doi:10.11659/jjssx.08E024072

·基础研究·

低氧条件下敲低miR-221-3p表达对乳腺癌细胞干性维持及血管生成的影响

张 倩,李 琦,马 楠,张卫群 (新疆维吾尔自治区人民医院乳腺、甲状腺科,新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] **目的** 探究低氧条件下微小RNA-221-3p(miR-221-3p)在乳腺癌细胞中的表达情况,以及敲低其表达对乳腺癌细胞干性维持与血管生成的影响。**方法** 将人乳腺癌细胞系MCF-7分别在常氧条件和低氧条件下培养,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测细胞中miR-221-3p表达。将MCF-7细胞分为常氧组(在常氧条件下培养MCF-7细胞)、低氧组(在低氧条件下培养MCF-7细胞)、低氧+miR-221-3p NC组(在低氧条件下培养MCF-7细胞并转染miR-221-3p NC)、低氧+miR-221-3p inhibitor组(在低氧条件下培养MCF-7细胞并转染miR-221-3p inhibitor)。CCK-8法检测各组细胞增殖活性;肿瘤球形成实验检测各组细胞肿瘤球数目;流式细胞术检测各组细胞中干性标志物乙醛脱氢酶1(ALDH1)标记的细胞比例;Western blot检测各组细胞中分化抗原簇蛋白133(CD133)、跨膜黏附分子(CD44)、性别决定区Y框蛋白2(SOX2)蛋白表达;体外管形成实验检测各组细胞上清液培养下的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)管形成数目;Western blot检测各组细胞中低氧诱导因子-1α(HIF-1α)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达。**结果** 与常氧组比较,低氧组细胞中miR-221-3p及CD133、CD44、SOX2、HIF-1α、VEGF蛋白表达水平显著上调($P<0.05$),细胞增殖活性、肿瘤球数目、$ALDH1^+$细胞比例、HUVEC成管数目均显著增加/升高($P<0.05$);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组细胞中miR-221-3p及CD133、CD44、SOX2、HIF-1α、VEGF蛋白表达水平显著下调($P<0.05$),细胞增殖活性、肿瘤球数目、$ALDH1^+$细胞比例、HUVEC成管数目均显著减少/降低($P<0.05$)。**结论** 在低氧条件下,乳腺癌细胞中miR-221-3p表达上调,敲低miR-221-3p表达能够降低乳腺癌细胞干性及血管生成能力。

[关键词] 乳腺癌;低氧;微小RNA-221-3p;干性;血管生成
[中图分类号] R737.9 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-08-20

Effects of knocking down miR-221-3p expression on the stemness maintenance and angiogenesis in breast cancer cells under hypoxia conditions

ZHANG Qian, LI Qi, MA Nan, ZHANG Wei-qun (Department of Breast and Thyroid, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi Xinjiang 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-221-3p (miR-221-3p) in breast cancer cells under hypoxia conditions, and the effects of knocking down its expression on the stemness maintenance and angiogenesis in breast cancer cells. **Methods** Human breast cancer cell line MCF-7 were cultured under normoxic and hypoxic conditions, and the expression of miR-221-3p in cells was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). MCF-7 cells were divided into normoxic group (MCF-7 cells were cultured under normoxic conditions), hypoxic group (MCF-7 cells were cultured under hypoxic conditions), hypoxia+miR-221-3p NC group (MCF-7 cells were cultured under hypoxic conditions and transfected with miR-221-3p NC), hypoxia+miR-221-3p inhibitor group (MCF-7 cells were cultured under hypoxic conditions and transfected with miR-221-3p inhibitor). The proliferation activity of cells in each group was detected by CCK-8 method; the number of cell tumor spheres in each group was detected by tumor sphere formation assay; the proportion of cells labeled with the stemness marker aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in each group was detected by flow cytometry; the expression of cluster of differentiation 133 (CD133), cluster of differentiation 44 (CD44) and sex determination region Y-box protein 2 (SOX2) of cells in each group was detected by Western blot; the number of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) tubes formed by cell supernatant culture in each group was detected by in vitro tube formation experiment; the expression of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) of cells in each group was detected by Western blot. **Results** Compared with normoxic group, the expression levels of miR-221-3p, and CD133, CD44, SOX2, HIF-1α, VEGF protein of cells in hypoxic group were significantly up-regulated ($P<0.05$), and the cell proliferation activity, the number of tumor spheres, the proportion of $ALDH1^+$ cells and the number of HUVEC tubes were significantly increased ($P<0.05$). Compared with hypoxia+miR-221-3p NC group, the expression levels of miR-221-3p, and CD133, CD44, SOX2, HIF-1α, VEGF protein of cells in hypoxia+miR-221-3p inhibitor group were significantly down-regulated ($P<0.05$), and the cell proliferation activity, the number of tumor spheres, the proportion of $ALDH1^+$ cells, and the number of HUVEC were significantly

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2020D01C117)
[通信作者] 张卫群,E-mail:18690829937@163.com

decreased (P<0.05). **Conclusion** Under hypoxic conditions, the expression of miR-221-3p in breast cancer cells is up-regulated, and knocking down the expression of miR-221-3p can reduce the stemness and angiogenesis ability of breast cancer cells.

