

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.006

miR-429 对乳腺癌干细胞干性维持和体内成瘤能力的影响 *

程 腾 杜雅莹 张磐石 胡晓鹏 夏文飞[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:探究 miR-429 在乳腺癌干细胞维持中所发挥的作用,并探索 miR-429 对乳腺癌干细胞体内成瘤能力的影响。**方法:**无血清悬浮培养法用于培养经流式细胞仪分选得到的 CD44⁺CD24⁻ 表型乳腺癌细胞系干细胞 MCF-7-S、SKBR3-S、MDA-MB-231-S 及乳腺正常上皮干细胞 MCF-10A-S,实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)用于检测 miR-429 在上述 4 株干细胞中的表达。将包含 miR-429 的重组慢病毒质粒及其阴性对照空载体质粒 vector 分别以病毒:细胞数量为 15:1 的比例感染 MDA-MB-231 细胞,经 2.0 μg/mL 嘌呤霉素筛选,成功构建稳定表达 miR-429 或 vector 的 MDA-MB-231 细胞,经流式分选出上述两株稳转细胞株的 CD44⁺CD24⁻ 表型干细胞 MDA-MB-231-Svector 和 MDA-MB-231-SmiR-429。无血清悬浮培养后,镜下观察过表达 miR-429 对肿瘤球形成能力的影响,流式细胞术检测过表达 miR-429 对 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群比例的影响,Western Blot 检测过表达 miR-429 对乳腺癌干细胞干性相关因子 ALDH1、SOX2 和 Bmi1 蛋白表达的影响,将 MDA-MB-231-Svector 和 MDA-MB-231-SmiR-429 干细胞分别注射到 BALB/c 裸鼠右侧胸壁第二对乳腺脂肪垫中,构建乳腺癌干细胞裸鼠移植瘤模型,观察过表达 miR-429 对裸鼠体内成瘤能力的影响。**结果:**与 MCF-10A-S 相比,miR-429 在 MCF-7-S、SKBR3-S 和 MDA-MB-231-S 细胞系中的表达水平均异常降低,其中,miR-429 在 MDA-MB-231-S 细胞中表达最低($P<0.05$)。与 MDA-MB-231-Svector 细胞相比,经流式分选后的 CD44⁺CD24⁻ 表型 MDA-MB-231-SmiR-429 干细胞形成的肿瘤球的大小和数量、分选时 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的比例、ALDH1、SOX2 和 Bmi1 的蛋白表达水平以及裸鼠体内成瘤的体积和重量均显著降低($P<0.05$)。**结论:**miR-429 可降低乳腺癌干细胞的干性和体内成瘤能力,其可能是抑制乳腺癌转移和耐药的关键分子。

关键词:乳腺癌;干细胞;成球能力;CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群;体内成瘤

中图分类号:R-33; R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)13-2429-05

Effects of miR-429 on Stemness Maintenance and Tumorigenesis in Vivo of Breast Cancer*

CHENG Teng, DU Ya-ying, ZHANG Pan-shi, HU Xiao-peng, XIA Wen-fei[△]

(Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of miR-429 in the stemness maintenance of breast cancer and explore the effect of miR-429 on tumorigenic ability in vivo of breast cancer stem cells. **Methods:** The CD44⁺CD24⁻ phenotype breast cancer stem cells MCF-7-S, SKBR3-S, MDA-MB-231-S and normal mammary gland stem cells MCF-10A-S sorted by Flow Cytometry were cultured in serum-free suspension culture. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-429 in the above four stem cells. The recombinant lentiviral vector containing miR-429 and its negative control vector were respectively transfected into MDA-MB-231 cells in the ratio of virus/cell number with 15:1, and screened with 2.0 μg/mL puromycin to construct stable expressing miR-429 and vector MDA-MB-231 cells, CD44⁺CD24⁻ phenotype breast cancer stem cells MDA-MB-231-Svector and MDA-MB-231-SmiR-429 were sorted by Flow Cytometry from the above two cells, then the cells were serum-free suspension cultured. In order to assess the effects of miR-429 overexpression in MDA-MB-231 cells, Microscope was used to observe of the mammosphere forming ability, Flow cytometry was used to detect of the percentage of CD44⁺CD24⁻ phenotype cell subsets, Western Blot was used to detect the expression of ALDH1, SOX2 and Bmi1 proteins expression. MDA-MB-231-Svector and MDA-MB-231-SmiR-429 cells were respectively injected into the second pair of breast pat pad on the right side of the chest in BALB/c nude mice to construct the transplanted tumor model of breast cancer stem cells in nude mice. The effects of overexpression miR-429 on the tumorigenic ability in nude mice were observed. **Results:** The expression of miR-429 in MCF-7-S, SKBR3-S and MDA-MB-231-S was significantly lower than that of MCF-10A-S, which was lowest in MDA-MB-231-S ($P<0.05$). The size and number of tumor mammospheres, the proportion of CD44⁺CD24⁻ phenotype cell subsets after sorting, the protein expression levels of ALDH1, SOX2 and Bmi1, the tumor volume and weight in nude from MDA-MB-231-SmiR-429 cells were both significantly less than or lower than that of

