

研究论文

miR-29b对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7的调控

韦凌嘉^{1,2} 楼佳燕^{1,2} 陈梦捷^{1,2} 王鹤^{1,2*}⁽¹⁾广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021; ⁽²⁾广西区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室, 南宁 530021)

摘要 该文旨在研究miR-29b对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7增殖、凋亡、细胞周期的调控。先通过生物信息学分析筛选出关键基因, 再通过关键基因找出与其相关的miRNAs。用miR-29b上调慢病毒和miR-29b下调慢病毒转染Ect1/E6E7细胞, 实时荧光定量PCR法检测转染后Ect1/E6E7细胞中miR-29b的表达量, CCK-8法检测转染后各组细胞的增殖情况, 流式细胞术检测转染后各组细胞凋亡及细胞周期情况, 双荧光素酶实验验证miR-29b与CCND2的靶向关系。经生物信息学分析筛选出关键基因CCND2, 再由CCND2找到miR-29b。用miR-29b上下调慢病毒转染Ect1/E6E7细胞, miR-29b上调组与NC组相比, 细胞增殖速率减慢, 凋亡率升高($P<0.05$)。miR-29b上调组与NC组和miR-29b下调组相比, G₀/G₁期细胞比例高, S期细胞比例低。miR-29b下调组与NC组比较, 细胞增殖速率加快, 凋亡率降低($P<0.05$)。双荧光素酶实验表明, miR-29b可与CCND2靶向结合。总之, miR-29b可与CCND2靶向结合, 并且可调控宫颈癌前细胞Ect1/E6E7增殖、细胞周期和细胞凋亡从而调控宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的发生和进展。但其是否通过CCND2来实现该调控, 仍需进行下一步研究。

关键词 miR-29b; CCND2; CIN; 宫颈癌前细胞

Regulation of Cervical Cancer Precancerous Cells Ect1/E6E7 by miR-29b

WEI Lingjia^{1,2}, LOU Jiayan^{1,2}, CHEN Mengjie^{1,2}, WANG He^{1,2*}⁽¹⁾Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning 530021, China; ⁽²⁾Guangxi Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High Frequency Tumor, Nanning 530021, China)

Abstract This study is aimed to explore the regulation of miR-29b on proliferation, apoptosis and cell cycle of Ect1/E6E7 cervical precancerous cells. First, the key genes were screened through bioinformatics, and then the miRNAs related to the key genes were identified. Ect1/E6E7 cells were transfected with overexpressing lentivirus and knock-down lentivirus of miR-29b, and the expression of miR-29b in the transfected Ect1/E6E7 cells was detected by real-time quantitative PCR. The proliferation of the transfected cells was detected by CCK-8, and the apoptosis and cell cycle of the transfected cells were detected by flow cytometry. CCND2 was identified as the target gene of miR-29b by double luciferase assay. The key gene CCND2 was screened

收稿日期: 2022-10-14

接受日期: 2023-02-06

广西自然科学基金(批准号: 2020GXNSFAA159032)、国家自然科学基金(批准号: 82160443)、区域性高发肿瘤重点实验室专项资金(批准号: 02402215010D)和广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(批准号: S2018031)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0771-5306270, E-mail: wanghe5306270@sina.com

Received: October 14, 2022

Accepted: February 6, 2023

This work was supported by the Guangxi Natural Science Foundation of China (Grant No.2020GXNSFAA159032), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82160443), the Regional High Incidence Cancer Key Laboratory Special Fund (Grant No.02402215010D), and the Guangxi Medical and Health Appropriate Technology Development and Application Project (Grant No.S2018031)

*Corresponding author. Tel: +86-771-5306270, E-mail: wanghe5306270@sina.com

by bioinformatics and miR-29b was found by *CCND2*. Ect1/E6E7 cells were transfected with overexpressing lentivirus and knock-down lentivirus of miR-29b. Compared with NC group, the proliferation rate of miR-29b up-regulated group was slower and the apoptosis rate was higher ($P < 0.05$). Compared with NC group and miR-29b down-regulated group, the proportion of G₀/G₁ phase cells was higher and the proportion of S phase cells was lower in the miR-29b up-regulated group. Compared with NC group, the proliferation rate of miR-29b down-regulated group was faster and the apoptosis rate was lower ($P < 0.05$). Dual luciferase assay confirmed that miR-29b could bind to *CCND2*. In conclusion, miR-29b can target *CCND2* and regulate the proliferation, cell cycle and apoptosis of cervical precancerous cells Ect1/E6E7 to regulate the occurrence and progression of CIN (cervical intraepithelial neoplasia). But whether miR-29b achieves this regulation through *CCND2* still needs to be further studied.

