

miR-205在宫颈鳞癌中的表达及其对癌细胞迁移、侵袭能力的影响

刘建兵^{1,2}, 林晓雨², 李文龙², 王伟¹, 王文豪¹, 崔小华², 郝建卿², 李莉², 郝敏^{1*}

¹山西医科大学第二医院妇产科, 山西太原 030001; ²山西医科大学基础医学院医学细胞生物与遗传学教研室, 山西太原 030001

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.07.0694

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

刘建兵, 林晓雨, 李文龙, 等. miR-205在宫颈鳞癌中的表达及其对癌细胞迁移及侵袭能力的影响[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(7): 694-700.

[收稿日期] 2021-10-26

[录用日期] 2022-04-29

[上线日期] 2022-05-07

[摘要] **目的** 筛选宫颈鳞癌中差异表达的微小RNA(miRNA, miR), 探讨关键miRNA对宫颈癌发生发展的作用及其机制。**方法** 采用生物信息学方法分析并以差异倍数>2.5及P<0.01为条件筛选宫颈鳞癌中差异表达的miRNA; 采用原位杂交和qRT-PCR分别检测miR-205及白细胞介素(IL)-32的表达; 采用CCK-8法检测细胞增殖活力; 应用Transwell模型评价细胞迁移及侵袭能力; 利用Western blotting检测侵袭相关基质金属蛋白酶(MMP)-2及MMP-9蛋白的表达量。**结果** 生物信息学分析获得宫颈鳞癌中差异表达的miRNA 106个, 其中70个上调, 36个下调; 其中miR-205的表达量变化最大。原位杂交及qRT-PCR结果表明, miR-205在宫颈鳞癌细胞中的表达量明显高于癌旁组织(P<0.05)。miR-205可明显提升宫颈癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力(P<0.05)。在宫颈癌细胞系HeLa及SiHa细胞中, 过表达miR-205可增强IL-32的表达, 降低miR-205表达则可抑制IL-32的表达(P<0.05)。荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-205可与IL-32启动子作用提高靶基因的表达量(P<0.05); 降低miR-205及IL-32表达均可抑制细胞的侵袭能力(P<0.05); IL-32表达降低能明显抑制侵袭相关蛋白MMP-2及MMP-9的表达(P<0.05)。**结论** 宫颈鳞癌中miR-205表达量明显增高, 可能通过上调IL-32的表达促进MMP-2及MMP-9的表达, 最终促进宫颈癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

[关键词] 宫颈肿瘤; 癌, 鳞状细胞; miR-205; 细胞增殖; 细胞侵袭; 细胞运动

Effect of miR-205 expression in cervical squamous cell carcinoma on cancer cell migration and invasion

Liu Jian-Bing^{1,2}, Lin Xiao-Yu², Li Wen-Long², Wang Wei¹, Wang Wen-Hao¹, Cui Xiao-Hua², Hao Jian-Qing², Li Li², Hao Min^{1*}

¹Departments of Obstetrics and Gynecology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

²Department of Medical Cell Biology and Genetics, School of Basic Medical, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

*Corresponding author, E-mail: 2yuanhaomin@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81972452), the Shanxi Fundamental Research Program (20210302123320), the Key Research and Development (R and D) Projects of Shanxi Province (201803D31121, 201903D321152), and the Special Public Welfare Industry Research of National Health and Family Planning Commission of China (201402010)

[Abstract] **Objective** To identify the differentially expressed microRNA (miRNA, miR) in cervical squamous cell carcinoma (SCC) and explore the mechanism of critical miRNA on the occurrence and development of cervical cancer.

[基金项目] 国家自然科学基金(81972452); 山西省基础研究计划(20210302123320); 山西省重点研发计划(201803D31121, 201903D321152); 国家卫生和计划生育委员会公益性行业科研专项(201402010)

