

STAT3 与 miR-21 的调控关系及其对舌鳞癌化疗敏感性的影响

刘晶,白丽,李宏,孙昕,冯琦

(河南科技大学临床医学院,河南科技大学第一附属医院,河南 洛阳 471003)

摘要: [目的] 探讨 STAT3 与 miR-21 的调控关系以及其对舌鳞癌细胞 TscCa 对顺铂(DDP)敏感性的影响作用。[方法] 体外培养 TscCa 细胞和 TscCa/DDPR 细胞,将细胞分为空白对照组、阴性对照组、WP1066 处理组、DDP 处理组和 WP1066+DDP 共处理组。采用 MTT 法和划痕实验检测 DDP 和/或 WP1066 对 TscCa 细胞和 TscCa/DDPR 细胞增殖和迁移的影响;采用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测不同处理方式 TscCa 细胞和 TscCa/DDPR 细胞 miR-21、STAT3、p-STAT3 的表达水平。[结果] 经不同浓度 DDP(0.25、1、4、16 μ g/ml)处理后,TscCa 细胞的增殖和迁移能力明显低于 TscCa/DDPR 细胞($P<0.05$),且具有剂量依赖性。TscCa 细胞中 miR-21、STAT3 表达量明显低于 TscCa/DDPR 细胞($P<0.05$)。WP1066 可以明显抑制 TscCa 细胞和 TscCa/DDPR 细胞的增殖和迁移活性,且两组细胞比较差异无统计学意义($P>0.05$)。经 WP1066 处理后,TscCa 细胞、TscCa/DDPR 细胞 miR-21 和 p-STAT3 表达水平均低于空白对照组($P<0.05$)。而 DDP 对 TscCa/DDPR 细胞 miR-21 和 p-STAT3 表达水平无明显影响,与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Pearson 相关性分析显示,miR-21 与 p-STAT3 的表达量呈正相关($r=0.999, P<0.05$)。[结论] STAT3/miR-21 过表达与舌鳞癌细胞对顺铂的耐药性相关,有可能成为舌鳞癌患者对化疗药物产生耐药性的潜在干预靶点。

关键词: miR-21;舌鳞癌;DDP;敏感性;STAT3

中图分类号: R739.86 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)06-0531-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.06.B008

Relationship of STAT3 and miR-21 Expression with Sensitivity to Cisplatin in Tongue Squamous Cell Carcinoma

LIU Jing, BAI Li, LI Hong, SUN Xin, FENG Qi

(Kaiyuan Hospital, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship of signal transducer and activators of transcription 3 (STAT3) and miR-21 expression and the sensitivity to cisplatin (DDP) in tongue squamous cell carcinoma. [Methods] Tongue squamous cell carcinoma TscCa cells and DDP-resistance TscCa cells (TscCa/DDPR) were cultured in vitro and divided into control group, negative control group, WP1066 treatment group, DDP treatment group and WP1066+DDP treatment group. The proliferation and metastasis ability of TscCa cells and TscCa/DDPR cells were detected by MTT and scratch healing assay, respectively. The mRNA and protein expressions of miR-21, p-STAT3, STAT3 in TscCa cells and TscCa/DDPR were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. [Results] The proliferation and metastasis ability of TscCa cells treated with DDP (0.25, 1, 4, 16 μ g/ml) were lower than those of TscCa/DDPR cells ($P<0.05$) in a dose-independent manner. The miR-21, STAT3 expressions in TscCa cells were lower than those in TscCa/DDPR cells($P<0.05$). There was no difference in the proliferation and metastasis between TscCa and TscCa/DDPR cells treated with WP1066($P>0.05$). And the miR-21 and p-STAT3 expressions in TscCa and TscCa/DDPR cells treated with WP1066 were lower than those in control group and negative control group ($P<0.05$). There was no difference in miR-21 and p-STAT3 expressions in TscCa/DDPR cells treated with DDP compared with control group ($P>0.05$). The miR-21 expression was positively correlated with p-STAT3($r=0.999, P<0.05$). [Conclusion] The down-regulation of miR-21/STAT3 may enhance the sensitivity of tongue squamous cell carcinoma to DDP.

