doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.15.008

MicroRNA-221/222 对乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞阿霉素耐药性的影响 *

郭 猛[1] 王 阳[1] 何庆泗[2△] 刘道同[1] 刘秀丽[1]

（1 山东中医药大学附属济宁市第一人民医院乳甲外科 山东 济宁 272111；2 山东大学齐鲁医院普外科 山东 济南 250012）

摘要 目的：探讨微小 RNA-221/222（miR-221/222）对乳腺癌 MDA-MB-231/ 阿霉素（DOX）细胞 DOX 耐药性的影响。**方法：**采用脂质体法转染 miR-221/222 抑制物（miR-221/222 inhibitor）至 MDA-MB-231/DOX 细胞内（Inhibitor 组），同时设立空白对照组和转染无关序列的阴性对照组，采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测 MDA-MB-231 细胞株及 MDA-MB-231/DOX 细胞株的 miR-221/222 表达水平及转染效率；CCK-8 法检测转染 48 h 后 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 药物敏感性的变化；流式细胞术（FCM）检测转染 MDA-MB-231/DOX 细胞的细胞凋亡率；蛋白免疫印迹实验（WB）检测转染后 MDA-MB-231/DOX 细胞内促凋亡蛋白 p53 上调凋亡调控因子（PUMA），Bcl2 蛋白修饰因子（BMF）以及细胞周期蛋白激酶抑制因子 p27（$p27^{Kip1}$）的表达情况。**结果：**MDA-MB-231/DOX 细胞中的 miR-221/222 表达水平高于亲本 MDA-MB-231 细胞（$P<0.05$）；MDA-MB-231/DOX 细胞转染 miR-221/222 inhibitor 96 h 后，miR-221/222 的表达水平低于空白对照组和阴性对照组（$P<0.05$）；与空白对照组相比，MDA-MB-231/DOX 细胞转染 miR-221/222 inhibitor 48h 后，DOX 继续处理 48 h 后，细胞的凋亡率明显升高，且细胞内的促凋亡蛋白 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kipl}$ 的表达均增加（$P<0.05$）；DOX 对 inhibitor 组耐药细胞的半数抑制浓度（IC_{50}）显著低于空白对照组细胞及阴性对照组（$P<0.05$）。**结论：**miR-221/222 能够增加 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 的耐药性，这可能与下调促凋亡蛋白的表达有关；降低 miR-221/222 水平可诱导 MDA-MB-231/DOX 凋亡，并且上调促凋亡蛋白的表达，从而部分逆转 MDA-MB-231/DOX 对 DOX 的耐药性。

关键词：MicroRNA-221/222；阿霉素；耐药性；乳腺癌；MDA-MB-231/DOX

中图分类号：R-33；R737.9 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2020)15-2843-05

Effect of Microrna-221/222 on Adriamycin Resistance of Breast Cancer MDA-MB-231/DOX Cells*

GUO Meng[1], WANG Yang[1], HE Qing-si[2△], LIU Dao-tong[1], LIU Xiu-li[1]

(1 Department of Breast and Thyroid Surgery, Jining First People's Hospital Affiliated to Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jining, Shandong, 272111, China; 2 Department of General Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan, Shandong, 250012, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of microrna-221/222 (miR-221/222) on DOX resistance of breast cancer MDA-MB-231/doxorubicin (DOX) cells. **Methods:** miR-221/222 inhibitor (miR-221/222 inhibitor) was transfected into MDA-MB-231/DOX cells by liposome method, the blank control group and the negative control group were set up meanwhile. The transfection efficiency and expression level of miR-221/222 in MDA-MB-231 cell line and cell line MDA-MB-231/DOX cell line was detected by real time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR); the change of drug sensitivity of MDA-MB-231/DOX cells to dox after 48 hours of transfection was detected by CCK-8 tests; the apoptosis rate of MDA-MB-231/DOX cells was detected by flow cytometry (FCM); the upregulation of pro-apoptotic protein p53 up regulates apoptosis (PUMA), bcl-2 protein modifying factor (BMF) and cyclin kinase inhibitor p27 ($p27^{kip1}$) in MDA-MB-231/DOX cells were detected by Western blotting (WB). **Results:** The expression level of miR-221/222 in MDA-MB-231/DOX cells was higher than that in MDA-MB-231 cells ($P<0.05$), the expression level of miR-221/222 in miR-221/222 inhibitor transfected by MDA-MB-231/DOX cells was lower than that in the blank control group and the negative control group ($P<0.05$) after 96 hours of treatment; compared with the blank control group, the expression level of miR-221/222 inhibitor transfected by MDA-MB-231/DOX cells was lower than that in the blank control group ($P<0.05$). The apoptotic rate of the cells increased significantly and the expression of apoptosis promoting protein puma, BMF and $p27^{kip1}$ in the cells increased ($P<0.05$); the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of drug resistance cells in the inhibitor group was significantly lower than that in the blank control group and the negative control group ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-221/222 can increase the resistance of MDA-MB-231/DOX cells to DOX,

