

MicroRNA-493抑制乳腺癌MCF7细胞增殖、迁移和成瘤能力

韦 唯¹ 葛葵葵^{1,2} 徐宇强¹ 黄晋江¹ 黄青山^{1,2*}

(¹复旦大学生命科学学院遗传学国家重点实验室, 上海 200433; ²上海高科联合生物技术研发有限公司, 上海 201206)

摘要 为了研究miR-493对乳腺癌MCF7细胞增殖、迁移和肿瘤形成能力的影响及其可能的机制, 该文使用pcDNA3.1(+)/miR-493重组质粒转染MCF7细胞, 通过筛选获得高表达miR-493的细胞克隆。通过荧光定量PCR检测miR-493在MCF10A和MCF7及各细胞克隆中的表达; CCK8实验检测miR-493对MCF7细胞增殖能力的影响; Transwell和划痕实验观察miR-493高表达后MCF7细胞迁移和侵袭能力的改变, 软琼脂克隆形成实验以及裸鼠实验检测miR-493对MCF7细胞肿瘤形成能力的影响。软件预测miR-493可能的靶基因, 并通过荧光定量PCR和Western blot进行验证。该研究证明, miR-493能够有效抑制乳腺癌MCF7细胞的增殖、迁移、浸润和肿瘤形成的能力。

关键词 miR-493; MCF7; 细胞增殖; 细胞迁移; 肿瘤形成

MicroRNA-493 Inhibited Proliferation, Migration and Tumor Formation of Breast Cancer Cell MCF7

Wei Wei¹, Ge Kuikui^{1,2}, Xu Yuqiang¹, Huang Jinjiang¹, Huang Qingshan^{1,2*}

(¹State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;

²Shanghai Hi-Tech United Bio-Technological R&D Co., Ltd, Shanghai 201206, China)

Abstract To research the effect of miR-493 on cell proliferation, migration and tumor formation of breast cancer MCF7 cells, MCF7 cells were infected with recombinant plasmid pcDNA3.1(+)/miR-493 and cell lines with stably highly expressed miR-493 were selected by G418 screening. The expression of miR-493 in MCF10A, MCF7 cells and MCF7 clones after infection was detected by fluorescence quantitative Real-time PCR. In order to detect the influence of increased miR-493 expression in MCF7 cells, the proliferation ability was determined using CCK8 assay. The migration ability of MCF7 cells was assessed by Transwell and wound-healing assays. The invasion ability of MCF7 cells was detected by Transwell assay. The impact of miR-493 expression on the tumor formation ability of MCF7 cells was detected by soft agar assay *in vitro* and nude mice assay *in vivo*. The target gene was predicted by miRanda and TargetScan softwares and investigated by fluorescence quantitative Real-time PCR and Western blot. The result of CCK8 assay showed that over-expression of miR-493 could inhibit cell proliferation of MCF7 cells. The results of Transwell and wound-healing assays indicated that the abilities of migration and invasion of MCF7 cells were suppressed when miR-493 was up-regulated. And the results of soft agar and nude mice assays also revealed that over-expression of miR-493 could inhibit both clone formation and tumor formation of MCF7 cells.

Keywords miR-493; MCF7; cell proliferation; cell migration; tumor formation

收稿日期: 2014-11-04 接收日期: 2015-02-01

国家重大新药创制专项(批准号: 2013ZX09102057)和国家自然科学基金项目资助的课题

*通讯作者: Tel: 021-51630528, E-mail: qshuang@fudan.edu.cn

Received: November 4, 2014

Accepted: February 1, 2015

This work was supported by the National New-drug Innovation Project of China (Grant No.2013ZX09102057) and the Project for National Basic Science Personnel Training Fund

*Corresponding author. Tel: +86-21-51630528, E-mail: qshuang@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2015-03-30 15:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150330.1548.007.html>

MicroRNA被发现与人类癌症的发生和发展具有重要的联系,其在癌症组织细胞与正常细胞中的表达存在差异,这些差异表达的microRNA的靶基因可能位于癌症相关的基因组区域^[1-2]。MicroRNA-493(miR-493)是近年来通过测序方法发现的一种microRNA,在随后的工作中被检测和证实,并且已经被正式收录到microRNA的数据库中。近年来研究发现,miR-493可以通过IGF1R(insulin-like growth factor 1 receptor)抑制结肠癌的肝转移过程^[3],并可通过FZD4(frizzled class receptor 4)和RhoC(Ras homolog gene family, member C)抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移能力^[4]。Gu等^[7]发现,miR-493可以通过E2F1(E2F transcription factor 1)抑制肺癌的生长和侵袭。最新研究表明,促分裂原活化蛋白激酶激酶MKK7(mitogen-activated protein kinase kinase 7)是miR-493可能的功能靶点^[5]。尽管现有的研究结果表明,miR-493在结肠癌^[5]、膀胱癌^[6]和肺癌^[7]中表达异常,上调miR-493的表达可以有效抑制这些肿瘤的增殖与迁移能力,但其在其他肿瘤中的表达情况以及与肿瘤进程的关系并不是很清楚,其抗肿瘤作用的普遍性及作用机制仍有待于进一步探讨。

