

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.007

miR30a 体外干预乳腺癌腋窝肿大淋巴结中肿瘤干细胞 相关基因表达和侵袭力的变化^{*}

周 健¹,余天雾^{1△},吕永双¹,蒋小卫²
(1.重庆医科大学附属永川医院普通外科 3 病区 402160;2.重庆医科大学附属
第二临床学院三腺外科 400010)

[摘要] **目的** 探讨肿瘤干细胞在乳腺癌患者腋窝肿大淋巴结中微转移灶及微小 RNA30a(miR30a)对其侵袭能力的影响,初步探讨 miRNAs 抗乳腺癌治疗的可行性。**方法** 从乳腺癌患者腋窝肿大淋巴结中分离、培养肿瘤干细胞样乳腺癌细胞。合成 miR30a 寡核苷酸片段,应用腺病毒将该片段转染人原代乳腺癌细胞,同时设乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株为试验对照,每组细胞均设空载体组、空白对照组,以荧光显微镜评估转染效率。以 Transwell 小室体外侵袭试验检测转染前后肿瘤细胞增殖和侵袭力的变化。以 Western blot 分别检测 ALDH1、Vimentin 和 N-Cadherin 蛋白表达。**结果** Transwell 小室体外侵袭试验显示空白对照组中原代乳腺癌细胞较 MDA-MB-231 细胞株侵袭力强,其侵袭指数分别为(75.3±3.2)%,(58.4±2.8)%,两者差异有统计学意义($P<0.05$),而转染 miR30a 后这两种细胞体外侵袭力均明显减弱,其侵袭指数分别为(21.4±1.9)%,(28.2±2.3)%,与各自空白对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 乳腺癌患者部分腋窝增生肿大的淋巴结中 ALDH 表达增高,可能存在肿瘤微转移,术中应完全清扫为宜。miR30a 抑制了肿瘤干性基因表达和侵袭能力。

[关键词] 乳腺肿瘤;干细胞;腋窝肿大淋巴结;肿瘤转移;侵袭;miR30a
[中图分类号] R73.37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)12-1605-03

Intervention in vitro of miR30a on tumor stem cell related gene expression and invasiveness of breast cancer swollen axillary lymph nodes^{*}

Zhou Jian¹,Yu Tianwu^{1△},Lv Yongshuang¹,Jiang Xiaowei²
(1. Third Department of General Surgery, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University,
Chongqing 402160, China; 2. Department of Three Glands Surgery, Second Clinical
College of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the micrometastatic lesion of tumor stem cells in the axillary swollen lymph nodes of breast cancer patients and the influence of miR30a on its invasive ability, and to explore the feasibility of miRNAs anti-breast cancer treatment. **Methods** The tumor stem cell-like breast cancer cells were separated from the axillary swollen lymph nodes in breast cancer patients and cultured. miR30a oligonucleotide fragment was synthesized and transfected into human primary generation breast cancer cells by using adenovirus, meanwhile the breast cancer cell line MDA-MB-231 was taken as the experimental control and the transfection efficiency was assessed by the fluorescence microscopy. The changes of tumor cell proliferation and invasiveness before and after transfection were detected by the Transwell chamber in vitro invasion assay. Western blot was used to detect the ALDH1, Vimentin and N-Cadherin protein expression. **Results** The Transwell chamber in vitro invasion assay showed that the primary generation breast cancer cell had more strong invasive ability than MDA-MB-231 cell line, their invasion indexes were (75.3±3.2)% and (58.4±2.8)% respectively, the difference was statistically significant ($P<0.05$), and after transfecting miR30a, the in vitro invasiveness ability in these two kinds of cells were significantly weakened and their invasion indexes were (21.4±1.9)% and (28.2±2.3)% respectively, the difference compared with the control group showed the statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** The ALDH expression in partial axillary hyperplasia and swollen lymph nodes in the patients with breast cancer is increased, and the tumor micrometastasis may exist, which should be completely cleaned in operation. miR30a inhibits the expression and invasive ability of tumor stem gene.

