论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201410121

miR-335对MDA-MB-231乳腺癌细胞生物学特性的影响

伍家燕,高 月,曾 帆,李海玉,樊建军,李 韵,张寒韬,刘革力,宋方洲 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院分子肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 检测 microRNA-335(miR-335)在乳腺癌细胞系 BT474、T47D、MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231 和正常乳腺细胞系 MCF-10A 中的表达以及在原发性乳腺癌和淋巴结转移性乳腺癌中的表达,进一步研究 miR-335 对 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡及迁移能力的影响。**方法** 采用荧光实时定量 PCR 检测 miR-335 在乳腺癌细胞系 BT474、T47D、MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231 和正常乳腺细胞系 MCF-10A 中的表达,以及在原发性乳腺癌和淋巴结转移性乳腺癌中的表达。体外培养 MDA-MB-231 细胞并将其分3组,分别为 miR-335 组、阴性对照组和空白对照组。miR-335 组转染 miR-335 模拟物(has-miR-335 mimics),阴性对照组转染阴性对照序列(negative control,NC),空白对照组细胞不行任何转染。通过 MTT 实验检测过表达 miR-335 对细胞增殖能力的影响;流式细胞仪检测过表达 miR-335 对细胞凋亡的影响;Transwell 实验检测对细胞迁移能力的影响。Western blot 检测 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达。**结果** 各乳腺癌细胞系中 miR-335 表达水平均低于乳腺正常上皮细胞系 MCF-10A, MDA-MB-231 细胞中最低($P<0.01$)。在随机配对的10例原发性乳腺癌和10例淋巴结转移性乳腺癌标本中,有7例淋巴结转移性乳腺癌中 MiR-335 的表达低于对应的原发性乳腺癌($P<0.05$)。过表达 miR-335 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖、凋亡无明显影响($P>0.05$),但能显著抑制细胞的迁移能力($P<0.05$)。Western blot 结果显示:miR-335 组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量均低于阴性对照组和空白对照组。**结论** miR-335 在高转移性乳腺癌细胞系和淋巴结转移性乳腺癌组织中明显低表达,过表达 miR-335 对 MDA-MB-231 细胞的增殖、凋亡无明显影响,但抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移能力。miR-335 可能通过下调 MMP2 和 MMP9 的表达从而抑制 MDA-MB-231 细胞迁移。

[关键词] miR-335;乳腺肿瘤;细胞增殖;细胞迁移

[中图法分类号] R394.2;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

Effect of miR-335 on biological behavior of breast cancer MDA-MB-231 cells

Wu Jiayan, Gao Yue, Zeng Fan, Li Haiyu, Fan Jianjun, Li Yun, Zhang Hantao, Liu Geli, Song Fangzhou (Molecular Medicine and Tumor Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of miR-335 in breast cancer cells (BT474, T47D, MCF-7, SK-BR-3, and MDA-MB-231) and normal breast cells (MCF-10A) and in primary breast cancer and lymph node metastatic breast cancer, and investigate the effect of miR-335 on the proliferation, apoptosis, and migration of MDA-MB-231 cells. **Methods** MDA-MB-231 cells were divided into 3 groups: a miR-335 group (transfected with miR-335 mimics), a control group (transfected with negative control) and a blank group (non-transfected). The expression of miR-335 in normal breast cells and breast cancer cells was detected by real-time PCR. MTT assay was performed to observe the proliferation ability. The effect of over-expression of miR-335 on cell apoptosis was determined by flow cytometry. Transwell chamber assay was

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20125503110012)

[通信作者] 宋方洲,E-mail: fzsongcq@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150505.1356.001.html(2015-05-05)

