

抑制小鼠乳腺肿瘤转移 microRNA 的筛选

张 丽, 李 小 颖, 孙 彩 显, 张 旭, 陈 炜, 张 连 峰

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 鉴定 25 种 microRNA 的功能及其在乳腺癌中发挥的作用, 以筛选新的抑制乳腺癌转移的 microRNA 分子。方法 利用脂质体 2000 将 25 种鼠源 microRNA 表达载体转染至 4T07 细胞, 经 G418 筛选结合流式细胞仪分选获绿色荧光细胞得稳定表达鼠源 microRNA 的细胞株。将细胞 2×10^5 个/只尾静脉注射接种于 BALB/C 小鼠, 14 d 后解剖分离肺组织, 统计小鼠肺组织结节数目。结果 和接种阴性对照细胞小鼠相比, 接种 mir-449a 稳转细胞的小鼠肿瘤肺转移减少。而接种 mir-1935 稳转细胞的小鼠肿瘤肺转移增多。其它 23 种 microRNA 稳转细胞接种小鼠肿瘤肺转移既不增加也不减少。结论 从 25 种鼠源 microRNA 中筛选到 2 种与乳腺癌肿瘤转移相关的 microRNA: mir-449a 抑制乳腺癌细胞肺转移, mir-1935 则促进癌细胞肺转移。

【关键词】 4T07; 乳腺癌; 小 RNA; 转移; 尾静脉注射

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0072-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.003.015

The study of screening breast tumor suppressor microRNA in mice

ZHANG Li, LI Xiao-ying, SUN Cai-xian, ZHANG Xu, Chen Wei, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the functional role of 25 microRNAs in breast cancer, and to find new tumor suppressor microRNAs that may serve as specific targets of new gene therapies. **Methods** Twenty-five microRNAs expression vectors were constructed and stably transfected into mouse mammary tumor cells 4To7 by Lipofectamine2000. Cells were selected with G418 and sorted by Flow cytometry. The cells in logarithmic phase were collected and 2×10^5 cells/mouse was inoculated into BALB/c mice via tail vein. Lungs were harvested 14 days after tumor cell inoculation, and the number of metastasis foci was counted. **Results** Mice inoculated with mir-449a-expressing 4To7 cells via tail vein developed reduced lung metastases compared with mice inoculated with negative control cells. Mice inoculated with mir-1935-expressing 4To7 cells via tail vein developed increased lung metastases compared with mice inoculated with negative control cells. Other twenty-three microRNAs neither promoted nor inhibited lung metastases of breast cancer. **Conclusions** Two of twenty-five microRNA were identified to be associated with breast cancer metastasis. MiR-449a may play a tumour suppressor role in the regulation of migration and metastasis in breast cancer. miR-1935 transgenic over-expression promoted tumor growth and metastasis.

【Key words】 4T07; Breast cancer; Micro RNA; Metastasis; Tail intravenous injection

【基金项目】 国家“重大新药创制”科技重大专项课题“啮齿类研发平台创新药物研究开发技术平台建设”(2011ZX09307-302); 国家科技支撑计划课题“神经和代谢疾病基因工程模型的建立”(2012BAI39B02)。

【作者简介】 张丽, 女, 博士, E-mail: zhangliqq2004@126.com。

【通讯作者】 张连峰, E-mail: Zhanglf@cnilas.org。

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。据美国癌症协会统计数据,美国每年有 23 万乳腺癌新发病例,2012 年死亡人数为 4 万。我国属女性乳腺癌的低发国,但近年来乳腺癌的发病率明显增高,跃居女性恶性肿瘤中的第一位,明显高于其它癌症的发病率。并以每年 2%~3% 的增长速率递增,严重危害女性的生命和健康。