Subject words: miR-21; tongue squamous cell carcinoma; cisplatin; sensitivity; STAT3

舌鳞癌是我国目前发病率最高的口腔鳞状细胞

癌,由于恶性程度和浸润程度高,而且解剖位置特殊,彻底手术切除较为困难,因此术后复发率和转移率较高^[1]。临床上主要采取以外科手术为基础的综合化疗序贯治疗方案。常用的化疗药物包括奥沙

通信作者: 刘晶,住院医师,硕士;河南科技大学第一附属医院开元院区口腔科,河南省洛阳市洛龙区关林路与学府街交叉口(471003),E-mail:lhwl40722@126.com

收稿日期: 2018-03-05; **修回日期:** 2018-05-07

利铂、顺铂、长春新碱、阿霉素等,但是长期化疗易导致肿瘤细胞产生耐药性,从而影响化疗效果^[2]。如何提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性一直是肿瘤治疗领域探讨的重点。信号转导与转录活化因子(signal transducer and activators of transcription 3, STAT3)属于 STAT 家族成员之一,多种受体酪氨酸激酶通过上调 STAT3 的磷酸化水平,参与调控肿瘤细胞的恶性生物学行为^[3]。miRNA 是一类非编码的小 RNA,参与了大量抑癌或致癌基因的负性调控,其中 miRNA-21 是发现较早的一类 miRNA,高表达于多种肿瘤细胞,发挥癌基因的作用^[4]。前期有生物信息学研究显示,miR-21 基因启动子区域有 STAT3 的结合位点可调控 miR-21 的表达^[5]。笔者通过探讨 miR-21 与 STAT3 的调控关系以及对舌鳞癌顺铂化疗敏感性的影响,旨在为降低舌鳞癌化疗耐药性、提高治疗效果提供潜在的干预靶点,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 受试细胞

人口腔鳞癌细胞株 TscCa 细胞购自 American Type Culture Collection 公司。TscCa/cisplatin resistance(TscCa/DDPR)由我院肿瘤内科惠赠,来自一例经 DDP 治疗后有初步临床反应继而发生进展的舌鳞癌患者。

1.2 主要试剂

顺铂(cisplatin, DDP)由齐鲁制药(海南)有限公司提供;STAT3 抑制剂 WP1066,德国 Calbiochem;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),美国 Sigma。

PCR 引物和小干扰 RNA 由上海生工生物工程有限公司合成并提供;miR-21 模拟物和抑制物以及阴性对照由上海吉玛技术制药有限公司提供;S-P 免疫组化试剂盒、cDNA 合成试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒:美国 OMEGA 生物公司;STAT3、p-STAT3 抗体购自美国 Abcam 公司;RPMI1640 细胞培养基:美国 Hyclone 公司;胰蛋白酶-EDTA 细胞消化液(0.25%):北京钮因华信科技发展有限公司;FBS 胎牛血清和链霉素-青霉素双抗:美国 ThermoFisher 公司;Trizo:美国 Invitrogen 公司;DEPC:美国 Sigma 公司;磷酸盐缓冲液、氯仿、异丙醇、无水乙醇:国药集团化学试剂有限公司;生理盐水:安徽双鹤药业有限

责任公司。

1.3 主要仪器

HERcell1501 型 CO₂ 细胞培养箱,美国 Thermo Forma 公司;5810R 型台式冷冻离心机,各种型号的移液枪,德国 Eppendorf 公司;JB-CJ-1500FX 超净工作台,苏州佳宝净化工程设备有限公司;实时定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;iMake 多功能酶标仪,日本 Bio-Rad 公司;CX41 倒置光学显微镜,日本 OLYMPUS 公司;FA1204B 电子分析天平,上海精科天美仪器有限公司;Amersham 电泳仪,瑞典 Bioscience 公司;恒温水浴摇床和 YCZ-40D 型转移电泳槽,北京六一仪器厂;ChemiGenius2 凝胶成像数码分析系统,美国 Syngene 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养

