

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000348

整合素 $\beta 1$ 基因 shRNA 慢病毒载体构建及其对乳腺癌他莫昔芬耐药细胞迁移和侵袭能力的影响

袁杰¹, 涂刚¹, 陈茂山¹, 朱庆¹, 杨丽², 成宏³, 杨光伦¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; 3. 恩施土家族苗族自治州中心医院乳腺外科, 湖北 445000)

【摘要】目的:构建整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$, ITG $\beta 1$) 基因干扰慢病毒载体, 并研究 ITG $\beta 1$ 对他莫昔芬耐药乳腺癌 MCF-7 细胞 (Tamoxifen-resistant MCF-7, MCF-7R) 的迁移和侵袭能力的影响。**方法:**针对 ITG $\beta 1$ 靶序列设计合成 4 条 shRNA 序列及 1 条阴性对照序列 NC, 构建 ITG $\beta 1$ RNAi 慢病毒载体及对照病毒载体, 并分别进行病毒包装, 通过内源性筛选, 选取干扰效果最好的组病毒感染 MCF-7R 细胞, Western blot 检测 ITG $\beta 1$ 蛋白的表达水平; Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力。**结果:**成功构建 4 条慢病毒干扰重组质粒, 并分别包装成病毒, 通过内源性筛选挑选出干扰效果最佳的慢病毒组, 感染 MCF-7R 细胞后 ITG $\beta 1$ 基因的蛋白表达量较 NC 组明显降低 ($P=0.000$), 且细胞的迁移和侵袭能力明显弱于 NC 组 ($P=0.000$)。**结论:**慢病毒介导的 shRNA 可有效地干扰 MCF-7R 细胞中 ITG $\beta 1$ 的表达, 并且抑制 MCF-7R 细胞的迁移和侵袭能力。

【关键词】整合素 $\beta 1$; RNA 干扰; 慢病毒; 乳腺癌; 他莫昔芬耐受

【中图分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-03-13

Construction of lentivirus-mediated shRNA vector targeting the human ITG $\beta 1$ gene and indentification of its effect on migration and invasion of tamoxifen-resistant MCF-7

Yuan Jie¹, Tu Gang¹, Chen Maoshan¹, Zhu Qing¹, Yang Li², Cheng Hong³, Yang Guanglun¹

(1. Department of Endocrine and Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Key Laboratory of Clinical Diagnosis Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University;

3. Department of Endocrine Breast Surgery, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture)

【Abstract】Objective: To construct lentivirus vector targeting integrin $\beta 1$ (ITG $\beta 1$) gene and to study its effect on migration and invasion of Tamoxifen-resistant MCF-7 (MCF-7R). **Methods:** Four shRNA sequences targeting ITG $\beta 1$ gene and one negative control sequence were designed, and were cloned into lentivirus vector, respectively. Recombinant lentivirus and control were extracted after transfecting 293T with the recombinant vector and helper vectors. The lentivirus with the best interfering effect was determined by real-time PCR and was chosen to infect MCF-7R. The expression of ITG $\beta 1$ gene was determined by Western blot. Transwell assay was used to detect the difference of migration and invasion. **Results:** Four recombinant lentivirus vectors were successfully constructed and the packaged lentivirus with the best interfering effect was used to infect MCF-7R. Western blot results showed that the protein expression of ITG $\beta 1$ was significantly reduced in MCF-7R ($P=0.000$) and its migration and invasion abilities were markedly suppressed ($P=0.000$). **Conclusion:** Lentivirus vector targeting ITG $\beta 1$ gene can efficiently suppress the expression of ITG $\beta 1$ in MCF-7R, thereby leading to decreased migration and invasiveness abilities of MCF-7R

【Key words】integrin $\beta 1$; RNA interference; lentivirus; breast cancer; Tamoxifen resistance.

