文章编号:1000-5404(2014)02-0115-06

论著

MicroRNA-206可能通过调控Cx43表达调节人乳腺癌细胞的转移能力

杜俊泽[1],范林军[1],齐晓伟[1],孙 鹏[1],王明浩[1],明 佳[2],姜 军[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺病中心[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院三腺外科[2])

[摘要] **目的** 通过干预人乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-231中微小RNA206(microRNA-206,miR-206)的表达,观察连接蛋白43(connexin43,Cx43)的表达以及细胞在增殖、迁移和侵袭能力等方面的变化。**方法** 使用荧光定量RT-PCR(qRT-PCR)检测正常乳腺细胞MCF-10A和MCF-7、MDA-MB-231细胞中miR-206的表达水平。通过构建慢病毒载体转染MCF-7及MDA-MB-231细胞,分别升高和降低miR-206的表达水平;采用qRT-PCR和Western blot法检测转染后Cx43的mRNA及蛋白表达水平的变化。利用CCK-8法检测细胞增殖能力,Transwell小室法检测细胞迁移和侵袭能力。**结果** MCF-7和MDA-MB-231中miR-206的表达均明显低于正常细胞株;其中MCF-7细胞中miR-206表达水平较MDA-MB-231中低,Cx43表达水平较MDA-MB-231中高。转染慢病毒包装靶向增强miR-206表达的shRNA载体LV-hsa-miR-206(1569-11)后,MCF-7细胞的miR-206表达明显上升,Cx43的mRNA表达水平及蛋白表达水平均明显下降;细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显降低。转染慢病毒包装靶向抑制miR-206表达的shRNA载体LV-hsa-miR-206-inhibition后,MDA-MB-231细胞的miR-206表达明显下降,Cx43 mRNA表达水平及蛋白表达水平均明显上升;细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显增强;以上差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 干预miR-206的表达可导致Cx43表达水平的变化,并影响人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231的增殖、迁移和侵袭能力;miR-206可能通过抑制Cx43的表达调节了乳腺癌细胞的转移能力。

[关键词] 乳腺肿瘤;肿瘤细胞,培养的;microRNA-206;连接蛋白43;细胞运动;肿瘤侵袭
[中图法分类号] R394.3;R73-37;R737.9 [文献标志码] A

Inhibitory effects of microRNA-206 on migration and invasion of breast cancer by targeting Cx43

Du Junze[1], Fan Linjun[1], Qi Xiaowei[1], Sun Peng[1], Wang Minghao[1], Ming Jia[2], Jiang Jun[1] ([1]Center of Breast Cancer, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Thyroid and Breast Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the roles of microRNA-206 (miR-206) and connexin 43 (Cx43) in the cell proliferation, migration and invasion of breast cancer. **Methods** With qRT-PCR, the miR-206 expression levels of breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 and normal mammary gland cell line MCF-10A were detected. The levels of miR-206 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells were up-regulated or down-regulated by lentiviral vector-mediated transfection. Cx43 expression was detected by qRT-PCR and Western blotting. Cell migratory and invasive abilities were measured by Transwell chamber assay. **Results** It was found that there was obviously lower expression of miR-206 in breast cancer cells than in normal cells. MCF-7 cells showed lower miR-206 level but higher Cx43 level than MDA-MB-231 cells. After shRNA-mediated miR-206 up-regulation, MCF-7 cells displayed increase of miR-206 level, decrease of Cx43 mRNA and protein expression, and suppression of cell proliferation, migration and invasion ($P<0.05$). After shRNA-mediated miR-206 down-regulation, MDA-MB-231 cells displayed decrease of miR-206 level, increase of Cx43 mRNA and protein expression, and enhancement of cell proliferation, migration and invasion ($P<0.05$). **Conclusion** MicroRNA-206 inhibits migration and invasion of breast cancer cells through down-regulation of Cx43 expression possibly, which indicates the tumor-suppressive function of microRNA-206 in breast cancer.

[基金项目] 国家自然科学基金(81172539);重庆市自然科学基金(2011jjA0695)
[通信作者] 姜 军,电话:(023)68754160, E-mail:jbcd@medmail.com.cn
明 佳,电话:(023)63693551, E-mail:mjia1001@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131203.0935.003.html(2013-12-03)

[**Key words**] breast neoplasms; tumor cells, cultured; microRNA-206; connexin 43; cell movement; neoplasm invasiveness

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81172539) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2011jjA0695). Corresponding author: Jiang Jun, Tel:86-23-68754160, E-mail:jbcd@medmail.com.cn; Ming Jia, Tel: 86-23-63693551, E-mail:mjia1001@sina.com

