

科技部補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫  
名 稱 : Gestrinone調控P21蛋白表現之機制探討

報 告 類 別 : 成果報告  
執行計畫學生 : 周宇訢  
學生計畫編號 : MOST 110-2813-C-040-067-B  
研 究 期 間 : 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月  
指 導 教 授 : 曾淑玲

處 理 方 式 : 本計畫可公開查詢

執 行 單 位 : 中山醫學大學醫學研究所

中 華 民 國 111年03月31日

## (一)摘要

現今醫療發達的社會中，癌症死亡仍名列前茅，因此若能了解其中相關調控機轉，就可能為癌症的治療帶來更多希望。

p21 為具腫瘤抑癌基因(tumor suppressor gene)及致癌基因(oncogene)兩種不同功能之基因，而在子宮頸癌中 p21 普遍被認為是致癌基因。根據過去研究顯示，Galectin-3 在前列腺癌中，被發現藉由與 p21 形成穩定鍵結，使表現量穩定。c-MYC 則是會透過與 p21 啟動子接合，抑制 p21 活性。VEGF 可促進血管生成，為多種惡性腫瘤如肝癌之治療靶點。EGFR 已知在 HELA 細胞中有表現，且 EREG 被發現與激活促進癌症進展之信號傳遞通路有關[1]。AREG 表現與調控 EREG 及下游訊息相關。

因此本研究計畫藉由以 gestrinone 處理 HELA 細胞，透過西方墨點法(Western blotting)試驗確認 gestrinone 會使 P21 蛋白表現下降，定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction,qPCR)觀察相關基因表現，其中 EREG、AREG 與 p21 共同被抑制，而 c-MYC、galectin 3、VEGF 與 p21 表現相反，藉由上述實驗及先前文獻研究驗證 AREG、EREG、VEGF 在子宮頸癌中所扮演誘導癌化之功能，而 c-MYC 和 galectin 3 目前與 p21 關係仍有待確認。

## (二)研究動機與研究問題

根據研究顯示，許多癌症都與 p21 蛋白表現活性有極大的相關，因此若能釐清癌症與 p21 及其上下游調控基因的關係，便可提供相關癌症的治療有更明確、清楚的策略方向。Gestrinone 早期作為口服避孕藥使用，為目前臨床上對子宮內膜異位症及攝護腺癌之用藥，本實驗室發現 gestrinone 處理過後的不同

株婦癌細胞有不同敏感度之細胞毒性，其中以子宮頸癌細胞(HELA)的存活率有明顯下降趨勢，其 p21 表現量也因為 gestrinone 的處理發生明顯的變化，但一些相關機轉目前還屬未知，有待更深入探討研究。

因此，本研究計畫接著想釐清 gestrinone 對 HELA(子宮頸癌第二期細胞)細胞株中，p21 所扮演的角色，以及 p21 可能與 Galectin-3(Gal-3)、c-MYC、VEGF、EREG、AREG 之間相互調節機轉，並使用 Centrotide 作為實驗對照組；Centrotide 為 GnRH 拮抗劑，可抑制人體內促性腺釋放激素(LRHR)的作用，LRHR 調節黃體生成激素(LH)分泌，抑制不成熟排卵。希望可透過了解 gestrinone 在 HELA 細胞中對 p21 調節的基礎生化機轉、比較其之間之差異，並提供臨床對於婦科癌症的治療策略及相關標地基因的深入探討。

### (三)文獻回顧與探討

HELA 細胞為子宮頸癌細胞株，來自美國一位子宮頸癌患者亨麗耶塔·雷克斯，雖然她最後仍因不敵癌症摧殘逝世，但是卻留下了對科學研究有重大改變的細胞株:HELA 細胞。一般從活體分離之細胞培養最多僅能存活數代，而 HELA 細胞在人工科技適當修改下，生命及繁殖力極強，可以說是永生不熄的，這項發明造成研究界一時轟動，也為科學研究帶來更大可能性。

Gestrinone 為雄性素(androgen)荷爾蒙衍生物，早期被發現可作為口服避孕藥，現則用於治療子宮內膜異位症。Gestrinone 藉由抑制促性腺激素之釋放與抑制子宮週期排卵，使子宮內膜停止增厚。也因其為 19-去甲辜酮(19-nortestosterone)結構類似物，可藉由與孕酮接受體的作用，進而抑制卵巢合成雌激素及黃體激素，達到治療子宮內膜異位的效果。除此之外，本實驗室也證實 gestrinone 對不同的婦癌細胞株有不同程度的抗癌藥效，其中以 HELA 細