对于女性来说,乳腺癌是仅次于子宫癌的第二大恶性肿瘤,到目前为止,乳腺癌的发病率占据了女性恶性肿瘤的30%^[8]。最近的研究发现,microRNA在乳腺癌中有异常上调或下调的表现,可以促进或者抑制肿瘤的发生和发展,其作用类似于癌基因或是抑癌基因^[9-10]。如miR-340被发现通过抑制c-Met原癌基因蛋白可以抑制乳腺癌的迁移和侵袭^[11];而miR-96通过RECK(reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs)可以促进乳腺癌的增殖和侵袭,其在乳腺癌中的表达明显高于正常的乳腺组织^[12]。

为了探讨miR-493在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌的影响,本研究以乳腺癌细胞系MCF7为主要研究对象,获得稳定高表达miR-493的MCF7细胞克隆,研究miR-493对乳腺癌细胞系增殖、迁移、侵袭以及肿瘤形成能力的影响,并寻找其可能的调控靶基因,以期初步揭示miR-493抑制乳腺癌细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

重组质粒pcDNA3.1(+)/miR-493由本实验室构建与保存;MCF7与MCF10A细胞由本实验室保存;

DMEM培养基、FBS胎牛血清、0.25%胰酶、青霉素-链霉素双抗购自Gibco公司;转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;G418购自Sigma公司;PBS购自CORNING公司;Hairpin-it miRNA qRT-PCR Kit、Taq-man PCR以及反转录试剂盒购自上海吉玛生物技术有限公司;CCK8细胞增殖与活性检测试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司;Transwell小室(8 μ m)及培养板购自CORNING公司;5%脱脂牛奶、低熔点琼脂糖粉与2×PBS solution均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;RIPA细胞裂解液、TBST、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;NC膜购自PALL公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自天根生物科技有限公司;anti-ANTXR1与anti-GAPDH抗体购自Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗以及山羊抗鼠二抗购自CST公司;蛋白marker与超灵敏ECL发光底物试剂盒购自Thermo公司。BALB/c裸鼠(5周龄,雌性)购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与克隆筛选 MCF7与MCF10A细胞使用含10% FBS的DMEM培养液,于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。将MCF7细胞传入6孔板,待密度达到80%时,利用脂质体法将重组质粒以及对照载体转染至细胞内,方法参见Lipofectamine 2000的说明书。细胞贴壁后,换液,加入800 μ g/mL的G418进行筛选,每2 d更换筛选培养基。14 d后,挑选6孔板中已形成的单细胞克隆至24孔板中进行扩大培养,直至获得稳定的具有抗性的细胞克隆。

1.2.2 CCK8实验检测细胞增殖 将处于对数生长期的MCF7细胞及筛选的细胞克隆,按 5×10^3 /孔接种于96孔板(200 μ L)中,每组细胞设置5个复孔,分别于D0、D1、D2、D3、D4弃去上清,加入100 μ L含有10% CCK8的无血清DMEM培养基,37 °C、5% CO₂培养箱孵育1.5 h后,吸取90 μ L上清,酶标仪测定 D_{450} 值,计算细胞增长率。

1.2.3 Real-time PCR检测miR-493的含量 待各组细胞生长达到80%时,PBS洗3次,0.25%胰酶消化,Trizol裂解细胞提取总RNA。用Hairpin-it miRNA Real-time PCR Kit进行逆转录和Real-time PCR。实验方法参照Taq-man PCR试剂盒的说明书,以U6为内参进行Taq-man PCR检测,反应条件:95 °C 3 min;95 °C 12 s,62 °C 40 s,反应进行50个循环。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

均值,对MCF7标准化作图。

1.2.4 Transwell实验检测细胞迁移能力 于24孔板中放入Transwell小室(装有聚碳酸酯微孔膜,孔径8 μm ,小室分为铺胶与不铺胶两种),将处于对数生长期的细胞消化,用无血清DMEM培养基重悬,制成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的悬浮溶液,吸取100 μL 细胞悬液接种于小室上层。下室加入500 μL 含10%胎牛血清的DMEM培养基,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。孵育24 h后,将不铺胶的小室取出,PBS清洗3次,4%多聚甲醛室温避光固定20 min,结晶紫染色30 min,PBS清洗脱色,用棉球轻轻擦去小室上层细胞,小室避光晾干后,置于显微镜下观察细胞,随机选择5个视野进行拍照计数,取平均值。孵育48 h后,将铺胶的小室取出,重复上述实验步骤。对细胞数量作柱状图,纵坐标表示细胞数。