Keywords miR-29b; *CCND2*; CIN; cervical precancerous cells

宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是宫颈癌的前期病变,但并不是所有的CIN都会发展为宫颈癌,研究发现大约有30%的CIN会发展为癌症^[1]。CIN转变为宫颈癌的原因是多种多样的,原癌基因和抑癌基因的突变就是其中一种。微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, miRNA)是一种非编码RNA,可调控人体基因的表达^[2]。而miR-29b是一种重要的miRNA,可通过调控和修饰下游靶基因而参与多种癌症的发生、发展及预后^[3-4]。现有研究发现,miR-29b调控多种妇科疾病的发生及发展,但还未有miR-29b与CIN的相关研究。本研究将探索miR-29b对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7增殖、凋亡、细胞周期的影响,为CIN转化为宫颈癌提供新的预防及治疗思路。

1 材料与方法

1.1 细胞系与慢病毒

人宫颈癌前细胞株Ect1/E6E7购于美国ATCC,在含1%青-链霉素的DK-SFM培养基中培养。miR-29b上下调慢病毒由上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建及提供。

1.2 由关键基因*CCND2*预测出与其相关的miR-29b

使用 Genemania工具构建基因网络,找出网络关键基因。通过KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库查找关键基因的相关通路,找出与宫颈上皮内瘤变发生和进展相关通路网络中的关键基因。使用 TargetScan、Tarbase、starBase、Networkanalyst、miRDB多个数据库预测靶向细胞周期蛋白D2(cyclin D2, *CCND2*)的miRNAs。

1.3 miR-29b上下调慢病毒的转染

取对数生长期的宫颈癌前细胞Ect1/E6E7,将细

胞接种到96孔板中。培养24 h后,将慢病毒转染[感染复数(multiplicity of infection, MOI)=20]至宫颈癌前细胞Ect1/E6E7中。将细胞分为miR-29b上调组、miR-29b下调组与阴性对照组(negative control group, NC组)。

1.4 实时荧光定量PCR法检测转染慢病毒后Ect1/E6E7细胞中miR-29b的相对表达量

Trizol法提取细胞总RNA,使用TaKaRa试剂盒(日本TaKaRa公司,货号:638313、638314)进行逆转录及PCR。反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,60 °C退火4 s,循环40次;95 °C预变性15 s,60 °C变性60 s,95 °C退火15 s生成融解曲线。以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-29b的相对表达量。引物序列为miR-29b Forward: 5'-TTC GCC TAG CAC CAT TTG AAA TCA GTG-3', Reverse: 加尾法通用引物;U6 Forward: 5'-AGC CAC ATC GCT CAG ACA C-3', Reverse: 5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3'。

1.5 细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)法检测转染miR-29b慢病毒对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7增殖的影响

在96孔板中按 3×10^3 个/孔的密度接种细胞,每个时间点设置3个复孔,每隔24 h加入CCK-8试剂(日本同仁化学CCK-8试剂盒,货号:CK04),在37 °C培养箱中孵育2 h,用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(D)值,绘制各组的增殖曲线。

1.6 流式细胞术检测转染miR-29b慢病毒对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7凋亡的影响

用不含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化各组细胞, PBS清洗3次,按照Annexin V-APC/PI细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯

基生物技术有限公司, 货号: KGA1030)说明书加入染料, 室温避光孵育10 min, 流式仪检测各组细胞的凋亡情况。各组实验均重复3次。

1.7 流式细胞术检测转染miR-29b慢病毒对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7周期的影响