* 基金项目：山东省自然科学基金项目（ZR2016YL639）

作者简介：郭猛（1986-），男，博士，主治医师，研究方向：乳腺、甲状腺，E-mail: qingsih@yeah.net

△ 通讯作者：何庆泗（1961-），男，硕士，主任医师，研究方向：普外科学，E-mail: Heqingshi517@126.com

（收稿日期：2019-12-23 接受日期：2020-01-18）

which may be related to down regulating the expression of pro-apoptotic protein, and down regulating the level of miR-221/222 can induce MDA-MB-231/DOX apoptosis and raise the expression of pro-apoptotic protein, which can partially reverse the resistance of MDA-MB-231/DOX to DOX.

Key words: MicroRNA-221/222; Doxorubicin; Drug resistance; Breast cancer; MDA-MB-231 /DOX

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)15-2843-05

前言

乳腺癌是一种高度异质性恶性肿瘤，严重威胁着女性的健康，化疗辅助手术治疗仍是治疗该病的主要方式[1,2]。目前认为，化疗耐药情况的发生是乳腺癌患者出现不良预后的重要因素，因此寻找能够逆转化疗耐药的有关靶标成为当前研究的热点[3,4]。

微小 RNA（microRNA，miR）是一类高度保守的长度约 22nt 的内源性非编码小分子单链 RNA，广泛存在于真核生物细胞中 [5]。近年来大量研究发现，miR 参与转录后基因表达调控，miR 的表达变化与多种恶性肿瘤的发生发展及化疗耐药密切相关[6-8]。与其他成簇 miR 一样，人 miR-221 与 miR-222 具有完全同源的核心种子序列（68-72），定位于 Xp11.3，呈前后排列[9]。近年来的研究表明，miR-221/222 在乳腺癌的发生及恶性进展中，发挥着重要作用，如 Zhao JJ 等 [10] 的研究表明，miR-221/222 能够负调控雌激素受体 -α（Estrogen receptor-α, ER-α）的表达，从而导致乳腺癌细胞对内分泌治疗药物他莫昔芬产生获得性耐药，为探讨 miR-221/222 在乳腺癌的化疗耐药中是否发挥作用，本研究选取乳腺癌 MDA-MB-231/ 阿霉素（Doxorubicin, DOX）细胞，通过改变细胞内 miR- 221/222 表达水平，观察其在 MDA-MB-231/DOX 细胞的 DOX 耐药中的作用，报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-231/DOX 在实验室常规培养，保种，MDA-MB-231/DOX 耐药细胞的耐药指数（Resistance index，RI）[11] 为 11.2。MDA-MB-231 细胞培养于 DMEM 培养基（成分：① 10% 的 FBS；② 10×10^4 U/L 的青霉素；③ 100 mg/L 的链霉素）中，MDA-MB-231/DOX 细胞培养于 DMEM 培养基（成分：① 1 μmol/L DOX；② 10%的 FBS；③ 10×10^4 U/L 的青霉素；④ 100 mg/L 的链霉素）中。有关条件：37℃下放于 5%的 CO_2 中给予培养，提取复苏之后的第 4-10 代子细胞实施实验。

1.2 细胞分组和转染

取 4×10^5 个对数生长期阶段的实验 MDA-MB-231/DOX 细胞，将其接种在 6 cm 的培养皿内，放置 24 h 后，以脂质体 Lipofectamine® 3000（美国 Invitrogen 公司）将 miR-221/222 in hibitor（5'-UGGGGUAUUUGACAAACUGACA-3'，上海生工生物工程技术服务有限公司）（inhibitor 组）及 miR 无关的序列（设为阴性对照组）将其转染于 MDA-MB-231/DOX 细胞内，涉及的步骤遵照说明书进行，而未转染的 MDA-MB-231/DOX 细胞为空白对照组。分别于 24 h，48 h，72 h 及 96 h 后，收集各组细胞。

