

论著·基础研究

微小 RNA-340 对肝细胞癌细胞转移和侵袭力的影响

袁成良, 邹 宁, 刘朝红, 邹颜娇

(德阳市人民医院检验科, 四川德阳 618000)

摘 要: **目的** 探讨高表达微小 RNA-340(miR-340)对肝细胞癌(HCC)细胞转移和侵袭力的影响。**方法** 采用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒进行 miR-340 转染, Transwell 侵袭实验评价侵袭能力, 实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)测定 HCC 细胞株 miR-340、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的 mRNA 水平, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平, 用蛋白质免疫印迹(Western blot)检测核转录因子 κ B1(NF- κ B1)蛋白水平。**结果** 与 HepG2 相比 miR-340 在 HCC 细胞系中表达水平降低, 高表达 miR-340 的 HepG2 细胞、MHCC-97L 细胞侵袭能力下降。高表达 miR-340 的 HepG2 细胞和 MHCC-97L 细胞 E-钙黏蛋白 mRNA 表达上调, N-钙黏蛋白 mRNA 水平下调, 波形蛋白 mRNA 水平下调。miR-340 使 HepG2 细胞和 MHCC-97L 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达下降; 与 HCC 细胞系比较, 高表达 miR-340 的 HepG2 细胞 NF- κ B1 表达量下降 40%、MHCC-97L 细胞下降 66%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。生物信息学分析预示 NF- κ B1 是 miR-340 的潜在靶基因且萤光素酶报告分析又进一步证实了 miR-340 可以直接作用于 NF- κ B1 的 3' 端非编码区。**结论** miR-340 在抑制细胞迁移、侵袭和上皮细胞间质转化中起着重要的作用, 提示 miR-340 表达水平降低是 HCC 发生的重要环节, 基于 miR-340 的治疗方法可用于 HCC 诊治。

关键词: 微小 RNA-340; 肝细胞癌; 侵袭; 转移; 核转录因子- κ B1

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.19.003

中图法分类号: R735.7

文章编号: 1673-4130(2019)19-2313-05

文献标识码: A

Effect of microRNA-340 on migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell

YUAN Chengliang, ZOU Ning, LIU Chaohong, ZOU Yanjiao

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Deyang City,
Deyang, Sichuan 618000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of microRNA-340(miR-340) on the migration and invasion of human hepatocellular carcinoma(HCC) cells. **Methods** The miR-340 was transiently transfected into HCC cells using Lipofectamine™ 2000 reagent. Using Transwell invasion assay to evaluate the invasion force of HCC cells, The mRNA level of miR-340, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-2 and MMP-9 in HCC cells were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The protein levels of MMP-2 and MMP-9 were detected by ELISA, Western blot were used to analysis the expression of NF- κ B1 protein. **Results** Compared with FTE187, the expression of microRNA-340 in HCC cell lines was decreased. overexpression of microRNA-340 inhibited the invasion ability of HepG2 and MHCC-97L cells. The expression of E-cadherin was up-regulated in HepG2 and MHCC-97L cells with high expression of microRNA-340, the level of N-cadherin and vimentin was down-regulated in these cells. The expression of MMP-2 and MMP-9 in HepG2 and MHCC-97L cells was decreased by microRNA-340. Compared with miR-NC cells, the expression of NF-kappa B1 in HepG2 cells with high expression of microRNA-340 was decreased by 40% and that of MHCC-97L cells by 66%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Bioinformatics analysis predicted that the NF- κ B1 was a potential target gene of miR-340. Luciferase reporter assay further confirmed that miR-340 could directly target the 3' UTR of NF- κ B1. **Conclusion** miR-340 plays an important role in inhibiting migra-

作者简介: 袁成良, 男, 主任技师, 主要从事肿瘤发生机制、自身免疫性疾病的研究。

本文引用格式: 袁成良, 邹宁, 刘朝红, 等. 微小 RNA-340 对肝细胞癌细胞转移和侵袭力的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(19): 2313-2317.

tion, invasion and EMT, suggesting that miR-340 expression is one of the important mechanisms of HCC, miR-340-based therapy can be used to treat HCC.