Keywords: breast cancer; hypoxia; microRNA-221-3p; stemness; angiogenesis

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤类型,也是女性患癌死亡的第二大原因[1]。乳腺癌的治疗主要包括手术、内分泌治疗、化疗、放疗和靶向治疗。随着医疗技术的不断发展,患者的生存率和生活质量得到了大幅提高。然而,部分患者在治疗过程中或治疗后会发生肿瘤转移、复发,远期预后并不理想[2]。低氧是大多数实体瘤微环境中普遍存在的特征,由肿瘤快速生长导致的耗氧量和供氧量不平衡引起,低氧条件下肿瘤细胞可通过调节缺氧相关基因的表达来促进肿瘤生长、血管生成和转移,并诱导细胞耐药性的产生[3-4]。低氧还能够促进肿瘤细胞获得干性特征,从而增强自我更新能力,最终导致肿瘤细胞获得更具侵袭性和致命性的表型[5]。

微小RNA(microRNA,miRNA)属于一类小的非编码RNA,通过引起mRNA降解或抑制翻译对靶基因的表达产生负调控作用,从而调节肿瘤细胞生长、凋亡、转移、免疫应答、自噬和上皮间质转化等[6]。目前已发现有多种miRNA在肿瘤低氧微环境中异常表达[7]。研究表明,miR-221-3p在乳腺癌患者组织样本中表达上调,并通过诱导上皮间质转化促进乳腺癌生长和转移[8],因此推测miR-221-3p具有作为乳腺癌诊断和预后标志物以及治疗靶点的潜力。然而,在低氧条件下miR-221-3p能否调控乳腺癌细胞干性和血管生成目前尚不清楚。因此,本研究通过在体外低氧环境下培养乳腺癌细胞,观察敲低miR-221-3p对乳腺癌细胞干性维持及血管生成的影响,以期为乳腺癌靶向治疗提供新的思路与依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人乳腺癌细胞系MCF-7和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)购于武汉普诺赛生命科技公司,特级胎牛血清和胰蛋白酶购于美国Sigma公司,青链霉素双抗液购于上海抚生实业有限公司,DMEM培养基购于上海吉至生化科技公司,miRcute miRNA分离试剂盒购于北京天根生物科技公司,One Step Prime Script miRNA cDNA合成试剂盒和PrimeScript™ miRNA RT-PCR试剂盒购于日本Takara公司,Hieff Trans® miRNA体外转染试剂购于上海翌圣生物科技公司,CCK-8细胞增殖试剂盒购于北京索莱宝科技公司,成球培养基购于上海启达生物科技公司,高效RIPA裂解液购于北京兰杰柯科技公司,Bradford蛋白浓度测定试剂盒购于北京伊塔生物科技公司,Matrigel基质胶购于美国Invitrogen公司,兔抗干性标志物乙醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1,ALDH1)、分化抗原簇蛋白133(cluster of differentiation 133,CD133)、跨膜黏附分子(cluster of differentiation 44,CD44)、性别决定区Y框蛋白2(sex determination region Y-box protein 2, SOX2)、低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、GAPDH抗体及抗生素偶联的山羊抗兔IgG抗体均购于英国Abcam公司;miR-221-3p阴性对照(NC)及miR-221-3p抑制物(inhibitor)由广州锐博生物科技公司设计并合成。

1.2 细胞培养

MCF-7细胞用含10%胎牛血清与1%双抗液的高糖DMEM培养基培养,分别置于37 ℃、5%CO_2常氧和37 ℃、5%CO_2、1%O_2低氧培养箱中培养。根据细胞生长情况,待融合度约80%时,使用胰蛋白酶溶液消化、传代。

1.3 实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

收集常氧和低氧条件下培养的MCF-7细胞,按照miRcute miRNA分离试剂盒说明书,分别提取总RNA,再通过miRNA反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。设计miR-221-3p和内参U6的引物序列,miR-221-3p正向引物5′-ACACTCCAGCTGGGAGCTACA-3′,反向引物5′-CTCAACTGGTGTCGTGGA-3′;U6正向引物5′-ATTGGAACGATACAGAG-3′,反向引物5′-GGAACGCTTCACGAATTT-3′。按照PrimeScript™ miRNA RT-PCR试剂盒说明书配制反应体系,在ABI 7500系统扩增,热循环条件:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共30个循环。实验重复3次,各样本内miR-221-3p的相对表达量用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析。

