

miRNA-146a 在甲状腺癌细胞中的靶基因预测及相关通路分析

李芳,姜霞,苏兴凯,刘肇,胡毅平,陈英,田延锋

(河北医科大学第一医院,河北石家庄 050031)

摘要:[目的] 利用生物信息学方法对 miRNA-146a 在甲状腺癌细胞 BCPAP 中的作用进行转录组测序,从分子水平研究 miRNA-146a 对甲状腺癌发病的作用机制,寻找潜在的治疗靶点。[方法] 对甲状腺癌细胞 BCPAP 分别转录 miRNA-146a 的模拟物、空白模拟物和 miRNA-146a 的抑制物及空白抑制物,荧光定量 PCR 检测细胞 miRNA-146a 的表达;高通量测序检测差异 miRNA;对检测结果的差异基因与 miRTarBase、miRWalk2.0 和 TargetScan 中 miRNA-146a 靶基因数据库共分析,预测 miRNA-146a 靶基因;用 Cluster Profiles 3.0.5 软件进行富集分析。[结果] 转录组测序结果与 miRTarBase、miRWalk2.0 和 TargetScan 中 miRNA-146a 靶基因数据库共分析,提示 miRNA-146a 靶基因与 *CXCL8*、*CXCR4*、*IRAK1*、*PRKCE* 和 *LFNG* 等 9 个靶基因相关。GO 功能注释预测靶基因集合富集在炎症反应、细胞运动及迁移的正调节、趋化性调节、G 蛋白偶联受体结合、细胞因子活性及受体结合。KEGG 信号通路富集结果提示与 Toll 样受体信号通路、Notch 信号通路、Fc epsilon RI 信号通路和趋化因子信号通路等相关。[结论] miRNA-146a 在甲状腺癌组织中的表达可能是其分子诊断的有用生物标志物和潜在的靶点,可为甲状腺癌的临床诊断提供一定参考。

关键词: 甲状腺肿瘤;miRNA-146a;高通量测序;GO 注释;KEGG 信号通路

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)08-0689-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B006

Target Gene Prediction and Related Pathway Analysis of MicroRNA146a in Thyroid Carcinoma Cells

LI Fang,JIANG Xia,SU Xing-kai,LIU Bo,HU Yi-ping,CHEN Ying,TIAN Yan-feng

(The First Hospital of Hebei Medical University,Shijiazhuang 050031,China)

Abstract: [Objective] To study the role of microRNA-146a(miRNA-146a) in thyroid cancer cells and its mechanism with bioinformatics. [Methods] MiRNA-146a mimic,blank mimic,inhibitor and blank inhibitor were transcribed in thyroid cancer BCPAP cells,respectively. The expression of miRNA-146a in thyroid cancer cells was detected by fluorescence quantitative RT-PCR(fqRT-PCR). The results were analyzed with miRTarBase,miRWalk2.0 and TargetScan database,and the target gene of miRNA-146a was predicted. Enrichment analysis was used by Cluster Profiles 3.0.5 software. [Results] The results of transcriptome sequencing were analyzed in the target gene databases of miRNATarBase,microWalk 2.0 and TargetScan,suggesting that the target genes of miRNA-146a were related to 9 genes including *CXCL8*、*CXCR4*、*IRAK1*、*PRKCE* and *LFNG*.GO functional annotation predicted the accumulation of target genes in inflammatory response,positive regulation of cell movement and migration,chemotaxis regulation,G protein coupled receptor binding,cytokine activity and receptor binding. KEGG signaling pathway enrichment results suggested that Toll-like receptor signaling pathway,Notch signaling pathway,Fc epsilon RI signaling pathway and chemokine signaling pathway were related. [Conclusion] The expression of miRNA-146a in thyroid cancer tissue may be a useful biomarker and potential target for molecular diagnosis,which may provide some reference for clinical diagnosis of thyroid cancer.