Key words: microRNA-340; hepatocellular carcinoma; invasion; migration; nuclear factor-kappa B1

肝细胞癌(HCC)占原发性肝癌的 70%~85%, 是全球癌症最常见的死亡原因之一^[1]。治疗 HCC 包括手术切除和肝移植,但这仅仅对一小部分早期诊断的 HCC 患者有效^[2]。造成这种结局的主要原因是 HCC 的高侵袭性和肝内和(或)肝外转移^[3-4]。目前对 HCC 转移和侵袭的机制研究多集中在已知基因上,但有不少学者通过对微小 RNA(miRNA)的研究来了解 HCC 的生物学机制,并且收益颇多。本实验通过 miR-340 转染,利用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、Transwell 侵袭实验和蛋白质免疫印迹(Western blot)等技术来检测上皮细胞间质转化相关分子、基质金属蛋白酶(MMP)及核转录因子- κ B1(NF- κ B1)的表达,进一步探讨 miR-340 对 HCC 细胞转移、侵袭的影响及通过何种途径来调控其转移和侵袭,为预防、诊断和治疗 HCC 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人 HCC 细胞株 HepG2、MHCC-97L 和永生化的健康人输卵管上皮细胞株 FTE187 从美国菌种保藏中心购得。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 实时 PCR 仪购自美国赛默飞公司;DMEM 培养基、胎牛血清均从美国 Gibco 公司购得;LipofectamineTM 2000 试剂购自美国 Invitrogen;qPCR 试剂盒购自荷兰 Qiagen 公司;含细胞外基质蛋白的基质胶从美国 BD 生物购得;包被的 Transwell 培养皿(8 mm 孔径)购自美国 Corning 公司;ELISA 试剂盒从武汉优尔生生命科学装备有限公司购得;Western blot 所用裂解缓冲液、基于二喹啉甲酸比色法(BCA)的蛋白检测试剂盒、化学发光(ECL)试剂均购自中国生物技术研究所有碧云天;蛋白酶抑制剂从德国默克购得;聚偏二氟乙烯膜(PVDF)从美国 Millipore 购得;NF- κ B1 抗体、羊抗兔 IgG 二抗和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)购自美国细胞信号传导技术公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人 HCC 细胞株 HepG2、MHCC-97L 和永生化的健康人输卵管上皮细胞株 FTE187 均用 DMEM 培养基培养,严格按照说明书进行。

1.3.2 miRNA 瞬时转染 HepG2 和 MHCC-97L 细胞株均转染 miR-340 作为 miR-340 组。两个细胞株不转染 miR-340 为对照即 miR-NC 组。24 h 后用 LipofectamineTM 2000 试剂将 50 nmol/L 的 miR-340

转染入细胞。

1.3.3 Transwell 侵袭实验 用含细胞外基质蛋白的基质胶包被的 Transwell 培养皿(8 mm 孔径)来评估细胞的侵袭力。细胞在无血清培养液中培养 24 h, 2×10^5 个细胞悬浮于 100 μ L 无血清 DMEM,然后接种在顶室中,在下室中加入 600 μ L 含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM。于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 环境中孵育 24 h 后,用棉签擦掉留在膜表面上的细胞,然后穿透细胞在甲醇中固定,再用 0.1% 结晶紫染色。用相差显微镜观察并记录侵袭到下层培养池中的细胞数目。

1.3.4 qPCR 检测指标的表达情况 采用 qPCR 检测 miR-340 和 5 种 mRNA 包括 E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、MMP-2 和 MMP-9,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。2 μ g RNA 用于 qPCR,用 qPCR 试剂盒进行 RNA 转录和扩增。SYBR Green II 用来作为荧光信号,ROX 作为对照荧光。mRNA 的逆转录在 Applied Biosystems GeneAmp PCR 系统 9700 上进行,实时 PCR 在 ABI7500 实时 PCR 仪上进行。所有的样本都同批检测,以避免批间差。各样品均做 3 份平行试验取其均值。其表达水平由双 Δ CT ($\Delta\Delta$ CT)法进行分析,将 GAPDH mRNA 的表达作为标准品,用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 来计算。另外采用 ELISA 试剂盒对上述培养上清液中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平进行测定。

