

健脾清热活血方介导 microRNA - 222 - 3p 调控 TGF - β 1、CDKN1B/p27 表达防治结肠癌的离体研究

张涛¹ 张馨月² 卢鑫² 黄晓燕³ 林逸婷²

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530000;

2. 广西中医药大学, 广西南宁 530000; 3. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530000)

摘要:目的 通过检测健脾清热活血方基于 microRNA - 222 - 3p 调控 TGF - β 通路对结肠癌 HCT - 116 细胞迁移的变化以及 TGF - β 1、CDKN1B/p27 的表达, 探讨该方防治结肠癌的效用及可能机制。方法 参照血清药理学方法, 制备大鼠含药血清。应用 RNAi 技术构建稳定沉默 miR - 222 结肠癌 HCT - 116 细胞系。离体实验随机分为空白对照组 (HCT - 116)、阴性对照组 (NC)、阳性对照组 (miR - 222 - 3p 沉默)、治疗组 (miR - 222 - 3p 沉默 + 低/中/高剂量中药)。Transwell 法检测细胞迁移能力, 应用现代分子生物学技术检测 TGF - β 1、CDKN1B/p27 表达。结果 成功构建 TUD - hsa - miR - 222 - 3p Inhibitor 慢病毒载体并获得 miR - 222 稳定沉默的结肠癌 HCT - 116 细胞系, 与正常组及 NC 组对比, miR - 222 沉默后 HCT - 116 细胞迁移能力明显下降, 有显著差异 ($P < 0.05$); 在治疗组中 HCT - 116 细胞迁移数目较 sh - miR222 - 3p 组减少更为显著 ($P < 0.05$)。对于 TGF - β 1/CDKN1B/p27mRNA 表达, 与阳性对照组比较, 治疗组 CDKN1B/p27mRNA 表达下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。WB 结果显示, 与阳性对照组相比, 治疗组 TGF - β 1/CDKN1B/p27 蛋白表达均下调, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 健脾清热活血方可能通过抑制 miRNA - 222 - 3p 减少 TGF - β 1、CDKN1B/p27 表达, 降低细胞迁移能力, 诱导结肠癌细胞凋亡, 达到防治结肠癌的效用。

关键词:健脾清热活血方; microRNA - 222 - 3p; RNA 干扰; 转化生长因子 - β 1; 结肠癌

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.08.20

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805(2021)08-1863-05

近年来, 结肠癌病死率持续攀升且呈早发表现^[1]。根据大规模流行病学研究发现, 结肠癌在世界范围内的发病率约为 6.1%, 死亡率约为 9.2%, 死亡率位居全球癌症死亡总数的第二位^[2]。前期课题组研究认为, 结肠癌基本病机为本虚标实, 虚实夹杂, 以“脾胃虚弱为本、湿热瘀毒为标”贯穿始终, 治疗上应以健脾清热活血为基本大法^[3]。课题组收集了 6 例结肠癌患者和 6 例健康志愿者的结肠组织黏膜, 利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 基因芯片检测其基因表达谱的表达情况, 发现 miRNA - 222 - 3p 为脾虚湿热型结肠癌中上调 Top10 的 microRNAs, 且在差异表达 microRNAs 靶基因功能富集分析及 pathway 分析中发现 miRNA - 222 - 3p 参与调节结肠癌细胞生长发育、TGF - β 信号通路等。基于上述研究, 课题组采用慢病毒转染技术成功构建了稳定沉默 miRNA - 222 - 3p 结肠癌 HCT - 116 细胞系, 将健脾清热活血方含药血清作用于稳定沉默 miRNA - 222 - 3p - HCT - 116 细胞系, 观察健脾清热活血方介导 miRNA - 222 - 3p 调控 TGF - β 信号通路防治结肠癌的可能机制, 现汇报如下。

1 材料

1.1 动物与细胞株 人结肠癌 HCT - 116 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所 (中国上海), 并由本实验室长期保存。293T 细胞 (人胚肾细胞) 购自中国科学院细胞库。SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (200 \pm 20) g, 购自广西医科大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (桂) 2009 - 0002, 实验动物合格证号: 0001869。

收稿日期: 2021-03-30; 修订日期: 2021-08-20

基金项目: 广西自然科学基金 (2018GXNSFAA281042);

广西中医药大学一流学科项目 (2018XK082 2019XK164);