carried out to investigate the effect of miR-335 on migration of MDA-MB-231 cells. The expression of MMP-2 and MMP-9 was detected by Western blotting. **Results** The level of miR-335 in the breast cancer cells, especially, MDA-MB-231 cells, was lower than that in the normal breast cells ($P<0.01$). In the tissues of randomly paired primary breast cancer (10 cases) and lymph node metastatic breast cancer (10 cases), the expression of miR-335 in 7 cases of lymph node metastatic breast cancer was lower than that in the corresponding primary breast cancer ($P<0.05$). Over-expression of miR-335 had no significant effect on the proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 cells ($P>0.05$), but could significantly inhibit the cell migration ($P<0.05$). Western blot results showed that the protein levels of MMP-2 and MMP-9 in the miR-335 group were lower than those in the control group and the blank group. **Conclusion** The expression of miR-335 is particularly reduced in the MDA-MB-231 cells and in the lymph node metastatic breast cancer tissues. The over-expression of miR-335 markedly inhibits the migration of MDA-MB-231 cells, but has no effect on the cell proliferation and apoptosis. MiR-335 inhibits the migration of MDA-MB-231 cells through down-regulating the levels of MMP-2 and MMP-9.

[**Key words**] miR-335; breast neoplasms; cell proliferation; cell migration

Supported by the Specialized Research Fund for Doctoral Program of Colleges and Universities (20125503110012). Corresponding author: Song Fangzhou, E-mail: fzsongcq@163.com

乳腺癌是危及女性身心健康的恶性肿瘤之一,发病率占各种恶性肿瘤的7%~10%。调查数据显示,全球每年有120万女性罹患乳腺癌,且有50万人死于此病[1]。乳腺癌发生远端转移是乳腺癌患者主要的致死原因,但乳腺癌转移的具体机制目前尚未明确。

miRNA是一类长度为18~24个核苷酸的内源性非编码单链小分子RNA,它们参与了人类基因组中约1/3左右基因的表达调控。在细胞增殖、分化、凋亡,应激反应,新陈代谢等多种生命过程中发挥着重要作用[2]。近50%已知的miRNAs位于与肿瘤相关的基因区域/脆性位点,提示miRNA可作为致癌或抑癌基因而发挥促癌或抑癌作用[3]。miRNA在乳腺癌中参与肿瘤细胞的生长、凋亡、迁移、侵袭等肿瘤发生、发展过程,进而实现对乳腺癌转移的调控。最近研究发现microRNA-335(miR-335)在结肠癌、儿童急性粒细胞性白血病及星形细胞瘤中呈现高表达[4-6],而在乳腺癌、胃癌中miR-335是低表达的[7-8]。这说明miR-335在不同的肿瘤中发挥着不同的作用。为了探讨miR-335在乳腺癌中的具体作用机制,本研究利用荧光实时定量PCR检测miR-335在乳腺癌细胞系和正常乳腺细胞系中的表达。进一步利用miR-335模拟物(mimics)转染MDA-MB-231细胞,观察其对该细胞增殖、凋亡及迁移能力的影响,并探讨miR-335可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

各乳腺癌细胞株与人乳腺正常上皮细胞MCF-10A均来源于ATCC并由本实验室保存。20例原发性及淋巴结转移的乳腺癌组织均来源于重庆市肿瘤医院。DMEM培养基、DMEM/F12培养基、OPTI-MEM培养基及胎牛血清(Gibco公司,美国),马血清(Invitrogen公司,美国),氢化可的松、生长因子(EGF)及胰岛素(Invitrogen公司,美国),霍乱毒素(Sigma公司,美国),青链霉素(碧云天公司,上海)。RNA抽提试剂(TRIzol,TaKaRa公司,日本)。miR-335 mimics和对照mimics control由上海吉玛公司合成。Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国)。Transwell小室(Costar公司,美国)。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐、二甲基亚砜(DMSO)、结晶紫(台盼蓝)染液(Sigma公司,美国),SYBRGreen PCR Master Mix(TOYOBO公司,日本)。蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒和ECL发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人MMP-2和MMP-9多克隆抗体购自Abcam公司;HRP标记的山羊抗兔IgG抗体、兔抗人β-actin多克隆抗体IgG购自北京中杉生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231采用含10% FBS高糖DMEM培养基;SKBR-3、T47D和BT-474采用含10% FBS的RPMI1640培养基;MCF-10A采用DMEM/F12含5%马血清、10 μg/mL胰岛素、20 ng/mL EGF、100 ng/mL霍乱毒素、0.5 μg/mL氢化可的松培养基,37 ℃、5% CO_2及相对湿度条件下培养。