消化并收集细胞,将细胞加入预冷的无水乙醇固定3天。1 200 r/min离心5 min并弃去无水乙醇,加入含DNA染色液的碘化丙啶,室温避光孵育30 min,流式仪检测各组细胞的细胞周期情况。

1.8 双荧光素酶基因报告实验验证miR-29b与CCND2的靶向结合

将Ect1/E6E7细胞接种至24孔板并培养24 h, 按组别进行质粒转染, 转染24 h后弃去培养基, 使用“双荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 货号: RG027)”中的裂解液裂解细胞。先加入配制好的萤火虫荧光素酶检测试剂并测定RLU(relative light unit), 再加入配制好的海肾荧光素酶检测工作液并测定RLU。

1.9 统计方法

使用SPSS 23.0对实验结果进行统计。计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 由关键基因CCND2预测出与其相关的miR-29b

使用 Genemania工具构建基因网络,探究基因间的互作关系(图1)。在构建的网络中, *CCND2*、*CTNNB1*、*PRKCI*、*PIK3CA*、*FOXO1*、*MUC2*、*TGFBR2*、*TP73*、*CSNK1A1*、*CTBP2*、*AK5*、*GRHPR*、*KDELR3*、*NCOA2*等是关键基因。

这些关键基因通过特定的信号通路发挥作用。我们发现HPV infection pathway和Hippo signaling pathway这2条通路上有较多的共同基因。其中在HPV infection pathway上的基因有: *CCND2*、*CTNNB1*、*PRKCI*、*FOXO1*、*PIK3CA*、*CSNK1A1*。在Hippo signaling pathway上的基因有: *CCND2*、

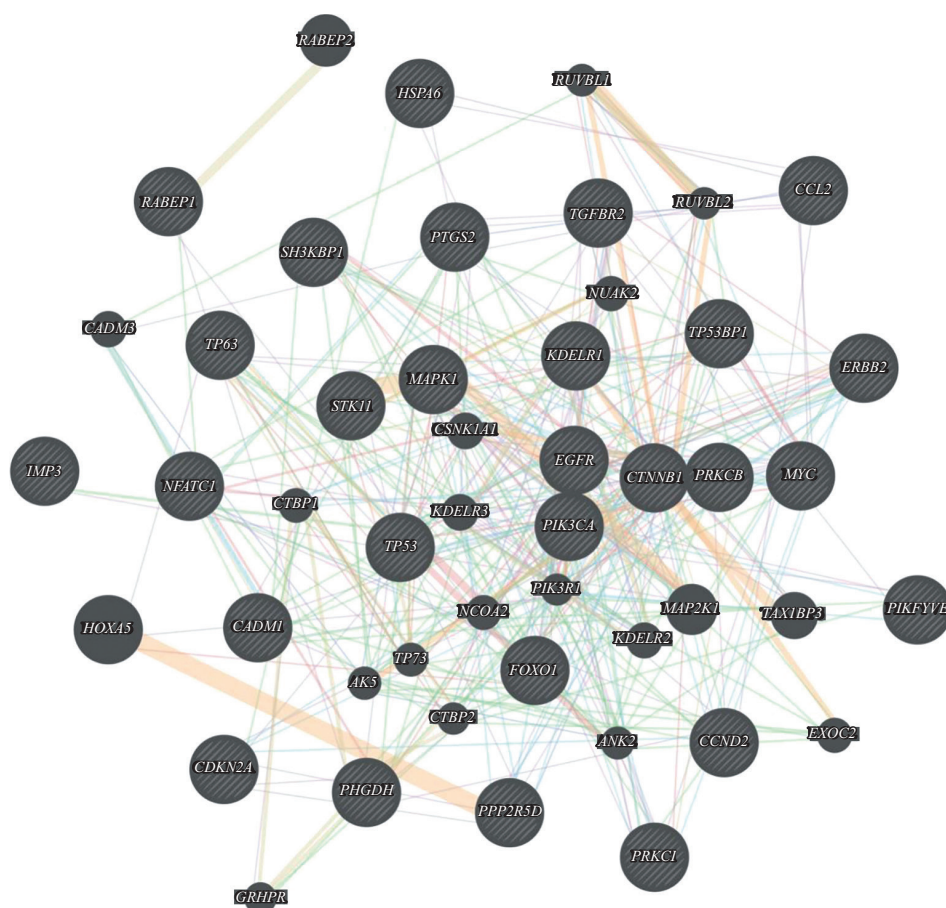


图1 基因互作网络

Fig.1 Gene interaction network

CTNBN1、*PRKCI*、*TGFBR2*、*TP73*。这2条通路的共同基因有：*CCND2*、*CTNBN1*。经查阅文献联合生信分析，我们选取与HPV相关的*CCND2*基因进行下一步筛选。