[作者简介] 刘建兵, 理学博士, 主要从事妇科肿瘤方面的研究

[通信作者] 郝敏, E-mail: 2yuanhaomin@163.com

Methods To identify differentially expressed miRNA, we employed bioinformatics methods to filter out miRNA under the conditions of $|\text{fold change(FC)}| > 2.5$ and $P < 0.01$. The RNA expressions of *miR-205* and interleukin-32 (IL-32) were detected by *in situ* hybridization and qRT-PCR, respectively. We evaluated cell proliferation, migration, and invasion through CCK-8 and Transwell model. The protein level of matrix metalloproteinase-3 (MMP-2) and MMP-9 were quantified by Western blotting. **Results** Through bioinformatics analysis, we obtained 106 differentially expressed miRNA in cervical cancer, with 70 up-regulated and 36 down-regulated miRNAs. *miR-205* was the most differentially expressed miRNA. We validated the overexpression of *miR-205* in cervical squamous cell carcinoma by *in situ* hybridization and qRT-PCR ($P < 0.05$). Overexpression of *miR-205* could significantly promote the proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells ($P < 0.05$). The overexpression or decreased expression of *miR-205* can increase or inhibit the expression of IL-32 in cervical cancer cell lines HeLa and SiHa, and *miR-205* can directly interact with the IL-32 promoter to increase the expression of target genes ($P < 0.05$); the decreased expression of *miR-205* and IL-32 inhibited the invasion of cells ($P < 0.05$); moreover, the decreased expression of IL-32 could significantly inhibit the expression of the invasion-associated proteins MMP-2 and MMP-9 ($P < 0.05$). **Conclusion** In cervical squamous cell carcinoma, *miR-205* is dramatically up-regulated, potentially promoting the proliferation, migration, and invasion of cancer cells, which could further enhance the expression of MMP-2 and MMP-9 through IL-32 up-regulation, and ultimately improve the invasion ability of cervical cancer cells.

[Key words] uterine cervical neoplasms; carcinoma, squamous cell; *miR-205*; cell proliferation; cell invasion; cell movement

宫颈癌是一种发病率和致死率均较高的妇科肿瘤^[1-2]。高危型人乳头瘤病毒的持续感染是公认的诱发宫颈癌变的主要因素^[3-4]。现有研究发现, Epstein-Bar病毒、阴道微生物菌群、叶酸缺乏及化学致癌物等因素均与宫颈癌的发生发展有关^[3,5-6]。微小RNA(miRNA, miR)是一段由20~24个核苷酸组成的内源性非编码RNA,一般通过与靶基因结合后的相互作用而发挥调控功能,涉及30%以上的人类基因^[7-8]。目前发现宫颈癌中有近百种miRNA存在异常表达,如miR-27b、miR-196a、miR-21、miR-590等呈高表达^[9-12],miR-506、miR-200b、miR-183、miR-125b等呈低表达^[13-16]。差异表达的miRNA通过广泛参与宫颈癌细胞的增殖、侵袭、转移、化疗耐药、放疗抵抗等过程,在宫颈癌的发生、发展及预后中发挥重要的作用^[17],但目前能应用于临床诊断及作为治疗靶标的关键miRNA还很少。本研究拟筛选宫颈癌中异常表达的miRNA,并通过细胞及分子生物学方法鉴定关键miRNA的功能机制,以探讨宫颈癌发生发展的机制,并寻找可用于宫颈癌诊断及治疗的新靶标。

1 材料与方法

1.1 样本信息及差异表达分析 从肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中下载宫颈鳞癌患者的临床信息及miRNA不同亚型表达量数据,包括254个肿瘤样本组织和3个邻近的非肿瘤样本组织,并在R软件中进行归一化处理。采用R软件中的“limma”包分析并筛选差异表达的miRNA,筛选标准为差异倍数 > 2.5 及 $P < 0.01$ 。P值经错误发现率(FDR)校正。

1.2 宫颈鳞癌样本及癌细胞株 选取2021年6—9

月在山西医科大学第二医院进行手术治疗的21例宫颈鳞癌患者。纳入标准:初次确诊为宫颈鳞癌;治疗前未进行化疗、放疗及免疫治疗等;接受宫颈癌切除术。收集手术切除的21例宫颈鳞癌组织及13例癌旁组织,将标本保存于4%多聚甲醛溶液及液氮中。本研究经山西医科大学伦理委员会审查通过(2021SLL044)。人宫颈癌细胞系HeLa及SiHa细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,培养于DMEM培养基(含10%FBS、1%双抗)中,于细胞培养箱(37℃、5%CO₂)中生长,备用。

1.3 细胞转染 对照(NC)组、miR-205组,miR-205抑制剂对照组,miR-205抑制剂组以及si-IL-32组细胞,分别利用Lipofectamine 2000转染NC序列(UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG)、miR-205 mimics序列(GACUCCGGUGGAAUGAAGGAUU)、miR-205 inhibitor NC序列(CAGUACUUUUGUGUAGUACAA)、miR-205 inhibitor序列(CAGACUCCGGUGGAAUGAAGGA)及IL-32 siRNA序列(GGCUUGAUUACUCUCUAUATT)。

