

## miR-30c 减轻肝细胞肝癌的侵袭与转移

孔亮亮,倪庆锋,卢叶挺,丁文周,孔连宝\*

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:观察 miR-30c/snail 在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达并探讨其在肝癌侵袭中的作用。方法:定量 PCR 检测肝癌及肝癌细胞系中 miR-30c/snail 的 mRNA 表达水平,通过免疫组织化学和 Western blot 分别检测肝癌及肝癌细胞系中 snail 的蛋白表达水平,并在肝癌细胞株中转染 miR-30c 模拟物或抑制物,分析其对肝癌细胞侵袭的作用。结果:与无脉管转移组相比,miR-30c 在有脉管转移组的 HCC 组织中表达明显下调,同时在高转移肝癌细胞株 MHCC-97H 中也有相似的结果。转染 miR-30c 模拟物可减少 snail 的表达,并减少 MHCC-97H 细胞的侵袭性,然而,转染 miR-30c 抑制剂则增加 snail 的蛋白水平,增加 HepG2 细胞的侵袭力。结论:上调 miR-30c 的表达通过直接抑制 snail,可减弱 HCC 的侵袭性。一种新的针对 miR-30c 的治疗策略可能有利于伴侵袭转移的 HCC 患者。

**[关键词]** miR-30c;肝细胞性肝癌;肿瘤侵袭

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)07-937-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140716

## miR-30c attenuates invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma

Kong Liangliang, Ni Qingfeng, Lu Yeting, Ding Wenzhou, Kong Lianbao\*

(Department of Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To detect the expression of miR-30c/snail and the role of miR-30c in hepatocellular carcinoma (HCC) invasion. **Methods:** mRNA expression of miR-30c/snail in HCC samples and cell lines were determined by real-time PCR, while protein expression of snail in HCC tissues and cells were detected by immunohistochemistry and Western blotting assays, respectively. Moreover, invasion of HCC cells was analyzed after transfection with miR-30c mimic or inhibitor. **Results:** We found that the miR-30c levels were obviously decreased in HCC with vascular metastasis compared with non-metastatic tissues, and the same results were found in the highly metastatic cell line MHCC-97H. Transfection with miR-30c mimic decreased snail expression and reduced the invasion of MHCC-97H cells; however, transfection with miR-30c inhibitor increased the protein level of snail and promoted the invasion of HepG2 cells. **Conclusion:** Upregulation of miR-30c expression attenuates the invasion of HCC by directly inhibiting snail. A new therapeutic strategy based on miR-30c may prove to be beneficial for HCC patients with invasion or metastasis.

**[Key words]** miR-30c; hepatocellular carcinoma; tumor invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07):937-943]

原发性肝癌是全球发病率第 5 的恶性肿瘤,同时占因肿瘤导致死亡的第 3 位。85%~90%的原发性肝癌属于肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC),而且超过一半的 HCC 患者是在中国<sup>[1]</sup>。其预后不良主要是由于通过门静脉和肝内其他系统发生肝内、外转移<sup>[2-3]</sup>。尽管部分肝切除术或肝移植是最好的选择,然而只适用于相对正常肝功能和

可控的肿瘤病变的患者。此外,肿瘤切除或移植后往往有较高的转移或复发,而且术后 5 年生存率仅为 30%~40%<sup>[4]</sup>。显然,有必要进一步了解 HCC 的侵袭和转移性,找到一个肝癌治疗的有效手段。

上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)使上皮细胞变形、迁移和运动能力增加,抗凋亡能力增强<sup>[5]</sup>,在肿瘤细胞的侵袭和浸润中都发挥重要作用。足够的证据表明<sup>[6]</sup>EMT 是导致肿瘤侵袭与转移的潜在机制。Snail 与 Slug 同属于一个转录因子家族,都可以与 Smad 相互作用蛋白(SIP1)

