

miR-15 家族基因多态性及表达与食管鳞癌发生的研究

郭旭东¹, 邵毅¹, 沈艺¹, 牛琛¹, 魏文强², 刘芬¹

(1. 首都医科大学公共卫生学院, 北京市临床流行病学重点实验室, 北京 100069; 2. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021)

摘要: [目的] 通过病例对照设计来评估 miR-15 家族基因相关 SNPs 及其表达与食管鳞癌发生风险的关联。[方法] 从 2017 年 10 月至 2018 年 6 月于河南省林州市肿瘤医院就诊患者中, 选取食管癌新发患者 43 例为病例组, 选取同期在当地医院参加食管癌早诊早治筛查项目的 59 名健康人群为对照组。对 miR-15 家族(miR-15a、miR-15b、miR-16、miR-195 和 miR-497) 中 miRNAs 基因上的 10 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点 (rs1022960、rs10936201、rs11078662、rs14309、rs1451761、rs2066557、rs2740545、rs412999、rs7998223、rs9535416) 与食管鳞癌发生风险进行关联研究。同时, 对 miR-16-5p 在食管癌患者血清中的表达差异性进行测定。采用 χ^2 检验比较各 SNPs 位点基因型在病例组和对照组的分布, 用秩和检验分析两组间 miR-16-5p 表达水平的差异; 对单因素分析有统计学差异的变量采用多因素的 Logistic 回归进行校正。[结果] 去除检测不合格的位点, 最终纳入 6 个 SNPs, 各位点的基因型频率分布在病例组和对照组间差异均无统计学差异 ($P>0.05$), 食管鳞癌患者血清中 miR-16-5p 的表达量高于对照组 ($P<0.001$)。[结论] miR-15 家族中 miR-16 在食管鳞癌患者血清中高表达, 但未发现候选的 miRNAs 多态位点与食管鳞癌发生风险相关。

关键词: 食管鳞癌; 微小 RNA; miR-15 家族; 单核苷酸多态性

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2019)06-0470-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.06.A013

Association Between Polymorphisms of miR-15 Family and the Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

GUO Xu-dong¹, SHAO Yi¹, SHENG Yi¹, NIU Chen¹, WEI Wen-qiang², LIU Fen¹

(1. School of Public Health, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Clinical Epidemiology, Beijing 100069, China; 2. National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To evaluate the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of miR-15 family and the risk of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). [Methods] Forty three ESCC patients admitted in Linzhou Cancer Hospital and 59 healthy subjects were recruited from October 2017 to June 2018. Genotypes were determined by MassArray based on allele-specific MALDI-TOF mass spectrometry. The expression level of miR-16-5p was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The distribution of genotypes of each SNP was analyzed by χ^2 test; Mann-Whitney *U* test was used to compare the expression change of miR-16-5p; the variables with statistical differences in univariate analysis were adjusted by multivariate logistic regression. [Results] After removing the unqualified SNPs, the genotype distribution of 6 SNPs included in the analysis was not associated with ESCC susceptibility ($P>0.05$). However, the expression level of the serum miR-16-5p in ESCC patients was significantly higher than that in healthy controls ($P<0.001$). [Conclusion] The polymorphisms in miR-15 family may be not associated with the risk of ESCC, but the expression of serum miR-16 is significantly upregulated in ESCC patients.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; microRNA; miR-15 family; single nucleotide polymorphism

收稿日期: 2019-03-26; 修回日期: 2019-04-10

基金项目: 北京市自然科学基金(7132023); 国家自然科学基金(81874277、81473056、81573224); 北京市教委科研计划一般项目 (KM201710025006)

通信作者: 刘芬, E-mail: liufen05@ccmu.edu.cn

食管癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球范围内位居肿瘤发病的第7位。食管癌的预后差、死亡率高,5年生存率仅5%~34%,病死率在全球范围内位居肿瘤的第6位^[1]。2018年,全球新发食管癌病例572000例,死亡病例509000例^[1]。我国是食管癌高发区,平均发病率为22.14/10万,位居我国肿瘤发病第5位;死亡率为16.77/10万,位居我国肿瘤死亡第4位^[2]。