1.3.5 Western blot 分析 HepG2 和 MHCC-97L 细胞在低温 PBS 中洗涤 2 次,然后在 RIPA 裂解缓冲液与蛋白酶抑制剂中溶解。细胞裂解物的蛋白质浓度用 BCA 试剂盒测定,50 μ g 蛋白通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转移到 PVDF 膜上。该膜用吐温-20 Tris 缓冲盐水(TBST)稀释的 5% 牛奶室温包被 1 h,4 $^{\circ}$ C 用 NF- κ B1 抗体(1:1 000)孵育过夜。膜再用辣根过氧化物酶的羊抗兔 IgG 二抗孵育(1:1 000)2 h。将蛋白用 ECL 试剂显影。密度用的 Image J 软件进行测定,每个样本的值标准化为 GAPDH(1:1 000)的吸光度值。

1.3.6 荧光素酶报告分析 HepG2 和 MHCC-97L 细胞(2×10^5 /孔)于转染前接种于 24 孔板并培养过夜。细胞用 pMIR-EGFR-3'UTR 的野生型或突变型质粒、miR-340 或 miR-NC 和 pRL-SV40 质粒共转染,使用 LipofectamineTM 2000 试剂。在共转染 48 h 后,萤火虫荧光素和海肾荧光素酶活性用双荧光素酶报告系统定量检测。各组均做 3 个平行实验。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism5.0 软件进行统计学分析。各组计数资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HepG2 和 MHCC-97L 细胞系中 miR-340 表达水平比较 qPCR 系统检测结果表明,与健康人输卵管上皮细胞株 FTE187 (1.04 ± 0.08) 相比较,在 HepG2 (0.44 ± 0.05) 和 MHCC-97L (0.46 ± 0.07) 细胞中 miR-340 表达水平显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 miR-340 高表达抑制 HepG2 和 MHCC-97L 细胞的侵袭能力 侵袭能力通过 Transwell 侵袭实验进行评价, HepG2 和 MHCC-97L 细胞用 miR-340 和 miR-NC 转染,然后在顶室接种。24 h 后通过膜侵入的 HepG2 和 MHCC-97L 细胞被染色和定量。转染了 miR-340 的 HepG2 细胞,通过 Transwell 小膜浸润的数目 (65 ± 8 个细胞/高倍视野) 比 miR-NC 组 (120 ± 10 个细胞/高倍视野) 下降 54.17%, 在 MHCC-97L 细胞组 (41 ± 6 个细胞/高倍视野) 下降 34.17%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

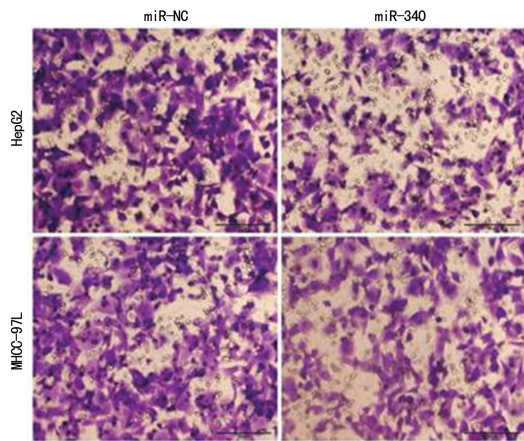
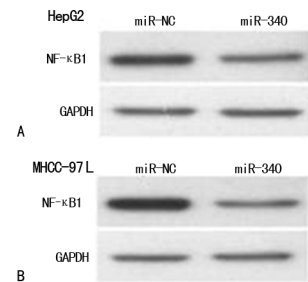


图 1 高表达的 miR-340 抑制 HepG2 和 MHCC-97L 细胞的侵袭

2.3 miR-340 高表达对 HCC 上皮细胞-间质转化 (EMT) 相关分子的影响 采用 qPCR 检测高表达 miR-340 的 HepG2 和 MHCC-97L 细胞中 EMT 标志物的表达水平。发现高表达 miR-340 的 HepG2 细胞和 MHCC-97L 细胞中 E-钙黏蛋白 mRNA 表达上调, 分别为 (2.72 ± 0.04) 和 (2.16 ± 0.03); N-钙黏蛋白 mRNA 分别为 (0.21 ± 0.01)、(0.34 ± 0.02) 表达下调; 波形蛋白 mRNA 分别为 (0.31 ± 0.02)、(0.33 ± 0.03) 表达下调。而对照组 HepG2 和 MHCC-97L 细胞上对应 EMT 标志物的表达水平分别为 E-钙黏蛋白 mRNA (1.32 ± 0.02) 和 (1.12 ± 0.02); N-钙黏蛋白 mRNA 分别为 (0.61 ± 0.01)、(0.74 ± 0.02); 波形蛋白 mRNA 分别为 (0.52 ± 0.02)、(0.61 ± 0.03), 差

