

miR-34c逆转乳腺癌耐药细胞株MCF-7/DOX 耐药性的研究

刘 浩 贺智敏*

(广州医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 广州 510095)

摘要 miR-34在肿瘤发生发展中起着至关重要的作用, 然而, miR-34在肿瘤耐药中的作用研究不多。该研究将合成的miR-34c成熟序列转染乳腺癌阿霉素(doxorubicin, DOX)耐药细胞MCF-7/DOX, 探讨miR-34c体外逆转MCF-7/DOX细胞耐药性作用及其可能的机制。采用Real-time RT-PCR检测miR-34c在乳腺癌耐药细胞株MCF-7/DOX中的表达, MTS法检测miR-34c对MCF-7/DOX细胞阿霉素耐药性的影响, 流式细胞术检测miR-34c对MCF-7/DOX细胞周期和凋亡的影响, Real-time RT-PCR和Western blot法检测多药耐药相关蛋白MDR、MRP以及细胞周期与凋亡相关蛋白Bcl-2、E2F3的表达。结果显示, miR-34c在乳腺癌MCF-7/DOX耐药细胞中低表达, 转染miR-34c可明显增加耐药细胞对阿霉素的敏感性; 流式分析发现, miR-34c可以促进耐药细胞G₂期细胞周期阻滞和凋亡; 与对照组相比较, miR-34c转染组细胞MDR、MRP蛋白表达无明显变化, 而Bcl-2、E2F3 mRNA和蛋白表达均明显下调。研究表明, miR-34c直接靶向抑制Bcl-2和E2F3的表达, 诱导细胞周期G₂期阻滞和凋亡, 进而增强MCF-7/DOX耐药细胞对阿霉素的敏感性。

关键词 miR-34c; 乳腺癌; 耐药; 细胞周期阻滞和凋亡

The Reversing and Molecular Mechanisms of miR-34c on the MCF-7/DOX Cells with Doxorubicin-Resistance

Liu Hao, He Zhimin*

(Cancer Hospital and Cancer Research Institute, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

Abstract miR-34 played an important role in tumor development and progress, but there were few studies on the function of miR-34 in drug resistance. To elucidate the function and mechanism of exogenous miR-34c involved in drug resistance in the breast cancer cells, miR-34c mimics were used to transfect into MCF-7/DOX cells with doxorubicin-resistance. The expression of miR-34c was analyzed by Real-time RT-PCR. Cell viability was analyzed by MTS assay. Cell cycle distribution and apoptosis were detected by PI and Annexin V/PI staining, respectively. The expressions of the drug-resistant related protein MDR and MRP, and cell proliferation and apoptosis related protein Bcl-2 and E2F3 were analyzed by Real-time RT-PCR and Western blot. Our results showed that miR-34c was significantly down-regulated in MCF-7/DOX cells, and overexpression of miR-34c increased sensitivity to doxorubicin in MCF-7/DOX cells. Flow cytometry analysis showed that miR-34c could induce G₂ cell cycle arrest and cell apoptosis. Furthermore, miR-34c did not affect the expression of MDR and MRP, but sig-

收稿日期: 2014-09-24 接受日期: 2014-12-10

国家自然科学基金(批准号: 81402497)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-66673666-2014, E-mail: hezhimin2005@yahoo.com

Received: September 24, 2014 Accepted: December 10, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81402497)

*Corresponding author. Tel: +86-20-66673666-2014, E-mail: hezhimin2005@yahoo.com

网络出版时间: 2015-01-30 16:23 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150130.1623.004.html>

nificantly inhibited the mRNA and protein expression of Bcl-2 and E2F3. Our results suggested that miR-34c could directly target and inhibit Bcl-2 and E2F3 expression, and induced G₂ cell cycle arrest and apoptosis, which in turn increased sensitivity to doxorubicin in MCF-7/DOX cells.