Subject words: thyroid cancer;miRNA-146a;high-throughout sequencing;GO annotation;KEGG pathway

甲状腺癌(thyroid cancer,TC)是最常见的恶性内

分泌肿瘤,近年来,由于环境污染、遗传、激素及心理因素影响等,其发病率呈逐渐上升趋势^[1-2],其确诊方式常以超声下发现结节并初步判断良恶性,怀疑恶性结节者需进行针吸细胞血检查加以明确。然而,有的病变仍不能准确归类为良性或恶性,诊断方式

基金项目: 河北省科技计划项目(17277715D)

通信作者: 田延锋,主任医师,硕士;河北医科大学第一医院普外一科,河北省石家庄市裕华区东岗路 89 号(050031);E-mail: 18633889606@163.com

收稿日期: 2020-01-06; **修回日期:** 2020-04-20

仍缺乏一定的有效性及准确性。因此,寻找用于辅助诊断和评估甲状腺癌患者预后的生物标志物非常重要。MicroRNA 是一种大小约 21~23 个碱基的单链小分子 RNA, miRNA 是一类在进化上非常保守的基因,提示可能有重要的生物学功能^[3]。大量研究表明,miRNA 的功能涉及到各种生理病理过程,包括:发育过程调节、抵抗病毒入侵、动物免疫功能调节、各器官或系统疾病以及肿瘤的发生及发展各个阶段^[3]。MiRNA 能够通过结合基因转录物的 3'UTR(3'非翻译区)来修饰转录后水平的基因表达,从而抑制其翻译或诱导其降解,它们通常在同一生物通路中调节多个靶基因^[4]。

甲状腺癌中最常见的病理类型是甲状腺乳头状癌(PTC),占 85%~90%左右^[5]。研究发现,与正常甲状腺组织相比,miRNA 在 PTC 中过度表达^[6],研究证实高度上调的 miRNA 列表(高达 19.3 倍)包括 miRNA-146、miRNA-221/222、miRNA-155、miRNA-34 和 miRNA-181^[6-7]。本文拟探讨以脂质体介导的转染方法将 miRNA-146a 模拟物和抑制物转染甲状腺癌细胞(BCPAP 细胞),通过高通量测序技术和生物信息学技术预测 miRNA-146a 的可能的靶基因,及其可能作用的生物通路,进而为甲状腺癌的发生、发展提供潜在机制性探索并挖掘其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 BCPAP 细胞培养及转染

将甲状腺癌细胞 BCPAP 接种于含体积分数 10%FBS 的 MEM 培养基中,培养条件 37℃,体积分数为 5%CO₂, 孵育 48h 后用质量分数为 0.25%胰蛋白酶消化液消化传代,选取对数生长期的细胞进行实验。实验前,调整细胞浓度至 3.5×10⁵ 个/ml,将细胞铺至 6 孔板,每孔 2ml。24h 后,细胞汇合达 50%~70%,开始转染。按 Lipo 2000 操作说明将 miRNA-146a(50nM)、mimic control(50nM)、miRNA-146a inhibitor(50nM)、inhibitor control(50nM)转染 BCPAP 细胞,48h 后进行后续实验。

1.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞 miRNA-146a 表达

细胞转染 48h 后收样,弃培养基加入 1ml TRI-ZOL 裂解液,按 TRZOL 法提取总 RNA,测量总 RNA

浓度。取 1μl Total RNA,1μl 2.5U/μl Poly A Polymerase,5μl 5×PAP/RT Buffer,1μl RTase Mix,加 ddH₂O(RNase/DNase free)至 25μl 配制成逆转录体系,按 All-in-oneTM miRNA First-Stand cDNA Synthesis Kit 试剂盒操作说明进行逆转录。反应温度:37℃,60 min,85℃,5min,4℃保存备用。按照 All-in-oneTM miRNA qPCR Primers 试剂盒操作说明检测 miRNA-146a 在细胞中的表达量,以 U6 作内参,以 2^{-ΔΔCt} 值计算各组细胞中 miRNA-146a 的相对表达量。实验分为 miRNA-146a mimic、mimic control、miRNA-146a inhibitor、inhibitor control 四组,每组设 3 个复孔。

1.3 RNA 定量和鉴定

在 1%琼脂糖凝胶上检测 RNA 降解和污染。使用 NanoPhotometer[®] spectrophotometer(IMPLEN, CA, USA)检测 RNA 的纯度和浓度。使用 Agilent 2100 bioanalyzer 评估 RNA 完整性。

