

鼻咽癌差异表达 miRNAs 筛选研究

李晓霞^{1,2}, 李瑞平^{1,2}, 杜紫明^{1,2}, 曾木圣^{1,3}, 邵建永^{1,2}(1. 华南肿瘤学国家重点实验室; 2. 中山大学肿瘤防治中心病理科; 3. 中山大学肿瘤防治中心
实验研究部, 广东 广州 510060)

摘要: 【目的】应用 miRNAs 芯片筛选原代培养的鼻咽癌细胞差异表达 miRNAs, 并寻找差异表达 miRNAs 调控的靶基因, 为进一步研究其在鼻咽癌发病机制中的作用打下基础。【方法】运用 miRNAs 芯片技术筛选原代培养的鼻咽癌细胞差异表达 miRNAs, 同时运用 miRNAs 特异的引物组对差异表达的 miRNAs 进行荧光定量 RT-PCR 验证。运用靶基因预测软件并结合全基因组表达谱芯片结果预测差异表达 miRNAs 可能调控的靶基因, 并利用 western blot 技术检测预测的靶基因在原代培养的鼻咽癌细胞中的表达。【结果】miRNAs 芯片结果显示, 鼻咽癌中 miR-203、miR-503、miR-424、miR-141 和 miR-148a 表达下调, 而 miR-25、miR-195 和 miR-15a 表达上调, 其差异表达均在 2 倍以上; 荧光定量 RT-PCR 结果与 miRNAs 芯片的结果较符合; 其中 miR-203 的预测靶基因为 CCNG1 和 SPARC, Western blot 结果显示, 其在原代培养的鼻咽癌细胞亦高表达。【结论】miR-203、miR-503、miR-424、miR-141、miR-148a、miR-25、miR-195、miR-15a 在原代培养的鼻咽癌细胞与正常鼻咽上皮细胞中存在差异表达; CCNG1 和 SPARC 可能是 miR-203 调控的靶基因, 可能参与了鼻咽癌的发生发展。

关键词: microRNA; 鼻咽癌; 差异表达

中图分类号: R739.63

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0607-06

Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Nasopharyngeal Carcinoma

LI Xiao-xia^{1,2}, LI Rui-ping^{1,2}, DU Zi-ming^{1,2}, ZENG Mu-sheng^{1,3}, SHAO Jian-yong^{1,2}(1. State Key Laboratory of South-East Oncology; 2. Department of Pathology, Cancer Center, SUN Yat-sen University;
3. Department of Research, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the differentially expressed miRNAs and their target genes in primary nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells, which are useful for further studies on functions of miRNAs in pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. 【Methods】 MicroRNA microarray was used to investigate the differentially expressed miRNAs in primary NPC cells, and the discovered miRNAs were confirmed by real time RT-PCR assay. Furthermore, we predicted the possible target genes by combination anticipated algorithms and the whole expression profile of genome from primary NPC cells. Western blot was performed to detect the expression of the predicted target gene in primary NPC cells. 【Results】 MicroRNA microarray showed that expression of miR-203, miR-503, miR-424, miR-141, and miR-148a were down-regulated in primary NPC cells by two folds, while expression of miR-25, miR-195, and miR-15a were up-regulated by more than two folds too, which was accordant with the results from real time RT-PCR. CCNG1 and SPARC, the predicted target genes of miR-203, were detected to be high expressed in primary NPC cells by Western blot assay. 【Conclusion】 MiR-203, miR-503, miR-424, miR-141, miR-148a, miR-25, miR-195, and miR-15a were differentially expressed between NPC and NPNE cells. CCNG1 and SPARC, the putative target genes of miR-203, may play an important role in the pathogenesis and development of NPC.

