

MicroRNA-205 抑制黑素瘤细胞迁移和侵袭的作用及其机制

陈虎艳, 王上上, 姜敏, 张乔安, 陈连军*

复旦大学附属华山医院皮肤科, 上海 200040

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-205 (miR-205) 表达对人类黑素瘤细胞株(A375 和 A2058) 迁移和侵袭的作用及其分子机制。**方法** 转染 miR-205 过表达慢病毒(Lenti-miR-205) 构建 miR-205 过表达的黑素瘤细胞 A375 和 A2058 细胞系(miR-205 组), 转染空白对照慢病毒作为对照细胞系(NC 组)。通过划痕实验和 Transwell 实验分别检测两组细胞迁移和侵袭能力, 激光共聚焦扫描显微镜观察细胞形态和表达钙黏蛋白 E(E-cadherin) 的细胞数量与荧光强度, 蛋白质印迹法检测 E-cadherin、Twist、整合素(integrin)、波形蛋白(vimentin)、Zeb1、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 蛋白表达。**结果** 培养 8 h 和 24 h 时 miR-205 组 A375 与 A2058 细胞的迁移能力均大于 NC 组($P < 0.01$); miR-205 组两种细胞的侵袭能力均低于 NC 组($P < 0.01$)。MiR-205 过表达后 A375 和 A2058 细胞均由梭形、基质型向圆形、表皮型转化。与 NC 组相比, miR-205 组细胞 E-cadherin 蛋白表达增加($P < 0.01$), 且表达 E-cadherin 的细胞数量和荧光强度均增加; Twist、integrin、vimentin、Zeb1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。**结论** MiR-205 通过诱导 E-cadherin 的表达逆转上皮间质转化, 从而抑制黑素瘤细胞的迁移和侵袭。

[关键词] microRNA-205; 黑素瘤; 上皮间质转化; 细胞迁移; 细胞侵袭

[中图分类号] R 739.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0576-07

Inhibitory effect of microRNA-205 on migration and invasion of melanoma cell lines and its related mechanism

CHEN Hu-yan, WANG Shang-shang, JIANG Min, ZHANG Qiao-an, CHEN Lian-jun*

Department of Dermatology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of microRNA-205 (miR-205) expression on migration and invasion of human melanoma cell lines (A375 and A2058) and its related molecular mechanism. **Methods** The miR-205 over-expressed melanoma cells (miR-205 group) were constructed via transfecting A375 and A2058 cell lines with Lenti-miR-205, and the cells transfected with blank vector virus were taken as control group (NC group). The migration and invasion ability of the cells in two groups were detected by scratch assay and Transwell assay, respectively. The confocal laser scanning microscopy was employed to observe the cell morphology and the cell number and fluorescence intensity of the cells expressing E-cadherin protein. Western blotting was performed to detect the protein expressions of E-cadherin, Twist, integrin, vimentin, Zeb1, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. **Results** At 8 h and 24 h of cells culture, the migration ability of A375 and A2058 cells in miR-205 group was significantly higher than that in NC group ($P < 0.01$); the invasion ability of two kinds of cells in miR-205 group was lower than that in NC group ($P < 0.01$). A375 and A2058 cells over-expressing miR-205 were transformed from shuttle, stroma type to round and epidermal type. Compared with the NC group, the E-cadherin expression of the cells in miR-205 group was significantly increased ($P < 0.01$) and the cell number and fluorescence intensity of the cells expressing E-cadherin was increased, while the protein expressions of Twist, integrin, vimentin, Zeb1, MMP-2 and MMP-9 were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** MiR-205 can inhibit the migration and invasion abilities of melanoma cells by inducing E-cadherin expression and reversing epithelial-mesenchymal transition.

[Key words] microRNA-205; melanomas; epithelial-mesenchymal transition; cell migration; cell invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 576-582]

[收稿日期] 2017-01-05 **[接受日期]** 2017-02-22

[基金项目] 上海市卫生局科研课题(20134363)。Supported by Scientific Research Project of Shanghai Health Bureau (20134363).