1.2.5 划痕实验检测细胞愈合能力 将细胞接种于6孔板中,24 h后待其融合率达到90%以上时,吸去培养基,用PBS清洗3次,用10 μL 枪头在每孔细胞中均匀划三条横线,大约每隔0.5~1 cm一条,横穿过孔。加入培养基,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。在0, 24, 48 h分别进行显微镜观察和拍照,计算愈合率。划痕愈合率 $= (\text{Area}_{0\text{h}} - \text{Area}_{24\text{h or } 48\text{h}}) / \text{Area}_{0\text{h}} \times 100\%$, Area表示未愈合的面积。

1.2.6 软琼脂克隆实验检测细胞克隆形成能力 1.2%低熔点琼脂糖加热融化后和2 $\times$ DMEM培养基(含20%胎牛血清)1:1混合,取3 mL加入60 mm的细胞培养皿中,于水平处放置冷却。0.6%低熔点琼脂糖加热融化后和2 $\times$ DMEM培养基1:1混合,作为上层琼脂。将各组细胞计数,每皿接种1 000个细胞,每组细胞重复3皿,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养2周。2周后,将1.7%低熔点琼脂糖加热融化后和2 $\times$ PBS以及1%中性红染液以10:10:0.1的比例混合,向每个培养皿中加入3 mL混合液,摇匀,待冷却后进行拍照计数,取平均值。

1.2.7 裸鼠皮下肿瘤生长实验 将3组细胞(MCF7-pcDNA3.1和MCF7-miR493-5,11)消化计数,调至细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,选取同一批次5周龄的裸鼠15只,体重18~24 g,随机分为3组,每只裸鼠皮下注射200 μL 细胞悬液。1周后测量肿瘤大小,每周测1次,第7周时将裸鼠处死取瘤,根据每组肿瘤大小绘制各组肿瘤生长曲线进行比较。

1.2.8 靶基因的预测及验证 运用miRanda软件

预测miR-493的靶基因,并通过TargetScan软件验证miRanda预测结果的正确性。上调miR-493的表达,通过Real-time PCR检测miR-493过表达后预测靶基因的表达式,实验步骤根据Real-time PCR试剂盒的说明书进行。

1.2.9 Western blot检测ANTXR1的表达 收取细胞,利用Western blot及RIPA裂解液试剂盒提取总蛋白,参照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书对蛋白进行定量,每孔上样20 μL (100 μg)蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,之后转移到NC膜上,室温震荡封闭2 h,anti-ANTXR1按1:500稀释,anti-GAPDH按1:2 000稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗涤3次,每次5 min。山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗按1:2 000稀释,室温40 min,TBST洗涤4次,每次5 min,辣根过氧化物酶底物显色,化学发光仪检测。

1.2.10 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

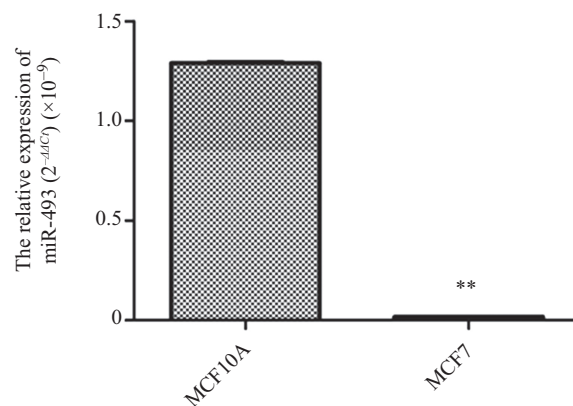
2 结果

2.1 检测miR-493在MCF10A和MCF7细胞中的表达量

通过荧光定量PCR检测miR-493的表达,结果如图1所示,与正常的乳腺细胞系MCF10A相比,MCF7细胞系中miR-493的表达明显降低($P < 0.01$)。

2.2 miR-493转染MCF7细胞及检测miR-493的表达

将pcDNA3.1(+)/miR-493重组质粒转染MCF7细胞,在具有抗性的细胞克隆中,我们选取MCF7-miR493-5, 11两个克隆进行G418加压筛选,提高