1.4 原位杂交法检测癌组织中miR-205的表达 采用原位杂交法检测癌组织中miR-205的表达,以癌旁组织作为对照。将人宫颈鳞癌组织用4%多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋,切成4μm厚的切片,蛋白酶K处理,室温下用醋酸酐、三乙醇胺溶液孵育10 min,加入地高辛标记的RNA探针[5'-CAG(+A)C(+T)CCGG(+T)GGAA(+T)GA(+A)GGA-Dig-3'],4℃孵育过夜。次日用含吐温-20的磷酸盐缓冲液冲洗,并用碱性磷酸酶显色液处理至显色,水洗残液,乙醇脱水,封片,拍照。

1.5 qRT-PCR法检测miR-205及IL-32的表达 提取总RNA,并要求其光密度(OD)₂₆₀/OD₂₈₀为1.8~2.0;

将RNA进行反转录,得到模板cDNA;以cDNA为模板,构建PCR体系,采用两步法进行PCR扩增。引物序列如下。*miR-205*:反转引物RT-205 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGACCAGACT-3';扩增引物正向5'-AATTGTCCTTCATTCCACCGG-3',反向5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';*IL-32*正向5'-TCTCAGTGGAGCTGGGTCAT-3',反向5'-CCAACCCCTGAGCAGAA GTA-3';*U6*正向5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3',反向5'-TTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3';*GAPDH*正向5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3',反向5'-TTCACACCCATGACGAACAT-3'。以人*U6*基因或*GAPDH*作为内参照,目的基因mRNA相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。 $\Delta\Delta Ct=(\text{目的基因Ct}-\text{内参照基因Ct})_{\text{处理组}}-(\text{目的基因Ct}-\text{内参照基因Ct})_{\text{对照组}}$ 。

1.6 细胞增殖、迁移及侵袭能力检测 (1)细胞增殖检测:采用CCK-8法,取适量细胞,置于96孔板,每组重复5孔,分别于培养0 h和48 h每孔添加10 μ l CCK-8溶液,孵育1 h,用酶标仪测定450 nm处的OD值,计算细胞活力。(2)细胞迁移及侵袭能力检测:采用Transwell模型,将Transwell小室放入预先每孔加有600 μ l培养基(含10%血清)的24孔板内,在Transwell的内室(侵袭实验中的Transwell小室需提前铺Matrigel基质胶)加入适量细胞,培养一定时间后,取出小室,擦掉内室细胞,利用4%多聚甲醛溶液固定小室外细胞,伊红或结晶紫染色后,于显微镜下观察、计数、拍照。

1.7 miR-205对IL-32 mRNA表达的调节作用 在宫颈癌HeLa及SiHa细胞中,检测过表达或降低miR-205表达后IL-32的表达情况。比较IL-32启动子与miR-205序列,构建IL-32启动子报告载体,将IL-32启动子报告载体与NC或miR-205 mimics序列分别共转染于HeLa细胞中,采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(海肾萤光素酶基因为报告基因,萤火虫萤光素酶基因为内参照基因,美国Promega公司)检测相对萤光素酶活性。

1.8 Western blotting法检测侵袭相关蛋白的表达 将HeLa和SiHa细胞各分为对照组及si-IL-32组,提取细胞总蛋白,测定OD_{562 nm}值,根据标准曲线法测得蛋白浓度。取30~50 μ g蛋白样品,变性,SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,用5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,孵育一抗过夜;磷酸盐缓冲溶液冲洗3~5次,孵育二抗1 h;磷酸缓冲溶液冲洗3~5次,按化学发光试剂盒要求进行曝光显影(取溶液A、B各1 ml,避光条件下配制发光液,滴加适量发光液,使其与蛋白膜充分接触,反应1 min后,进入暗室显影、定影)。所用抗体如下:兔源MMP-2、MMP-9

(1:1000,美国Proteintech公司)及兔源GAPDH(1:5000,美国Bioworld公司)。以GAPDH为内参,通过条带灰度分析计算蛋白相对表达量。

1.9 统计学处理 采用Excel 2007软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,宫颈癌组和癌旁组的比较采用配对t检验,实验组与对照组间的比较采用两独立样本t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选宫颈鳞癌差异表达miRNA 生物信息学分析显示,宫颈鳞癌中具有表达差异的miRNA共106个,其中70个上调,36个下调。在差异表达的miRNA中,*miR-205*表达量变化最大,差异倍数为8.414(图1,表1)。