[作者简介] 陈虎艳, 硕士, 住院医师。E-mail: chhy1027@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-52888178, E-mail: lianjunchan@163.com

恶性黑色素瘤是临床上一种高度恶性的肿瘤,其发病率在全球男性及女性中分别排第5和第6位,病死率高达23.2%^[1]。恶性黑色素瘤常原发于皮肤及黏膜组织,早期症状不明显,生长速度快,通常伴随局部侵犯,也可广泛侵犯表皮、皮下组织以及深层结缔组织,甚至相邻器官(或组织),也可通过淋巴结、血行远处转移或广泛播散。黑色素瘤的疗效和预后与转移灶数量密切相关,而临床上许多患者在确诊时已经属于中晚期,伴随多处转移,导致预后不良^[2]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)指上皮细胞在特定生理或病理情况下向间质细胞表型转变的过程。EMT与肿瘤的发生、发展尤其是侵袭转移密切相关^[3]。EMT的现象也存在于黑色素瘤中^[4],因此,揭示EMT的分子调控机制及其与黑色素瘤侵袭转移的关系,对于预防和治疗黑色素瘤具有重要意义。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度不超过25 nt的内源性非编码RNA。MiRNA是近年来生命科研的明星分子,目前在人体已发现超过1 000种miRNA,它们广泛参与到机体的多种生理和病理过程,如细胞增殖、分化凋亡、迁移侵袭、器官发育、肿瘤发生和发展等^[5]。MiRNA主要作用于编码基因的转录后水平,可以抑制靶基因的表达,在肿瘤发生、发展中miRNA被归纳为抑癌基因和癌基因两类。现在已知黑色素瘤的发生、发展经历一个多步骤的复杂过程,涉及许多癌基因、抑癌基因以及信号转导的异常激活或失活。研究显示多种miRNA参与调控黑色素瘤细胞的生物学行为,如miR-330-5p、miR-542-3p等可以抑制黑色素瘤细胞迁移和侵袭^[6-7]。

MicroRNA-205(miR-205)是一种具有抑癌基因特征的miRNA,在多种肿瘤中表达降低,恢复其表达可以抑制多种肿瘤细胞增殖,如黑色素瘤^[8]。临床标本研究显示,miR-205在黑色素瘤组织中表达减少,其表达水平与黑色素瘤的分期呈正相关,与患者预后呈负相关^[1]。以上研究提示miR-205可能调控黑色素瘤细胞的迁移和侵袭,但是目前关于miR-205与黑色素瘤细胞EMT关系以及其调控的分子机制尚不明。因此,本研究通过miR-205过表达以探讨miR-205对黑色素瘤细胞EMT、迁移和侵袭的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人黑色素瘤细胞株 A375 和 A2058

购自中国科学院上海分院细胞库,均采用含10%胎牛血清(FBS)和1%青-链霉素混合液的DMEM培养液培养,培养条件为5% CO₂、37℃的细胞培养箱,生长方式为贴壁生长。每天换液,当细胞融合度达80%~90%时,采用0.25%胰蛋白酶消化传代,继续培养,用第4或第5代细胞进行后续实验。

1.2 MiR-205 过表达慢病毒的转染

MiR-205过表达慢病毒(Lenti-miR-205)和空白对照慢病毒购自上海基科生物化学有限公司[对照慢病毒和miR205过表达病毒均携带绿色荧光蛋白(GFP)],分别称为miR-205组和NC组。慢病毒转染步骤如下:取生长良好的A375和A2058细胞接种于12孔板培养24h,加入含有慢病毒浓度为10⁷ U/mL的完全培养液孵育24h,然后去掉含有慢病毒的培养液,换成1 mL新鲜培养液继续培养过夜,然后将细胞1:3传代,并继续培养1~2 d。为了获得稳转细胞株,采用含2 μg/mL嘌呤霉素的培养液进行培养,每3 d更换培养液,2周后获得稳转细胞株。

1.3 划痕实验检测细胞迁移能力

在6孔板分别培养A375和A2058细胞(5×10⁵/孔),贴壁过夜后用枪头垂直比着直尺在培养皿底部划线,注意角度不要倾斜。用PBS洗细胞3次,洗掉划下的细胞,用含2% FBS的培养液在37℃、5% CO₂培养箱内培养,分别在0、8、24 h时随机选取3个不同视野下拍照,与0 h进行比较并计算迁移宽度。计算公式:拍照观察时相对迁移宽度=拍照观察时迁移宽度/0 h时平均划痕宽度。