乳腺癌是我国女性发病率和死亡率较高的恶性肿瘤,转移一直是乳腺癌患者死亡的主要原因,也是乳腺癌的治疗难点之一。缝隙连接是存在于相邻细胞间的膜通道结构,它的基本组成单位是连接蛋白(connexin, Cx),人类乳腺组织主要表达Cx26、Cx43。有关连接蛋白43调节恶性肿瘤转移的机制研究[1]发现,Cx43介导了相邻细胞间双向性、直接的电或化学信号交流,在乳腺癌转移时伴随有Cx43的表达增加和细胞间信息交流的紊乱。研究[2-3]发现,在Cx43的启动子上存在着多个转录因子的结合位点,例如:转录因子SP-1(specificity protein-1)、SP-3、AP-1(activator protein-1)、c-jun等,多种化学或物理刺激通过这些转录因子在转录水平调节了Cx43基因的表达。但是,转录水平的调控因素众多,关系复杂,mRNA需要翻译成蛋白质发挥作用,一个分子最终的功能体现在蛋白质水平。我们的前期研究[4]发现,Cx43的转录后调控可能参与了乳腺癌腋窝淋巴结转移的调节,但有关Cx43的转录后调控在乳腺癌远处转移中的作用尚不清楚。

微小RNA(microRNA,miRNA)是最大的一类基因表达转录后调控因子[5],有关乳腺癌中miRNA的研究[6]发现,多种miRNA通过多个目的基因参与了乳腺癌转移的调节。前期研究[4]中,我们以手术切除的人乳腺癌原发灶和配对转移的腋窝淋巴结为研究对象,研究了微小RNA-206(microRNA-206,miR-206)的表达和Cx43蛋白表达的变化关系,结果发现,在乳腺癌发生腋窝淋巴结转移时miR-206的mRNA表达明显降低,而Cx43的蛋白表达明显增加,二者有明显的负相关关系。上述研究提示miR-206可能在乳腺癌腋窝淋巴结转移中发挥重要作用,而Cx43可能是其下游调控分子。但是,miR-206是否确实通过Cx43调节了乳腺癌的远处转移及其机制尚不清楚。因此,本研究拟以人乳腺癌细胞株MCF-7及MDA-MB-231为细胞模型,通过干预miR-206的表达,观察其对Cx43表达以及对细胞生物学特性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人乳腺癌细胞株MCF-7及MDA-MB-231购自中科院上海细胞库;正常人乳腺细胞MCF-10A由我科实验室保存。DMEM(高糖)培养基购自Hyclone公司,胎牛血清购自美国Gibco公司,RNAisoPlus和qRT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,CCK-8购自碧云天公司,兔抗人Cx43单克隆抗体购自Santa公司,GAPDH购自Epitomics公司,Matrigel基质胶购自BD公司,LV-hsa-miR-206-inhibition(慢病毒包装靶向抑制miR-206的shRNA载体)、LV-hsa-miR-206(1569-11)(慢病毒包装靶向增强miR-206的shRNA载体)、NC-GFP-LV(慢病毒包装作对照的载体)构建包装及其对应的病毒上清、靶片段序列和NC载体的靶片段序列购自上海吉凯基因化学技术有限公司,PCR引物由上海生工公司合成。

1.2 细胞培养及传代

MCF-7、MDA-MB-231及MCF-10A细胞培养于含有10%胎牛血清的DMEM(高糖)培养液,在37℃,5% CO_2的孵育箱中培养,常规用0.25%胰酶消化传代。实验所用细胞均处于对数生长期。

1.3 qRT-PCR检测细胞中miR-206表达以及Cx43 mRNA表达

取对数生长期的MCF-10A、MCF-7及MDA-MB-231细胞,提取细胞总RNA,按TaKaRa说明书操作进行PCR反应。miR-206及U6引物序列:miR-206上游5′-GGCCGCTGGAATGTAAGGAAG-3′,下游5′-GTGCAGGGTCCGAGGT-3′。U6上游5′-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3′,下游5’-GTAACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3′。反转录条件:42 ℃ 15 min→85 ℃ 5 s→4 ℃ 5 min。qRT-PCR反应条件:95 ℃ 1:30 →(95 ℃ 5 s→60 ℃ 30 s) × 40→65 ℃ 1 s。实验重复3次,根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量并进行统计。Cx43及GAPDH引物序列:Cx43上游5′-GGTGGAGAGGGAGGGGATAAGAG-3′,下游5′-CCACCCGCTCATTCACATACAC-3′。GAPDH上游5′-AGAGGCAGGGATGATGTTCTG-3′,下游5′-GACTCATGACCACAGTCCATGC-3′。反转录条件:42 ℃ 15 min→85 ℃ 5 s→4 ℃ 5 min。qRT-PCR反应条件:95 ℃ 1:30→(95 ℃ 5 s→62.5 ℃ 30 s) ×40→65 ℃ 1 s。实验重复3次,根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量并进行统计。