食管癌的病理类型主要为腺癌和鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。在我国ESCC约占食管癌的90%。目前尽管大量研究对食管鳞癌的发病机制进行了探讨,仍未准确阐明其发病机制。已知的环境危险因素包括吸烟、饮酒、喜食烫食、食用腌制食物等,并发现本病也有较大家族遗传的可能^[3]。遗传变异的范围从单个核苷酸到染色体异常,其中最常见的是单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。

小分子RNAs(microRNAs, miRNAs)是一类大小约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子,其通过在转录后水平调控靶mRNA的翻译,进而影响蛋白差异表达,在肿瘤发生、发展的多个环节中发挥着类似肿瘤抑制基因或抑癌基因的关键性作用^[4-7]。而最近的研究显示miRNAs基因多态(miRNA-related single nucleotide polymorphisms, miR-SNPs)与肿瘤的易感性有关^[8]。证据表明miR-SNPs可通过影响靶基因的表达间接产生生物学效应,即miRNAs基因多态→miRNAs表达改变→靶mRNA表达改变→生物学效应^[9]。值得注意的是,2002年Calin及其同事最早发现在慢性淋巴细胞白血病中,易于出现突变、丢失的染色体13q14.3区含有miR-15和miR-16,约68%的慢性淋巴细胞白血病患者有miR-15和miR-16缺失或下调^[10]。miR-15和miR-16都属于miR-15家族,这一研究为miRNA-SNPs的功能学效应提供了第一个直接证据,也开启了学者们对实体瘤miRNAs的研究兴趣,然而结论并不一致。

为此,本研究拟通过检测miR-15家族miR-SNPs基因型频率在食管鳞癌患者和健康对照人群中的分布差异,分析miR-SNPs与ESCC发病风险的关联,并对miRNAs的表达差异性进行探讨,以期为ESCC病因学研究提供新的线索,为早期筛查ESCC易感者和个体化治疗提供新的标志物。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究的病例和对照来自于河南省林州市食管癌高发区。病例来自2017年10月至2018年6月于林州市肿瘤医院初次就诊并经病理诊断为食管鳞癌的患者,排除非食管原发灶。健康对照为同期在当地医院参加食管癌早诊早治筛查项目的健康人群。所有研究对象均为汉族。所有患者均在未进行任何手术及放化疗等治疗前采集外周静脉血。每名受试者均留取3ml非抗凝血,离心后分离血清和血细胞,样本冻存-80℃以备提取RNA及DNA。本研究通过首都医科大学伦理委员会审查,所有研究对象均填写知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 SNPs 筛选

利用生物信息学方法,通过PubMed等数据库查找miR-15家族相关miRNAs确认其在各肿瘤疾病中的遗传学关联,研究区域包括miR-15家族基因的Pre-miRNA区、上下游各延伸1kb在内的侧翼区以及成熟miRNAs作用的靶点区,查找miR-15家族相关SNPs位点并取各数据库的交集。结合公共数据库:miRNASNP(<http://www.bioguo.org/miRNASNP/>)、PolymiRTs(<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>)、SNP Function Prediction(FuncPred)(<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html>)、miRNASNiPer(<http://integratomics-time.com/miRNA-SNiPer/>)等;且NCBI dbSNP数据库显示中国汉族人群中最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)>0.05,连锁不平衡系数(r^2)>0.8,并结合文献报道的相关位点信息,共筛选出10个miR-SNPs。

1.2.2 DNA 提取和 SNPs 分型

采用天根血液基因组DNA提取试剂盒并严格按照说明书操作提取DNA。根据前期筛选的SNPs位点,利用软件MassARRAY Assay Design v3.1设计PCR反应和单碱基扩展引物;并利用UCSC Genome验证引物设计位点的特异性。最后使用MassARRAY Assay法对目的单核苷酸多态性位点进行检测。