* 基金项目:湖北省科技计划基金项目(2014CA1379)

作者简介:程腾(1988-),男,博士,住院医师,从事普外科疾病方面的研究,E-mail: doctorcheng888@126.com

△ 通讯作者:夏文飞(1985-),男,博士,主治医师,从事乳腺癌、肝癌方面的研究,E-mail: xiawenfei@163.com

(收稿日期:2018-11-14 接受日期:2018-12-10)

MDA-MB-231-Svector cells($P<0.05$). **Conclusion:** miR-429 can decrease the stemness and tumorigenicity of breast cancer stem cells and may be a key molecule in breast cancer metastasis and drug resistance.

Key words: Breast cancer; Stem cells; Mammosphere forming ability; CD44⁺CD24⁻phenotype cell subsets; Tumorigenesis in vivo

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2429-05

前言

乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率逐年上升,且发病的年龄也趋于年轻化,虽然乳腺癌的诊疗技术不断提高,乳腺癌可被早期发现并进行有效治疗,但仍然存在复发、转移和治疗耐药的风险^[1-3]。随着对乳腺癌发病及转移等机制的研究,研究者认为乳腺癌干细胞具有极强的成瘤能力和自我更新能力,并可在促分化条件下产生具腔上皮和肌上皮标记的癌细胞后代,这也是乳腺癌发生复发转移或治疗耐药的关键性因素^[4-5]。目前“以 CD44⁺CD24⁻ 作为细胞表面分子标志物,通过流式细胞分选技术来分选乳腺癌干细胞”为一种常见的乳腺癌干细胞识别和分选的方法^[6]。肿瘤干细胞的干性受多种因素的调控,如肿瘤异质性、肿瘤微环境、DNA 甲基化、组蛋白修饰、微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 等^[7]。其中 miRNAs 是一种非编码小 RNA,其能通过与靶 mRNA 互补配对,抑制蛋白翻译或使 mRNA 降解而调节基因的表达,从而在肿瘤的发生发展中发挥极其重要的生物学作用^[8,9]。有研究显示作为 miR-429 同家族的 miR-200c 可通过抑制 Bmi1、ALDH1、SOX2 等公认的干细胞干性调控相关因子的表达而调控肿瘤干细胞,从而抑制肿瘤的转移、复发或治疗耐药^[10,11],因此我们推测 miR-429 可能也具有类似的干细胞调控作用。鉴于此,本研究从 miR-429 的角度来探究其在乳腺癌干细胞干性维持和体内成瘤能力中的作用,以期望为乳腺癌复发、转移或治疗耐药的患者提供新的临床治疗思路。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