1.4 细胞分组培养及干预

根据1.3中miR-206的表达情况将实验分为miR-206过表达组和抑制表达组,将过表达组分为3个亚组,分别为:转染LV-hsa-miR-206(1569-11)实验组(转染组),转染NC-GFP-LV阴性对照组(阴性转染对照组),未做处理的MCF-7细胞组(正常组)。取对数生长期细胞MCF-7以10^5/孔接种于6孔板内培养12 h,待细胞融合度达30%换新鲜DMEM培养基,加入6×10^8 TU/mL病毒20 μL(MOI为20)转染,12 h后即更换新鲜培养基,96 h后于倒置荧光显微镜下观察,进行后续实验。抑制表达组分为3个亚组,分别为:转染LV-hsa-miR-206-inhibition实验组(转染组),转染NC-GFP-LV阴性对照组(阴性转染对照组),未做处理的MDA-MB-231细胞组(正常组)。取对数生长期细胞MDA-MB-231以10^5/孔接种于6孔板内培养12 h,待细胞汇合度达30%换新鲜DMEM培养基,加入6×10^8 TU/mL病毒10 μL(MOI为10)转染,12 h后即更换新鲜培养基,96 h

后于倒置荧光显微镜下观察,进行后续实验。

1.5 qRT-PCR 检测慢病毒转染后 miR-206 表达

分组同 1.4,转染 96 h 后,按 1.3 实验条件检测各组细胞 miR-206 的表达情况。

1.6 qRT-PCR 检测 Cx43 mRNA 表达

分组同 1.4,取对数生长期的细胞提取细胞总 RNA,按 TaKaRa 说明书操作进行 PCR 反应。实验操作及条件同 1.3。

1.7 Western blot 检测 Cx43 表达

分组同 1.4,用细胞裂解液提取各组细胞上清总蛋白,Bradford 法测浓度。取 50 μg 蛋白行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳转 PCDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 4 h,加 1∶1 000 稀释的兔抗人 Cx43 抗体 37 ℃ 孵育 4 h,TBST 漂洗后加 1∶2 500 稀释的抗兔二抗 37 ℃孵育 2 h 后,加 ECL 显色试剂在暗室中进行曝光和显影。通过对胶片进行扫描,比较各组灰度值变化。实验重复 3 次。

1.8 CCK-8 法检测细胞增殖

分组同 1.4,于转染后 12、24、48、72、96 h 进行 CCK-8 细胞增殖实验。按试剂说明书操作,每组设 5 个复孔,另设 5 个复孔只加 DMEM 培养液和 CCK-8 液做调零孔。通过 Thermo Variockan 多功能读数仪测定波长 450 nm 处光密度值[D(450)]。以检测时间为 X 轴,D(450) 为 Y 轴绘制细胞增殖曲线。实验重复 3 次。根据 CCK-8 结果进行统计学分析。

1.9 Transwell 法检测细胞迁移

分组同 1.4,使用含 0.1% BSA 的无血清 DMEM 培养基混悬、稀释,然后细胞计数,使得细胞数为 1×10^5/mL,分别吸取 200 μL 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室,下室中加入含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱培养 12 h,取出上室,自然风干,多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 2 min,0.1% 结晶紫染色,在光镜下(200 倍) 观察,随机选取 5 个视野的细胞进行计数,结果取均值。实验重复 3 次。

1.10 Transwell 法检测细胞侵袭

分组同 1.4。实验开始前使用预冷的无血清 DMEM 培养基与 Matrigel 基质胶按照 2∶1的比例混合,小心混匀并按 30 μL 每孔加入 Transwell 上层小室中。置于 37 ℃约 1 h 使其凝固,使用含 0.1% BSA 的无血清培养基将细胞混悬、稀释,然后细胞计数,使得细胞数为 1×10^5/mL,分别吸取 200 μL 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室,下室中加入含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱培养 24 h,取出上室,自然风干,多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 2 min,0.1% 结晶紫染色,在光镜下(200 倍) 观察,随机选取 5 个视野的细胞进行计数,结果取均值。实验重复 3 次。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,2 组数据均值比较采用独立样本 t 检验,相关性采用简单相关分析法。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 miR-206 和 Cx43 mRNA 表达

正常乳腺细胞株 MCF-10A 中 miR-206 表达(639.13 ± 13.04)显著高于乳腺癌细胞 MCF-7(1)及 MDA-MB-231(15.54 ± 0.84),而 MDA-MB-231 中 miR-206 表达又显著高于 MCF-7,MDA-MB-231 中 Cx43 mRNA 表达(1)显著低于 MCF-7(7.19 ± 0.64),差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 慢病毒转染效率评价