1.2.3 总 RNA 的提取和定量测定

使用mirVana™ PARIS™试剂盒提取血清中总RNA,步骤参照试剂盒说明书。抽提所得总RNA经

NanoDrop ND-2000 分光光度计测定浓度及 A₂₆₀/A₂₈₀, Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent, 美国)电泳检测 RNA 完整性。两组血清样品的浓度及纯度分析结果显示, 总 RNA 的总量及质量符合 miRNA 定量检测要求。实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)实验, 采用 Taqman Universal PCR Master Mix 试剂盒 (ABI, USA)步骤参照试剂盒说明书。结果采用 3 个复孔取平均值作为该样本的 Ct 值。数据归一化处理以 miR-1228 作为内参^[11], 使用定量 PCR 中的相对定量法, 得出 $\Delta Ct = Ct_{miR-16} - Ct_{miR-1228}$, miR-16 的表达量用 $2^{-\Delta Ct}$ 表示。

1.3 统计学分析

采用两样本成组 *t* 检验比较病例组和对照组之间年龄分布的差异。采用 Pearson χ^2 检验分析性别、教育程度、吸烟和饮酒等分类变量在病例组和对照组间的分布差异。采用 χ^2 拟合优度检验评估各 SNPs 位点的基因型对照组人群的分布中是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。采用 Pearson χ^2 检验分析各基因多态位点在病例组和对照组之间的分布特征。对 miRNA 定量测定结果采用 Mann-Whitney *U* 和 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验统计学分析, 对单因素分析有差异的变量采用多因素 Logistic 回归进行校正。软件使用 SPSS22.0, 双侧检验 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本特征

研究共纳入 102 例研究对象, 其中病例组 43 例(男性 25 例, 女性 18 例), 平均年龄(59±6)岁, 对照组 59 例(男性 31 例, 女性 28 例), 平均年龄(59±3)岁。其中吸烟、饮酒和受教育程度在病例组和对照组中存在差异, 病例组中吸烟者、饮酒者和受教育程度较低者所占比例更高(Table 1)。

2.2 SNPs 位点分析结果

将纳入的 10 个 SNPs 位点进行检

测分型, 发现 rs7998223 和 rs9535416 最小等位基因频率均小于 0.05, rs412999 仅表现一种分型, 以及经 χ^2 拟合优度检验发现, 在对照人群中 rs1451761 (*P*<0.05) 的分布不符合 HWE 平衡定律, 因此在后续研究中剔除了这 4 个位点。其余 6 个位点在对照组人群中均符合 HWE 遗传定律, 且最小等位基因频率与 1000 Genomes Project 数据库中中国北方汉族人群的最小等位基因频率相近(Table 2)。

计算各 SNPs 位点基因型在病例组和对照组中的分布并未识别出与食管癌的发病风险显著相关的多态位点, 未发现 SNPs 与食管鳞癌有统计学关联(Table 3)。

2.3 miR-16 表达的测定

对 miR-16-5p 在病例组与对照组血清中表达量的差异比较, 显示具有统计学意义 (*P*<0.001), 病例

Table 1 Comparison of demographic and risk factors between case and control groups