乳腺癌患者 50% 经手术治疗后可治愈,50% 患者在治疗后 5 年内出现复发转移,其中 30% 左右发生转移导致死亡,乳腺癌转移是导致患者死亡的主因。乳腺癌转移好发的部位依次是肺、骨和脑等。转移的恶性肿瘤往往对于传统的肿瘤疗法具有耐受性,且在临床上不可治愈,因此迫切需要深入研究参与肿瘤转移的内在的分子机制。

microRNA(miRNA)是一类长约 19-23nt 的单链非编码 RNA,miRNA 与其靶 mRNA 的 3'-UTRs(3' 非编码区)特异性结合,引起靶 mRNA 的翻译抑制或切割降解。miRNA 直接作用于约 30% 的人类基因,而且几乎参与所有的生物过程,包括细胞生长、细胞周期调控、细胞凋亡、分化以及应激反应等。在过去的五年里,一系列参与调节肿瘤转移尤其是乳腺癌转移调节的 miRNA 被发现,如 miR-10b^[1], miR-335^[2], miR-373 和 miR-520^[3]。此外,miR-200 和 let-7 家族也参与肿瘤的转移调节^[4-6]。研究发现,在乳腺癌细胞发展具备转移特性时,一系列的 miRNAs 的表达丢失,如 miR-335, miR-206, miR-126^[2], miR-31^[7], miR-340^[8]等,而恢复其表达则抑制肿瘤细胞的侵袭和转移,反之则会促进转移。

迄今为止,尽管多种 miRNA 的癌基因功能以及抑制肿瘤作用已经被阐明,但是肿瘤转移相关的基因和 miRNA 之间错综复杂的相互作用关系还没有真正清楚,而且目前 miRNA 靶点治疗还没有获得成功^[9]。因此,通过诱导 miRNA 分子在肿瘤细胞中的表达,可以寻找新的抗肿瘤细胞生长和迁移的 miRNA 分子靶点,发现更多与乳腺癌肿瘤转移相关 miRNA,从而为乳腺癌的治疗提供新的思路。

我室购买了 500 种 miRNA 前体表达质粒库,因此可以进行大规模的乳腺癌肿瘤转移相关 miRNA 筛选。目前,我们已经通过向小鼠乳腺癌 4T07 细胞转染 miRNA 表达载体的方法,获得 50 种稳定表达 miRNA 的乳腺肿瘤细胞克隆,并比较了其中 25 种 miRNA 过表达对尾静脉移植瘤生长的抑制或促进作用,初步筛选得到一种肿瘤转移抑制 miRNA 和

一种肿瘤转移促进 miRNA,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 鼠源 miRNA 表达载体构建及质粒制备

鼠源 miRNA 表达载体库购自傲锐东源(OriGene Technologies),25 条 miRNA 前体名称及功能见表 1(序列参见 miRBase)携带 SgfI 和 MluI 酶切位点,被克隆到 pCMV-MIR 载体的 CMV 启动子下游。miRNA 前体序列长度约 600 bp,包含 60-70 nt 的 pre-miRNA 且携带上下游 250-300 nt 的侧翼序列。经测序并比对正确无突变碱基后,质粒小提,醋酸钠无水乙醇沉淀,质粒终浓度达 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以上,用于细胞转染实验。

1.2 细胞培养

小鼠乳腺癌细胞 4T07 由实验室冻存,用含 10% 胎牛血清(PAA)、100 IU/mL 青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM(GIBCO 公司)培养基作为 4T07 细胞的培养液,于 5% CO_2 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内常规培养。

采用脂质体 2000(Invitrogen 公司)转染 4T07 细胞(具体转染步骤参照脂质体 2000 操作说明)。转染后 24 h,1:10 传代,用含 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418(AMRESCO 公司)的培养液筛选细胞 2 周,倒置显微镜(Nikon TS100)下挑选绿色荧光克隆进行扩大培养,流式细胞仪分选绿色荧光标记稳定表达 MicroRNAs 细胞,并扩大培养。

1.3 实验动物

BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司 SCXK(京)2007-0001,雌性,体重 18~20 g,在本实验室无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)的饲养间(SYXK(京)2009-0003)饲养。所有实验操作程序均经过实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准(批准号为 ILAS-GC-2012-001)。