**[基金项目]** 卫生部医药发展项目(W2012Fz058)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:lbkong@njmu.edu.cn

竞争性结合 E-钙黏素 (E-cadherin) 启动子区的 E-Box 连接基序, 抑制 E-cadherin 的表达, 从而促进 EMT 的发生<sup>[7]</sup>。也有研究表明抑制 E-cadherin 可能通过激活 PI3K/AKT 通路, 促进肝癌的发生、转移等<sup>[8]</sup>。近年来, 越来越多的微小 RNA (microRNA, miR) 被证实发生在肿瘤的发生、侵袭、转移过程中起重要作用<sup>[9-10]</sup>, 其中包括 miR-30c<sup>[11]</sup>。然而 miR-30c/snail 在 HCC 侵袭与转移中的作用并没有深入研究。本文检测了癌旁组织、HCC 组织和肝癌细胞系中 miR-30c 的表达水平, 以及 snail 的 mRNA 和蛋白水平, 并通过在肝癌细胞株中上调及干扰 miR-30c, 验证其对 snail 的调控以及对肝癌细胞侵袭性作用, 为 HCC 的侵袭转移机制及肝癌的治疗提供新的方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 组织标本与细胞系

在南京医科大学第一附属医院收集了 2010 年 12 月~2012 年 12 月间肝癌手术切除的 45 对肝癌及癌旁组织标本, 所有标本的病理结果通过常规切片及免疫组化确认, 均为 HCC, 其中有病理或免疫组化可证实的脉管癌栓或门静脉系统癌栓为脉管转移组, 否则为非脉管转移组。新鲜标本通过液氮保存, 实验得到患者本人及南京医科大学第一附属医院伦理委员会的同意。患者的临床指标见表 1。人类肝癌细胞系 (HepG2, SMMC-7721, MHCC-97H) 及正常人肝细胞 LO2 均为本实验室冻存。

#### 1.1.2 主要试剂

胎牛血清、DMEM 高糖培养基、0.25% 胰酶 (Gibco 公司, 美国); miR-30c 模拟物 (miR-30c mimic)、miR-30c 抑制物 (miR-30c inhibitor) 以及其阴性对照 (上海吉玛公司); Snail 及 GAPDH 的上下游引物、TRIzol、Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司, 美国); 反转录试剂盒、SYBR Green 定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本); TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA 反转录试剂盒、miR-30c 及 RNU6B 特异性 Taqman 探针和 TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (ABI 公司, 美国); Snail、GAPDH 一抗 (Santa 公司, 美国); E-cadherin 一抗 (BD 公司, 美国); ECL 发光液 (Pierce 公司, 美国); 免疫组化试剂盒 (福州迈新公司); Dual-Glo Luciferase Reporter Assay System (Promega 公司, 美国); 基质胶 (BD 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

表 1 临床指标

Table 1 Clinical indicators (n)

临床指标	总体	脉管转移(+)	脉管转移(-)	P 值
例数	45	20	25	
性别				0.682
男	38	16	22	
女	7	4	3	
年龄				0.787
≥55 岁	26	12	14	
<55 岁	19	8	11	
肿块大小				0.034
≥5 cm	25	15	10	
< 5 cm	20	5	15	
肿瘤个数				0.728
单个	37	16	21	
多个	8	4	4	
乙肝病史				0.938
HBV(+)	34	15	19	
HBV(-)	11	5	6	
肝功能 Child 分级				0.883
A~B	32	14	18	
C	13	6	7	
AFP (ng/ml)				0.486
≥100	29	14	15	
< 100	16	6	10	
1 年内复发				0.072
是	14	9	5	
否	31	11	20	

脉管转移(+): 病理或免疫组化可证实的脉管癌栓或门静脉系统癌栓; 脉管转移(-): 无病理或免疫组化可证实的脉管癌栓或门静脉系统癌栓。

所有的细胞都在恒温 37℃, 含 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行培养, 培养基为添加了 10% 胎牛血清, 50 U/ml 青霉素和 50 μg/ml 庆大霉素的 DMEM 高糖培养基。

#### 1.2.2 细胞转染

取对数生长期的肝癌细胞系, 以每孔  $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$  个细胞密度种植于 6 孔板中培养 24 h, 50 nmol/L miR-30c mimic 或 miR-30c inhibitor, 以及其阴性对照通过 Lipofectamine2000 进行转染, 具体的转染步骤参照试剂盒说明书。转染后 24 h 收集细胞或进行后续实验。

#### 1.2.3 实时定量 PCR

应用 TRIzol 提取组织或细胞总 RNA, 并测定 RNA 浓度及纯度。然后通过反转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA, 最后通过 SYBR Green 定量 PCR 试剂盒进行定量检测, 引物上下游序列为: Snail: 上游引物 5'-TCGGAAGCCTAACTACAGCGA-3', 下游