Key words: microRNA; nasopharyngeal carcinoma; differentially expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):607-612]

收稿日期: 2007-06-28

基金项目: 国家重点基础研究规划项目(“973”计划, 2004CB518708); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目

作者简介: 李晓霞(1981-), 女, 山东沂南人, 硕士研究生; 邵建永, 通讯作者, 研究员, 博士生导师, E-mail: shjiany@mail.sysu.edu.cn

miRNAs (microRNA)是一类高度保守的非编码小 RNA (non-coding small RNA), 一般为 19~25nt 的单链型 RNA, 由 60~110nt 的可形成发夹状的内源性转录前体加工而成。它们广泛存在于植物、动物以及病毒中^[1]。miRNA 与靶 mRNA 的 3' UTR 碱基配对, 通过抑制 mRNA 的翻译^[2]或直接使 mRNA 降解^[3], 在转录后水平使基因产生沉默。越来越多的证据显示由 miRNA 调节的基因调控机制作为基因表达水平调控的一种重要方式, 与肿瘤的发生密切相关, miRNAs 很可能是一类潜在的癌基因或抑癌基因。对慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 的研究发现 mir-15a 和 mir-16-1 位于 13q14 染色体缺失域, 50%~60% 的 CLL 的患者存在 mir-16-1 和/或 mir-15a 的表达下调^[4], 而 miR-143 和 miR-145 在结肠癌中表达下调^[5], Let-7 在肺癌细胞中表达下调, RAS 可能受到 Let-7 的调控^[6], 并且 50% 以上的 miRNAs 的基因位于在人类癌症中发生缺失、扩增的染色体区域或染色体脆性位点, 进一步表明了 miRNAs 与人类癌症的相关性^[7]。鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是我国南方地区常见的恶性肿瘤。目前认为, 遗传因素、EB 病毒感染和某些环境因素与鼻咽癌的发生有关^[8], 但具体的分子发生机制尚不清楚。本研究应用 miRNAs 芯片筛查了原代培养的鼻咽癌和正常鼻咽上皮细胞差异表达的 miRNAs, 并在对差异表达的 miRNAs 进行靶基因的预测的基础上进一步对其靶基因进行了验证, 为进一步研究其在鼻咽癌发病机制中的作用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

5 例原代培养鼻咽癌细胞 (NPC8、NPC31、NPC43、NPC44 和 NPC47) 及 5 例原代培养鼻咽正常上皮细胞 (NPNE5、NPNE7、NPNE10、NPNE12 和 NPNE13) 标本均来源于中山大学肿瘤防治中心鼻咽科门诊。患者均为未接受过治疗的门诊病人。鼻咽癌细胞株 C666 由中山大学附属肿瘤防治中心实验研究部冻存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 鼻咽原代细胞的培养方法参见文献^[1], 其中用于芯片的鼻咽原代细胞均经过生物

学特性的鉴定 (资料未发表)。C666 细胞用 RPMI 1640 培养基 (含有 10% 的 FBS、50 mg/L 链霉素和 50 mg/L 青霉素), 细胞置于 37℃, 5%CO₂ 的培养箱中。

1.2.2 小分子 RNA 样品的分离与荧光标记 取对数生长期细胞, Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 分光光度计测定总 RNA 的纯度, 甲醛变性胶电泳质检总 RNA 的质量。取 50~100 μg 总 RNA 用 miRNA Isolation Kit 分离小于 100 nt 的小分子 RNA, 具体方法按说明书进行。

1.2.3 miRNA 芯片杂交及数据分析 芯片由北京博奥生物芯片有限责任公司研制 (晶芯® 哺乳动物 miRNA 微阵列芯片服务 V1.0 芯片上一共有 509 个 miRNA 对应的探针)。miRNAs 芯片杂交、扫描和数据分析均在该公司技术服务部完成, 详细资料见网站 (<http://www.capitalbio.com>)

1.2.4 生物信息学分析 应用互联网上 miRNA 靶基因预测软件 (PicTar^[9]、Targetscan^[10]、MiRbase^[11]、MiRanda^[12]) 在线服务站点, 输出差异表达 miRNA 的预测靶基因, 取至少 3 个软件预测到的基因作为靶基因。

1.2.5 荧光定量 RT-PCR miRNA 的 RT-PCR 方法参照 Chen 等^[13]的方法。相应的 PCR 引物见表 1。

表 1 用于 miRNA 实时定量 RT-PCR 的引物
Table 1 Primers used to perform RT-PCR of microRNAs

Primer	Sequence(5' 3')
miR-203 RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACctagtg
PCR primer	Forward CGCGTGAAATGTTTAGGACC Reverse GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-195 RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACgccaat
PCR primer	Forward CGGCTAGCAGCACAGAAATAT Reverse GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-15a RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACcacaat
PCR primer	Forward CGGTAGCAGCACATAATGGTT Reverse GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-25 RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACtcagac
PCR primer	Forward GCCATTGCACCTGTCTCGGT Reverse GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	Forward CTCGCTTCGGCAGCACA Reverse AACGCTTCACGAATTTGCGT