Keywords miR-34c; breast cancer; drug-resistance; cell cycle arrest and apoptosis

乳腺癌是一类严重危害妇女健康的恶性肿瘤,其全球发病率居女性恶性肿瘤之首^[1]。我国女性乳腺癌发病率逐年升高,并有逐步年轻化的趋势^[2]。目前,化疗仍是乳腺癌临床治疗的主要方法之一,然而因化疗耐药导致的肿瘤复发和转移严重限制着乳腺癌的临床治疗效果。

MicroRNA(miRNA)是一段长19~25 bp的单链RNA分子,可通过不完全配对与靶标mRNA 3'-非翻译区(3'-UTR)结合,在转录后水平对基因的表达进行调控,导致目的mRNA的降解或蛋白质翻译抑制。miRNAs参与细胞的分化、增殖和凋亡等多种生物学进程^[3]。近年来的研究表明,miRNA在多种肿瘤中存在异常表达,并且在肿瘤的增殖、分化、侵袭转移和治疗中扮演了重要的角色^[4]。miR-34是一个保守的miRNA家族,由miR-34a、miR-34b和miR-34c三个同源的miRNA分子组成^[5]。临床研究发现,miR-34在肺癌、肝癌、乳腺癌和结肠癌等多种肿瘤中低表达,被认为是肿瘤发生的一个普遍事件^[6-10]。然而,miR-34在乳腺癌耐药性中的作用研究不多。

在本研究中,我们发现,miR-34c在乳腺癌阿霉素(doxorubicin, DOX)耐药细胞MCF-7/DOX中低表达,过表达miR-34c可以逆转MCF-7/DOX的耐药性,抑制细胞增殖并促进凋亡。我们的结果说明,miR-34c可通过调控增殖与凋亡相关蛋白表达而逆转乳腺癌的阿霉素耐药作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳腺癌MCF-7细胞及MCF-7/DOX耐药细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。DMEM培养基、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)、胰蛋白酶购自Gibco公司;转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司;ECL化学发光底物试剂盒购自Pierce公司;Quick Start Bradford蛋白定量试剂购自Bio-Rad公司;Primescript RT reagent Kit反转录试剂盒和SYBR Premix Ex Tap™试剂盒购自TaKaRa公司;

MTS购自Promega公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自碧云天生物技术研究。miR-34c抑制剂(anti-miR-34c)、miR-34c成熟序列(miR-34c mimics)和阴性对照(negative control, NC)购自上海吉玛制药技术有限公司。MDR、MPR、E2F3、 β -actin抗体购自Santa Cruz公司;Bcl-2、Snail抗体购自CST公司;预染蛋白质Marker购自Fermentas公司;HRP标记山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌MCF-7细胞及MCF-7/DOX耐药细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液,于37℃、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。将MCF-7/DOX耐药细胞暴露于低剂量[1/10的半数抑制浓度(50% concentration of inhibition, IC₅₀)]的阿霉素中维持细胞耐药性。

1.3 细胞转染

转染前1 d,接种MCF-7细胞及MCF-7/DOX耐药细胞于6孔板中,在细胞密度达50%汇合度时进行转染。吸去旧培养基,每孔加入1 500 μ L完全培养基。分别将5 μ L 20 μ mol/L anti-miR-34c(终浓度为50 nmol/L)、5 μ L 20 μ mol/L miR-34c mimics(终浓度为50 nmol/L)、miRNA-negative control加入到250 μ L Opti-MEM培养基中,轻柔混匀;另外,用250 μ L Opti-MEM培养基稀释1 μ L TurboFect™ siRNA Transfection Reagent,轻柔混匀,室温孵育5 min;混合Opti-MEM-脂质体与Opti-MEM-miRNA,室温孵育20 min,形成转染复合物;然后将上述混合物加到细胞培养基中,轻轻混匀,在37℃、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。分别于24 h后收集细胞进行MTS和流式实验,检测miR-34c对细胞增殖和凋亡的影响;于48 h后提取细胞总RNA和总蛋白,Real-time RT-PCR、Western blot检测miR-34c对增殖、凋亡相关蛋白表达的影响。

1.4 MTS法检测miR-34c对细胞耐药性的作用

取转染miR-34c的细胞,以 2×10^4 /mL接种到96孔板中,100 μ L/孔,培养过夜使细胞贴壁。向试验孔

加入不同浓度的阿霉素,继续培养72 h,吸去培养基,加入100 μ L含0.5 mg/mL MTS的RPMI-1640,继续培养4 h。最后,用酶标仪测定490 nm波长下的光密度(optical density, *D*)值,并计算药物对细胞的抑制率。抑制率=(1-实验组*D*值/对照组*D*值)×100%。以阿霉素浓度为横坐标、抑制率为纵坐标,作图并拟合抑制曲线,计算IC₅₀值。

