

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.21.008

miR-21 对人喉鳞癌细胞 Hep2 迁移侵袭能力的影响

刘永军¹,管艳飞¹,常 顺^{2△}

(云南省第一人民医院:1.耳鼻喉科;2.神经外科,昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨微小 RNA-21(miR-21)对人喉鳞癌细胞 Hep2 迁移、侵袭能力的影响。**方法** 用脂质体 Lipofectamine™2000 将 miR-21 抑制剂和 miR-21 NC 转入人喉鳞癌细胞 Hep2 中,48 h 后,运用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力,划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell 小室法检测细胞侵袭能力,蛋白质印迹法检测人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(PTEN)/磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)的激活情况,以及基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 与伴有 kazal 域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(RECK)的表达。**结果** 与 miR-21 NC 比较,miR-21 抑制剂能明显降低 Hep2 细胞活力[(0.688±0.043) vs. (0.375±0.012)],抑制细胞迁移能力[(6.57±0.02)μm vs. (20.49±2.18)μm]及细胞侵袭能力[(100.7±10.2) vs. (46.8±4.3)],差异均有统计学意义($P<0.01$);同时 miR-21 抑制剂能明显下调 PI3K、MMP2 及 MMP9 的表达($P<0.01$),降低 Akt 的磷酸化水平($P<0.01$),并上调 PTEN 及 RECK 的表达($P<0.01$)。**结论** miR-21 抑制剂能明显抑制人喉鳞癌细胞 Hep2 的迁移、侵袭能力,可能与 PTEN/PI3K/Akt 信号通路有关。

[关键词] 微小 RNA-21;人喉鳞癌 Hep2 细胞;迁移;侵袭**[中图分类号]** R739.65**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)21-2906-03**Effect of miR-21 on migration and invasion ability in human laryngeal squamous carcinoma cell Hep2**Liu Yongjun¹,Guan Yanfei¹,Chang Shun^{2△}

(1. Department of Ear Nose Throat; 2. Department of Neurosurgery, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of microRNA-21(miR-21) on the migration and invasion ability in human laryngeal squamous carcinoma cell Hep2. **Methods** The MTT method was used to detect the viability of Hep2 cells at 48 h after miR-21 inhibitor and miR-21 NC transferring into Hep2 cells by Lipofectamine™2000. The cell migration ability was detected by using the scratch test. The cell invasion ability was detected by using the Transwell method. The activation of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN)/ phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) / protein kinase B(Akt) signal pathway and the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9, reversion inducing cysteine rich protein with kazal motif (RECK) was detected by using the Western blotting. **Results** Compared with miR-21 NC, miR-21 inhibitor could significantly reduce the Hep2 cell viability[(0.688±0.043) vs. (0.375±0.012)], inhibited the migration ability[(6.57±0.02)μm vs. (20.49±2.18) μm] and invasion ability[(100.7±10.2) vs. (46.8±4.3)], and the differences were statistically significant($P<0.01$), meanwhile miR-21 inhibitor could down-regulate the expression of PI3K, MMP2 and MMP9($P<0.01$), and reduced the phosphorylation level of Akt ($P<0.01$), up-regulated the expression of PTEN and RECK ($P<0.01$). **Conclusion** miR-21 inhibitor can significantly suppress the migration and invasion ability of Hep2, which may be related with the PTEN/PI3K/Akt signal pathway.

[Key words] microRNA-21; human laryngeal squamous carcinoma cell Hep2; migration; invasion

喉鳞癌是我国常见的头颈部恶性肿瘤,占头颈部肿瘤的14%左右,其中喉鳞状细胞癌是其主要病理类型,占90%以上。喉鳞癌的主要治疗方式为手术治疗,辅以化疗和放射治疗,但对中晚期患者预后及5年生存率效果欠佳,主要原因是恶性肿瘤的侵袭转移,并最终导致患者死亡^[1-2]。而且喉鳞癌的发病机制尚未清楚,吸烟、饮酒、病毒感染、空气污染及癌基因的激活与抑癌基因的失活都可能是其病因^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是目前新发现的一类癌基因或抑癌基因,并与肿瘤的发生、发展密切相关,在肿瘤的增殖、凋亡、侵袭转移中起重要作用^[3]。已证实微小RNA-21(microRNA-21, miR-21)是唯一一个在已检测的恶性肿瘤中均表达上调的miRNA,在肿瘤中发挥着癌基因作用^[4-5]。此外,通过miRNA芯片技术也证实48对喉鳞状细胞癌标本中包括miR-21在内的4个miRNA表达水平上调^[6]。同时也发现喉鳞状细胞癌患者血清miR-21表达水平明显过高,并与淋巴结转移密切相