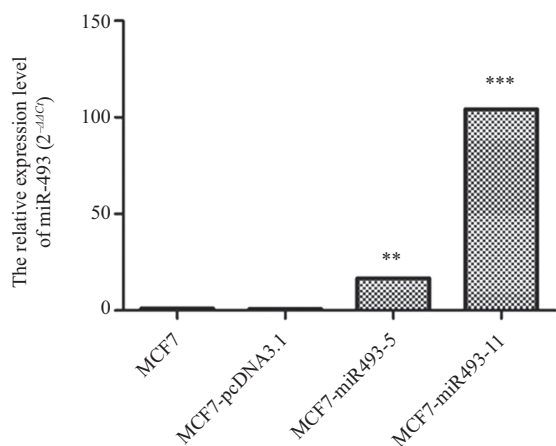


** $P < 0.01$, 与MCF10A组比较。

** $P < 0.01$ compared with MCF10A group.

图1 miR-493在MCF7及MCF10A细胞中的表达

Fig.1 The expression of miR-493 in MCF7 and MCF10A cells

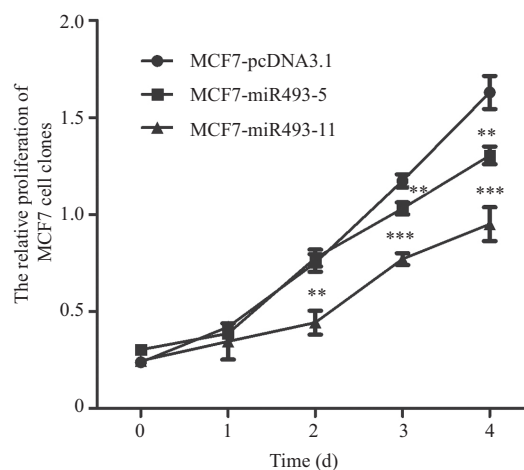


** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与MCF7组比较。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with MCF7 group.

图2 miR-493在细胞克隆中的表达

Fig.2 The expression level of miR-493 in cell clones

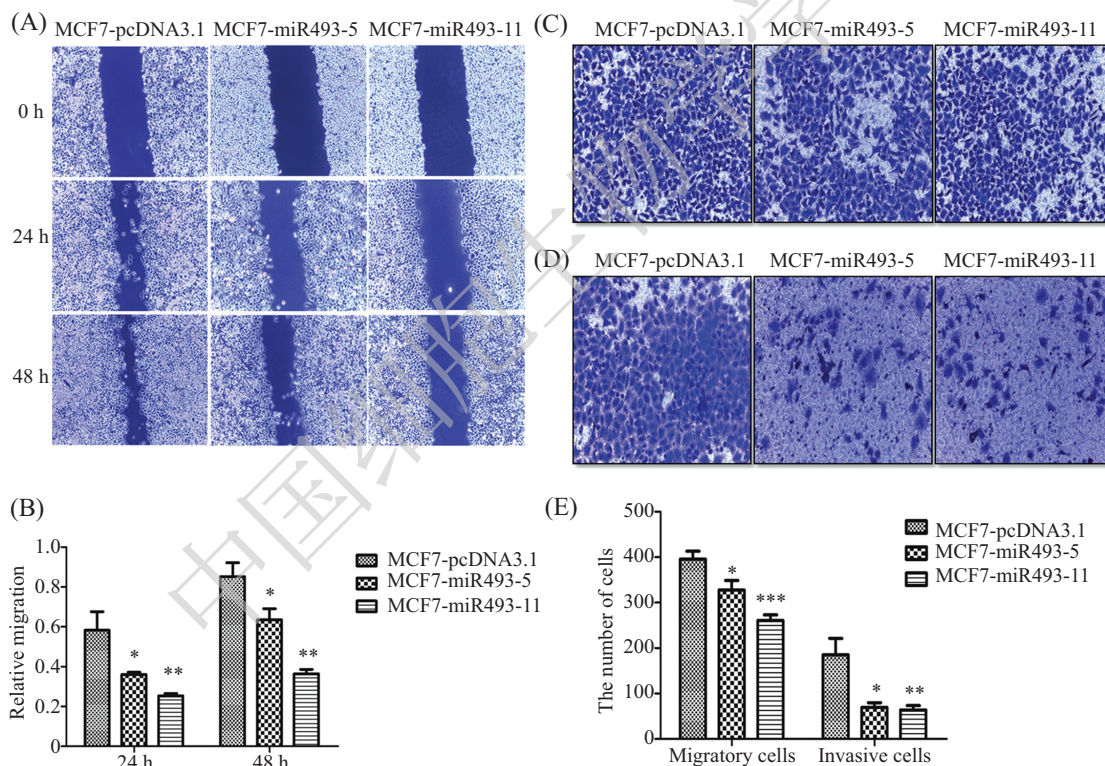


** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与MCF7-pcDNA3.1组比较。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with MCF7-pcDNA3.1 group.