1.3 实时荧光定量 PCR（real time quantitative PCR, qRT-PCR）

收集各实验组 $3\text{-}5\times10^5$ 个细胞，分别加入 1 mL Trizol 试剂（美国 Invitrogen 公司）后抽提细胞总 RNA，遵照试剂盒（上海谷研实业有限公司）附带的说明书实施操作。通过紫外分光光度计（美国 Thermo 公司）测定出总 RNA 的浓度和纯度（A_{260}/A_{280}），并以逆转录的试剂盒（美国 Invitrogen 公司）进行逆转录，产物置于 -20℃保存备用。miR-221/222 及内参 U6 的 qRT-PCR 引物序列（上海生工生物工程技术服务有限公司），见表 1。定量 PCR 扩增仪（ABI 7500，美国 ABI 公司）检测细胞内 miR-221/222 表达水平。qRT-PCR 扩增体系为 10 μL，反应条件：95℃，30 s；95℃，5s；60℃，35s，实施 40 个循环后通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定 miR-221/222 的相对表达量，将实验重复进行 3 次之后，进行统计分析。

表 1 qRT-PCR 检测 miR-221/222 的引物序列

Table 1 Primer sequence of miR-221 / 222 detected by qRT-PCR

Genes	Primers	Sequence(5'-3')
miR-221/222	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACACTCACC
	qRT-PCR	
	Forward	CAGCATACATGATTCCTTGTGA
	Reverse	CTTTGGTGTTTGAGATGTTTGG
U6	RT	TGGTGTCGTGGAGTCG
	qRT-PCR	
	Forward	CTCGCTTCGGCAGCACA
	Reverse	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.4 药物敏感性实验

转染 48h 后，将各组 MDA-MB-231/DOX 细胞成功接种在 96 孔板内，使每孔接种约 1×10^4 个实验细胞，依次添加不同浓度的 DOX（0，1，2，4，8，16，32 μmol/L），并设置 3 个复孔，再培养 48 h。完成后弃去上清，添加 CCK-8 法有关试剂，再培养 4 h，最后记录 450 nm 波长的有关吸光度值。以 SPSS20.0 软件计算 DOX 对各组 MDA-MB-231/DOX 细胞的半数抑制浓度（50% inhibitory concentration, IC_{50}），并绘图。

1.5 细胞凋亡检测

采用流式细胞术（Flow Cytometry, FCM），Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组 MDA-MB-231/DOX 细胞凋亡率，转染 48h 后，各组 MDA-MB-231/DOX 细胞中分别加入含有 3 μmol/L DOX 的无血清培养液，继续培养 48 h，收集各组细胞，PBS 洗涤 2 次，加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞，随后加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μL PI，混匀，室温避光孵育 10min，流式细胞仪（FACSCanto II，美国 BD 公司）检测细胞凋亡率，实验重复 3 次后，进行统计分析。

1.6 蛋白质免疫印迹检测（Western blotting, WB）

收集约 $4\text{-}6\times10^5$ 个实验细胞，添加 RIPA 蛋白的裂解液（上海谷研实业有限公司），成功抽提出细胞全蛋白，通过 BCA 蛋白定量试剂盒（美国 Thermo 公司）测定蛋白水平。利用 15%的 SDS-PAGE 胶常规电泳分离出蛋白之后，以湿转法使蛋白转至 PVDF 膜，再用 5%的脱脂奶粉于室温下震荡封闭约 2h，用 TBS-T 洗膜，兔抗人凋亡调控因子（PUMA）单克隆抗体（12450，美国 CST 公司，1:2000 稀释），兔抗人 Bcl2 蛋白修饰因子（BMF）多克隆抗体（5889，美国 CST 公司，1:1000 稀释），兔抗人细胞周期蛋白激酶抑制因子 p27（$p27^{Kip1}$）多克隆抗体（2552，美国 CST，1:2000 稀释），兔抗人型 GAPDH 单克隆抗体（2118，美国 CST，1:3000 稀释），在 4℃下孵育过夜。以 TBS-T 洗膜，而后添加 HRP 所标记的羊抗兔二抗（北京北方同正生物技术发展有限公司，1:10000 稀释），以室温孵育约 1 h，加 ECL 发光液（北京泰新生物科技有限公司）实施化学发光及显影，通过凝胶成像仪（GelDoc-It，美国 UVP 公司）为蛋白条带实施观察，得到图像后通过 ImageLab 软件实施灰度分析，登记灰度值。实验重复 3 次后，进行统计分析。