异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 HepG2 和 MHCC-97L 细胞中 miR-340 高表达对 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响 采用 qPCR 和 ELISA 分别检测转染 miR-340 的 HepG2 和 MHCC-97L 细胞中的 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 和蛋白水平, 结果显示高表达 miR-340 的 HepG2 细胞 MMP-2 的 mRNA (0.47 ± 0.04) 和蛋白 (2.02 ± 0.11) 水平降低; MMP-9 的 mRNA (0.33 ± 0.03) 和蛋白 (0.87 ± 0.06) 水平明显降低, 对照组 HepG2 细胞 MMP-2 的 mRNA (0.67 ± 0.05) 和蛋白 (3.24 ± 0.18), MMP-9 的 mRNA (0.57 ± 0.04) 和蛋白 (1.56 ± 0.08), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。高表达 miR-340 的 MHCC-97L 细胞 MMP-2 的 mRNA (0.19 ± 0.01) 和蛋白 (1.04 ± 0.08) 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MMP-9 的 mRNA (0.27 ± 0.02) 和蛋白 (1.63 ± 0.07) 水平也明显降低, 对照组 MHCC-97L 细胞 MMP-2 的 mRNA (0.37 ± 0.02) 和蛋白 (2.12 ± 0.10); MMP-9 的 mRNA (0.43 ± 0.03) 和蛋白 (2.32 ± 0.14), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: A 表示 HepG2 细胞中的 NF-κB1 蛋白质和 GAPDH 的表达; B 表示 MHCC-97L 细胞中 NF-κB1 蛋白质和 GAPDH 的表达

图 2 miR-340 转染的 HepG2 和 MHCC-97L 细胞 NF-κB1 蛋白的表达

2.5 TargetScan 6.2 软件预测 miR-340 的作用靶点 TargetScan 6.2 软件预测 NF-κB1 是 miR-340 的结合物, 用 Western blot 对 miR-340 转染的 HepG2 和 MHCC-97L 细胞中的 NF-κB1 蛋白质表达进行测定, 见图 2。结果显示, 上调 miR-340 后, HepG2 细胞 NF-κB1 表达量 (1.61 ± 0.13) 较 miR-NC 组 (0.96 ± 0.10) 降低 40%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MHCC-97L 细胞 NF-κB1 表达量 (2.71 ± 0.16) 较 miR-NC 组 (0.92 ± 0.11) 下降 66%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。为了进一步证实 NF-κB1 是否是 miR-340 的直接靶点, 将 NF-κB1 的 3'-UTR 野生型和突变型克隆到荧光素酶指示基因载体, 结果显示 miR-340 显著抑制 pMir NF-κB1 3'-UTR WT 的荧光素酶活性。

3 讨 论

miRNA 是长度为 21~23 个核苷酸的序列^[5], 是

调节基因表达的新指标,能够调节细胞增殖、转移、凋亡等参与肿瘤的发生发展^[6]。近年来,miR-340 被认为是肿瘤抑制基因,在多种生物学过程如细胞迁移和侵袭中发挥作用^[7-13]。研究发现其在胃癌、食管癌和乳腺癌中表达降低^[14-17],miR-340 在食管癌细胞表达降低,作为抑癌基因通过下调磷酸丝氨酸转氨酶 1 (PSAT1)抑制食管癌细胞的生长、集落形成和侵袭^[10]。高表达的 miR-340 作用于高迁移率核小体结合域 5(HMGN5)抑制前列腺癌细胞的增殖和侵袭^[13]。本研究重点研究了 miR-340 在人类 HCC 发病机制中的作用。

本研究通过 qPCR 技术发现 miR-340 水平在 HCC 细胞株 HepG2 和 MHCC-97L 比健康人输卵管上皮细胞系 FTE187 显著降低,换言之,增加 miR-340 水平可抑制 HCC 细胞生长发育。这之前学者报道的 miR-340 能降低肿瘤的发生率相符^[18]。此外,一些报道还证实了 miR-340 在大肠癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤和口腔鳞状细胞癌也明显下调^[9]。这表明 miR-340 异常可见于多种类型的癌症细胞和组织,因此,推测 miR-340 降低在肿瘤发生中起着关键作用。