1.4 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力

在24孔板Transwell小室上室底部中央垂直加入100 μL稀释后的基质胶(1 mg/mL;用4℃预冷的无FBS培养液配制),37℃温育4~5 h使其呈胶状。细胞FBS饥饿2 h后,取200 μL细胞密度为2.5×10⁴/mL的细胞悬液加入Transwell小室上室,贴壁过夜后换无FBS培养液。Transwell小室下室加入500 μL含20% FBS的培养液培养24 h后,用4%多聚甲醛室温固定30 min、0.1%结晶紫染色30 min、棉签拭去上室内的细胞,电子显微镜观察并计数紧贴上室底部膜下的细胞数。

1.5 激光共聚焦扫描显微镜观察细胞形态与蛋白表达

在96孔板中接种约5×10³/孔的细胞,贴壁培养24 h后用4%多聚甲醛4℃固定15 min, PBS清洗

3次;再用体积分数为0.2%的Triton-X 100破膜15 min, PBS清洗3次;然后用羊血清封闭1.5 h, PBS清洗3次, 4℃孵育过夜标记β-actin(1:100; 60008-1-Ig, Proteintech公司), PBS清洗3次, 连接 DyLight 594的二抗(1:200)处理1 h, DAPI复染5 min, PBS清洗3次, 用防荧光淬灭封片剂封片。采用激光扫描共聚焦显微镜观察目的蛋白的荧光表达情况: DyLight 594 激发波长 594 nm, 发射波长 618 nm; DAPI 激发波长 358 nm, 发射波长 461 nm。

1.6 蛋白质印迹法检测 EMT 相关蛋白的表达 离心收集细胞, RIPA 裂解液处理 30 min 后, 4℃ 10 000×g 离心 10 min, 分离上清。蛋白经变性后, 加入 SDS-PAGE 凝胶的上样孔, 电泳、转膜(NC膜)、10%脱脂奶粉封闭1 h; 分别于4℃过夜标记特异性一抗 E-cadherin (3195)、波形蛋白(vimentin, 3932)、Zeb1 (3396)、整合素(integrin, 3629; 均购自 Cell Signaling 公司)和 Twist (ab50887)、基质金属蛋白酶(MMP)-2 (2763-1)、MMP-9(2551-1; 均购自 Abcam 公司), 所有目的抗体稀释比例均为1:1 000。以 GAPDH 作为内参照蛋白(稀释比例为1:5 000; 60004-1-Ig, Proteintech 公司)。TBST 洗膜 3 次 5 min; 标记相应二抗(1:1 000 稀释), 孵育 1 h, TBST 洗 3 次 5 min; 暗室中膜上滴加适量 ECL 发光液, 采用 Tanon-6100 全自动化学发光图像分析系统检测发光强度。使用 Quantity One 4.31 软件定量各条带的灰度值, 根据公式计算目的蛋白的相对灰度值: 目的蛋白的相对灰度值 = 目的蛋白的灰度值 / GAPDH 灰度值。

1.7 qPCR 检测 miR-205 mRNA 的表达 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 用赛默飞 Nanodrop 2000/2000C 分光光度计测定总 RNA 浓度。然后用反转录试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司)反转录获得 cDNA。MiRNA 引物使用 Bulge-Loop™ miRNA qPCR Primer Set(广州市锐博生物科技有限公司); 按 qPCR 试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司)操作说明进行 qPCR 反应。qPCR 反应条件: 95℃ 30 s; 93℃ 5 s; 60℃ 30 s; 95℃ 15 s; 35 个循环; 60℃ 1 min; 95℃ 15 s。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用

Student's *t* 检验。所有实验重复 3 次。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Lenti-miR-205 稳转 A375 和 A2058 细胞株构建成功 慢病毒(Lenti-miR-205)对 A375(图 1A)和 A2058(图 1B)细胞的转染效率较高。qPCR 结果显示, miR-205 组两种细胞的 miR-205 mRNA 表达水平高于 NC 组(A375: 251.00 ± 57.90 vs 1.00 ± 0.08, $P < 0.01$; A2058: 52.90 ± 4.80 vs 1.00 ± 0.02, $P < 0.01$), 提示 miR-205 过表达的 A375 和 A2058 稳转株构建成功。