广西中医药大学广西研究生创新计划项目 (xjyb097)

作者简介: 张涛 (1976-), 男 (汉族), 江西井冈山人, 广西中医药大学附属瑞康医院主任医师, 博士学位, 主要从事中医药治疗消化系统疾病研究工作。

1.2 药物与试剂 健脾清热活血方由救必应 15g, 水蛭 10g, 三七 10g, 白术 10g, 白芍 15g, 炙甘草 6g 组成, 专人对组成药味进行鉴定评价, 确保药材质量规范化, 该中药饮片来源于广西中医药大学第一附属医院中药房。HCT - 116 细胞培养相关试剂: 慢病毒载体 (GenePharma 提供的重组 Lentivirus 颗粒), LipofectamineTM 2000 (invitation lipo2000), 重组穿梭质粒和包装质粒 pGag/Pol、pRev、pVSV - G 由广州铭善上生物公司构建制备, Puromycin Dihydrochloride (Thermo 公司提供, 货号: A11138 - 03)。Hepes AM-RESCO 7365 - 45 - 9, LipofectamineTM 2000 转染试剂, Polybrene Sigma H9268, T4 DNA Ligase 酶 (购于 TaKaRa 公司, 货号: D2011A), 氨苄青霉素, DNA 凝胶回收试剂盒 (DONGSHENG BIOTECH)。Anti - TGF beta - 1 抗体 Rabbit (ab92486, 购自 abcam), Anti - p27 KIP 1 antibody [SX53G8] Rabbit (ab193379, 购自 abcam); Rabbit Anti - Mouse IgG (6170 - 05, 购自 southern biotech), Goat Anti - Rabbit IgG (4050 - 05, 购自 southern biotech); 过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG (BA1060)、过氧化物酶标记兔抗大鼠 IgG (BA1058) 均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 主要仪器 洁净工作台 (苏州安泰, SW - CJ - IFD), 细胞恒温培养箱 (Thermo scientific, HERACELL150i), 低速离心机 (中佳, SC3614), 倒置光学显微镜 (OLYMPUS CKX41, U - CTR30 - 2), 倒置荧光显微镜 (Leica, DMI6000B), 定量 PCR 仪 (ABI PRISM[®] 7500 实时 PCR 系统) 来自美国加州福斯特城的应用生物系统公司, Transwell 细胞培养板 (BD, REF353097), 软件分析 (ImageJ 生产商 Java 型号: ImageJ 1.4)。ECL 成像仪购自基因公司, NanoDrop2000 分光光度计购自 Thermo 公司。

2 方法

2.1 含药血清的制备 根据课题组前期研究基础^[3], 选择 SPF 级雄性 SD 大鼠, 采用血清药理学方法, 制备大鼠含药血清。参照公式: 给药剂量 = 临床常用量 \times 动物等剂量系数 \times 培养液内稀释度 (动物等效剂量 \times 培养基内稀释浓度)。置于 - 20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2 构建稳定沉默 miR - 222 - 3p - HCT - 116 结肠癌细胞系 根据 shRNA 引物设计原则,设计并合成 miR - 222 - shRNA 序列,应用 TuD RNA(Tough Decoy RNA) 的设计方法构建 TUD - hsa - miR - 222 - 3p Inhibitor 慢病毒载体。plvx - shRNAPuro 载体经 XhoI 与 EcoRII 双酶切后,在 T4 DNA Ligase 连接酶的作用下与双链 miR - 222 DNA 于 16° C 进行连接反应 1h,将连接产物与 DH5 α 感受态细胞混匀发生产物转化,提取质粒,挑取若干阳性单克隆质粒进行测序验证。将含目的序列的穿梭质粒和包装质粒(pGag/Pol, pRev, pVSV - G) 进行高纯度无内毒素抽提,转染 293T 细胞,制备高滴度慢病毒浓缩液。Polybrene(6 μ g/ml) 感染 HCT - 116 细胞筛选最佳 MOI 后,将慢病毒感染 HCT - 116, Puro - mycin 筛选稳转细胞系。取阳性克隆细胞在倒置荧光显微镜下观察细胞 GFP 荧光表达情况,评价感染效率,RT - PCR 检测转染后 miR - 222 表达,以测定是否成功构建稳定沉默 miR - 222 结肠癌 HCT - 116 细胞系。