1.4 细胞转染与分组

将MCF-7细胞培养至对数生长期,按照每孔2×10^4个的密度接种在6孔板上,过夜培养后分为常氧组(在常氧条件下培养MCF-7细胞)、低氧组(在低氧条件下培养MCF-7细胞)、低氧+miR-221-3p NC组(在

低氧条件下培养MCF-7细胞并转染miR-221-3p NC)、低氧+miR-221-3p inhibitor组(在低氧条件下培养MCF-7细胞并转染miR-221-3p inhibitor)。待细胞融合度达到约80%,按照Hieff Trans® miRNA体外转染试剂说明书,将miR-221-3p NC、miR-221-3p inhibitor分别转染至MCF-7细胞中,48 h后观察细胞状态,更换为新鲜培养基培养,转染结束后进行低氧培养。24 h后收集细胞,采用RT-qPCR检测各组MCF-7细胞中miR-221-3p相对表达量。

1.5 CCK-8法

将MCF-7细胞按照每孔3×10^4个的密度接种在96孔板上,按照1.4分组转染后,继续在常氧或低氧条件下培养0、24、48、72 h,将10 μL CCK-8工作液加入孔内,涡旋混匀,37 ℃孵育2 h,测定450 nm处的光密度(optical density,OD)值,绘制各组细胞的生长曲线图。

1.6 肿瘤球形成实验

取1.4中各组MCF-7细胞,分别制成单细胞悬液后,接种至含有成球培养基的低黏附皿中,轻轻晃动,培养10 d后,使用倒置显微镜观察各组细胞肿瘤球形成情况并计数,直径≥100 μm为1个球体。

1.7 流式细胞术

将各组MCF-7细胞密度调整为1×10^7/mL,PBS洗涤,吸取200 μL悬液加入流式管内,再加入5 μL ALDH1抗体,4 ℃避光孵育30 min,弃上清液,加入流式缓冲液重悬,经流式细胞仪检测各组$ALDH1^+$细胞比例。

1.8 Western blot

在各组MCF-7细胞中加入RIPA裂解液,分离总蛋白,Bradford法测定蛋白含量。蛋白加热变性,每组取40 μg进行电泳分离,湿转法将分离后的目的蛋白转至PVDF膜上,置于5%脱脂奶粉封闭2 h,加入1×TBST稀释的抗体后,分别加入兔抗CD133多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗CD44多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗SOX2多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗HIF-1α多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗VEGF多克隆抗体(1∶1 000),4 ℃摇床孵育过夜,次日,加入抗生素偶联的山羊抗兔IgG抗体(1∶5 000),室温摇床孵育1 h,用超敏型ECL显色,以GAPDH作为内参,通过Image J软件分析蛋白条带灰度值。

1.9 体外管形成实验

收集各组MCF-7细胞上清液重悬HUVEC。将Matrigel基质胶铺在24孔板中,待胶凝固后,每孔接种1×10^4个HUVEC,培养48 h后,光学显微镜下观察各组细胞成管情况并计数。

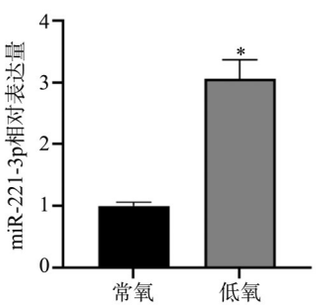
1.10 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。不同组间数据采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用*LSD-t*检验,实验结果用GraphPad 8.0软件制图。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧条件下MCF-7细胞中miR-221-3p表达

RT-qPCR检测结果显示,与常氧条件下培养的MCF-7细胞比较,低氧条件下培养的MCF-7细胞中miR-221-3p的表达水平显著上调($P<0.05$),见图1。

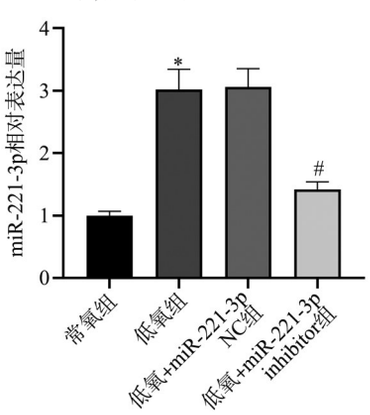


*:与常氧比较,$P<0.05$

图1 常氧与低氧条件下MCF-7细胞中miR-221-3p表达

2.2 各组MCF-7细胞中miR-221-3p表达

RT-qPCR检测结果显示,与常氧组比较,低氧组MCF-7细胞中miR-221-3p的表达水平显著上调($P<0.05$);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组细胞中miR-221-3p的表达水平显著下调($P<0.05$),见图2。