运用荧光显微镜观察慢病毒转染效率,转染效率均 >80%(图 1)。流式细胞术检测转染效率结果同样显示:MCF-7 细胞与 MDA-MB-231 细胞的转染效率分别为 87% 和 82%。

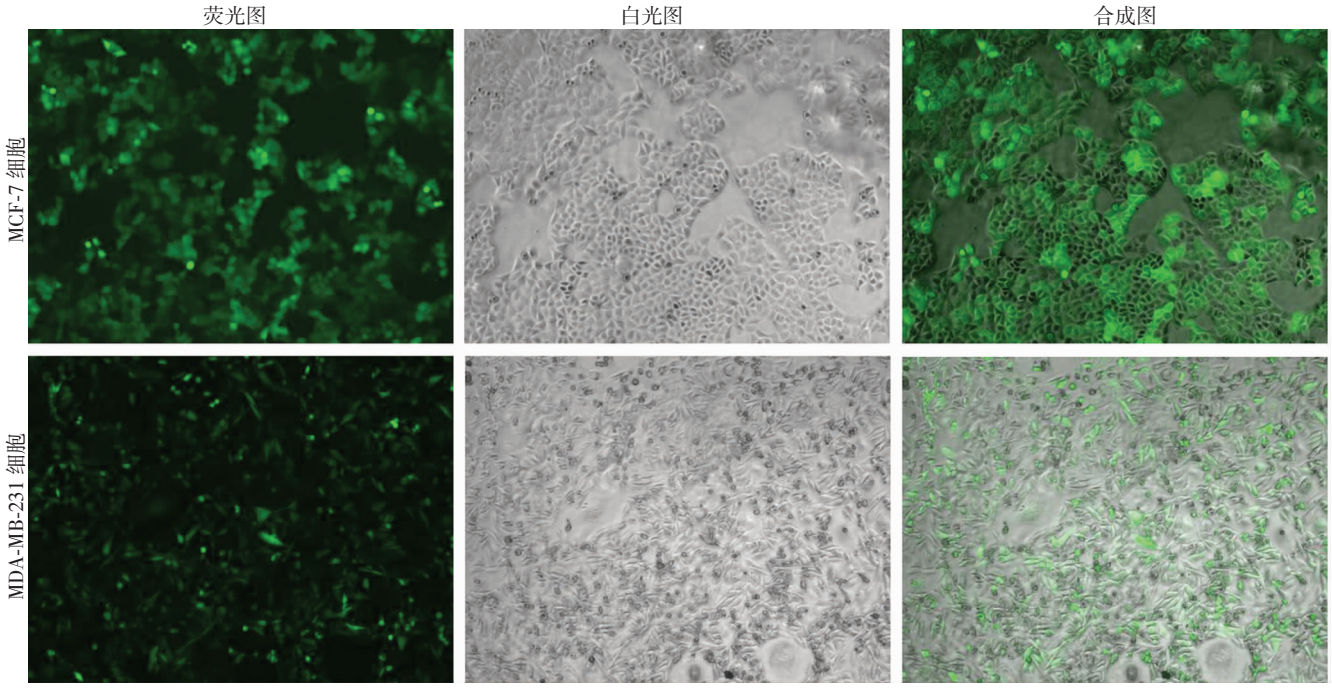


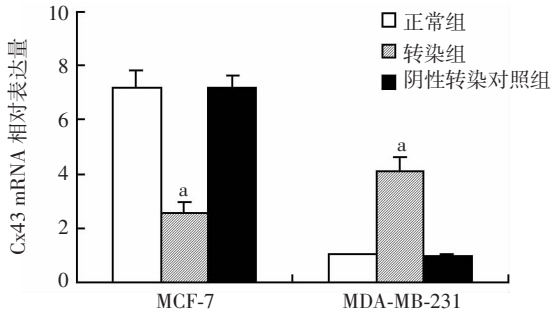
图 1 荧光显微镜观察乳腺癌细胞慢病毒转染情况(×100)

2.3 荧光定量 RT-PCR 检测转染后各组细胞 miR-206 表达

多重比较结果显示:转染后的 MCF-7 细胞 miR-206 表达量由未处理细胞表达量的 1 增加至(120.331 ± 1.801),差异有统计学意义($P<0.05$),而阴性转染对照组表达量与未处理细胞组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。转染后的 MDA-MB-231 细胞 miR-206 表达量由未处理细胞的 1 减少至(0.342 ± 0.037),差异有统计学意义($P<0.05$),而阴性转染对照组表达量与未处理细胞组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 荧光定量 RT-PCR 检测 Cx43mRNA 表达