| Factors | Control group (n=59) | Case group (n=43) | χ^2/t | <i>P</i> |
|------------------------------|----------------------|-------------------|------------|----------|
| Age (years) | 59.0±3.0 | 59.0±6.0 | 0.81 | 0.42 |
| Gender | | | | |
| Male | 31 (52.50%) | 25 (58.10%) | 0.32 | 0.69 |
| Female | 28 (47.50%) | 18 (41.90%) | | |
| Education | | | | |
| Low than high school | 50 (84.70%) | 42 (97.70%) | 4.70 | 0.04 |
| High school and above | 9 (15.30%) | 1 (2.30%) | | |
| Smoking | | | | |
| Yes | 15 (25.40%) | 21 (48.80%) | 22.42 | <0.001 |
| No | 44 (74.60%) | 22 (51.20%) | | |
| Drinking | | | | |
| Yes | 1 (1.70%) | 14 (32.60%) | 18.89 | <0.01 |
| No | 58 (98.30%) | 29 (67.40%) | | |
| History of digestive disease | | | | |
| Yes | 15 (25.40%) | 10 (23.30%) | 0.06 | 1.00 |
| No | 44 (74.60%) | 33 (76.70%) | | |
| Family history of cancer | | | | |
| Yes | 19 (32.20%) | 19 (44.20%) | 1.53 | 0.30 |
| No | 40 (67.80%) | 24 (55.80%) | | |

Table 2 Information of SNPs in miR-15 family

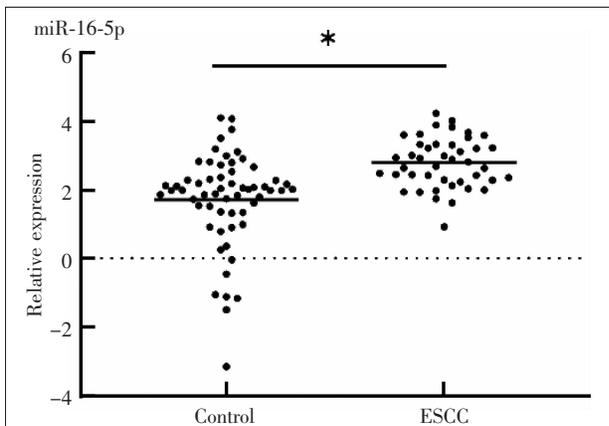
| SNPs | Gene | Chromosome | MAF | PHWE | Allele |
|------------|-----------|------------|------|------|--------|
| rs1022960 | miR-16-1 | 13 | 0.34 | 0.93 | C/T |
| rs10936201 | miR-16-2 | 3 | 0.17 | 0.85 | A/C |
| rs11078662 | miR-195 | 17 | 0.15 | 0.98 | A/G |
| rs14309 | miR-497 | 17 | 0.16 | 0.94 | A/G |
| rs2066557 | miR-15/16 | 13 | 0.40 | 0.80 | C/T |
| rs2740545 | miR-15a | 13 | 0.36 | 0.49 | C/T |

Note: MAF: minor allele frequency; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 3 Frequency distribution of genotypes of miR-15 family SNPs in case and control groups