*:与常氧组比较,$P<0.05$;#:与低氧+miR-221-3p NC组比较,$P<0.05$

图2 各组MCF-7细胞中miR-221-3p表达

2.3 各组MCF-7细胞增殖活性

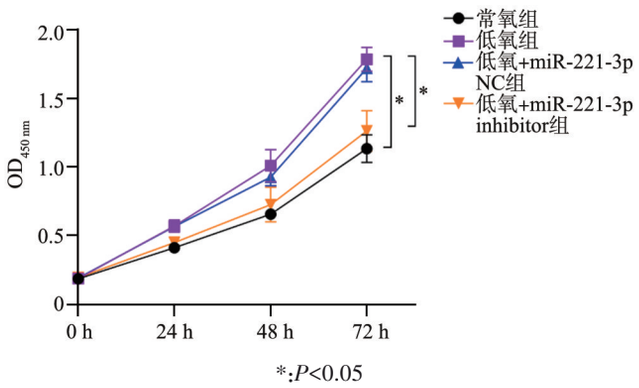
CCK-8法检测结果显示,在培养24 h、48 h、72 h时,与常氧组比较,低氧组MCF-7细胞增殖活性显著升高($P<0.05$);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组MCF-7细胞增殖活性显著降低

(P<0.05),见图3。

2.4　各组MCF-7细胞干性特征维持情况

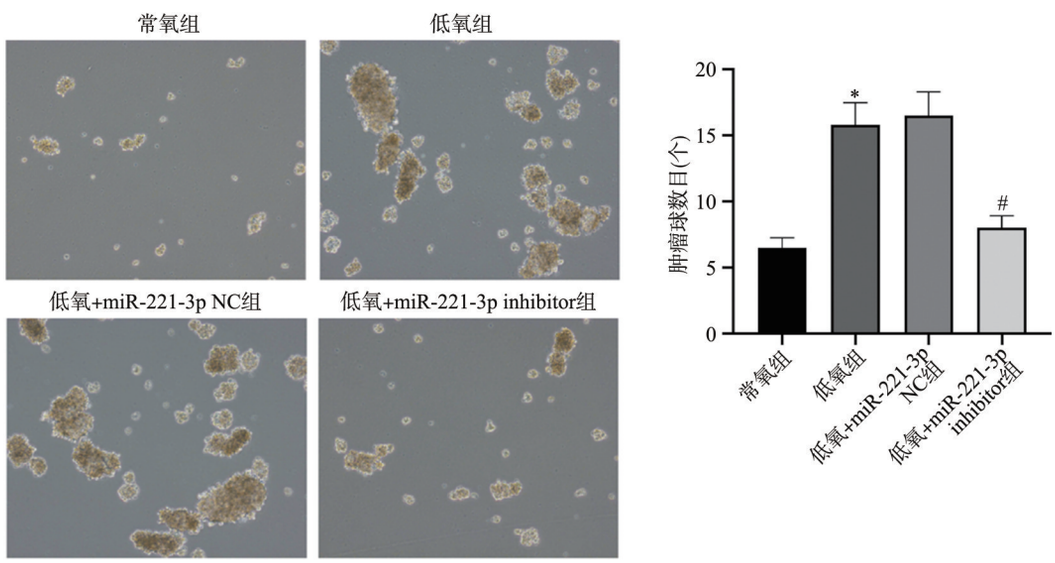
肿瘤球形成实验检测结果显示,与常氧组比较,低氧组MCF-7细胞肿瘤球数目显著增多(P<0.05);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组肿瘤球数目显著减少(P<0.05),见图4。

流式细胞术检测结果显示,与常氧组比较,低氧组ALDH1$^+$细胞比例显著升高(P<0.05);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组ALDH1$^+$细胞比例显著降低(P<0.05),见图5。