采用 U6 RNA 作为内标, 进行归一化。

1.2.6 Western Blot 分析 分别取 2 例鼻咽癌原代细胞(NPC43, NPC44)和 1 例鼻咽正常上皮原代细胞(NPNE5) Trizol 提取 RNA 后的剩余液, 按照 Trizol 试剂说明书提取蛋白, -80 保存待用。鼠抗人 SPARC 单克隆抗体; 兔抗人 CCNG1 多克隆抗体均购自 DAKO 公司。

2 结 果

2.1 总 RNA 提取及质量鉴定结果

样品总 RNA 的 OD260 /OD280 之值在 1.8 ~ 2.0 之间。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 条带清晰, 28 S 比 18 S RNA 条带亮度接近 2 : 1, RNA 完好无降解, 质量符合 miRNAs 芯片的质量要求(图 1)。经 miRNA Isolation Kit 分离, 分别获得 C666、5 例鼻咽癌原代细胞(NPC8、NPC31、NPC43、NPC44 和 NPC47) 及 5 例正常鼻咽上皮原代细胞(NPNE5、NPNE7、NPNE10、NPNE12 和 NPNE13) 的小分子 RNA。

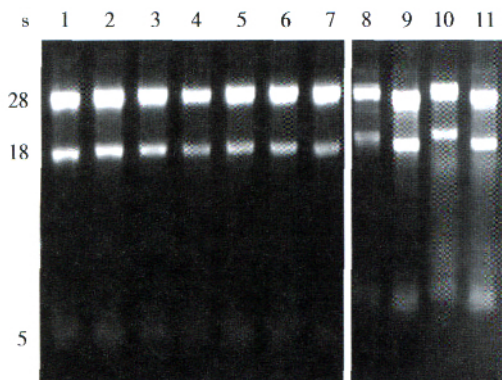


图 1 鼻咽原代细胞和 C666 总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoregram of total RNA of the primary cultured nasopharyngeal cells and C666

1: NPC8; 2: NPC31; 3: NPC43; 4: NPC44; 5: NPNE7; 6: NPNE1; 7: NPNE12; 8: C666; 9: NPC47; 10: NPNE5; 11: NPNE13

2.2 鼻咽癌和正常鼻咽上皮细胞差异表达 miRNA

分别将 NPNE7 和 NPNE10, NPNE5、NPNE12 和 NPNE13 样本小 RNA 混合后与芯片杂交, NPC8、NPC31、NPC43、NPC44 和 NPC47 样本小 RNA 分别与芯片杂交。杂交芯片经过扫描和数据整理后应用 Cluster 和 SAM 软件输出, 得到

miRNA 表达谱和差异表达 miRNA(表 2)。应用非监督等级聚类 (unsupervised hierarchical clustering) 的方法将原代培养的鼻咽癌和正常鼻咽上皮细胞的 miRNA 放到一起聚类, 得到原代培养的鼻咽癌和正常鼻咽上皮细胞 miRNA 表达谱(图 2)。结果显示在原代培养的鼻咽癌和正常鼻咽上皮细胞中 let-7 家族、miR-29、miR-23、miR-24、miR-22 和 miR-221 等高表达。应用 SAM 软件 two class unpaired 的方法筛选出 24 个鼻咽癌相关 miRNAs, 包括 18 个在鼻咽癌表达下调的 miRNAs 和 6 个在鼻咽癌表达上调的 miRNAs。其中在鼻咽癌表达下调 2 倍以上的有: miR-203、miR-503、miR-424、miR-141 和 miR-148a 共 5 个。在鼻咽癌表达上调 2 倍以上的有: miR-25、miR-195 和 miR-15a 共 3 个。