将 TscCa 细胞培养在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,将细胞置于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。24~48h 更换培养液,48h 传代一次。

1.4.2 实验分组

①空白对照组,不做任何处理;②阴性对照组,加入 DMSO 干预(12.4μl/4ml);③WP1066 处理组,采用 WP1066 DMSO 溶液(终浓度 4μmol/L)干预细胞;④DDP 处理组,采用 DDP 溶液(终浓度 4μg/ml)干预细胞;⑤WP1066+DDP 共处理组。

1.4.3 MTT 法检测细胞增殖

将不同处理方式的 TscCa 细胞和 TscCa/DDPR 细胞(1×10⁴个/孔)单层接种至 96 孔板中,置于 37℃,5%CO₂ 细胞培养箱中进行培养,每组设置 8 个平行孔,24h 后,加入(终浓度分别为 0.25、1、4、16μg/ml)DDP,培养 48h 后,每孔加入 20μl MTT,置于 37℃,5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 4h 后,弃除上清液,每孔加入 200μl DMSO,置于振荡器上震动 5min,置于显微镜下观察无紫色结晶物。将 96 孔板放置于 450 酶标仪上,检测波长为 570nm,参比波长为 450nm 处的吸光光度值(OD 值),计算平均值。

1.4.4 划痕实验

将细胞接种至 12 孔板中,待细胞汇合率为 50%~60%时,弃去培养基,用 200μl 黄枪尖划痕,加入新鲜培养基,每隔 24h 置于倒置显微镜下观察拍照。

1.4.5 提取总 RNA

①收集细胞 1×10¹⁰个,置于 EP 管中;②加入

1ml 预冷的 Trizol,充分混合均匀,静置 5~10min;③加入 200 μ l 氯仿,震荡 30s,静置 5~10min;④12 000rpm 离心,取上清;⑤加入 500 μ l 异丙醇,震荡 30s,静置 10min;⑥12 000rpm 离心,弃上清;⑦加入 1ml 75% 乙醇,震荡 30s,12 000rpm 离心,弃上清;⑧将 EP 管倒置于滤纸上,将 RNA 充分干燥;⑨加入 20 μ l DE-PC 水溶解沉淀,分装,置于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。采用凝胶电泳检测 RNA 分子量;采用分光光度计检测 RNA 浓度。

1.4.6 RNA 反转录

根据试剂盒说明书操作进行。将 cDNA 保存至 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.7 实时定量 PCR

将 20 μ l 反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 60min, 85 $^{\circ}$ C 5s,加入去离子水至 100 μ l,各反应孔取 2 μ l 进行 PCR。冰浴中配制 20 μ l PCR 反应体系,95 $^{\circ}$ C 30s 预变性,95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,循环 45 次。根据 NCBI 数据库获得的资料设计引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成并提供。

1.4.8 Western blot

提取蛋白样品;蛋白样品凝胶电泳;转膜;封闭;加入一抗孵育;加入二抗孵育;显影;采用化学发光法检测膜上的蛋白表达条带,以积分光密度(IOD)表示灰度值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理;方差齐性采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验,组间两两比较采用 LSD 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T_{scca} 细胞和 T_{scca}/DDPR 细胞对 DDP 的敏感性

经 MTT 法和划痕实验检测,经不同浓度 DDP(0.25、1、4、16 μ g/ml) 处理后,T_{scca} 细胞的增殖和迁移能力明显受到抑制,且随着 DDP 浓度升高,抑制活性越明显,但是未见 DDP 对 T_{scca}/DDPR 细胞增殖和迁移活性的抑制作用,两组细胞增殖和