转染 LV-hsa-miR-206(1569-11)后提高了 miR-206 表达量的 MCF-7 细胞与未处理细胞相比,Cx43 mRNA 表达显著下降($P<0.05$),而阴性转染对照组无明显变化($P>0.05$);转染 LV-hsa-miR-206-inhibition 后降低了 miR-206 表达量的 MDA-MB-231 细胞与未处理细胞相比,Cx43 mRNA 表达显著上升($P<0.05$),阴性转染对照组无明显变化($P>0.05$)。见图 2。



a:$P<0.05$,与对应正常组比较

图 2 荧光定量 RT-PCR 检测干预 miR-206 表达后各组细胞 Cx43 mRNA 表达

2.5 Western blot 检测 Cx43 蛋白表达水平

MCF-7 细胞中 Cx43 蛋白表达量高于 MDA-MB-231 细胞($P<0.05$),MCF-7 细胞转染组相对于正常组和阴性转染对照组 Cx43 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$)。MDA-MB-231 细胞转染组相对于正常组和阴性转染对照组 Cx43 蛋白表达水平明显上升($P<0.05$)。见图 3。

2.6 miR-206 的表达与 Cx43 mRNA 水平以及蛋白表达水平的相关性分析

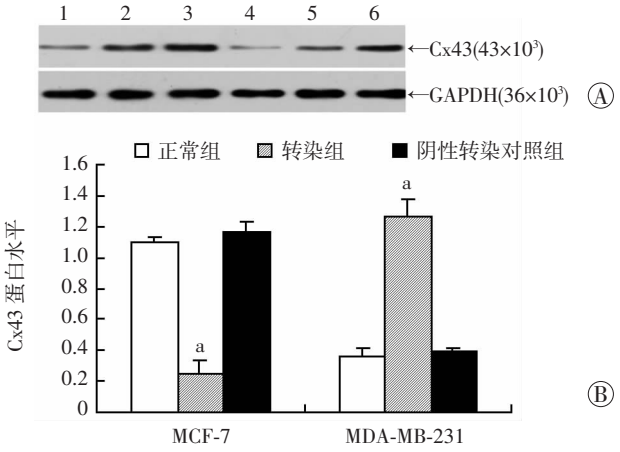
miR-206 表达水平与 Cx43 mRNA 和蛋白表达水平间均存在负相关关系($r=-0.591$,$P=0.043$;$r=-0.724$,$P=0.008$)。

2.7 CCK-8 法检测细胞增殖能力

转染组的 MCF-7 细胞相对于未转染的正常细胞,增殖能力出现了明显下降($P<0.05$)。转染组的 MDA-MB-231 细胞相对于未转染的正常细胞,增殖能力出现了显著上升($P<0.05$)。见图 4。

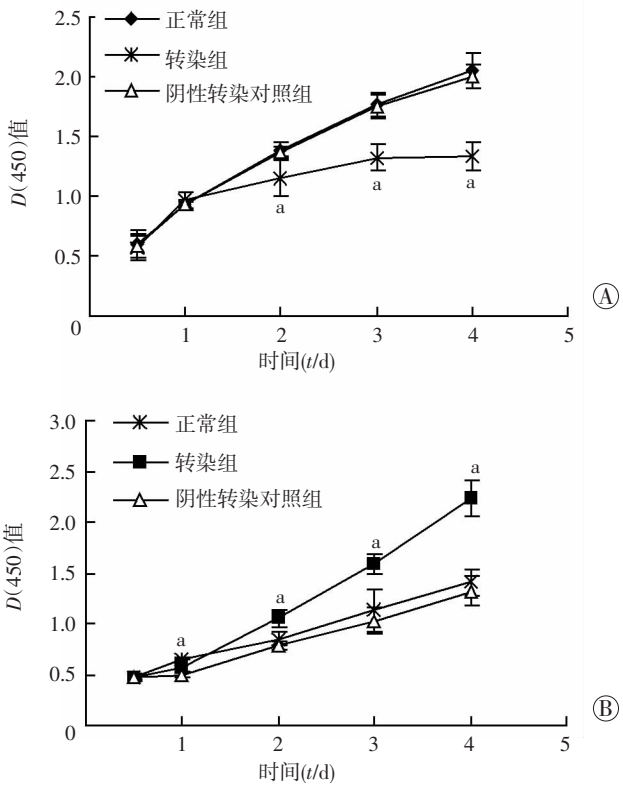
2.8 细胞迁移能力检测

图 5 显示,MCF-7 转染组细胞视野迁移的细胞数为(19.60 ± 3.04)个,显著低于正常组的(43 ± 7.41)个,转染组迁移能力明显降低($P<0.05$)。而 MDA-MB-231 转染组细胞视野迁移的细胞数为(81.80 ± 6.61)个,显著高于正常组的(61.2 ± 5.26)个,转染组迁移能力明显上升($P<0.05$)。