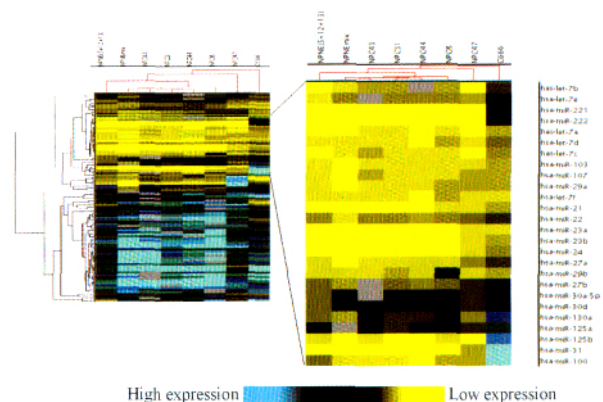


图 2 鼻咽原代细胞和 C666 的 miRNA 芯片数据聚类图

Fig.2 Clustering analysis of miRNAs of primary cultured nasopharyngeal cells and C666

表 2 原代培养鼻咽癌细胞相对正常鼻咽上皮细胞差异表达的 miRNA

Table 2 The differentially expressed miRNAs of primary cultured nasopharyngeal carcinoma cells

Number	miRNA	Fold change
1	miR-25	4.3210
2	miR-195	3.3660
3	miR-15a	2.7290
4	miR-203	0.2525
5	miR-503	0.3422
6	miR-424	0.4238
7	miR-141	0.4643
8	miR-148a	0.4772

2.3 差异表达 miRNA 的 RT-PCR 验证结果

采用荧光定量 RT-PCR 的方法检测了芯片中显示表达下调的 miR-203 在几个原代培养的鼻咽癌和正常鼻咽上皮细胞中的表达,同时对表达上调的 miR-195, miR-25, miR-15a 在 NPC47 的表达进行了检测,并采用 U6 进行归一化。miRNAs 定量 PCR 扩增曲线和溶解曲线(图 3),显示溶解曲线

呈单峰,引物的特异性较好。我们又将芯片结果与荧光定量 RT-PCR 结果进行比较(图 4),结果显示在 NPC31、43、44、47 中 miR-203 表达下调;在 NPC47 中 miR-195, miR-25, miR-15a 表达上调,miRNA 芯片与定量 RT-PCR 的结果一致,说明本研究芯片结果真实可靠。