1.2.2 细胞RNA提取 收集5×10^6细胞,加入1 mL TRIzol重悬并反复吹打使细胞充分裂解,以备抽提RNA使用。每1毫升TRIzol加入200 μL氯仿,剧烈震荡混匀30 s,室温静置15 min,4 ℃下12 000×*g*离心15 min。小心转移上层水相于另一RNase free EP中,加入500 μL异丙醇轻柔地颠倒混匀,室温静置10 min。4 ℃下12 000×*g*离心20 min,弃上清液,加入1 mL 80%乙醇洗涤,4 ℃下12 000×*g*离心20 min弃上清。超净台下风干。加入适量DEPC水溶解,分光光度计测定浓度,1%琼脂糖电泳检测RNA完整性后于-80 ℃保存备用。

1.2.3 组织RNA提取 临床收集液氮冻存的20例原发性及淋巴结转移的乳腺癌组织,放入研钵中,加入液氮研磨,每50 mg组织加入1 mL TRIzol,转入RNase free EP管。12 000×*g*离心5 min,弃沉淀。每1 mL TRIzol加入200 μL氯仿,剧烈震荡混匀30 s,室温静置15 min,4 ℃下12 000×*g*离心15 min。小心转移上层水相于另一RNase free EP中,加入500 μL异丙醇轻柔地颠倒混匀,室温静置10 min。4 ℃下12 000×*g*离心20 min,弃上清液,加入1 mL 80%乙醇洗涤,4 ℃下12 000×*g*离心20 min弃上清。超净台下风干。加入适量DEPC水溶解,分光光度计测定浓度,1%琼脂糖电泳检测RNA完整性后,于-80 ℃保存备用。

1.2.4 反转录-实时荧光定量PCR miRNA的反转录-实时定量多聚酶链反应(qRT-PCR)采用茎环法。miR-335的反转录引物为5′-GTCGTATCCAGTGCA-GGGTCCGAGGTGCACTGGATACGACTCAACATC-3′,荧光定量PCR miR-335的上游引物为5′-TAGCTTAT-CAGACTG-A-3′,下游引物为5′-CCAGTGCAGGGTC-CGAGGT-3′。将抽提的RNA进行反转录,实时定量PCR采用SYBR Green PCR Master Mix(Toybo公司,日本)和96孔荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司,美国)。采用U6 RNA作为内参。每个样本重复3次实验后得到的数据,通过比较CT值法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)进行相对定量分析。

1.2.5 细胞转染 对数生长期MDA-MB-231细胞于转染前24 h接种于6孔板中(3×10^5/孔),培养至细胞达60%融合度时进行细胞转染。按照Invitrogen公司的操作说明将100 pmol miR-335-mimics转染到MDA-MB-231细胞中,转染mimics control组为阴性对照。37 ℃、5% CO_2培养箱中继续培养进行相关检测。

1.2.6 MTT实验 转染后24 h,将细胞以每孔1×10^4的密度接种于96孔板中,每组4个复孔,于不同时间点即1、2、3、4、5、6、7 d,每孔加MTT 20 μL(5 mg/mL),置37 ℃、5% CO_2孵箱继续培养4 h。取出培养板,轻轻吸去上清液,每孔加100 μL DMSO终止反应并溶解甲赞蓝紫色颗粒,震荡混匀,分光光度计测各孔*D*(490)值,计算平均值。实验重复3次。

1.2.7 细胞凋亡实验 MDA-MB-231细胞转染48 h后收集,用PBS悬浮细胞,1 000 r/min离心5 min;重复3次,弃上清培养基;最后加入1 mL PBS混匀并转移至1.5 mL EP管中,加入5 μL Annexin-FITC,轻轻振荡混匀后于4 ℃下孵育15 min,之后加入5 μL碘化丙啶(PI),4 ℃下孵育5 min,流式细胞仪上进行检测并分析细胞凋亡情况。