乳腺癌细胞 MCF-10A、MCF-7、SKBR3 和 MDA-MB-231 (中国科学院上海生命科学院生化细胞所),兔抗人 ALDH1、SOX2、Bmi1 单克隆抗体、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体 (美国 CST 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (武汉博士德公司),FITC 标记 CD24 抗人抗体、PE 标记 CD44 抗人抗体 (美国 BD 公司),miR-429 慢病毒载体质粒及对照空载体质粒 vector (美国 GeneCopoeia 公司),Lipofectamine 2000 转染试剂、Trizol 试剂 (自美国 Invitrogen 公司),RNA 抽提试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司),TaqMan 逆转录试剂盒 (英国 Life Technologies 公司),qSYBR-Green-containing PCR 试剂盒 (美国 Qiagen 公司),蛋白提取试剂盒、ECL 增强化学发光试剂盒和 BCA 蛋白定量检测试剂盒 (美国 Thermo 公司),ChemiDoc™ 触摸成像系统 (美国 Bio-Rad 公司),奥林巴斯倒置显微镜 OLYMPUS IX71 (日本 Olympus 公司),流式细胞分选仪 (美国 BD 公司),紫外可见分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

1.2 贴壁细胞和肿瘤球培养

贴壁细胞的培养:乳腺癌细胞 MCF-10A 培养于含 10% 马

血清、1 mg 表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF)、100 mg 胰岛素、2 mg 霍乱毒素的 DMEM-F12 (1:1) 培养基;MCF-7、SKBR3 和 MDA-MB-231 均培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。

肿瘤球培养:无血清培养基由 DMEM-F12(1:1)500 mL、B27(1:50)10 mL、EGF(20 ng/mL)1 mL 和碱性成纤维细胞生长因子 (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)(20 ng/mL)500 μ L (Gibco, USA) 组成。由贴壁细胞 MCF-7、SKBR3、MDA-MB-231 及 MCF-10A 经流式分选出的 CD44⁺CD24⁻ 表型的干细胞分别为 MCF-7-S、SKBR3-S、MDA-MB-231-S 及 MCF-10A-S,用于实验结果 2.1 部分的实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测。由转染 vector 或 miR-429 的 MDA-MB-231 稳转细胞株所分选出的 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的干细胞分别为 MDA-MB-231-Svector 和 MDA-MB-231-SmiR-429,用于实验结果 2.2、2.3 和 2.4 部分的检测。所有干细胞均培养于含无血清培养基的低吸附六孔板 (Corning, USA) 中。

统计肿瘤球数量的方法:经流式分选后的干细胞,于无血清培养基中培养一周后,镜下观察,每次实验随机选取不同视野拍照 3 次,统计微尺数大于 100 μ m 的细胞球 (每次实验重复 3 次)。

1.3 建立稳定表达 miR-429 及 vector 的细胞株

含 miR-429 的重组慢病毒质粒及其阴性对照慢病毒空载体质粒 vector, 分别 (病毒:细胞数量 = 15:1) 感染 MDA-MB-231 细胞,72h 后,更换含 2.0 μ g/mL 嘌呤霉素的培养基,继续培养。至所有细胞均观察到绿色荧光时,即成功构建稳定表达 miR-429 及 vector 的细胞株。

1.4 流式细胞术检测和分选 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群

收集细胞进行细胞计数,室温离心 (1000 rpm, 5min) 后, PBS 洗涤细胞沉淀 2 次后,调整细胞浓度为 5×10^5 ,将细胞悬液平均转移至 2 支流式管中,其中一份加入 10 μ L CD24-FITC 及 CD44-PE 抗体,另一份中加入 10 μ L FITC 及 PE 标记的对照抗体。室温孵育 20 min,将标记后的细胞离心 (1000 rpm, 5 min) 弃上清,取沉淀, PBS 清洗一次,上机检测 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的比例,分选出 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群,用于后续研究。

1.5 RNA 提取和 qRT-PCR 检测

收集细胞,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,并检测 RNA 浓度和纯度 (OD260/OD280),严格参照逆转录试剂盒说明书,将 RNA 逆转录为 cDNA。miR-429 及内参 U6 引物由 Invitrogen 公司合成,严格参照 qSYBR-Green-containing PCR 试剂盒说明书进行操作,设置三个复孔。miR-429 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.6 蛋白提取和 Western Blot 检测