A:Western blot 检测结果 1:MDA-MB-231 正常组;2:MCF-7 正常组;3:MDA-MB-231 转染组;4:MCF-7 转染组;5:MDA-MB-231 阴性转染对照组;6:MCF-7 阴性转染对照组;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与对应正常组比较

图 3 Western blot 检测干预 miR-206 后各组细胞 CX43 蛋白表达



a:$P<0.05$,与正常组比较

A:MCF-7;B:MDA-MB-231

图 4 CCK-8 法检测改变 miR-206 表达后细胞增殖能力的变化

2.9 细胞侵袭能力检测

图 6 显示,MCF-7 转染组穿过 Transwell 小室细胞数(48.20 ± 10.01)显著低于正常组(88.4 ± 7.23),表明提高 miR-206 表达后细胞侵袭能力下降($P<0.05$);MDA-MB-231 转染组穿过 Transwell 小室细胞数(123.00 ± 4.69)显著高于正常组(99 ± 6.24),表明降低 miR-206 表达后细胞侵袭能力上升($P<0.05$)。

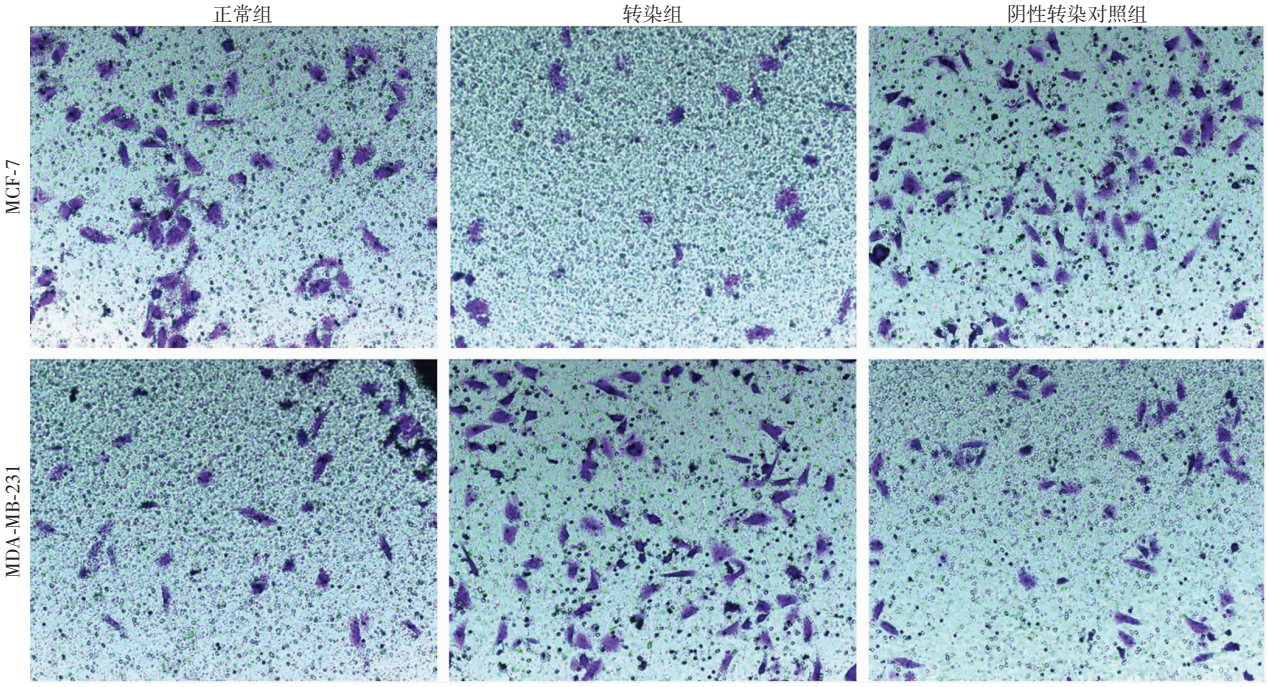


图 5　调控 miR-206 表达后对细胞迁移能力的影响　（结晶紫　×200）

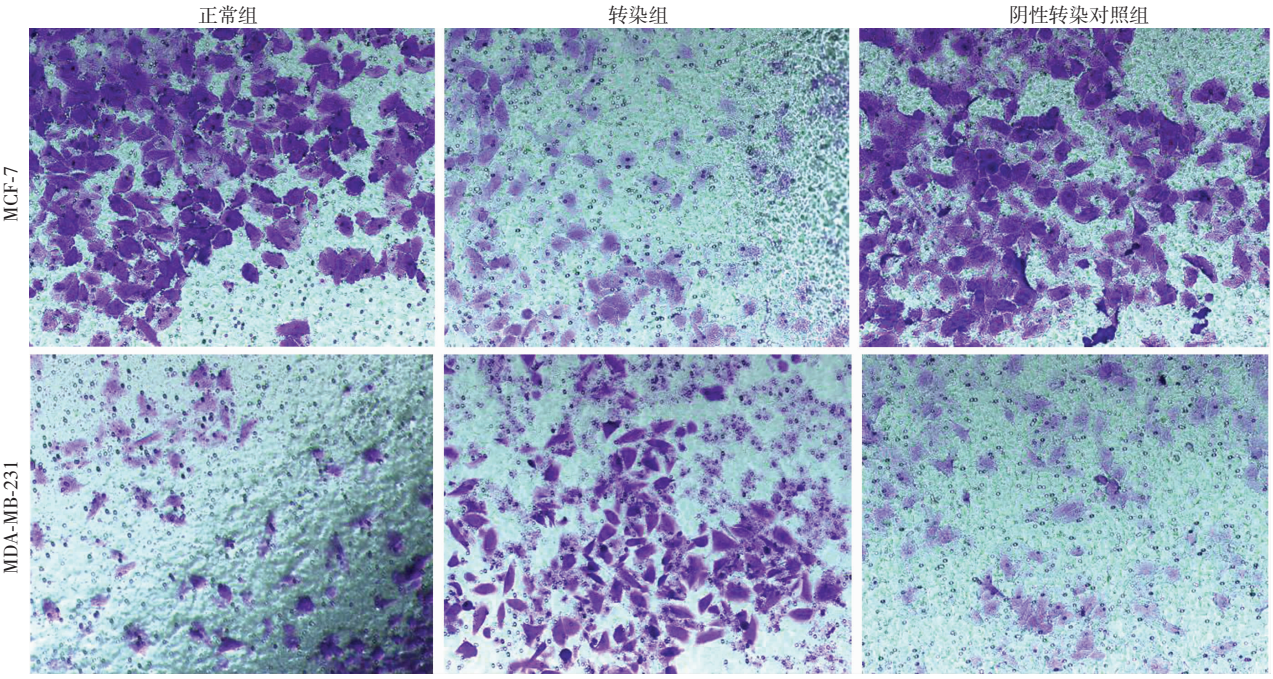


图 6　调控 miR-206 表达后对细胞侵袭能力的影响　（结晶紫　×200）

3　讨论

miRNA 是最大的一类基因表达转录后调控因子，它们通过 5′端的 2～8 个碱基与靶基因的 3′端非翻译区（3′untranslated region，3′UTR）结合，发挥抑制基因翻译和降低蛋白表达的作用，参与了多个生物学过程，包括：细胞周期的调控，细胞的生长、凋亡，细胞分化及细胞应激反应[7]。此外，miRNA 能同时调节致癌和抑癌通路[8]。有研究[9]表明，多种 miRNA 通过多个目的基因 miRNA 与乳腺癌细胞的增殖、侵袭、血管生成和转移均有联系，例如，miR-125 通过 ErBb2、miR-145 通过 RTNK 抑制了乳腺癌的转移[6,10]。