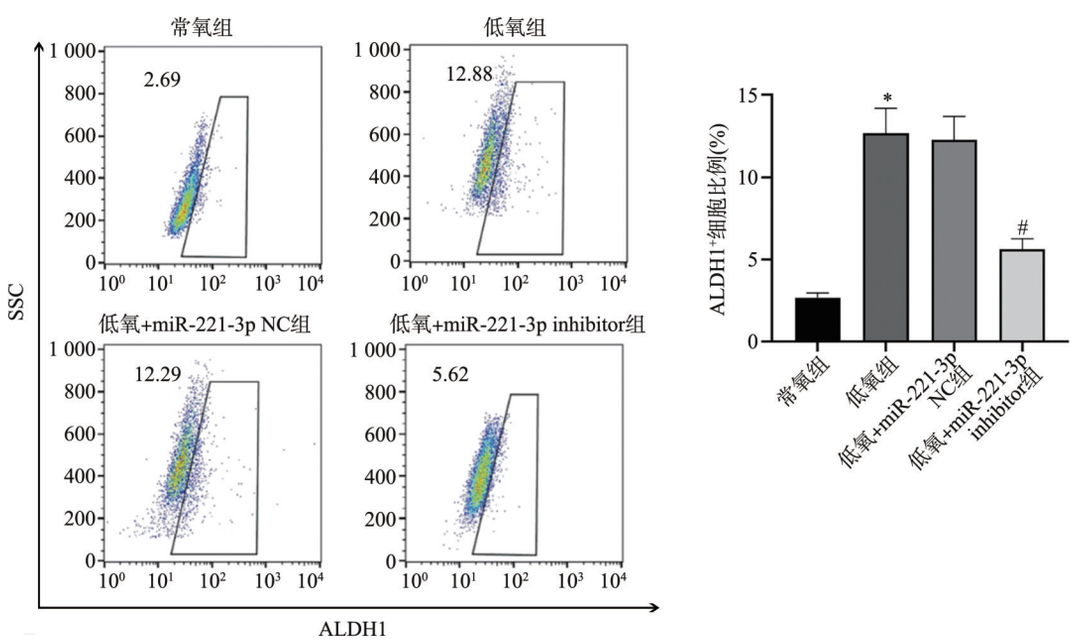
*:P<0.05

图3　各组MCF-7细胞增殖活性



*:与常氧组比较,P<0.05;#:与低氧+miR-221-3p NC组比较,P<0.05

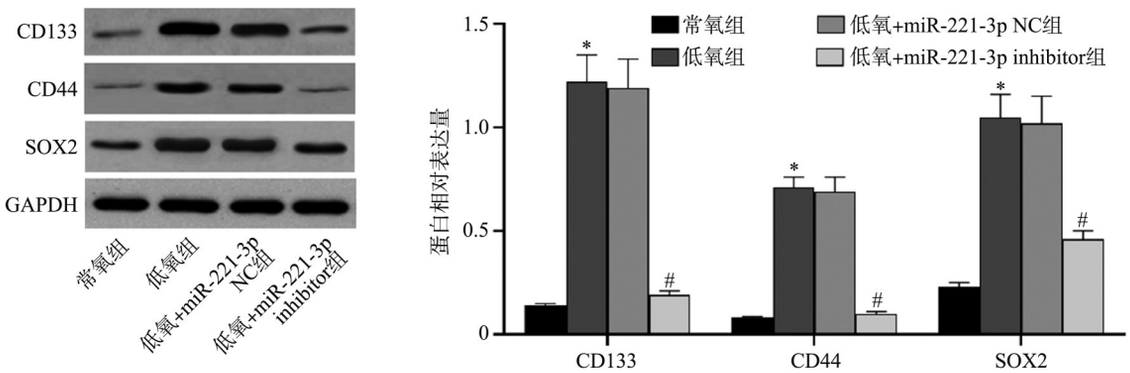
图4　各组MCF-7细胞肿瘤球形成情况(×40)



*:与常氧组比较,P<0.05;#:与低氧+miR-221-3p NC组比较,P<0.05

图5　各组MCF-7细胞表面ALDH1阳性比例

Western blot检测结果显示,与常氧组比较,低氧组MCF-7细胞中CD133、CD44、SOX2蛋白表达水平显著上调($P<0.05$);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组MCF-7细胞中CD133、CD44、SOX2蛋白表达水平显著下调($P<0.05$),见图6。



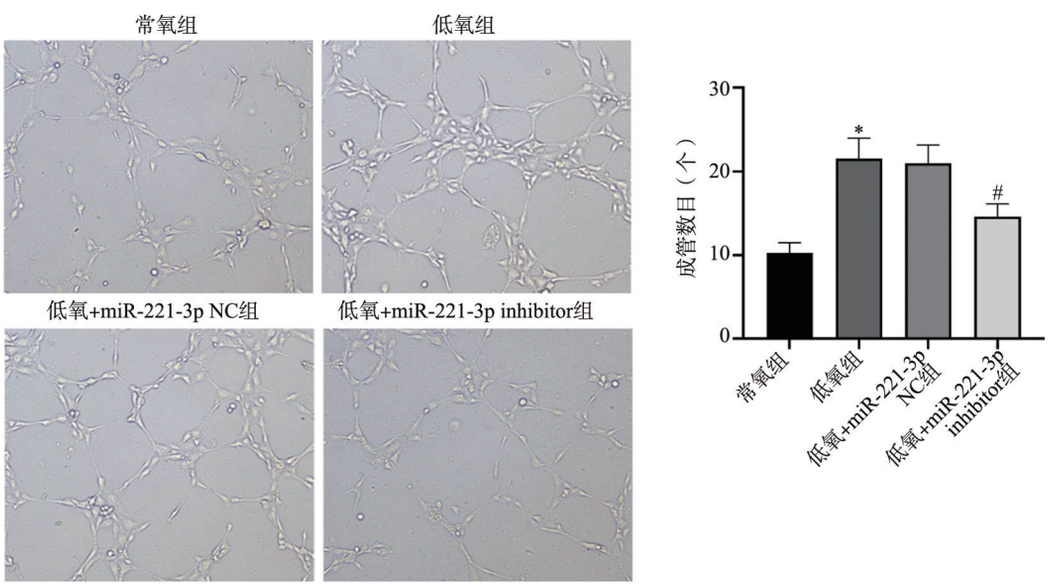
*:与常氧组比较,$P<0.05$;#:与低氧+miR-221-3p NC组比较,$P<0.05$