关,且可作为喉鳞状细胞癌标记物及预后的独立因子^[7]。充分说明miR-21在喉鳞癌中过表达,并与喉鳞癌的发生、发展密切相关。因此,探讨miR-21在喉鳞癌发生、发展过程中的作用,具有重要的理论意义。所以,本研究拟通过下调人喉鳞癌细胞Hep2中miR-21的表达,探讨其对Hep2细胞迁移、侵袭能力的影响及具体机制,从而为喉鳞癌的早期诊断及预后判断提供新思路。

1 材料与方

1.1 细胞株来源 人喉鳞癌细胞 Hep2 购自中国科学院细胞库(目录号:TCHu21)。

1.2 仪器与试剂 四甲基偶氮唑盐(MTT,美国Gibco公司),miR-21抑制剂和miR-21 NC(上海吉玛制药技术有限公司);张力蛋白同源的基因(PTEN),磷脂酰肌醇3激酶(PI3K),蛋白激酶B(Akt),伴有kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(RECK),基质金属蛋白酶(MMP)2,MMP9(美国

Epitomics 公司);胎牛血清,达氏修正依氏培养基(DMEM,美国 Hyclone 公司);三磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH,碧云天生物技术有限公司)。迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪(北京六一仪器厂);ChemidocTM XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 方法

1.3.1 MTT 比色法检测 Hep2 细胞活力 将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 96 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-21 抑制剂和 miR-21 NC。48 h 后,加入 5 mg/mL MTT 20 μL,继续培养 4 h 后吸弃培养液,每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μL,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 560 nm 处测吸光度值(A 值),以 A 值表示细胞相对活力。

1.3.2 划痕实验 将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 6 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用移液器枪头沿培养板底部呈“一”字型划痕单层细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤被刮下的细胞,更换培养基后,用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-21 抑制剂和 miR-21 NC。48 h 后,倒置显微镜下观察 Hep2 细胞向划痕区域的迁移距离并拍照。

1.3.3 Transwell 侵袭实验 将基质胶(matrigel)均匀平铺于 Transwell 小室的微膜(8 μm)上,制成凝胶备用。将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 6 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-21 抑制剂和 miR-21 NC。48 h 后,将细胞消化加入 Transwell 上室,下室用含 5%胎牛血清的 DMEM 培养基,继续培养 24 h,取出 Transwell 小室,洗涤,多聚甲醛固定,结晶紫染色,被染色的细胞质呈紫色,倒置光学显微镜下计数 5 个视野穿膜细胞个数,计算平均每个视野的细胞数,即表示细胞的侵袭能力。每组实验重复 3 次。

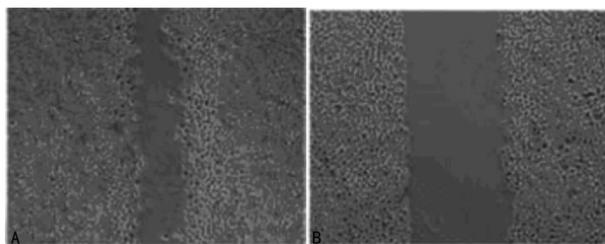
1.3.4 蛋白质印迹法(Western blotting) 将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 6 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-21 抑制剂和 miR-21 NC。48 h 后消化收集细胞,加入放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液,每隔 10 min 置于涡旋仪中震荡 30 s,40 min 后 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液,即可获得总蛋白。根据二喹啉甲酸(BCA)试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,进行十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶电泳,后湿法转膜。将膜浸入一抗溶液孵育,4 °C 过夜;漂洗后,浸入二抗溶液中室温孵育 1~2 h。将膜取出漂洗,在膜上滴加电化学发光(ECL)曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用 Quantity One 软件对各抗体条带灰度值进行统计。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,所有数据至少重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学。

2 结果

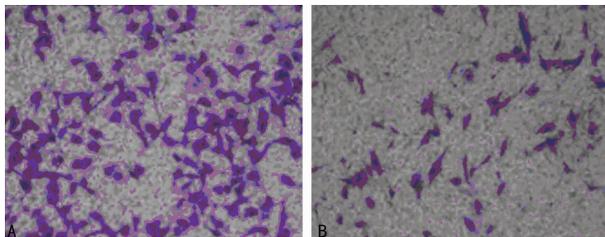
2.1 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞活力的影响 Hep2 细胞转染 miR-21 抑制剂和 miR-21 NC 48 h 后,经 MTT 比色法发现,细胞转染 miR-21 抑制剂其 A 值(0.375 ± 0.012) 低于转染 miR-21 NC 的(0.688 ± 0.043),差异有统计学意义($P < 0.01$),表明 miR-21 抑制剂能明显抑制 Hep2 细胞活力。