基于Targescan、Tarbase、starBase、Networkanalyst、miRDB等多个数据库预测*CCND2*的靶向miRNAs。一共获得145个miRNAs(图2)，它们可能与*CCND2*存在相互作用。经查阅文献结合生信分析，发现miR-29b与宫颈癌相关，因此我们选取miR-29b

进行下一步实验。

2.2 miR-29b慢病毒转染后各组细胞中miR-29b的相对表达量

miR-29b上调组的RNA相对表达量为 4.32 ± 0.01 ，miR-29b下调组的RNA相对表达量为 0.35 ± 0.01 ，NC组的RNA相对表达量为 1.00 ± 0.03 。miR-29b上调组、miR-29b下调组与NC组的RNA相对表达量相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$ ，图3)。这表明miR-29b下调慢病毒在Ect1/E6E7细胞系中的转染是有效的。

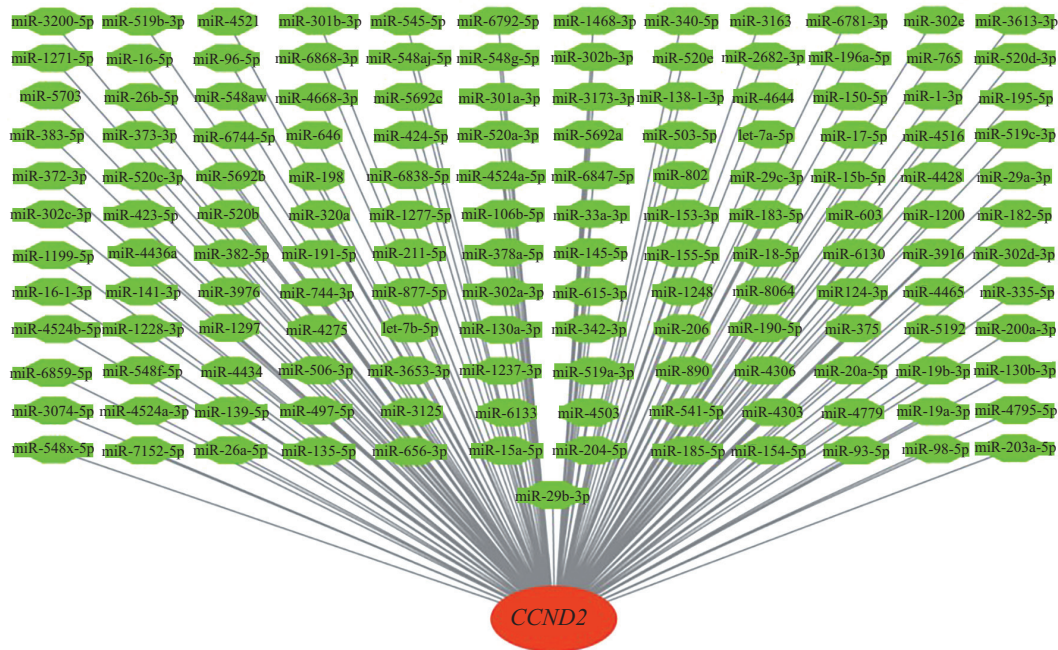
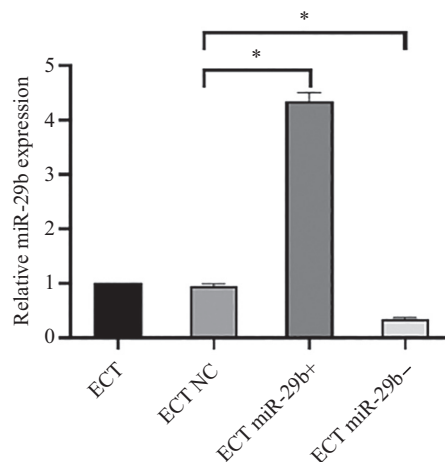