| SNPs | Genotypes | Control group | Case group | OR | P |
|------------|-----------|---------------|------------|-----------------|------|
| rs1022960 | CC | 25(42.40%) | 17(40.50%) | 1.00 | |
| | CT | 29(49.20%) | 22(52.40%) | 1.12(0.49~2.56) | 0.84 |
| | TT | 5(8.50%) | 3(7.10%) | 0.88(0.18~4.19) | 1.00 |
| | C | 79(66.90%) | 56(66.70%) | 1.00 | |
| rs10936201 | T | 39(33.10%) | 28(33.30%) | 1.18(0.27~5.15) | 1.00 |
| | CC | 43(74.10%) | 31(73.80%) | 1.00 | |
| | AC | 13(22.40%) | 11(26.20%) | 1.17(0.47~2.96) | 0.81 |
| | AA | 2(3.40%) | 0 | | |
| rs11078662 | C | 99(85.30%) | 73(86.90%) | 1.00 | |
| | A | 17(14.30%) | 11(13.10%) | 0.88(0.39~1.99) | 0.84 |
| | CC | 47(79.70%) | 33(76.70%) | 1.00 | |
| | CT | 12(20.30%) | 9(20.90%) | 1.07(0.40~2.82) | 1.00 |
| rs14309 | TT | 0 | 1(2.30%) | | |
| | C | 106(89.80%) | 75(87.20%) | 1.00 | |
| | T | 12(10.20%) | 11(12.80%) | 1.29(0.54~3.09) | 0.66 |
| | CC | 45(77.60%) | 33(76.70%) | 1.00 | |
| rs2066557 | CT | 13(22.40%) | 9(20.90%) | 0.94(0.36~2.47) | 1.00 |
| | TT | 0 | 1(2.30%) | | |
| | C | 103(88.80%) | 75(87.20%) | 1.00 | |
| | T | 13(11.20%) | 11(12.80%) | 1.16(0.49~2.74) | 0.83 |
| rs2740545 | TT | 15(25.40%) | 17(39.50%) | 1.00 | |
| | CT | 34(57.60%) | 19(44.20%) | 0.49(0.20~1.20) | 0.17 |
| | CC | 10(16.90%) | 7(16.30%) | 0.62(0.19~2.03) | 0.55 |
| | T | 64(54.20%) | 53(61.60%) | 1.00 | |
| rs2740545 | C | 54(45.80%) | 33(38.40%) | 0.74(0.42~1.30) | 0.32 |
| | TT | 19(32.20%) | 18(41.90%) | 1.00 | |
| | CT | 32(54.20%) | 20(46.50%) | 0.66(0.28~1.55) | 0.39 |
| | CC | 8(13.60%) | 5(11.60%) | 0.66(0.18~2.40) | 0.78 |
| rs2740545 | T | 70(59.30%) | 56(65.10%) | 1.00 | |
| | C | 48(40.70%) | 30(34.90%) | 0.78(0.44~1.39) | 0.47 |

Note: OR; odds ratio.



Note: *: $P < 0.001$.

Figure 1 Expression of miR-16-5p in ESCC group and control group

组血清中 miR-16-5p 表达量高于对照组(Figure 1)。对 miR-16 基因 SNPs 多态位点的不同基因型与 miR-16-5p 的表达水平的相关性分析显示,miR-16-5p 表达在各基因型间的分布无差异($P > 0.05$)(Table 4)。

2.4 分层分析及多因素分析结果

将病例组 ESCC 患者按照分化程度及 TNM 分期分为不同亚组,结果显示各个 SNPs 位点的基因型在食管鳞癌的分化程度及分期之间的分布没有差异(数据未显示);血清中 miR-16-5p 的表达水平在食管鳞癌的分化程度及病理分期之间的差异没有统计学意义(Table 4)。将在食管鳞癌和正常对照组存在差异的受教育程度、吸烟和饮酒等变量纳入多因素 Logistic 回归模型,考虑年龄和性别的影响。结果显示,miR-16-5p 高表达可明显提高患食管鳞癌风险(OR=2.90,95%CI:1.43~5.87, $P=0.003$)。

3 讨论

miR-15 家族包括 6 种高度保守的 miRNAs,miR-15a、miR-15b、miR-16、miR-195 和 miR-497。在 miR-15 家族中发现 miR-15a/16-1 和 miR-15b/16-

2 为两个基因簇,其中 miR-16-1 和 miR-16-2 序列完全一致。其功能与细胞凋亡、细胞分化和周期调控、应激等均有密切关联。本研究通过病例对照设计探讨 miR-15 家族基因上 10 个具有潜在功能的 SNPs 位点与食管鳞癌的关联,排除检测不合格的位点后,结果显示 6 个 SNPs 位点的基因型分布在病例组和对照组均无差异($P > 0.05$)。血清中 miR-16-5p 的表达水平在食管癌鳞癌患者和健康对照组间的比较差异有统计学意义。

大量研究表明 miRNA 形成过程以及靶基因结合位点的序列变异可影响 miRNA 的功能,从而对疾病的发生发展产生影响^[12]。随着 miRNA 在肿瘤发生发展中的研究不断深入,miRNA 以及 miRNA 结合

