

和厚朴酚通过上调 miR-99a/b 抑制 HeLa 细胞增殖和侵袭

徐雅杰 张志强 于 鹤

摘 要 **目的** 探究和厚朴酚对宫颈癌 HeLa 细胞增殖和侵袭的影响,并初步探讨相关分子机制。**方法** 将培养的对数期的人宫颈癌 HeLa 细胞分为对照组、Scramble 组、miR-99a/b mimic 组、和厚朴酚高、中、低剂量组。MTT 实验用于检测不同干预对 HeLa 细胞增殖的影响,Transwell 小室用于测定 HeLa 的侵袭能力,实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 用于检测细胞中 miR-99a、miR-99b 的表达情况,蛋白免疫印迹 (WB) 检测细胞中 cyclin D1、MMP7 蛋白表达。**结果** 和厚朴酚高、中、低剂量组细胞增殖率和侵袭细胞数均明显低于对照组和 DMSO 溶剂组 ($P < 0.05$),并呈剂量依赖性。mimic 组和厚朴酚高、中、低剂量组 miR-99a 和 miR-99b 表达水平明显高于对照组和 Scramble 组 ($P < 0.05$);随着和厚朴酚剂量的增加,HeLa 细胞中 miR-99a 和 miR-99b 表达水平逐渐升高。和厚朴酚高、中、低剂量组 miR-99a 和 miR-99b 表达水平明显高于对照组和 Scramble 组 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。和厚朴酚高、中、低剂量组 HeLa 细胞增殖率和侵袭能力明显低于对照组和 Scramble 组,呈现剂量依赖性。Western blot 法检测结果显示,mimic 组和和厚朴酚高、中、低剂量组 cyclin D1 和 MMP7 表达水平明显低于对照组和 Scramble 组 ($P < 0.05$);随着和厚朴酚剂量的增加,HeLa 细胞中 cyclin D1 和 MMP7 表达水平明显降低。**结论** 和厚朴酚可能通过上调 miR-99a/b 表达,进而抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖和侵袭,为宫颈癌的靶向治疗提供一定的理论依据。

关键词 和厚朴酚 宫颈癌 miR-99a miR-99b

中图分类号 R737.33

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.11.023

Honokiol Inhibits HeLa Cell Proliferation and Invasion by Up-regulating miR-99a/b. Xu Yajie, Zhang Zhiqiang, Yu He. Department of Gynaecology, Zhoukou Central Hospital, Henan 466000, China

Abstract **Objective** To explore the influence of Honokiol on proliferation and invasion of hela cells with the related molecular mechanisms. **Methods** MTT assay was used to detect the effects of different interventions on the proliferation of HeLa cells. Transwell chamber was performed to determine the invasion ability of Hela cells. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-99a and miR-99b. Western blot (WB) was used to detect the protein level of cyclin D1, MMP7. **Results** The proliferation and invasive cell numbers of honokiol in high, medium and low dose groups were significantly lower than those in control group and DMSO solvent group ($P < 0.05$), and in a dose-dependent manner. The levels of miR-99a and miR-99b in mimic group and honokiol group were significantly higher than those in control group and Scramble group ($P < 0.05$). With the increase of honokiol dose, miR-99a and miR-99b expression levels gradually increased. The expression levels of miR-99a and miR-99b in high, medium and low doses of honokiol were significantly higher than those in the control and Scramble groups ($P < 0.05$), and were dose-dependent. MiR-99a and miR-99b expression levels in HeLa cells of honokiol mid-dose group and honokiol high-dose group were significantly lower than those in the miR-99a/b mimic groups ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expressions of cyclin D1 and MMP7 in mimic group and honokiol group were significantly lower than those in control group and Scramble group ($P < 0.05$). With the increase of honokiol dose, HeLa Cell cyclin D1 and MMP7 expression levels were significantly lower. **Conclusion** Honokiol may inhibit the proliferation and invasion of cervical cancer Hela cells by up-regulating the expression of miR-99a/b, which will provide a theoretical basis for the diagnosis and targeted therapy of cervical cancer.