2.2 宫颈癌组织中miR-205的表达水平 在

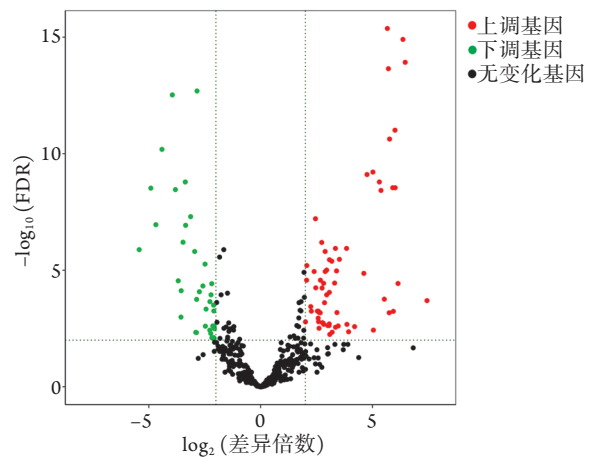


图1 宫颈鳞癌中差异表达的miRNA火山图

Fig.1 Volcano plot of differentially expressed miRNAs in cervical squamous cell carcinoma
FDR. 错误发现率

表1 宫颈鳞癌中表达上调及下调前5位的miRNA

Tab.1 The top five up-regulated and down-regulated miRNAs in cervical squamous cell carcinoma

表达变化	差异倍数	P	FDR
表达上调			
hsa-miR-205-5p	8.414	<0.001	<0.001
hsa-miR-944	7.996	<0.001	<0.001
hsa-miR-141-3p	6.442	<0.001	<0.001
hsa-miR-203b-5p	6.440	0.001	<0.001
hsa-miR-203b-3p	6.282	<0.001	<0.001
表达下调			
hsa-miR-204-5p	-5.434	<0.001	<0.001
hsa-miR-133a-3p	-4.799	<0.001	<0.001
hsa-miR-1-3p	-4.565	<0.001	<0.001
hsa-miR-145-5p	-4.366	<0.001	<0.001
hsa-miR-10b-5p	-3.854	<0.001	<0.001

FDR. 错误发现率

TCGA数据库中,与宫颈正常组织miR-205表达量(55.60 ± 3.6)比较,宫颈鳞癌组织的miR-205表达量($12\ 122.59 \pm 9000.7$)明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2A)。原位杂交检测结果显示,miR-205在人宫颈鳞癌组织中呈阳性表达(蓝色),而在癌旁组织中表达很弱,甚至不表达(图2B)。宫颈鳞癌临床标本癌组织的miR-205表达量明显高于癌旁组织[(1.86 ± 0.19) vs. 1.00, $P < 0.05$,图2C]。

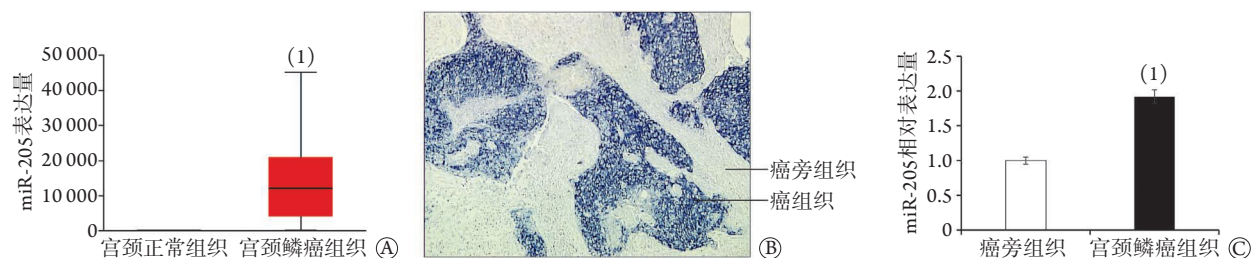


图2 宫颈鳞癌与正常组织中miR-205的表达情况

Fig.2 The expression of miR-205 in normal tissue and cervical squamous cell carcinoma

A. TCGA数据库中宫颈鳞癌与宫颈正常组织miR-205的表达; B. 原位杂交检测人宫颈鳞癌标本中miR-205的表达定位(蓝色示有表达, $\times 100$); C. qRT-PCR检测miR-205相对表达量;与宫颈正常组织或癌旁组织比较,(1) $P < 0.05$