1.4 尾静脉注射接种 BALB/c 小鼠

取对数生长期的转染空载体的 4T07 细胞及稳定表达 miRNA 的 4T07 细胞,分别调整细胞浓度至 2×10^6 cells/mL。每只 BALB/c 小鼠尾静脉接种 0.1 mL 单细胞悬液。小鼠模型分两组,每组 3~6 只。阴性对照组,转染 pCMV-MIR 空载体;阳性组,转染 miRNA 表达载体。

1.5 观察尾静脉移植瘤生长情况

接种 14 d 后牺牲动物,解剖分离肺组织,观察肿瘤的生长及转移情况,计数并进行统计学分析。

2 结果

2.1 25 种 miRNA 表达载体的构建

25 条鼠源 miRNA 前体(表 1)携带 SgfI 和 MluI 酶切位点,被克隆到 pCMV-MIR 载体的 CMV 启动子下游(图 1),在转染过程中,细胞内将以 CMV 启动子驱动 miRNA 前体表达为成熟 miRNA,发挥其相应的细胞学功能性。这些 miRNA 前体根据其功能及与肿瘤的关系密切程度可以分为三类:已经被实验验证与癌症关系密切的 7 种 miRNA 分子如 mir-133a-1、mir-148a、mir-24-2、mir-375、mir-376、mir-421、mir-449a;与癌症关系未知的 12 种 miRNA 分子如 mir-1-2-as、mir-466d、mir-467e、mir-487b、mir-546、mir-568、mir-654、mir-668、mir-682、mir-692-2、mir-763、mir-764 等;还有最近新发现的 6 种 miRNA 分子包括 mir-1193、mir-1895、mir-1902、mir-1931、mir-1935、mir-1940 等。

2.2 25 种 miRNA 的稳定转染细胞系的建立

经过转染,G418 筛选结合流式细胞仪分选获得

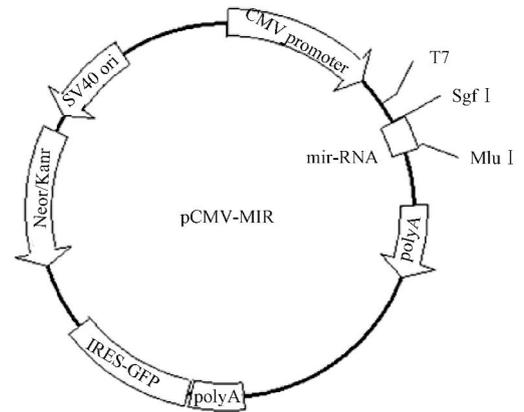


图 1 miRNA 表达载体的构建

Fig. 1 The construction of miRNA expression vectors

表达 25 种 miRNA 的混合细胞克隆,经过多次传代荧光强度稳定,miRNA 稳转细胞的形态、生长方式、生长速度等与转染对照质粒的细胞无明显差异。将细胞扩大培养用于 BALB/c 小鼠尾静脉注射。其对照细胞及三类 miRNA 的稳转细胞系(彩插 5 图 2)。