胞的藥效敏感性最為明顯。因此，本研究計畫將接續上述研究成果探討 gestrinone 對子宮頸癌細胞株的相關調控機轉。

根據文獻指出，p21 最早被發現為受 p53 調控活性之下游腫瘤抑癌基因 (tumor suppressor gene)，主要透過 Cyclin-dependent kinases complex inhibitor(CDK inhibitor)週期蛋白依賴性激酶抑制劑的功能，進而調控細胞週期的停滯與否。如當細胞遭受 DNA 損傷時、外界氧化壓力時，細胞會藉由 p53 的活化帶動 p21 表現，促使細胞週期趨緩，減少對自身產生威脅的可能性。即活化 p21 表現去抑制癌細胞 CDK 蛋白、生長所需增殖細胞核抗原、轉錄因子、活化趨化物等，使腫瘤細胞生長停滯。後續研究發現 p21 亦可運作獨立於 p53 之外，自行作為 CDK 抑制劑去調節細胞週期是否進入下一階段的分週期。如對正常細胞的生長過程、細胞分化與否。上述兩者所描述之 p21 皆扮演腫瘤抑癌基因功能的角色。

而近幾年，在 p21 的角色上有了更突破的發現!那就是 p21 不只可以是腫瘤抑癌基因，也可以為致癌基因(oncogene)，如 p21 的表現增加會促進癌細胞在某些特定腫瘤移動、移轉能力，使其更具侵略性，也會促進病灶區腫瘤的形成。根據前人研究顯示，p21 基因缺失在前列腺癌中，會降低癌細胞移活動力，抑制癌症快速惡化的能力[2-4]。

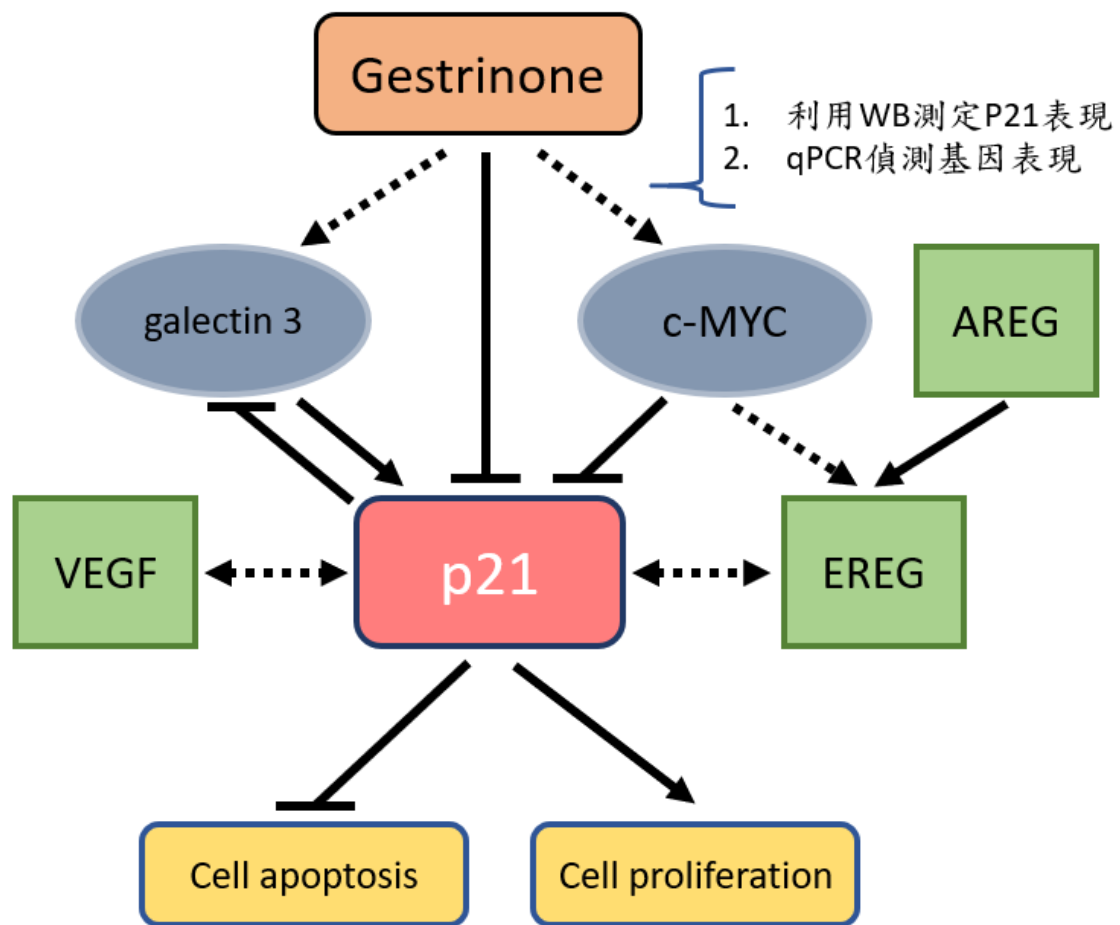
這項重大發現讓我們在癌症治療方面又邁進一大步，可以藉由標地、控制 p21 表現來遏止癌細胞增生、轉移、入侵，甚至活化其凋亡機制基因。我們實驗室研究結果已證實，在偵測不到 p53 表現的 HELA 細胞內，經 gestrinone 處理之後，可以發現其 p21 表現量明顯變化[5]，並且有顯著的細胞死亡狀況，若能釐清在子宮頸癌中，gestrinone 調控 p21 相關基因及可能的上下游關係，或許