2.3 细胞培养及分组干预 以上述方法构建的稳定沉默 miR - 222 - 3p - HCT - 116 结肠癌细胞系为实验对象,分为空白对照组(HCT - 116 cell)、阴性对照组(NC)、阳性对照组(miR - 222 - 3p 沉默)、治疗组(miR - 222 - 3p 沉默 + 低/中/高剂量中药) 六组。空白对照组为未经任何特殊处理的 HCT - 116 细胞,阴性对照组为转染空序列慢病毒载体的细胞。除空白对照组及阴性对照组外,其余各组均转染稳定沉默 miRNA - 222 - 3p 慢病毒载体。治疗组分别加入用培养液调至 2.5%、5%、10% 浓度的健脾清热活血方含药血清,即中药低、中、高剂量组。六组均在完全培养基(10% FBS + 1% 青链霉素 + 89% RPMI - 1640) 中培养。

2.4 Transwell 检测细胞迁移能力 将悬浮于无血清培养基中的细胞接种于 Transwell 细胞培养板上室,细胞浓度为 1×10^5 ,下室加入含 10% FBS 的完全培养基,进行迁移实验。置于细胞培养箱孵育 48h 后,细胞向细胞膜的另一侧迁移,用棉签小心地将未穿过的细胞从过滤器的上表面除去,1% 结晶紫染色 10min,显微镜下计数并拍照,取平均值。

2.5 qRT - PCR 检测细胞 TGF - β 1、CDKN1B/p27 的 mRNA 表达 提取各组细胞总 RNA,cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。用 SYBR Green qPCR SupreMix Ex Taq 和定量 PCR 仪进行定量实时聚合酶链反应(qRT - PCR)。基因特异性引物由 Genecem 设计合成,如表 1 所示。基因 mRNA 水平的相对定量归一化为 U6 和 18s mRNA 水平,并用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算。

表 1 RT - PCR 引物序列

Sequence name	Primer sequence	product length /bp
miR - 222 RT primer	5' - CTCAACTGCTGCTCGTGGACTCG - GCAATTCAGTTGAGACCCAGTA - 3'	71
miR - 222 forward primer	5' - AACTCCAGCTGGGAGCTACATCTG - GCTACTG - 3'	
miR - 222 reverse primer	5' - CTCAACTGCTGCTCGTGG - 3'	
U6 RT primer	5' - AACGCTTCACGAATTTGCGT - 3'	94
U6 forward primer	5' - CTCGCTTCGGCAGCAC - 3'	
U6 reverse primer	5' - AACGCTTCACGAATTTGCGT - 3'	
TGFB1 - F	5' - TGGACATCAACGGGTTCACT - 3'	263
TGFB1 - R	5' - GAAGTTGGCATGGTAGCCCT - 3'	
CDKN1B - F	5' - AAGCACTGCAGAGACATGGA - 3'	130
CDKN1B - R	5' - TGTAGTAGAACTCGGGCAAGCT - 3'	
18s - F	5' - CCTGGATACCGCAGCTAGGA - 3'	112
18s - R	5' - GCGGCCAATACGAATGCCCC - 3'	

2.6 Western Blotting 检测细胞 TGF - β 1、CDKN1B/p27 的蛋白表达 PBS 清洗各组细胞,抽提总蛋白。BCA 法测量蛋白浓度。凝胶电泳 SDS - PAGE 分离蛋白,转移至 PVDF 膜。TBST 封堵斑点 1h。室温下加入按 1: 1000 稀释过的一抗于 4° C 孵育过夜,

TBST 清洗 3 次,分别加入二抗稀释液室温孵育 1h,TBST 洗膜 5min \times 3 次,蒸馏水漂洗 2min \times 3 次,加入化学发光试剂(ECL) 进行显影,读取灰度值。

2.7 统计学分析 应用 GraphPad PrismVersion8. 2. 1 统计软件,所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异分析采用 *t* 检验。 $P < 0. 05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 成功构建稳定沉默 miR - 222 结肠癌 HCT - 116 细胞系 镜下观察发现:与 HCT - 116 - NC 组相比,HCT - 116 - hsa - miR - 222 Inhibitor 组镜下细胞大面积发出了绿色荧光,转染效率达 80% 以上,表明慢病毒转染成功并稳定表达(图 1、图 2)。应用 RT - PCR 技术检测慢病毒感染后的 HCT - 116 细胞,发现 miR - 222 基因的相对表达量降低了 53. 42%,表明 TUD - hsa - miR - 222 - 3p Inhibitor 慢病毒载体有效抑制 miR - 222 表达(图 3、图 4)。综上,TUD - hsa - miR - 222 - 3p Inhibitor 慢病毒载体构建成功并且获得了 miR - 222 稳定沉默的结肠癌 HCT - 116 细胞系。