2.2 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞迁移侵袭能力的影响 与 miR-21 NC 比较,miR-21 抑制剂能明显抑制人喉鳞癌 Hep2 细胞的迁移、侵袭能力,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1、2 及表 1。



A: miR-21 NC; B: miR-21 抑制剂。

图 1 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞迁移能力的影响(×100)



A: miR-21 NC; B: miR-21 抑制剂。

图 2 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色,×200)

表 1 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞迁移、侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞迁移距离(μm)	细胞侵袭数目
miR-21 NC	6.57 ± 0.02	100.7 ± 10.2
miR-21 抑制剂	20.49 ± 2.18 *	46.8 ± 4.3 *

* : $P < 0.01$, 与 miR-21 NC 比较。

2.3 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞中 MMPs 及 RECK 蛋白表达的影响 与 miR-21 NC 比较,miR-21 抑制剂能明显下调人喉鳞癌 Hep2 细胞中 MMP2、MMP9 的表达,上调 RECK 的表达,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3、表 2。

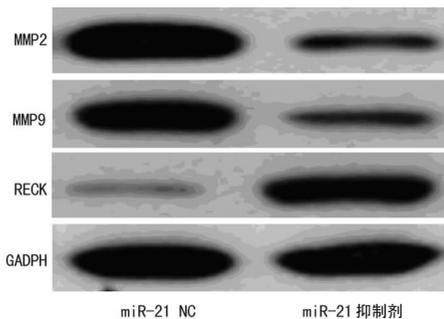


图 3 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞中 MMPs 及 RECK 蛋白表达的影响

表 2 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞中 MMPs 及 RECK 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP2/ GADPH	MMP9/ GADPH	RECK/ GADPH
miR-21 NC	1.089 ± 0.084	0.997 ± 0.078	0.283 ± 0.010
miR-21 抑制剂	0.342 ± 0.020 *	0.305 ± 0.026 *	0.975 ± 0.064 *

* : $P < 0.01$, 与 miR-21 NC 比较。

2.4 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞中 PTEN/Akt 信

号通路的影响 与 miR-21 NC 比较,miR-21 抑制剂能明显下调人喉鳞癌 Hep2 细胞中 PI3K 的表达及 Akt 磷酸化水平,上调 PTEN 的表达,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 4、表 3。

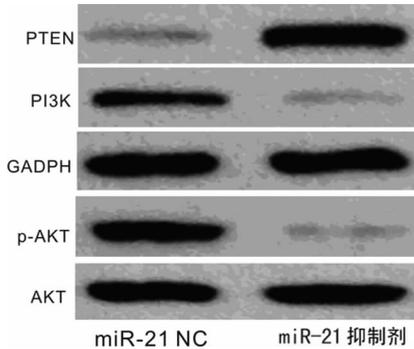


图 4 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞中 PTEN/Akt 信号通路的影响

表 3 miR-21 抑制剂对人喉鳞癌 Hep2 细胞中 PTEN/Akt 信号通路的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN/GADPH	PI3K/GADPH	p-Akt/Akt
miR-21 NC	0.287±0.011	0.502±0.046	1.007±0.104
miR-21 抑制剂	1.009±0.097*	0.133±0.012*	0.169±0.020*

*: $P < 0.01$, 与 miR-21 NC 比较。

3 讨论

miRNAs 是一类进化上高度保守的内源性非编码小分子 RNA,它能够结合于靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域,阻遏靶基因的翻译,从而抑制靶基因表达。miR-21 是 2001 年在非脊椎动物和脊椎动物中发现的第一个 miRNA,随后在小鼠的神经元细胞及 HeLa 细胞中也分别检测到,其具有较强的组织特异性,与多种实体肿瘤的发生、发展密切相关,在喉鳞癌中也表达异常,并呈上调趋势。如 Kalfert 等^[5]对 51 例头颈部鳞状细胞癌组织(23 例咽癌、24 例喉癌、4 例鼻咽癌)及正常鳞上皮组织进行实时荧光定量 PCR(RT-PCR)分析,结果发现 miR-21 在所有癌组织中表达水平都明显上调。Cao 等^[6]进一步通过 miRNA 芯片也证实 48 对喉鳞状细胞癌标本中包括 miR-21 在内的 4 个 miRNA 表达水平上调。Wang 等^[7]检测 52 例喉鳞状细胞癌患者及 52 例声带息肉患者血清中 miR-21 的表达,发现喉鳞状细胞癌患者血清 miR-21 表达水平明显过高,并与淋巴结转移密切相关,其可作为喉鳞状细胞癌标记物及预后的独立因子。此外,Liu 等^[8]也证实喉鳞癌中 miR-21 过表达,且高表达的 miR-21 与临床分期、病理分化及淋巴结转移密切相关,说明 miR-21 在喉鳞癌细胞中起致癌 miRNA 的作用,并与喉癌淋巴结转移密切相关。因此,本研究在此基础上探讨 miR-21 对人喉鳞癌细胞 Hep2 迁移、侵袭的作用。