Key words Honokiol; cervical cancer; MiR-99a; MiR-99b

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201603094)

作者单位:466000 周口市中心医院妇科(徐雅杰、于鹤),产科(张志强)

通讯作者:徐雅杰,电子信箱:xuyajie3152@sina.com

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,其发生率在女性肿瘤中居第2位,严重威胁女性的身体健康和生命安全^[1]。目前手术治疗和放化疗是宫颈癌治疗的主要手段,放疗及手术是治疗宫颈癌的有效方法^[2]。但由于子宫的淋巴管丰富,癌细胞淋巴转移严重影响

宫颈癌的治愈率及预后^[3]。明确宫颈癌细胞增殖和侵袭的分子机制对于降低宫颈癌病死率和改善预后具有重要的意义^[4]。和厚朴酚是一种植物类抗癌药物,被广泛应用于癌症的治疗中,具有低毒、多靶点、多效应的特点^[5]。本研究以宫颈癌细胞为实验对象,探究和厚朴酚对宫颈癌细胞增殖和侵袭的抑制作用,并初步探讨其分子机制,为宫颈癌的诊断和靶向治疗提供理论依据。

材料与方法

1. 材料:宫颈癌细胞 HeLa(中国科学院上海细胞库)。10%胎牛血清(美国 Gibco 公司);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);预染蛋白 Marker(美国 Pierce 公司);MTT 和 DMSO 购自美国 Sigma 公司;miR-99a mimic、Scramble 购自广州锐博生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自天根生化科技有限公司;Lipofactemin2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;TaqDNA 聚合酶购自 NEB 公司;SW-CJ-2D2G2F2FD 双人净化工作台(江苏);ZC-ZY-CS8 组合式二氧化碳振荡培养箱(上海),24 孔细胞培养板购自于美国 Corning 公司,酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司;和厚朴酚(西安天一生物有限公司,批号 20150306,纯度 >99%),采用 DMSO 溶解。

2. 细胞培养:将购买的 HeLa 细胞解冻、复苏,将细胞接种于含 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,于 37℃,5% CO₂和饱和湿度的培养箱中进行常规培养。收集贴壁生长的对数生长期的 HeLa 细胞,用胰蛋白酶进行消化处理,制成单细胞悬液,调整细胞数目为 1×10^6 /ml,以每孔 100μl 接种于有 DMEM 培养液的 24 孔细胞培养板,培养 48h。

3. 细胞分组及处理:培养 48h 后,将培养好的细胞随机分成 6 组,依次命名为对照组、Scramble 组、miR-99a mimic 组、miR-99b mimic 组、和厚朴酚低剂量组、和厚朴酚中剂量组、和厚朴酚高剂量组,每组重复 3 孔,重复 3 遍。Scramble 组用 Scramble 转染细胞(作为阴性对照),miR-99a/b mimic 组用 miR-99a mimic 和 miR-99b mimic 转染细胞,和厚朴酚组按低、中、高剂量分别用 5、10、15μg/ml 和厚朴酚培养 HeLa 细胞,对照组不做处理。转染时分别取 10μl 稀释好的 miR-99 mimic 和 Scramble、6μl Lipo2000 和 250μl RPMI-1640 混匀后室温孵育 20min。将以上液体和 1.5ml RPMI-1640 加入每孔细胞中,6h 后全

量更换完全培养基,置于 37℃,5% CO₂和饱和湿度的培养箱中培养 48h。

4. qRT-PCR 检测 miR-99a 和 miR-99b 表达情况:取培养好的各组 HeLa 细胞,用胰蛋白酶进行消化处理,用 RNA 提取试剂盒提取 HeLa 细胞总 RNA,用反转录试剂盒将 RNA 反转成 cDNA。根据 NCBI 中提交的 miR-99a(NR_029514.1)和 miR-99b(NR_029843.1)的 cDNA 序列设计引物,miR-99a:上游引物(F1):5'-CCCATTTGGCATAAACCCGTA-3',下游引物(R1):5'-CACACTGACACAGACCATAG-3',miR-99b:上游引物(F2):5'-GGCACCCACCCGTAG-3',下游引物(R2):5'-GACACGGACCCACAGACA-3';进行 qRT-PCR,同时以 U6 为内参。PCR 的反应体系为:5×缓冲液 10μl, TaqDNA 聚合酶 1μl,上游引物 F 2μl,下游引物 R 2μl,10mmol/L dNTP mix 1μl,cDNA 1μl,ddH₂O 33μl;PCR 的反应条件为:预变性:95℃ 5min,变性:95℃ 30s,延伸:66℃ 15s,40 个循环,延伸时读取吸光度(A)值。采用最大二阶导数法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)对数据进行统计,计算 miR-99a 和 miR-99b 的相对表达。 $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组目的基因 Ct 平均值} - \text{实验组内参基因 Ct 平均值}) - (\text{对照组目的基因 Ct 平均值} - \text{对照组内参基因 Ct 平均值})$ 。

