

miR-34a 对乳腺癌细胞增殖与侵袭的影响*

冯刚¹,李良平¹,樊友本²,刘志苏^{3△}

(1. 三峡大学附属第一临床医学院/宜昌市中心人民医院甲乳外科,湖北宜昌 443000;2. 上海交通大学附属第六人民医院普通外科,上海 200000;3. 武汉大学中南医院普通外科,武汉 430000)

[摘要] **目的** 研究 miR-34a 对乳腺癌细胞生物学功能的影响及其作用机制,为乳腺癌的诊治提供理论依据。**方法** 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-34a 在乳腺癌细胞系中的表达,CCK8 法、Transwell 实验检测 miR-34a 对乳腺癌细胞增殖、侵袭能力的影响,双荧光素酶法和 Western blot 法对靶基因 Wnt1 进行验证,并检测其下游基因 β -catenin、CyclinD1 的表达。**结果** miR-34a 抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭能力,Wnt1 蛋白为 miR-34a 的直接作用靶点,过表达 miR-34a 可直接抑制 Wnt1 蛋白的表达,下游基因 β -catenin、CyclinD1 也受到抑制。**结论** miR-34a 直接靶向作用于 Wnt1 蛋白从而抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭。

[关键词] 乳腺肿瘤;miR-34a;Wnt1;细胞增殖;肿瘤浸润**[中图分类号]** Q291**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0207-05

Effects of miR-34a on proliferation and invasion of breast cancer cells*

FENG Gang¹, LI Liangping¹, FAN Youben², LIU Zhisu^{3△}

(1. Department of Thyroid Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of China Three Gorges University/Yichang Central People's Hospital, Yichang, Hubei 443000, China; 2. Department of General Surgery, the Sixth Affiliated Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200000, China; 3. Department of General Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression profiles and potential mechanisms of microRNA-34a (miR-34a) on breast cancer cells, and to provide a theoretical basis for diagnosis and treatment of breast cancer. **Methods** Real-time fluorescence quantification PCR was used to detect the expression of miR-34a in breast cancer cells. The effect of miR-34a on the proliferation and invasion of breast cancer cells was detected by CCK8 and Transwell assay. The target gene Wnt1 was verified by dual-luciferase reporter assay and Western blot, and the expressions of its downstream genes β -catenin and CyclinD1 were assessed. **Results** MiR-34a inhibited the proliferation and invasion of breast cancer cells. Wnt1 protein was the direct target of miR-34a. The expression of Wnt1 protein could be inhibited by the overexpression of miR-34a directly. Meanwhile, the expression of its downstream gene β -catenin and CyclinD1 were inhibited as well. **Conclusion** MiR-34a directly targets Wnt1 protein, which suppresses the proliferation and invasion of breast cancer cells.

[Key words] breast neoplasms; miR-34a; Wnt1; cell proliferation; neoplasm invasiveness

乳腺癌是目前女性最为高发的恶性肿瘤之一,近年来,随着现代分子诊断技术的发展,乳腺癌的早期诊断和治疗已取得了实质性的进展,但乳腺癌的难治率和复发率仍然是急需解决的问题^[1-2]。因此,寻找新的可行的乳腺癌诊治方法一直是乳腺癌研究的重点和热点。微小 RNA(miRNA, miR)可通过碱基互补配对原则与特异性靶基因的 3'UTR 配对,从而发挥对靶基因的调节作用,此外 miR 可通过转录调控基因的表达,即对某些 mRNA 产生降解作用从而抑制蛋白质的合成,多项研究表明细胞的增殖凋亡与 miR-34a 相关^[3-5],miR-34a 作为调控网络中的重要分

子涉及肿瘤的发生、发展,但目前关于乳腺癌的相关报道较少,本文检测了 miR-34a 在各种乳腺癌细胞株中的水平,并将 miR-34a 模拟物和抑制剂转染到乳腺癌细胞株中,观察其细胞生物学行为变化,通过生物信息学预测并证实其作用机制,以期为乳腺癌的诊断及靶向治疗提供新方向,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MCF-7、T47D、SK-BR-3 和人乳腺上皮细胞 MCF-10A 均购于武汉大学基础医学院,荧光报告载体