图3 miR-493对MCF7细胞增殖的影响

Fig.3 The influence of miR-493 in MCF7 cell proliferation



A: 细胞划痕实验(200 $\times$); B: 划痕愈合率, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与转染了空载体的MCF7-pcDNA3.1组比较; C: 穿过Transwell小室的细胞(200 $\times$); D: 穿过铺基质胶的Transwell小室的细胞(200 $\times$); E: 穿过Transwell小室的细胞数统计, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与MCF7-pcDNA3.1组比较。

A: wound-healing assay (200 $\times$); B: the cell recovery rate of wound-healing assay, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with MCF7-pcDNA3.1 group; C: migratory cells of Transwell migration assay (200 $\times$); D: invasive cells of Transwell invasion assay (200 $\times$); E: the number of migratory and invasive cells, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with MCF7-pcDNA3.1 group.

图4 划痕实验和Transwell实验检测miR-493对细胞迁移和侵袭能力的影响

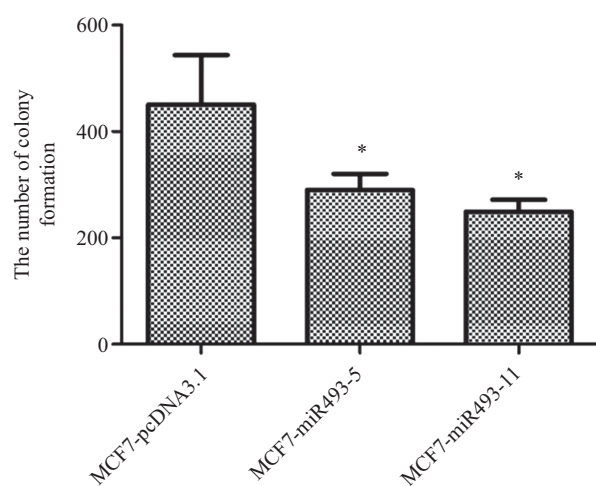
Fig.4 The influence of the ability of cell migration or invasion in MCF7 cells with over-expression of miR-493

miR-493的表达, 进行后续实验。通过Taq-man探针法荧光定量PCR检测miR-493的表达。结果如图2所示, 与MCF7细胞相比, miR-493的表达在MCF7-miR493-5与MCF7-miR493-11克隆中明显增高, 分别

是在MCF7细胞中的17倍与104倍, 而转染空载体的MCF7细胞中的miR-493的表达没有明显变化。

2.3 miR-493抑制乳腺癌MCF7细胞的增殖

通过CCK8实验对各个细胞克隆的增殖情况进



* $P < 0.05$, 与MCF7-pcDNA3.1组比较。

* $P < 0.05$ compared with MCF7-pcDNA3.1 group.