5. MTT 实验检测细胞增殖:培养 48h 后,取出细胞培养板,弃去原培养基,每孔加入 100μl DMEM 无血清培养液,在避光条件下加入 10μl MTT 溶液,置于 37℃,5% CO₂和饱和湿度的培养箱中培养 4h,取出细胞培养版,弃去每孔培养液,每孔加入 150μl 二甲亚砜溶液,置于震荡仪振荡 10min,使紫色结晶物完全融解。使用酶标仪于 570nm 波长下测定各孔吸光值,每组重复 3 次求取平均值,以对照组细胞活力为 100%,计算各组细胞活力。细胞活力(%) = 其他各组平均吸光值/对照组平均吸光值 × 100%。

6. Transwell 小室测定细胞侵袭能力:用 DMEM 无血清培养基将 Matrigel 胶稀释至 1mg/ml,然后取 40μl 稀释好的 Matrigel 胶均匀铺在 Transwell 小室上室,置于 37℃条件下静止放置 20~30min。取培养好的各组 HeLa 细胞,用胰蛋白酶进行消化处理,制成单细胞悬液,调整细胞数目为 1×10^6 /ml,按每孔 100μl 将对数期的 HeLa 细胞加入到 Transwell 小室,置于 37℃,含 5% CO₂培养箱中,培养 48h 后取出小室,弃去培养液,用 PBS 溶液清洗细胞 2~3 次,每孔加入 500μl 95%乙醇固定 15~20min,经 0.1%结晶

紫溶液染色 30min 后,用棉签擦拭未穿膜细胞,风干小室,200 倍显微镜下,每个样本随机选取 5 个视野进行拍照计数。

7. Western blot 法检测 cyclin D1、MMP7 蛋白表达情况:取培养好的各组 HeLa 细胞,用胰蛋白酶进行消化处理,加入 2ml 细胞裂解液 [150mmol/L NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 50mmol/L Tris(pH 值为 8.0)] 提取细胞总蛋白,取 40 μ l 蛋白质样品加入 1.5ml 离心管中,加入 10 μ l 10 $\times$ 上样缓冲液,混匀后置于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中煮沸 10min, 12000r/min 离心 10min。以 β -actin 为内参,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 每孔上样体积 20 μ l, 电泳结束后,半干转膜仪转膜 50min, 分别滴加鼠抗人 cyclin D1 多克隆抗体和鼠抗人 MMP7 多克隆抗体,置于 4 $^{\circ}$ C 下过夜,滴加二抗 37 $^{\circ}$ C 放置 1h。加入 ECL 发光剂进行显影,利用自动凝胶成像系统采集图像。采用 Gel-Pro analyzer4 软件对 SDS-PAGE 电泳图目的条带进行扫描,分析 cyclin D1 和 MMP7 表达水平。

8. 统计学方法:本研究所有数据利用统计学软件 SPSS 20.0 进行统计分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 和厚朴酚抑制 HeLa 细胞增殖和侵袭:培养 48h 后,MTT 和 Transwell 小室结果显示,和厚朴酚高、中、低剂量组细胞增殖率和侵袭细胞数均明显低于对照组和 DMSO 溶剂组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。详见图 1。

2. 转染及结果鉴定:培养 48h 后,qRT-PCR 检测结果显示,miR-99a/b mimic 组 miR-99a 和 miR-99b 表达情况明显高于对照及 Scramble 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),miR-99a mimic 组和 miR-99b mimic 组已成功转染 HeLa 细胞,详见图 2。