1.2.8 Transwell迁移实验 每个处理组细胞浓度为1×10^4/mL,每个Transwell小室加入200 μL细胞悬液,下室加入600 μL条件培养基(含有10% FBS),置于37℃、5% CO_2培养箱培养。每个处理组设3个复孔。培养24 h后取出Transwell小室,吸弃小室内的液体,用棉签擦除里面的细胞,并用PBS轻轻洗掉里面剩余细胞。用4%多聚甲醛固定Transwell小室反面的细胞30 min。放入结晶紫染液中,染色15 min。200倍镜下观察并拍照,随机选取3个视野计数,取均数作为透膜细胞数。

1.2.9 Western blot检测MMP-2和MMP-9蛋白的表达 MDA-MB-231细胞经转染处理48 h后,收集各组细胞,提取蛋白,BCA法定量。取40 μg蛋白样品,经SDS-PAGE分离后,电转移至PVDF膜上,经5%脱脂奶粉室温封闭2 h;加入兔抗人MMP-2(1∶1 000稀释)抗体,相对分子质量74×10^3,MMP-9(1∶1 000稀释)抗体,相对分子质量92×10^3,兔抗人β-actin多克隆抗体(1∶1 000),相对分子质量43×10^3。4 ℃过夜,TBST洗膜3次,再分别与HRP标记的山羊抗兔二抗(1∶3 000)室温孵育2 h,ECL化学发光。

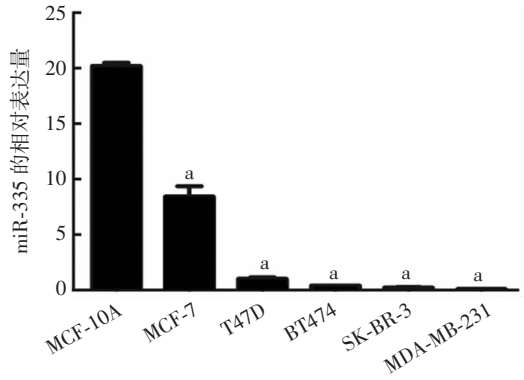
1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,多组均数比较采用单因素方差分析,2组均数比较采用配对*t*检验。

2 结果

2.1 miR-335在乳腺癌细胞系和正常乳腺细胞系中的表达

乳腺癌细胞系BT474、T47D、MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231中miR-335表达水平低于乳腺正常上皮细胞系MCF-10A,在MDA-MB-231细胞中表达最低($P<0.01$,图1)。



a:$P<0.01$,与正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 比较

图 1　qRT-PCR 检测 miR-335 在乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞中的表达

2.2　miR-335 在原发性及淋巴结转移的乳腺癌组织中的表达

对提取的 10 对原发性及淋巴结转移的乳腺癌组织 RNA 随机配对进行荧光实时定量 PCR,检测结果显示淋巴结转移性乳腺癌组织中 miR-335 表达水平(1.139 ± 0.052)低于原发性乳腺癌组织(3.318 ± 0.088,$P<0.05$)。

2.3　实时定量 PCR 验证转染效果

为确定 miR-335-mimics 是否成功转染 MDA-MB-231 细胞,在转染 24 h 后,用荧光实时定量 PCR 相对定量的方法检测 miR-335 的表达,结果发现 miR-335-mimics 转染组 miR-335 的表达较2 个对照组明显升高[(124.710 ±6.493) *vs* (1.039 ±0.189)、(1.163 ±0.115),$P<0.01$],该结果表明瞬时转染成功,后继实验可以采用 miR-335-mimics 转染 24 h 的细胞进行分析。