提取细胞总蛋白,严格参照蛋白提取试剂盒说明书进行操作。测定蛋白浓度,严格参照 BCA 蛋白定量检测试剂盒说明书

进行操作。10% SDS-PAGE 分离蛋白,每组设置 3 个复孔,湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜,5% BSA 室温封闭 1 h。分别加入一抗孵育液(稀释比例 1:1000),4℃孵育过夜。TBST 洗涤 $3 \times 10 \text{ min}$,加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 $3 \times 10 \text{ min}$ 。ECL 发光液, ChemiDoc™ 成像系统,进行曝光并采集图像。目的蛋白相对表达水平,以灰度比值表示。

1.7 移植瘤裸鼠模型

实验用 BALB/c 免疫缺陷型裸鼠(SPF 级)来源于华中科技大学同济医学院附属同济医院,4-6 周龄,雌性,体重 $19.00 \pm 4.32 \text{ g}$ 。严格按清洁级动物饲养标准进行喂养,饲养环境恒温($22.25 \pm 3.14^\circ\text{C}$)、恒湿($52.56 \pm 2.03\%$),且确保空气洁净层流架内无特定病原体。裸鼠分两组,每组各 5 只,将构建的稳定转染 miR-429 及其阴性对照 vector 的 MDA-MB-231-S 细胞,分别注射到裸鼠右侧胸壁第二对乳腺脂肪垫上,注射前均需充分混匀细胞悬液,每只裸鼠注射体 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液(约含 5×10^5 个细胞)。每日观察瘤体成长情况并记录,四周后处死裸鼠并取出瘤体,称量瘤体的重量,以游标卡尺测量瘤体的长径及短径,计算瘤体的体积 $= (\text{长径} \times \text{短径}^2)/2$,本研究经我院伦理委员会批准且所有操作均符合动物伦理学。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本间比较采用双尾 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。检验标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 乳腺癌干细胞中 miR-429 的表达水平

贴壁细胞 MCF-7、SKBR3、MDA-MB-231 及 MCF-10A 分选出的 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的干细胞分别为 MCF-10A-S、MCF-7-S、SKBR3-S 和 MDA-MB-231-S,经无血清悬浮培养后形成肿瘤球,镜下肿瘤球圆而亮,生长状态良好。qRT-PCR 检测四株干细胞中 miR-429 的表达水平,结果显示:miR-429 在正常乳腺上皮干细胞 MCF-10A-S 以及干细胞 MCF-7-S、SKBR3-S 和 MDA-MB-231-S 中的表达水平分别为 (1.13 ± 0.23) 、 (0.73 ± 0.24) 、 (0.58 ± 0.31) 、 (0.33 ± 0.09) ,与正常乳腺上皮干细胞 MCF-10A-S 相比,miR-429 在干细胞 MCF-7-S、SKBR3-S 和 MDA-MB-231-S 中均表达下调($t=2.691$ 、 3.186 、 7.243 , $P=0.027$ 、 0.013 、 0.000)。

2.2 miR-429 对乳腺癌肿瘤球形成能力和 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群比例的影响

为探讨 miR-429 对乳腺癌肿瘤干性的影响,选择 miR-429 表达最低的 MDA-MB-231 细胞进行进一步研究。分别转染 miR-429 慢病毒质粒及其阴性对照 vector 到 MDA-MB-231 细胞中,分选出 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的干细胞 MDA-MB-231-Svector 和 MDA-MB-231-SmiR-429,经无血清悬浮培养后形成细胞球,分别检测过表达 miR-429 对成球能力和 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚型比例的影响。

结果显示:与 MDA-MB-231-Svector 相比,过表达 miR-429 可使 MDA-MB-231-SmiR-429 细胞形成的肿瘤球的大小减小;过表达 miR-429 在 MDA-MB-231-Svector 细胞形成的肿瘤球数量为 (175.36 ± 26.89) 个(每 10^4 个 MDA-MB-231-Svector 或

MDA-MB-231-SmiR-429 细胞所形成的干细胞球的个数),在 MDA-MB-231-SmiR-429 细胞形成的肿瘤球数量为 (79.85 ± 25.74) 个,与 MDA-MB-231-Svector 相比,过表达 miR-429 可使 MDA-MB-231-SmiR-429 细胞形成的肿瘤球数量降低,差异具有统计学意义($t=5.477$, $P=0.041$)。MDA-MB-231-Svector 细胞分选时检出的 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的比例为 $(1.93 \pm 0.08)\%$,MDA-MB-231-SmiR-429 细胞分选时检出的 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的比例为 $(0.56 \pm 0.02)\%$,过表达 miR-429 可使 MDA-MB-231-SmiR-429 细胞分选时检出的 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的比例显著降低,差异具有统计学意义($t=5.143$, $P=0.028$),见图 1。