3. 和厚朴酚对 HeLa 细胞 miR-99a 和 miR-99b 表达的影响:minic 组和和厚朴酚组 HeLa 细胞中 miR-99a 和 miR-99b 表达水平与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);minic 组和厚朴酚高、中、低剂量组 miR-99a 和 miR-99b 表达水平明显高于对照组和 Scramble 组 ($P < 0.05$);随着和厚朴酚剂量的增加,HeLa 细胞中 miR-99a 和 miR-99b 表达水平明显升高,呈现剂量依赖性,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见图 3。

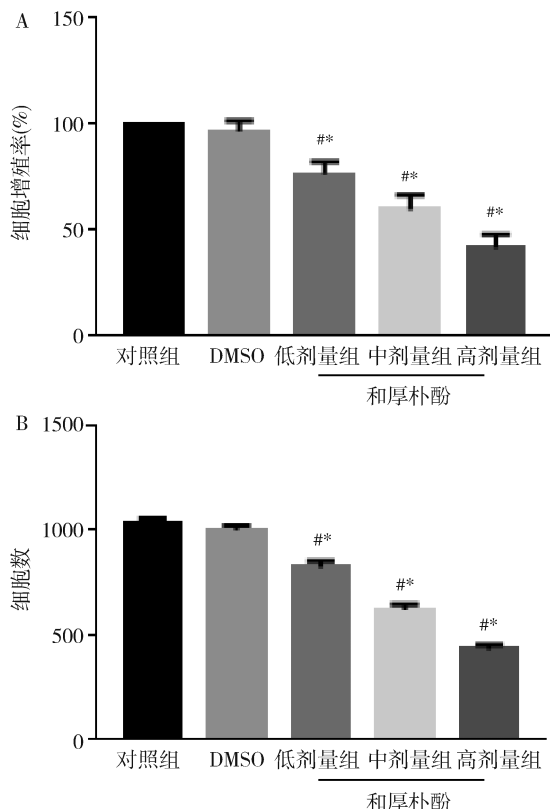


图 1 和厚朴酚抑制 HeLa 细胞增殖和侵袭

与对照组比较, # $P < 0.05$; 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$

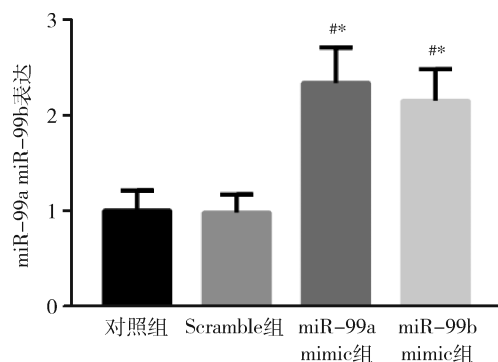


图 2 qRT-PCR 检测 miR-99a 和 miR-99b 表达鉴定转染结果

与对照组比较, # $P < 0.05$; 与 Scramble 组比较, * $P < 0.05$

4. miR-99a/b mimic 和和厚朴酚对 HeLa 细胞增殖的影响:和厚朴酚组 HeLa 细胞增殖率与对照组和 Scramble 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),和厚朴酚高、中、低剂量组 HeLa 细胞增殖率明显低于对照组和 Scramble 组,呈现剂量依赖性;miR-99a/b mimic 组细胞增殖率也明显低于对照组和 Scramble 组 ($P < 0.05$),详见图 4。

5. miR-99a/b mimic 和厚朴酚对 HeLa 细胞侵

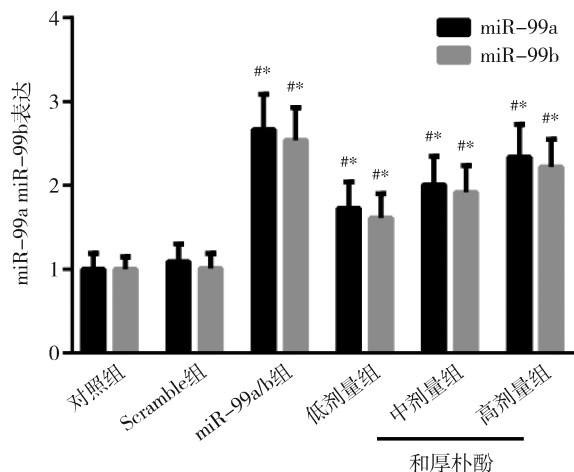


图3 qRT-PCR检测miR-99a和miR-99b表达情况

与对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与 Scramble 组比较, ^{*} $P < 0.05$