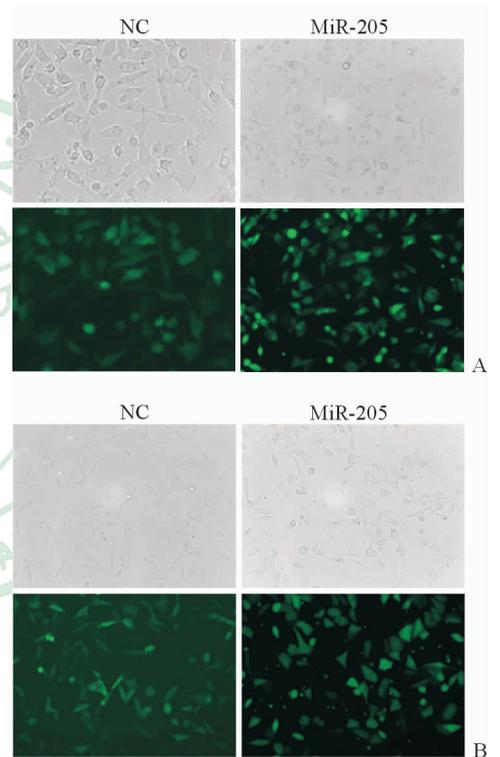


图 1 MiR-205 过表达稳转 A375 和 A2058 细胞株的构建
Fig 1 Establishment of A375 and A2058 cells over-expressing miR-205

A: A375 cells; B: A2058 cells. NC group: The A375 and A2058 cells transfected with blank vector virus; miR-205 group: The A375 and A2058 cells transfected with Lenti-miR-205. Original magnification: ×200

2.2 MiR-205 过表达抑制 A375 和 A2058 细胞的迁移能力 如图 2 所示, 划痕后细胞培养至 8 h 时, miR-205 组 A375 和 A2058 细胞的相对划痕宽度均宽于 NC 组($P < 0.01$); 24 h 时 NC 组划痕处均长满细胞, 而 miR-205 组痕宽依然存在, 两组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

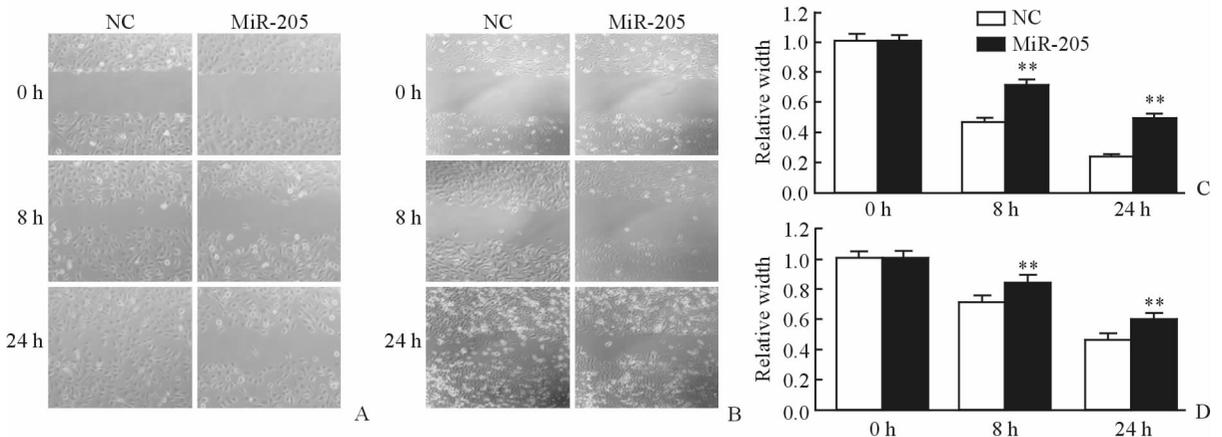


图 2 划痕实验检测 miR-205 过表达对 A375 和 A2058 细胞迁移能力的影响

Fig 2 Effect of miR-205 over-expression on migration ability of A375 and A2058 cells by scratch assay