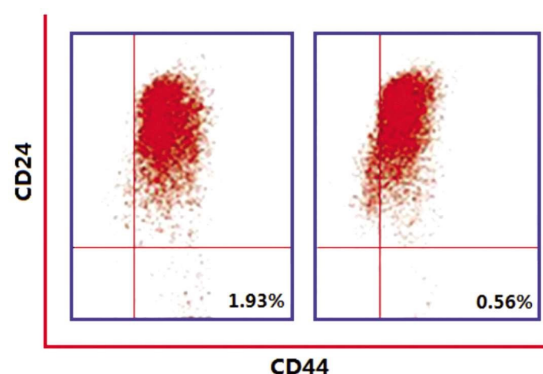


图 1 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群比例图

Fig.1 CD44⁺CD24⁻ ratio of phenotypic cell subsets

2.3 过表达 miR-429 对乳腺癌肿瘤干细胞相关调控因子 ALDH1、SOX2 和 Bmi1 蛋白表达的影响

分别转染 miR-429 慢病毒质粒及其阴性对照 vector 到 MDA-MB-231 细胞中,分选出 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的干细胞 MDA-MB-231-Svector 和 MDA-MB-231-SmiR-429,经无血清悬浮培养后形成细胞球,收集细胞提取蛋白,Western Blot 用以检测 ALDH1、SOX2 和 Bmi1 的蛋白表达。结果显示:在 MDA-MB-231-Svector 细胞中,ALDH1、SOX2 和 Bmi1 的蛋白表达水平分别为 (0.98 ± 0.22) 、 (1.12 ± 0.31) 、 (1.03 ± 0.03) ,在 MDA-MB-231-SmiR-429 细胞中,ALDH1、SOX2 和 Bmi1 的蛋白表达水平分别为 (0.26 ± 0.09) 、 (0.46 ± 0.10) 、 (0.29 ± 0.04) ,与 MDA-MB-231-Svector 细胞相比,MDA-MB-231-SmiR-429 细胞中 ALDH1、SOX2 和 Bmi1 的蛋白表达水平均显著降低($t=6.773$ 、 4.531 、 33.094 , $P=0.000$ 、 0.002 、 0.000),见图 2。

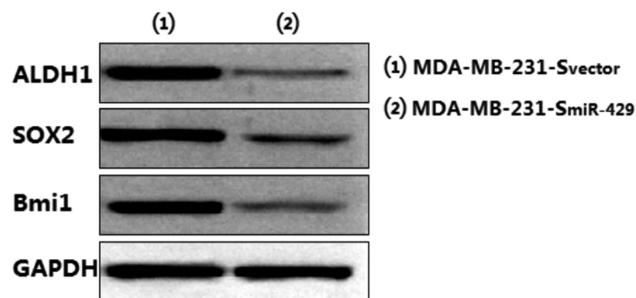


图 2 ALDH1、SOX2 和 Bmi1 的蛋白表达图

Fig.2 Protein expression maps of ALDH1, SOX2 and Bmi1

2.4 过表达 miR-429 对乳腺癌干细胞体内成瘤能力的影响

为评估 miR-429 对乳腺癌干细胞体内成瘤能力的影响。将 MDA-MB-231-Svector 和 MDA-MB-231-SmiR-429 细胞分别注射到裸鼠的脂肪垫上(每组各 5 只),构建裸鼠移植瘤模型,4 周后处死裸鼠并取出瘤体组织,称量重量。结果显示:MDA-MB-231-SmiR-429 组裸鼠成瘤体积为 (602.23 ± 23.89) mm³、重量为 (1.32 ± 0.25) g,MDA-MB-231-Svector 组裸鼠成瘤体积为 (1001.59 ± 29.14) mm³、重量为 (4.86 ± 0.32) g,MDA-MB-231-SmiR-429 组裸鼠成瘤体积($t=5.714, P=0.033$)和重量($t=4.885, P=0.041$)均显著小于 MDA-MB-231-Svector 组。