通过 Transwell 试验发现,miR-340 可显著抑制 HCC 细胞的侵袭。那么,miR-340 是如何影响肿瘤细胞侵袭的呢?通过检测 miR-340 转染的 HepG2 和 MHCC-97L 细胞中 EMT 标志物,EMT 是上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的过程,是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程,研究发现,EMT 在 HCC 的迁移侵袭过程中起到关键性的作用^[19],结果表明,miR-340 可通过大幅上调上皮标志物 E-钙黏蛋白和下调间充质标志物 N-钙黏蛋白和波形蛋白从而显著抑制肿瘤细胞的侵袭能力,这个结果表明 miR-340 可通过抑制 EMT 来抑制细胞的侵袭能力。

MMP 是一类降解细胞外基质的蛋白水解酶,在多种肿瘤细胞的侵袭与转移中发挥关键作用^[20]。KAMEL 等^[21]的研究发现,MMP-2 的过表达与卵巢上皮癌的浸润和转移具有相关性。LIU 等^[22]发现 MMP-9 的高表达与鼻咽癌淋巴转移和临床分期密切相关,在本研究中,用 qRT-PCR 和 ELISA 分别检测转染 miR-340 细胞的 MMP-2 与 MMP-9 的 mRNA 与蛋白水平。结果显示转染 miR-340 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 和蛋白水平明显减少,表明上调的 miR-340 可通过下调 MMP-2 和 MMP-9 来抑制细胞的迁移能力。那么推测在 miR-340 表达降低的 HCC 细胞中,MMP-2 和 MMP-9 增加了细胞的转移能力。

已有报道称 miR-340 可通过靶向 CDK6,RHC-

CK1 和 cMet 来影响癌细胞的生长、转移^[8-13]。虽然生物信息学工具可能有助于揭示 miRNA 作用的靶 mRNA,但这需要用其他试验来验证。在本文中,显示 miR-340 的作用靶点是 NF- κ B1 mRNA,从而揭示了有关肿瘤发生的可能机制。实际上,NF- κ B1 是 Rel/NF- κ B 转录因子家族的成员,在免疫反应、胚胎和细胞谱系发育和肿瘤发生等都起着关键作用^[23]。本研究结果表明,NF- κ B1 是 miR-340 的作用靶点。首先,使用免疫印迹确认了 miR-340 会导致 NF- κ B1 蛋白水平的显著下降。然后发现 miR-340 的结合区与 NF- κ B1 的 mRNA 的 3' UTR 互补。而且,NF- κ B1 3'-UTR 萤光素酶活性对 miR-340 的上调有极强敏感性,miR-340 结合位点突变去除了 miR-340 对萤光素酶活性的调节作用。因此,断定 miR-340 直接调节 NF- κ B1 表达。

研究者发现 MMP-2 和 MMP-9 与 NF- κ B1 发生了同方向改变,但 E-钙黏蛋白与 NF- κ B1 却发生了反方向改变。有报道证实了 miR-9 通过直接靶向 NF- κ B1 表达和下调其下游分子 MMP-2 和 MMP-9 来抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的迁移和侵袭^[24-26]。另有报道表明 miR-9 可以通过目标基因 NF- κ B1 抑制 E-钙黏蛋白表达从而抑制黑色素瘤细胞的转移^[27]。因此,推测 miR-340 通过 NF- κ B1 调节 MMP-2,MMP-9 和 E-钙黏蛋白从而抑制肝癌细胞的侵袭和转移。

4 结 论

miR-340 在 HCC 细胞株中表达降低,其作用的靶基因为 NF- κ B1,上调其表达可以增加 E-钙黏蛋白和降低 N-钙黏蛋白和波形蛋白从而显著抑制 EMT,另外,还可以降低 MMP-2 和 MMP-9 从而抑制肝癌细胞转移和侵袭。这种新的 miR-340/NF- κ B1 途径可能对肝癌的潜在分子机制和转移提供新的见解,高表达的 miR-340 可能为未来预防、诊断和治疗 HCC 提供新的思路 and 有效方案,具有潜在临床应用价值。

参考文献

- [1] JU B L, CHEN Y B, ZHANG W Y, et al. miR-145 regulates chemoresistance in hepatocellular carcinoma via epithelial mesenchymal transition[J]. Cell Mol Biol, 2015, 61 (3): 12-16.
- [2] LUO Q, LI Y, DENG J, et al. PARP-1 inhibitor sensitizes arsenic trioxide in hepatocellular carcinoma cells via abrogation of G2/M checkpoint and suppression of DNA damage repair[J]. Chem Biol Interact, 2015, 226(25): 12-22.
- [3] MULCAHY M F. Management of hepatocellular cancer [J]. Curr Treat Options Oncol, 2005, 6(5): 423-435.
- [4] ELSERAG H B. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118-1127.