* 基金项目:国家青年科学基金资助项目(81603345)。 作者简介:冯刚(1980-),主治医师,博士,主要从事乳腺癌发病机制研究。

△ 通信作者,E-mail:lzszyy@163.com。

(pLUC)购于美国 Promega 公司。

1.1.2 仪器和试剂 低温高速离心机(Thermo Fisher 公司,美国);二氧化碳培养箱(Thermo Fisher 公司,美国);低温高速离心机(Thermo Fisher 公司,美国);实时荧光定量(RT-PCR)仪(Stratagene 公司,美国);Transwell 小室(Corning 公司,美国);ODYSSEY 双色红外成像系统(LI-COR 公司,美国);BCA 蛋白浓度检测试剂盒(北京天根生物公司,中国);苯甲磺酰氟(PMSF, Sigma 公司,美国);Trizol(Invitrogen 公司,美国);焦碳酸二乙酯(DEPC, Bio Basic 公司,美国);胎牛血清(Gibco 公司,美国);TBST 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,中国);TBS 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,中国);牛血清清蛋白(Sigma 公司,美国);Lipofectamine2000(Invitrogen 公司,美国);双荧光酶报告系统检测试剂盒(Promega 公司,美国);miR-34a 模拟物(Invitrogen 公司,美国);miR-34a 抑制剂(Invitrogen 公司,美国);TaqMan[®] Micro RNA 反转录试剂盒(Life Technologies 公司,美国);TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II(Life Technologies 公司,美国);TaqMan[®] Micro RNA 分析试剂盒(Life Technologies 公司,美国);Wnt1 兔抗人多克隆抗体(Proteintech 公司,美国); β -catenin 兔抗人多克隆抗体(Proteintech 公司,美国);CyclinD1 兔抗人多克隆抗体(Proteintech 公司,美国);荧光报告系统检测仪(Promega 公司,美国);CCK8 试剂盒(上海碧云天生物技术公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 以 $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 个/孔的量取对数期生长细胞铺于 6 孔板中,用无抗生素培养基培养。转染前细胞融合度应达到 50%~60%。无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次除去残余血清。每孔加入无血清 DMEM/F12 培养基 1.5 mL。5 μ L Lipofectamine2000 加入 250 μ L 无血清培养液中,移液器混匀,室温放置 5 min。5 μ L miR-34a 模拟物、抑制剂或其阴性对照加入 250 μ L 无血清培养基中混匀,室温放置 5 min。将上述两种液体混合,混匀室温放置 20 min。500 μ L 混合液加入每孔细胞,摇匀后放于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 环境中培养。转染 6~8 h 后更换含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,细胞继续培养 48 h 后行后续实验。

1.2.2 RNA 提取及 RT-PCR 去培养基后直接加入 Trizol,反复吹打裂解细胞,收集 Trizol 至离心管中,室温放置上述样品液 10 min,每毫升 Trizol 中加入氯仿 200 μ L,剧烈振荡 1 min,室温静置 5 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 冷冻离心 15 min,取出样品吸取上清液约 450 μ L 至含有 600 μ L 冷冻异丙醇的新离心管中,混匀,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 冷冻离心 10 min 去上清液,加入 500 μ L 冷冻的 75%乙醇,弹起沉淀后 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 冷冻离心 5 min,去上清液。风干 5~10 min 加入 DEPC 约 30 μ L, -80 $^{\circ}$ C 保存。分光

光度计 Nanodrop 上测定 RNA 浓度,反转录具体操作步骤按照 TaqMan[®] Micro RNA 反转录试剂盒说明书进行。按照 16 $^{\circ}$ C 30 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min 反应条件进行反转录,将得到的产物保存于 4 $^{\circ}$ C。冰上配制反应体系并加入 8 联排 PCR 管中。按照 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min 反应条件进行反应。miR-34a 正向引物: 5'-GGG TGG CAG TGT CTT AGC T-3', 反向引物: 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'; 内参 U6 正向引物: 5'-GCG CGT CGT GAA GCG TTC-3', 反向引物: 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。每个实验重复 3 次,结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算,用相对定量表示。