图6 各组MCF-7细胞中干细胞相关标志物表达

2.5 各组MCF-7细胞血管生成能力比较

体外管形成实验检测结果显示,与常氧组比较,低氧组HUVEC成管数目显著增加($P<0.05$);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组HUVEC成管数目显著减少($P<0.05$),见图7。

Western blot检测结果显示,与常氧组比较,低氧组MCF-7细胞中HIF-1α、VEGF蛋白表达水平显著上调($P<0.05$);与低氧+miR-221-3p NC组比较,低氧+miR-221-3p inhibitor组MCF-7细胞中HIF-1α、VEGF蛋白表达水平显著下调($P<0.05$),见图8。



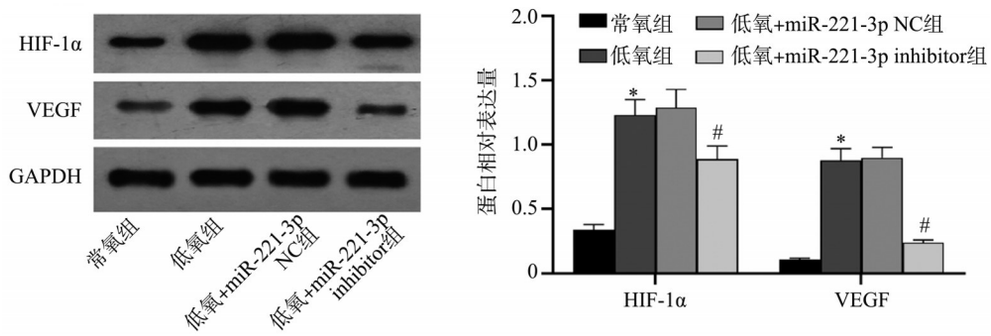
*:与常氧组比较,$P<0.05$;#:与低氧+miR-221-3p NC组比较,$P<0.05$

图7 各组MCF-7细胞上清液培养后HUVEC成管数目检测结果(×100)

3 讨论

miRNA的表达受各种因素的影响,低氧诱导的miRNA表达异常是多数肿瘤具备的特征。评估低氧环境下miRNA表达的变化对于了解miRNA在肿瘤发展过程中的作用至关重要。目前已明确多种miRNA参与肿瘤的发展[9],但对于肿瘤在低氧环境下调节基因表达的机制尚不完全清楚。由于肿瘤细胞在低氧条件下的反应涉及参与炎症、肿瘤侵袭、血管生成、细胞周期阻滞和细胞凋亡等转录调节因子,因此,鉴定对低氧敏感的miRNA及其影响肿瘤细胞恶性行为的机制,可能有助于寻找新的治疗靶点和更有效的抗肿瘤疗法。

研究表明,miR-221-3p作为一种致癌基因,其异常表达与多种肿瘤的发生发展密切相关[10-11]。miR-221-3p在胃癌组织和细胞中的表达水平显著高于癌旁组织和正常胃黏膜细胞,其高表达与临床分



*:与常氧组比较,$P<0.05$;#:与低氧+miR-221-3p NC组比较,$P<0.05$

图8 各组MCF-7细胞中HIF-1α、VEGF蛋白表达水平

期、淋巴结转移及远处转移密切相关,并促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移[12]。miR-221-3p还可以通过Hedgehog通路靶向抑制叉头框P2(forkhead box P2,FOXP2)蛋白表达,从而促进甲状腺癌细胞增殖并抑制细胞凋亡[13]。miR-221-3p也被检测到在人表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor,HER2)阳性乳腺癌患者组织样本中表达上调,并通过直接靶向肿瘤抑制因子长寿保证同源物2(longevity assurance homolog 2,LASS2)和甲基化CpG结合域蛋白2(methyl-CpG binding domain protein 2,MBD2)促进HER2阳性乳腺癌细胞增殖和迁移[14]。目前,已有miR-221-3p在低氧环境下影响肿瘤进展的相关报道。Macharia等[15]将胶质母细胞瘤细胞暴露于低氧环境下发现,miR-221-3p表达水平较常氧环境进一步升高,且其高表达与肿瘤代谢改变、血管生成及免疫逃逸相关。Yu等[16]研究表明,在体外低氧环境可诱导甲状腺癌细胞分泌miR-221-3p,并促进甲状腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化,而抑制miR-221-3p限制了裸鼠甲状腺癌异种移植瘤模型的肿瘤生长。本研究结果显示,低氧条件下培养的人乳腺癌细胞系MCF-7中miR-221-3p表达上调,同时细胞增殖、干性特征及血管生成等相关指标水平也升高,表明miR-221-3p在低氧环境中的高表达可能促进乳腺癌的进展。此外,本研究还探讨了低氧条件下敲低miR-221-3p表达后乳腺癌细胞增殖、干性特征及血管生成的变化,结果显示,细胞中miR-221-3p表达下调,细胞增殖、干性特征及血管生成等相关指标水平也随之降低。以上结果表明,在低氧条件下敲低miR-221-3p表达能够抑制乳腺癌细胞的恶性行为,减缓肿瘤进程。