[Key words] breast neoplasms; stem cell; axillary lymph nodes; neoplasms metastasis; invasiveness; miR30a

乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells)可能是乳腺癌术后局部复发和转移的关键因素^[1]。对其鉴别主要是基于肿瘤细胞表面的分子表型如 CD44⁺/CD24^{-/low} 或乙醛脱氢酶 1 阳性(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)^[2]。

乳腺癌细胞出现上皮细胞向间质细胞转变(epithelial to mesenchymal transition, EMT) 是上皮细胞获得侵袭、迁移能力的主要方式。因此,研究乳腺癌腋窝淋巴结微转移灶及寻找针对乳腺癌干细胞的有效措施具有重要意义。小 RNA 干扰

可通过各种生物学行为在转录后水平负性调控靶基因的表达,影响多种靶基因的生物学行为,如细胞的生长、凋亡、增殖、分化、转化和衰老^[3]。Ouzounova 等^[4]报道 miR30a 在体内过表达影响乳腺癌的进展,其家族在非黏附的环境中调节乳腺癌细胞的生长。因此,本课题通过检测浸润性乳腺癌患者腋窝增生、肿大淋巴结中乳腺癌干细胞微转移灶,为临床常规清扫腋窝淋巴结微转移灶提供初步依据并探索微小 RNA30a(miR30a)干扰对微转移灶中 EMT 型细胞干性基因的表达和

^{*} 基金项目:重庆市科技计划项目科研基金支持(CSTC2011JJA10038)。 作者简介:周健(1986—),主治医师,硕士,主要从事乳腺肿瘤治疗研究。 △ 通讯作者,E-mail:674079699@qq.com。

侵袭力的影响,为乳腺癌转移灶的治疗提供一种新的靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂及材料 人白血病抑制因子(hLIF)、人前列腺素源生长因子(h-PDGF)、人表皮细胞生长因子(hEGF)、人碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和人 B-27 培养基购自美国 Protech 公司;DMEM/F12、胎牛血清购自德国 Hyclone 公司;结晶紫紫粉购自南京生物试剂公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂、透明质酸酶和Ⅲ型胶原酶购自英国 Sigma 公司;腺病毒 miR30a 载体购自上海吉玛制药技术有限公司;MDA-MB-231 细胞株获自重庆医科大学附属第二医院中心实验室提供;基质胶(matrix matrigel)、兔抗人 CD44-FITC、ALDH1-PE、CD24-PE 和鼠抗兔 IgG 同型对照抗体(FITC)购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 Vimentin、N-Cadherin、ALDH1 多克隆抗体购自美国 Ebioscience 公司;Transwell 小室(孔径 8 μm)购自美国 Milipore 公司;PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司成都分公司。

1.2 无血清法原代乳腺癌干细胞分离、培养 部分参照文献[5]进行。将约 1 g 大小的肿瘤组织或淋巴结剪碎(约 1 mm^3)浸入 DMEM/F12 无血清培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中消化组织块。过滤,离心 5 min(500~1 000 r/min),收集脱落细胞,共消化 4~5 h。收集洗涤后的细胞于 DMEM/F12 完全培养基培养,24 h 后弃去悬浮细胞。待长满皿底时,换以 DMEM/F12 无血清培养基培养,每 1~2 天倒置显微镜下观察 1 次生长状态和融合、成球的情况。待 12 d 时收集悬浮细胞将其标记为肿瘤干细胞原代(P_0)。其铺满皿底将细胞消化传代。同法以无血清培养基培养人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231。

1.3 流式细胞仪鉴定肿瘤细胞表型 消化、收集培养的肿瘤细胞(P_0),制作单细胞悬液,按流式抗体说明书以 2% 的体积分数加入 CD44-FITC 和 CD24-PE 抗体(工作液 1:20 稀释)并准备同型对照抗体细胞。以流式细胞仪检测 CD44、CD24 和 ALDH1 阳性细胞的含量,重复检测 2 次,取其平均值。