整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$, ITG $\beta 1$) 是整合素家族的重要成员, 介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质

(extracellular matrix, ECM) 间的信号传导。ITG $\beta 1$ 相关研究主要集中于乳腺癌、黑色素瘤、胃癌、肺癌等, 其在肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭、凋亡中发挥重要作用^[1-4]。有研究发现 ITG $\beta 1$ 与乳腺癌的放射治疗敏感性有关, 抑制 ITG $\beta 1$ 可以增加放疗疗效^[5-6]; 也有研究表明 ITG $\beta 1$ 与乳腺癌的靶向治疗耐药相关^[7-8]。Pontiggia 等^[9]发现乳腺癌发生他莫昔芬耐药与

作者介绍: 袁杰, Email: yuanjie630805104@163.com,

研究方向: 乳腺癌内分泌治疗。

通信作者: 杨光伦, Email: guanglunyang@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81072149)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1112.017.html>

(2014-06-12)

ITGβ1 有关,本课题组前期研究发现乳腺癌 MCF-7 细胞他莫昔芬耐受后,ITGβ1 基因表达上调,与同期研究相符。本研究以 ITGβ1 基因为靶点,设计特异性小发夹 RNA(short hairpin RNA,shRNA),构建慢病毒重组质粒并包装病毒,在乳腺癌耐药细胞中稳定下调 ITGβ1,为后续研究 ITGβ1 的功能及其分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

慢病毒工具载体 GV115 载体、包装质粒 pHelper 1.0、pHelper 2.0 及 293T 细胞、限制性内切酶 *Age* I 和 *Eco*R I、感受态大肠杆菌均购自上海吉凯基因化学技术有限公司;乳腺癌 MCF-7 细胞、肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast,CAF)由重庆医科大学检验诊断实验室提供,他莫昔芬耐受的 MCF-7 细胞株(Tamoxifen-resistant MCF-7,MCF-7R)由本课题组前期建立和鉴定^[10];胎牛血清及培养基购买于 GIBCO;PCR 用引物(R&F)、双链脱氧核糖核酸(dsDNA oligo)由上海吉凯基因技术有限公司合成;T4 DNA 连接酶及缓冲溶液购自 NEB;质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN;Trizol、逆转录及荧光定量 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司;鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠/抗兔购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗人 ITGβ1 单抗购自 abcam 公司;蛋白裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;ECL 化学发光试剂盒为 Millipore 公司产品;Transwell 小室购自重庆鼎国生物技术有限公司。

1.2 慢病毒重组质粒的构建

设计 4 条寡核苷酸作为靶序列,长度均为 19 bp,分别编号为 ITGβ1-RNAi(1753-1)、ITGβ1-RNAi(1754-2)、ITGβ1-RNAi(1755-1)、ITGβ1-RNAi(1756-1)及 1 条阴性对照序列 NC,见表 1;根据 shRNA 设计原则,合成相应的 shRNA 序列,见表 2。序列由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。把合成的成对寡核苷酸退火形成带有黏性末端的 DNA 结

构,通过 T4 DNA 连接酶将其与经 *Age* I 和 *Eco*R I 双酶切的 GV115 载体连接,产物转化感受态大肠杆菌,挑取转化子,使用 GV115 载体通用引物,进行 PCR 鉴定,阳性与阴性克隆产物分别为 341 bp 和 307 bp。引物序列为:上游:5'-CCATGA-TTCCTTCATATTGTC-3',下游:5'-CGCGTGGATAACCGTATT-AC-3',引物由上海吉凯基因技术有限公司合成。阳性克隆送上海美季生物技术有限公司测序。

表 1 siRNA 序列表
Tab.1 Sequences of siRNA

编号	靶序列信息	GC 含量 (%)
ITGβ1-RNAi(1753-1)	GACGATTTCGAGAATGTAA	36.84
ITGβ1-RNAi(1754-2)	GGCTCCAAAGATATAAAGA	36.84
ITGβ1-RNAi(1755-1)	GTCAGCAGTAGGAACATTA	42.11
ITGβ1-RNAi(1756-1)	GGAATGCTGTTTGCAAGT	42.11
NC	TTCTCCGAACGTGTCACGT	52.60

1.3 慢病毒的包装及滴度测定

取传代数较少、处于对数生长期的 293T 细胞接种于 15 cm 平皿,每皿约 1.2×10^7 个细胞,37 ℃、5%CO₂ 条件下培养,24 h 待细胞密度达 70%~80%时,分别加入重组干扰质粒、pHelper1.0、pHelper2.0、稀释后的脂质体(Lipofectamine 2000),培养 8 h 后倒去含有转染混和物的培养基,每皿细胞中加入含 10%血清的细胞培养基 15 ml,继续培养 48 h 后,荧光显微镜下观察,收集细胞并于 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min,收集上清,以 0.45 μm 孔径的滤器过滤上清液于超速离心管内,4 ℃、25 000 r/min 再次离心 2 h,重悬病毒沉淀得到病毒颗粒;采用逐孔稀释法测定病毒滴度(TU/ml)。