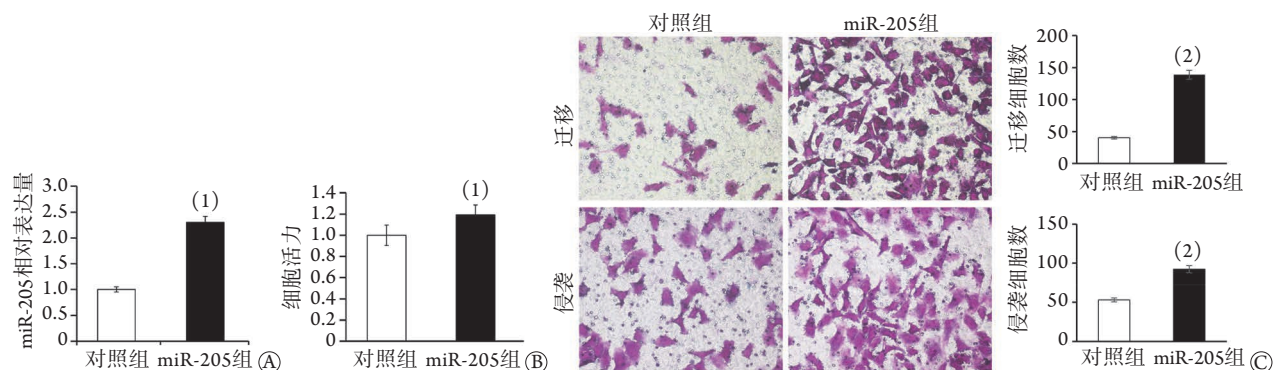


图3 miR-205过表达对宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移及侵袭的影响

Fig.3 The effect of over-expressed miR-205 on proliferation, migration and invasion of cervical cancer HeLa cells

A. miR-205相对表达量; B.相对细胞活力; C. 迁移及侵袭能力;与对照组比较,(1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$

2.4 miR-205对IL-32 mRNA表达的调节作用 与对照组比较,miR-205组miR-205表达量明显升高($P < 0.05$,图4A);与miR-205抑制剂对照组比较,miR-205抑制剂组miR-205表达量明显降低($P < 0.05$,图4B)。与对照组比较,miR-205组IL-32 mRNA相对表达量明显升高($P < 0.05$,图4C);与miR-205抑制剂对照组比较,miR-205抑制剂组IL-32 mRNA相对表达量明显降低($P < 0.05$,图4D)。在临床标本中,与癌旁组织比较,宫颈鳞癌组织中IL-32 mRNA相对表达量明显升高($P < 0.05$,图4E)。与IL-32启动子报告载体+NC组比较,IL-32启动子报告载体+miR-205组的相对荧光活性明显升高($P < 0.05$,图4F)。

2.5 miR-205和IL-32对宫颈癌细胞侵袭及侵袭相关蛋白MMP-2、MMP-9表达的影响 与对照组比较,si-IL-32组细胞IL-32 mRNA相对表达量明显

2.3 过表达miR-205对宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响 HeLa细胞转染实验结果显示,与对照组比较,miR-205组miR-205的表达水平明显升高($P < 0.05$,图3A);CCK-8法检测结果显示,与对照组比较,miR-205组细胞活力明显升高($P < 0.05$,图3B);Transwell法检测结果显示,与对照组比较,miR-205组能够迁移或侵袭过Transwell小室的细胞数量明显增多($P < 0.01$,图3C)。

降低($P < 0.05$,图5A、B)。Transwell法检测结果显示,降低miR-205表达后迁移过Transwell小室的细胞数量明显变少($P < 0.05$,图5C);si-IL-32组能够侵袭过Transwell小室的细胞数量也明显少于对照组($P < 0.05$,图5D)。Western blotting检测结果显示,si-IL-32组MMP-2、MMP-9蛋白的相对表达量明显低于对照组($P < 0.05$,图6)。

3 讨论

宫颈癌中有近百种miRNA存在异常表达,但目前能应用于临床诊断及作为治疗靶标的关键miRNA还很少。本研究经筛选获得了宫颈癌中共106个差异表达的miRNA,其中miR-205表达明显上调,且变化量最大。本研究发现,miR-205在宫颈癌组织中表达水平明显高于癌旁组织,提示miR-205可能