Table 4 Distribution of miR-16-5p expression level between genotypes and pathological of each SNPs

| Genotypes and pathological | N | miR-16-5p expression(FC) | F/t | P |
|----------------------------|----|--------------------------|------|------|
| rs1022960 | | | | |
| CC | 42 | 1.00 | | |
| CT | 51 | 1.10 | 0.10 | 0.95 |
| TT | 8 | 0.71 | | |
| rs10936201 | | | | |
| AA | 2 | 1.00 | | |
| AC | 24 | 2.10 | 1.15 | 0.56 |
| CC | 74 | 1.90 | | |
| rs2066557 | | | | |
| CC | 17 | 1.00 | | |
| CT | 53 | 0.65 | 2.24 | 0.33 |
| TT | 32 | 1.49 | | |
| rs2740545 | | | | |
| CC | 13 | 1.00 | | |
| CT | 52 | 0.70 | 0.59 | 0.74 |
| TT | 37 | 1.22 | | |
| Differentiation | | | | |
| Low | 5 | 1.00 | | |
| Medium | 29 | 2.19 | 0.46 | 0.79 |
| High | 9 | 1.12 | | |
| TNM | | | | |
| I~II | 20 | 1.00 | | |
| III~IV | 23 | 1.72 | 0.29 | 0.77 |

Note:FC:fold change.

位点 SNPs 与肿瘤易感性及对肿瘤进程的研究越来越受到关注。miR-15 家族参与调节人体的多种重要活动,在肿瘤中的研究也逐渐受到重视,已有研究证实不同的肿瘤组织和细胞中 miR-15 家族出现差异性表达^[13-15]。目前对于 miR-15 家族的研究较多集中在白血病,研究者发现 miR-15/16 是慢性粒细胞白血病中 13q14 缺失的主要靶点,是 miRNA 在癌症发病机制中主要参与的一个重要例子^[16]。超过三分之二的慢性 B 细胞淋巴瘤白血病的特征是位于 13q14 的 miR-15a/16-1 缺失,miR-15b/16-2 缺失在 B 细胞慢性淋巴瘤白血病的发病机制中也发挥着重要作用^[17]。对实体瘤的研究发现 miR-16-1 基因的一个多态位点 rs1022960 可能与不吸烟女性人群患肺癌的风险有关^[22]。本研究中,由于样本量较小,无法进一步根据吸烟等环境因素进行分层分析,这是本研究的局限性之一,这也可能与我们未发现 miR-15 家族相关 SNPs 位点与食管鳞癌发生风险具有关联性有关。其次,本研究采用病例对照研究的设计方

法,可能存在潜在的选择偏倚和信息偏倚。

既往研究中关于 miR-16 在食管鳞癌中的表达水平却不尽相同。例如在一项 ESCC 患者化疗结果的对比研究中发现具有良好预后患者的 miR-16 水平显著高于放疗后预后差的患者($P<0.05$,AUC:0.762),提示血浆 miR-16 可作为 ESCC 患者放疗结果的预测因子。此外还发现治疗后 miR-16 水平增加超过 2 倍,显示与更长的总生存期相关($P=0.009$),结果提示 miR-16 可能为 ESCC 的保护因子^[18],而其他关于食管鳞癌中 miR-16 的研究均发现 miR-16 在外周血、食管癌细胞或癌症组织中高表达。Hu 等^[19]发现 miR-16 与肿瘤分期及淋巴结转移有密切关联,其中 T₃~T₄ 肿瘤患者的 miR-16 表达水平显著高于 T₁~T₂ 肿瘤患者($P=0.020$)。Zhu 等^[20]在食管癌细胞中发现 miR-16 通过结合靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区(3' UTR),下调靶基因表达水平,抑制细胞凋亡,同时可以促进细胞增殖。Li 等^[21]发现 miR-16 与食管鳞癌的预后相关,其高表达水平可缩短无进展生存期和总生存期,提示 miR-16 可能是致癌基因并可以预测 ESCC 的不良生存率。miR-16 在食管鳞癌中的表达水平不尽相同其主要的原因为除各研究样本量较小,可能会造成偏倚外,研究样本类型也不尽一致,主要分为血浆和组织,部分研究对象还包含了化疗后的患者,各研究间研究对象的差异性较大,其结果往往也存在较大差异性。