1.4 miR30a 腺病毒转染乳腺癌细胞 将提取的肿大腋窝淋巴结中肿瘤细胞分为 3 组:试验组 1(腺病毒 miR30a)、空载体组 1 和空白对照组 1,同时以乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为对照,转染相应腺病毒后设立试验组 2、空白载体组 2 和空白组 2。靶细胞铺板:试验前 1 d,向 24 孔板孔内加入完全培养基(500 μL /孔,靶细胞:5 $\times 10^4$ 个),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养过夜。第 2 天将病毒原液混匀后加入培养板(400 μL /孔),同时加入 polybrene,24 h 后弃掉病毒液,换为新鲜完全培养基,7 d 后观察并拍照。计算转染率:试验组和空载体组,每组 3 复孔,每组计数 6~8 个视野(40 倍高倍镜),取平均值计入公式:转染率(%)=荧光细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.5 Transwell 小室侵袭试验及细胞增殖力检测 将 Transwell 上室内均匀涂一层稀释的基质胶,每组各设 3 个复孔。向各组 Transwell 下室加入 DMEM 完全培养基,向上室内加入细胞悬液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 12~24 h。以棉签擦去上室基质胶上的细胞后 75% 乙醇固定,以结晶紫液(2 g/100 mL)染色 15 min 后流水冲洗。吹干后倒置显微镜下计数穿膜细胞数并拍照。结果计算:设穿过无 Matrigel 胶的微孔滤膜细胞数为对照,各试验组穿过 Matrigel 胶的细胞数与其相比得到相对百分率,以此百分率表示癌细胞体外侵袭指数。MTT 法检测肿瘤细胞的增殖指数向 24 孔板 Transwell 小室的下室完全培养基中加入 MTT 溶液(5 mg/mL)150 μL /孔,将小室膜浸没在培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h;离心去上清液后加入二甲基亚砜(DMSO)500 μL /孔,振荡 10 min,使结晶物充分溶解后将 24 孔板置于酶标仪上,设 490 nm 波长,测吸光度(A)值。

1.6 RT-PCR 检测转染细胞中 miR30a 的表达 转染筛选后

细胞总 RNA 的提取按 Trizol 操作说明书并结合文献进行操作。将转染后的细胞加 Trizol 后,室温放置 5 min 后离心,弃沉淀,加入氯仿后振荡混匀后室温放置 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min 后取上层水相,加入异丙醇室温放置 5 min 后,离心 10 min,弃上清液,加入 75% 乙醇温和振荡后离心 5 min,弃上清液,真空干燥 5 min 后加入 0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS)溶解 RNA 样品,测 A 值。

1.7 Western blot 法检测肿瘤细胞侵袭分子 ALDH1、Vimentin、N-Cadherin 的表达 细胞为本试验提取培养的人乳腺癌细胞。蛋白提取及蛋白凝胶电泳按照 Western blot 说明书操作。培养细胞在 80% 浓度左右时,以胰酶酶解后裂解,离心收集在试管中,加入 450 μL 裂解液反复吹打,所得样品用超声细胞破碎仪处理,处理后的样品入水浴箱加热,离心后取上清液。

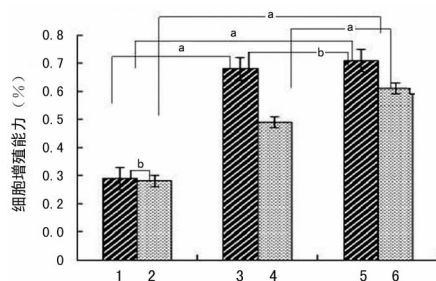
1.8 统计学处理 采用 Excel2003、SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 SNK 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌干细胞球的生长情况 消化、分离乳腺癌患者腋窝肿大淋巴结标本,10 例中分离出 6 例。试验中 1 例污染,余 5 例于培养期间均出现部分细胞逐渐凋亡、崩解,部分细胞呈贴壁、增殖和分化状态。3 d 时镜下见到细胞呈梭形、尖角状或多角形,逐渐铺满瓶底。换用无血清培养基后仅小部分细胞体积逐渐变大及融合,约 12 d 后呈较大的单个或多个球状悬浮细胞,折光性强,中心融合且部分发生凋亡。以完全培养基贴壁培养 48 h 后出现了细胞团,增殖、分裂成新生细胞,形态呈梭形或尖角状,自第 2、3 代后细胞形态更规则。

2.2 流式细胞仪细胞表型鉴定结果 经流式细胞仪检测,待测标本中活性细胞占总细胞量的 89.50%,其中,ALDH1 阳性细胞约占 63.95%,CD24^{-/low} 约占总细胞数的 1.13%,CD44⁺ 细胞约占 89.78%。流式结果显示在腋窝淋巴结中提取的癌细胞表面的干性基因分子 ALDH1 和 CD44⁺ 有较高表达,而 CD24^{-/low} 呈低表达,这表明经无血清培养法富集的肿瘤细胞具有干性特征。