1.5 流式细胞术检测miR-34c对细胞周期及凋亡的作用

取转染miR-34c的细胞,以 1×10^6 /mL接种到6孔板中,于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。分别于24, 48 h收集细胞,70%冰乙醇固定过夜,50 g/mL Rnase处理0.5 h,100 g/mL的碘化丙啶(PI)于4 °C染色30 min,流式细胞仪(Beckman-Coulter公司)检测分析细胞周期分布;收集细胞,按照Annexin V/PI凋亡检测试剂盒的说明书要求,先后加入Annexin V和PI,避光、室温反应10 min后,流式细胞仪检测细胞凋亡。

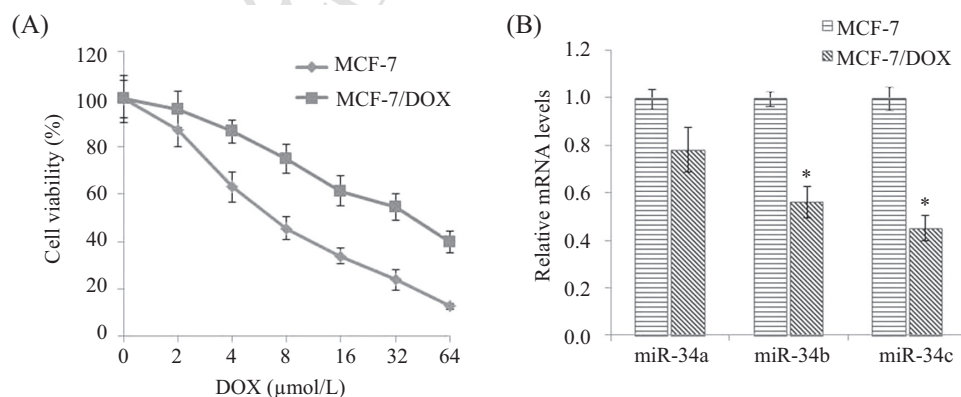
1.6 Real-time RT-PCR

按照Trizol(Invitrogen公司)说明书的方法提取细胞总RNA,按Primescript RT reagent Kit反转录试剂盒(TaKaRa公司)说明书将RNA逆转录为cDNA。引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成。引物序列如下:*Bcl-2*上游引物:5'-ATG TGT GTG GAG AGC GTC AA-3',下游引物:5'-ACA GTT CCA CAA AGG CAT CC-3';*CCND1*上游引物:5'-GAG GAA GAG GAG GAG GA-3',下游引物:5'-GAG

ATG GAA GGG GGA AAG AG-3';*CDK6*上游引物:5'-AGA GAC AGG AGT GGC CTT GA-3',下游引物:5'-TGA AAG CAA GCA AAC AGG TG-3';*E2F3*上游引物:5'-CCC TAA ACC CGC TTC C-3',下游引物:5'-GTT CAC AAA CGG TCC TTC TA-3';*NCO4*上游引物:5'-TGC AGC AGA ATG TCT TCC AG-3',下游引物:5'-AAA GTT GGC CTC ACC TTG G-3';*TAF4B*上游引物:5'-AAT CTT TCT CCG ACA ATG CT-3',下游引物:5'-GAC TGT GAT CCA CTA CAT GC-3';*GAPDH*上游引物:5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3',下游引物:5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'。Real-time RT-PCR反应体系及条件参照SYBR Premix Ex Tap™试剂盒,2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算mRNA的相对表达量,以*GAPDH*作为内参。每个实验组重复3次。

1.7 蛋白提取和Western blot分析

收集细胞,经PBS洗涤后用三去污裂解液[50 mmol/L Tris-Cl(pH8.0),150 mmol/L NaCl,0.2 g/L叠氮钠,100 mg/L Aprotin,100 mg/L PMSF,1 g/L SDS,10 g/L NP-40,5 g/L去氧胆酸钠]裂解,离心后收集上清,用Bradford法测定蛋白浓度;等量蛋白样品经10%的SDS-PAGE电泳分离后,转印至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,MDR、MRP、Bcl-2、E2F3、 β -actin一抗均以1:1 000比例稀释,4 °C孵育过夜。经PBST洗涤后,加入HRP标记的特异性二抗以1:5 000比例稀释,室温下孵育2 h,最后用ECL化学发光试剂对X光片显影,扫描图片。