1.4 内源性筛靶

取 MCF-7R,以 10×10^4 个/ml 的密度接种于 6 孔板,2 ml/孔,12 h 后,将培养基换成 1 ml/孔新鲜培养基(为含 5%FBS 的 DMEM 培养基),感染复数(multiplicity of infection,MOI)值为 5 和 10 分别加入相应量的 ITGβ1-RNAi(1753-1)组(低、高 MOI 值感染组分别编号为 KD1-1、KD1-2)、ITGβ1-RNAi(1754-2)组(低、高 MOI 值感染组分别编号为 KD2-1、KD2-2)、ITGβ1-RNAi(1755-1)组(低、高 MOI 值感染组分别编号为 KD3-1、

表 2 shRNA 序列表
Tab.2 Sequences of shRNA

编号	5'端	STEM	Loop	STEM	
ITG β 1-RNAi (1753-1)-a	Ccgg	aaGACGATTTGGAGAATGTAA	TTCAAGAGA	TTACATTCTCCAAATCGTCtt	TTTTTg
ITG β 1-RNAi (1753-1)-b	aattcaaaaa	aaGACGATTTGGAGAATGTAA	TCTCTTGAA	TTACATTCTCCAAATCGTCtt	
ITG β 1-RNAi (1754-2)-a	Ccgg	gaGGCTCCAAAGATATAAAGA	TTCAAGAGA	TCTTTATATCTTTGGAGCCtc	TTTTTg
ITG β 1-RNAi (1754-2)-b	aattcaaaaa	gaGGCTCCAAAGATATAAAGA	TCTCTTGAA	TCTTTATATCTTTGGAGCCtc	
ITG β 1-RNAi (1755-1)-a	Ccgg	aaGTCAGCAGTAGGAACATTA	TTCAAGAGA	TAATGTTCTACTGCTGACtt	TTTTTg
ITG β 1-RNAi (1755-1)-b	aattcaaaaa	aaGTCAGCAGTAGGAACATTA	TCTCTTGAA	TAATGTTCTACTGCTGACtt	
ITG β 1-RNAi (1756-1)-a	Ccgg	gaGGAATGCTGTTTGCAAGT	TTCAAGAGA	ACTTGCAAACACCATTTCCtc	TTTTTg
ITG β 1-RNAi (1756-1)-b	aattcaaaaa	gaGGAATGCTGTTTGCAAGT	TCTCTTGAA	ACTTGCAAACACCATTTCCtc	
NC-a	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGAGAA	TTTTTg
NC-b	AATTCAAAAA	TTCTCCGAACGTGTCACGT	AAGTTCTCT	ACGTGACACGTTCCGAGAA	

KD3-2)、ITGβ1-RNAi(1756-1)组(低、高 MOI 值感染组分别编号为 KD4-1、KD4-2)和 NC 组(低、高 MOI 值感染组分别编号为 NC1-1、NC2-2)的慢病毒,同时加入终浓度为 5 μg/ml 凝聚胺增强细胞感染效率,8 h 后更换新鲜培养基,2 ml/孔,72 h 后在荧光显微镜下观察细胞感染效率。取感染效率大于 80% 的细胞,提取 RNA,并逆转录成 cDNA,以 GAPDH 为内参,进行 real-Time PCR 检测 ITGβ1 基因 mRNA 的表达水平,重复实验 3 次,选取效果最佳的病毒。GAPDH 的引物序列为:上游:5'-TGACTTCAACA-GCGACACCCA-3',下游:5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3',ITGβ1 的引物序列为:上游:5'-CCTACTTCTGCACGATGTGATG-3',下游:5'-CCTTT-GCTACGGTTGTTACATT-3'。