Reis 等^[9]证实 RECK 是 miR-21 的下游靶基因,miR-21 能靶向下调 RECK,且 RECK 的低表达导致了 MMP9 的高表达,从而促进胰腺癌细胞的侵袭。左文娜^[10]证实 RECK 在喉癌组织中低表达,并与喉癌的发生、发展、分化及淋巴结转移密切相关。RECK 是一种新型的 MMPs 抑制剂,可在转录后水平明显抑制多种 MMPs 的表达,从而抑制肿瘤的侵袭转移及血管生成。MMPs 是降解细胞外基质的最重要的蛋白水解酶,其中 MMP2 不仅可以降解细胞外基质中的明胶 IV 型胶原等,还可以通过新生毛细血管促进肿瘤的侵袭及转移。MMP9 是

MMPs 中相对分子质量最大的酶,能够降解细胞外基质和基底膜,从而增加细胞的运动能力,促进肿瘤的扩散和转移。吴春芳等^[11]证实,MMP2 在喉癌组织中的阳性率明显高于癌旁组织,并与分化程度及临床分期密切相关。刘玉东等^[12]证实 MMP9 在喉癌组织中的阳性率明显高于癌旁组织,并与肿瘤的发生、发展密切相关。因此,上调 RECK 表达,下调 MMP2 及 MMP9 的表达,能在一定程度上抑制细胞外基质破坏,抵抗肿瘤细胞侵袭。本研究结果恰好证实了 miR-21 抑制剂可以明显地上调 RECK 的表达,下调 MMP2 及 MMP9 的表达,从而抑制 Hep2 细胞的侵袭、迁移能力。

肿瘤的侵袭、转移等生物学行为与多种信号通路有关,PTEN/PI3K/Akt 就是其中的一种。已证实 PTEN 是 miR-21 的下游靶基因,PTEN 在众多肿瘤中表达缺失或突变。PTEN 在喉鳞癌中低表达,并与肿瘤分期、肿瘤范围及淋巴结转移密切相关,且 miR-21 与 PTEN 呈负相关^[8]。PTEN 能将三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)去磷酸化为二磷酸脂酰肌醇(PIP2),从而负调控 PI3K/Akt 信号通路,负调节细胞生长、凋亡、迁移侵袭等生物学行为。PI3K/Akt 信号通路与多种人类肿瘤的发生、发展密切相关,能通过下游多种靶蛋白表达,从而参与调控肿瘤细胞的生长、凋亡、周期调控,血管生成,侵袭转移等过程。已报道,PI3K/Akt 在喉鳞癌中异常激活^[13]。孙吉春等^[14]证实,miR-21 抑制剂能明显抑制 PTEN/PI3K/Akt 信号通路,从而抑制胰腺癌细胞的侵袭转移。miR-21 抑制剂能明显抑制人舌鳞状细胞癌的增殖及侵袭能力^[15]。本研究结果也表明,miR-21 抑制剂能明显上调 PTEN 表达水平,下调 PI3K 表达水平及 Akt 磷酸化水平。从而说明,miR-21 能通过 PTEN/PI3K/Akt 信号通路影响喉鳞癌 Hep2 细胞的迁移、侵袭能力。

综上所述,miR-21 抑制剂能明显抑制人喉鳞癌细胞 Hep2 的迁移、侵袭能力,可能与上调 RECK 表达,下调 MMPs 表达,以及 PTEN/PI3K/Akt 信号通路失活有关。

参考文献

- [1] 骆文龙. 喉癌治疗的进展和相关问题[J]. 重庆医学, 2007,36(12):1119-1120.
- [2] Zhang W, Liu Y, Wang CW. S100A4 promotes squamous cell laryngeal cancer Hep-2 cell invasion via NF- κ B/MMP-9 signal[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(9):1361-1367.
- [3] 张经波,汪荣泉. mir-21 的转录调控及在肿瘤中的作用研究进展[J]. 重庆医学, 2012,41(31):3336-3337.
- [4] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [5] Kalfert D, Pesta M, Kulda V, et al. MicroRNA profile in site-specific head and neck squamous cell cancer[J]. Anti-cancer Res, 2015, 35(4):2455-2463.
- [6] Cao PY, Zhou L, Zhang J, et al. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Head Neck, 2013, 35(5):720-728.
- [7] Wang JT, Zhou YD, Lu J, et al. Combined(下转第 2913)