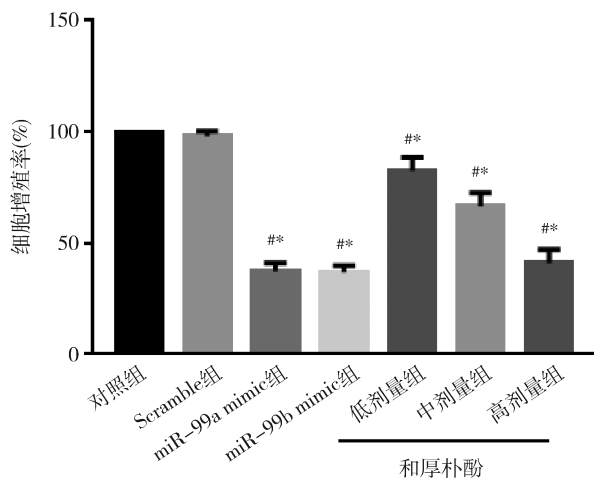


图4 miR-99a/b mimic和和厚朴酚对HeLa细胞增殖的影响

与对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与 Scramble 组比较, ^{*} $P < 0.05$

袭的影响:培养48h后,miR-99a/b mimic组侵袭细胞明显少于对照组和Scramble组($P < 0.05$);和厚朴酚高、中、低剂量组侵袭细胞也明显低于对照组和Scramble组,且呈现剂量依赖性($P < 0.05$),详见图5。

6. 和厚朴酚对HeLa细胞cyclin D1、MMP7表达影响:Western blot法检测结果显示,minic组和和厚朴酚高、中、低剂量组cyclin D1和MMP7表达水平明显低于对照组和Scramble组($P < 0.05$);随着和厚朴酚剂量的增加,HeLa细胞中cyclin D1和MMP7表达水平明显降低,呈现剂量依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见图6。

讨 论

宫颈癌在妇科恶性肿瘤中排名第2位,西医治疗

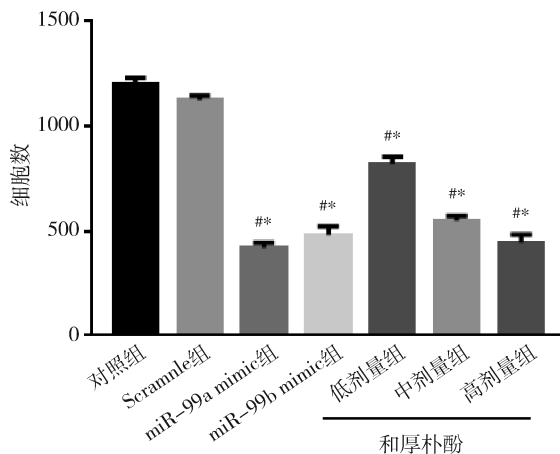


图5 miR-99a/b mimic和和厚朴酚对HeLa细胞侵袭的影响

与对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与 Scramble 组比较, ^{*} $P < 0.05$

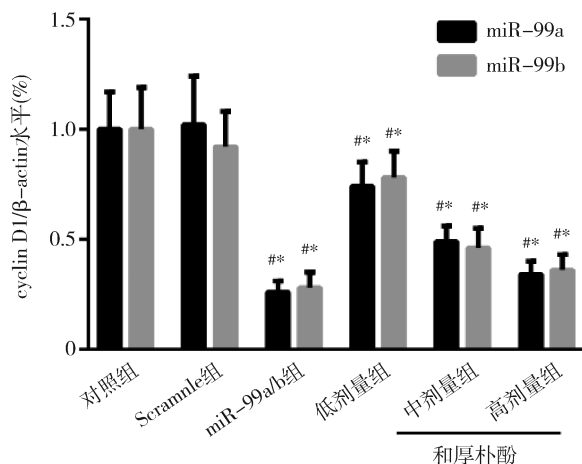


图6 Western blot法检测cyclin D1、MMP7蛋白表达情况

与对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与 Scramble 组比较, ^{*} $P < 0.05$