1.5 慢病毒对 MCF-7R 细胞 ITGβ1 蛋白表达水平的影响

选择干扰效果最佳的 ITGβ1-RNAi(1756-1)组慢病毒感染 MCF-7R 细胞(MCF-7R-siRNA-ITGβ1),提取细胞总蛋白,采用 Western blot 方法检测。具体方法:选取感染 ITGβ1-RNAi(1756-1)组和 NC 组慢病毒且感染效率大于 80% 的 MCF-7R 细胞,提取蛋白,BCA 法测量蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳分离、转膜,5%脱脂奶粉室温摇床封闭 4 h,分别加入兔抗人 ITGβ1 单克隆抗体(1:500 稀释)和鼠抗人 β-actin 单克隆抗体(1:1 000 稀释),4 °C 过夜;TBST 洗膜 3 次,5 min/次后,分别加入 HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG(1:1 000 稀释),室温孵育 2 h;洗膜后,ECL 化学显色剂显色。

1.6 细胞迁移及侵袭能力的变化

采用 Transwell 法,基质胶原解冻后用无血清培养基稀释成使用液,每个 Transwell 的上室中加入 30 μl 使用液,37 °C 放置 15 min 后;待胶凝固后,消化、离心、重悬(用不含血清培养基)、计数 MCF-7R-siRNA-ITGβ1、MCF-7R-vector(感染 NC 组病毒的细胞)后,将 200 μl 含 5×10^4 个细胞的细胞悬液加入 Transwell 上室,同时在下室加入 CAF 细胞的条件培养基 500 μl,37 °C 培养 24 h,棉签擦拭上室残余细胞,结晶紫染色,镜检。在 100 倍视野下,随机计算 5 个视野下的细胞数,计算平均数。迁移实验同上,但不加基质胶。

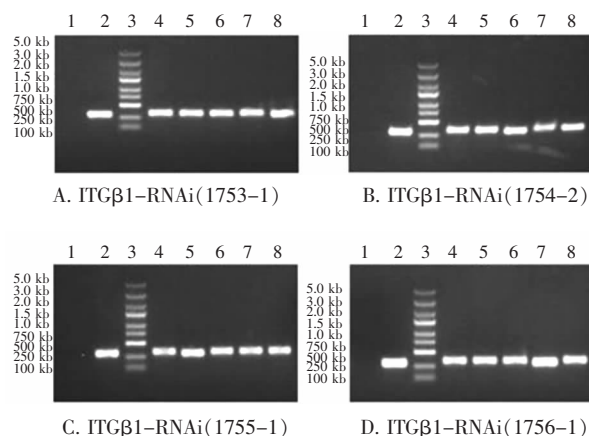
1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据统计,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述实验数据,两独立样本组间分析采用 *t* 检验,多组样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ITGβ1 重组干扰质粒的鉴定

菌落 PCR 结果显示,ITGβ1-RNAi(1753-1)组的 4、5、6、7 号泳道,ITGβ1-RNAi(1754-2)组的 4、5、7 号泳道,ITGβ1-RNAi(1755-1)组的 4、6、7、8 号泳道,ITGβ1-RNAi(1756-1)组的 4、5、6、8 号泳道为阳性克隆,PCR 产物可见 341 bp 大小的片段,与理论值相符,见图 1。测序结果表明干扰序列成功插入 GV115 载体。



1. 阴性对照 (ddH₂O); 2. 阴性对照 (空载自连对照组); 3. DNA Marker DL5000; 4~8. 选取的 5 个克隆 (阳性克隆产物为 341 bp, 阴性克隆产物为 307 bp)

图 1 阳性克隆 PCR 产物电泳图

Fig.1 Identification of positive clones by PCR

2.2 慢病毒的包装及滴度测定

应用三质粒系统转染 293T 细胞,48 h 后在荧光显微镜下观察细胞荧光,见图 2。ITGβ1-RNAi(1753-1)、ITGβ1-RNAi(1754-2)、ITGβ1-RNAi(1755-1)、ITGβ1-RNAi(1756-1)、NC 组的病毒滴度分别为 3×10^8 、 4×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 6×10^8 TU/ml。

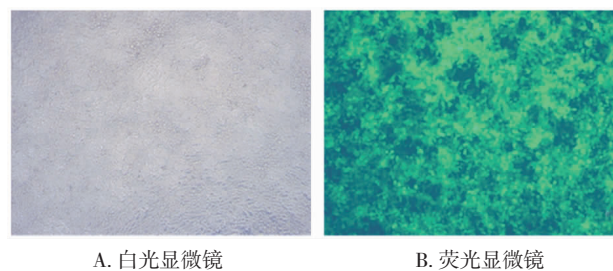


图 2 慢病毒感染 293T 细胞的荧光显微镜图片 (100 ×)