miR-206 基因定位于人染色体 6p12.2，在横纹肌肉瘤、乳腺癌[11]、子宫内膜癌、肺癌中抑制细胞生长并诱导凋亡，发挥抑制肿瘤细胞迁移和侵袭的能力。在动物实验中，在种植了横纹肌肉瘤的小鼠 miR-206 发挥肿瘤抑制因子的作用[12]。有研究[13]观察到在 ERα 阳性的人乳腺癌组织中 miR-206 出现了明显减少，并

且,将 miR-206 转染至人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 能够抑制癌细胞的增长。miR-206 在乳腺癌组织中出现了显著下降,低 miR-206 水平与高临床分期和更短的总生存率密切相关[14]。本实验也发现,正常乳腺细胞 miR-206 表达明显高于乳腺癌细胞。与既有研究结论相符。

但是,一个 miRNA 往往能发挥对多个目的基因的调节作用,为了明确 miR-206 的靶基因,本课题组前期通过两个生物信息学预测软件 TargetScan 和 PicTar 发现 Cx43 可能是 miR-206 的靶基因之一[4]。我们研究了手术切除的正常乳腺组织、乳腺癌原发灶及癌转移淋巴结中的 miR-206 与 Cx43 的表达水平,实验发现,癌转移淋巴结中的 miR-206 的表达水平较乳腺癌原发灶明显降低,而 Cx43 的变化正相反[4]。为了明确 miR-206 是否通过 Cx43 参与了乳腺癌转移的调节,本研究选择乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231。实验发现,在低表达 miR-206 的 MCF-7 细胞中,Cx43 mRNA及蛋白表达高;在高表达 miR-206 的 MDA-MB-231 细胞中,Cx43 mRNA 及蛋白表达低。在干预 miR-206 的表达后,Cx43 的表达也同时出现了与 miR-206 相反的变化,即在过表达 miR-206 后的 MCF-7 细胞中 Cx43 表达降低,在降低 miR-206 表达后的 MDA-MB-231 细胞中 Cx43 表达上升。对 miR-206 和 Cx43 的表达水平进行相关性分析的结果提示两者存在负相关的关系。