A: MTS法检测阿霉素对MCF-7细胞和MCF-7/DOX耐药细胞的增殖抑制作用; B: Real-time RT-PCR检测miR-34a、miR-34b和miR-34c在MCF-7细胞和MCF-7/DOX耐药细胞中的表达。

A: effects of Doxorubicin on cell viability of MCF-7 and MCF-7/DOX cells were measured by MTS assay; B: expressions of miR-34a, miR-34b and miR-34c in MCF-7 and MCF-7/DOX cells were measured by Real-time RT-PCR.

图1 miR-34在MCF-7/DOX耐药细胞中的表达

Fig.1 The expression of miR-34 in MCF-7/DOX cells with doxorubicin-resistance

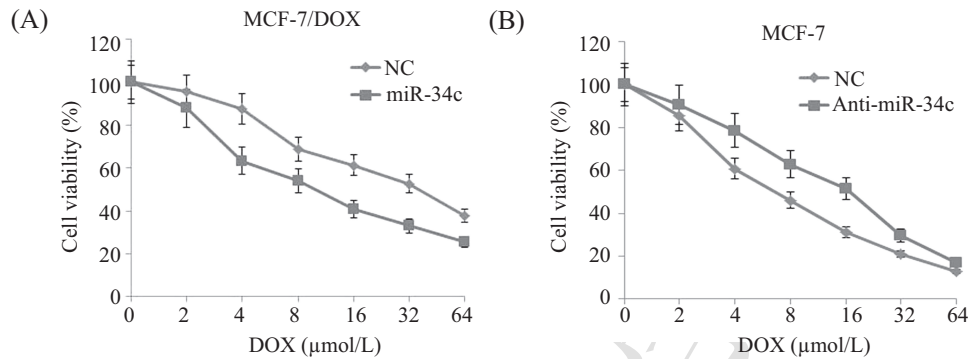
1.8 统计学方法

每组实验重复3次, 采用SPSS 15.0软件One-way analysis of variance方式进行方差分析, 两两比较采用 Students' *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34c在MCF-7/DOX耐药细胞中低表达

采用MTS法检测阿霉素对MCF-7细胞以及MCF-7/DOX耐药细胞的增殖抑制作用, 结果发现, 阿霉素能够有效抑制MCF-7细胞增殖(IC_{50} 为5.3 $\mu\text{mol/L}$), 而