1.7 统计分析

通过 SPSS20.0 软件实施资料分析。计量资料经检验均符合正态分布，以（$\bar{x}\pm s$）的形式表示，组间比较采用 t 检验。检验标准设定为 $\alpha=0.05$，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞中 miR-221/222 表达情况及转染效率

转染前，qRT-PCR 实验结果显示，MDA-MB-231/DOX 细胞中的 miR-221/222 的表达量（6.34±0.35），显著高于亲本 MDA-MB-231 细胞的（1.02±0.06）（$P<0.05$），见图 1A，表明 miR-221/222 可能参与并促进了乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 的耐药性。采用脂质体转染 miR-221/222 inhibitor 至 MDA-MB-231/DOX 细胞中，转染 24 h 后，实验组的 miR-221/222 水平下降，并且抑制效应可持续至 96 h，miR-221/222 的表达水平分别降低至空白对照组的（68.92±3.07）%和阴性对照组的（64.59±2.68）%；且空白对照组与阴性对照组在转染后的各时间点的 miR-221/222 表达水平相比，无统计学意义（$P>0.05$），见图 1B。

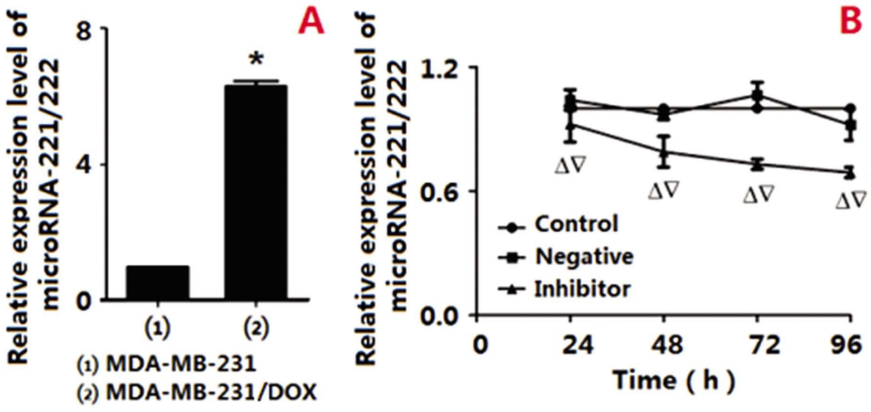

图 1 乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞中 miR-221/222 表达情况及转染效率

Fig.1 Expression and transfection efficiency of miR-221 / 222 in MDA-MB-231 / DOX cells of breast cancer

Note: Compared with MDA-MB-231 cells,*$P<0.05$; compared with the blank control group, $P<0.05$; compared with the negative control group, $P<0.05$.

2.2 miR-221/222 inhibitor 转染对 MDA-MB-231/DOX 细胞 DOX 耐药的影响

DOX 对 inhibitor 组耐药细胞的 IC_{50} 值为（3.11±1.02）μmol/L，明显低于空白对照组的（12.42±1.63）μmol/L 和阴性对照组的（11.61±1.37）μmol/L，差异有统计学意义（$P<0.05$），空白对照和阴性对照组的 IC_{50} 值无统计学差异（$P>0.05$），见图 2。

2.3 miR-221/222 inhibitor 转染对 MDA-MB-231/DOX 细胞凋亡的影响

与空白对照组相比，inhibitor 组耐药细胞在转染 miR-221/222 inhibitor 48 h 后，3 μmol/L DOX 继续处理 48 h，细胞的早期、晚期凋亡率以及总凋亡率均升高，亦高于阴性对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；而空白对照组和阴性对照组的早期、晚期凋亡率以及总凋亡率的差异均无统计学差异（$P>0.05$），见表 2。