1.2.3 CCK-8 法 收集转染后的各组细胞,将细胞制成密度为 2×10^4 个/mL 的单细胞悬液。在 96 孔板中接种单细胞悬液(100 mL/孔),将培养板放于 37 $^{\circ}$ C 孵箱进行培养,每组设 5 复孔,以只加入培养基的培养孔为空白孔,培养 24、48、72、96、120 h 后分别向各孔中加入 CCK-8 溶液 10 μ L,将培养板放入 37 $^{\circ}$ C 孵箱中继续培养 2 h。用酶标仪检测各组细胞吸光度($OD_{450 \text{ nm}}$)。

1.2.4 Transwell 实验 根据公司操作说明书,将小室放入培养板中,在上室加入 300 μ L 预温的无血清培养基,室温下静置 15~30 min,使基质胶水化,再吸去剩余培养液,制备细胞悬液,制备细胞悬液前让细胞在无血清条件下饥饿 12~24 h,消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用 PBS 洗 1~2 遍,用含牛血清清蛋白的无血清培养基重悬。取细胞悬液 100~200 μ L 加入 Transwell 小室上室中,加入 500 μ L 含胎牛血清的培养基于下室,常规培养 12~48 h 后直接计数。

1.2.5 双荧光素酶实验 将报告基因质粒与 miR-34a 模拟物共转染 MCF-7 细胞中,48 h 后收取细胞,吸除培养基,用 1 \times PBS 轻柔洗 2 遍,加入 1 \times 被动裂解液(PLB)反应液 80~10 μ L,每 3~5 分钟摇晃 1 次,室温放置 15 min;将裂解液转移至无菌小管,120 r/min 离心 30 s,取上清液转移至新的无菌小管。将 40 μ L LAR II 加入一次性测量管中,将 10 μ L 细胞裂解液加入其中,混匀,放入荧光仪开始测量,记录萤火虫荧光素酶读数,加入 40 μ L Stop&Glo Reagent,混匀,放入荧光仪开始测量,记录内参海肾荧光素酶读数,继续测量其他样品,计算两种荧光素酶读数的比值,取 3 个平行孔的平均值,并计算标准差。

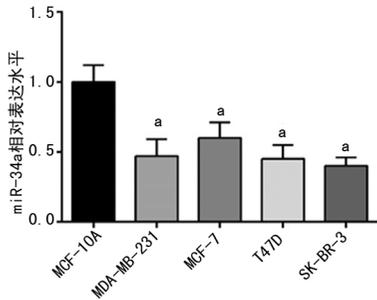
1.2.6 Western blot 实验 将收集的细胞中加入适量 RIPA 裂解液,放置冰上 30 min。期间每 10 min 超声破碎 1 次。4 $^{\circ}$ C 条件下,12 500 r/min 离心 10 min。取上清液,以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。加入上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min,分装保存。接通电源,直至溴酚蓝电泳至分离胶底部,切断电源,取出凝胶,按照蛋白 Marker 指示切下所需部分,开启电源,4 $^{\circ}$ C 条件下转膜 1.5 h 后切断电源。转膜后聚偏氟乙烯(PVDF)膜浸入 5%脱脂牛奶中,置