miRNA 主要通过影响目的 mRNA 的切割或抑制翻译两种机制行使功能。一般认为,如果 miRNA 与 mRNA 的 3'端非编码区具有完美的互补性,miRNA 就指导 mRNA 特异性切割,即使 mRNA 降解;如果两者没有足够的互补性,则 miRNA 就指导翻译抑制,即只影响蛋白表达水平,不影响 mRNA 的稳定性[15]。在本研究中,miR-206 表达的改变同时影响了 Cx43 的 mRNA 和蛋白的表达水平,表明 miR-206 可能同时通过两种机制调节了 Cx43 的 mRNA 和蛋白水平的表达。

Cx43 还具有介导癌细胞与血管内皮细胞黏附[16]、提高细胞运动等功能[17]。因此,本实验进一步研究了改变 miR-206 后 Cx43 变化的同时,细胞在增殖、迁移等方面的变化。结果发现,在 miR-206 表达水平增高,Cx43 表达水平降低后,细胞增殖能力以及侵袭迁移能力都出现了明显的下降;而在 miR-206 表达水平降低,Cx43 表达水平升高后,细胞增殖能力以及侵袭迁移能力出现了明显的增强。研究结果提示 miR-206 基因可能通过负向调控 Cx43 调节了乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。表明其在乳腺癌的发生、发展及远处转移中可能发生调控作用,其调控机制目前尚未完全清楚。

综上,我们认为 miR-206 可能通过调节 Cx43 的表达调节了乳腺癌细胞的增殖、侵迁移能力。但是,miR-206 对 Cx43 的具体调控机制和结合位点等问题有待在后续的研究中进一步深入探讨。

参考文献:

[1] Park S Y, Lee H E, Li H, *et al*. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(3): 876 – 887.

[2] Villares G J, Dobroff A S, Wang H, *et al*. Overexpression of protease-activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis *via* regulation of connexin 43[J]. Cancer Res, 2009, 69(16): 6730 – 6737.

[3] Gao F H, Wang Q, Wu Y L, *et al*. c-Jun N-terminal kinase mediates AML1-ETO protein-induced connexin-43 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(2): 505 – 511.

[4] 明佳, 范林军, 钟玲,等. 微小RNA206 和连接蛋白43 在乳腺癌原发灶及转移淋巴结中的表达变化关系[J]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2011, 5(1): 38 – 41.

[5] Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: towards development of novel therapeutics[J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 393 – 395.

[6] Yu Z, Baserga R, Chen L, *et al*. microRNA, cell cycle, and human breast cancer[J]. Am J Pathol, 2010, 176(3): 1058 – 1064.

[7] Jovanovic M, Hengartner M O. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for [J]. Oncogene, 2006, 25(46): 6176 – 6187.

[8] Casalini P, Iorio M V. MicroRNAs and future therapeutic applications in cancer[J]. J BUON, 2009, 14(Suppl 1): S17 – S22.

[9] Kasinski A L, Slack F J. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(12): 849 – 864.

[10] Kong Y W, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, *et al*. microRNAs in cancer management[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(6): e249 – e258.

[11] Leivonen S K, Makela R, Ostling P, *et al*. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines[J]. Oncogene, 2009, 28(44): 3926 – 3936.

[12] Taulli R, Bersani F, Foglizzo V, *et al*. The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation[J]. J Clin Invest, 2009, 119(8): 2366 – 2378.

[13] Kondo N, Toyama T, Sugiura H, *et al*. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5004 – 5008.

[14] Li Y, Hong F, Yu Z. Decreased expression of microRNA-206 in breast cancer and its association with disease characteristics and patient survival[J]. J Int Med Res, 2013, 41(3): 596 – 602.

[15] Kumar M S, Lu J, Mercer K L, *et al*. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis [J]. Nature Genet, 2007, 39(5): 673 – 677.

[16] Cotrina M L, Lin J H, Nedergaard M. Adhesive properties of connexin hemichannels[J]. Glia, 2008, 56(16): 1791 – 1798.

[17] Behrens J, Kameritsch P, Wallner S, *et al*. The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner[J]. Eur J Cell Biol, 2010, 89(11): 828 – 838.

(**收稿**:2013-09-23;**修回**:2013-11-03)

(编辑　汪勤俭)