Fig.2 Fluorescence microscope images of 293T cells infected with lentivirus (100 ×)

2.3 内源性筛靶

将各组慢病毒按高、低 MOI 值分别感染 MCF-7R 细胞,72 h 后在荧光显微镜下观察,感染效率均超过 90%,见图 3。real-time PCR 检测结果显示,在高 MOI 值感染时各组间 ITGβ1 基因的表达水平存在统计学差异 ($F=627.291, P=0.000$),ITGβ1-RNAi(1754-2)和 ITGβ1-RNAi(1756-1)组的沉默率分别为 81.6% 和 72.8%,ITGβ1 基因的表达量明显低于 NC 组,且差异均具有统计学意义 (ITGβ1-RNAi(1754-2)组 vs. NC 组: $P=0.000$; ITGβ1-RNAi(1756-1) vs. NC 组: $P=0.000$);在低 MOI 值感染时各组间 ITGβ1 基因的表达水平也存在差异 ($F=364.289, P=0.000$),但 ITGβ1-RNAi(1754-2)组的 ITGβ1 的

表达量高于 NC 组($P=0.000$),为无效靶点,见图 4。故选取 ITG β 1-RNAi(1756-1)组慢病毒用于后续实验。

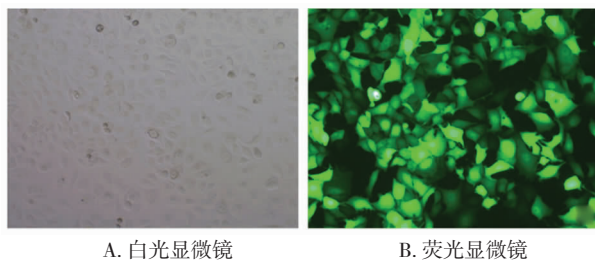
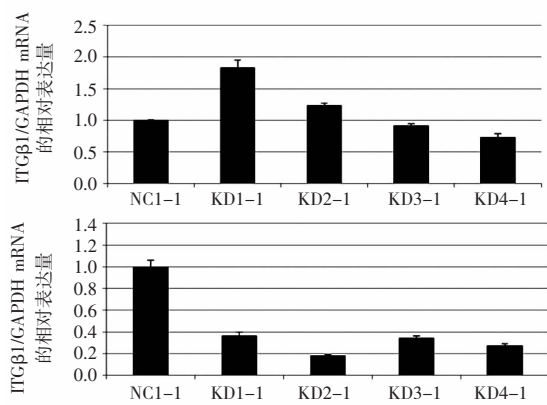


图 3 慢病毒感染 MCF-7R 细胞的荧光显微镜图片 (100 $\times$)

Fig.3 Fluorescence microscope images of MCF-7R cells infected with lentivirus (100 $\times$)



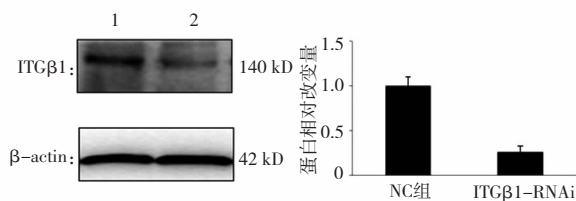
A. 低 MOI 组;B. 高 MOI 组;NC. 阴性对照;KD1. ITG β 1-RNAi(1753-1);KD2. ITG β 1-RNAi(1754-2);KD3. ITG β 1-RNAi(1755-1);KD4. ITG β 1-RNAi(1756-1)。ITG β 1 基因干扰效率达到 70%;KD2 vs. NC 组($P=0.000$),KD4 组 vs. NC 组($P=0.000$)

图 4 不同组病毒在高、低病毒 MOI 值时, ITG β 1 基因的敲减效率

Fig.4 Silencing efficiency of lentivirus with different quantities (MOI=5, MOI=10)

2.4 特异性干扰病毒对 ITG β 1 蛋白的干扰效果

Western blot 方法检测到感染 ITG β 1-RNAi(1756-1)组慢病毒的 MCF-7R 细胞中 ITG β 1 蛋白明显低于 NC 组(ITG β 1-RNAi 组 vs. NC 组=0.26;1; $t=10.5$; $P=0.000$),见图 5。