引物 5'-AGATGAGCATTGGCAGCGAG-3'; GAPDH: 上游引物 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 下游引物 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。为了检测 miR-30c 的表达, 首先利用 TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA 反转录试剂盒进行逆转录, 具体操作按说明书进行, 然后应用 miRNA 特异性 TaqMan 探针和 TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix 进行 miR-30c 的实时定量检测, RNU6B 被用来作为内参。所有实时定量反应均在 ABI StepOnePlus real-time PCR system 上进行, 每个反应设 3 个复孔。检测转染效率时应用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对定量分析, 其余数据用  $2^{-\Delta C_t}$  法分析。

#### 1.2.4 Western blot

通过含 25 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 5 mmol/L EDTA, 1% SDS 和 1% 蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液将细胞裂解, 蛋白样品在 10% SDS-PAGE 中电泳, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 1 h, 加一抗 (anti-snail, anti-GAPDH) 在 4℃ 过夜, 然后在室温下加 HRP 标记的二抗孵育 1 h。常规 ECL 曝光、扫描成像。

#### 1.2.5 细胞侵袭实验

Transwells 小室纤维膜孔径为 8 mm, 下室中加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 500  $\mu$ l, 上室中加入不含血清的 DMEM 200  $\mu$ l, 同时每个上室中加入含  $5 \times 10^4$  个细胞的悬液, 在恒温 37℃, 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中连续培养 48 h, 取出小室, 擦净上表面的基质胶及残留细胞, 小室下表面的细胞用 4% 多聚甲醛固定, 0.5% 结晶紫染色, 显微镜下每个小室随机观察 10 个视野并拍照, 计数穿膜细胞数。

#### 1.2.6 荧光素酶质粒构建

通过 miR 靶基因预测软件 Target Scan 5.2 得到 miR-30c 可能结合 snail 的 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR), 以此设计出野生和突变型寡聚核苷酸序列并合成于 Invitrogen 公司, 退火成双链后通过限制性核酸内切酶 *Nhe* I -*Xho* I 位点插入 pmirGLO 质粒 (Promega 公司, 美国), 转化后挑取 5~8 个单克隆菌落, 送美国 Invitrogen 公司测序证实构建正确后用质粒提取试剂盒 (Promega 公司, 美国) 提取质粒, 具体步骤按照质粒提取试剂盒说明书操作, 即完成质粒 pmirGLO-snail-wt/mut 的构建。

野生型寡聚核苷酸: 正义链: 5'-CTAGCGGC-CTGGGAGGAAGATGTTTACAC-3', 反义链: 5'-TCGAGTGTAACATCTTCTCCAGGCCG-3'; 突变型寡聚核苷酸: 正义链: 5'-CTAGCGGCCTGGGAG-

GAAGAGTGGGCAAC-3', 反义链: 5'-TCGAGTTGCCACTCTTCTCCAGGCCG-3'。

#### 1.2.7 双荧光素酶报告分析

接种  $5 \times 10^4$  个/孔 HepG2 细胞于 24 孔板内, 细胞培养箱内培养 24 h 后, 应用 Lipofectamine 2000 将 miR-30c mimic 或其阴性对照和 pmirGLO-snail-wt/mut 质粒共同转染入 MHCC-97H 细胞中, 具体的转染步骤参照试剂盒的说明书。转染 24 h 后应用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 在 GloMax 20/20 Luminometer 上检测。

#### 1.2.8 免疫组织化学染色

45 对 HCC 及癌旁组织经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切成 4  $\mu$ m 的石蜡切片, 经过脱蜡, 水化, 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 柠檬酸抗原高温修复, 封闭液封闭非特异性结合位点, 加入一抗 (anti-E-cadherin, anti-snail) 4℃ 过夜, 加生物素二抗, 加辣根酶标记链霉卵白素工作液, DAB 显色, 苏木紫复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片, 显微镜下观察。具体的步骤参照免疫组化试剂盒的说明书。

#### 1.3 统计学方法

运用 SPSS18.0 软件进行分析, 实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 *t* 检验比较, 临床指标采用卡方检验分析,  $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

