳腺癌、喉癌的放射增敏作用受到抑制^[20-21]。本研究中,我们先使用 TargetScan 生物信息学软件预测 miR-125a 与 TRIAP1 的 3'UTR 存在互补位点,可作用于其特异性序列,或可影响 p53 的表达。Western blot 实验结果显示 miR-125a 表达增强后 p53 表达也随之显著升高,同时 γH2AX 表达也升高,即细胞凋亡增加。流式细胞实验进一步证实,过表达 miR-125a 后 Hep-2 细胞凋亡率增加,提示 miR-125a 过表达可促使 p53 的表达,进一步诱发 Hep-2 细胞凋亡,并抑制肿瘤细胞的增殖。由此可见,Hep-2 细胞中 p53 的表达可能受 miR-125a 调节,因此对于 miR-125a 影响 p53 表达从而介导 Hep-2 细胞凋亡增加及放射敏感性提高的机制将是后续研究的重点。

综上所述,本研究初步探究了 miR-125a 与 p53 在喉癌中的作用,验证 miR-125a 可通过调控 p53 表达调控 Hep-2 细胞的增殖、侵袭、凋亡及放疗敏感性。

本研究不但丰富了 miR-125a 在 Hep-2 中作用的研究,还为喉癌放疗敏感性的研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Wang R, Bian XC, Liu YQ, et al. Establishment and characterization of a laryngeal squamous cell carcinoma cell line [J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2017, 52(1): 44-48. [王茹, 卞晓翠, 刘玉琴, 等. 喉鳞状细胞癌细胞系的建立及其生物学特性研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 52(1): 44-48.]
- [2] Kawakita D, Abdelaziz S, Chen Y, et al. Adverse respiratory outcomes among head and neck cancer survivors in the Utah Cancer Survivors Study[J]. Cancer, 2020, 126(4): 879-885.
- [3] Janiszewska J, Szaumkessel M, Kostrzevska-Poczekaj M, et al. Global miRNA expression profiling identifies miR-1290 as novel potential oncomiR in laryngeal carcinoma [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144924.
- [4] Lu C, Shi X, Wang AY, et al. RNA-Seq profiling of circular RNAs in human laryngeal squamous cell carcinomas [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 86.
- [5] Xu MM, Lu ZM, Zhang SY, et al. Differential expression profile of miRNAs associated with lymph node metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. The Journal of Practical Medicine, 2019, 35(15): 2447-2451. [许咪咪, 卢仲明, 张思毅, 等. 喉鳞状细胞癌淋巴结转移相关 miRNAs 差异表达谱分析 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(15): 2447-2451.]
- [6] Yan L, Yu MC, Gao GL, et al. MiR-125a-5p functions as a tumour suppressor in breast cancer by downregulating BAP1[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(11): 8773-8783.
- [7] Naidu S, Shi L, Magee P, et al. PDGFR-modulated miR-23b cluster and miR-125a-5p suppress lung tumorigenesis by targeting multiple components of KRAS and NF-kB pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15441.
- [8] Wang LB, Feng L, He J, et al. MiR-125a-5p inhibits the proliferation and invasion of breast cancer cells and induces apoptosis by targeting GAB2 [J]. Math Biosci Eng. 2019, 16(6): 6923-6933.
- [9] Hu X, Jiang H, Jiang X. Downregulation of lncRNA ANRIL inhibits proliferation, induces apoptosis, and enhances radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells through regulating miR-125a [J]. Cancer Biol Ther, 2017, 18(5): 331-338.
- [10] Krayem M, Sabbah M, Najem A, et al. The benefit of re-activating p53 under MAPK inhibition on the efficacy of radiotherapy in melanoma [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(8): 1093.
- [11] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [12] Tong QL, Shen ZS, Ying YY, et al. Long-term efficacy and influencing factors of surgical treatment for patients with laryngeal cancer [J]. Zhejiang Medical Journal, 2018, 40(23): 2521-2524. [童巧玲, 沈志森, 应焱燕, 等. 喉癌患者手术治疗的远期疗效及影响因素分析 [J]. 浙江医学, 2018, 40(23): 2521-2524.]
- [13] Tian QG, Tian RC, Liu Y, et al. The role of miR-144/GSPT1 axis in gastric cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(13): 4138-4145.
- [14] Handa H, Murakami Y, Ishihara R, et al. The role and function of microRNA in the pathogenesis of multiple myeloma[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(11): 1738.
- [15] Xu YP, Lin G, Sun XJ, et al. C-Met as a molecular marker for esophageal squamous cell carcinoma and its association with clinical outcome[J]. J Cancer, 2016, 7(5): 587-594.
- [16] Wei T, Zhu JQ. Advances of relationship between p53 gene family and thyroid cancer [J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2019, 26(11): 1372-1377. [魏涛, 朱精强. P53 基因家族与甲状腺癌的相关研究进展 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2019, 26(11): 1372-1377.]
- [17] Heo KS. Regulation of post-translational modification in breast cancer treatment[J]. BMB Rep, 2019, 52(2): 113-118.
- [18] Talib WH, Al Kury LT. Parthenolide inhibits tumor-promoting effects of nicotine in lung cancer by inducing p53-dependent apoptosis and inhibiting VEGF expression[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 1488-1495.
- [19] Qu CX, Liu Yh, Ge RR, et al. P53 protein expression and microsatellite instability in gastric carcinoma and their relationship with prognosis [J]. Journal of Chinese Oncology, 2019, 25(8): 698-702. [屈重行, 刘艳红, 葛瑞瑞, 等. 胃癌组织中 p53 蛋白表达和微卫星不稳定及其与预后的相关性研究[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(8): 698-702.]
- [20] Peng J, Li H, Chen J, et al. Differences in gene expression profile between vocal cord leukoplakia and normal larynx mucosa by gene chip [J]. J Otolaryngol Head Neck Surg, 2018, 47(1): 13.
- [21] Tian ZY, Yang CW, Cai ZC, et al. Radiosensitization of valproic acid to breast cancer cell MCF7 depends on tumor suppressor gene p53 [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2019, 33(4): 257-264. [田竹筠, 杨春旺, 蔡祖超, 等. 丙戊酸对乳腺癌 MCF7 细胞的放射敏感性依赖于抑癌基因 p53[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(4): 257-264.]
- [22] Qiu ZL, Jiang XP, Yuan XD, et al. Effect of NFBD1 depletion on chemoradiotherapy sensitivity of laryngeal carcinoma [J]. Chinese Journal of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, 2018, 18(5): 316-320, 324. [邱志利, 蒋晓平, 袁小东, 等. 抑制 NFBD1 表达对喉癌放疗敏感性影响的研究[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2018, 18(5): 316-320, 324.]