2.3 转染 miR30a 后细胞增殖能力检测 通过 MTT 法检测转染 miR30a 48 h 后从腋窝淋巴结提取的细胞和乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的增殖指数,发现两种细胞与各自空白对照组及空载体组比较,其增殖、生长能力明显受到了抑制,尽管未出现大面积的细胞死亡、崩解,但生长均极其缓慢,于转染后 7~10 d 才铺满皿底,且细胞间不会完全接触。经 MTT 法检测,发现试验组 1、2 细胞增殖能力较各自对应的空载体组 1、2 和空白对照组 1、2 明显降低($P<0.05$),见图 1。

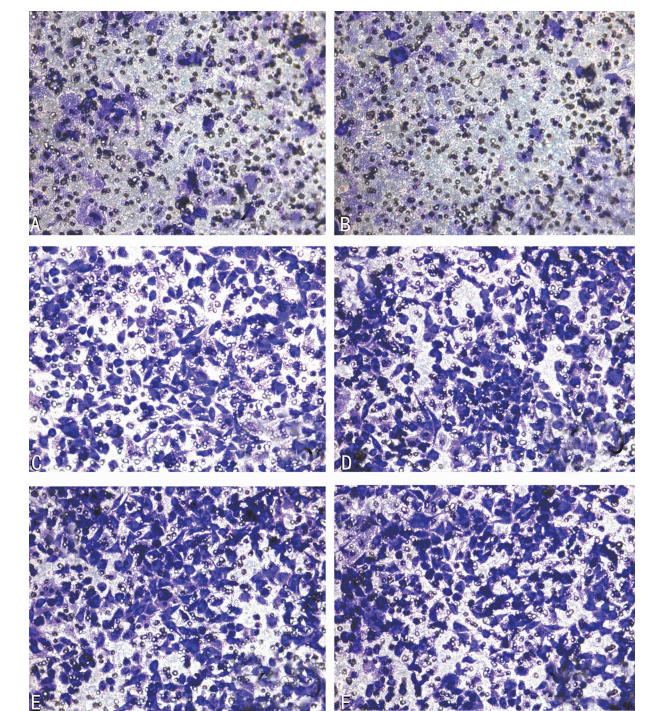


A: 试验组 1; B: 试验组 2; C: 空载体组 1; D: 空载体组 2; E: 空白对照组 1; F: 空白对照组 2。 $P<0.05$; $b>0.05$ 。

图 1 MTT 法检测各组细胞增殖能力

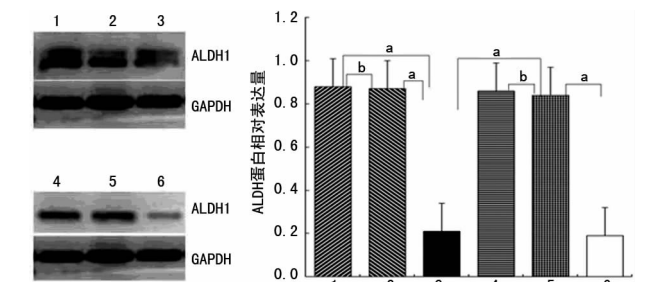
2.4 检测结果 试验结果证实腋窝肿大淋巴结内提取培养的肿瘤细胞具有明显的侵袭和迁徙能力,见图 2。空白载体组 1、

2 的侵袭指数分别为 $(88.6 \pm 2.6)\%$ 、 $(63.1 \pm 2.0)\%$ ，两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；而试验组 1、2 的侵袭指数分别为 $(21.4 \pm 1.9)\%$ 、 $(28.2 \pm 2.3)\%$ ，两者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，但是分别与空白对照组 1 $(75.3 \pm 3.2)\%$ ，空白对照组 2 $(58.4 \pm 2.8)\%$ 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；而空白对照组 1、2 和空载体组 1、2 之间相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A: 试验组 1; B: 试验组 2; C: 空载体组 1; D: 空载体组 2; E: 空白对照组 1; F: 空白对照组 2。

图 2 Transwell 检测肿瘤细胞的侵袭迁徙能力(结晶紫染色 $\times 200$)

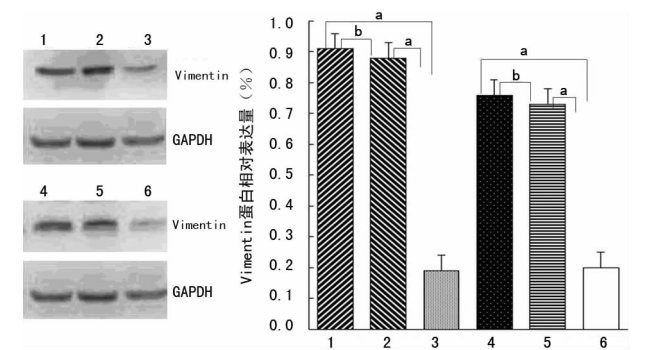


1: 空白对照组 1; 2: 空载体组 1; 3: 试验组 1; 4: 空白对照组 2; 5: 空载体组 2; 6: 试验组 2。^a: $P < 0.05$; ^b: $P > 0.05$ 。