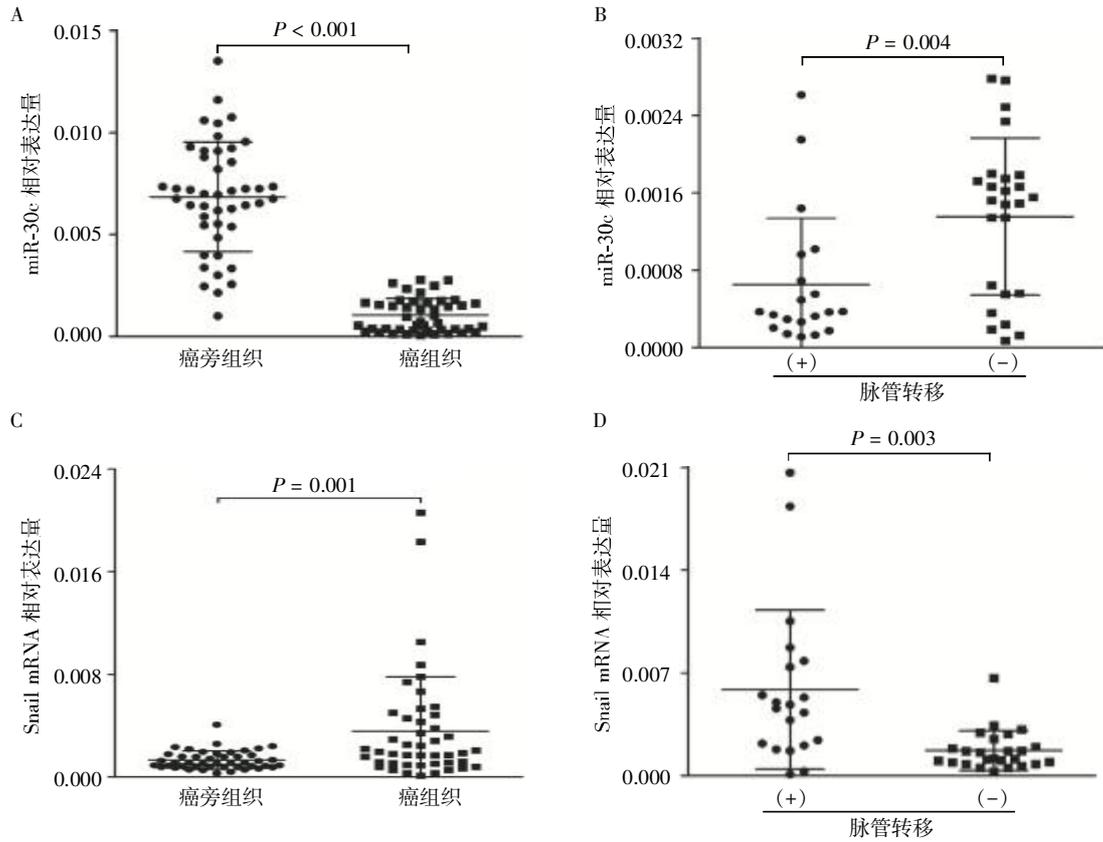
## 2 结果

### 2.1 miR-30c/snail 在肝癌组织中的表达

通过探针法定量 PCR 检测 45 对肝癌及癌旁组织, 发现肝癌组织中 miR-30c 的表达水平明显低于癌旁组织 ( $0.00104 \pm 0.00083$  vs  $0.00684 \pm 0.00269$ ,  $P < 0.001$ , 图 1A), 然而 snail 的表达却呈现了相反的情况 ( $0.00357 \pm 0.00424$  vs  $0.00131 \pm 0.00072$ ,  $P < 0.01$ , 图 1C)。进一步分析发现脉管转移组中 miR-30c 的表达更低于非脉管转移组 ( $0.00065 \pm 0.00069$  vs  $0.00135 \pm 0.00081$ ,  $P < 0.01$ , 图 1B)。有趣的是, snail 的表达在脉管转移组中明显高于非脉管转移组 ( $0.00587 \pm 0.00541$  vs  $0.00173 \pm 0.00135$ ,  $P < 0.01$ , 图 1D)。免疫组织化学染色结果显示了相似的结果, 而且 EMT 的相关上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达水平也下调了 (图 2)。以上数据说明 miR-30c 表达的下调和 snail 表达的上调可能在肝癌的脉管转移中起到重要作用。