3.2 健脾清热活血方对各组结肠癌 HCT - 116 细胞迁移能力的影响 通过检测各组穿过 PET 膜的细胞数,可评估其细胞迁移能力。细胞迁移实验结果显示:HCT - 116 细胞迁移数量在阳性对照组(sh - microRNA - 222 - 3p) 中比在空白对照组和 sh - NC 组中明显减少,差异有统计学意义($P < 0. 05$);在治疗组中 HCT - 116 细胞迁移数目较阳性对照组减少更显著($P < 0. 05$)(图 5)。表明健脾清热活血方与稳定沉默 miRNA - 222 - 3p 可协同抑制 HCT - 116 细胞迁移。

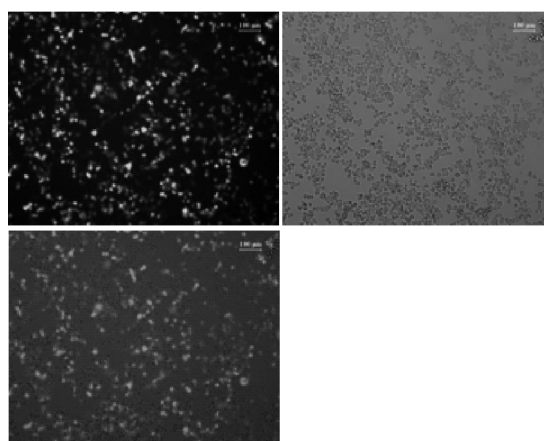


图 1 HCT - 116 NC 稳定细胞株(10 \times 10 拍照)

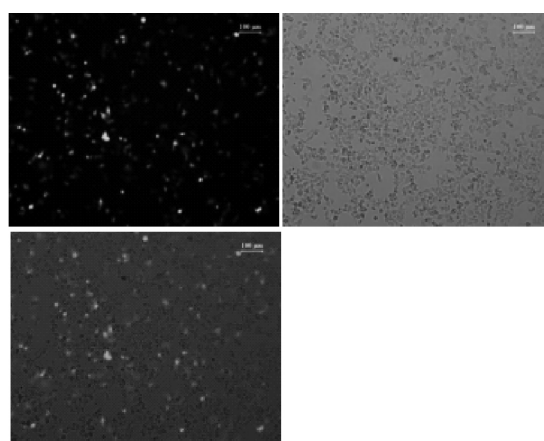
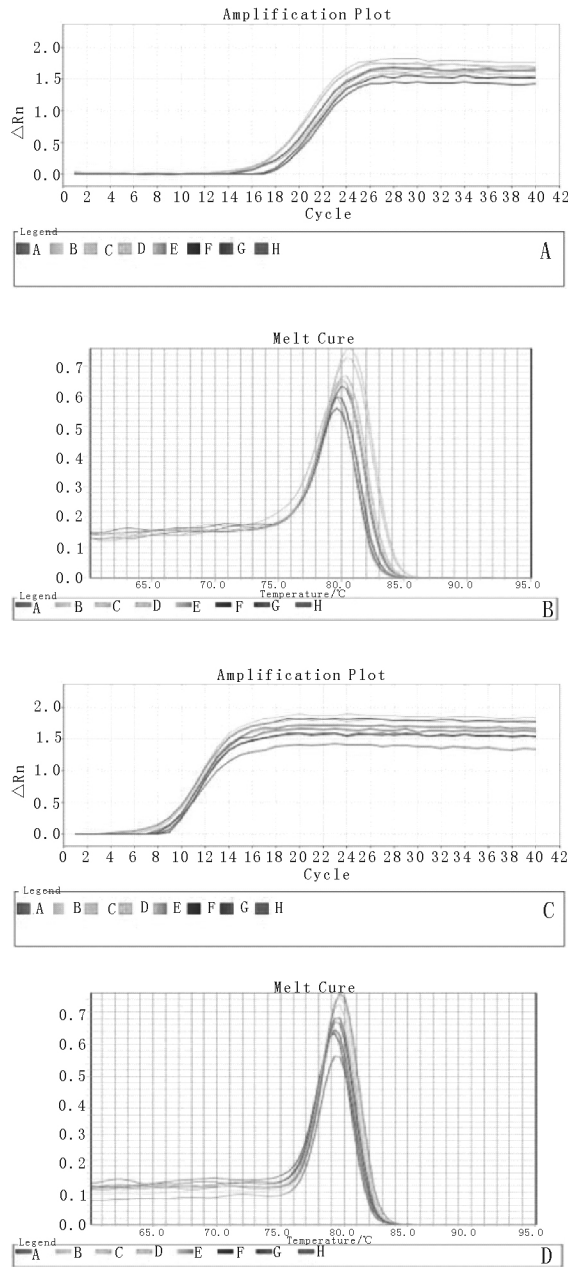