表 1 25 种鼠源 microRNAs 及涉及肿瘤
Tab. 1 25 mouse microRNAs and related cancer

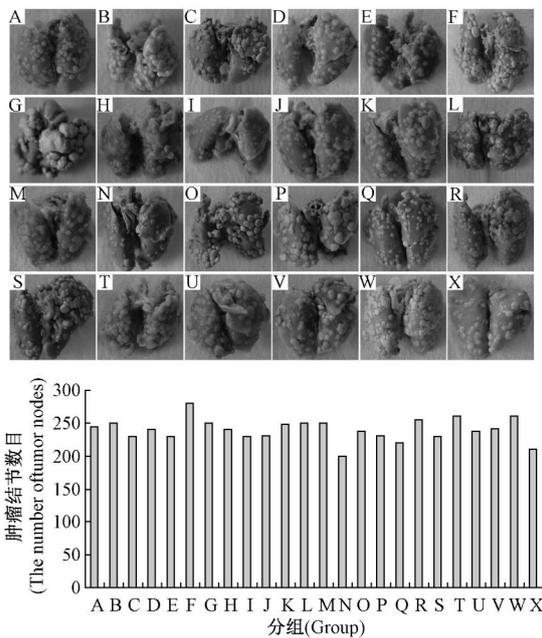
编号 ID	鼠源 miRNA Mouse miRNA	对应人源 miRNA Human miRNA	涉及肿瘤或者细胞系 Related cancer or cell lines	表达 Expression	在肿瘤转移过程 中的作用 Function
SC400736	mir-1193	-	-	-	-
SC400759	mir-1-2-as	MIR1-2	-	-	-
SC400764	mir-133a-1	MIR133A1	肺、舌、食管鳞状细胞癌,上颌窦鳞癌	下调	诱导凋亡,抑制细胞迁移与侵袭 ^[10]
SC400785	mir-148a	MIR148a	胃肠道癌	下调	抑制细胞迁移与侵袭 ^[11]
SC400816	mir-1895	-	-	-	-
SC400826	mir-1902	-	-	-	-
SC400840	mir-1931	-	-	-	-
SC400844	mir-1935	-	-	-	-
SC400852	mir-1940	-	-	-	-
SC400937	mir-24-2	MIR24-2	MCF-7 乳腺癌细胞	下调	诱导凋亡 ^[12]
SC401020	mir-375	MIR375	头颈癌、宫颈癌、食管癌和胃癌	下调	肿瘤抑制子 ^[13]
SC401021	mir-376a	MIR376A1	痣和黑色素瘤	下调	抑制增殖诱导凋亡 ^[14]
SC401036	mir-421	MIR421	胃癌、鼻咽癌	上调	诱导增殖抵抗凋亡 ^[15]
SC401044	mir-449a	MIR449a	前列腺癌、胃癌、肝癌和肺癌	下调	抑制增殖诱导凋亡 ^[16-20]
SC401066	mir-466d	-	-	-	-
SC401082	mir-467e	-	-	-	-
SC401094	mir-487b	MIR487B	-	-	-
SC401119	mir-546	-	-	-	-
SC401122	mir-568	MIR568	-	-	-
SC401131	mir-654	MIR568	-	-	-
SC401135	mir-668	MIR668	-	-	-
SC401168	mir-682	-	-	-	-
SC401182	mir-692-2	-	-	-	-
SC401220	mir-763	-	-	-	-
SC401221	mir-764	-	-	-	-

注: -,无。Note: -,no.

2.3 miRNA 过表达对乳腺癌细胞系尾静脉移植瘤生长的调节

2.3.1 23 种 miRNA 过表达对乳腺癌细胞肺转移无明显的抑制或者促进作用

将对数生长期的稳定表达 miRNA 的 4TO7 细胞和稳定表达对照载体的 4TO7 细胞分别对 BALB/c 小鼠进行尾静脉接种。14 d 后,脱颈处死,解剖取材,统计肺部肿瘤结节数目。结果发现,和对照组相比,阳性组的小鼠肺组织结节数目没有明显的增加或者减少,因此这些 miRNA 过表达对肿瘤细胞的肺转移无明显的抑制或者促进作用(图 3)。



注:A-X 分别为 4To7 (n=6)、mir-1193 (n=3)、mir1-2-as (n=5)、mir-133a-1 (n=3)、mir-148a (n=6)、mir-1895 (n=4)、mir-1902 (n=3)、mir-1931 (n=6)、mir-1940 (n=6)、mir-24-2 (n=6)、mir-375 (n=6)、mir-376a (n=6)、mir-421 (n=5)、mir-466d (n=5)、mir-467e (n=6)、mir-487b (n=6)、mir-546 (n=6)、mir-568 (n=3)、mir-654 (n=6)、mir-668 (n=3)、mir-682 (n=6)、mir-692-2 (n=6)、mir-763 (n=3) 和 mir-764 (n=6)。