图2 *CCND2*基因与miRNAs的互作网络

Fig.2 *CCND2* gene and miRNAs interaction network



ECT NC: 阴性对照组; ECT miR-29b+: miR-29b上调组; ECT miR-29b-: miR-29b下调组。* $P < 0.05$ 。

ECT NC: negative control group; ECT miR-29b+: miR-29b up-regulation group; ECT miR-29b-: miR-29b down-regulated group. * $P < 0.05$ 。

图3 各组细胞中miR-29b的相对表达水平

Fig.3 Relative expression levels of miR-29b in cells of each group

2.3 miR-29b慢病毒转染对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7增殖的影响

在第1天, miR-29b上调组、NC组、miR-29b下调组的 D 值分别为 0.097 ± 0.002 、 0.098 ± 0.001 、 0.100 ± 0.001 , 各组细胞的 D 值基本相同, 差异无统计学意义。在第3天, miR-29b上调组、NC组、miR-29b下调组的 D 值分别为 0.164 ± 0.002 、 0.176 ± 0.001 、 0.197 ± 0.001 。第3天与之后的各时间点, miR-29b上调组增殖速率比NC组低, miR-29b下调组增殖速率比NC组高, 差异均具有统计学意义($P<0.05$, 图4)。

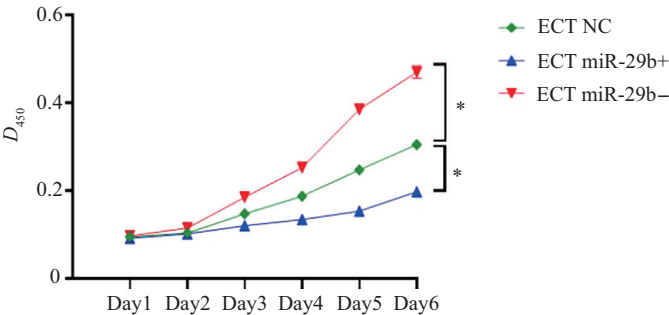
2.4 miR-29b慢病毒转染对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7凋亡的影响

miR-29b上调组的凋亡率为 $(37.98\pm0.23)\%$,

miR-29b下调组的凋亡率为 $(19.25\pm0.61)\%$, NC组的凋亡率为 $(31.15\pm0.60)\%$ 。对比3组细胞的凋亡率, miR-29b上调组的细胞凋亡率比NC组高($P<0.05$), miR-29b下调组的细胞凋亡率比NC组低($P<0.05$), 差异均具有统计学意义(图5)。

2.5 miR-29b对宫颈癌前细胞Ect1/E6E7细胞周期的影响

miR-29b上调组、NC组、miR-29b下调组在 G_0/G_1 期所占的百分比分别为 74.71 ± 1.17 、 53.65 ± 1.55 、 52.92 ± 1.55 ; 在S期所占的百分比分别为 12.16 ± 0.78 、 30.90 ± 1.55 、 30.35 ± 1.55 ; 在 G_2/M 期所占的百分比分别为 13.13 ± 0.77 、 15.34 ± 0.40 、 16.72 ± 0.32 。miR-29b上调组与NC组、miR-29b下调组相比, G_0/G_1 期细胞



* $P<0.05$.