能為子宮頸癌治療產生更明確之標靶基因及可能治療方法。

Galectin-3(Gal-3)在過去研究顯示, 可為腫瘤抑癌基因或致癌基因, 在前列腺癌中, Gal-3 表現量雖然低, 卻會藉由其結構中 carbohydrate-recognition domain (CRD)與 p21 穩定鍵結, 使其表現量穩定, 造成細胞凋亡, 而 p21 也會藉由相關機轉去調控 Gal-3 表現[6]; 另一方面, c-MYC 在過去也已被證實, 可為腫瘤抑癌基因或是致癌基因, 在不同情況下, 會藉由結合在 p21 轉錄啟動子上, 去抑制 p21 基因表現[7]。VEGF 血管內皮生長因子, 其作用促進血管生成, 為多種惡性腫瘤的治療靶點; 例如:在肝細胞癌中會與肝素結合, 可誘導血管內皮細胞的增殖和遷移, 表達多寡與腫瘤分期和進展有關, 在許多已鑑定的腫瘤中不受調控。其家族有些成員在宮頸癌發病和進展中的作用已得到充分證實相關性, 因此, 若能確切 VEGF 標靶切入點若是能找到, 可能為受其所苦的患者帶來甚大的進展[8-10]; EREG 上皮調節蛋白, 在許多癌症中主要藉由結合並提高表現激活 EGFR 信號傳遞通路並促進癌症進展。此外, EREG 過表達顯示通過誘導 c-MYC 表達促進 HNSCC 腫瘤發生, 並且 c-MYC 的藥理抑制挽救了 EREG 促進的 HNSCC 腫瘤發生, 因此 EREG/EGFR 通路可能是一個潛在的靶點, 可以與其他驅動突變靶點結合以對抗特定的癌症。[11-12]。AREG 根據先前文獻指出, 在多種癌症中均有表達且顯示有可能通過激活癌細胞中的 EGFR/ERK/NF- $\kappa$ B 信號通路在細胞遷移、侵襲上有所調節, 亦有數據表明 AREG 通過 AREG-EGFR-ERK 途徑促進癌細胞之抗藥性及穩定性, 其中高表現 EREG 和 AREG 表達作為大腸直腸癌患者的獨立有利預後生物標誌物的效用。此外, 抗 EGFR 單株抗體治療可能對具有高 AREG 和 EREG 表達之轉移性患者特別有益。因此, 有必要在後續相關試驗中做進一步的確認[13-14]。因此,

本研究計畫希望能藉試驗觀察經不同劑量 gestrinone 處理 HELA 細胞後，細胞內 p21 表現量的變化與 Galectin-3、VEGF、EREG、AREG 訊息傳遞路徑是否可能有關，尤其在 HELA 細胞中，是否透過上述路徑來調控 p21 之表現而影響細胞存活，進而表達抗癌藥效。

Gestrinone 在過去為口服避孕藥，目前在臨床用於治療子宮內膜異位症，搜尋相關文獻已知 gestrinone 在 HELA 細胞中可能調控的訊息傳遞路徑來影響 p21 的表現，使其依據不同刺激與細胞條件執行促腫瘤或抑制腫瘤的功能。因此利用 gestrinone 進行 HELA 細胞試驗，觀察其是否能直接抑制其生長，及探討 gestrinone 在癌細胞中與相關基因的可能致癌機轉。



圖一:推測 gestrinone 處理細胞後與 p21 及相關基因間可能調控關係

因此本實驗希望可以藉由觀察 HELA 細胞在經過不同劑量 gestrinone 處理後，先用 Western blot 來確認 P21 及蛋白表現是否與預期相同，再用 qPCR 驗證 p21、Galectin-3、c-MYC、VEGF、EREG、AREG 表現量之差異，來推測 p21 與其他基因可能調控及被調控關係。同時，並藉由試驗結果推論 gestrinone 影響 p21 相關之上下游關係以及細胞在處理藥物後的走向趨勢。

#### (四)研究方法與步驟

##### (一) 細胞培養

本實驗採用 HELA(子宮頸癌細胞株)，分別使用 ATCC 所建議的 MEM，將其培養在 37°C 、5% CO<sub>2</sub> 環境中。

##### (二) 加藥處理細胞

細胞計數將 6cm 培養皿中細胞用繼代方式分至 4 盤 3.5cm 培養皿中，並使其維持  $3 \times 10^5$  之細胞數，經 24 小時貼覆後，利用不同濃度之'佑汝'2.5mg 膠囊 Gestrinone(0uM、0.5uM、2.5uM)及對照組:250uM'欣得泰凍晶注射液'Centrotide Centrotide 進行 24 小時加藥處理。

##### (三) 核酸萃取

###### (1)分離 DNA/RNA:

將上述細胞培養所得 HELA 細胞置於 2c.c.離心管中，加入 DR buffer、β-ME，後經低溫高速離心將 DNA、RNA 分離。

###### (2)RNA 清洗:

將含 RNA 之 RB column 分別加入 99.5%無水酒精、 RW1 buffer、RPE buffer 兩次及分別用 4°C 12000rpm 離心，將碎裂小片段核酸、剩餘蛋白質雜質藉由酒精配置溶液沖洗去除。