迁移活性比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。见 Table 1。

2.2 T_{scca} 细胞和 T_{scca}/DDPR 细胞 miR-21、STAT3 表达的差异

RT-PCR 检测结果显示,T_{scca} 细胞 miR-21 表达量明显低于 T_{scca}/DDPR 细胞,差异有统计学意义(*P*<0.05);经 RT-PCR 和 Western blot 检测,T_{scca} 细胞 STAT3 mRNA 和蛋白表达量明显低于 T_{scca}/DDPR 细胞,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见 Figure 1。

2.3 DDP 和 WP1066 对 T_{scca} 细胞和 T_{scca}/DDPR 细胞增殖和迁移活性的影响

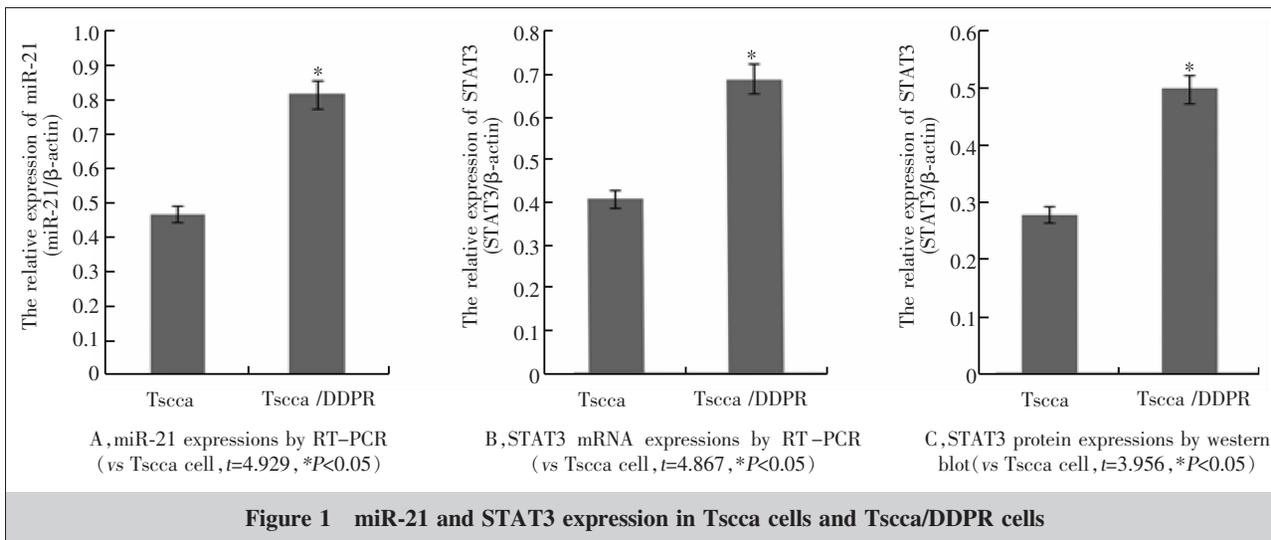
经 MTT 法和划痕实验检测,经不同干预方式处理 T_{scca} 细胞或 T_{scca}/DDPR 细胞 3d 后,T_{scca} 细胞的增殖和迁移能力明显受到抑制,且 WP1066 和 DDP 联合干预组较单一干预组抑制活性更明显,但是未见 DDP 对 T_{scca}/DDPR 细胞增殖和迁移活性的抑制作用,DDP 组和 WP1066+DDP 组 T_{scca} 细胞和 T_{scca}/DDPR 细胞增殖和迁移活性比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。WP1066 和 WP1066+DDP 联合干预对 T_{scca}/DDPR 细胞增殖和迁移活性都有明显的抑制作用,但是两种干预方式比较未见统计学差异(*P*>0.05)。见 Table 2。