肿瘤干细胞是一类具有无限增殖、多向分化潜能以及抗化学毒物损伤能力的肿瘤细胞亚群,起源于正常组织中的干细胞或具有干细胞特性的肿瘤细胞,肿瘤干细胞是肿瘤组织形成、复发和转移的主要原因[17]。研究表明,肿瘤干细胞存在于一种特殊的微环境生态位中,该环境可以使干细胞保持休眠状态,保证其不对称分裂和维持干性特征,在需要时分化和复制为成熟细胞[18]。低氧不仅对于肿瘤干细胞生态位的形成至关重要,还可以促进肿瘤细胞的去分化,从而获得干性特征。ALDH1是正常组织和肿瘤组织中的常用干细胞检测标志物,ALDH1作为一种细胞质酶,可将细胞内醛转化为羧酸,并参与细胞内有毒物质的降解,使干细胞免受常规化疗药物的攻击[19]。CD133是一种具有5个跨膜结构域的糖蛋白,通常在肿瘤干细胞中高表达,广泛应用于肿瘤细胞干性特征的筛选[20]。CD44是一种单通道Ⅰ型跨膜蛋白,参与细胞黏附和细胞外基质的信号传导,也被认为是包括乳腺癌在内的多种肿瘤干细胞的标志物[21]。本研究结果显示,低氧条件下培养的MCF-7细胞肿瘤球数目和$ALDH1^+$细胞比例增加,CD133、CD44、SOX2蛋白表达水平也上调,而敲低miR-221-3p表达后,MCF-7细胞肿瘤球数目和$ALDH1^+$细胞比例减少,同时CD133、CD44及SOX2蛋白表达水平下调。表明在低氧条件下敲低miR-221-3p表达能够降低MCF-7细胞的干性特征。

乳腺癌的发展需要持续的血液来供应氧气和必需的营养物质,而血液供应是由恶性组织内生成的血管来维持的,因此,抑制血管生成是一种有效的乳腺癌治疗策略。低氧是肿瘤血管生成的重要引发因素,这个过程伴随着大量细胞内通路的激活,其中HIF-1α是调控大量缺氧相关基因表达的最关键分子[22]。VEGF是HIF通路的关键下游靶标,通过影响内皮细胞迁移、增殖、通透性和存活来驱动血管生成[23]。本研究结果显示,低氧条件下培养的MCF-7细胞上清液诱导HUVEC后,成管数目显著增加,MCF-7细胞中HIF-1α和VEGF蛋白表达水平显著上调,说明血管生成增加;而使用低氧条件下敲低miR-221-3p表达的MCF-7细胞上清液诱导HUVEC后,成管数目显著减

少,MCF-7细胞中HIF-1α和VEGF蛋白表达水平显著下调。由此说明,在低氧条件下敲低miR-221-3p表达可以减少肿瘤血管生成。

综上所述,低氧条件促进乳腺癌细胞中miR-221-3p表达,有利于提高细胞增殖、维持干性特征及促进血管生成,而敲低miR-221-3p表达可降低肿瘤细胞的干性特征与血管生成能力,抑制乳腺癌进展。但miR-221-3p在低氧条件下调控乳腺癌细胞干性及血管生成的具体机制需要进一步研究。

[参考文献]

[1] Newman L. Oncologic anthropology: global variations in breast cancer risk, biology, and outcome[J]. J Surg Oncol, 2023, 128(6): 959-966. doi: 10. 1002/jso. 27459.

[2] Khan SA. Breast cancer risk reduction: current status and emerging trends to increase efficacy and reduce toxicity of preventive medication [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2023, 32(4): 631-646. doi: 10. 1016/j. soc. 2023. 05. 001.

[3] Ullah A, Shehzadi S, Ullah N, et al. Hypoxia a typical target in human lung cancer therapy[J]. Curr Protein Pept Sci, 2024, 25(5): 376-385. doi: 10. 2174/0113892037252820231114045234.

[4] Kao TW, Bai GH, Wang TL, et al. Novel cancer treatment paradigm targeting hypoxia-induced factor in conjunction with current therapies to overcome resistance[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 171. doi: 10. 1186/s13046-023-02724-y.