A, C: A375 cells; B, D: A2058 cells. NC group: The A375 and A2058 cells transfected with blank vector virus; miR-205 group: The A375 and A2058 cells transfected with Lenti-miR-205. 0 h, 8 h and 24 h indicate that the cells cultured for 0, 8 and 24 h after scratching. Original magnification: $\times 100$ (A, B). ** $P < 0.01$ vs NC group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 MiR-205 过表达抑制 A375 和 A2058 细胞的侵袭能力 Transwell 实验结果(图 3)显示, miR-205 组 A375 和 A2058 细胞的穿膜数量均少于 NC 组($P < 0.01$), 提示 miR-205 过表达能够减弱 A375 和 A2058 细胞的侵袭能力。

2.4 MiR-205 过表达对 A375 和 A2058 细胞形态的影响 由图 4 可见, NC 组 A375 和 A2058 细胞均为梭型或长条形, 而 miR-205 组两种细胞均变为圆形、短杆型, 提示 miR-205 过表达后 A375 和 A2058 细胞的形态特征由基质型向表皮型转化。

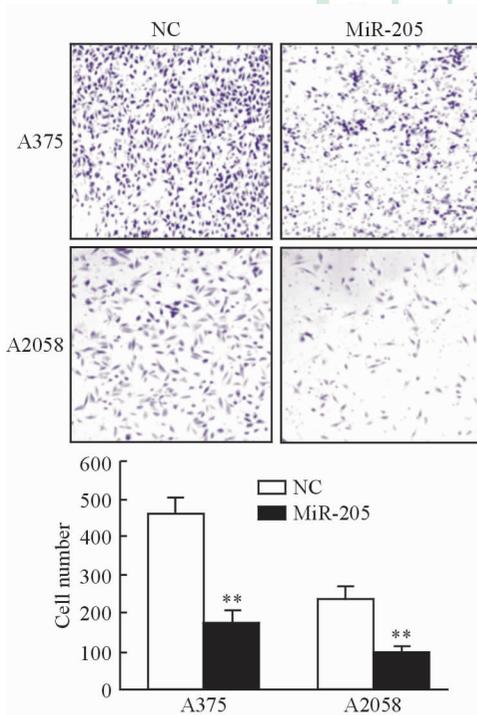


图 3 Transwell 实验检测 miR-205 过表达对 A375 和 A2058 细胞侵袭能力的影响

Fig 3 Effect of miR-205 over-expression on invasion ability of A375 and A2058 cells by Transwell assay

NC group: The A375 and A2058 cells transfected with blank vector virus; miR-205 group: The A375 and A2058 cells transfected with Lenti-miR-205. Original magnification: $\times 100$. ** $P < 0.01$ vs NC group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

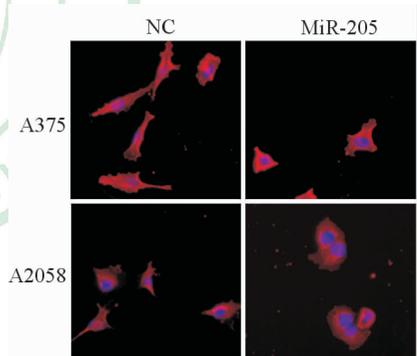


图 4 激光共聚焦扫描显微镜观察 miR-205 过表达对 A375 和 A2058 细胞形态的影响

Fig 4 Effect of miR-205 over-expression on morphology of A375 and A2058 cells by confocal laser scanning microscopy

NC group: The A375 and A2058 cells transfected with blank vector virus; miR-205 group: The A375 and A2058 cells transfected with Lenti-miR-205. Original magnification: $\times 400$

2.5 MiR-205 过表达对 A375 和 A2058 细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响 MiR-205 组 A375 和 A2058 细胞内 E-cadherin 蛋白表达均高于 NC 组($P < 0.01$), 而 vimentin、intergrin、Twist、Zeb1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达均低于 NC 组($P < 0.01$), 见图 5A~5C。激光共聚焦扫描显微镜结果显示, miR-205 组两种细胞内 E-cadherin 表达数量与荧光强度较 NC 组增加(图 5D)。