- [5] LIESE J, PEVELING-OBERHAG J, DOERING C, et al. A possible role of miRNAs as predictive markers for the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. *Transpl Int*, 2016, 29(3):369-380.
- [6] AMR K S, EZZAT W M, ELHOSARY Y A, et al. The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Gene*, 2016, 575(1):66-70.
- [7] HUANG D, QIU S, GE R, et al. miR-340 suppresses glioblastoma multiforme[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(11):9257-9270.
- [8] LI X, GONG X, CHEN J, et al. miR-340 inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing CDK6, cyclin-D1 and cyclin-D2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3):670-677.
- [9] SHI L, CHEN Z G, WU L L, et al. miR-340 reverses cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma cell lines by targeting Nrf2-dependent antioxidant pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(23):10439-10444.
- [10] FERNANDEZ S, RISOLINO M, MANDIA N, et al. miR-340 inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting multiple negative regulators of p27 in non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(25):3240-3250.
- [11] TAKEYAMA H, YAMAMOTO H, YAMASHITA S, et al. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(4):976-985.
- [12] SUN Y, ZHAO X, ZHOU Y, et al. miR-124, miR-137 and miR-340 regulate colorectal cancer growth via inhibition of the Warburg effect[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(4):1346-1352.
- [13] WU Z S, WU Q, WANG C Q, et al. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met[J]. *Cancer*, 2011, 117(13):2842-2852.
- [14] HOU X, QIAO H. Effect of miR-340 on gastric cancer cell proliferation and apoptosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10):13108-13113.
- [15] YU W, ZHANG G, LU B, et al. miR-340 impedes the progression of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting EZH2[J]. *Gene*, 2016, 577(2):193-201.
- [16] CHEN C P, SUN Z L, LU X, et al. miR-340 suppresses cell migration and invasion by targeting MYO10 in breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2):709-716.
- [17] WOZNAK M, SZTILLER-SIKORSKA M, CZYZ M. Diminution of miR-340-5p levels is responsible for increased expression of ABCB5 in melanoma cells under oxygen-deprived conditions[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99(3):707-716.
- [18] ZHANG J, JIN H, LIU H, et al. MiRNA-99a directly regulates AGO2 through translational repression in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogenesis*, 2014, 3(1):e97.
- [19] CHEN J S, LI H S, HUANG J Q, et al. Down-regulation of Gli-1 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 393(1/2):283-291.
- [20] RORSYTH P A, WONG H, LAING T D, et al. Gelatinase-A, (MMP-2), gelatinase-B(MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1 • MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas[J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(1):1828-1835.
- [21] KAMEL H, ABDELAZIM L, HABIB S M, et al. Immunorexpression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in malignant ovarian epithelial tumours[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2010, 32(1):580-586.
- [22] LIU Z, LI L, YANG Z, et al. Increased expression of MMP9 is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1):270.
- [23] ZANDI E, KARIN M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I κ B kinase complex[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(7):4547-4551.
- [24] QIN Y, LIU X J, LI L, et al. MMP-2/9-oriented combinations enhance antitumor efficacy of EGFR/HER2-targeting fusion proteins and gemcitabine[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(1):121-130.
- [25] FIORENTINI C, BODEI S, BEDUSSI F, et al. GPNMB/OA protein increases the invasiveness of human metastatic prostate cancer cell lines DU145 and PC3 through MMP-2 and MMP-9 activity[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(1):100-111.
- [26] ZHANG H, SHEN B, SWINARSKA J T, et al. 9-Hydroxyphenolphorbide α -mediated photodynamic therapy induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in Hep-2 cells via ROS-mediated suppression of the ERK pathway[J]. *Photo Phot Ther*, 2014, 11(1):55-62.
- [27] KATO M T, BOLANHO A, ZARELLA B L, et al. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9[J]. *J Dent Res*, 2014, 93(1):74-77.

(收稿日期:2019-03-15 修回日期:2019-06-29)