图4 各组细胞的增殖情况
Fig.4 Cell proliferation in each group

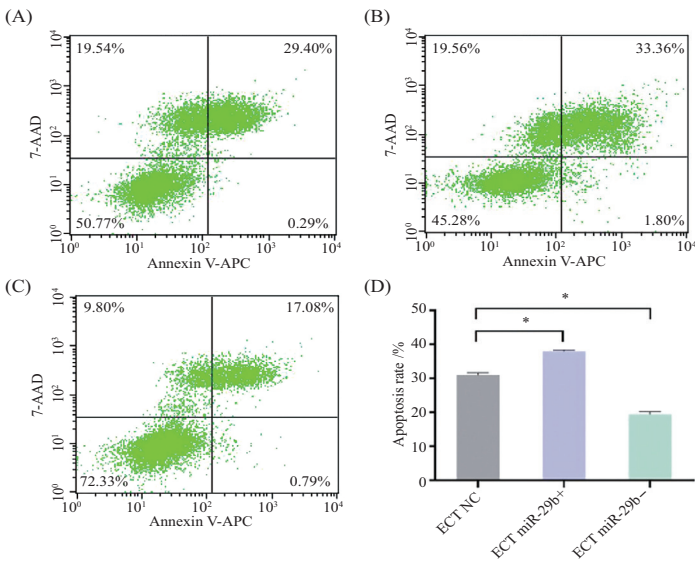
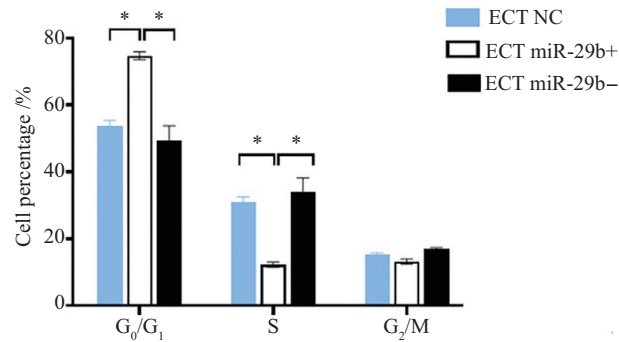
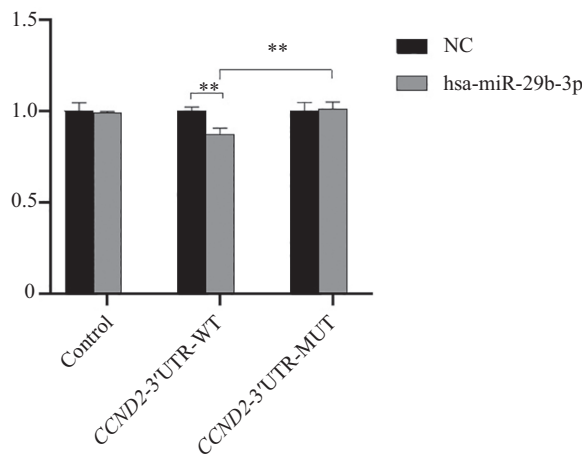


图5 各组细胞凋亡情况
Fig.5 Cell apoptosis in each group



* $P < 0.05$.

图6 各组细胞周期的比较
Fig.6 Comparison of cell cycle in each group



** $P < 0.01$.

图7 双荧光素酶报告基因实验
Fig.7 Double luciferase reporter gene experiment

比例升高, S期细胞比例降低, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 表明miR-29b上调使Ect1/E6E7细胞向S期转化的细胞比例下降, 使细胞生长停滞在G₀/G₁期, 细胞增殖受抑制; 而miR-29b下调组细胞周期与NC组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 图6)。

2.6 miR-29b与CCND2的靶向结合

经过hsa-miR-29b-3p作用后, CCND2-3'UTR-WT(野生型)组细胞中的荧光素酶活性与其对照组相比降低13%($P < 0.01$), 说明hsa-miR-29b-3p能够作用于CCND2-3'UTR区; 将CCND2-3'UTR区突变成CCND2-3'UTR-MUT(突变型)后, hsa-miR-29b-3p不能与其结合, CCND2-3'UTR-MUT(突变型)组细胞中的荧光素酶活性与CCND2-3'UTR-WT(野生型)组相比上升16%($P < 0.01$), 说明该突变位点是CCND2与miR-29b-3p作用的位点。根据这一实验结果, 我们认为CCND2与miR-29b-3p靶向结合(图7)。