尿病类型进行分型诊断和治疗。

参考文献

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(Suppl 1):S64-71.
- [2] Atkinson M, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes[J]. *Lancet*, 2014, 383(9911):69-82.
- [3] Tuomi T, Santoro N, Caprio S, et al. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity[J]. *Lancet*, 2014, 383(9922):1084-1094.
- [4] Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL, et al. 自身抗体[M]. 邹和建, 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009:287-294.
- [5] Wilmot-Roussel H, Lévy DJ, Carette C, et al. Factors associated with the presence of glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2 autoantibodies in patients with longstanding type 1 diabetes [J]. *Diabetes Metab*, 2013, 39(3):244-249.
- [6] 顾榕, 王知笑, 杨慧, 等. 我国汉族 1 型糖尿病 HLA 基因与 4 种胰岛自身抗体关系的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(12):881-888.
- [7] 王建平, 张弛, 林健, 等. 1 型糖尿病患者胰岛自身抗体与人类白细胞抗原-DQ 基因型的关系[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(34):2380-2384.
- [8] Siraj ES, Rogers DG, Gupta MK, et al. A simple screening method for individuals at risk of developing type 1 diabetes measurement of islet cell autoantibodies [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44(11):855-860.
- [9] 周薇, 杜静, 陆红, 等. 胰岛细胞自身抗体对 1 型糖尿病诊

断价值的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(14):1690-1691.

- [10] Kong YH, Kim MS, Lee DY. Comparison of the prevalence of islet autoantibodies according to age and disease duration in patients with type 1 diabetes mellitus[J]. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2013, 18(2):65-70.
- [11] Kawasaki E, Kuriya G, Satoh T, et al. Humoral immune response to islet autoantigens in Japanese patients with type 1 diabetes[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008(1150):248-251.
- [12] 赵玲, 吕朝晖, 杨国庆, 等. 成年起病的 1 型糖尿病临床分析[J]. *中华糖尿病杂志*, 2014, 6(2):86-90.
- [13] Ly LD, Twigg SM, Tran DT, et al. Most type 1 diabetes presenting as diabetic ketoacidosis in Vietnamese People is negative for pancreatic islet cell autoantibodies[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 96(3):e63-e65.
- [14] Wenzlau JM, Juhl K, Yu LP, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(43):17040-17045.
- [15] 陶文玉, 李奕平, 徐凡. 92 例青壮年糖尿病临床分析[J]. *重庆医学*, 2013, 42(6):642-644.
- [16] 吴艺捷, 胡远峰, 赵立, 等. 糖尿病患者胰岛自身抗体与 β 细胞功能的关系[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, 19(1):17-20.
- [17] Jones AG, Hattersley AT. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes[J]. *Diabet Med*, 2013, 30(7):803-817.

(收稿日期:2016-01-20 修回日期:2016-04-07)

(上接第 2908 页)

- detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9):148.
- [8] Liu J, Lei DP, Jin T, et al. Altered expression of miR-21 and PTEN in human laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(10):2653-2657.
 - [9] Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer[J]. *BMC Urol*, 2012(12):14.
 - [10] 左文娜. 回复引导半胱氨酸丰富蛋白 Kazal 基元、基质金属蛋白酶-14、内皮抑素及血管内皮生长因子在喉癌中的表达及相关性研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(23):71-75.
 - [11] 吴春芳, 李海洲, 李富. 喉癌组织中 Survivin, MMP-2 的表

达、临床意义及相关性研究[J]. *中国当代医药*, 2015, 25(1):8-11.

- [12] 刘玉东, 冯帅, 甄娟, 等. S100A4 与 MMP-9 在喉鳞癌中的表达和相关性研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(24):1547-1550.
- [13] 杨大志, 姬长友. PI3K、p-Akt 蛋白在喉鳞癌中的表达及临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(10):935-937.
- [14] 孙吉春, 黄飞舟, 聂晚频, 等. MiR-21 通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路抑制胰腺癌细胞系生长侵袭能力的体外研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(12):39-44.
- [15] Wang Y, Zhu Y, Lv P, et al. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma in vitro[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5):4555-4563.

(收稿日期:2016-01-08 修回日期:2016-03-26)