宫颈癌以手术、放疗和化疗为主,但这些治疗方法对人体的伤害比较大,且临床治疗效果差。中医对宫颈癌的病因及发病机制有一定的理论分析,祖国医学认为,宫颈癌属瘀血、带下、漏证的范畴,中医认为治疗宫颈癌不仅是抗癌消瘤,更要着重于阴阳、气血、脏腑、经络、心身的整体调治^[6]。因此,应选用安全低毒的抗癌药物用于宫颈癌的治疗中。和厚朴酚(honokiol)是一种植物类抗癌药物,它从木兰科植物厚朴中提取的天然活性物质,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等生物学活性,在中药的研究和应用中具有重要的地位^[7-9]。研究表明,和厚朴酚可以抑制肿瘤细胞增殖和转移、促进肿瘤细胞凋亡和分化、抑制新生血管生长等作用^[10-13]。近年来和厚朴酚已经广泛应用于癌症治疗的研究中,杨光丽等^[14]研究表明,和厚朴酚

能够体外抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖并诱导凋亡。本研究中以 HeLa 细胞系为实验对象,研究结果表明,和厚朴酚能够抑制人宫颈癌细胞增殖和侵袭,且随着和厚朴酚剂量的增加,HeLa 细胞增殖和侵袭能力显著下降,呈剂量依赖性,与文献[14]报道一致,但是具体作用机制还不明确。

研究表明,miR-99a 是一种肿瘤抑制因子,其表达水平上调可以抑制肿瘤细胞增殖和侵袭,促进肿瘤细胞凋亡^[15]。孙建鸣等^[16]研究表明,miR-99a 在膀胱癌、肾癌、前列腺癌组织或其肿瘤细胞中均呈低表达,通过质粒转染等方法上调其在肿瘤细胞中的表达后,能够抑制肿瘤的生长。黎文汉^[17]研究表明,上调胶质瘤细胞系 LN229 中 miR-99a 表达水平能够明显抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力,并能调控 MMPs 表达。罗玉政等^[18]研究表明,用腺病毒介导的方法失调 miR-99a 的表达可以抑制人结肠癌 HCT-8 细胞的生长^[18]。miR-99b 是另一种肿瘤抑制因子,李连香等临床研究表明,miR-99b 在治疗后患者宫颈癌组织中的表达水平提高,提示 miR-99b 在宫颈癌的发生和发展过程中可能起重要作用^[19]。姜丽等^[20]研究表明,上调 miR-99b 的表达水平,可以抑制宫颈癌细胞增殖和侵袭。Kang 等^[21]研究表明,在非小细胞肺癌中,miR-99b 可以直接调控靶基因成纤维细胞生长因子受体 3 的表达水平,进而抑制肿瘤发生、发展。

本研究结果表明,miR-99a/b mimic 组 HeLa 细胞的增殖和侵袭能力明显低于对照组,提示 miR-99a 和 miR-99b 的表达水平与 HeLa 细胞增殖和侵袭密切相关,miR-99a/b 过表达能够抑制肿瘤细胞增殖和侵袭,另外和厚朴酚高、中、低剂量组也表现出了类似的增殖和侵袭抑制,尤其是高剂量组,提示和厚朴酚可能会通过影响 miR-99a/b 表达,进而影响 HeLa 细胞增殖和侵袭能力。然而,和厚朴酚对 miR-99a 和 miR-99b 表达水平的影响方面的研究尚未见报道,因此笔者对采用不同浓度和厚朴酚对 HeLa 细胞进行处理,并检测 miR-99a/b 表达。结果显示和厚朴酚高、中、低剂量组 miR-99a 和 miR-99b 表达水平明显高于对照组和 Scramble 组,且呈剂量依赖性,一定程度上验证了本研究结果。

miRNA 一般通过靶基因参与肿瘤细胞的发生、发展过程。有研究显示 cyclin D1 和 MMP7 分别是 miR-99a/b 的靶基因,cyclin D1 和 MMP7 蛋白的表达由微小 RNA (microRNA) 调控,microRNA 是一类