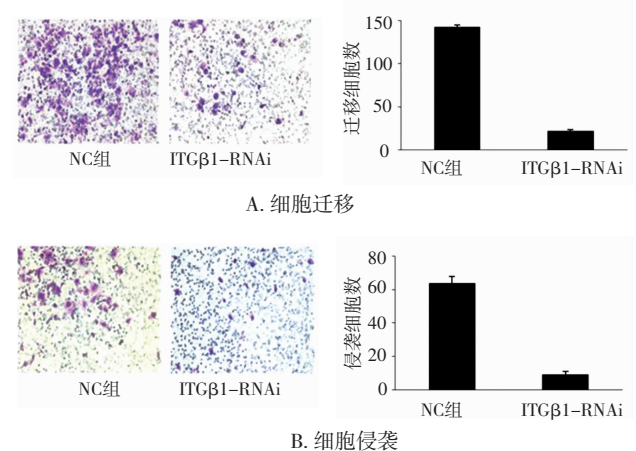
1. NC 组;2. ITG β 1-RNAi(1756-1);两者有统计学差异

图 5 Western blot 检测感染特异性干扰慢病毒后, ITG β 1 的蛋白表达水平

Fig.5 Effect of lentivirus on the expression of ITG β 1 detected by Western blot

2.5 ITG β 1 增强 MCF-7R 细胞迁移和侵袭能力

Transwell 法检测发现干扰 ITG β 1 基因后,MCF-7R 细胞的迁移(ITG β 1-RNAi 组 vs. NC 组=21:142; $t=52.7$; $P=0.000$)和侵袭能力(ITG β 1-RNAi 组 vs. NC 组=9:64; $t=21.0$; $P=0.000$)均明显降低,见图 6。



ITG β 1-RNAi 组 vs. NC 组有统计学差异

图 6 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力

Fig.6 Invasiveness and migration capability detected by Transwell

3 讨论

他莫昔芬在雌激素受体(estrogen receptor, ER) α 阳性乳腺癌内分泌治疗中占有重要地位,能显著提高患者的生存率,但原发和继发性耐受限制了其临床应用效果^[1]。课题组前期研究发现^[12],乳腺癌 MCF-7 细胞发生他莫昔芬耐受后,细胞骨架发生重构,MCF-7R 细胞中的纤维状肌动蛋白纤维出现板状伪足和应力纤维 2 种形态;且发现 MCF-7R 细胞较 MCF-7 细胞迁移和侵袭能力明显增强,但对于细胞骨架重构及运动能力增强的具体调控机制没有深入研究。

整合素家族包括 18 个 α 亚基和 8 个 β 亚基,它们至少组成 24 种异二聚体。ITG β 1 在介导 ECM 与细胞间的信号传导过程中至关重要,是肿瘤细胞与肿瘤微环境间的重要桥梁。ITG β 1 是一个跨膜蛋白,包括细胞外区域、跨膜区域和无内在酶活性的胞质区域。ITG β 1 与 α 亚基组成 12 种潜在的整合素受体,细胞外区域可与包含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸排列的 ECM 分子结合,细胞质区域可以介导

双向信号传导。Wang 等^[13]发现,ITGB1 通过促进肺癌细胞迁移能力从而引起肿瘤的复发和转移;Beatty 等^[3]报道,ITGB1 通过促进伪足的成熟和基质的降解从而促进乳腺癌细胞的远处转移;已有大量研究发现 ITGB1 与肿瘤的放射治疗^[5-6,14]和化学治疗耐药^[4,7-8]相关,但在乳腺癌的内分泌治疗耐受过程中的研究少见。Pontiggia 等^[9]发现 ITGB1 参与介导乳腺癌细胞 MAPK/ERK、PI3K-AKT 通路活化,引起 ER α 磷酸化导致他莫昔芬耐受。总之,ITGB1 在肿瘤的进展和治疗耐药中发挥重要作用。前期基因芯片结果显示 ITGB1 的表达在 MCF-7R 细胞较 MCF-7 中明显升高,同时实验证实 MCF-7R 骨架重构及迁移和侵袭能力增强,故猜想 ITGB1 可能参与介导他莫昔芬治疗过程中肿瘤细胞运动能力的增强,进而增加患者复发和发生远处转移的概率。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒为基础发展起来的基因治疗载体,因其感染效率高且能实现靶基因的稳定沉默故应用最广^[15-17]。应用 RNAi 技术干扰 ITGB1 的表达以探讨其对乳腺癌耐药细胞迁移和侵袭能力的影响。本研究以 ITGB1 为靶点,构建慢病毒干扰质粒、包装病毒,在 MCF-7R 细胞中干扰 ITGB1 的表达,发现细胞的迁移和侵袭能力明显降低,但目前对于 ITGB1 具体怎样增强耐药细胞的运动能力还未见相关研究。本研究也间接证实干扰肿瘤细胞与肿瘤微环境间的联系可以延缓或终止肿瘤的进展。