3 讨论

乳腺癌具有易转移、复发率高的特点,同时乳腺癌的治疗耐药性较强,这些因素导致患者存在一定的死亡风险^[12-14]。随着研究的深入和科学技术的进步,尽管乳腺癌的诊断及治疗已取得巨大进展,但其复发、转移及治疗耐药仍未得到实质性的改善^[15]。研究显示,在肿瘤细胞中存在一群自我分裂和分化能力较强,且能维持肿瘤细胞生长的细胞亚群,此部分细胞被称为肿瘤干细胞^[16,17]。肿瘤干细胞具有先天耐药性,常规化疗药物仅能杀死部分增殖活跃的非肿瘤干细胞,而残留的肿瘤干细胞则是导致肿瘤复发和转移的重要原因^[18-20]。因此肿瘤干细胞可能可以作为肿瘤治疗的重要靶向细胞,并根据靶向肿瘤干细胞寻找出对应的靶点,而后对靶点进行干预以治疗肿瘤。

研究显示 miR-200 家族(miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141、miR-429)在多种恶性肿瘤如乳腺癌、宫颈癌、胃癌等中低表达,miR-200 家族的低表达可引起肿瘤患者的多种临床症状改变,包括肿瘤的复发、转移或耐药^[21-23]。其中 miR-200c 作为 miR-200 家族中研究最为深入的 miRNAs 已被报道其参与了乳腺癌干细胞干性调控,可抑制乳腺癌的复发和转移^[24,25]。我们推测作为 miR-200 家族成员之一的 miR-429 可能也在乳腺癌干细胞的干性维持及体内成瘤中发挥重要作用。本研究通过无血清悬浮培养法,培养经流式细胞仪分选得到的 CD44⁺CD24⁻ 表型的乳腺癌细胞系干细胞 MCF-7-S、SKBR3-S、MDA-MB-231-S 及乳腺正常上皮干细胞 MCF-10A-S,比较 miR-429 在这四株干细胞中的表达特点,结果显示 miR-429 在乳腺癌细胞系干细胞中表达下调,该研究结果与“miR-429 在乳腺癌细胞系中低表达”的研究相一致^[26,27],即 miR-429 在 CD44⁺CD24⁻ 表型的乳腺癌细胞系干细胞中也存在表达下调的现象。

随后,本研究选择 miR-429 表达最低的 MDA-MB-231 细胞,通过转染慢病毒质粒,筛选并构建稳定表达 miR-429 及其阴性对照 vector 的稳转细胞株 MDA-MB-231,并分选出 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的干细胞 MDA-MB-231-Svector 和 MDA-MB-231-SmiR-429,经无血清悬浮培养后形成细胞球,分别检测过表达 miR-429 对成球能力和 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚型的比例的影响,结果发现 miR-429 可显著降低 MDA-MB-231 细胞的肿瘤球形成能力,同时降低 CD44⁺CD24⁻ 表型细胞亚群的比例,抑制干性相关因子的蛋白表达,进而抑制裸鼠的体内成瘤能力,这一结果与“miR-200 家族成员

miR-200c 可通过抑制 Bmi1、Suz12、SOX2 等干细胞干性调控相关因子的表达而调控肿瘤干细胞,从而抑制肿瘤的转移、复发或治疗耐药”^[28-30]相一致。即 miR-429 与 miR-200c 一样,在乳腺癌的干性维持和复发、转移和耐药中发挥重要作用,其可能也有潜力作为乳腺癌治疗的重要靶点,后续将继续研究 miR-429 在乳腺癌干细胞的转移、复发和耐药中的具体作用机制。