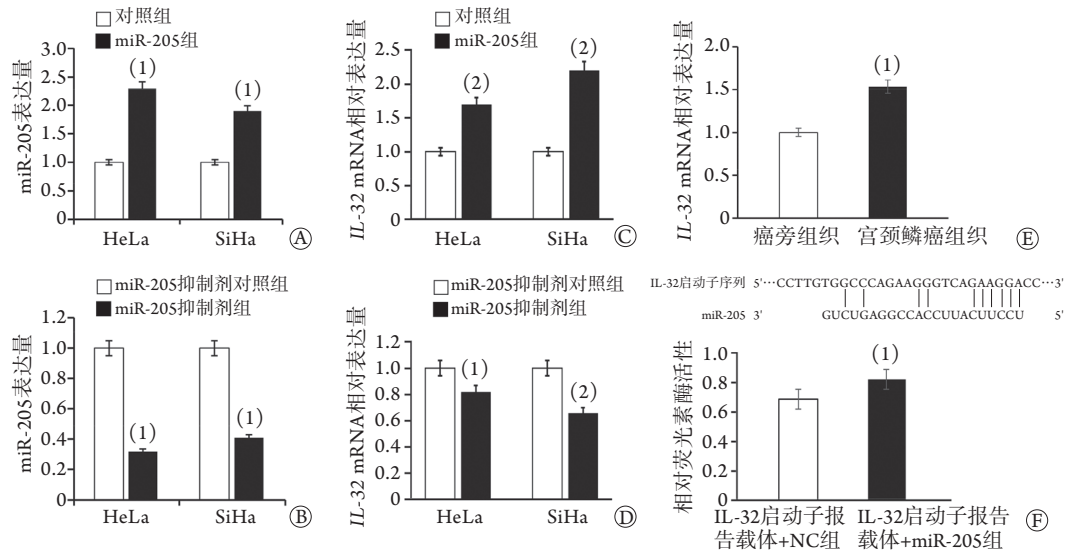


图4 miR-205对IL-32 mRNA表达的调节作用

Fig.4 Regulating effect of miR-205 and on the expression of IL-32 mRNA

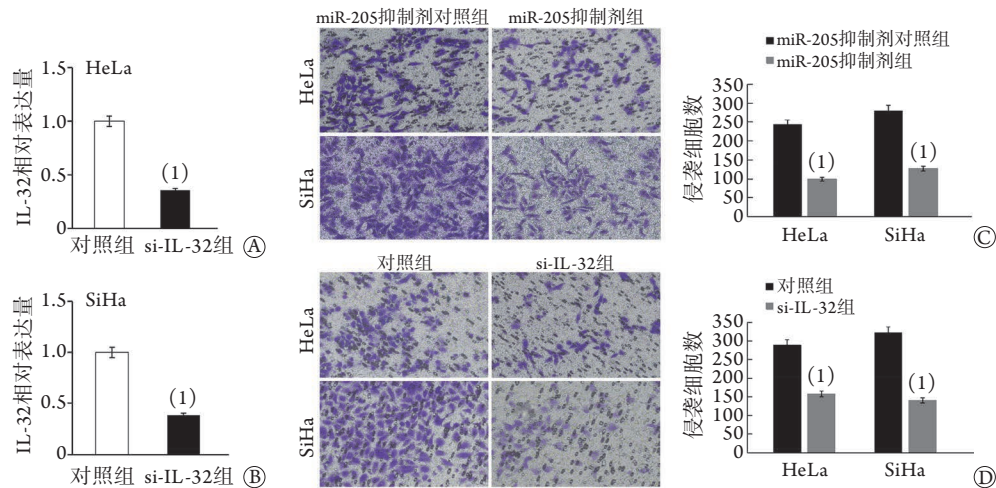
A、B. miR-205表达差异；C、D、E. IL-32 mRNA的表达差异；F. 相对荧光素酶活性；与对照组比较，(1) $P < 0.05$ ，(2) $P < 0.01$ 

图5 miR-205和IL-32对宫颈癌细胞侵袭的影响

Fig.5 The effect of miR-205 and IL-32 on the invasion of cervical cancer cells

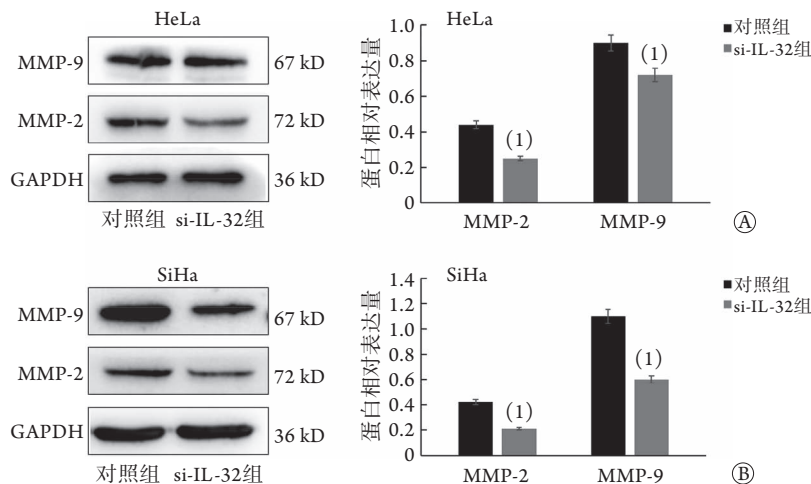
A、B. IL-32表达量；C、D. 细胞侵袭能力比较($\times 100$)；与对照组或miR-205抑制剂对照组比较，(1) $P < 0.05$ 

图6 降低IL-32表达对宫颈癌细胞MMP-2、MMP-9蛋白表达的影响

Fig.6 The effect of decreased expression of IL-32 on the expression of cervical cancer cells MMP-2 and MMP-9 proteins