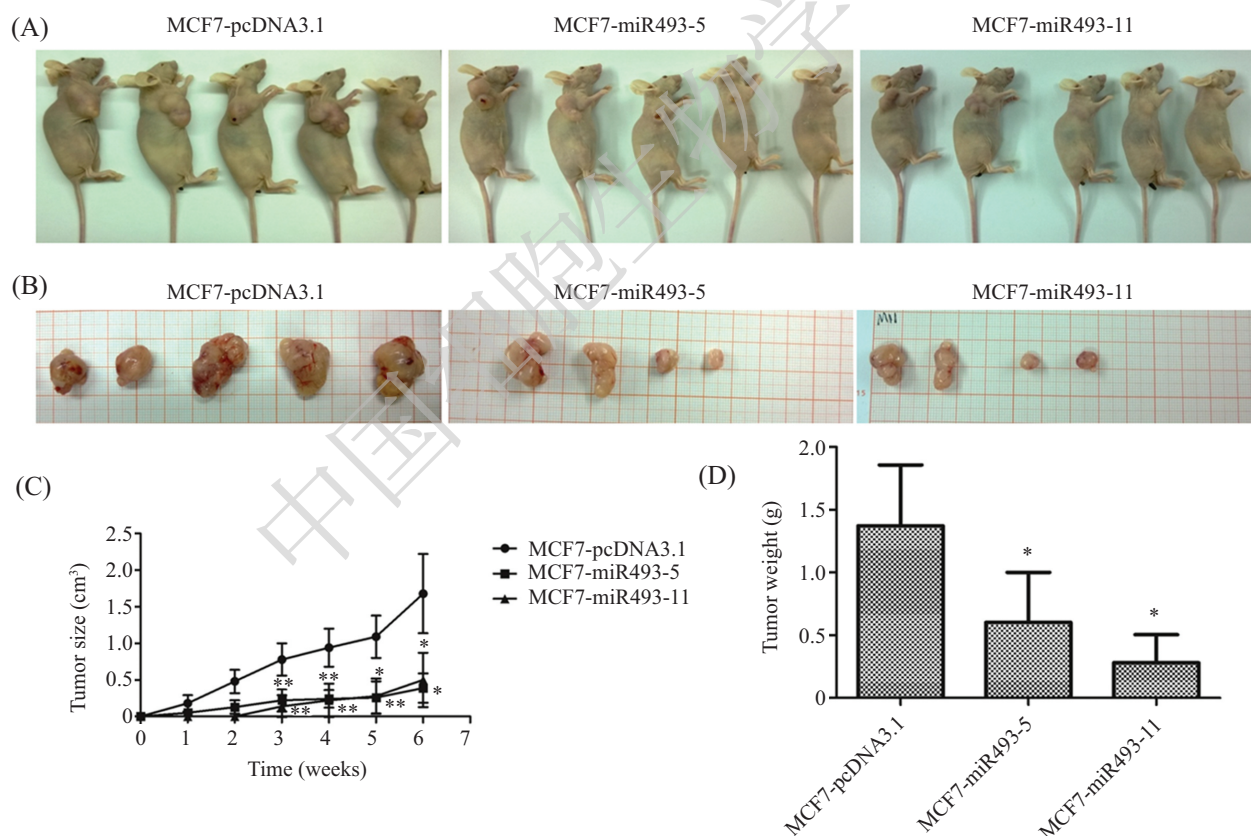
图5 miR-493对MCF7细胞克隆形成能力的影响

Fig.5 The influence of the ability of colony formation in MCF7 cells with over-expression of miR-493

行检测, 生长曲线如图3所示。结果发现, 与对照细胞相比, miR-493高表达的MCF7-miR493-5与MCF7-miR493-11细胞的生长均受到抑制, 并且抑制效果与miR-493的表达呈正相关。

2.4 miR-493抑制乳腺癌MCF7细胞的迁移与侵袭

划痕实验反映肿瘤细胞的运动与迁移能力, 结果显示, 同对照细胞相比, 两株高表达miR-493的细胞克隆的愈合率在24 h和48 h时均明显降低, 并且MCF7-miR493-11细胞的愈合较MCF7-miR493-5更为缓慢(图4A), 愈合率统计结果如图4B所示。Transwell检测细胞迁移实验结果如图4C所示, 同MCF7-pcDNA3.1相比, MCF7-miR493-5与MCF7-miR493-11克隆的细胞迁移数量明显减少, 细胞侵袭实验获得了相似的结果(图4D), 统计结果如图4E所示。以上实验说明, miR-493的高表达显著抑制

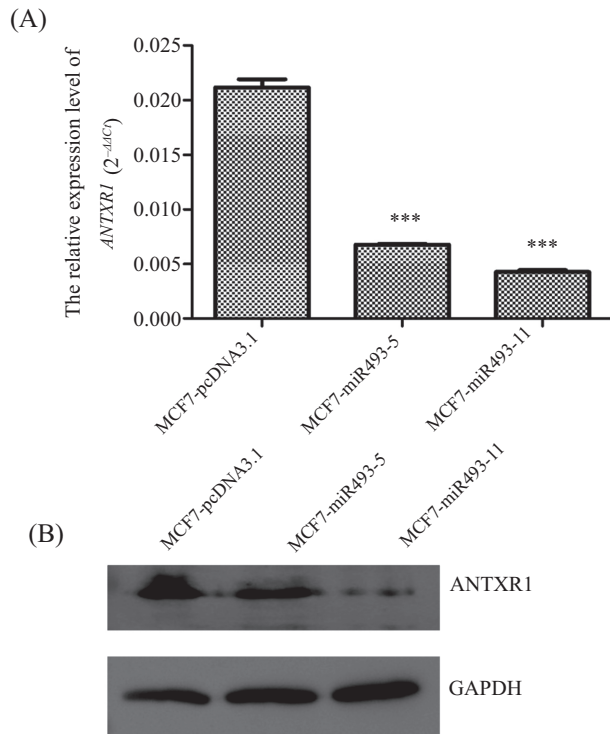


A: MCF7-pcDNA3.1、MCF7-miR493-5以及MCF7-miR493-11细胞在裸鼠皮下成瘤情况(第7周); B: MCF7-pcDNA3.1、MCF7-miR493-5以及MCF7-miR493-11细胞形成的肿瘤大小(第7周); C: MCF7-pcDNA3.1、MCF7-miR493-5以及MCF7-miR493-11细胞的肿瘤生长曲线; D: MCF7-pcDNA3.1、MCF7-miR493-5以及MCF7-miR493-11的裸鼠形成肿瘤的重量(第7周)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与MCF7-pcDNA3.1组比较。

A: nude mice injected with MCF7-pcDNA3.1, MCF7-miR493-5 and MCF7-miR493-11; B: tumor of nude mice injected with MCF7-pcDNA3.1, MCF7-miR493-5 and MCF7-miR493-11; C: tumor volume in nude mice injected with MCF7-pcDNA3.1, MCF7-miR493-5 and MCF7-miR493-11; D: weigh of tumor increase of nude mice injected with MCF7-pcDNA3.1, MCF7-miR493-5 and MCF7-miR493-11. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with MCF7-pcDNA3.1 group.