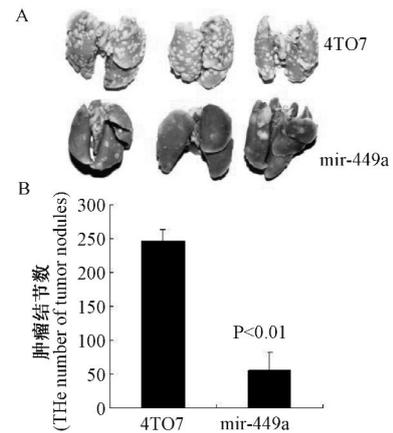
图 3 23 种 miRNA 对乳腺癌肺转移无明显的抑制或者促进作用

Note: A-X were 4To7 (n=6)、mir-1193 (n=3)、mir1-2-as (n=5)、mir-133a-1 (n=3)、mir-148a (n=6)、mir-1895 (n=4)、mir-1902 (n=3)、mir-1931 (n=6)、mir-1940 (n=6)、mir-24-2 (n=6)、mir-375 (n=6)、mir-376a (n=6)、mir-421 (n=5)、mir-466d (n=5)、mir-467e (n=6)、mir-487b (n=6)、mir-546 (n=6)、mir-568 (n=3)、mir-654 (n=6)、mir-668 (n=3)、mir-682 (n=6)、mir-692-2 (n=6)、mir-763 (n=3) and mir-764 (n=6).

Fig.3 Twenty-three microRNAs neither inhibited nor promoted lung metastases of breast cancer

2.3.2 mir-449a 抑制尾静脉移植瘤生长

将对数生长期的转染阴性对照载体的 4TO7 细胞和稳定表达 mir-449a 的 4TO7 细胞分别对 BALB/c 小鼠进行尾静脉接种。14 d 后,脱颈处死,解剖取材,统计肺部肿瘤结节数目。结果发现,和对照组相比,阳性组即接种表达 mir-449a 的乳腺肿瘤细胞的小鼠肺组织结节数目显著减少,转移程度降低(图 4)。



注:A:对照细胞尾静脉移植瘤和 mir-449a 过表达 4TO7 细胞尾静脉移植瘤; B:与对照组相比, mir-449a 表达组肿瘤结节数目显著减少。

图 4 mir-449a 过表达抑制肿瘤转移

Note: A, Tail vein xenografted tumors of control cells and cells expressing mir-449a; B, The number of metastasis foci in the lungs from mice inoculated with mir-449a-expressing 4To7 cells via tail vein was significantly decreased compared with mice inoculated with negative control cells.

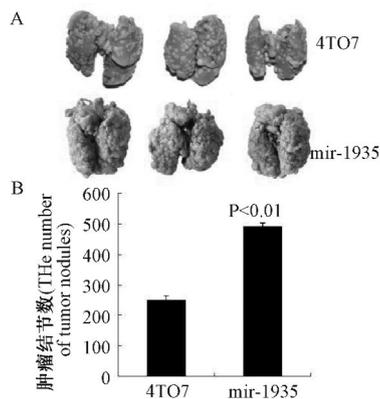
Fig.4 mir-449a over-expression inhibited tumor cell metastasis

2.3.3 miR1935 促进尾静脉移植瘤生长

将对数生长期的稳定表达 miR-1935 的 4TO7 细胞和稳定表达阴性对照载体的 4TO7 细胞分别对 BALB/c 小鼠进行尾静脉接种。14 d 后,脱颈处死,解剖取材,统计肺部肿瘤结节数目。结果发现,和对照组相比,阳性组即接种表达 mir-1935 的乳腺肿瘤细胞的小鼠肺组织结节数目显著增多,转移程度增加(图 5)。