综上所述,本研究首次成功地在 MCF-7R 中干扰了 ITGB1 的表达,建立了 ITGB1 稳定下调的 MCF-7R 株,后续研究 ITGB1 在乳腺癌他莫昔芬治疗耐受中发挥的作用奠定基础,也可探究肿瘤微环境在乳腺癌他莫昔芬耐受中所扮演的角色,或可为解决乳腺癌内分泌治疗耐受提供新的方向。

参 考 文 献

[1] Kocaturk B, Van den Berg YW, Tiekens C, et al. Alternatively spliced tissue factor promotes breast cancer growth in a beta1 integrin-dependent manner[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(28): 11517-11522.

[2] Qin J, Tang J, Jiao L, et al. A diterpenoid compound, excisanin A, inhibits the invasive behavior of breast cancer cells by modulating the integrin beta1/FAK/PI3K/AKT/beta-catenin signaling[J]. *Life Sci*, 2013, 93(18-19): 655-663.

[3] Beatty BT, Sharma VP, Bravo-Cordero JJ, et al. beta1 integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(11): 1661-1675, s1-s11.

[4] Carbonell WS, Delay M, Jahangiri A, et al. beta1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(10): 3145-3154.

[5] Hassan H, Greve B, Pavao MS, et al. Syndecan-1 modulates beta-integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast cancer cell adhesion, migration, and resistance to irradiation[J]. *FEBS J*, 2013, 280(10): 2216-2227.

[6] Eke I, Deuse Y, Hehlhans S, et al. beta1 Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(4): 1529-1540.

[7] Huang C, Park CC, Hilsenbeck SG, et al. beta1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib[J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(4): R84.

[8] Lesniak D, Xu Y, Deschenes J, et al. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(22): 8620-8628.

[9] Pontiggia O, Sampayo R, Raffo D, et al. The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer; a role for soluble stromal factors and fibronectin through beta1 integrin[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(2): 459-471.

[10] 莫志强, 涂刚, 罗浩军, 等. 人乳腺癌 MCF-7 他莫昔芬耐药细胞株的建立及鉴定[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(21): 2256-2259.

[11] He YJ, Wu JZ, Ji MH, et al. miR-342 is associated with estrogen receptor-alpha expression and response to tamoxifen in breast cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(3): 813-818.

[12] 李振华, 涂刚, 李维东, 等. MCF-7 细胞他莫昔芬耐药过程中 F-actin 细胞骨架的重构促进细胞迁移[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(14): 1475-1479.

[13] Wang XM, Li J, Yan MX, et al. Integrative analyses identify osteopontin, LAMB3 and ITGB1 as critical pro-metastatic genes for lung cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55714.

[14] Nam JM, Chung Y, Hsu HC, et al. beta1 integrin targeting to enhance radiation therapy[J]. *Int J Radiat Biol*, 2009, 85(11): 923-928.

[15] Wang S, Zeng X, Liu Y, et al. Construction and characterization of a PDCD5 recombinant lentivirus vector and its expression in tumor cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(1): 91-98.

[16] Zhao B, Yang C, Yang S, et al. Construction of conditional lentivirus-mediated shRNA vector targeting the human Mirk gene and identification of RNAi efficiency in rhabdomyosarcoma RD cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(4): 1253-1259.

[17] Dang WQ, Tang H, Cao H, et al. Construction of lentivirus-mediated short hairpin RNA targeting human STAT3 gene[J]. *Cellular and Molecular Medicine*, 2012, 28(11): 1204-1207.

(责任编辑: 冉明会)