2.4 WP1066 和 DDP 对 T_{scca} 细胞和 T_{scca}/DDPR 细胞 miR-21、STAT3 表达的影响

经 RT-PCR 检测,WP1066、DDP、WP1066+DDP 分别作用于 T_{scca} 细胞 miR-21 和 p-STAT3 表达水平明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05);而经 WP1066、WP1066+DDP 分别作用于 T_{scca}/DDPR 细胞 miR-21 和 p-STAT3 表达水平明显低于空白对照组、阴性对照组以及 DDP

Table 1 Effect of DDP on proliferation and metastasis of T_{scca} cells and T_{scca}/DDPR cells

Cells	DDP (μ g/ml)			
	0.25	1	4	16
OD value				
T _{scca} cell	0.994 \pm 0.023	0.789 \pm 0.025	0.542 \pm 0.019	0.380 \pm 0.007
T _{scca} /DDPR cell	1.176 \pm 0.017	1.128 \pm 0.021	1.121 \pm 0.014	1.092 \pm 0.022
<i>t</i>	20.123	32.834	77.580	97.525
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
24h migration distance (μ m)				
T _{scca} cell	127.42 \pm 18.36	112.83 \pm 14.15	94.39 \pm 13.08	79.25 \pm 8.41
T _{scca} /DDPR cell	135.56 \pm 22.11	132.62 \pm 18.43	127.94 \pm 21.16	121.67 \pm 17.25
<i>t</i>	0.896	2.693	4.265	6.990
<i>P</i>	0.382	0.015	0.001	<0.001



组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。经 Western blot 法检测,WP1066、DDP、WP1066+DDP 分别作用于 Tssca 细胞 p-STAT3 表达水平明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$); 而经 WP1066、WP1066+DDP 分别作用于 Tssca/DDPR 细胞 p-STAT3 表达水平明显低于空白对照组、阴性对照组以及 DDP 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见 Table 3 和 Figure 2。

2.5 miR-21 与 p-STAT3 表达的相关性

Pearson 相关性分析显示,miR-21 与 p-STAT3 表达呈正相关 ($r=0.999$, $P<0.05$)。见 Figure 3。

3 讨论

目前,临床上关

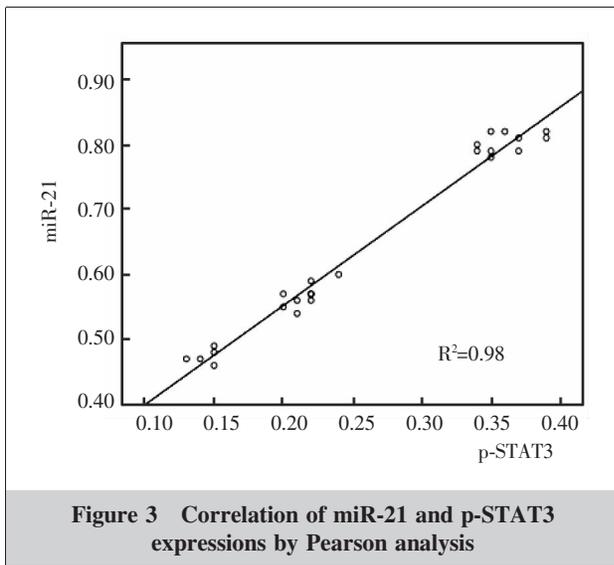
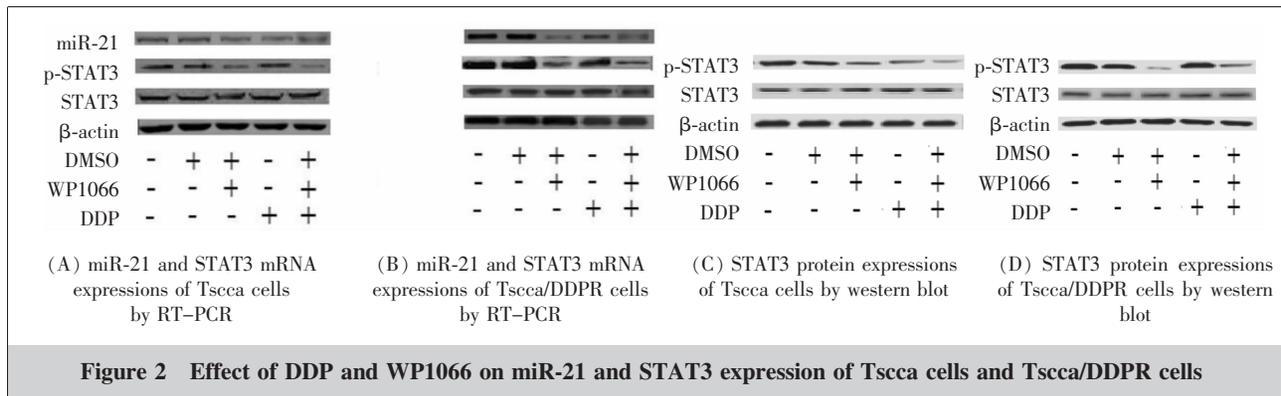
Table 2 Effect of DDP and WP1066 on proliferation and metastasis of Tssca cells and Tssca/DDPR cells