综上所述,miR-429 可显著抑制乳腺癌干细胞的生成,进而降低其成瘤能力,因此,研发上调 miR-429 表达的药物将可能为乳腺癌的临床治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Effi AB, Aman NA, Kouli BS, et al. Breast Cancer Molecular Subtypes Defined by ER/PR and HER2 Status: Association with Clinicopathologic Parameters in Ivorian Patients [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(4): 1973-1978
- [2] Denkert C, Loibl S, Budczies J, et al. Standardized determination of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: A prognostic marker for histological diagnosis[J]. Pathologie, 2018, 39(6): 520-531
- [3] Ding W, Li Z, Wang C, et al. Anthracycline versus nonanthracycline adjuvant therapy for early breast cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(42): e12908
- [4] Bosukonda A, Carlson WD. Harnessing the BMP signaling pathway to control the formation of cancer stem cells by effects on epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(1): 223-228
- [5] Shah M, Cardenas R, Wang B, et al. HOXC8 regulates self-renewal, differentiation and transformation of breast cancer stem cells [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 38
- [6] Le Gallo M, de la Motte Rouge T, Poissonnier A, et al. Tumor analysis: freeze-thawing cycle of triple-negative breast cancer cells alters tumor CD24/CD44 profiles and the percentage of tumor-infiltrating immune cells[J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1): 401
- [7] Shima H, Yamada A, Ishikawa T, et al. Are breast cancer stem cells the key to resolving clinical issues in breast cancer therapy?[J]. Gland Surg, 2017, 6(1): 82-88
- [8] Masuda T, Shinden Y, Noda M, et al. Circulating Pre-microRNA-488 in Peripheral Blood Is a Potential Biomarker for Predicting Recurrence in Breast Cancer [J]. Anticancer Res, 2018, 38 (8): 4515-4523
- [9] Chu J, Li Y, Fan X, et al. MiR-4319 Suppress the Malignancy of Triple-Negative Breast Cancer by Regulating Self-Renewal and Tumorigenesis of Stem Cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(2): 593-604
- [10] Song C, Liu LZ, Pei XQ, et al. miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS[J]. Oncotarget, 2015, 6(33): 34968-34978
- [11] Wang Q, Cheng Y, Wang Y, et al. Tamoxifen reverses epithelial-mesenchymal transition by demethylating miR-200c in triple-negative breast cancer cells[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 492
- [12] 李稳,马欣,汪静,等.长链非编码 RNA 在乳腺癌中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(21): 4174-4176, 4180
- [13] Liang Y, Yi L, Liu P, et al. CX3CL1 involves in breast cancer metastasizing to the spine via the Src/FAK signaling pathway [J]. J Cancer, 2018, 9(19): 3603-3612

- [14] Kang SH, Cho J, Jeong H, et al. High RNA-binding Motif Protein 3 Expression Is Associated with Improved Clinical Outcomes in Invasive Breast Cancer[J]. *J Breast Cancer*, 2018, 21(3): 288-296
- [15] Deng YW, Hao WJ, Li YW, et al. Hsa-miRNA-143-3p Reverses Multidrug Resistance of Triple-Negative Breast Cancer by Inhibiting the Expression of Its Target Protein Cytokine-Induced Apoptosis Inhibitor 1 In Vivo[J]. *J Breast Cancer*, 2018, 21(3): 251-258
- [16] Feng Y, Spezia M, Huang S, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis[J]. *Genes Dis*, 2018, 5(2): 77-106
- [17] Lan J, Lu H, Samanta D, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(41): E9640-E9648
- [18] Chu J, Li Y, Fan X, et al. MiR-4319 Suppress the Malignancy of Triple-Negative Breast Cancer by Regulating Self-Renewal and Tumorigenesis of Stem Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(2): 593-604
- [19] Ashour F, Awwad MH, Sharawy HEL, et al. Estrogen receptor positive breast tumors resist chemotherapy by the overexpression of P53 in Cancer Stem Cells [J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2018, 30(2): 45-48
- [20] Zhou B, Jin Y, Zhang D, et al. 5-Fluorouracil may enrich cancer stem cells in canine mammary tumor cells in vitro[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7987-7992
- [21] Dimri M, Cho JH, Kang M, et al. PLK1 inhibition down-regulates polycomb group protein BMI1 via modulation of the miR-200c/141 cluster[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(5): 3033-3044
- [22] Li X, Roslan S, Johnstone CN, et al. MiR-200 can repress breast cancer metastasis through ZEB1-independent but moesin-dependent pathways[J]. *Oncogene*, 2014, 33(31): 4077-4088
- [23] Xu F, He H, Huang W, et al. Decreased expression of MicroRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(3): 283-288
- [24] Lu YX, Yuan L, Xue XL, et al. Regulation of colorectal carcinoma stemness, growth, and metastasis by an miR-200c-Sox2-negative feedback loop mechanism[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(10): 2631-2642
- [25] Liu CM, Peng CY, Liao YW, et al. Sulforaphane targets cancer stemness and tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas via miR-200c induction [J]. *J Formos Med Assoc*, 2017, 116(1): 41-48
- [26] Sun X, Li Z, Chen Y. The Potential Prognostic Value of MicroRNA-429 for Human Gliomas [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2016, 46(1): 44-48
- [27] Watson KL, Jones RA, Bruce A, et al. The miR-200b/200a/429 cluster prevents metastasis and induces dormancy in a murine claudin-low mammary tumor cell line[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 369(1): 17-26
- [28] Kong X, Ding X, Li X, et al. 53BP1 suppresses epithelial-mesenchymal transition by downregulating ZEB1 through microRNA-200b/429 in breast cancer[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(8): 982-989
- [29] Ye ZB, Ma G, Zhao YH, et al. miR-429 inhibits migration and invasion of breast cancer cells in vitro [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(2): 531-538
- [30] Kim ES, Choi YE, Hwang SJ, et al. IL-4, a direct target of miR-340/429, is involved in radiation-induced aggressive tumor behavior in human carcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 86836-86856