3 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤最重要的生物学特性之一,肿瘤转移机制及抗肿瘤的实验研究不可能完全利用人体活检和尸检材料去完成,必须建立相应的



注:A:对照细胞尾静脉移植瘤和 mir-1935 过表达 4TO7 细胞尾静脉移植瘤;B:与对照组相比, mir-1935 表达组肿瘤结节数目显著增加。

图 5 mir-1935 过表达促进肿瘤转移

Note: A, Tail vein xenografted tumors of control cells and cells expressing mir-1935; B, The number of metastasis foci in the lungs from mice inoculated with mir-1935-expressing 4To7 cells via tail vein was significantly increased compared with mice inoculated with negative control cells.

Fig. 5 mir-1935 over-expression accelerated tumor cell metastasis

动物及人类肿瘤动物转移模型,特别是小鼠模型,这对研究肿瘤的转移机制是极其重要的工具和手段。肿瘤转移动物模型按转移途径可分为血道肿瘤转移动物模型和淋巴道肿瘤转移动物模型。按转移程度还可分为高转移肿瘤转移动物模型(转移率超过 70%)和低转移肿瘤转移动物模型(转移率低于 30%)。李颖等^[21]对三株荧光素酶标记的小鼠乳腺癌细胞在小鼠体内生长及转移进行比较,研究发现来源于 BALB/cF3H 小鼠自发乳腺癌细胞株的 4TO7 细胞转移能力中等,尾静脉注射 14 d,在肺部可见较多肿瘤结节或者转移灶,同时不会因肿瘤结节过多导致动物死亡,可作为研究肿瘤转移的理想细胞模型。因此,本研究选择转移能力中等的 4TO7 细胞通过脂质体转染诱导多种鼠源 miRNA 表达,考察不同的 miRNA 的表达是否对 4TO7 细胞转移特性改变发生影响。

目前,已经有超过 1000 种人类 miRNA 被发现。miRNAs 参与多种生物学功能,如调节细胞发育、分化、增殖、凋亡等。一些 miRNAs 在癌症发生发展中发挥作用,其中一些 miRNA 抑制肿瘤发生,称为 tumor suppressor miRNA (TSmiRs);另一些 miRNA 促进肿瘤发生,则称作 oncogenic miRNAs,即 oncomiRs。Tavazoie SF 等^[2]发现 miR-335、miR-126

和 miR-206 具有肿瘤转移抑制能力,其中 miR-126 能够影响细胞的运动和增殖。miR-335 则通过抑制转录因子 SOX4 的表达抑制乳腺癌转移。由此可见,在肿瘤转移过程中的 miRNA 是重要和多能的,而且 miRNA 复杂的调节网络既可以通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达,也可以通过几个 miRNAs 的组合来精细调控某个基因的表达。因此 TSmiRs 分子具有十分重要的临床使用价值,发现更多与乳腺癌肿瘤转移相关 miRNA,将为乳腺癌的治疗提供更多新的靶点。

mir-449a 在多种固体肿瘤和肿瘤细胞系中低水平表达,包括前列腺癌,胃癌,脾癌和肺癌^[16-20]。Noonan 等^[16]报道 miR-449a 在前列腺癌中低表达,从而导致了前列腺癌细胞中组蛋白脱乙酰基酶-1 (histone deacetylases, HDAC-1) 过表达,而 HDAC-1 是一种原癌基因。这暗示了 mir-449a 可能是一种抑癌基因,其表达异常可能与癌症发生有关。罗等^[20]报道 mir-449a 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 组织和细胞系中表达下调,和淋巴结转移和低生存率相关,在体外实验中可以通过 c-Met 靶点抑制肿瘤迁移和侵袭。迄今为止,还没有 mir-449a 与乳腺肿瘤转移相关的报道。本研究中, mir-449a 过表达的 4TO7 细胞,和对照细胞相比,尾静脉注射产生肺部转移的能力下降,提示 mir-449a 对乳腺肿瘤转移具有抑制作用。与之功能相反的是 mir-1935,在本报道中表现出促进肿瘤转移的作用,目前国际上还没有类似的报道,也缺少对其功能的预测,因此有关其肿瘤转移的调节机制还需深入的研究。