### 2.2 miR-30c/snail 在肝癌细胞系中的表达

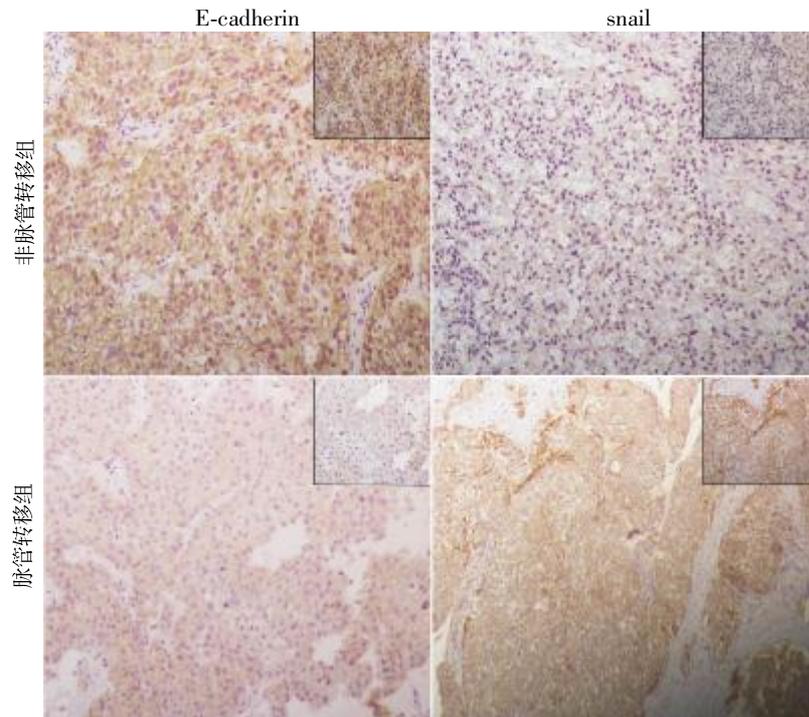
在检测细胞系中 miR-30c 及 snail 的表达水平时, 发现高转移性肝癌细胞系 MHCC-97H 中 miR-30c



A、C:定量 RT-PCR 检测肝癌及癌旁组织中 miR-30c/snail 的表达水平,对照为癌旁组织;B、D:肝癌组织中脉管转移组与非脉管转移组 miR-30c/snail 的表达水平,对照为非脉管转移组。

图 1 miR-30c/snail 在肝癌组织标本中的表达

Figure 1 The expression of miR-30 snail in HCC tissues



免疫组织化学染色肝癌组织中非脉管转移组与脉管转移组 E-cadherin/snail 蛋白表达水平( $\times 200$ ,内嵌; $\times 400$ )。

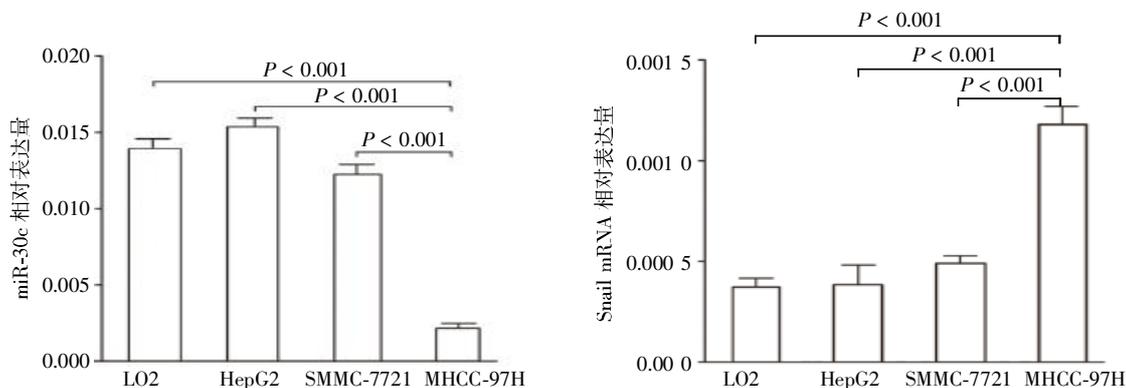
图 2 EMT 相关蛋白在肝癌组织中的表达

Figure 2 The expression of EMT related proteins in HCC tissues

的表达水平明显低于正常肝细胞系及其他肝癌细胞系 ( $0.00216 \pm 0.00032$  vs  $0.01391 \pm 0.00068$ ,  $0.01535 \pm 0.00058$ ,  $0.01224 \pm 0.00065$ ,  $P < 0.001$ , 图 3A), 而 snail 在 MHCC-97H 中的表达却明显高于其他检测的细胞系 ( $0.00118 \pm 0.00009$  vs