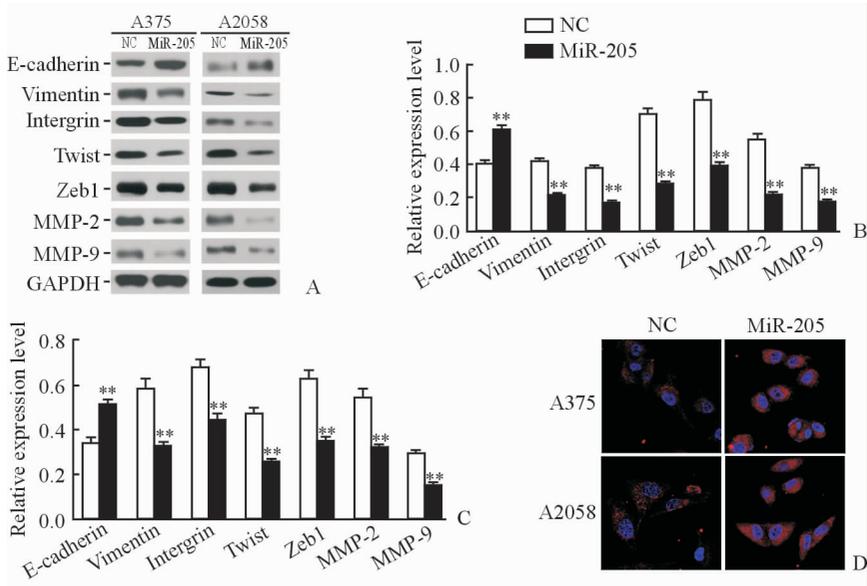


图5 MiR-205 过表达对 EMT 相关蛋白表达水平的影响

Fig 5 Effect of miR-205 over-expression on expressions of EMT-related proteins

A-C: The expressions of EMT-related proteins were detected by Western blotting (B: A375 cells; C: A2058 cells); D: The expression of E-cadherin was detected by confocal laser scanning microscopy. NC group: The A375 and A2058 cells transfected with blank vector virus; miR-205 group: The A375 and A2058 cells transfected with Lenti-miR-205. EMT: Epithelial-mesenchymal transition; MMP: Matrix metalloproteinase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. * * $P < 0.01$ vs NC group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Original magnification: $\times 400$ (D)

3 讨论

黑色素瘤发源于表皮基底的黑色素细胞,细胞具有极性,细胞间排列紧密,具有非常广泛的紧密连接。众多的细胞分子在维持肿瘤细胞形态和细胞间连接中发挥重要作用,如 E-cadherin 等^[9]。黑色素瘤细胞是如何打破这种连接方式,从原发部位游离,进而启动肿瘤的侵袭和转移,并如何重塑其生存的微环境,其具体机制尚不清楚。近年来,EMT 在肿瘤侵袭和转移中的作用逐渐成为人们关注的热点,被认为是肿瘤发生侵袭转移的始动环节^[10]。EMT 是指具有极性的细胞通过特定程序转化为具有间质表型的生物学过程。通过 EMT,细胞失去极性,失去与基底膜的连接表型,获得较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型。EMT 发生过程中表皮细胞标志物 E-cadherin、角蛋白等表达下调或缺失,间质细胞标志物 N-cadherin、vimentin 等表达则显著上调^[11]。EMT 是黑色素瘤细胞的常见现象,是导致侵袭与转移的重要原因^[12]。但目前关于黑色素瘤 EMT 转化的分子机制尚未完全阐明。