1.4 文库构建与质检

建库起始 RNA 为 total RNA,总量 ≥1μg。建库中使用的建库试剂盒为 Illumina 的 NEBNext[®] UltraTM RNA Library Prep Kit。通过 Oligo(dT)磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA,随后在 NEB Fragmentation Buffer 中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断。以片段化的 mRNA 为模版,随机寡核苷酸为引物,在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链,随后用 RNaseH 降解 RNA 链,并在 DNA polymerase I 体系下,以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复,经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头,用 AMPure XP beads 筛选 200bp 左右的 cDNA,进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,最终获得文库。

文库构建完成后,先使用 Qubit2.0 Fluorometer 进行初步定量,稀释文库至 1.5ng/μl,随后使用 Agilent 2100 bioanalyzer 对文库的 insert size 进行检测,insert size 符合预期后,qRT-PCR 对文库有效浓度进行准确定量(文库有效浓度高于 2nM),以保证文库质量。

1.5 上机测序

库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序,并产生 150bp 配对末端读数。测序的基本原理是边合

成边测序 (Sequencing by Synthesis)。在测序的 flow cell 中加入四种荧光标记的 dNTP、DNA 聚合酶以及接头引物进行扩增,在每一个测序簇延伸互补链时,每加入一个被荧光标记的 dNTP 就能释放出相对应的荧光,测序仪通过捕获荧光信号,并通过计算机软件将光信号转化为测序峰,从而获得待测片段的序列信息。

1.6 聚类 and 测序

根据制造商的说明,使用 TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS(Illumina)在 cBot Cluster Generation System 上将带有索引编码的样本进行聚类。生成簇后,在 Illumina HiSeq 平台上测序,产生 125bp/150bp 的配对末端读数。

1.7 差异表达基因分析

在差异基因表达分析之前,每个测序文库都会用 edgeR 程序包中的一个缩放归一化因子调整读取结果。然后使用 edgeR R 包(3.12.1)进行两种条件的差异表达分析。使用 Benjamini&Hochberg 方法调整 *P* 值。将校正的 *P*<0.05 和绝对倍数变化大于 2 设定为显著差异表达的阈值。

1.8 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

采用 clusterProfiler 软件对差异基因进行 GO 功能注释分析和 KEGG 通路富集分析。GO 注释分为 3 个部分:分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)、生物学过程(biological process, BP),其中校正后 *P*<0.05 的 GO 项被认为是显著富集项。KEGG 数据库主要用于从分子水平信息,特别是基因组测序和其他高通量实验产生的大规模分子数据集中了解生物系统的高级功能和效用,富集以 padj 小于 0.05 为显著富集。

1.9 qRT-PCR 验证相关基因表达情况

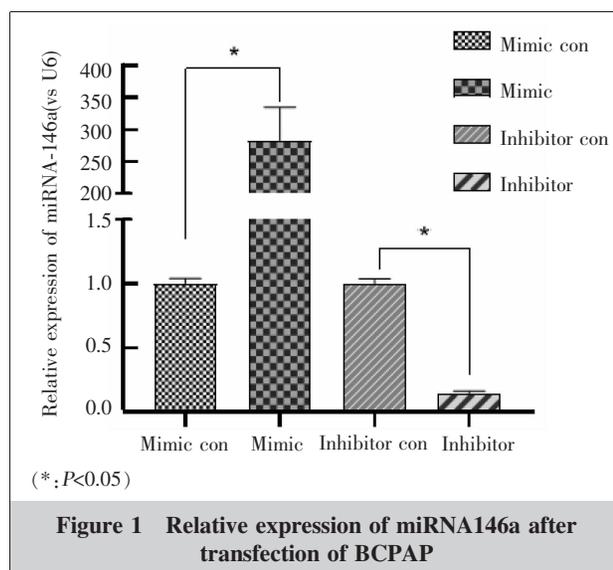
采用 qRT-PCR 法检测转染 miRNA-146a 模拟物和抑制物后甲状腺癌细胞 (BCPAP 细胞) 中 IRAK1、LFNG、PRKCE 的相对表达量。引物由 NCBI 在线设计,并由生工公司合成(引物序列信息见 Table 1)。(1)提取总 RNA:按照 Trizol 试剂盒说明书操作;(2)反转录:按照组分配制 RT 反应液,其中 PrimeScript Buffer (5×) 2μl, PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5μl, Oligo dT Primer 0.5μl, Random 6 mers 0.5μl, Total RNA 1μl, RNase Free dH₂O 5.5μl;(3)配 qPCR 反应体系 (20μl), 其中 SYBR Green Master