### (3)RNA 純化:

將 RB column 移至 1.5c.c.離心管中加入 RMas-free water, 4°C 12000rpm 離心兩次, 下方液體即為純化 RNA, 後將 RNA 保存於-80°C冰箱中直至需使用。

### (4)cDNA 製備(RT-PCR):

利用 OD260nm/OD280nm 比值定量檢驗 RNA 純度, 得 RNA 濃度, 並以 5ug 為標準, 換算得出進行反轉錄 PCR 所需 RNA 量, 之後在 RNA 中加入 oligo dt、dNTP、DEPC 水上機加熱 65°C 5 min, 後將其置於冰上加入 RT FS Bf(5x)、0.5M DTT 再上機 37°C 2min, 再置於冰上並加入 DEPC 水、MMLV, 後上機 37°C 50min, 70°C 15min 並待其冷卻至 4°C後, 得 cDNA, 並以 PCR 聚合酶連鎖反應驗證 cDNA 之訊號是否表現, 以利後續試驗進行。

### (四) 基因活性表現偵測(qPCR 定量即時聚合酶連鎖反應)

所需原料:cDNA、二次水、SYBR-Green 非專一鍵結螢光染劑、所設計引子(因不同基因而異), 分別加入 8 連排微量離心管中, 上機反應 95° C 10min→ 95° C 15sec、60° C 1min(連續 40 cycles)→ 95° C 15sec→ 60° C 1min→ 95° C 15sec, 進行統計分析, 計算樣本之間 $\Delta$ CT、 $\Delta\Delta$ CT 和 RQ 值, 並用 RQ 值繪圖觀察處理不同劑量 gestrinone 之婦癌細胞中 p21 基因及待測基因表現量。

actin F	TGG GCC TTG CTC AGA GCG GA
actin R	GCT CAC CGC CTC GGC TTG TC
p21 F	TGAGCGATGGA ACTTCGACT
p21 R	CGAAGGCACAAGGGTACAAGA
VEGF F	TGG GCC TTG CTC AGA GCG GA



VEGF R	GCT CAC CGC CTC GGC TTG TC
EREG F	AAT GGC TAT TGT TTG CAT GG
EREG R	CTT AAA GGT TGG TGG ACG GT
AREG F	ATA TTT CGG TGA ACG GTG TG
AREG R	TGT GAG GAT CAC AGC AGA CA

### (五) 蛋白質活性表現偵測(Western Blotting 西方墨點法)

#### (1)蛋白質收集和前處理:

4 盤 3.5cm 培養皿中，使細胞數維持  $3 \times 10^5$  之細胞數，經 24 小時貼覆後，利用不同濃度之 Gestrinone(0uM、0.5uM、2.5uM)及對照組:250uM Centrotide 進行 48 小時加藥處理。後加入裂解液、蛋白酶抑制劑，再經高速離心，取上清液即含所需目標蛋白質，後進行蛋白質濃度測定，稀釋為  $5 \mu\text{g/ml}$ ，保存於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中備用。

#### (2)蛋白質電泳(SDS-PAGE):

分別配製適當濃度之上膠(stack gel)、下膠(separating gel)，將膠檯架妥後先加下膠後上膠，待其凝固後倒入 running buffer，即可將待測 protein sample marker、蛋白質樣本注入孔洞中，通電跑膠，進行蛋白質分離。

#### (3)蛋白質轉印:

將跑完膠之膠體轉移至已用甲醇活化之 PVDF 膜上，藉由其表面正電，吸附蛋白質於上。將其用浸濕 transfer buffer 之濾紙夾緊包覆，進行轉印。

#### (4)Blocking:

待轉漬完成後，利用 NET 緩衝劑將膜上未吸附蛋白質之空白區填滿，防止抗體

的非專一性結合，確保後續試驗抗體只能專一性接合在目標蛋白上。

#### (5) 抗體反應：

先後加入一級、二級抗體，一級抗體目的為辨認目標蛋白質，二級抗體則是辨認一級抗體與其接合，藉此有效放大訊號，二級抗體上有 HRP 酵素，後加入酵素受體，使其呈色。即可上機壓片感光、觀察結果。

#### (六) 統計分析

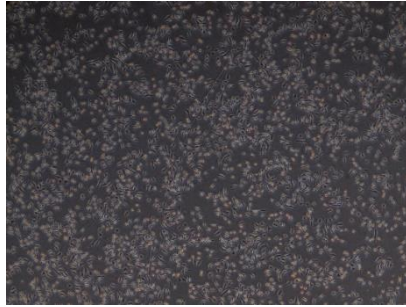
為確保進行試驗時之穩定性，本實驗皆採用至少二樣本二重複的方式驗證。使用平均數和標準差方式呈現，再藉由 Student's t-test 進行數據分析，以驗結果是否與對照組有產生顯著差異，如檢定結果之 p 值 $<0.05$ ，則具顯著差異。（\*表示  $P<0.05$ ，\*\*表為  $p<0.01$ ，\*\*\*為  $p<0.005$ ）