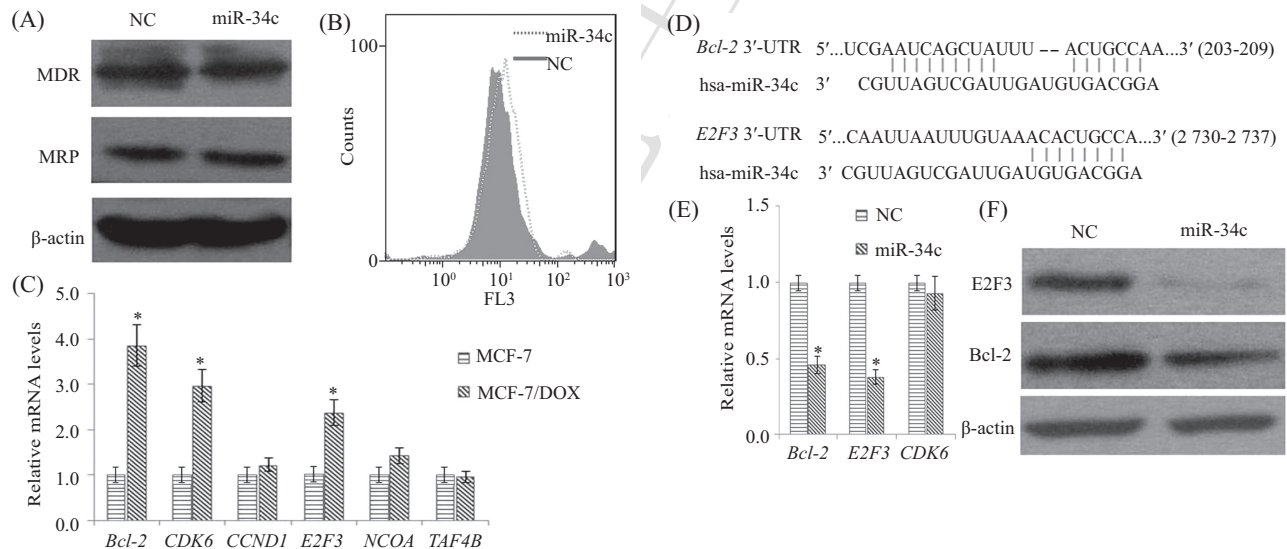


A: MTS法检测转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞存活率的影响; B: MTS法检测转染miR-34c抑制剂对MCF-7细胞存活率的影响。

A: effects of miR-34c on cell viability in MCF-7/DOX cells were determined by MTS assay; B: effects of anti-miR-34c on cell viability in MCF-7 cells were determined by MTS assay.

图2 miR-34c对MCF-7细胞与MCF-7/DOX耐药细胞耐药性的影响

Fig.2 Effects of miR-34c on cell viability in MCF-7 cells and MCF-7/DOX cells with doxorubicin-resistance