综上所述,本研究首次通过尾静脉移植瘤小鼠模型对鼠源 miRNA 过表达对乳腺肿瘤转移的影响作用进行较大规模筛选,并已经获得初步进展。从 25 种鼠源 miRNA 中筛选到 2 种与乳腺癌肿瘤转移相关的 miRNA: mir-449a 抑制尾静脉移植瘤生长, mir-1935 促进尾静脉移植瘤生长。其余 23 种鼠源 miRNA 对小鼠乳腺癌细胞的转移无明显的促进或者抑制作用。未来我们将继续展开工作,以期获得更多参与乳腺癌转移过程的 miRNA。miRNA 疗法将有可能成为治疗乳腺癌的有效方式,关于 miRNA 新功能的研究,将为乳腺癌的治疗开启一扇新的大门,为乳腺癌患者带来希望。

参考文献:

[1] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumor invasion and

- metastasis initiated by microRNA - 10b in breast cancer [J]. *Nature*, 2007, 449(7163):682 - 688.
- [2] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2008, 451(7175):147 - 152.
- [3] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, *et al.* The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(2):202 - 210.
- [4] Park SM, Gaur AB, Lengyel E, *et al.* The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(7):894 - 907.
- [5] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10:593 - 601.
- [6] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al.* Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. *Cell*, 2007, 131(6):1109 - 1123.
- [7] Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, *et al.* A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis [J]. *Cell*, 2009, 137(6):1032 - 1046.
- [8] Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, *et al.* miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met [J]. *Cancer*, 2011, 1:10.
- [9] Milena S. Nicoloso, Riccardo Spizzo, *et al.* MicroRNAs-the micro steering wheel of tumour metastases [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9:293 - 302.
- [10] Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, *et al.* microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(1):9 - 21.
- [11] Chen Y, Song Y, Wang Z, *et al.* Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance [J]. *J Gastrointest Surg*, 2010, 14(7):1170 - 1179.
- [12] Martin EC, Elliott S, Rhodes LV, *et al.* Preferential star strand biogenesis of pre-miR-24-2 targets PKC-alpha and suppresses cell survival in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53(1):38 - 48.
- [13] Hyun Min Jung, Rushi S. Patel, Brittany L. Phillips, *et al.* Chan Tumor suppressor miR-375 regulates MYC expression via repression of CIP2A coding sequence through multiple miRNA - mRNA interactions [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(11):1638 - 1648.
- [14] Zehavi L, Avraham R, Barzilai A, *et al.* Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11:44.
- [15] Chen L, Tang Y, Wang J, *et al.* MiR-421 induces cell proliferation and apoptosis resistance in human nasopharyngeal carcinoma via downregulation of FOXO4 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(4):745 - 50.
- [16] Noonan EJ, Place RF, Pookot D, *et al.* miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2009, 28:1714 - 1724.
- [17] Bou Kheir T, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, *et al.* miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10:29.
- [18] Chen H, Lin YW, Mao YQ, *et al.* MicroRNA-449a acts as a tumor suppressor in human bladder cancer through the regulation of pocket proteins [J]. *Cancer Lett*, 2012, 320:40 - 47.
- [19] Jeon HS, Lee SY, Lee EJ, *et al.* Combining microRNA-449a/b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76:171 - 176.
- [20] Luo W, Huang B, Li Z, *et al.* MicroRNA-449a is downregulated in non-small cell lung cancer and inhibits migration and invasion by targeting c-Met [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e64759.
- [21] 李颖, 马元武, 张连峰. 三株荧光素酶标记的小鼠乳腺癌细胞在小鼠体内生长及转移的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(4):1 - 4

[修回日期]2014-02-17