2.4　miR-335 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响

与空白对照组和阴性对照组相比,miR-335 组的 MDA-MB-231 细胞增殖能力没有发生明显变化($P>0.05$,图 2)。

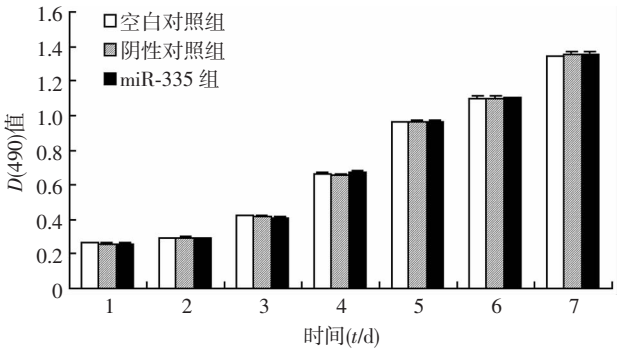
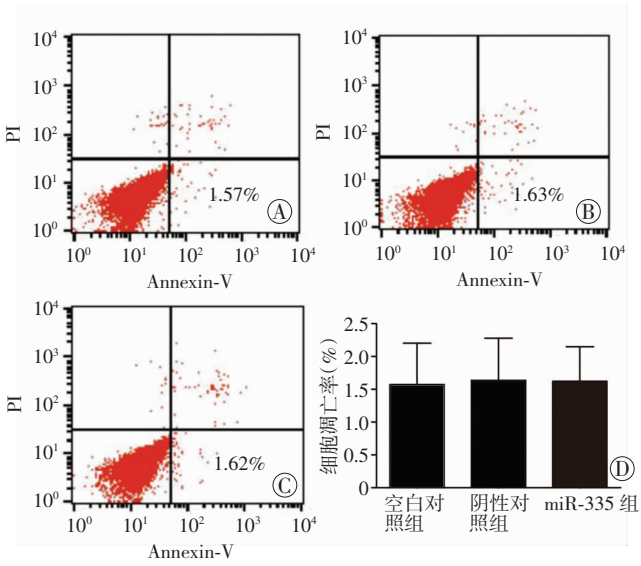


图 2　MTT 检测过表达 miR-335 对 MDA-MB-231 细胞增殖功能的影响

2.5　miR-335 对 MAD-MB-231 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示:与空白对照组和阴性对照组比较,miR-335 组的 MDA-MB-231 细胞凋亡率没有发生明显变化($P>0.05$,图 3)。

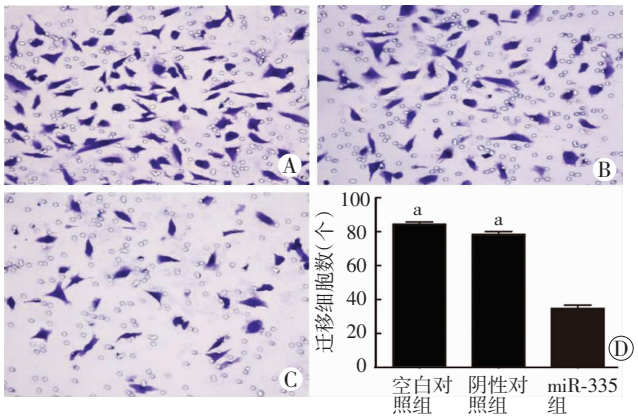


A:空白对照组;B:阴性对照组;C:miR-335 组;D:细胞凋亡率分析

图 3　流式细胞仪检测过表达 miR-335 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

2.6　miR-335 对 MAD-MB-231 细胞迁移能力的影响

MDA-MB-231 细胞转染 miR-335 mimics 后 24 h,细胞穿过小室聚碳酸酯膜的数目(34.7 ± 3.5)明显低于阴性对照组 (84.3 ± 2.5)和空白对照组(78.3 ± 3.1,$P<0.05$,图 4)。

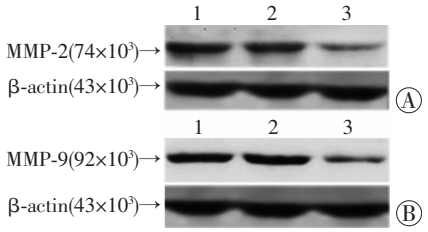


A:空白对照组;B:阴性对照组;C: miR-335 组;D:穿膜数分析　a:$P<0.05$,与 miR-335 组比较

图 4　Transwell 迁移实验观察 miR-335 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响

2.7 过表达 miR-335 对 MAD-MB-231 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示：miR-335 组 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达明显低于阴性对照组和空白对照组（图5）。