[5] Semenza GL. Mechanisms of breast cancer stem cell specification and self-renewal mediated by hypoxia-inducible factor 1[J]. Stem Cells Transl Med, 2023, 12(12): 783-790. doi: 10. 1093/stcltm/szad061.

[6] Abolhasanzadeh N, Sarabandi S, Dehghan B, et al. Exploring the intricate relationship between miRNA dysregulation and breast cancer development: insights into the impact of environmental chemicals[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1333563. doi: 10. 3389/fimmu. 2024. 1333563.

[7] Tapeh BE, Alivand MR, Solalii S. Potential interactions between miRNAS and hypoxia: a new layer in cancer hypoxia[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 21 (17): 2315-2326. doi: 10. 2174/1871520621666 210201100326.

[8] Fang Y, Zhang Q, Chen Z, et al. Clinical significance and immune characteristics analysis of miR-221-3p and its key target genes related to epithelial-mesenchymal transition in breast cancer [J]. Aging (Albany NY), 2024, 16(1): 322-347. doi: 10. 18632/aging. 205370.

[9] Chen H. microRNA-based cancer diagnosis and therapy[J]. Int J Mol Sci, 2023, 25(1): 230. doi: 10. 3390/ijms25010230.

[10] Tan W, Li Z, Xia W, et al. miR-221-3p regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion via targeting LIFR [J]. Ann Hepatol, 2022, 27 Suppl 1: 100567. doi: 10. 1016/j. aohep. 2021. 100567.

[11] 李兴亮,吴紫瑶,马继春,等. miR-221-3p在人类消化道肿瘤中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2023, 52(2): 172-176. doi: 10. 11969/j. issn. 1673-548X. 2023. 02. 036.

[12] Ma J, Li X, Qiu Z, et al. Correlation of miR-221-3p differential expression with clinical characteristics of gastric cancer patients[J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 69. doi: 10. 1007/s11033-023-08924-1.

[13] Chang W, Chang Q, Lu H, et al. MiR-221-3p facilitates thyroid cancer cell proliferation and inhibit apoptosis by targeting FOXP2 through hedgehog pathway[J]. Mol Biotechnol, 2022, 64(8): 919-927. doi: 10. 1007/s12033-022-00473-5.

[14] Shao X, Zheng Y, Huang Y, et al. Hsa-miR-221-3p promotes proliferation and migration in HER2-positive breast cancer cells by targeting LASS2 and MBD2[J]. Histol Histopathol, 2022, 37(11): 1099-1112. doi: 10. 14670/HH-18-483.

[15] Macharia LW, Muriithi W, Heming CP, et al. The genotypic and phenotypic impact of hypoxia microenvironment on glioblastoma cell lines[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1248. doi: 10. 1186/s12885-021-08978-z.

[16] Yu F, Deng X, Zhong Y, et al. Hypoxic papillary thyroid carcinoma cells-secreted exosomes deliver miR-221-3p to normoxic tumor cells to elicit a pro-tumoral effect by regulating the ZFAND5[J]. Exp Cell Res, 2023, 431(1): 113716. doi: 10. 1016/j. yexcr. 2023. 113716.

[17] Radak M, Fallahi H. Cell-cell communication in stem cells and cancer: alone but in touch[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2024, 38(3): 479-488. doi: 10. 1111/fcp. 12982.

[18] Guido CB, Sosa LDV, Perez PA, et al. Changes of stem cell niche during experimental pituitary tumor development [J]. J Neuroendocrinol, 2021, 33(12): e13051. doi: 10. 1111/jne. 13051.

[19] 刘翠翠,张立行,柳素玲. 肿瘤干细胞标志物ALDH1A1通过重塑免疫微环境促进乳腺癌进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(3): 405-412. doi: 10. 11844/cjcb. 2022. 03. 0001.

[20] Grabovenko FI, Kisil OV, Pavlova GV, et al. Protein CD133 as a tumor stem cell marker[J]. Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko, 2022, 86(6): 113-120. doi: 10. 17116/neiro202286061113.

[21] Hassn Mesrati M, Syafruddin SE, Mohtar MA, et al. CD44: a multifunctional mediator of cancer progression [J]. Biomolecules, 2021, 11(12): 1850. doi: 10. 3390/biom11121850.

[22] Zhi S, Chen C, Huang H, et al. Hypoxia-inducible factor in breast cancer: role and target for breast cancer treatment [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1370800. doi: 10. 3389/fimmu. 2024. 1370800.

[23] Ricciuti B, Foglietta J, Bianconi V, et al. Enzymes involved in tumor-driven angiogenesis: a valuable target for anticancer therapy [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 56: 87-99. doi: 10. 1016/j. semcancer. 2017. 11. 005.

(编辑:贺绍梅)