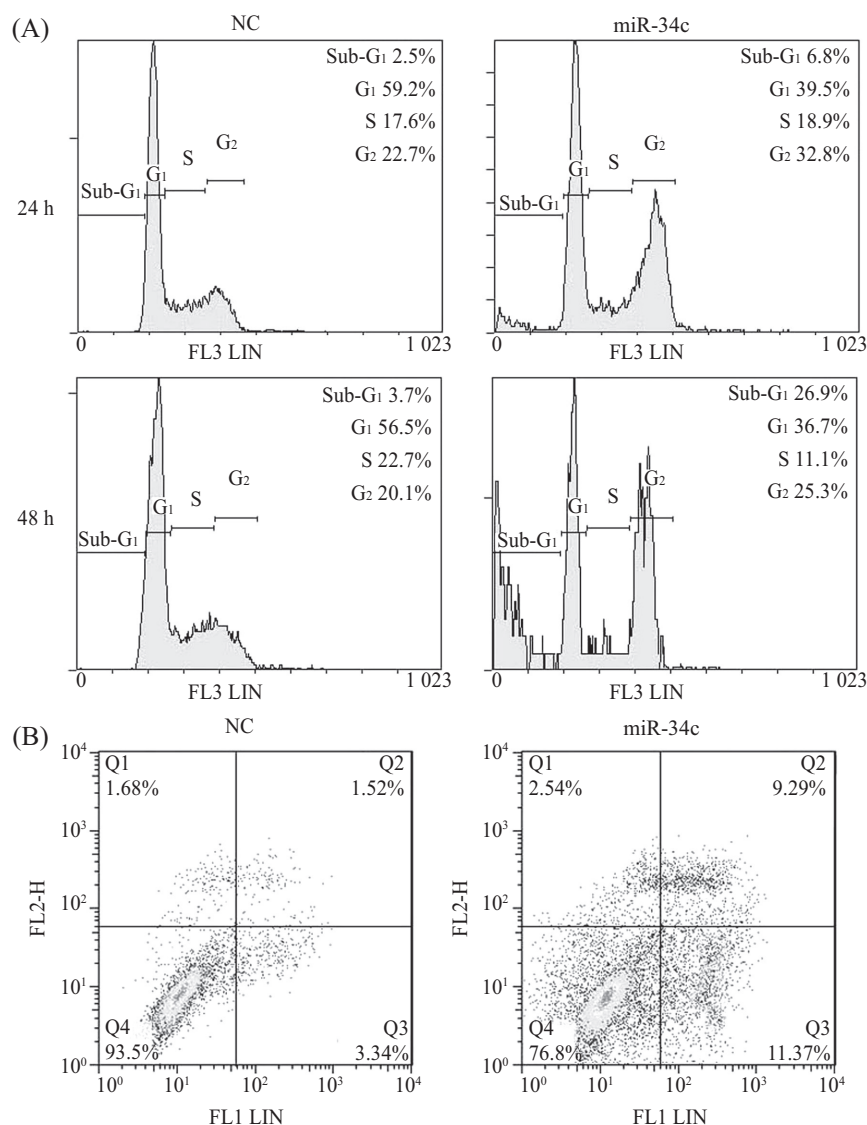


A: Western blot检测转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞耐药相关蛋白MDR、MRP表达的影响; B: 流式细胞检测转染miR-34c对细胞内阿霉素浓度的影响; C: Real-time RT-PCR检测miR-34c靶基因在MCF-7细胞和MCF-7/DOX耐药细胞中的表达情况; D: TargetScan软件预测miR-34c与Bcl-2和E2F3的3'-UTR互补结合区; E: Real-time RT-PCR检测转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞Bcl-2、E2F3和CDK6 mRNA表达的影响; F: Western blot检测转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞Bcl-2和E2F3蛋白表达的影响。

A: effects of miR-34c on the expression of drug-resistant related protein MDR and MRP in MCF-7/DOX cells were measured by Western blot; B: effects of miR-34c on cellular doxorubicin concentration was determined by flow cytometry analysis; C: the expressions of miR-34c targets in MCF-7 and MCF-7/DOX cells were measured by Real-time RT-PCR; D: the match sites of miR-34c on the 3'-UTR of Bcl-2 and E2F3 were predicted by TargetScan; E: effects of miR-34c on the mRNA expression of Bcl-2, E2F3 and CDK6 were measured by Real-time RT-PCR; F: effects of miR-34c on the protein expression of Bcl-2 and E2F3 were measured by Western blot.

图3 转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞耐药相关蛋白、增殖与凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of miR-34c on the expressions of drug-resistant related protein, cell proliferation and apoptosis related protein of MCF-7/DOX cells with doxorubicin-resistance



A: PI染色流式细胞仪检测转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞周期的影响; B: Annexin V/PI染色流式细胞仪检测miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞凋亡的影响。

A: effects of miR-34c on cell cycle distribution of MCF-7/DOX cells were analyzed by PI staining; B: effects of miR-34c on cell apoptosis of MCF-7/DOX were analyzed by Annexin V/PI staining.

图4 转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞周期和凋亡的影响

Fig.4 Effects of miR-34c on cell cycle distribution and apoptosis of MCF-7/DOX cells with doxorubicin-resistance

对MCF-7/DOX耐药细胞的增殖抑制作用较弱(IC_{50} 为52.6 $\mu\text{mol/L}$)(图1A)。采用Real-time RT-PCR检测miR-34家族成员在MCF-7细胞和MCF-7/DOX耐药细胞中的表达情况,结果发现,miR-34a、miR-34b、miR-34c在MCF-7/DOX耐药细胞中均下调表达,且miR-34c下调表达最为显著(图1B)。

2.2 miR-34c对MCF-7细胞与MCF-7/DOX耐药细胞耐药性的影响

实验结果显示,与对照组相比较,miR-34c转染组的MCF-7/DOX耐药细胞对阿霉素的敏感性明显增加(图2A),miR-34c转染组 IC_{50} 为15.2 $\mu\text{mol/L}$,而对照

组 IC_{50} 为46.3 $\mu\text{mol/L}$ 。相反,采用miR-34c抑制剂(anti-miR-34c)转染MCF-7细胞,结果发现,转染anti-miR-34c的MCF-7细胞对阿霉素的敏感性明显降低(图2B)。

2.3 转染miR-34c抑制Bcl-2和E2F3的表达

为了探讨miR-34c逆转MCF-7/DOX耐药性的可能机制,我们首先分析了miR-34c对MDR、MRP耐药相关蛋白表达的影响。Western blot检测结果显示,与对照组相比较,miR-34c转染组细胞中MDR、MRP耐药相关蛋白的表达没有明显变化(图3A)。进一步采用流式细胞仪分析发现,转染miR-34c并不影响细胞内阿霉素的浓度(图3B),提示miR-34c逆