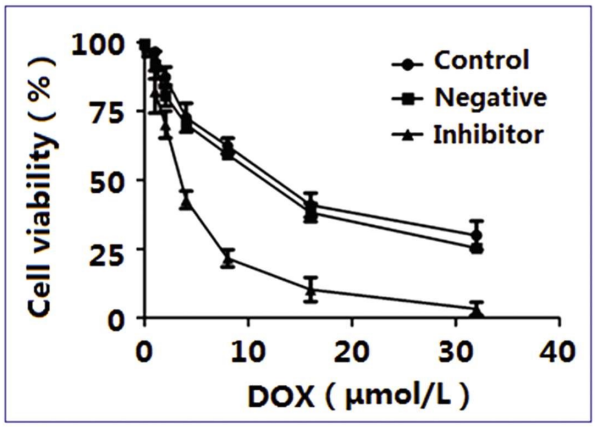

图 2 miR-221/222 水平变化对 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 药物敏感性的影响

Fig. 2 Effect of miR-221/222 on drug sensitivity of MDA-MB-231/DOX cells to dox

Note: After 48 hours of transfection, DOX (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μ mol / L) of different concentrations continued to treat cells for 48 hours, and CCK-8 was used to detect cell viability.

3 讨论

乳腺癌是女性易患的三大癌症之一，可严重危害生命健康。当前，化疗是临床上综合治疗方案当中重要的一环，但在化疗时出现的耐药性往往是引发治疗失败及预后不良，以及死亡的一个重要因素[12-14]。有报道表明，在肿瘤的发生及恶性进展中，会有大量 miR 发生改变，提示从 miR 角度探讨肿瘤的恶性进展机制有重要意义[15-17]。

近年来，miR 与肿瘤耐药之间的关系，受到越来越多的关注。miR 是通过 Drosha 酶及 Dicer 酶剪切 miR 前体所得，其可通过和靶基因 mRNA 的 3' 非编码区（3'Untranslated Region, 3'-UTR）结合，在转录水平或者转录后水平，调节靶基因的表达水平，进而参与细胞的各项生命活动 [18-20]。据文献报道，miR-221/222 与多种肿瘤的治疗疗效及预后相关，如前列腺癌[21]、结直肠癌[22]及肝癌[23]。Antoniali G 等[24]证实，miR-221/222 能够通过靶向 PTEN 信号通路，调节癌细胞的放疗敏感性。不少国外的研究[25-27]证明，miR-221/222 能够通过多种途径，如影响乳腺癌上皮间质转化、选择性干扰 A20/c-Rel/ 结缔生长因子 (Connective tissue growth factor, CTGF) 信号通路从而影响乳腺癌的发生发展。那么 miR-221/22 在乳腺癌的化疗耐药中，是否也发挥着诱导和促进作用呢？本研究探讨了 miR-221/22 在乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞 DOX 耐药中的作用。

表 2 转染 48h 后，各组 MDA-MB-231/DOX 细胞的凋亡率（%）

Table 2 Apoptosis ratio of MDA-MB-231/DOX cells in each group after 48 hours of transfection (%)

Groups	Early apoptosis ratio	Late apoptosis ratio	Total apoptosis ratio
Blank control group	2.13±0.25	3.21±0.71	5.61±1.14
Negative control group	1.79±0.17	3.54±0.48	5.46±1.25
Inhibitor group	4.38±1.12△▽	21.93±1.43△▽	26.37± 4.01△▽

Note: Compared with the blank control group, △P<0.05; compared with the negative control group, ▽ P<0.05.

2.4 miR-221/222 inhibitor 转染对 MDA-MB-231/DOX 细胞中促凋亡蛋白表达的影响

与空白对照组相比，inhibitor 组耐药细胞在转染 miR-221/222 inhibitor 48 h 后，细胞内的促凋亡蛋白 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$ 的表达均增加（P<0.05）；空白对照组与阴性对照组细胞内的 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$ 蛋白表达水平的差异，均无统计学意义（P>0.05），见图 3，表 3。