Mix 10.0μl, Primer (2μM) 2.0μl, ROX Reference Dye II 0.4μl, 模板 DNA 2.0μl, RNase Free dH₂O 5.6μl。将其置于荧光定量 PCR 仪上进行反应,程序设定为 95℃ 5min, 95℃ 10s, 60℃ 45s, 95℃ 15s, 60℃ 60s, 95℃ 15s, 共 45 个循环,以 GAPDH 为内参基因,反应结束后对所得数据循环阈值(Ct 值)进行分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算 IRAK1、LFNG、PRKCE 的相对表达量。

2 结果

2.1 转染结果

用脂质体介导的转染方法将 miRNA-146a 模拟物和抑制物转染甲状腺癌细胞(BCPAP 细胞),以细胞固定表达 U6 做对照,测定转染后细胞目的基因即 miRNA-146a 表达量,计算两个表达产物的比值从而判断其相对表达量,转染效率如 Figure 1 所示。



2.2 高通量测序检测差异 miRNA

将转染成功细胞做基因检测,首先定量分析,得到所有样本的表达矩阵,进行基因或转录本水平的表达差异显著性分析。采用 edgeR 软件进行表达差异显著性分析。与转染 mimic control 相比,miR-146a mimic 转染 BCPAP 细胞后,测序结果提示有 277 个基因表达上调,同时有 322 个基因表达下调。对 322 个表达下调基因与 miRTarBase、miRWalk2.0 和 TargetScan 中 miR-146a 靶基因数据库取交集,提示与 CXCL8、CXCR4、IRAK1、PRKCE、WSB2、EPSTI-1、

SLC10A3, *TRIM22* 和 *LFNG* 9 个差异表达基因相关。

2.3 选取 *IRAK1*、*LFNG*、*PRKCE* 基因进行表达结果分析

使用 qPCR 分析转染 miRNA-146a 模拟物和抑制物后 BCPAP 细胞中 *IRAK1*、*LFNG*、*PRKCE* 的相对表达量,并参照 *GAPDH* 进行标准归一化处理,结果显示,与相应的 control 组对比,其中转染 miRNA-146a 模拟物后, *IRAK1*、*LFNG*、*PRKCE* 基因表达量均有下降,且后两者差异有统计学意义(Figure 2,3)。

2.4 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集结果

针对 322 个下调差异基因进行 GO 注释和 KEGG 通路富集分析。通过 GO 注释描述共得到细胞组分注释信息 (106 个基因)、GO 生物学过程注释信息 (279 个基因)及 GO 分子功能注释信息 (264 个基因)。随后将这些基因分别投射至 GO 的分子功能、细胞组分、生物学过程等三大应用功能上,结果显示 miRNA-146a 预测靶基因集合富集在炎症反应、细胞运动及迁移的正调节、趋化性调节、G 蛋白偶联受体结合、细胞因子活性及受体结合(Figure 4)。

在 GO 注释分类的基础上,利用已有生物通路数据,对 322 个下调差异基因集合中的基因进行 KEGG 生物通路富集分析(Figure 5)。结果显示,miRNA-146a 作用的靶基因蛋白等富集于以下通路中,如 Toll 样受体信号通路 (*CXCL8*、*IRAK1*、*TNF*)、Notch 信号通路 (*NOTCH4*、*LFNG*)、Fc epsilon RI 信号通路 (*TNF*、*SYK*、*PRKCE*、*PIK3R2*)、趋化因子信号通路 (*CXCL8*、*CXCR4*、*PIK3R2*)等(Table 2)。