摇床上室温封闭 2 h,以稀释好的抗体 Wnt1、 β -catenin、CyclinD1、GAPDH 孵育封闭后的 PVDF 膜,4 °C 过夜。将膜取出,TBST 清洗 3 次,每次 10 min,稀释后的荧光二抗工作液 37 °C 孵育 40 min。TBS 再次清洗 3 次,每次 10~15 min。ODYSSEY 双色红外成像系统扫描成像并计算灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34a 在乳腺癌细胞中的表达水平 取正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 中 miR-34a 的表达量为 1,得出乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MCF-7、T47D、SK-BR-3 中 miR-34a 的相对表达水平,可见 miR-34a 在多个乳腺癌细胞系中水平均显著下调($t = 5.34, t = 3.75, t = 6.23, t = 6.91, P < 0.05$),见图 1。



a: $P < 0.05$, 与 MCF-10A 比较

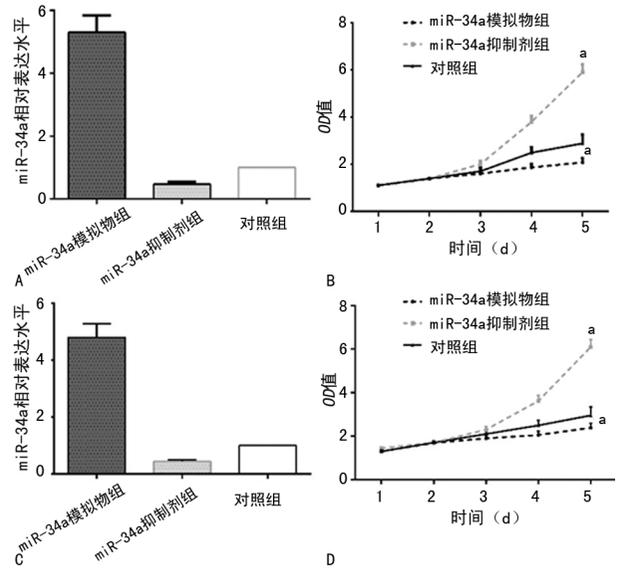
图 1 miR-34a 在正常乳腺上皮细胞和不同乳腺癌细胞株中的表达水平

2.2 miR-34a 对乳腺癌细胞增殖活性的影响 分别将 miR-34a 模拟物及抑制剂转染入 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中,采用 RT-PCR 检测不同组中 miR-34a 的表达水平,结果显示,miR-34a 抑制剂组中 miR-34a 的表达水平显著降低,而 miR-34a 模拟物组中 miR-34a 的表达水平显著升高。根据 CCK-8 法检测结果绘制乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 的生长曲线,miR-34a 模拟物组细胞活力显著低于对照组,差异有统计学意义($t = 10.26, P < 0.05$),而 miR-34a 抑制剂组细胞活力显著高于对照组,差异有统计学意义($t = 7.26, P < 0.05$),见图 2。

2.3 miR-34a 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响 两种乳腺癌细胞在培养 72 h 后,乳腺癌细胞的侵袭能力均显著降低,在 MCF-7 细胞系中,miR-34a 模拟物组穿过小室的数目与对照组比较,差异有统计学意义($t = 12.82, P < 0.01$);在 MDA-MB-231 细胞系中,miR-34a 模拟物组穿过小室的数目与对照组比较,差异也有统计学意义($t = 9.35, P < 0.05$),见图 3。

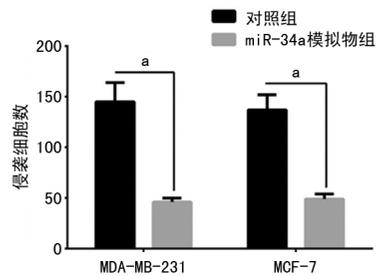
2.4 双荧光素酶实验验证 miR-34a 对 Wnt1 蛋白的直接靶向作用 通过靶基因预测网站 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)和 miRanda (<http://www.microrna.org/>)进行了生物信息学预测,结果显示 miR-34a 与 Wnt1 mRNA 的 3'UTR 之间存在互

补配对序列。WT 组、Mut 组和对照组质粒共转染 MCF-7 细胞 48 h 后进行双荧光素酶检测,结果表明共转染 miR-34a 模拟物和 pLUC-Wnt1-WT-3'UTR 的乳腺癌细胞中荧光素酶活性强度显著低于其他组($t = 11.28, P < 0.01$),见图 4。