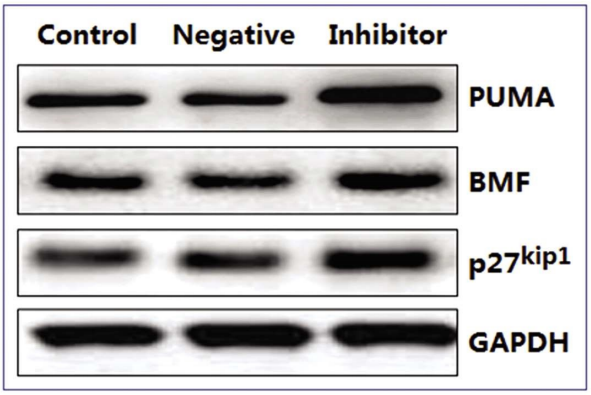

图 3 转染 48h 后，MDA-MB-231/DOX 细胞中促凋亡蛋白的表达水平

Fig.3 Expression level of pro-apoptotic protein in MDA-MB-231/DOX cells 48 hours after transfection

Note: 48 hours after transfection, WB detected the expression of puma, BMF and $p27^{kip1}$ in the cells.

本研究实验结果发现转染 miR-221/222 inhibitor 后，MDA-MB-231/DOX 细胞的早期，晚期以及总凋亡率均显著升高，表明降低 miR-221/222 水平可达到促进细胞凋亡的效果，提示 miR-221/222 具有原癌基因的作用。此外，抑制 miR-221/222 水平可提高 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 的药物敏感性，可见抑制 miR-221/222 能够增加乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 的药物敏感性，提示抑制 miR-221/222 有逆转乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 耐药的潜能。

多项研究证实[28-30]，miR-221/222 可通过调节靶蛋白的转录表达，如 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$ 等，从而在多种恶性肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用。在本研究中，我们采用 WB 法检测了 MDA-MB-231/DOX 细胞中，抑制 miR-221/222 的表达后，促凋亡蛋白 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$ 的表达水平的变化情况，实验结果显示，降低 MDA-MB-231/DOX 细胞内 miR-221/222 水平，PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$ 的蛋白表达水平也随之增加，说明在乳腺癌 MDA-MB-231/DOX 细胞中 miR-221/222 可能参与了促凋亡蛋白 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$

表 3 转染 48h 后，MDA-MB-231/DOX 细胞中促凋亡蛋白的表达水平

Table 3 Expression level of pro-apoptotic protein in MDA-MB-231/DOX cells 48 hours after transfection

Groups	PUMA	BMF	$p27^{Kip1}$
Blank control group	0.75±0.03	0.59±0.05	0.61±0.04
Negative control group	0.69±0.04	0.52±0.05	0.64±0.06
Inhibitor group	1.13±0.12△▽	1.19±0.06△▽	0.96±0.05△▽

Note: Compared with the blank control group, $P<0.05$; compared with the negative control group, $P<0.05$.

的表达调控。本研究的不足之处在于，并没有针对 miR-221/222 调控促凋亡蛋白 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$ 表达的具体机制作深入研究，接下来，我们将会进一步深入探讨其内在机制，并且探寻 miR-221/222 诱导乳腺癌细胞化疗耐药过程中的新靶蛋白。

综上所述，抑制 miR-221/222 表达可降低 MDA-MB-231/DOX 细胞对 DOX 的耐药性，这可能是通过增加促凋亡蛋白 PUMA，BMF 以及 $p27^{Kip1}$ 表达实现的，提示 miR-221/222 在逆转乳腺癌 DOX 耐药中有一定的应用前景。

参考文献(References)

[1] 刘美宏, 毕洁领, 唐文, 等. 保乳手术与改良根治术治疗Ⅰ-Ⅱ期乳腺癌患者的疗效及生存状况比较研究[J].现代生物医学进展, 2018, 18(14): 2738-2741, 2787

[2] Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, et al. Mesenchymal-epithelial Transition and Tumor Vascular Remodeling in Eribulin Chemotherapy for Breast Cancer[J]. Anticancer Res, 2018, 38(1): 401-410

[3] Lee KM, Giltnane JM, Balko JM, et al. MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation [J]. Cell Metab, 2017, 26(4): 633-647

[4] Li Y, Gao X, Yu Z, et al. Reversing Multidrug Resistance by Multiplexed Gene Silencing for Enhanced Breast Cancer Chemotherapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(18): 15461-15466

[5] Ritchie W. microRNA Target Prediction [J]. Methods Mol Biol, 2018, 427(3): 193-200

[6] 刘锐, 巴一. 外泌体传输 microRNA 在肿瘤研究中的进展[J].中国肿瘤临床, 2016, 43(10): 442-445

[7] Chang RK, Li X, Mu N, et al. MicroRNA expression profiles in non-epithelial ovarian tumors[J]. Int J Oncol, 2018, 52(1): 55-66