(五)結果

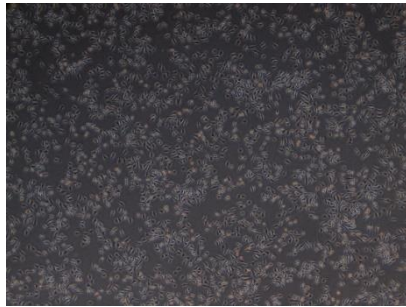
0 hour

48 hours

gestrinone 0 uM



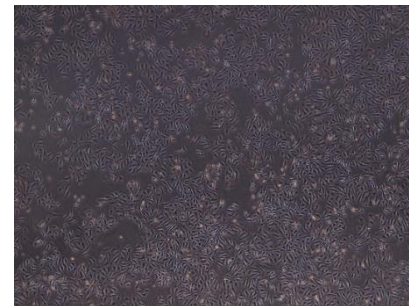
gestrinone 0.5 uM



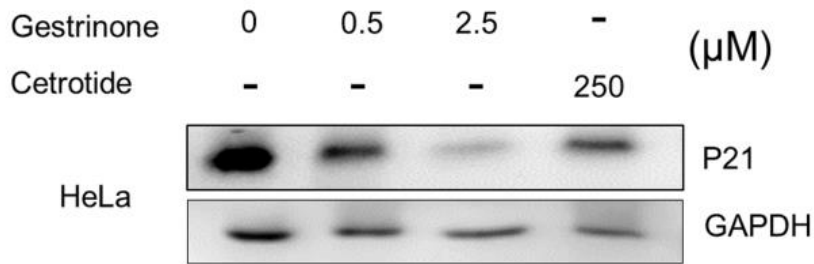
gestrinone 2.5 uM



centrotide 250 uM



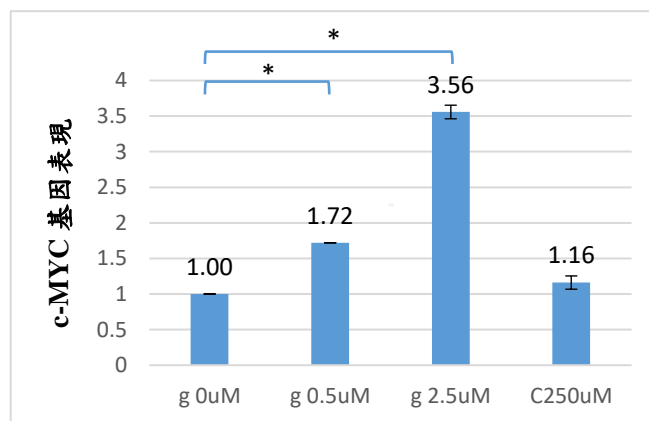
圖一:HELA 細胞處理不同劑量 gestrinone 後經 48 小時觀察細胞數量，可以看到 g 0uM、Centrotide 250 uM 與未加藥處理前相比細胞數量大量增加；而 g 0.5 uM 可以看到細胞與未加藥處理前相比有減少，但減少的量並不明顯；此外，在 g 2.5 uM 我們看到 HELA 細胞在經 gestrinone 後，細胞大量死亡，因此為了驗證其中 p21 表現，我們進行 WB 測試以驗證我們認為 P21 蛋白的表現下降。



圖二：WB--gestrinone 對 Hela 細胞 P21 蛋白活性的影響

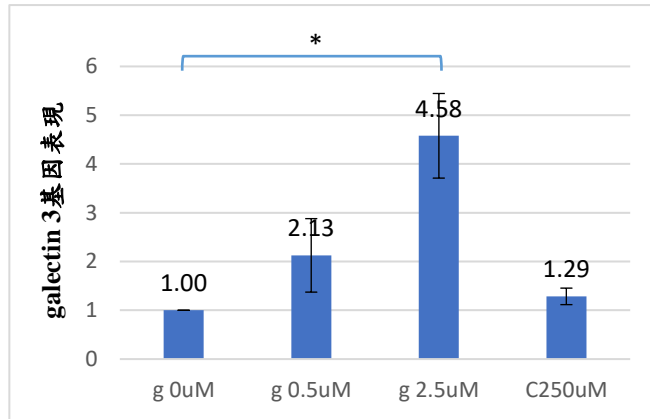
由圖可知 GAPDH 蛋白(為 house-keeping gene)可做為蛋白濃度之標準:

在不同劑量及藥物處理後蛋白濃度差不多，觀察 P21 時發現其蛋白表現隨劑量處理呈現下降趨勢，且在高劑量組中與對照組具顯著差異下降，由此可再次驗證先前文獻所提: Gestrinone 會導致 P21 表現下降。