$0.00037 \pm 0.00004$ ,  $0.00038 \pm 0.00010$ ,  $0.00049 \pm 0.00004$ ,  $P < 0.001$ , 图 3B)。以上数据展示了和肝癌组织中相类似的结果, 进一步表明 miR-30c/snail 在肝癌侵袭转移中的作用。

### 2.3 miR-30c 直接调控 snail 的表达



A: 正常肝细胞系 (LO2) 及肝癌细胞系 (HepG2, SMMC-7721, MHCC-97H) 中 miR-30c 的表达水平; B: 正常肝细胞系 (LO2) 及肝癌细胞系 (HepG2, SMMC-7721, MHCC-97H) 中 snail 的表达水平 ( $n = 3$ )。

图 3 miR-30c/snail 在正常肝细胞及肝癌细胞系中的表达

Figure 3 The expression of miR-30c/snail in normal hepatocytes and HCC cell lines

为了验证 miR-30c 对 snail 的表达调控, 将 miR-30c mimic 或 miR-30c inhibitor 分别转染入 MHCC-97H 或 HepG2 细胞系中, 并设有对照组。RT-PCR 的结果显示转染入 MHCC-97H 的外源性 miR-30c mimic 明显增加了细胞中 miR-30c 的表达 ( $1.00 \pm 0.10$  vs  $731.40 \pm 70.90$ ,  $P < 0.001$ ), 而且通过 Western blot 分析, 发现 snail 的表达水平被抑制了 (图 4A)。miR-30c inhibitor 有效地抑制了 HepG2 细胞系中内源性 miR-30c 的表达 ( $1.00 \pm 0.10$  vs  $0.58 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ), 同时发现 snail 的蛋白表达水平却增加了 (图 4B)。为了进一步确定 snail 是否是 miR-30c 的直接靶点, 通过 Target Scan 5.2 预测了 miR-30c 结合 snail 的 3'-UTR (图 4C), 并以此构建了质粒 pmirGLO-snail-wt/mut。最后应用双荧光素酶报告分析, 发现转染 miR-30c mimic 到 MHCC-97H 中明显减低了 pmirGLO-snail-wt 质粒中荧光素酶的表达 ( $6.22 \pm 0.37$  vs  $2.82 \pm 0.23$ ,  $P < 0.001$ , 图 4D)。以上结果表明 miR-30c 在肝癌细胞中直接靶向 snail 并下调其表达。

### 2.4 miR-30c 减轻肝癌细胞的侵袭

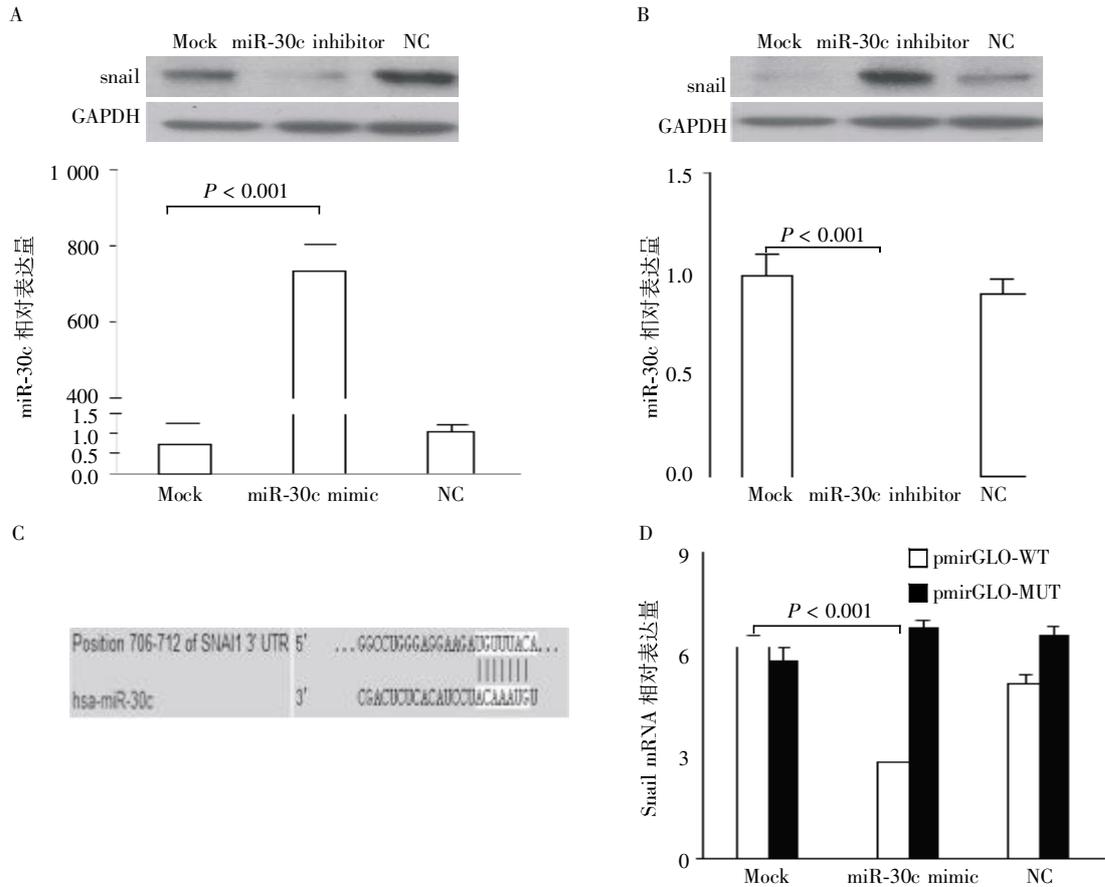
应用 Transwell 细胞侵袭实验检测 miR-30c 对肝癌细胞侵袭的影响, 发现转染后高表达 miR-30c 的 MHCC-97H 细胞染色后在显微镜下观察, 穿过小室基底膜的数目明显少于转染阴性对照组 ( $253 \pm 27$  vs  $405 \pm 26$ ,  $P < 0.01$ , 图 5A)。而转染了 miR-