[8] Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis [J]. Cell Oncol (Dordr), 2017, 40(4): 303-339

[9] Zhu Z, Zhang D, Lee H, et al. Macrophage-derived apoptotic bodies promote the proliferation of the recipient cells via shuttling microRNA-221/222[J]. J Leukoc Biol, 2017, 101(6): 1349-1359

[10] Zhao JJ, Lin J, Yang H, et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptorαand is associated with tamoxifen resistance in breast cancer[J]. J Biol Chem, 2016, 291(43): 22859

[11] Peng Z, Zhang C, Zhou W, et al. The STAT3/NFIL3 signaling axis mediated chemotherapy resistance is reversed by Raddeanin A via inducing apoptosis in choriocarcinoma cells [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(7): 5370-5382

[12] Liang Y, Li Y, Song X, et al. Long noncoding RNA LINP1 acts as an oncogene and promotes chemoresistance in breast cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(2): 120-131

[13] Zhong JT, Yu J, Wang HJ, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on the autophagy, apoptosis, and chemotherapy resistance of human breast cancer cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2017, 39(5): 1010428317697562

[14] Hasna J, Hague F, Rodat-Despoix L, et al. Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: the p53 connection [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(4): 691-705

[15] Ahrend H, Kaul A, Ziegler S, et al. MicroRNA-1 and MicroRNA-21 Individually Regulate Cellular Growth of Non-malignant and Malignant Renal Cells[J]. In Vivo, 2017, 31(4): 625-630

[16] Kim R, Park SI, Lee CY, et al. Alternative new mesenchymal stem cell source exerts tumor tropism through ALCAM and N-cadherin via regulation of microRNA-192 and -218 [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 427(1-2): 177-185

[17] Xu F, Liao JZ, Xiang GY, et al. MiR-101 and doxorubicin codelivered by liposomes suppressing malignant properties of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Med, 2017, 6(3): 651-661

[18] 谢静, 王天娇, 张旭凤, 等. MicroRNA 和 NF－κB 与胃癌侵袭转移关系的研究进展[J].实用肿瘤学杂志, 2016, 30(4): 380-384

[19] Thamotharan S, Chu A, Kempf K, et al. Differential microRNA expression in human placentas of term intra-uterine growth restriction that regulates target genes mediating angiogenesis and amino acid transport[J]. Plos One, 2017, 12(5): e0176493

[20] Alam KJ, Mo JS, Han SH, et al. MicroRNA 375 regulates proliferation and migration of colon cancer cells by suppressing the CTGF-EGFR signaling pathway[J]. Int J Cancer, 2017, 141(8): 1614-1629

[21] Sun T, Du SY, Armenia J, et al. Expression of lncRNA MIR222HG co-transcribed from the miR-221/222 gene promoter facilitates the development of castration-resistant prostate cancer [J]. Oncogenesis, 2018, 7(3): 30

[22] Wang L, Liu C, Li C, et al. Effects of microRNA-221/222 on cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells [J]. Gene, 2015, 572(2): 252-258

[23] 赵甜甜, 赵雯秋. 原发性肝癌患者血清 miR-221 检测的临床意义[J].检验医学与临床, 2018, 15(23): 3546-3548, 3552

[24] Antoniali G, Serra F, Lirussi L, et al. Mammalian APE1 controls miRNA processing and its interactome is linked to cancer RNA metabolism[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 797

[25] Han SH, Kim HJ, Gwak JM, et al. MicroRNA-222 Expression as a Predictive Marker for Tumor Progression in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer[J]. J Breast Cancer, 2017, 20(1): 35-44

(下转第 2909 页)

non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 158 (3): 911-919.e6

[11] Besse B, Adjei A, Baas P, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease [J]. Ann Oncol, 2014, 25(8): 1475-1484

[12] Schroedl F1, Kaser-Eichberger A2, Schlereth SL3, et al.Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(10): 6440-2

[13] Douglas E. Wood, Ella A. Kazerooni, Scott L. Baum, et al. Lung Cancer Screening, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network Jnccn, 2018, 16(4): 412-441