近年来研究发现,miRNA 参与调控黑色素瘤

EMT,原癌基因 KRAS 可通过诱导 JUN 和 SP-1 基因而抑制 miR-200 表达,而 miR-200 过表达可以逆转 KRAS 诱导的 EMT^[7,13]。MiR-211 和 miR-542-3p 在黑色素瘤发生、发展中呈现抑癌基因的特征,分别通过与原癌基因 RAB22A 和 PIM1 的 3'UTR 序列结合抑制这两种原癌基因的表达,进而抑制黑色素瘤 EMT^[7,14]。MiR-205 在多种肿瘤中被发现具有抑癌基因特征,如在乳腺癌^[15]、肝癌^[16]、胃癌^[17]、结肠癌^[18]和前列腺癌^[19]等肿瘤中其通常处于低表达水平,这可能与 miR-205 基因转录启动子过度甲基化有关。黑色素瘤转移灶组织中 miR-205 的表达低于原发性黑色素瘤,提示其表达减低与黑色素瘤侵袭转移有关,在黑色素瘤细胞中过表达 miR-205 能抑制其增殖、多克隆形成和动物体内肿瘤形成等,被认为是黑色素瘤的抑癌基因^[20]。本研究发现 miR-205 在 A375 和 A2058 两种细胞株中表达几乎缺失,这与他人研究所发现的结果相仿,说明 miR-205 在黑色素瘤组织和细胞中异常低表达,但是至今尚无报道揭示其表达降低的机制。

研究发现 miR-205 可以通过调控 EMT 而影响肿瘤细胞的侵袭和转移^[21-22]。本研究通过划痕实验和 Transwell 实验证明 miR-205 过表达可以抑制

A375 和 A2058 细胞的迁移和侵袭能力,并且通过形态学检查发现 miR-205 过表达后 A375 和 A2058 细胞形态从基质型向表皮型转化,且蛋白质印迹法结果显示 miR-205 过表达可以抑制 Twist 蛋白表达。Twist 蛋白可以与 *E-cadherin* 基因启动子结合,抑制 *E-cadherin* 基因转录,是促进肿瘤细胞发生 EMT 的重要蛋白^[23]。本研究结果显示 Twist 蛋白表达降低,其原因可能是 miR-205 促进表皮型相关蛋白 *E-cadherin* 表达的重要原因,同时 miR-205 抑制间质型相关蛋白 vimentin 和 integrin 的表达,这些发现都从分子水平证明 miR-205 可以抑制黑素瘤细胞 EMT。本研究还观察到 miR-205 过表达可以抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达。MMP-2 和 MMP-9 属于分泌性蛋白,肿瘤细胞过度分泌可以促进细胞外基质降解,为肿瘤侵袭转移提供条件^[24]。以上结果说明,miR-205 可以通过抑制 EMT 降低 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达,从而抑制黑素瘤细胞的迁移和侵袭。但黑素瘤中 miR-205 表达几乎缺失,几乎失去抑制 EMT 的能力,导致肿瘤细胞发生 EMT, MMP-2 和 MMP-9 分泌增强,细胞迁移和侵袭能力增强,最终导致黑素瘤向周围组织和器官侵犯转移。

本研究初步发现 miR-205 在黑素瘤发展过程中具有抑癌基因的特征,miR-205 过表达可以抑制黑素瘤细胞的迁移和侵袭能力,且 miR-205 过表达可以抑制 EMT,抑制 MMP-2 和 MMP-9 等蛋白表达,进而抑制肿瘤的侵袭转移。在下一步研究中,我们将对 miR-205 在黑素瘤组织和细胞中表达降低和 miR-205 抑制 *Twist* 等基因表达的分子机制进行探讨,以期阐明黑素瘤侵袭转移的分子机制,为黑素瘤的靶向治疗提供新型有效的潜在靶点。

[参考文献]

[1] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN D M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127: 2893-2917.

[2] HAQQ C, NOSRATI M, SUDILOVSKY D, CROTHERS J, KHODABAKHSH D, PULLIAM B L, et al. The gene expression signatures of melanoma progression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:

6092-6097.