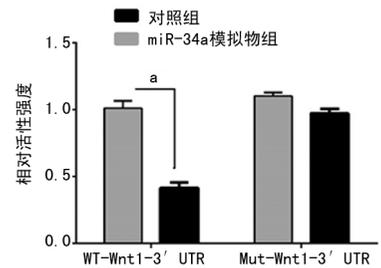
A: MCF-7 细胞被转染后 miR-34a 表达水平; B: MCF-7 细胞不同转染组生长曲线; C: MDA-MB-231 细胞被转染后 miR-34a 表达水平; D: MDA-MB-231 细胞不同转染组生长曲线; a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 2 不同乳腺癌细胞被转染后 miR-34a 相对表达水平及生长曲线图



a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 3 miR-34a 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响

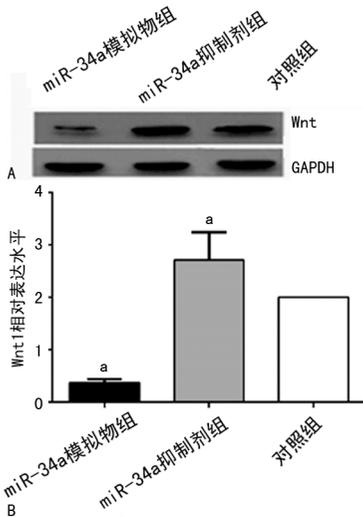


a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 4 两组 Wnt1-3'UTR 双荧光素酶检测对比

2.5 miR-34a 对 Wnt1 蛋白表达的影响 细胞转染 24 h 后通过 Western blot 检测分别转染 miR-34a 模拟物和 miR-34a 抑制剂的乳腺癌细胞 MCF-7 中 Wnt1 蛋白的表达情况,结果显示,经转染后 miR-34a 模拟物组 Wnt1 的相对表达水平下调,与对照组比较

差异有统计学意义($t=11.32, P<0.01$), miR-34a 抑制剂组 Wnt1 相对表达水平上调, 与对照组比较差异有统计学意义($t=4.85, P<0.05$), 见图 5。



A: 转染 MCF-7 细胞后各组 Wnt1 蛋白的 Western blot; B: 转染 MCF-7 细胞后各组 Wnt1 蛋白相对表达水平; $^a: P<0.05$, 与对照组比较

图 5 miR-34a 对乳腺癌细胞 Wnt1 蛋白表达的影响

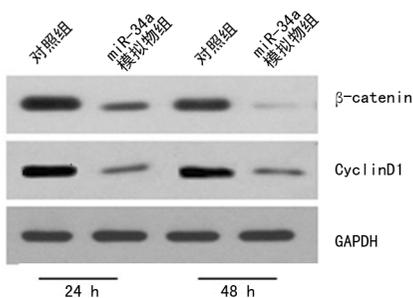
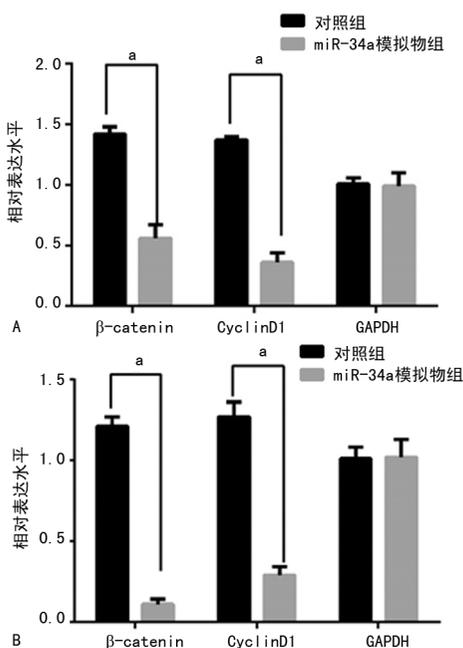


图 6 miR-34a 模拟物组及对照组 β -catenin、CyclinD1 蛋白的表达情况



A: 转染 24 h 后的各组蛋白相对表达水平; B: 转染 48 h 后的各组蛋白相对表达水平; $^a: P<0.05$, 与对照组比较

图 7 miR-34a 模拟物组及对照组 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白的相对表达水平