图6 miR-493对小鼠皮下注射成瘤能力的影响

Fig.6 The influence of the ability of tumor formation in nude mice with over-expression of miR-493



A: *ANTXR1*的mRNA在各细胞克隆中的表达。*** $P < 0.001$, 与MCF7-pcDNA3.1组比较; B: 与MCF7-pcDNA3.1相比, 过表达miR-493对*ANTXR1*蛋白表达量的影响。

A: the mRNA expression of *ANTXR1* in different cell clones. *** $P < 0.001$ compared with MCF7-pcDNA3.1 group; B: the influence of *ANTXR1* expression with over-expression of miR-493, compared with MCF7-pcDNA3.1 group.

图7 过表达miR-493对*ANTXR1*表达的影响

Fig.7 The influence of *ANTXR1* expression with over-expression of miR-493

了MCF7细胞的迁移和侵袭。

2.5 miR-493抑制乳腺癌MCF7细胞体外克隆形成能力

软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆形成能力的结果显示, 与MCF7-pcDNA3.1相比, MCF7-miR493-5与MCF7-miR493-11细胞的克隆形成数量明显降低(图5)。

2.6 miR-493抑制乳腺癌MCF7细胞在裸鼠皮下的成瘤能力

肿瘤细胞裸鼠皮下成瘤实验结果显示, miR-493高表达的MCF7-miR493-5与MCF7-miR493-11细胞, 其裸鼠皮下形成的肿瘤大小明显减小(图6A和图6B), 肿瘤生长受到显著抑制(图6C), 肿瘤重量也显著低于对照组(图6D)。

2.7 miR-493靶基因的验证

通过软件分析, 我们发现炭疽毒素受体

1(*ANTXR1*), 可能是miR-493的干扰靶点。为了验证这一结果, 我们通过荧光定量PCR检测了miR-493高表达细胞系中*ANTXR1*的表达。结果显示, 与MCF7-pcDNA3.1相比, 高表达miR-493的MCF7细胞系中靶基因*ANTXR1*的mRNA表达明显降低(图7A)。通过Western blot实验检测*ANTXR1*蛋白的表达, 结果与荧光定量PCR实验结果一致(图7B), miR-493同时抑制了*ANTXR1*基因的mRNA与蛋白水平的表达。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 发病率占全身恶性肿瘤的7%~10%, 并且呈现逐年增长的趋势。同其他肿瘤一样, 乳腺癌的发生也是癌基因与抑癌基因多阶段相互作用的结果, 并最终导致细胞生长不受体内调节的控制, 逐渐向周围正常细胞侵染的过程。在过去的几十年里, 大量的研究表明乳腺癌与microRNA之间存在着某种关系, 一些microRNA已经被证明可以抑制乳腺癌的发生发展, 如miR-145^[13]、miR-379^[14]、miR-205^[8]、miR-19^[15]、miR-10b^[16]和miR-21^[17]等。本研究中, 我们发现了一种新的可以抑制乳腺癌的microRNA——miR-493。

研究中我们发现, 与正常乳腺上皮细胞系MCF10A相比, 乳腺癌细胞系MCF7中miR-493的表达明显降低, 这一现象提示我们, miR-493的表达缺失可能与乳腺癌的发生相关。为了探讨miR-493与乳腺癌之间可能存在的关系, 我们上调了MCF7细胞中miR-493的表达, 并检测了miR-493表达增加后对肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭、体外克隆形成与裸鼠皮下肿瘤形成能力的影响, 结果发现, miR-493的过表达确实抑制了乳腺癌细胞的恶性表型。这提示我们, 在乳腺癌的肿瘤发生中, miR-493可能扮演着重要的抑癌角色。

为了进一步了解miR-493在乳腺癌中可能的抑制机制, 我们利用了两种不同的目的基因预测软件来筛选miR-493可能的靶基因, 并且利用实时荧光定量PCR来验证我们的假设。实验结果证明, miR-493通过抑制炭疽毒素受体*ANTXR1*的表达, 对乳腺癌细胞发挥了抑制作用。作为已被报导的miR-493的靶点分子, *FZD4*、*RhoC*的表达在miR-493高表达的细胞系中也得到了部分抑制(数据未显示), 但其抑制效果不及对*ANTXR1*的抑制明显, 这可能与不同分子在乳腺癌细胞中的表达量不同有关。*ANTXR1*基因是肿瘤血管内皮标记物, 并且编码一