3 讨论

甲状腺癌是内分泌系统常见肿瘤,可发生于各个年龄段,且患者的生存率较高。然而,部分甲状腺癌患者其相关死亡率和癌症复发率值得注意。因此,为了有效治疗甲状腺癌,找到可鉴别甲状腺癌类型,预测肿瘤的侵袭性和检测可能干扰治疗的特异性突变基因成为

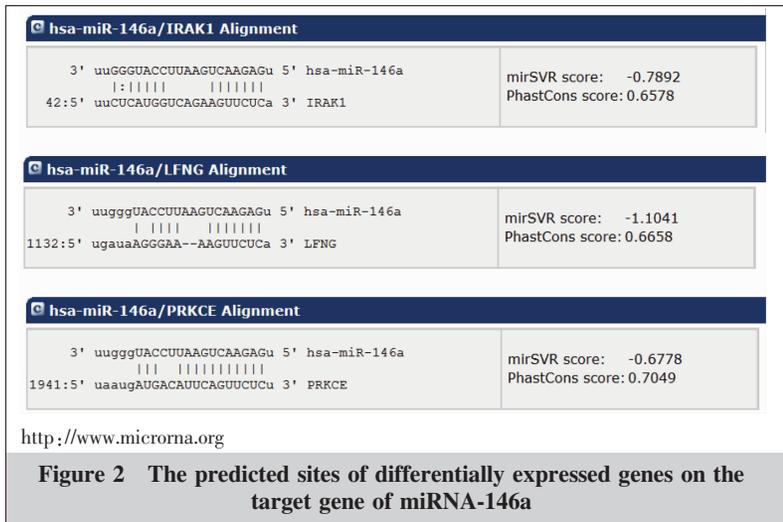


Figure 2 The predicted sites of differentially expressed genes on the target gene of miRNA-146a

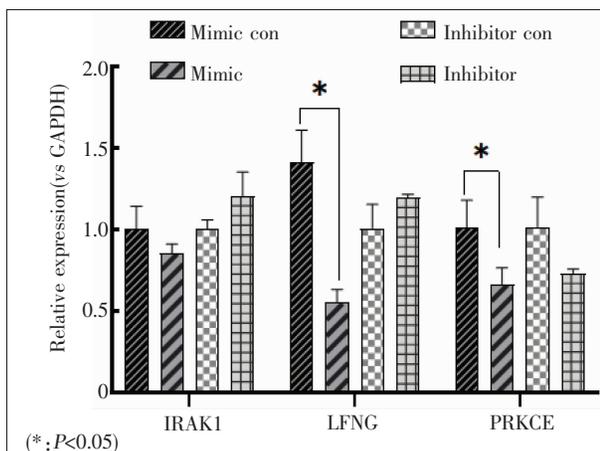


Figure 3 Related genes expression of miRNA-146a mimic and inhibitor

Table 1 Primer sequence of the genes

Gene	Forward 5'~3'	Reverse 3'~5'
<i>IRAK1</i>	GGCCATTCTCAGTCCTTGCT	GCAGCTTCTCTAGCCTCTCG
<i>LFNG</i>	CAGGTGACCGCTGAGCTACG	GATGGAGCGGAACCTGGATG
<i>PRKCE</i>	CTGCTTCCAGACCAAGGACC	TCCTTGACATCCCGAAGTC
<i>GAPDH</i>	AGCCTCAAGATCATCAGCAATG	TGTGGTCATGATCCTTCCACC

Table 2 Enrichment of KEGG signal pathway of miRNA-146a differentially expressed genes