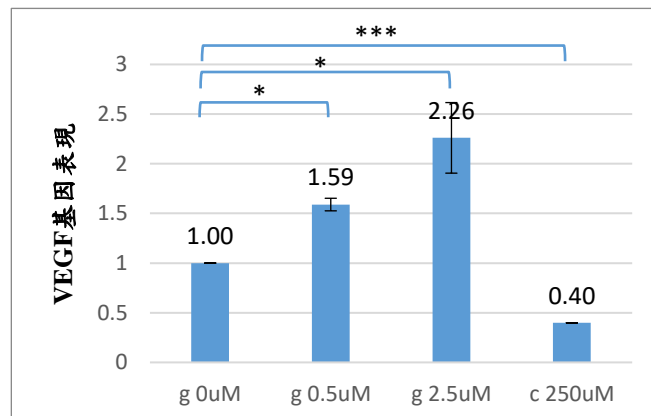
圖三：gestrinone 對 Hela 細胞 c-myc 基因活性的影響

相較於 g 0uM，g 0.5uM、g 2.5uM 皆顯示以 gestrinone 處理後 c-myc 表現有顯著上升，可印證先前文提到 c-MYC 可能可以抑制 p21 表現，而根據欣前文先推定 p21 在子宮頸癌中扮演至癌基因的角色，由此可間接印證 c-myc 在子宮頸癌中可能為抑癌基因之角色。



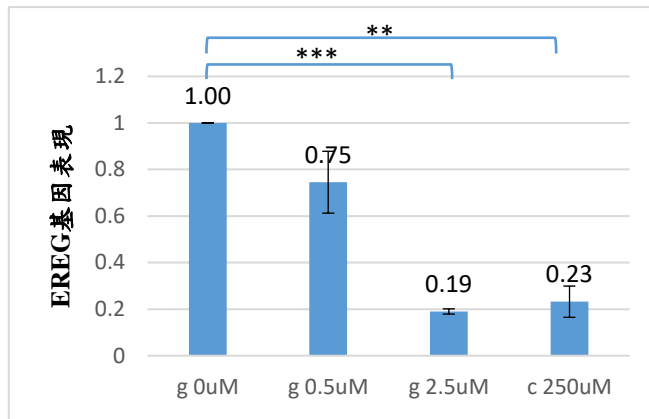
圖四：以 gestrinone 處理 Hela 後 galectin 3 基因活性之改變

以 g 2.5uM 較具有明顯表現上升，但與之前實驗預期不同。原本預期 galectin 3 會與 p21 形成穩定鍵結，因此若得 p21 因 gestrinone 處理而表現減少，galectin 3 應與其一同下降，推測可能在前列腺癌中之相關路徑與此次試驗中子宮頸癌作用機轉略有差異。其中差異仍須進一步探討才得以釐清。



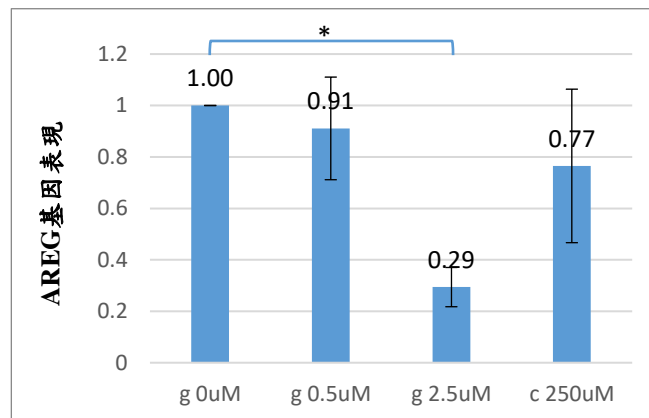
圖五：VEGF 在處理高低劑量 gestrinone 與 centritide 後 Hela 細胞基因表現量

由圖可知，三劑量與 g 0uM 皆有顯著差異，其中 g 0.5uM、g 2.5uM 與之相比表現明顯上升；而 c 250uM 則是有極顯著表現下降，根據試驗所設定理論應為表現下降，推測可能 VEGF 在肝癌中作用機轉與其在此不盡相同，亦有可能為與其之其他家族成員與子宮頸癌較相關。



圖六：Hela 細胞處理 gestrinone 後表現量之改變

EREG 隨處理 gestrinone 劑量之高低，有近於反比之基因表現，其中 g 2.5uM、c 250uM 與 g 0uM 相比，有非常顯著之下降差異，C50 同為表現下降且與 g0 具顯著差異，與先前文現不同的是，與 c-myc 所得結果與其呈現相反，因此在子宮頸癌中可知 c-myc 不會受到 EREG 之誘導活化，因此 gestrinone 抑制其表現路徑值得繼續探索。



圖七：以 gestrinone 處理 Hela 細胞後基因表現量之變化

只有在高劑量(g 2.5uM)處理時之表現下降且與未處理樣本具顯著下降差異，其作用與機轉合 EREG 相近，可更進一步驗證 EREG、AREG 在子宮頸癌中所扮演誘導癌化之功能，而 p21 與 EREG、AREG 分別及交互之關係有待後續實驗深入了解，並渴望為治療增添希望。