30c inhibitor 的 HepG2 细胞, 可以观察到相反的现象 ( $87 \pm 8$  vs  $44 \pm 9$ ,  $P < 0.01$ , 图 5B)。以上数据说明 miR-30c 可减轻肝癌细胞的侵袭性。

## 3 讨论

HCC 的侵袭与转移是影响肝癌治疗预后的关键原因<sup>[12]</sup>, 因此研究其侵袭性的分子机制就显得十分重要。近年来, 越来越多的证据表明上皮-间质转化介导肿瘤的发生与发展, 包括局部侵袭与远处转移<sup>[5]</sup>, 而其中 DNA 结合因子 snail 通过结合 E-cadherin 的 E-box 而抑制其表达, 促使 EMT 发生<sup>[13]</sup>。miR 是一种约 23 个核苷酸的非编码小 RNA, 通过与信使 RNA 的 3'-UTR 互补进行转录后调控<sup>[14]</sup>。miR 被证明参与几乎所有的生物过程, 包括细胞增殖、凋亡、分化等, 与此同时大量证据显示 miR 也可作为癌基因或抑癌基因参与肿瘤的发生、发展过程<sup>[15]</sup>。在本研究中, 发现 miR-30c 通过抑制 snail 的表达, 从而减轻了 HCC 的侵袭性。