- [3] KALLURI R, WEINBERG R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119: 1420-1428.
- [4] WEHBE M, SOUDJA S M, MAS A, CHASSON L, GUINAMARD R, DE TENBOSSCHE C P, et al. Epithelial-mesenchymal-transition-like and TGFbeta pathways associated with autochthonous inflammatory melanoma development in mice [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e49419. doi: 10.1371/journal.pone.0049419.
- [5] VENTURA A, JACKS T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way[J]. *Cell*, 2009, 136: 586-591.
- [6] SU B B, ZHOU S W, GAN C B, ZHANG X N. MiR-330-5p regulates tyrosinase and PDIA3 expression and suppresses cell proliferation and invasion in cutaneous malignant melanoma[J]. *J Surg Res*, 2016, 203: 434-440.
- [7] RANG Z, YANG G, WANG Y W, CUI F. miR-542-3p suppresses invasion and metastasis by targeting the proto-oncogene serine/threonine protein kinase, PIM1, in melanoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474: 315-320.
- [8] SALAJEGHEH A, DOLAN-EVANS E, SULLIVAN E, IRANI S, RAHMAN M A, VOSGHA H, et al. The expression profiles of the galectin gene family in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma with particular emphasis on galectin-1 and galectin-3 expression[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96: 212-218.
- [9] ISHIYAMA N, LEE S H, LIU S, LI G Y, SMITH M J, REICHARDT L F, et al. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion[J]. *Cell*, 2010, 141: 117-128.
- [10] OMBRATO L, MALANCHI I. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation[J]. *Crit Rev Oncog*, 2014, 19: 349-361.
- [11] McDONALD T M, PASCUAL A S, UPPALAPATI C K, COOPER K E, LEYVA K J, HULL E E. Zebrafish keratocyte explant cultures as a wound healing model system: differential gene expression & morphological changes support epithelial-mesenchymal transition[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319: 1815-1827.

- [12] SCHLEGEL N C, VON PLANTA A, WIDMER D S, DUMMER R, CHRISTOFORI G. PI3K signalling is required for a TGF β -induced epithelial-mesenchymal-like transition (EMT-like) in human melanoma cells [J]. *Exp Dermatol*, 2015, 24: 22-28.
- [13] ZHONG X, ZHENG L, SHEN J, ZHANG D, XIONG M, ZHANG Y, et al. Suppression of microRNA 200 family expression by oncogenic KRAS activation promotes cell survival and epithelial-mesenchymal transition in KRAS-driven cancer [J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36: 2742-2754.
- [14] YU H, YANG W. MiR-211 is epigenetically regulated by DNMT1 mediated methylation and inhibits EMT of melanoma cells by targeting RAB22A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476: 400-405.
- [15] HU Y, QIU Y, YAGUE E, JI W, LIU J, ZHANG J. MiRNA-205 targets VEGFA and FGF2 and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2291. doi: 10.1038/cddis.2016.194.
- [16] ZHANG T, ZHANG J, CUI M, LIU F, YOU X, DU Y, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits tumor suppressor miR-205 through inducing hypermethylation of miR-205 promoter to enhance carcinogenesis [J]. *Neoplasia*, 2013, 15: 1282-1291.
- [17] XU C, LI M, ZHANG L, BI Y, WANG P, LI J, et al. MicroRNA-205 suppresses the invasion and epithelial-mesenchymal transition of human gastric cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13: 4767-4773.
- [18] NGUYEN-VU T, WANG J, MESMAR F, MUKHOPADHYAY S, SAXENA A, McCOLLUM C W, et al. Estrogen receptor beta reduces colon cancer metastasis through a novel miR-205-PROX1 mechanism [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 42159-42171.
- [19] XU C G, YANG M F, FAN J X, WANG W. MiR-30a and miR-205 are downregulated in hypoxia and modulate radiosensitivity of prostate cancer cells by inhibiting autophagy via TP53INP1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20: 1501-1508.
- [20] DAR A A, MAJID S, DE SEMIR D, NOSRATI M, BEZROOKOVE V, KASHANI-SABET M. MiRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 16606-16614.
- [21] GREGORY P A, BRACKEN C P, BERT A G, GOODALL G J. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7: 3112-3118.
- [22] LAMOUILLE S, SUBRAMANYAM D, BLELLOCH R, DERYNCK R. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25: 200-207.
- [23] MONTSERRAT N, GALLARDO A, ESCUIN D, CATASUS L, PRAT J, GUTIERREZ-AVIGNO F J, et al. Repression of E-cadherin by SNAIL, ZEB1, and TWIST in invasive ductal carcinomas of the breast: a cooperative effort? [J]. *Hum Pathol*, 2011, 42: 103-110.
- [24] HUNG W C, TSENG W L, SHIEA J, CHANG H C. Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 288: 156-161.

[本文编辑] 杨亚红