KEGG signaling pathway	Relative genes
Cytokine-cytokine receptor interaction	CSF2/ <i>CXCL8</i> / <i>TNFRSF9</i> / <i>CXCL1</i> / <i>CXCL3</i> / <i>IL1B</i> / <i>CXCL2</i> / <i>TNF</i> / <i>CSF1R</i> / <i>CXCR4</i> / <i>CXCL6</i> / <i>CXCL5</i> / <i>CSF3</i>
Chemokine signaling pathway	<i>CXCL8</i> / <i>CXCL1</i> / <i>CXCL3</i> / <i>CXCL2</i> / <i>CXCR4</i> / <i>CXCL6</i> / <i>CXCL5</i> / <i>PIK3R2</i>
NOD-like receptor signaling pathway	<i>CXCL8</i> / <i>CXCL1</i> / <i>IL1B</i> / <i>CXCL2</i> / <i>TNF</i>
Fc epsilon RI signaling pathway	<i>CSF2</i> / <i>TNF</i> / <i>SYK</i> / <i>PRKCE</i> / <i>PIK3R2</i>
Notch signaling pathway	<i>ADAM17</i> / <i>HES1</i> / <i>NOTCH4</i> / <i>LFNG</i>
Toll-like receptor signaling pathway	<i>CXCL8</i> / <i>IRAK1</i> / <i>IL1B</i> / <i>TNF</i> / <i>PIK3R2</i>