转MCF-7/DOX耐药性可能与减少药物的外排作用无关。采用TargetScan软件预测miR-34c靶基因发现,细胞增殖、凋亡相关蛋白Bcl2、E2F3、CDK6、CCND1、NCOA、TAF4B的3'-UTR均包含miR-34c的结合位点。进一步运用Real-time RT-PCR检测显示,Bcl-2、CDK6、E2F3基因的mRNA表达水平在MCF-7/DOX耐药细胞中上调表达(图3C),且转染miR-34c能显著抑制Bcl-2、E2F3的mRNA的表达,但对CDK6 mRNA表达没有明显的影响(图3D和图3E)。此外,miR-34c转染组Bcl-2、E2F3的蛋白表达亦明显下调表达(图3F)。

2.4 转染miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞周期和凋亡的影响

采用PI染色和流式细胞术检测miR-34c对MCF-7/DOX耐药细胞周期和凋亡的影响,结果显示,转染miR-34c 24 h时,MCF-7/DOX细胞在G₂期细胞比例明显增加;而在48 h时,miR-34c转染组细胞在Sub-G₁期的细胞比例明显增加(图4A)。进一步采用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒检测发现,miR-34c转染组凋亡的细胞比率显著增加(图4B)。以上结果表明,上调miR-34c的表达可以诱导MCF-7/DOX耐药细胞G₂期阻滞和细胞凋亡。

3 讨论

miR-34家族是一类重要的肿瘤抑制miRNA,其在前列腺癌^[7]、结直肠癌^[8]、肺癌^[9]和乳腺癌^[10]等多种肿瘤中的下调表达被认为是肿瘤发生发展的普遍事件。本研究采用乳腺癌MCF-7/DOX耐药细胞模型发现,过表达miR-34c能够增加乳腺癌耐药细胞对化疗药物的敏感性。

肿瘤细胞增加药物的外排、减少药物的吸收是其耐受化疗药物的一种主要手段。ABC家族的跨膜转运蛋白MDR、MRP可将药物从细胞内泵到外侧^[11]。许多研究表明,乳腺癌阿霉素耐药细胞高表达MDR和MRP,且抑制MDR和MRP蛋白的表达能克服乳腺癌阿霉素耐药^[12-13],然而转染miR-34c对MDR和MRP的蛋白表达没有明显的影响,说明miR-34c逆转乳腺癌MCF-7/DOX细胞耐药的机制可能与减少药物的外排作用无关。

本研究发现,miR-34c诱导MCF-7/DOX耐药细胞G₂期阻滞和凋亡,提示抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡是miR-34c逆转乳腺癌MCF-7/DOX细胞耐药的

重要机制。实验结果显示,E2F3在乳腺癌MCF-7/DOX耐药细胞中显著高表达。E2F3是E2F转录因子家族成员之一,是调控细胞周期进程的重要调控蛋白之一。已有的研究显示,E2F3在多种肿瘤中异常表达,在调节细胞增殖、促进肿瘤的发生发展等方面具有重要的作用^[14-15]。近年来,有研究发现,许多miRNA参与调节E2F3的表达^[16]。例如,miR-449a、miR-141通过靶向E2F3分别抑制肺癌细胞、肝癌细胞的增殖^[17-18]。Li等^[19]发现,在乳腺癌细胞中miR-34a的功能障碍导致转录因子E2F3的表达量增高,当过表达miR-34a后通过下调靶基因E2F3 mRNA的表达可抑制细胞增殖。我们发现,过表达miR-34c同样能够抑制E2F3的表达,这可能是过表达miR-34c诱导乳腺癌MCF-7/DOX耐药细胞周期G₂期阻滞的重要因素。

Bcl-2是一个在细胞凋亡中发挥重要作用的蛋白,可抑制肿瘤细胞的凋亡。近年来,多项研究发现,Bcl-2的高表达与肿瘤的耐药成正相关^[20-21]。Kim等^[22]发现,抑制Bcl-2的表达能够增强乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性。本研究发现,在MCF-7/DOX耐药细胞中,Bcl-2的蛋白表达水平明显升高,提示Bcl-2介导的抗凋亡是乳腺癌MCF-7/DOX细胞产生耐药的重要机制。我们通过生物信息学分析发现,miR-34c能够靶向Bcl-2的3'-UTR区,而过表达miR-34c能显著抑制Bcl-2 mRNA和蛋白表达,这与流式实验观察到的细胞凋亡率明显上升一致。