1：空白对照组；2：阴性对照组；3：miR-335 组

图5 Western blot 检测各组细胞 MMP-2（A）、MMP-9（B）表达

3 讨论

miRNA 是目前哺乳动物细胞研究最成熟的非编码 RNA，是近几年来分子生物学领域的又一个研究热点。miRNA 对靶基因的调控主要通过与其 mRNA 3′ UTRs（untranslated regions）区近乎完全互补结合后在转录后水平使其降解，或者与之不完全互补结合在翻译水平抑制蛋白合成，在细胞增殖、分化、凋亡、应激反应、新陈代谢等许多生命过程中发挥着重要作用。这些进程的失调通常发生在肿瘤中，与致癌关系密切。第一个被发现 miRNAs 与肿瘤相关的是在 B 细胞慢性淋巴白血病中染色体 13q14.3 的异位诱导缺失[9]。miR-15a 和 miR-16-1 在此位点的丢失导致了抗凋亡基因 Bcl-2 的高表达。大量的研究证明异常的 miRNA 存在人类肿瘤中，包括乳腺癌。如 miR-196 和 miR-10a 位于同源异形框与乳腺癌的发展和致癌有关[10]。miR-125b 在乳腺癌中低表达，位于染色体 11q23-24，其中一个区域在乳腺癌、卵巢癌、肺癌中经常发生丢失[11]。

乳腺癌转移相关 miRNA 的发现，为我们研究乳腺癌转移提供了新的思路。Ma 等[12]最早发现 miR-10b 在乳腺癌中具有侵袭和转移的作用，miR-10b 可通过抑制转录因子 homeoboxD10（HOXD10）的翻译，引发转移基因 ras homologue gene family member C（RHOC）的表达，其能够促进肿瘤细胞的侵袭和迁移。Wu 等[13]发现 miR-340 在侵袭转移能力强的乳腺癌细胞系中表达下调，诱导 miR-340 的表达能够抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。近年来研究发现 miR-335 在不同的肿瘤中发挥着不同的作用，miR-335 在乳腺癌、胃癌中低表达[7-8]，而在星形细胞瘤、非小细胞肺癌中 miR-335 高表达，并能促进肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力[4, 6, 14]。本研究在乳腺癌细胞水平对 miR-335 进行荧光实时定量 PCR 检测，结果发现 miR-335 在所选的乳腺癌细胞株中均呈低表达，尤其是高转移性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中表达更低，与文献[7]报道一致。为了进一步验证 miR-335 在乳腺癌中的表达情况，本研究收集了 20 例原发性乳腺癌和淋巴结转移性乳腺癌临床组织标本，采用荧光实时定量 PCR 检测 miR-335 的表达，结果发现 20 例随机配对标本中有 7 例淋巴结转移性乳腺癌中 miR-335 的表达低于原发性乳腺癌。因此推测 miR-335 可能在乳腺癌中发挥类似抑癌基因的作用，尤其与乳腺癌的转移有关。进一步在低表达 miR-335 的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 过表达 miR-335，通过细胞增殖、细胞凋亡和迁移实验探讨 miR-335 对乳腺癌细胞的生物学行为的影响。结果显示：过表达 miR-335 对 MDA-MB-231 细胞的增殖能力与对照组相比无明显变化，对细胞凋亡也没有明显的影响，但对 MDA-MB-231 细胞的迁移能力却起到了明显抑制作用。有研究已证实 Sp1、Bcl-w 是胃癌中 miR-335 发挥作用的靶基因。高表达的 Bcl-w 与胃癌的浸润显著相关[15]，Bcl-w 可以通过激活 PI3K/Akt 传导通路来促进胃癌细胞浸润。而 miR-335 不仅可以直接抑制 Sp1 的表达，而且还可以通过抑制 Bcl-w 的表达来抑制其介导的 PI3K-Akt-Sp1 通路抑制 Sp1 的表达，进而达到抑制胃癌细胞侵袭转移的目的。2008 年 Tavazoie 等[7]在对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 研究中发现 miR-335 通过作用于转录因子 SOX4 和细胞外基质成分 tenascin C（TNC）来抑制肿瘤的迁徙和转移。转录因子 SOX4 则是通过与 Wnt 信号通路、TGF-β、Notch、Hedgehog、P53 及自身的转录因子作用等途径综合调控特定靶基因的表达，在细胞的发育和迁移等方面发挥重要的作用[16]。基质金属蛋白酶（MMPs）家族是一种与肿瘤侵袭和转移密切相关的蛋白酶，尤其是胶原酶（MMP-2）和明胶酶（MMP-9）与之关系最为密切[17]。被激活后一方面降解、破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质和基底膜，使瘤细胞沿着缺失的基底膜向周围组织浸润，促进肿瘤侵袭和转移；另一方面则通过毛细血管内生、新生血管生成等促进肿瘤侵袭和转移[18-19]。研究表明，MMP-2 和 MMP-9 在星形细胞瘤、肺癌、肾细胞癌及乳腺癌等多种肿瘤中高表达，在恶性肿瘤的浸润和转移中起到重要作用。本研究发现过表达 miR-335 后 MMP-2 和 MMP-9 的表达在蛋白水平均