图 2 HCT - 116 - hsa - miR - 222 Inhibitor 稳定细胞株(10 \times 10 拍照)



A: miR-222 扩增曲线 B: miR-222 熔解曲线
C: U6 扩增曲线 D: U6 熔解曲线
图 3 miR-222、U6 扩增及熔解曲线

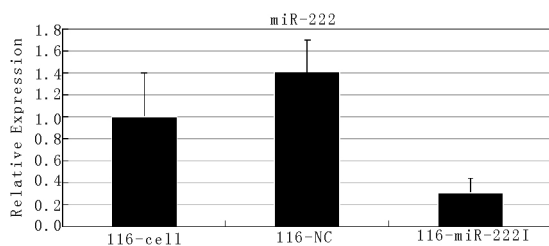
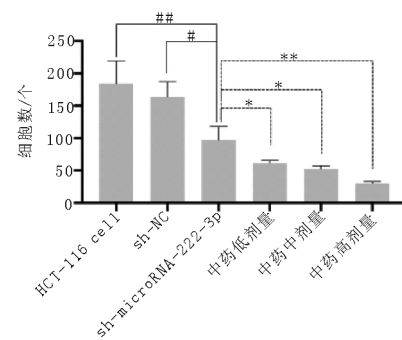
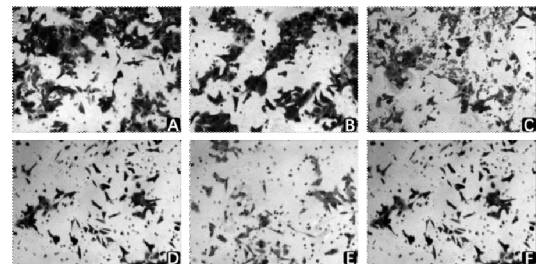


图 4 转染慢病毒后各组细胞 miR-222 的表达水平

3.3 qRT-PCR 检测健脾清热活血方对各组人结肠癌 HCT-116 细胞 TGF-β1/CDKN1B/p27 mRNA 表达水平的影响 为了进一步探讨沉默 miRNA-222-3p 对结肠癌细胞系 HCT-116

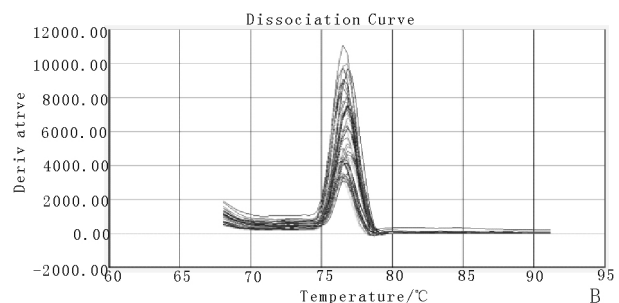
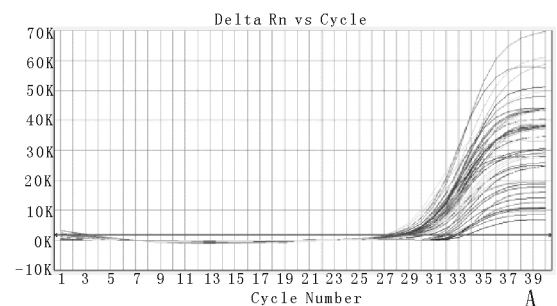
调控的机制 我们检测了稳定沉默 miRNA-222-3p 对某些细胞周期相关基因表达的影响。结果提示,与空白对照组、阴性对照组 (sh-NC) 相比,阳性对照组 (sh-microRNA-222-3p) 中 TGF-β1 和 CDKN1B/p27 的 mRNA 表达降低,经统计学分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗组与阳性对照组比较, TGF-β1 和 CDKN1B/p27 的 mRNA 表达明显降低,且中药高剂量组降低最为显著 ($P < 0.05$) (图 6、图 7)。