图 3 Western blot 检测 ALDH1 在人原代乳腺癌细胞中的表达

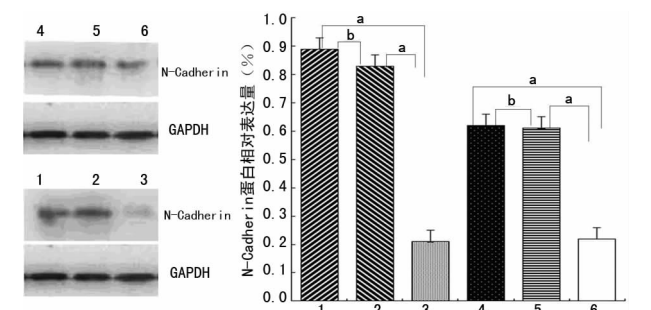
2.5 转染 miR30a 后肿瘤 ALDH1、Vimentin、N-Cadherin 的表达变化 空白对照组 1 ALDH1 表达较空白对照组 2，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，试验组 1 ALDH1 表达较空载体组 1 及空白对照组 1 显著下降 ($P < 0.05$)；试验组 2 ALDH1 表达较空载体组 2 及空白对照组 2 显著下降 ($P < 0.05$)；且试验组 1 与试验组 2 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。Vimentin(图 4)和 N-Cadherin(图 5)在空白对照组 1、2 及空载体组 1、2 的两种细胞中表达量均很高，而空白对照组 1 较空白对照组 2 及空载体组 1 较空载体组 2 表达更高 ($P < 0.05$)。试验组中两种细胞 Vimentin 和 N-Cadherin 的蛋白表达量均明显下降，相较而言，试验组 1 和试验组 2 较对应的空白对照组及空

载体组均要弱很多 ($P < 0.05$)。但是试验组中间的表达强弱无明显的差别 ($P > 0.05$)。



1: 空白对照组 1; 2: 空载体组 1; 3: 试验组 1; 4: 空白对照组 2; 5: 空载体组 2; 6: 试验组 2。^a: $P < 0.05$; ^b: $P > 0.05$ 。

图 4 Western blot 检测 Vimentin 在人原代乳腺癌细胞中的表达



1: 空白对照组 1; 2: 空载体组 1; 3: 试验组 1; 4: 空白对照组 2; 5: 空载体组 2; 6: 试验组 2。^a: $P < 0.05$; ^b: $P > 0.05$ 。

图 5 Western blot 检测 N-Cadherin 在人乳腺癌细胞中的表达

3 讨论

有报道称，表达 $CD44^{+}$ 表面分子、不表达或低表达 $CD24^{-}$ 分子的乳腺癌细胞具有肿瘤干细胞的特性^[6]。而近年来 ALDH1 是更具鉴定意义的乳腺癌干细胞的标志物^[7]；这类细胞能形成乳球细胞、自我更新、侵袭力增强、成瘤和远处转移的潜能^[8]。Ginestier 等^[9]报道 ALDH1 的肿瘤细胞也可能是乳腺癌远处转移的重要介导子，这类细胞已被认为比 $CD44^{+}/CD24^{-}$ 更易形成肿瘤，是比 $CD44^{+}/CD24^{-}$ 更好的预测标志分子。本研究从乳腺癌患者腋窝增生、肿大的淋巴结中提取的细胞经流式细胞仪检测证实其部分细胞的干性标志物 $CD44^{+}$ 和 ALDH1 都有较高水平的表达， $CD24^{-}$ 呈低表达或不表达，其增殖指数较空白对照组 2 细胞强，EMT 的侵袭分子(Vimentin 和 N-Cadherin)表达上调，表明这类细胞在肿瘤转移中具有重要作用。Tanei 等^[10]发现 ALDH1 阳性乳腺癌患者在治疗上完全缓解率显著低于 ALDH1 阴性的患者。因此，ALDH1 是否高表达与乳腺癌的关系极其密切，且与乳腺癌患者疾病的恶性程度和预后相关。