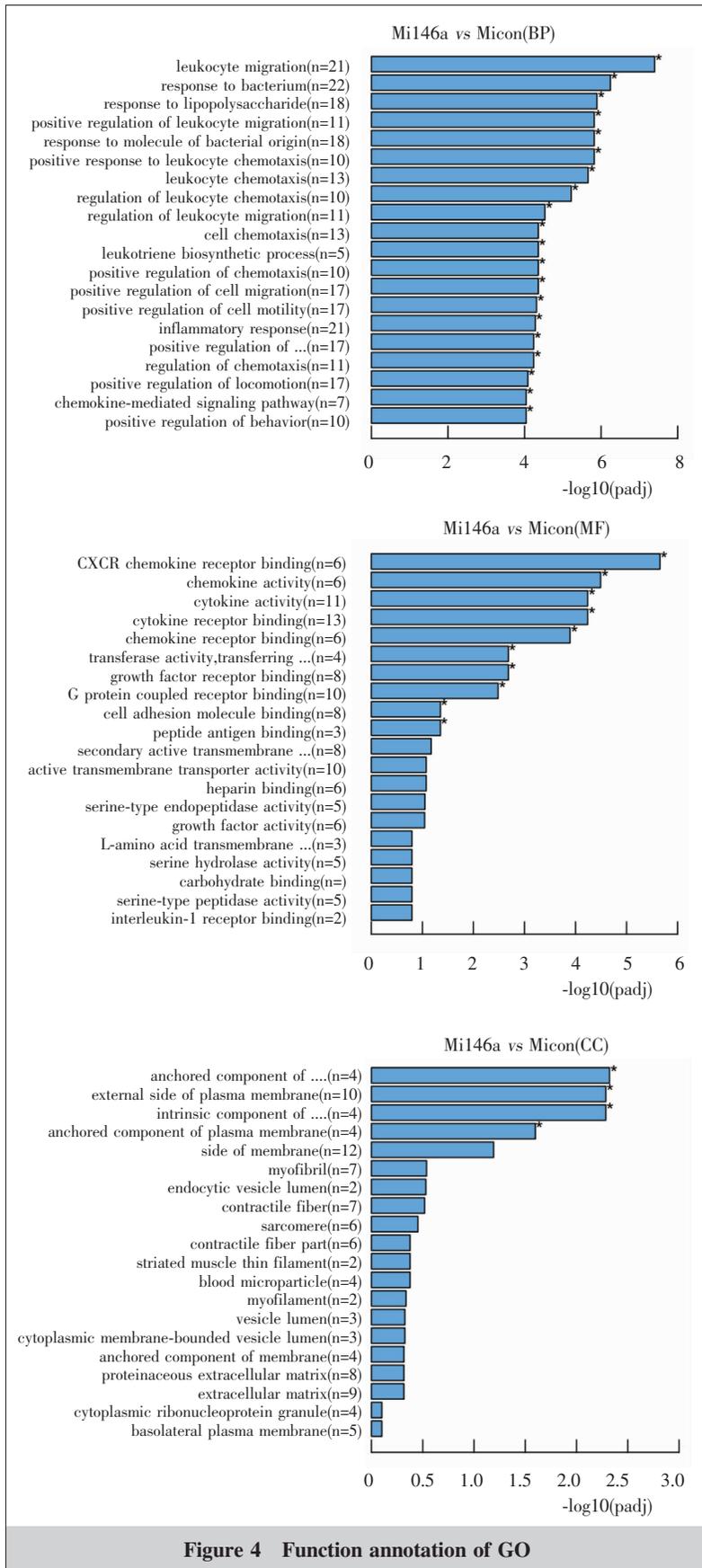


Figure 4 Function annotation of GO

一种迫切需求。microRNA(miRNA)是长度约 19~25 个核苷酸的小型非编码 RNA,在真核和原核细胞中负责基因表达的转录后调节。研究显示,miRNA 通过调节肿瘤细胞分化、迁移、凋亡和增殖而在癌症发展中起重要作用。这些调节过程通过特异性 miRNA 的表达来控制,导致致癌基因表达升高或肿瘤抑制基因表达缺失^[8-13]。特异的 miRNA 可作为肿瘤标志物,同时还可为靶向药物研发提供潜力空间。miRNAs 对人体病理和生理过程的调控主要是通过基因转录过程中和转录后蛋白质的表达来实现的,miRNAs 可以诱导肿瘤细胞异常代谢进而影响其转录和翻译过程。在 miRNAs 的研究中,发现 miR-146a 在多种肿瘤细胞中的表达明显高于正常组织^[14-15]。通过检索相关文献选择目前比较热门的 miRAN-146a 作为研究内容,通过脂质体介导的方式将 miRAN-146a mimic 转染甲状腺癌细胞 (BCPAP 细胞),通过高通量测序方法并结合 miR-TarBase 等数据库筛选出 miRNA-146a 可能靶基因。利用 GO 注释富集及 KEGG 信号通路分析,显示 miRNA-146a 可能的靶基因主要参与炎症反应、细胞运动及迁移的正调节、趋化性调节、细胞因子活性及受体结合等生物学过程和分子功能。并通过 Toll 样受体信号通路、Notch 信号通路、Fc epsilon RI 信号通路、趋化因子信号通路等发挥重要作用。

Zhang 等^[16]研究发现 miR-146a 靶向调节 *PRKCE* 基因,并且 miR-146a 可能通过负反馈调节环控制某些信号传导,包括下调 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 和 IL-1 受体相关激酶 1 (IRAK1)。Knauf 等^[17]还表明,在 73% 的 PTC 病例中,与相应的正常甲状腺组织相比,PKCε 蛋白水平降低了 50%~90%,在 PTC 中可能存在一些翻译后抑制 PKCε(其由 *PRKCE* 基因编码),PKCε