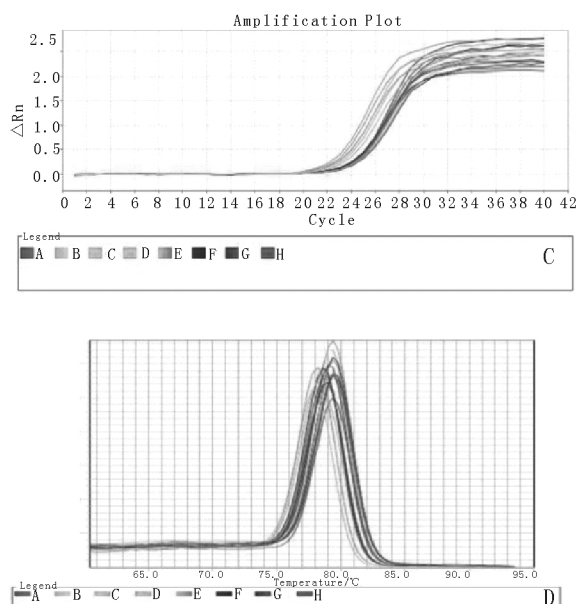


A. HCT-116 cell 组; B. sh-NC 组; C. sh-microRNA-222-3p 组;
D. 中药低剂量组; E. 中药中剂量组; F. 中药高剂量组。

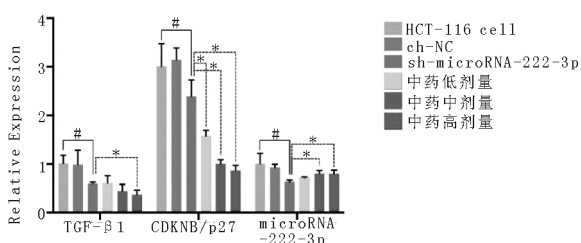
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与空白对照组或与 sh-NC 组比较有显著性差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 sh-microRNA-222-3p 组比较有显著性差异

图 5 sh-microRNA-222-3p 及健脾清热活血方对各组细胞迁移的影响



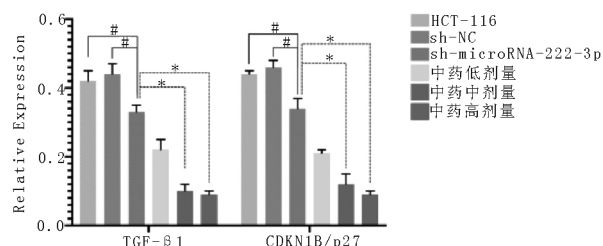
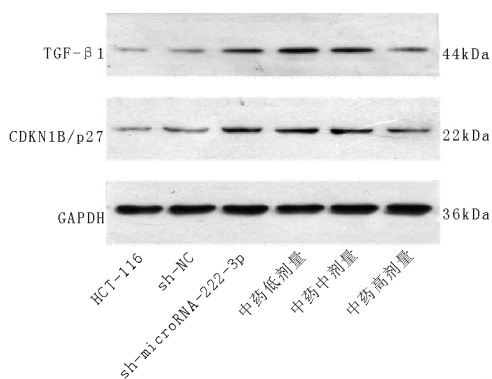


A: TGF-β1 扩增曲线 B: TGF-β1 熔解曲线
C: CDKN1B 扩增曲线 D: CDKN1B 熔解曲线
图 6 TGF-β1、CDKN1B 扩增、熔解曲线(三次重复)



$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 与空白对照组或
与 sh-NC 组比较有显著性差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,
与 sh-microRNA-222-3p 组比较有显著性差异
图 7 健脾清热活血方及稳定沉默 miR-222
对各组细胞 TGF-β1 和 CDKN1B/p27 mRNA 表达的影响