总之,本研究发现,miR-34c在乳腺癌MCF-7/DOX耐药细胞中明显低表达,过表达miR-34c能诱导耐药细胞周期G₂期阻滞和细胞凋亡,从而逆转其耐药性,且miR-34c负性调控细胞增殖与凋亡相关蛋白E2F3、Bcl-2的表达可能是其逆转乳腺癌MCF-7/DOX细胞耐药的重要机制。

参考文献 (References)

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013; 63(1): 11-30.
- 2 郑莹,吴春晓,张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征. 中国癌症杂志 (Zheng Ying, Wu Chunxiao, Zhang Minlu. The epidemic and characteristics of female breast cancer in China. China Oncology) 2013; 23(8): 561-9.
- 3 Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. Trends Mol Med 2006; 12(12): 580-7.
- 4 Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. Curr Biol 2014; 24(16): 762-76.

- 5 Wang R, Ma J, Wu Q, Xia J, Miele L, Sarkar FH, *et al.* Functional role of miR-34 family in human cancer. *Curr Drug Targets* 2013; 14(10): 1185-91.
- 6 Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010; 17(2): 193-9.
- 7 Hagman Z, Larne O, Edsjo A, Bjartell A, Ehrnstrom RA, Ulmert D, *et al.* miR-34c is downregulated in prostate cancer and exerts tumor suppressive functions. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2768-76.
- 8 Roy S, Levi E, Majumdar AP, Sarkar FH. Expression of miR-34 is lost in colon cancer which can be re-expressed by a novel agent CDF. *J Hematol Oncol* 2012; 5: 58.
- 9 Garofalo M, Jeon YJ, Nuovo GJ, Middleton J, Secchiero P, Joshi P, *et al.* MiR-34a/c-dependent PDGFR- α/β downregulation inhibits tumorigenesis and enhances TRAIL-induced apoptosis in lung cancer. *PLoS One* 2013; 8: e67581.
- 10 Cole KA, Attiyeh EF, Mosse YP, Laquaglia MJ, Diskin SJ, Brodeur GM, *et al.* A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol Cancer Res* 2008; 6(5): 735-42.
- 11 Yang S, Li Y, Gao J, Zhang T, Li S, Luo A, *et al.* MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1. *Oncogene* 2013; 32(36): 4294-303.
- 12 Wind NS, Holen I. Multidrug resistance in breast cancer: From *in vitro* models to clinical studies. *Int J Breast Cancer* 2011; 2011: 967419.
- 13 Hembruff SL, Laberge ML, Villeneuve DJ, Guo B, Veitch Z, Cecchetto M, *et al.* Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. *BMC Cancer* 2008; 8: 318.
- 14 Foster CS, Falconer A, Dodson AR, Norman AR, Dennis N, Fletcher A, *et al.* Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome. *Oncogene* 2004; 23(35): 5871-9.
- 15 Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, *et al.* Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 2004; 23(8): 1627-30.
- 16 Miles WO, Tschop K, Herr A, Ji JY, Dyson NJ. Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene. *Genes Dev* 2012; 26(4): 356-68.
- 17 Ren XS, Yin MH, Zhang X, Wang Z, Feng SP, Wang GX, *et al.* Tumor-suppressive microRNA-449a induces growth arrest and senescence by targeting E2F3 in human lung cancer cells. *Cancer Lett* 2014; 344(2): 195-203.
- 18 Xue J, Niu YF, Huang J, Peng G, Wang LX, Yang YH, *et al.* miR-141 suppresses the growth and metastasis of HCC cells by targeting E2F3. *Tumour Biol* 2014; 35(12): 12103-7.
- 19 Li L, Xie X, Luo J, Liu M, Xi S, Guo J, *et al.* Targeted expression of miR-34a using the T-VISA system suppresses breast cancer cell growth and invasion. *Mol Ther* 2012; 20(12): 2326-34.
- 20 Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008; 27(50): 6398-406.
- 21 Huang Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A, *et al.* Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42(1): 73-81.
- 22 Kim R, Tanabe K, Emi M, Uchida Y, Toge T. Modulation of tamoxifen sensitivity by antisense Bcl-2 and trastuzumab in breast carcinoma cells. *Cancer* 2005; 103(10): 2199-207.