Cells	Control	DMSO	WP1066	DDP	WP1066+DDP
OD value					
Tssca cell	1.197±0.018	0.942±0.012	0.620±0.014	0.597±0.008	0.375±0.010
Tssca/DDPR cell	1.214±0.020	0.951±0.016	0.631±0.015	1.168±0.014	0.611±0.009
<i>t</i>	1.998	1.423	1.695	111.982	55.472
<i>P</i>	0.061	0.072	0.102	<0.001	<0.001
24h migration distance (μm)					
Tssca cell	127.86±21.45	114.38±22.07	91.45±16.27	89.53±15.34	71.79±11.54
Tssca/DDPR cell	128.94±23.19	114.16±19.85	90.88±13.46	110.62±16.95	86.92±14.36
<i>t</i>	0.108	0.023	0.085	2.917	2.597
<i>P</i>	0.915	0.982	0.933	0.009	0.018

Table 3 Effect of DDP and WP1066 on miR-21 and STAT3 expressions of Tssca cells and Tssca/DDPR cells

Groups	qRT-PCR			Western blot	
	miR-21	p-STAT3	STAT3	p-STAT3	STAT3
Tssca cell					
Control	1.00±0.11	1.00±0.12	1.00±0.07	1.00±0.10	1.00±0.18
Negative control	0.97±0.17	0.96±0.14	0.97±0.12	0.95±0.12	0.92±0.17
WP1066	0.68±0.16 ^a	0.61±0.09 ^a	0.98±0.14	0.70±0.13 ^a	0.93±0.2
DDP	0.66±0.14 ^a	0.67±0.15 ^a	0.96±0.10	0.78±0.10 ^a	0.95±0.18
WP1066+DDP	0.61±0.12 ^{ab}	0.54±0.12 ^{ab}	0.95±0.18	0.59±0.13 ^{ab}	0.91±0.19
<i>F</i>	17.112	27.930	0.231	21.429	0.371
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.826
Tssca/DDPR cell					
Control	1.00±0.07	1.00±0.12	1.00±0.09	1.00±0.11	1.00±0.09
Negative control	0.93±0.12	0.96±0.14	0.95±0.14	0.94±0.15	0.94±0.11
WP1066	0.52±0.11 ^{ab}	0.58±0.08 ^{ab}	0.97±0.16	0.60±0.10 ^{ab}	0.92±0.11
DDP	0.81±0.09 ^a	0.92±0.15	0.96±0.13	0.89±0.17 ^a	0.91±0.10
WP1066+DDP	0.45±0.09 ^{ab}	0.54±0.11 ^{ab}	0.95±0.12	0.51±0.12 ^{ab}	0.93±0.11
<i>F</i>	63.310	32.672	0.254	27.165	1.148
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.906	<0.001	0.346