3.4 Western Blot 检测健脾清热活血方对各组人结肠癌 HCT-116 细胞 TGF-β1/CDKN1B/p27 蛋白表达水平的影响 TGF-β1、CDKN1B/p27 Western blot 结果显示:与空白对照组、阴性对照组(sh-NC)比较,阳性对照组蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组与阳性对照组相比,蛋白表达明显降低,且中药高剂量组降低最为显著($P < 0.05$)(图 8)。



$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 与空白对照组或
与 sh-NC 组比较有显著性差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,
与 sh-microRNA-222-3p 组比较有显著性差异
图 8 健脾清热活血方及稳定沉默 miR-222
对各组细胞 TGF-β1 和 CDKN1B/p27 蛋白表达的影响

4 讨论

迄今为止,我国结肠癌的死亡率依然高居不下,尤其是炎症相关性结肠癌,作为溃疡性结肠炎的重要并发症,其死亡率占 15%^[4],这可能与尚无明确的靶向治疗药物相关,且耐药是严重的治疗障碍之一^[5]。目前,中药复方在肿瘤综合治疗中的地位及作用已得到认可,但其确切机制仍需进一步研究,健脾清热活血方是在全国名老中医劳绍贤教授的指导下,精心裁制而成,其临床疗效确切^[6-8]。课题组前期已经证实健脾清热活血方可介导 PI3K 通路,调控磷酸化 β-catenin 核内转录,达到防治结肠癌的效用,并且通过基因芯片发现 miRNA-222-3p 在脾虚湿热型结肠癌中高表达,参与调节结肠癌细胞生长发育、TGF-β 信号通路等,据此推测 miRNA-222-3p 是结肠癌发展进程中的一个关键基因,起到肿瘤促进作用。于是本实验进一步分析了健脾清热活血方对稳定沉默 miRNA-222-3p 后结肠癌 HCT-116 细胞的影响。

多种证据表明,miRNAs 广泛参与了多种生命进程,包括影响细胞周期以及参与肿瘤的发生^[9]。miRNAs 与目标基因 3' UTR 端结合,调节其蛋白表达水平而显著影响肿瘤细胞的增殖以及耐药性^[10]。其中,miR-222 的过表达与多种恶性肿瘤预后呈负相关^[11-13]。miRNA-222-3p 基因簇位于 X 染色体 p113 位点,对炎症相关性结肠癌的负性调控作用相对明显。有研究显示,过表达的 miRNA-222-3p 可促进结肠癌细胞的侵袭和迁移,而抑制 miRNA-222-3p 的表达能阻止癌细胞扩散^[14]。Liu Sanhong 等^[15]发现在人结肠癌组织中,miR-222 表达水平高于非肿瘤性结肠组织,miR-222 抑制剂对结肠癌细胞的增殖和集落形成有明显的抑制作用。TGF-β 信号通路是调节细胞周期的关键通路,参与血管生成和炎症反应,在结肠癌的发展变化中至关重要,尤其是炎症相关性结肠癌^[16]。在正常细胞中,该通路抑制细胞生长和肿瘤的发生,但随着肿瘤的进展,TGF-β 能促进肿瘤细胞增殖和侵袭^[17]。TGF-β1 作为 TGF-β 的主要存在形式,与受体结合后,磷酸化下游的细胞信号传导物质 Smad2 蛋白,并转移进入细胞核,诱导 CDKN1B/p27 蛋白的表达。CDKN1B/p27 能抑制 Cyclin E 和 Cyc A 与 Cdk2 的复合物活性,限制 G1-S 转换,在生理上控制细胞周期的进展^[18]。miRNA-222-3p 已被证实参与靶向 TGF-β 通路^[19],但是关于健脾清热活血方介导 miRNA-222-3p 调控 TGF-β 通路参与结肠癌相关机制的研究还鲜有报道。

本研究探讨了 miRNA-222-3p 在结肠癌中的生物学效用,并确定 miRNA-222-3p 的潜在靶基因,我们将成功构建的稳定

沉默 miRNA - 222 - 3p 慢病毒载体转染结肠癌 HCT - 116 细胞系后发现: 与空白对照组、阴性对照组相比, 转染稳定沉默 miRNA - 222 - 3p 慢病毒载体的 HCT - 116 细胞迁移能力减弱, TGF - β 1 和 CDKN1B/p27 表达降低, 这与先前的推测一致, 表明下调 miRNA - 222 - 3p 可能是治疗结肠癌的潜在策略。我们通过观察健脾清热活血方介导 miRNA - 222 - 3p 调控 TGF - β 通路相关靶蛋白在结肠癌中的表达水平, 发现与阳性对照组相比, 治疗组可进一步降低 TGF - β 1、CDKN1B/p27 表达, 且呈浓度依赖性, 充分证明了本方能下调 miRNA - 222 - 3p 从而减少 TGF - β 1、CDKN1B/p27 表达, 降低细胞迁移能力。综上, 我们有理由相信健脾清热活血方具有明确的减毒增效作用, 能多靶点、多环节协同发挥疗效。