3 讨论

3.1 CCND2、miR-29b与CIN的关系

我们通过生信分析筛选出与HPV感染相关的基因CCND2, 已有文献支持CCND2与宫颈癌的发生发展有关^[5-6]。CCND2是一种调控细胞周期的基因, 其表达量增高可使细胞异常增殖, 从而诱导肿瘤的发生发展^[7-8]。有学者研究发现, 在正常、CIN和宫颈癌组织中CCND2呈逐渐增加的趋势^[9-10], 过表达CCND2可促进宫颈癌细胞的增殖和迁移^[11], 且部分miRNA下调可促进CCND2的表达从而促进宫颈癌的进展^[6]。有研究报道, CCND2下调可使慢性粒细胞白血病急变期的K562细胞停滞在G₀/G₁期, 从而介导细胞的凋亡^[12]。

通过生信分析进一步挖掘, 我们发现CCND2是miR-29b的靶基因。miRNA可通过结合其下游靶基因的3'UTR参与细胞周期调节, 以及细胞增殖、分化、凋亡和侵袭^[13]。miRNA表达谱与疾病的病因、

分类、进展和预后密切相关。miR-29家族由miR-29a、miR-29b和miR-29c组成,miR-29b有基因调控功能,在细胞中发挥抗肿瘤作用^[14]。miR-29b与多种疾病如直肠癌^[15]、卵巢癌^[16]、子宫内膜癌等^[17]密切相关。因此我们提出假设,miR-29b可能与CIN的发生、发展相关。

3.2 miR-29b与CCND2相互作用调控CIN及宫颈癌

查阅文献发现,miR-29b与CCND2相互作用,在宫颈癌细胞中二者表达呈负相关^[18]。但尚不清楚miR-29b、CCND2二者与CIN的关系。因此,我们选取miR-29b进行宫颈癌前细胞实验,以了解miR-29b对CIN发生和进展的作用。

通过本研究,我们发现miR-29b上调可抑制宫颈癌前细胞增殖,miR-29b下调对宫颈癌前细胞增殖有明显的促进作用,这与其发挥抗肿瘤的作用相符。在细胞周期实验中,miR-29b上调组与NC组比较,G₀/G₁期细胞比例升高,S期细胞比例降低,miR-29b上调可抑制宫颈癌前细胞Ect1/E6E7由G₀/G₁期向S期转化,体现了miR-29b上调可使细胞增殖受到抑制,与我们增殖实验结果相符。在一项miR-29b对宫颈癌细胞HeLa、SiHa细胞生物学行为影响的研究中发现,miR-29b表达量增高对细胞增殖、迁移和侵袭均有抑制作用,支持本实验研究结果^[19]。ZHOU等^[18]收集宫颈癌组织及癌旁正常组织进行对比,发现宫颈癌组织中miR-29b的相对表达量较癌旁正常组织升高,进一步体外实验发现miR-29b上调能明显抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移,且提高了G₁期细胞所占百分率($P<0.05$)。该实验支持了miR-29b在宫颈癌中表现为抑癌基因的特性,也与我们的实验结果相符。

同时,我们通过双荧光素酶基因报告实验证实了CCND2是miR-29b的靶基因,miR-29b通过与CCND2的3'UTR结合来调控CCND2的表达。已有研究发现miR-29b可通过抑制CCND2来抑制肺动脉平滑肌细胞增殖,促进平滑肌细胞凋亡^[20]。我们通过细胞凋亡实验也发现miR-29b上调可促进宫颈癌前细胞Ect1/E6E7的凋亡。有学者在对尤因肉瘤的研究中发现新的癌基因轴,即*c-Myc*的上调抑制了*let-7a*、miR-16和miR-29b的表达,随后诱导了尤因肉瘤中CCND2的表达^[21]。

因此,通过本实验,我们证实了miR-29b可调控宫颈癌前细胞Ect1/E6E7的细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡,从而调控CIN的发生和进展。此外,还通过

实验证实了CCND2是miR-29b的靶基因。但miR-29b是否通过调控CCND2来影响CIN的发生和进展,仍需进行下一步研究。

参考文献 (References)