Note: vs control group, ^a $P<0.05$; vs DDP treatment group, ^b $P<0.05$



于头颈部恶性肿瘤仍以外科手术切除为主,配合化、放疗辅助治疗,如何提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,尽量提高治疗效果,降低毒副作用,是当前肿瘤治疗领域关注的重点^[6]。顺铂是舌鳞癌患者最常用的一线化疗药物,但是仍有部分患者对顺铂易产生原发性或继发性耐药,从而影响治疗效果^[7]。大量研究证实,STAT3的磷酸化水平与舌鳞癌的发生、发展密切相关^[8]。正常生理状态下,STAT3的激活受到严格控制,而在肿瘤细胞中,STAT3一直处于激活状态,并参与调控癌基因、抑癌基因转录等生物学活动。Fasanaro等^[9]研究发现,STAT3与人口腔鳞状细胞癌的生物行为学和预后密切相关,有可能成为新的治疗靶点。笔者首先通过MTT法和划痕实验检测了DDP对Tssca细胞和Tssca耐药细胞株增殖和迁移活性的影响,结果显示,DDP可明显抑制Tssca细胞的增殖和迁移,且具有剂量依赖性,但是对于Tssca耐药细胞株增殖和迁移活性的影响并不明显。

近年来 MicroRNAs 的发现和深入研究为肿瘤的治疗提供了新的思路。miRNAs 作为内源性非编码小分子 RNA,可通过结合靶 mRNA 的 3'端非编码区,编码区或 5'非编码区,在转录后水平调节抑癌基因或癌基因的表达,抑制或降解靶 mRNA 的翻译,从而参与细胞凋亡、增殖、分化等多种病理生理过程^[10]。有研究显示,至少有一半以上的 miRNA 基因位于癌症相关的基因组区域或者脆性位点,发挥抑癌或促进癌症发展的作用^[11];其中 miR-21 是早期发现的一类具有癌基因活性的小 RNA,在很多恶性肿瘤细胞中呈高表达^[12]。目前,miR-21 已被用作预测肿瘤患者预后的重要标志物^[13]。

WP1066 是 JAK2/STAT3 抑制剂,可以抑制 STAT3 磷酸化,从而诱导恶性肿瘤凋亡^[14]。黄媛媛等^[15]的前期研究结果显示,WP1066 通过诱导 caspase 凋亡途径,影响人舌鳞癌细胞的增殖和凋亡。在本项实验中,WP1066 可以下调 STAT3 磷酸化水平,从而进一步调控 Tssca 细胞以及耐药细胞株的生物学行为。经 MTT 法和划痕实验结果显示,WP1066、DDP 都可以明显抑制 Tssca 细胞的增殖和迁移能力,且 WP1066+DDP 联合干预对 Tssca 细胞的增殖和迁移活性的抑制作用更明显;但是只有 WP1066 可以抑制 Tssca/DDPR 细胞的增殖和迁移能力,而 DDP 对 Tssca/DDPR 细胞的影响并不明显。笔者又进一步分析了 miR-21 和 p-STAT3 表达的相关性,结果显示,miR-21 与 p-STAT3 表达量呈正相关性。提示 WP1066 对 Tssca 敏感细胞株和耐药细胞株 p-STAT3 的表达水平都有明显的下调作用,同时也下调 miR-21 的表达,从而抑制肿瘤细胞的增殖和转移。

综上所述,miR-21 在 DDP 耐药细胞株中表达上调,可能与 DDP 耐药性相关;小分子抑制剂

WP1066 可以通过抑制 STAT3 磷酸化水平下调 miR-21 的表达,从而提高人舌鳞癌细胞对 DDP 的敏感性,提示 STAT3/miR-21 过表达与舌鳞癌细胞的顺铂耐药性相关,有可能成为舌鳞癌患者对化疗药物产生耐药性的潜在干预靶点。