## (六)討論

藉由 WB 得到 P21 蛋白在處理 gestrinone 後，表現有明顯下降，其中在高劑量的下降更為大幅，由此結果進而去做 qPCR 探討各基因間之關係。

根據現前文獻研究顯示，癌症幹細胞是導致化療耐藥和可能復發的主要機制之一，作者藉由一連串試驗證明 AREG 通過 AREG/EGFR/ERK/NF- $\kappa$ B 信號傳遞通路並與癌症進展，包含細胞遷移、侵襲、抗藥性、癌幹性及穩定性有關，且研究發現 miR-34c-5p 可以透過靶向 AREG 抑制卵巢癌性性和耐藥性，此外，作者亦發現 AREG 的表達與幾種癌症的不良預後有關，因此 AREG 和 miR-34c-5p 都可能作為開發卵巢癌治療的預後生物標誌物或靶標[15]。

本次研究試驗結果中 AREG、EGFR 在許多癌症中主要藉由提高表現激活 EGFR，推測有可能會與 p21 相輔相成，並造成致癌效果，其在此試驗中結果顯示一會同受到高劑量之 gestrinone 抑制，情況也比較像是與 P21，且只有在高劑量時才有明顯減少，其餘劑量皆無差異，由此試驗 EGFR、AREG 所得結果顯示推測 EGFR、AREG 在子宮頸癌中亦是通過 AREG/EGFR 路徑調控，使 p21 活化並促進癌細胞增生和產生抗凋亡機轉，因此若能抑制源頭---AREG，可能研究機轉有所進展，並可能為治療子宮頸癌的一種有前景的策略。

而 VEGF 根據文獻指出，其作用會促進血管生成，目前可作為許多惡性腫瘤治療之標靶，其家族成員在許多癌症發病和進展中的作用已得到充分證實相關性，根據先前研究指出，VEGF 可能在宮頸癌的發生發展中起重要作用，Ang-2 和 VEGF 的相互協同作用與子宮頸中血管和淋巴管的生成密切相關。子宮頸癌放化療能顯著抑制腫瘤組織中血管和淋巴管的形成[16]；而根據試驗結果顯示，VEGF 在低劑量及高劑量 gestrinone 中表現皆有顯著的下降，因此若能有效抑制 VEGF 之

表現，此舉可能為治療子宮頸癌帶來一線生機。

根據文獻提到文獻已知 c-MYC 為 oncogene 其表現量提升進而可能造成 p21 表現下降，影響 p21 誘導細胞週期停滯在 G0/G1phase 的功能，其中 EREG 的過表達顯示通過誘導 C-Myc 表達促進 HNSCC 腫瘤發生，並且 C-Myc 的藥理抑制挽救了 EREG 促進的 HNSCC 腫瘤發生。EREG 可以通過維持 EGFR-Erk 通路的激活來模擬 EGFR 突變，並且 EREG 的高表達與對 EGFR 抑制劑之治療的反應呈正相關。此外，EREG 的敲低降低了對治療的敏感度。

此試驗結果將 EREG-EGFR-C-Myc 通路確定為驅動 HNSCC 腫瘤發生的關鍵，並表明 EREG 表達可能是 HNSCC 對治療的預測功能標誌物。[17]；此外，亦有文獻指出，c-myc 可能有抑癌功能，藉由抑制 EREG 等訊息傳導路徑之相關基因而壓抑腫瘤的癌化，但確切傳遞路徑尚未明確，仍需進一步的探討。

Galectin-3(Gal-3)在過去研究顯示，可為腫瘤抑癌基因或致癌基因，因其在前列腺癌中明確已知會與 p21 形成穩定鍵結結合，並誘發使細胞產生凋亡；而此試驗中，其表現與 p21 呈負相關，呈現不一致的情形，其中間相關機轉路徑有待後續實驗確認。

由此可延伸藉由分別加入 Galectin-3、c-MYC、VEGF、EREG、AREG、表現抑制劑後，觀察 p21 及其相關基因、蛋白表現量是否產生變化，並利用 MTT/Flow cytometry analysis cell cycle arrest 等方式確認 HELA 在處理 gestrinone 後是藉由產生細胞凋亡亦或造成細胞週期停滯，以進一步釐清、確認相互之間作用關係。

## (七)結論

藉由本次試驗，可明確得知 gestrinone 會使 P21 蛋白表現下降，進而推論出與



其他基因之關係，其中與 p21 共同被抑制的 EREG、AREG 和與 p21 表現相反的 c-MYC、galectin 3、VEGF；其中 AREG/EREG 已知為共同路徑，因此若能找出其中之治療標靶位置亦或相關上下游基因，可能為治療帶來希望。而 c-MYC 在子宮頸癌中可能為抑癌基因，但仍需進一步試驗確認。Galectin 3 與其在前列腺癌中所扮演角色略有差異，但是不排除可能與 p21 有間接關係，其中間相互作用有待釐清。