A. HeLa细胞；B. SiHa细胞；与对照组比较，(1) $P < 0.05$

对宫颈癌的发生发展起重要作用。miR-205是一个非常保守的非编码RNA分子,在多种癌症的发生发展中异常表达,在不同类型的癌症中,既可以充当致癌因子,又可以充当抑癌因子的角色^[18]。在宫颈癌的研究中,关于miR-205的功能也有不同报道。有研究发现,miR-205促进了宫颈癌细胞的增殖、迁移及侵袭^[19-21],也有研究显示miR-205能够抑制宫颈癌细胞的增殖及侵袭^[22-23]。本研究证实,miR-205能促进宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭,为阐明miR-205在宫颈癌中的作用提供了新证据。

人IL-32起初发现于活化的NK细胞及T细胞,主要表达于免疫细胞及上皮细胞,是一种促炎细胞因子^[24]。IL-32在多种类型的癌症中异常表达,能够通过促炎效应、抗病毒感染、促血管生成等方式及途径参与调控肿瘤的发生发展,但其在宫颈癌中的作用研究较少。既往发现IL-32对宫颈癌的发展具有抑制作用^[25-26],但Lee等^[25]发现IL-32高表达与宫颈癌的进展显著相关,随着人乳头瘤病毒(HPV)持续感染,使炎症持续,可能会促进宫颈发生癌变。IL-32可诱导肿瘤坏死因子(TNF)- α 等炎症因子的表达,进而促进炎症反应^[27]。Lee等^[25]证实,IL-32可促进IL-1 β 、TNF- α 及IL-18等炎症因子的表达。本研究发现,miR-205可促进炎症因子IL-32的表达,进而增强MMP-2、MMP-9的表达,促进宫颈癌细胞的侵袭。有研究发现,miRNA与炎症因子能够相互作用:一方面,miRNA靶向炎症执行者,调节炎症反应;另一方面,炎症信号可改变miRNA的表达,进而调节炎症因子表达,破坏促肿瘤与抗肿瘤信号转导的平衡,进而在恶性转化中发挥重要的调控作用^[28]。上述结果提示,miR-205可能通过调控炎症因子IL-32的表达在宫颈癌的发生发展中发挥重要的促进作用。

经典理论认为,miRNA对靶基因具有负调控作用,但有研究发现miRNA在基因表达调控中也有正向调控的情况发生。Vasudevan等^[29]证实miRNA可从对基因表达的抑制作用转变为活化作用;Majid等^[30]发现,miR-205能够结合于IL-24及IL-32的启动子区,并诱导靶基因mRNA和蛋白的高表达;Kim等^[31]发现,口腔癌中miR-205能够直接上调IL-24的表达;Xiao等^[32]发现,位于细胞核内的miRNA可起到激活基因转录的作用;本课题组前期研究也发现,miR-205能够直接上调靶基因CHN1的表达^[21]。由此看来,miRNA对靶基因的调控机制除了经典的负调控以外,还可能有正调控作用。在miR-205的调控模式中已经多次发现正调控的现象,表明miR-205对靶基因调控机制较为复杂。本研究发现,在宫颈癌细胞中miR-205与IL-32 mRNA

的表达变化一致,原位杂交实验显示miR-205可能在细胞核中高表达;本实验还证实miR-205可通过与IL-32启动子相互作用提高IL-32 mRNA的表达量。这为后续研究miR-205的复杂作用机制指明了方向,也再次证实了miR-205与IL-32的调控关系,但miR-205通过调控IL-32的表达影响宫颈癌发生发展的具体机制还需进一步深入研究。

综上所述,在宫颈鳞癌中存在异常表达的miRNA,其中miR-205明显高表达,可能通过上调IL-32的表达调节MMP-2和MMP-9的表达水平,从而促进癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