2.6 miR-34a 对 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白的影响 Western blot 检测 miR-34a 模拟物组转染 24 和 48 h 后 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白的表达, 结果显示, miR-34a 模拟物转染 24 h 后 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白的表达显著下降, 48 h 后 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白的表达仍显著下降, 与对照组比较, 差异均有统计学意义($t=10.25, t=11.36, P<0.05; t=13.57, t=12.24, P<0.05$), 见图 6、7。

3 讨论

miR 是一种长度约为 22 NT 的非编码 miR, 目前已有许多研究证实 miR 与疾病的发生、发展具有非常密切的关系^[6-9], 通过与正常表达谱进行比较, 发现 miR 参与了恶性肿瘤与其他众多慢性疾病的发生, 并对这些疾病的生理、病理过程产生显著的调控作用, 如调控细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等, 且还会影响这些疾病的转归及预后, 甚至会显著影响患者的生存期^[10-11]。miR-34a 是 miR 家族中的一员, 研究发现, 多种肿瘤细胞的周期、衰老、凋亡都与 miR-34a 有着直接的关联^[12-13]。还有研究表明, miR-34a 在胃癌^[14-15]、脑胶质瘤^[16]、肝癌^[17-18] 和结直肠癌^[19-20] 中表达水平显著下调, 且表现出组织依赖性, 即不同的癌组织中 miR-34a 表达下调程度不同^[21]。

Wnt 信号通路在恶性肿瘤中具有重要作用, 其机制为影响肿瘤细胞增殖、分化、凋亡、细胞周期、细胞黏附能力及血管再生^[22]。目前认为, Wnt 通路致癌关键是 β -catenin 降解障碍致使细胞质内游离 β -catenin 聚集并与 Tcf/Lef 结合进入细胞核, 从而激活下游靶基因 CyclinD1、C-myc 的转录, 导致肿瘤的发生^[23-24]。CyclinD1 是调节细胞进入增生期的主要因子, 已被证实为原癌基因, 其过度表达和失调均可导致细胞周期调控异常从而发生肿瘤, 乳腺癌组织存在着异常 Wnt 通路, 其多个成员均参与乳腺癌的发生、发展, β -catenin 的异常表达可能通过促使或激活 CyclinD1 的过表达导致乳腺癌的发生、发展。已有研究证明 miR-100、miR-1 和 miR-142 通过抑制或增强 Wnt 信号通路促进乳腺癌发生、发展^[25-27]。

本研究结果表明在过表达 miR-34a 的情况下, 乳腺癌细胞的增殖、侵袭能力受到明显抑制, 而抑制乳腺癌细胞中 miR-34a 的表达, 乳腺癌细胞的增殖、侵袭能力则明显增加。进一步的机制研究中, 证明了 miR-34a 的直接靶基因是 Wnt1 蛋白, 过表达 miR-34a 能显著抑制 Wnt1 的表达, 同时也影响了 Wnt 信号通路的下游关键基因 β -catenin、CyclinD1 的表达, 从而影响乳腺癌细胞的生物学行为, 即乳腺癌细胞增殖、侵袭能力受到抑制的原因是由于 miR-34a 通过直接靶向 Wnt1 基因, 从而影响其下游基因的表达, 诱导乳腺癌细胞产生上述细胞学行为, 在体外实验中, 乳腺癌细胞侵袭能力和增殖能力发生显著改变, 提示乳腺癌的发生、发展与 miR-34a 表达水平密切相关, miR-34a 表达水平的检测可以作为乳腺癌诊断的参