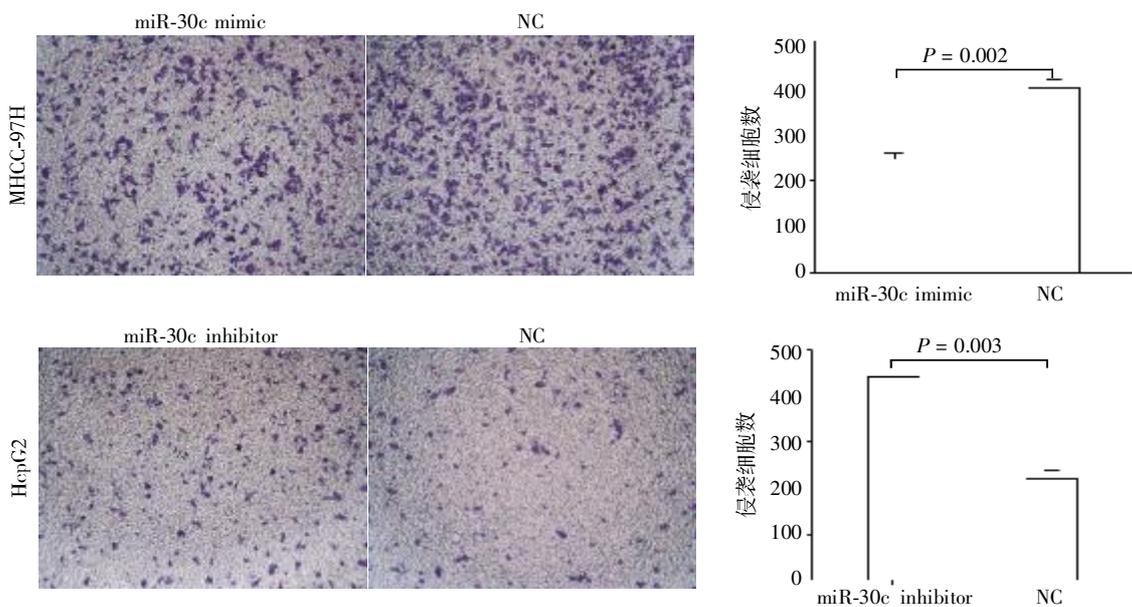
定量 PCR 检测癌旁组织与 HCC 组织的结果显示, 与癌旁组织相比, 肝癌组织中 miR-30c 表达下调, 而且进一步检测发现有脉管转移 HCC 组较无浸润组 miR-30c 也有明显下降, 通过定量 PCR 和免疫组织化学发现 snail 的表达在脉管转移组则明显上调, 这也与之前的研究报道相符合<sup>[16]</sup>。与此同时, 在不同侵袭力的肝癌细胞系中也发现了相似的结果。



A:转染 miR-30c mimic 或其对照入 MHCC-97H 细胞内,RT-PCR 测 miR-30c 的表达,Western blot 测 snail 的表达;B:转染 miR-30c inhibitor 或其对照入 HepG2 细胞内,RT-PCR 测 miR-30c 的表达,Western blot 测 snail 的表达;C:Taeget Scan 预测 miR-30c 可能结合 snail 的 3'-UTR;D:共转染 pRL-TK,pmirGLO-WT 或 pmirGLO-MUT 以及 miR-30c mimic 或阴性对照入 MHCC-97H 细胞 24 h 后测荧光素酶的表达。

图 4 miR-30c 调控 snail 的表达

Figure 4 The effect of miR-30c on the expression of snail



A:转染 miR-30c mimic 减弱了 MHCC-97H 细胞侵袭;B:转染 miR-30c inhibitor 增加了 HepG2 细胞侵袭(n = 3)。

图 5 miR-30c 对肝癌细胞侵袭的影响

Figure 5 The role of miR-30c in HCC invasion

提示miR-30c/snail在肝癌的发展中起到重要作用。进一步的体外实验表明过表达miR-30c抑制snail的表达,减弱了高侵袭力细胞系MHCC-97H的侵袭能力,并且通过双荧光素酶分析发现这种抑制作用是直接性的,而抑制miR-30c则增加了HepG2细胞中snail的表达,进而增强了其侵袭能力,这些结果表明miR-30c通过下调snail的表达可抑制肝癌细胞的侵袭与转移。

总的来说,本研究结果提示miR-30c在肝癌的侵袭及转移中发挥重要作用,它可能是通过抑制snail的表达,抑制了EMT的发生,从而减轻了HCC的侵袭能力。虽然具体机制尚待进一步研究,但已能为原发性肝癌的治疗提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-2576
- [2] Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 563-572
- [3] Poon RT, Fan ST, Wong J. Risk factors, prevention and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg*, 2000, 232(1): 10-24
- [4] Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 897-907
- [5] Mializzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2): 117-134
- [6] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 75-90
- [7] Niessen K, Fu Y, Chang L, et al. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization [J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(2): 315-325
- [8] 马修平, 张海, 汪亦品, 等. E-cadherin表达下调致GSK-3 $\beta$ 磷酸化失活的分子机制研究 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(7): 896-902
- [9] Mazar J, DeYoung K, Khaitan D, et al. The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13779
- [10] Adam L, Zhong M, Choi W, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5060-5072
- [11] Zhou H, Xu X, Xun Q, et al. microRNA-30c negatively regulates endometrial cancer cells by targeting metastasis-associated gene-1 [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(3): 807-812
- [12] Poon RT, Fan ST, Wong J. Risk factors, prevention and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg*, 2000, 232(1): 10-24
- [13] Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3): 155-166
- [14] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [15] Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1768-1771
- [16] Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, et al. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(2): 252-258

[收稿日期] 2014-02-10