个I型跨膜蛋白,分子量大约为85 kDa^[18]。*ANTXR1*是一种在乳腺癌中优势表达的分子,其在乳腺癌中的表达占据了过表达基因的前10%,在肿瘤血管壁中表达上调,并且促进肿瘤的生长^[19]。*Chen*等^[20]发现,*ANTXR1*的表达水平与Wnt信号通路相关的蛋白质表达水平呈现正相关,*ANTXR1*基因的敲除可以引起包括LRP6、AXIN1、ZEB1、c-Myc、CyclinD1以及磷酸化的GSK3 α 在内的相关蛋白的表达量降低,可作为一个潜在的肿瘤治疗的靶基因。我们的结果证明,miR-493可以有效地抑制*ANTXR1*在基因与蛋白水平的表达,这可能是其抑制乳腺癌肿瘤的重要机制之一。

本研究发现,miR-493可以靶向调节*ANTXR1*在乳腺癌MCF7细胞中的表达,从而抑制乳腺癌细胞的生长、迁移、侵袭、体外克隆形成以及裸鼠皮下成瘤能力。这为下一步深入研究miR-493在乳腺癌发生发展中的作用机制提供了重要途径,为探索乳腺癌的基因治疗、寻找新的分子治疗靶点提供了实验依据,为乳腺癌的治疗提供了一种新的可能。

参考文献 (References)

- Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol* 2006; 33(2): 167-73.
- Helleman J, Jansen MP, Burger C, van der Burg ME, Berns EM. Integrated genomics of chemotherapy resistant ovarian cancer: A role for extracellular matrix, TGF β and regulating microRNAs. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(1): 25-30.
- Okamoto K, Ishiguro T, Midorikawa Y, Ohata H, Izumiya M, Tsuchiya N, *et al.* miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *Embo J* 2012; 31(7): 1752-63.
- Ueno K, Hirata H, Majid S, Yamamura S, Shahryari V, Tabatabai ZL, *et al.* Tumor suppressor microRNA-493 decreases cell motility and migration ability in human bladder cancer cells by down-regulating RhoC and FZD4. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(1): 244-53.
- Sakai H, Sato A, Aihara Y, Ikarashi Y, Midorikawa Y, Kracht M, *et al.* MKK7 mediates miR-493-dependent suppression of liver metastasis of colon cancer cells. *Cancer Sci* 2014; 105(4): 425-30.
- Ueno K, Hirata H, Majid S, Yamamura S, Shahryari V, Tabatabai ZL, *et al.* Tumor suppressor microRNA-493 decreases cell motility and migration ability in human bladder cancer cells by down-regulating RhoC and FZD4. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(1): 244-53.
- Gu Y, Cheng Y, Song Y, Zhang Z, Deng M, Wang C, *et al.* MicroRNA-493 suppresses tumor growth, invasion and metastasis of lung cancer by regulating E2F1. *PLoS One* 2014; 9(8): e102602.
- Wang Z, Liao H, Deng Z, Yang P, Du N, Zhanng Y, *et al.* miR-NA-205 affects infiltration and metastasis of breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441(1): 139-43.
- Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451(7175): 147-52.
- Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle* 2008; 7(16): 2493-9.
- Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, Wang XN, Huang J, Zhao JJ, *et al.* miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met. *Cancer* 2011; 117(13): 2842-52.
- Zhang J, Kong X, Li J, Luo Q, Li X, Shen L, *et al.* miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. *Oncol Rep* 2014; 31(3): 1357-63.
- Kitade Y, Akao Y. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: MicroRNAs, miR-143 and -145, function as anti-oncomirs and the application of chemically modified miR-143 as an anti-cancer drug. *J Pharmacol Sci* 2010; 114(3): 276-80.
- Khan S, Brougham CL, Ryan J, Sahrudin A, O'Neill G, Wall D, *et al.* miR-379 regulates cyclin B1 expression and is decreased in breast cancer. *PLoS One* 2013; 8(7): e68753.
- Liang Z, Li Y, Huang K, Wagar N, Shim H. Regulation of miR-19 to breast cancer chemoresistance through targeting PTEN. *Pharm Res* 2011; 28(12): 3091-100.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449(7163): 682-8.
- Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007; 26(19): 2799-803.
- Chen D, Bhat-Nakshatri P, Goswami C, Badve S, Nakshatri H. *ANTXR1*, a stem cell-enriched functional biomarker, connects collagen signaling to cancer stem-like cells and metastasis in breast cancer. *Cancer Res* 2013; 73(18): 5821-33.
- Vargas M, Karamsetty R, Leppla SH, Chaudry GJ. Broad expression analysis of human *ANTXR1*/TEM8 transcripts reveals differential expression and novel splice variants. *PLoS One* 2012; 7(8): e43174.
- van de Vijver MJ, He YD, van'T VL, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(25): 1999-2009.