【参考文献】

- [1] 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 Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Zheng RS, Sun KX, Zhang SW, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015[J]. Chin J Oncol, 2019, 41(1): 19-28.[郑荣寿,孙可欣,张思维,等.2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J].中华肿瘤杂志,2019,41(1):19-28.]
- [3] Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, et al. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Lancet, 2013, 382(9895): 889-899.
- [4] Zhao XY, Zhang M, Zhu ZH, et al. Effect and mechanism of 6-gingerol on invasion and migration of HPV-positive and negative cervical cancer cells[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(7): 691-696.[赵行宇,张漠,朱志华,等.6-姜烯酚对HPV阳性及阴性宫颈癌细胞侵袭及迁移的作用及其机制[J].解放军医学杂志,2020,45(7):691-696.]
- [5] Carvalho M, de Melo YLF. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections and cancer of the uterine cervix[J]. Crit Rev Oncog, 2019, 24(4): 379-383.
- [6] Zhao W, Hao M, Wang Y, et al. Association between folate status and cervical intraepithelial neoplasia[J]. Eur J Clin Nutr, 2016, 70(7): 837-842.
- [7] Hammond SM. An overview of microRNAs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 3-14.
- [8] Zhang MW, Zhu ZH, Xia ZK, et al. Comprehensive circRNA-microRNA-mRNA network analysis revealed the novel regulatory mechanism of Trichosporon asahii infection[J]. Mil Med Res, 2021, 8(4): 523-534.
- [9] Liu F, Zhang SM, Zhao Z, et al. microRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 19666-19679.
- [10] Hou T, Ou J, Zhao X, et al. MicroRNA-196a promotes cervical cancer proliferation through the regulation of FOXO1 and p27Kip1[J]. Br J Cancer, 2014, 110(5): 1260-1268.
- [11] Xu JJ, Zhang W, Lv QY, et al. Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN[J]. Oncol Rep, 2015, 33(6): 3108-3116.
- [12] Chu Y, Ouyang Y, Wang F, et al. MicroRNA-590 promotes cervical cancer cell growth and invasion by targeting CHL1[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(5): 847-853.

- [13] Zhang MT, Xu QL, Yan SF, *et al.* Suppression of forkhead box Q1 by microRNA-506 represses the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 3106-3114.
- [14] Cheng YX, Zhang QF, Hong L, *et al.* microRNA-200b suppresses cell invasion and metastasis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3155-3160.
- [15] Fan DM, Wang Y, Qi PW, *et al.* microRNA-183 functions as the tumor suppressor *via* inhibiting cellular invasion and metastasis by targeting MMP-9 in cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 141(1): 166-174.
- [16] Ribeiro J, Marinho-Dias J, Monteiro P, *et al.* miR-34a and miR-125b expression in HPV infection and cervical cancer development[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 304584.
- [17] Wang WT, Zhao YN, Yan JX, *et al.* Differentially expressed microRNAs in the serum of cervical squamous cell carcinoma patients before and after surgery[J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7: 6.
- [18] Chauhan N, Dhasmana A, Jaggi M, *et al.* miR-205: a potential biomedicine for cancer therapy[J]. *Cells*, 2020, 9(9): E1957.
- [19] Xie H, Zhao YG, Caramuta S, *et al.* miR-205 expression promotes cell proliferation and migration of human cervical cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46990.
- [20] Zhang F, Liu J, Xie BB. Downregulation of microRNA-205 inhibits cell invasion and angiogenesis of cervical cancer through TSLC1-mediated Akt signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18626-18638.
- [21] Liu JB, Li YF, Chen XH, *et al.* Upregulation of miR-205 induces CHN1 expression, which is associated with the aggressive behaviour of cervical cancer cells and correlated with lymph node metastasis[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1029.
- [22] Zhang Y, Zhang YS, Xue FX. miR-205 mediates the inhibition of cervical cancer cell proliferation using olmesartan[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2016, 17(3): 1470320316663327.
- [23] Pang H, Yue XY. miR-205 serves as a prognostic factor and suppresses proliferation and invasion by targeting insulin-like growth factor receptor 1 in human cervical cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317701308.
- [24] Dahl CA, Schall RP, He HL, *et al.* Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells[J]. *J Immunol*, 1992, 148(2): 597-603.
- [25] Lee S, Kim JH, Kim H, *et al.* Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to human papillomavirus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papillomavirus oncogene[J]. *Immunology*, 2011, 132(3): 410-420.
- [26] Goda C, Kanaji T, Kanaji S, *et al.* Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells[J]. *Int Immunol*, 2006, 18(2): 233-240.
- [27] Kim SH, Han SY, Azam T, *et al.* Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF alpha[J]. *Immunity*, 2005, 22(1): 131-142.
- [28] Ma YM, Han WX, Yang L, *et al.* The regulation of miRNA in inflammation-related carcinogenesis[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(21): 3023-3031.
- [29] Vasudevan S, Tong YC, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1931-1934.
- [30] Majid S, Dar AA, Saini S, *et al.* microRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer[J]. *Cancer*, 2010, 116(24): 5637-5649.
- [31] Kim JS, Yu SK, Lee MH, *et al.* microRNA-205 directly regulates the tumor suppressor, interleukin-24, in human KB oral cancer cells[J]. *Mol Cells*, 2013, 35(1): 17-24.
- [32] Xiao M, Li J, Li W, *et al.* microRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(10): 1326-1334.

(责任编辑: 熊晓然)