内源性非编码小分子 RNA,可参与肿瘤形成的信号通路,与肿瘤发生、肿瘤细胞增殖、侵袭、转移以及凋亡密切相关,并能调控相关蛋白的表达^[22,23]。因此,本研究又对 cyclin D1 和 MMP7 表达进行检测,发现和厚朴酚高、中、低剂量组 cyclin D1 和 MMP7 表达水平明显低于对照组和 Scramble 组 ($P < 0.05$)。随着和厚朴酚剂量的增加,HeLa 细胞中 cyclin D1 和 MMP7 表达水平明显降低,呈现剂量依赖性。HeLa 细胞经和厚朴酚不同剂量处理之后 miR-99a/b 趋势逐渐升高,而 cyclin D1 和 MMP7 表达趋势逐渐降低。因此,笔者推测和厚朴酚可能通过上调 miR-99a/b,进而调节 cyclin D1 和 MMP7 表达,抑制 HeLa 细胞增殖、侵袭。不过本研究只是初步对和厚朴酚抑制 HeLa 细胞增殖、侵袭的机制进行了探讨,不足之处是尚未进行功能恢复实验,也未对 miR-99a/b 是否对 cyclin D1 和 MMP7 的调控进行验证,因此后续实验将继续深化对其作用机制的研究,为宫颈癌的靶向治疗提供一定的理论依据。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *Ca A Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90
- 宋红林, 黄清华, 李力. 新辅助介入化疗在局部晚期宫颈癌治疗中的价值[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(5):283-286
- 李雪茹, 孙晖, 查何, 等. S100A9 对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和迁移的影响及其机制探讨[J]. *中国细胞生物学报*, 2015, 12: 1632-1638
- 刘非. HPV16 E7 调控 MicroRNA-27b 影响宫颈癌细胞增殖和凋亡的机制研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014
- Shu- Er Y, Ming- Tsuen H, Tung- Hu T, *et al.* Down- modulation of Bcl- XL, release of cytochrome c and sequential activation of caspases during honokiol- induced apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells[J]. *Biochem Pharm*, 2002, 63(1): 1641-1651
- 崔叶敏, 郑艳芬, 崔梁瑜, 等. 沈氏妇科宫颈癌的中医治疗策略[J]. *四川中医*, 2015, 11:11-14
- Chao LK, Liao PC, Chenlung H, *et al.* Anti- inflammatory bioactivities of honokiol through inhibition of protein kinase C, mitogen- activated protein kinase, and the NF- κ B pathway to reduce LPS- induced TNF α and NO expression[J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58(6):3472-3478
- Amorati R, Zotova J, Baschieri A, *et al.* Antioxidant activity of magnolol and honokiol: kinetic and mechanistic investigations of their reaction with peroxyl radicals [J]. *J Org Chem*, 2015, 80(21): 10651-10659
- Shen JL, Man KM, Huang PH, *et al.* Honokiol and magnolol as multifunctional antioxidative molecules for dermatologic disorders [J]. *Molecules*, 2010, 15(9):6452-6465
- Battle T, Arbiser J, Frank D. The natural product Honokiol induces caspase- dependent apoptosis in B- cell chronic lymphocytic leuke-

- mia (B-CLL) cells[J]. Blood, 2005, 106(2): 690-697
- 11 Fong W, Tse A, Poon K, *et al.* Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1, 25-dihydroxy vitamin D3 and retinoic acid[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 427-441
 - 12 Kenji I, Teru H, Makoto H, *et al.* Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase-dependent and -independent apoptosis[J]. Blood, 2005, 106(5): 1794-1800
 - 13 Park E, Zhao Y, Kim Y, *et al.* Honokiol induces apoptosis via cytochrome crelease and caspase activation in activated rat hepatic stellate cells in vitro[J]. Planta Med, 2005, 71(1): 82-84
 - 14 杨光丽, 侯文礼, 付阿富, 等. 和厚朴酚对人宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2008, 39(4):558-562
 - 15 Sun J, Chen Z, Tan X, *et al.* MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Med Oncol, 2013, 30(1):411-417
 - 16 孙建鸣, 徐仁芳. miR-99a 在泌尿系肿瘤中的研究进展[J]. 系统医学, 2016, 1(9):162-165
 - 17 黎文汉. miR-99a 调控胶质瘤细胞侵袭与迁移的作用及机制研究[D]. 天津:天津医科大学, 2016