文献报道微小 RNAs 通过调控干细胞关键调节基因的表达完成干细胞的自我更新和分化^[11]，如 miR-203 可以调节 EMT 标志物分子的表达，如 E-cadherin，CSCs 的标志物 $CD44^{+}$ ^[12]；miR-127 的过表达或 BCL6 的耗竭抑制了乳腺癌细胞的增殖^[13]。本研究结果显示 miR30a 抑制了乳腺癌原发灶、转移淋巴结和增生肿大的淋巴结中肿瘤干性标志物 ALDH1、CD44 的表达来抑制肿瘤的进展。对肿瘤侵袭分子 EMT 的标志分子 Vimentin 和 N-Cadherin 也显示出了抑制作用。然而 miR30a 在可疑的乳腺癌腋窝淋巴结转移中异常表达的精确分子机制还有待研究。

(下转第 1611 页)

- [3] Mawhinney MR, Glasgow RE. Current treatment options for the management of esophageal cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2012, 4: 367-377.
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] Zhao L, Yan X, Shi J, et al. Ethanol extract of *Forsythia suspensa* root induces apoptosis of esophageal carcinoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 871-880.
- [6] Liu GX, Wang TT, Hu WJ, et al. Anticancer effect of ethanol extract of *Fructus Forsythiae* on primary cancer cells isolated from ascites and pleural fluids [J]. *Practical Geriatrics*, 2009, 23(5): 359-363.
- [7] 王彩霞, 殷海涛, 刘宝瑞. 连翘三萜类化合物对前列腺癌 PC-3 细胞增殖抑制及放疗敏感性的 [J]. *山东医药*, 2011, 51(45): 25-27.
- [8] 雷秋香, 赵连梅, 颜晰, 等. 连翘叶乙醇提取物对人食管癌细胞增殖抑制作用的研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(4): 394-399.
- [9] 颜晰, 赵连梅, 孙佳玮, 等. 连翘提取物体外抗肿瘤活性的初步研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2012, 24(1): 20-24.
- [10] Li X, Sun J, Hu S, et al. Icariin induced B16 melanoma tumor cells apoptosis, suppressed tumor growth and metastasis [J]. *Iran J Public Health*, 2014, 43(6): 847-848.
- [11] Wang Z, Ding L, Zhang S, et al. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1 β -stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1720-1726.
- [12] 赵连梅, 纪昕, 潘晓明, 等. 淫羊藿苷 (ICA) 对化疗后免疫抑制小鼠的免疫促进作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(12): 1092-1095.
- [13] 赵连梅, 纪昕, 单保恩, 等. 淫羊藿苷对化疗后小鼠骨髓和细胞免疫抑制作用的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(10): 976-979.
- [14] 王谦, 张玲, 毛海婷, 等. 中药淫羊藿苷逆转肝癌 HepG2. 2. 15 细胞恶性表型及诱导分化研究 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(19): 2087-2092.
- [15] 李翠玲, 张玲, 顾洪涛, 等. 淫羊藿苷体内抑瘤作用及其机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(2): 137-142.
- [16] Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, et al. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(30): 30931-30937.
- [17] Reichmann E. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression [J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(4): 309-315.
- [18] Elnemr A, Ohta T, Yachie A, et al. Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(2): 311-316.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2015-12-28)

(上接第 1607 页)

参考文献

- [1] Toru H, Susumu I, Hiroaki N. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 289-296.
- [2] Velasco-Velázquez M, Homsí N, Fuente DM, et al. Breast cancer stem cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(4): 573-577.
- [3] Gorospe M, Abdelmohsen K. MicroRegulators come of age in senescence [J]. *Trends Genet*, 2011, 27(6): 233-241.
- [4] Ouzounova M, Vuong T, Ancy PB, et al. MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 139.
- [5] Walia V, Elble CR. Enrichment for breast cancer cells with stem/progenitor properties by differential adhesion [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(8): 1175-1182.
- [6] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [7] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1): 45-55.
- [8] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1302-1313.
- [9] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.
- [10] Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12): 4234-4241.
- [11] Polytarchou C, Iliopoulos D, Struhl K. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(36): 14470-14475.
- [12] Tian LL, Li MH, Ge JC, et al. miR-203 is downregulated in laryngeal squamous cell carcinoma and can suppress proliferation and induce apoptosis of tumours [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(6): 5953-5963.
- [13] Chen JW, Wang M, Guo MZ, et al. miR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80266.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2015-12-24)