下降,我们推测 miR-335 抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移能力与下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达有关,但 miR-335 直接靶定 MMP-2 和 MMP-9 还是通过靶定其他基因后引起 MMP-2 和 MMP-9 的表达下调还需进一步探索。

本研究初步探明了 miR-335 对乳腺癌生物学行为的影响,为临床治疗乳腺癌开辟了新的方案并奠定了理论基础。深入透彻地研究 miR-335 在乳腺癌中作用机制,将使 miR-335 有望成为诊断乳腺癌发生转移的新的生物学指标和治疗靶点。有关 miR-335 对乳腺癌迁移的具体作用机制,本课题组仍在进一步研究。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71 - 96.

[2] Lee J W, Choi C H, Choi J J, *et al*. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (9): 2535 - 2542.

[3] Bosco N, Pelliccia F, Rocchi A. Characterization of FRA7B, a human common fragile site mapped at the 7p chromosome terminal region [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 202 (1): 47 - 52.

[4] Vickers M M, Bar J, Gorn-Hondermann I, *et al*. Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer: potential role as markers of metastatic disease[J]. Clin Exp Metastasis, 2012, 29(2): 123 - 132.

[5] 罗学群, 徐令, 柯志勇, 等. 儿童急性粒细胞白血病及其亚型的微小 RNA 表达[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33 (11): 831 - 835.

[6] Shu M, Zheng X, Wu S, *et al*. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells [J]. Mol Cancer, 2011, 10: 59.

[7] Tavazoie S F, Alarcon C, Oskarsson T, *et al*. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Natuer, 2008, 451(7175): 147 - 152.

[8] Xu Y, Zhao F, Wang Z, *et al*. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1 [J]. Oncogene, 2012, 31(11): 1398 - 1407.

[9] Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, *et al*. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24): 15524 - 15529.

[10] Makiyama K, Hamada J, Takada M, *et al*. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma[J]. Oncol Rep, 2005, 13(4): 673 - 679.

[11] Negrini M, Rasio D, Hampton G M, *et al*. Definition and refinement of chromosome 11 regions of loss of heterozygosity in breast cancer : identification of a new region at 11q23.3 [J]. Cancer Res, 1995, 55(14): 3003 - 3007.

[12] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [J]. Nature, 2007, 449 (7163) : 682 - 688.

[13] Wu Z S, Wu Q, Wang C Q, *et al*. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met[J]. Cancer, 2011, 117(13): 2842 - 2852.

[14] 王鹤, 刘志利, 德伟, 等. microRNA-335 对人非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 32(6): 795 - 799.

[15] Lee H W, Lee S S, Lee S J, *et al*. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation [J]. Cancer Res, 2003, 63(5): 1093 - 1100.

[16] Scharer C D, McCabe C D, Ali-Seyed M, *et al*. Genome-wide promoter analysis of the SOX4 transcriptional network in prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 709 - 717.

[17] Arvelo F, Cotte C. Metalloproteinases in tumor progression. Review [J]. Invest Clin, 2006, 47(2): 185 - 205.

[18] Decock J, Hendrickx W, Drijkoningen M, *et al*. Matrix metalloproteinase expression patterns in luminal A type breast carcinomas [J]. Dis Markers, 2007, 23(3): 189 - 196.

[19] Kim H J, Park C I, Park BW , *et al*. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast [J]. Yonsei Med J, 2006, 47(3): 333 - 342.

(**收稿**:2014-10-21;**修回**:2014-12-21)

(编辑 郭建秀)