[14] Oxnard GR, Yang JC, Yu H, et al. TATTON: a multi-arm, phase Ib trial of osimertinib combined with selumetinib, savolitinib, or durvalumab in EGFR-mutant lung cancer[J]. Ann Oncol, 2020, 31(4): 507-516

[15] Matsumoto Y, Sawa K, Fukui M, et al. Impact of tumor microenvironment on the efficacy of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2019, 110(10): 3244-3254

[16] Iacovelli R, Ciccarese C, Brunelli M, et al. PD-L1 Expression in De Novo Metastatic Castration-sensitive Prostate Cancer [J]. J Immunother, 2019, 42(7): 269-273

[17] Sakata Y, Kawamura K, Ichikado K, et al. Comparisons between tumor burden and other prognostic factors that influence survival of patients with non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(12): 2259-2266

[18] Watanabe H, Ohashi K, Nishii K, et al. A Long-term Response to Nivolumab in a Case of PD-L1-negative Lung Adenocarcinoma with an EGFR Mutation and Surrounding PD-L1-positive Tumor-associated Macrophages[J]. Intern Med, 2019, 58(20): 3033-3037

[19] Nakanishi Y, Masuda T, Yamaguchi K, et al. Pre-existing interstitial lung abnormalities are risk factors for immune checkpoint inhibitor-induced interstitial lung disease in non-small cell lung cancer[J]. Respir Investig, 2019, 57(5): 451-459

[20] Koyama J, Horiike A, Yoshizawa T, et al. Correlation between thyroid transcription factor-1 expression, immune-related thyroid dysfunction, and efficacy of anti-programmed cell death protein-1 treatment in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(5): 1919-1928

[21] Darb-Esfahani S, Kunze C A, Kulbe H, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(2): 1486-1499

[22] Kumar M, Guleria B, Swamy S, et al. Correlation of programmed death-ligand 1 expression with gene expression and clinicopathological parameters in Indian patients with non-small cell lung cancer[J]. Lung India, 2020, 37(2): 145-150

[23] Jadhav RR, Im SJ, Hu B, et al. Epigenetic signature of PD-1+ TCF1+ CD8 T cells that act as resource cells during chronic viral infection and respond to PD-1 blockade [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(28): 14113-14118

[24] Takada K, Yoneshima Y, Tanaka K, et al. Clinical impact of skeletal muscle area in patients with non-small cell lung cancer treated with anti-PD-1 inhibitors[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(5): 1217-1225

[25] Pockley AG, Vaupel P, Multhoff G. NK cell-based therapeutics for lung cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2020, 20(1): 23-33

[26] Ritzmann F, Jungnickel C, Vella G, et al. IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10353

[27] Petrova MP, Eneva MI, Arabadjiev JI, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio as a potential predictive marker for treatment with pembrolizumab as a second line treatment in patients with non-small cell lung cancer[J]. Biosci Trends, 2020, 14(1): 48-55

[28] Kim T, Cha YJ, Chang YS. Correlation of PD-L1 Expression Tested by 22C3 and SP263 in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Prognostic Effect on EGFR Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma [J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2020, 83(1): 51-60

[29] Lisberg A, Garon EB. Lack of clearly defined role for anti-programmed death- (ligand) 1 therapy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer [J]. Transl Lung Cancer Res, 2019, 8(2): 195-197

（上接第 2847 页）

[26] Santolla MF, Lappano R, Cirillo F, et al. miR-221 stimulates breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) through selective interference with the A20/c-Rel/CTGF signaling [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 94

[27] Amini S, Abak A, Estiar MA, et al. Expression Analysis of MicroRNA-222 in Breast Cancer[J]. Clin Lab, 2018, 64(4): 491-496

[28] 王轩,韩磊,张安玲,等.腺病毒载体介导 shRNAs 共调控胶质母细胞瘤细胞中 miR-221/222 的表达及功能的体外研究[J].中华神经医学杂志, 2016, 15(3): 224-230

[29] 秦娜, 李广波, 郭树霞, 等. MicroRNA-221(miR-221)抑制 $p27^{Kipl}$ 蛋白促进慢性粒细胞白血病的发生[J].首都医科大学学报, 2017, 38 (4): 580-585

[30] Zhao JJ, Chu ZB, Hu Y, et al. Targeting the miR-221-222/ PUMA/BAK/BAX Pathway Abrogates Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma[J]. Cancer Res, 2015, 75(20): 4384-4397