参考文献:

- [1] Ying XF, Jiang L, Chen J. Surgical resection for pulmonary metastases from head and neck squamous cell carcinoma: current status and perspectives [J]. *Tumor*, 2017, 37(3): 306–312. [应小芳, 江亮, 陈健. 手术切除头颈部鳞癌肺转移瘤的现状和前景 [J]. *肿瘤*, 2017, 37(3): 306–312.]
- [2] Lu XG, Hu CS. Adjuvant chemoradiotherapy for postoperative head and neck squamous cell carcinoma [J]. *China Oncology*, 2017, 27(6): 463–470. [陆雪官, 胡超苏. 头颈部鳞癌术后辅助放化疗的研究现状 [J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(6): 463–470.]
- [3] Chen X, Wang L, Wang W, et al. B7-H4 facilitates proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells through promoting interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 pathway activation. [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(7): 944–954.
- [4] Ji LF, Gan YH, Yu GY. Relationships between microRNA expressions and prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma and the mechanisms microRNA regulating tongue squamous cell carcinoma biological behavior [J]. *J of Peking University (Health Science)*, 2016, 48(1): 5–9. [贾凌飞, 甘业华, 俞光岩. MicroRNA 表达与舌鳞癌患者预后的关系及其调控舌鳞癌生物学行为的机制 [J]. *北京大学学报*, 2016, 48(1): 5–9.]
- [5] Bu LL, Zhao ZL, Liu JF, et al. STAT3 blockade enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic agents by eradicating head neck stemloid cancer cell [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 41944–41958.
- [6] Sun W1, Qiu Z2, Tan W, et al. The influence of marital status on survival in patients with oral tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 82092–82102.
- [7] Ausoni S, Boscolo-Rizzo P, Singh B, et al. Targeting cellular and molecular drivers of head and neck squamous cell carcinoma: current options and emerging perspectives [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(3): 413–426.
- [8] Li DL, Zhou YB, Han C, et al. Small interfering RNA targeting STAT3 enhances the drug susceptibility of adriamycin in breast cancer cells [J]. *Chin Pharma J*, 2016, 51(11): 896–903. [李朵璐, 周玉冰, 韩超, 等. 转录信号转导子与激活子 3 小分子干扰 RNA 增强乳腺癌对多柔比星的药物敏感性 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(11): 896–903.]
- [9] Fasanaro E, Staffieri C, Cappellesso R, et al. Prognostic significance of serine-phosphorylated STAT3 expression in pT1-T2 oral tongue carcinoma [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2015, 8(3): 275–280.
- [10] Boldrup L, Troiano G, Gu X, et al. Evidence that circulating proteins are more promising than miRNAs for identification of patients with squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(61): 103437–103448.
- [11] Zhang Y, Guan DH, Bi RX, et al. Prognostic value of microRNAs in gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 55489–55510.
- [12] Singh M, Garg N, Venugopal C, et al. STAT3 pathway regulates lung-derived brain metastasis initiating cell capacity through miR-21 activation [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 27461–27477.
- [13] Kao HW, Pan CY, Lai CH, et al. Urine miR-21-5p as a potential non-invasive biomarker for gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 56389–56397.
- [14] Honda S, Sadatomi D, Yamamura Y, et al. WP1066 suppresses macrophage cell death induced by inflammasome agonists independently of its inhibitory effect on STAT3 [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(3): 520–527.
- [15] Huang YY, Zhou X, Liu AQ, et al. Signal transducer and activator of transcription-3 inhibitor WP1066 affects human tongue squamous cell carcinoma proliferation and apoptosis in vitro and in vivo [J]. *Clin J Stomatol*, 2014, 95(5): 308–313. [黄媛媛, 周旋, 刘爱琴, 等. 信号传导与转录活化因子 3 抑制剂 WP1066 影响人舌鳞状细胞癌增殖与凋亡的研究 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2014, 95(5): 308–313.]