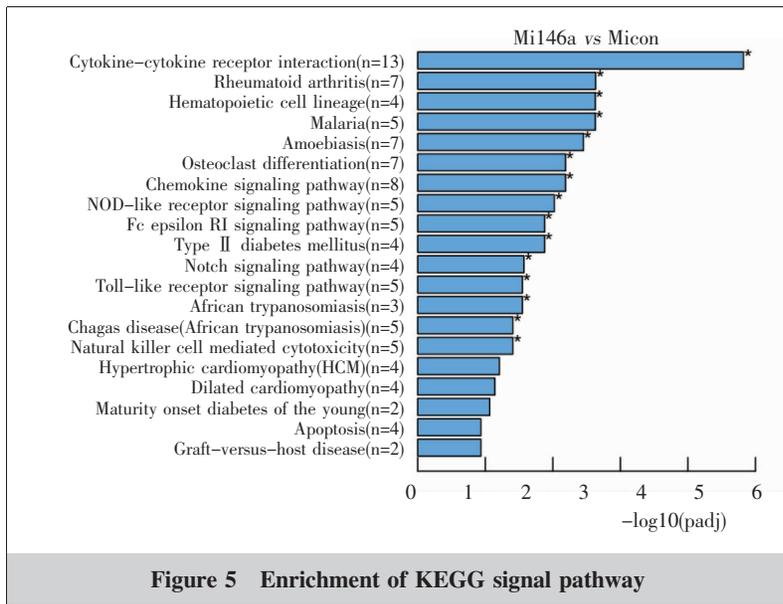


Figure 5 Enrichment of KEGG signal pathway

的降低可能是由于 miR-146 的表达。研究还提示 miR-146 通过下调癌细胞中某些靶基因来抑制甲状腺癌的形成、发展和侵袭，包括缺口同系物 1 (Notch1)和趋化因子 CXC 基序受体 4(CXCR4)等。此外,还观察到通过抑制 NF-κB 水平确定的甲状腺细胞中 miR-146a 的过表达。Hou 等^[18]的研究显示在甲状腺细胞中,NF-κB 活化诱导 pri-miR-146a 的转录,其转移至细胞质并加载到 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)上,而成熟的 miR-146a 通过下调调节白细胞介素-1 受体相关激酶 1(IRAK1)和 TNF 受体相关因子 6(TRAF6)有助于减弱受体信号传导。上述研究结果与本实验高通量测序检测靶基因结果一致,但其靶基因编码蛋白与其作用通路还有待进一步研究。

前期大量研究表明 miR-146a 与甲状腺肿瘤发生和恶化有关,miR-146a 在甲状腺癌组织中的表达可能是其分子诊断的有用生物标志物和潜在的靶点。应设计进一步的研究,以确定 miR-146a 在甲状腺癌细胞表型中的作用和机制,分析 miRNA 对甲状腺癌术前评估和预后评价的潜在价值。

参考文献:

[1] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
 [2] Reinhart BJ,Slack FJ,Basson M,et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature,2000,403(6772):901-906.
 [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature,2004,431(7006):350-355.

[4] Willeit P,Skroblin P,Kiechl S,et al. Liver microRNAs ;potential mediators and biomarkers for metabolic and cardiovascular disease?[J]. Eur Heart J,2016,37(43):3260-3266.
 [5] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma [J]. Cell,2014,159(3):676-690.
 [6] He H,Jazdzewski K,Li W,et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2005,102(52):19075-19080.
 [7] Pallante P,Visone R,Ferracin M,et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas [J]. Endocr Relat Cancer,2006,13(2):497-508.
 [8] Gopalan V,Smith RA,Lam AK. Downregulation of microRNA-498 in colorectal cancers and its cellular effects[J]. Exp Cell Res,2015,330(2):423-428.
 [9] Amin M,Lam AK. Current perspectives of mi-RNA in oesophageal adenocarcinoma:Roles in predicting carcinogenesis,progression and values in clinical management[J]. Exp Mol Pathol,2015,98(3):411-418.
 [10] Gopalan V,Pillai S,Ebrahimi F,et al. Regulation of microRNA-1288 in colorectal cancer;Altered expression and its clinicopathological significance [J]. Mol Carcinog,2013,53(S1):E36-E44.
 [11] Ebrahimi F,Gopalan V,Smith RA,et al. miR-126 in human cancers;Clinical roles and current perspectives [J]. Exp Mol Pathol,2014,96(1):98-107.
 [12] Maroof H,Salajegheh A,et al. Role of microRNA-34 family in cancer with particular reference to cancer angiogenesis[J]. Exp Mol Pathol,2014,97(2):298-304.
 [13] Maroof H,Salajegheh A,Smith RA,et al. MicroRNA-34 family,mechanisms of action in cancer;a review [J]. Curr Cancer Drug Targets,2014,14(8):737-751.
 [14] Permuth-Wey J,Thompson RC,Burton NL. A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma [J]. J Neurooncol,2011,105(3):639-646.
 [15] Labbaye C,Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis,immune function and cancer [J]. J Hematology Oncol,2012,5:13.
 [16] Zhang X,Li D,Li M,et al. MicroRNA-146a targets PRKCE to modulate papillary thyroid tumor development [J]. Int J Cancer,2013,134(2):257-267.
 [17] Knauf JA,Ward LS,Nikiforov YE,et al. Isozyme-specific abnormalities of PKC in thyroid cancer:evidence for post-transcriptional changes in PKC epsilon [J]. J Clin Endocrinol Metabo,2002,87(5):2150-2159.
 [18] Hou J,Wang P,Lin L,et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-Dependent type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6,IRAK1,and IRAK2[J]. J Immunol,2009,183(3):2150-2158.