参考文献:

- [1] Loomans - Kropp HA, Umar A. Increasing Incidence of Colorectal Cancer in Young Adults [J]. J Cancer Epidemiol, 2019, 2019: 9841295.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clinicians, 2018, 68 (6): 394.
- [3] 张涛, 陈玉, 王小平, 等. 基于 PI3K/Akt 通路探讨健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡、周期及 P - β - catenin 表达的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(7): 1618.
- [4] Mackiewicz T, Sowa A, Fichna J. Biomarkers for early detection of colitis - associated colorectal cancer - current concepts, future trends [J]. Curr Drug Targets, 2021, 22(1): 137.
- [5] Matsunaga T, Okumura N, Saito H, et al. Significance of aldo - keto reductase 1C3 and ATP - binding cassette transporter B1 in gain of irinotecan resistance in colon cancer cells [J]. Chem Biol Interact, 2020, 332: 109295.
- [6] 李锦颜, 陈玉, 张涛, 等. 健脾清热活血方调控 PGRP - 3、PGRP - 4、IL - 22 防治溃疡性结肠炎研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(7): 495.
- [7] 李华燕, 张涛, 张颖芹. 健脾清热活血方与美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的对比研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(4): 227.
- [8] 王喜周, 张涛, 陈远能, 等. 健脾清热活血类方药介导 β - catenin、C - myc 表达干预溃疡性结肠炎相关癌变研究 [J]. 中成药, 2012, 34(2): 226.
- [9] Rokavec M, Horst D. Cellular Model of Colon Cancer Progression Reveals Signatures of mRNAs, miRNA, lncRNAs, and Epigenetic Modifications Associated with Metastasis [J]. Cancer Res, 2017, 77(8): 1854.
- [10] Simonson B, Das S. MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? [J]. Mini Rev Med Chem, 2015, 15(6): 467.
- [11] Yang K, Chen Y, Cui Z, et al. MicroRNA - 222 - 3p participates in the development of oral squamous cell carcinoma by targeting CDKN1B [J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(7): 621.
- [12] Tan X, Tang H, Bi J, et al. MicroRNA - 222 - 3p associated with Helicobacter pylori targets HIPK2 to promote cell proliferation, invasion, and inhibits apoptosis in gastric cancer [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(7): 5153.
- [13] Zhao L, Quan J, Li Z, et al. MicroRNA2223p promotes tumor cell migration and invasion and inhibits apoptosis, and is correlated with an unfavorable prognosis of patients with renal cell carcinoma [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(1): 525.
- [14] Gao H, Cong X, Zhou J. MicroRNA - 222 influences migration and invasion through MIA3 in colorectal cancer [J]. Cancer Cell International, 2017, 17: 78.
- [15] Liu S, Sun X, Wang M, et al. A microRNA 221 - and 222 - mediated feedback loop maintains constitutive activation of NF κ B and STAT3 in colorectal cancer cells [J]. Gastroenterology, 2014, 147(4): 847.
- [16] Slattery ML, Wolff RK, Lundgreen A. A pathway approach to evaluating the association between the CHIEF pathway and risk of colorectal cancer [J]. Carcinogenesis, 2015, 36(1): 49.
- [17] Perrot - Applanat M, Vacher S, Pimpie C, et al. Differential gene expression in growth factors, epithelial mesenchymal transition and chemotaxis in the diffuse type compared with the intestinal type of gastric cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 18(1): 674.
- [18] Bencivenga D, Caldarelli I, Stampone E, et al. p27Kip1 and human cancers: A reappraisal of a still enigmatic protein [J]. Cancer Lett, 2017, 403: 354.
- [19] Ouyang Ying, Jiang Fangfang, Zeng Binghui, et al. miR - 222 knock-down suppresses epithelial - to - mesenchymal transition in human oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(11): 11251.