综上所述,本研究中未发现 miR-15 家族基因 SNPs 位点与食管鳞癌发病风险的相关性,但 miR-16 的表达在食管鳞癌患者中呈高表达,可能与食管鳞癌的发生发展有关。研究结果仍需更多大样本、多中心的研究进行验证。

参考文献:

- [1] Bray F,Ferlay J,Soerjomataram I,et al. Global cancer statistics 2018:GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin,2018,68(6):394-424.
- [2] Zhang SW,Zhang M,Li GL. An analysis of incidence and mortality of esophageal cancer in China,2003~2007 [J]. China Cancer,2012,21(4):241-247. [张思维,张敏,李光琳,等.2003~2007 年中国食管癌发病与死亡分析[J].中国肿瘤,2012,21(4):241-247.]
- [3] Han SJ,Wei WQ,Zhang ST. Risk Factors of esophageal

- cancer in a high-risk area in China, 2012[J]. Chinese General Practice, 2012, 15(32):3745-3748. [韩书婧, 魏文强, 张澍田, 等. 食管癌高发地区人群危险因素的研究[J]. 中国全科医学, 2012, 15(32):3745-3748.]
- [4] Calin A, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11):857-866.
- [5] Cheng G. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 81: 75-93.
- [6] Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(6):389-402.
- [7] Pichler M, Calin GA. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients [J]. Br J Cancer, 2015, 113(4):569-573.
- [8] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. Nature, 2003, 425(6956): 415-419.
- [9] Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and dicer in the biogenesis of microRNAs [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006, 71: 59-66.
- [10] Di Leva G, Croce CM. miRNA profiling of cancer [J]. Curr Opin Genet Dev, 2013, 23(1):3-11.
- [11] Hu J, Wang Z, Liao BY, et al. Human miR-1228 as a stable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs in cancer patients [J]. Int J Cancer, 2014, 135(5): 1187-1194.
- [12] Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the Agtr1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes [J]. Am J Hum Genet 2007, 81(2): 405-413.
- [13] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39):13944-13949.
- [14] Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, et al. 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors [J]. Blood, 2010, 115(19):3916-3922.
- [15] Mei Z, Su T, Ye J, et al. The miR-15 family enhances the radiosensitivity of breast cancer cells by targeting G2 checkpoints [J]. Radiat Res, 2015, 183(2):196-207.
- [16] Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL [J]. Cell Death Differ, 2015, 22(1):6-11.
- [17] Lovat F, Fassan M, Gasparini P, et al. miR-15b/16-2 deletion promotes B-cell malignancies [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(37):11636-11641.
- [18] Yu Q, Li B, Li P, et al. Plasma microRNAs to predict the response of radiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma patients [J]. Am J Transl Res, 2015, 7(10):2060-2071.
- [19] Hu Y, Correa AM, Hoque A, et al. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer [J]. Int J Cancer, 2011, 128(1):132-143.
- [20] Zhu Y, Xia Y, Niu H, et al. MiR-16 induced the suppression of cell apoptosis while promote proliferation in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(5):1340-1348.
- [21] Li BX, Yu Q, Shi ZL, et al. Circulating microRNAs in esophageal squamous cell carcinoma: association with locoregional staging and survival [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(5):7241-7250.
- [22] Yin Z, Li H, Cui Z, et al. Polymorphisms in pre-miRNA genes and cooking oil fume exposure as well as their interaction on the risk of lung cancer in a Chinese nonsmoking female population [J]. Oncol Targets Ther, 2016, 9(1):395-401.