(上接第 2505 页)

- [20] Sicras A, Huerta A, Navarro R, et al. Use of resources and associated costs of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: A population based retrospective study [J]. *Egyptian Journal of Chest Diseases & Tuberculosis*, 2016, 40(4): 189-197
- [21] Cosio B G, Soriano J B, Lópezcampos J L, et al. Defining the Asthma-COPD Overlap Syndrome in a COPD Cohort[J]. *Chest*, 2016, 149(1): 45-52
- [22] Sin D D, Miravittles M, Mannino D M, et al. What is asthma-COPD overlap syndrome? Towards a consensus definition from a round table discussion[J]. *European Respiratory Journal*, 2016, 48(3): 664
- [23] Tinkelman D G, Price D B, Nordyke R J, et al. Misdiagnosis of COPD and asthma in primary care patients 40 years of age and over [J]. *J Asthma*, 2006, 43(1): 75-80
- [24] Pavord I D, Lettis S, Locantore N, et al. Blood eosinophils and inhaled corticosteroid/long-acting β -2 agonist efficacy in COPD[J]. *Thorax*, 2016, 71(2): 118-125
- [25] Hollander C, Sitkauskienė B, Sakalauskas R, et al. Serum and bronchial lavage fluid concentrations of IL-8, SLPI, sCD14 and sICAM-1 in patients with COPD and asthma [J]. *Journal of Hunan Normal University*, 2016, 101(9): 1947-1953
- [26] Tho N V, Park H Y, Nakano Y. Asthma-COPD overlap syndrome (ACOS): A diagnostic challenge[J]. *Respirology*, 2016, 21(3): 410-418
- [27] Bozinovski S, Vlahos R, Anthony D, et al. COPD and squamous cell lung cancer: aberrant inflammation and immunity is the common link [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 635-648
- [28] van Boven J F, Románrodríguez M, Palmer J F, et al. Comorbidome, pattern and impact of asthma-COPD overlap syndrome (ACOS) in real-life[J]. *Chest*, 2016, 149(4): 1011-1020
- [29] Maddocks M, Kon S S, Canavan J L, et al. Physical frailty and pulmonary rehabilitation in COPD: a prospective cohort study [J]. *Thorax*, 2016, 71(11): 988-995
- [30] Karloh M, Mayer A F, Maurici R, et al. The COPD Assessment Test: What Do We Know So Far?: A Systematic Review and Meta-Analysis About Clinical Outcomes Prediction and Classification of Patients Into GOLD Stages[J]. *Chest*, 2016, 149(2): 413-425