- 18 罗玉政, 李铁军, 王俭. 腺病毒介导 miR-99a 过表达抑制人结肠癌 HCT-8 细胞的生长抑制及其作用机制[J]. 兰州大学学报:医学版, 2016, 42(3):22-28
- 19 李连香, 于翠革, 陈丽宏, 等. miR-99b 在新辅助化疗宫颈癌组织中的表达[J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(10):1292-1293
- 20 姜丽, 王燕. microRNA-99b 过表达对宫颈癌细胞增殖、侵袭及化疗敏感性的影响[J]. 山东医药, 2015, 29:56-58
- 21 Kang J, Lee SY, Sun YL, *et al.* microRNA-99b acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by directly targeting fibroblast growth factor receptor 3[J]. Exp Therapeut Med, 2012, 3(1): 149-153
- 22 J Zhang, S Wang, LY Lu, *et al.* MiR99a modulates MMP7 and MMP13 to regulate invasiveness of Kaposi's sarcoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12):12567-12573
- 23 Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, *et al.* Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. Genes Dev, 2006, 20(5):515-524

(收稿日期:2018-01-13)

(修回日期:2018-01-25)

(上接第 91 页)

参考文献

- 1 陈新. 口腔鳞状细胞癌现状[J]. 口腔医学, 2017, 37(5):462-465
- 2 Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 47-54
- 3 Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, *et al.* Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer[J]. Am J Pathol, 2001, 158(3):905-919
- 4 Viikila P, Kivela AJ, Mustonen H, *et al.* Carbonic anhydrase enzymes II, VII, IX and XII in Colorectal carcinomas[J]. World J Gastroentero, 2016, 22(36):8168-8177
- 5 Abdul W, William S. Sly carbonic anhydrase XII functions in health and disease[J]. Gene, 2017, 623:33-40
- 6 Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, *et al.* CA XII is a sero-diagnostic marker for lung cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33952
- 7 Jiang J, Zhao JH, Wang XL, *et al.* Correlation between carbonic anhydrase IX (CA-9), XII (CA-12) and hypoxia inducible factor-2 α (HIF-2 α) in breast cancer[J]. Neoplasma, 2015, 62(3):456-463
- 8 秦承东, 任正刚, 汤钊猷. 缺氧微环境在肿瘤进展中的作用[J]. 肿瘤, 2016, 3(1):96-102
- 9 Macklin PS, McAuliffe J, Pugh CW, *et al.* Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta[J]. Placenta, 2017, 56:8-13
- 10 Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis[J]. Science, 2016, 352(6282):175-180
- 11 Asgharzadeh MR, Barar J, Pourseif MM, *et al.* Molecular machineries of pH dysregulation in tumor microenvironment: potential targets for cancer therapy[J]. Bioimpacts, 2017, 7(2):115-133
- 12 Payen VL, Porporato PE, Baselet B, *et al.* Metabolic changes associat-

- ed with tumor metastasis, part I: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(7):1333-1348
- 13 Kivela A, Parkkila S, Saamio J, *et al.* Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2):577-584
- 14 Gondi G, Mysliwicz J, Hulikova A, *et al.* Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII[J]. Cancer Res, 2013, 73(21):6494-6503
- 15 Zhao MN, Liu Q, Gong YC, *et al.* GSH-dependent antioxidant defense contributes to the acclimation of colon cancer cells to acidic microenvironment[J]. Cell Cycle, 2016, 15(8):1125-1133
- 16 Maeda T, Yuzawa S, Suzuki A, *et al.* RhoA mediates the expression of acidic extracellular pH-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA through phospholipase D1 in mouse metastatic B16-BL6 melanoma cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(3):1251-1257
- 17 McDonald PC, Chafe SC. Overcoming hypoxia-mediated tumor progression: combinatorial approaches targeting pH regulation, angiogenesis and immune dysfunction[J]. Front Cell Dev Biol, 2016, 4(370):27
- 18 Barar J, Omid Y. Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy[J]. Bioimpacts, 2013, 3(4):149-162
- 19 Kopecka J, Rankin GM, Salaroglio IC, *et al.* P-glycoprotein-mediated chemoresistance is reversed by carbonic anhydrase XII inhibitors[J]. Oncotarget, 2016, 7(52):85861-85875
- 20 Kopecka J, Campia I, Jacobs A, *et al.* Carbonic anhydrase XII is a new therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(9):6776-6793

(收稿日期:2018-01-17)

(修回日期:2018-01-28)