### (八)文獻參考

1. Zhiying Wang, Xiaohui Liang, Aizhen Xiong, Lili Ding, Wei Li, Li Yang, Xiaojun Wu, Hailian Shi, Yue Zhou, and Zhengtao Wang. Helichrysetin and TNF- $\alpha$  synergistically promote apoptosis by inhibiting overactivation of the NF- $\kappa$ B and EGFR signaling pathways in HeLa and T98G cells
2. Guo, Q.; Xiong, Y.; Song, Y.; Hua, K.; Gao, S. ARHGAP17 suppresses tumor progression and up-regulates P21 and P27 expression via inhibiting PI3K/AKT signaling pathway in cervical cancer. *Gene* 2019, 692, 9–16
3. Shi, X.; Ran, L.; Liu, Y.; Zhong, S.; Zhou, P.; Liao, M.; Fang, W. Knockdown of hnRNP A2/B1 inhibits cell proliferation, invasion and cell cycle triggering apoptosis in cervical cancer via PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol. Rep.* 2018, 39, 939–950.
4. Bahar, Shamloo. ; Sinem, Usluer. p21 in Cancer Research. *Cancers.* 2019, 11, 1178
5. Huai-How CIOU, Tsung-Hsine LEE, Hsin-Chieh WANG, You-Ren DING, Chih-Jen TSENG, Po-Hui WANG, Meng-Hsiun TSAI, and Shu-LingG TZENG.

Repurposing gestrinone for tumor suppressor through P21 reduction regulated by JNK in gynecological cancer

6. Y Wang, V Balan, D Kho, V Hogan, P Nangia-Makker & A Raz.

Galectin-3 regulates p21 stability in human prostate cancer cells

7. Yun-Jeong Jeong, Hyang-Sook Hoe, Hyun-Ji Cho, Kwan-Kyu Park,

Dae-Dong Kim, Cheorl-Ho Kim, Junji Magae, Dong Wook Kang, Sang-Rae

Lee, Young-Chae Chang. Suppression of c-Myc enhances p21 WAF1/CIP1

-mediated G1 cell cycle arrest through the modulation of ERK

phosphorylation by ascochlorin

8. Guang-Zhi Zhu, Xi-Wen Liao, Xiang-Kun Wang, Yi-Zhen Gong,

Xiao-Guang Liu, Long Yu, Chuang-Ye Han, Cheng-Kun Yang, Hao Su,

Ke-Tuan Huang, Ting-Dong Yu, Jian-Lu Huang, Jia Li, Zhi-Ming Zeng, Wei

Qin, Zheng-Qian Liu, Xin Zhou, Jun-Qi Liu, Lei Lu, Quan-Fa Han, Li-Ming

Shang, Xin-Ping Ye, Tao Peng. Comprehensive investigation of p53, p21,

nm23, and VEGF expression in hepatitis B virus-related hepatocellular

carcinoma overall survival after hepatectomy

9. Lindsey E Minion, Krishnansu S Tewari. Cervical cancer - State of the

science: From angiogenesis blockade to checkpoint inhibition

10. Magdalena Salomon-Perzyńska, Aleksander Perzyński, Beata

Rembielak-Stawecka, Bogdan Michalski, Violetta Skrzypulec-Plinta.

[VEGF--targeted therapy for the treatment of cervical cancer --literature

review]

11. Wan-Li Cheng, Po-Hao Feng, Kang-Yun Lee, Kuan-Yuan Chen, Wei-Lun Sun, Nguyen Van Hiep, Ching-Shan Luo, Sheng-Ming Wu. The Role of EREG/EGFR Pathway in Tumor Progression
12. Sylvie Job, Aurélien de Reyniès, Betty Heller, Amélie Weiss, Eric Guérin, Christine Macabre, Sonia Ledrappier, Cyril Bour, Christine Wasylyk, Nelly Etienne-Selloum, Laurent Brino, Christian Gaiddon, Bohdan Wasylyk, Alain C Jung. Preferential Response of Basal-Like Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines to EGFR-Targeted Therapy Depending on EREG-Driven Oncogenic Addiction
13. Chen Jing, Yang Han Jin, Zhai You, Qian Qiong, Zhou Jun. Prognostic value of amphiregulin and epiregulin mRNA expression in metastatic colorectal cancer patients
14. Felix Bormann, Sebastian Stinzing, Sascha Tierling, Markus Morkel, Maria Rivera Markelova, Jörn Walter, Wilko Weichert, Florian Roßner, Natalia Kuhn, Juliane Perner, Johanna Dietz, Sylvia Ispasanie, Manfred Dietel, Reinhold Schäfer, Volker Heinemann, Christine Sers. Epigenetic regulation of Amphiregulin and Epiregulin in colorectal cancer
15. S-L Tung, W-C Huang, F-C Hsu, Z-P Yang, T-H Jang, J-W Chang, C-M Chuang, C-R Lai, and L-H Wang. miRNA-34c-5p inhibits amphiregulin-induced ovarian cancer stemness and drug resistance via downregulation of the AREG-EGFR-ERK pathway
16. Qingyuan Lv, Weijuan Zhong, Xiabin Ye, Yang Lv, Haiying Liu,

Guizhen Yan, and Diwen Chen. Expression of Angiopoietin and VEGF in Cervical Cancer and its Clinical Significance

17. Shuli Liu, Yang Wang, Yong Han, Weiya Xia, Ling Zhang, Shengming Xu, Houyu Ju, Xiangkai Zhang, Guoxin Ren, Liu Liu, Weimin Ye, Zhiyuan Zhang, and Jingzhou Hu. EREG-driven oncogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma exhibits higher sensitivity to Erlotinib therapy