考指标,对于临床上乳腺癌早期诊断和早期治疗提供了新的思路和方向。

参考文献

- [1] LI X, XIN P, WANG C, et al. Mechanisms of traditional Chinese medicine in the treatment of mammary gland hyperplasia[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(3): 1-16.
- [2] LI L, YUAN L, CHEN X, et al. Current treatments for breast cancer-related lymphoedema; a systematic review [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 11(1): 4875-4883.
- [3] GLORIA B, CLAUDIA C, ISABELLA C. MicroRNAs; new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer[J]. *Theranostics*, 2015, 5(10): 1122-1143.
- [4] DEMES M, ASZYK C, BARTSCH H, et al. Differential miRNA-expression as an adjunctive diagnostic tool in neuroendocrine tumors of the lung[J]. *Cancers*, 2016, 8(4): 38.
- [5] LIANG Z, XI Y. MicroRNAs mediate therapeutic and preventive effects of natural agents in breast cancer[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 35(16): 881-887.
- [6] Hammond S M. An overview of microRNAs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87(1): 3-14.
- [7] EBERT M S, SHARP P A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes[J]. *Cell*, 2012, 149(3): 515-524.
- [8] YATES L A, NORBURY C J, GILBERT R J. The long and short of microRNA[J]. *Cell*, 2013, 153(3): 516-519.
- [9] ROTTIERS V, NAAR A M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 239-250.
- [10] DI LEVA G, GAROFALO M, CROCE C M. MicroRNAs in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9(3): 287-314.
- [11] KONG Y W, COLLOUGH D, JACKSON T J, et al. microRNAs in cancer management[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(6): e249-e258.
- [12] FAROOQI A A, TABASSUM S, AHMAD A. MicroRNA-34a; a versatile regulator of myriads of targets in different cancers[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2089.
- [13] SLABAKOVA E, CULIG Z, REMŠÍK J. Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3100.
- [14] ZHANG Z, KONG Y, YANG W, et al. MicroRNA-34a inhibits tumor invasion and metastasis in gastric cancer by targeting Tgif2 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 15(3): 8921-8918.
- [15] JANG E, KIM E, SON H Y, et al. Nanovesicle-mediated systemic delivery of microRNA-34a for CD44 overexpressing gastric cancer stem cell therapy[J]. *Biomaterials*, 2016, 105(1): 12-24.
- [16] DUAN J, ZHOU K, TANG X, et al. MicroRNA-34a inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis of glioma cells via targeting of Bcl-2 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1): 432-438.
- [17] ZHU L, GAO J, HUANG K, et al. miR-34a screened by miRNA profiling negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway in Aflatoxin B1 induced hepatotoxicity [J]. *Sci Rep*, 2015, 16(5): 16732.
- [18] DAIGE C L, WIGGINS J F, PRIDDY L, et al. Systemic delivery of a miR34a mimic as a potential therapeutic for liver cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(10) 2352-2360.
- [19] SIEMENS H, NEUMANN J, JACK R, et al. Detection of miR-34a promoter methylation in combination with elevated expression of c-Met and β -catenin predicts distant metastasis of colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(3): 710-720.
- [20] GAO J, LI N, DONG Y, et al. miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 34(31): 4142-4152.
- [21] MISSO G, DI MARTINO M T, DE ROSA G, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 23(3): e194.
- [22] LECARPENTIER Y, CLAES V, DUTHOIT G, et al. Circadian rhythms, Wnt/ β -catenin pathway and PPAR α/γ profiles in diseases with primary or secondary cardiac dysfunction [J]. *Front Physiol*, 2014, 4(5): 429.
- [23] PROSPERI J R, GOSS K H. A Wnt-ow of opportunity: targeting the Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(9): 1074-1088.
- [24] KHRAMTSOV A I, KHRAMTSOVA G F, TRETIAKOVA M, et al. Wnt/ β -catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(6): 2911-2020.
- [25] JIANG Q, HE M, GUAN S, et al. MicroRNA-100 suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by targeting FZD-8 and inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Tumour Biol*, 2015, 37(4): 5001-5011.
- [26] LIU T, HU K, ZHAO Z, et al. MicroRNA-1 down-regulates proliferation and migration of breast cancer stem cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 41638-41649.
- [27] ISOBE T, HISAMORI S, HOGAN D J, et al. miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway [J]. *Elife*, 2014, 18(3): e01977.

(收稿日期:2018-08-18 修回日期:2018-11-01)