- [1] MCCREDIE M R, SHARPLES K J, PAUL C, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(5): 425-34.
- [2] DING R, GUO F, ZHANG Y, et al. Integrated transcriptome sequencing analysis reveals role of miR-138-5p/TBL1X in placenta from gestational diabetes mellitus [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 630-46.
- [3] LANGSCH S, BAUMGARTNER U, HAEMMIG S, et al. miR-29b mediates NF-kappaB signaling in KRAS-induced non-small cell lung cancers [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 4160-9.
- [4] KIRIMURA S, KURATA M, NAKAGAWA Y, et al. Role of microRNA-29b in myelodysplastic syndromes during transformation to overt leukaemia [J]. *Pathology*, 2016, 48(3): 233-41.
- [5] DU X, LIN L I, ZHANG L, et al. microRNA-195 inhibits the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells via the inhibition of CCND2 and MYB expression [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2639-43.
- [6] ZHANG H, XUE B, WANG S, et al. Long noncoding RNA TP73 antisense RNA 1 facilitates the proliferation and migration of cervical cancer cells via regulating microRNA607/cyclin D2 [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3371-8.
- [7] JARDIM D L, MILLIS S Z, ROSS J S, et al. Cyclin pathway genomic alterations across 190,247 solid tumors: leveraging large-scale data to inform therapeutic directions [J]. *Oncologist*, 2021, 26(1): e78-e89.
- [8] YANG D, XIE B B, LIU W J, et al. CCND2 may play a key role in cisplatin-resistant ovarian cancer through the p53 signaling pathway [J]. *J Mod Oncol*, 2022, 30(7): 1185-9.
- [9] JIANG Y, YIN F, CHEN Y, et al. Discovery of microarray-identified genes associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(12): 5667-81.
- [10] SHEN S N, WANG H, GONG B L. Expression of miRNA29 target genes CCND2 and CDK6 in cervical cancer [J]. *Chin J Wom Child Health Res*, 2018, 29(1): 56-8.
- [11] HAO Y F, LIU Y R, HUANG L L, et al. The mechanism of miRNA-195 targeting regulation of CCND2 and MYB inhibiting the proliferation and migration of cervical cancer cells [J]. *J Mod Lab Med*, 2022, 37(1): 130-5,71.
- [12] WANG Y, CHEN J, WANG L, et al. Fangchinoline induces G₀/G₁ arrest by modulating the expression of CDKN1A and CCND2 in K562 human chronic myelogenous leukemia cells [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(4): 1105-12.
- [13] PILLAI R S, BHATTACHARYYA S N, FILIPOWICZ W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms [J]? *Trends Cell Biol*, 2007, 17(3): 118-26.
- [14] YAN B, GUO Q, FU F J, et al. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 539-48.

- [15] MA X, YUAN W, TANG W Y, et al. Expression of miR-29b in colorectal cancer and its clinical significance [J]. *Chin J Onc*, 2016, 38(6): 430-3.
- [16] 胡菊梅, 胡旻. 卵巢癌患者组织中miR-29b、miR-187表达与预后关系[J]. *中国妇幼保健*(HU J M, HU M. Relationship between miR-29b and miR-187 expression and prognosis in ovarian cancer patients [J]. *Maternal and Child Health Care in China*), 2020, 35(13): 2504-8.
- [17] LIU P, HAN X Y, LIU C, et al. Effect of miR-29b on apoptosis of human endometrial carcinoma RL95-2 cells [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(4): 1944-8.
- [18] ZHOU D L, WANG D, ZHOU Q. The mechanism of microRNA-29B involved in cervical cancer by regulating cyclin D2 expression [J]. *Tumor*, 2014, 34(12): 1090-6.
- [19] ZHANG W, WU Q, LIU Y, et al. LncRNA HOTAIR promotes chemoresistance by facilitating epithelial to mesenchymal transition through miR-29b/PTEN/PI3K signaling in cervical cancer [J]. *Cells Tissues Organs*, 2022, 211(1): 16-29.
- [20] CHEN J, LI Y, LI Y, et al. Effect of miR-29b on the proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells by targeting Mcl-1 and CCND2 [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 6051407.
- [21] KAWANO M, TANAKA K, ITONAGA I, et al. c-Myc represses tumor-suppressive microRNAs, let-7a, miR-16 and miR-29b, and induces cyclin D2-mediated cell proliferation in Ewing's sarcoma cell line [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138560.