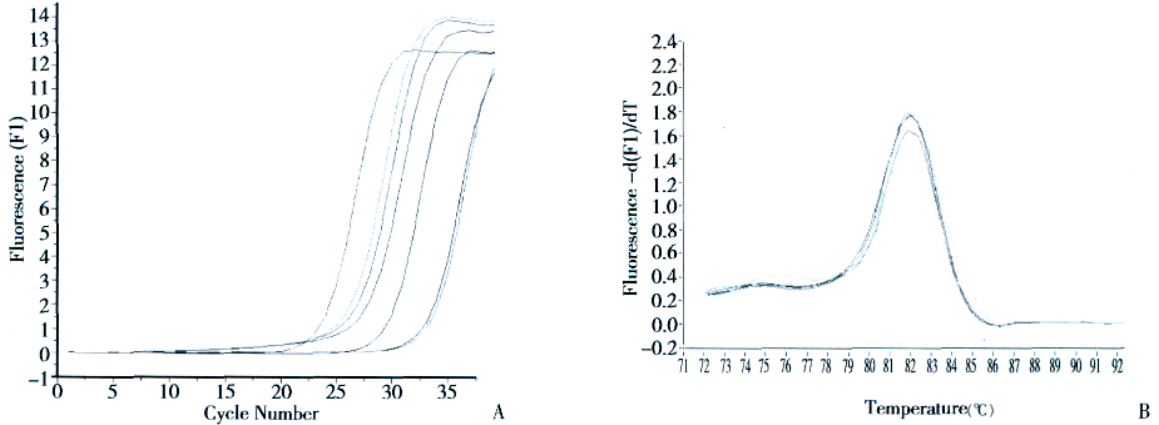


图 3 miR-203 的实时定量 RT-PCR 结果

Fig.3 Real time RT-PCR of miR-203

A: the amplification curve of miR-203; B: the melting curve of miR-203

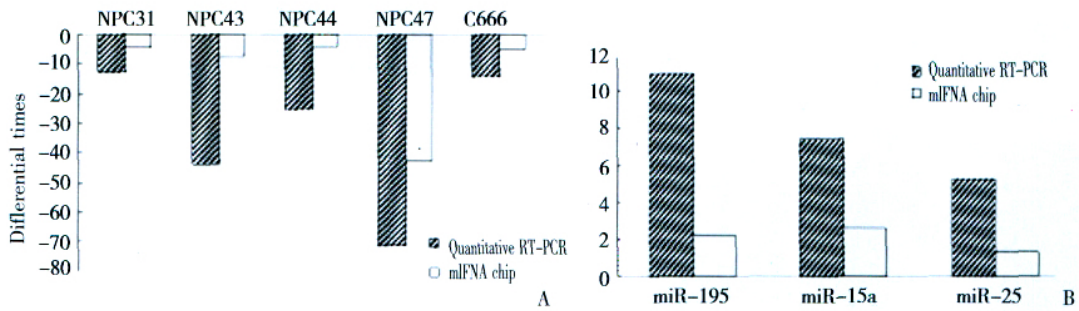


图 4 定量 RT-PCR 与芯片结果比较图

Fig.4 Comparison of real time RT-PCR and miRNA microarray

A: comparison of the expression of miR-203 in NPC31, NPC 43, NPC 44 and NPC 47; B: comparison of the expression of miR-195, miR-15a, miR-25 in NPC 47

2.4 miR-203 靶基因预测结果

选择鼻咽癌下调的 miR-203 进行靶基因的预测。通过四个靶点预测软件 (pictar, targetscan, miRanda, miRBase) 预测 miR-203 可能的靶基因。为了减少假阳性率,我们只挑选至少出现在 3 个软件中的基因作为其可能的靶基因,共筛选出 46 个基因。我们将先前预测的靶基因与全基因组差异基因表达谱相比较发现,在这 46 个预测的靶基因中,有 5 个基因表现为上调表达,它们是: SPARC, CCNG1, ID2, INSIG1 和 CITED2,有 3 个基

因表现为下调表达,其余基因无明显变化或者无数据。

2.5 Western blot 检测预测靶基因的表达

在原代培养的鼻咽癌细胞中下调表达的 miR-203,其预测两个的靶基因是 CCNG 和 SPARC。它们在原代培养的鼻咽癌全基因组表达谱芯片中表达都上调,进一步利用 Western blot 技术检测原代培养的鼻咽癌细胞中 CCNG 和 SPARC 的表达,结果显示在原代培养的鼻咽癌中 CCNG1 和 SPARC 蛋白高表达 (图 5),提示在鼻咽癌中

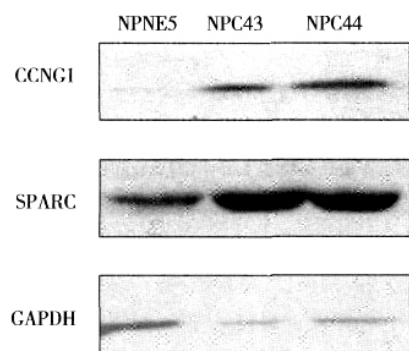


图 5 Western blot 检测 CCNG1 和 SPARC 在鼻咽原代细胞的表达

Fig.5 Western blot of CCNG1 and SPARC in NPNE5, NPC43, and NPC44

miR203 可能调控一系列基因表达包括 CCNG1 和 SPARC 基因。

3 讨论

近年来, miRNAs 作为生物体重要的基因调控分子, 与疾病的关系尤其是与肿瘤的关系备受关注。随着 miRNA 芯片技术的发展, 现已明确在多种肿瘤中存在 miRNAs 的异常表达或缺失, 推断 miRNAs 很可能是一类新的癌基因或抑癌基因。有研究者运用 miRNAs 芯片对慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 的研究发现 2 个 miRNAs 的基因, 即 mir- 15a 和 mir- 16, 位于 13q14 染色体缺失区域, 50% ~60% 的 CLL 的患者存在 mir- 16 和/或 mir- 15a 的表达下调^[4], miR- 143 和 miR- 145 在结肠癌中表达下调^[5], Let- 7 在肺癌细胞中表达下调, 在 A549 肺腺癌细胞中转染并表达 Let- 7, 导致肿瘤细胞生长抑制^[14], 这些均提示 miRNAs 已经成为研究肿瘤发生发展机制的一个新领域。

目前 miRNAs 在鼻咽癌中的研究尚未见报道, 我们以 miRNAs 芯片为平台初步研究了鼻咽癌 miRNAs 表达谱, 发现在原代培养的鼻咽癌细胞与正常鼻咽上皮细胞之间存在 24 个差异表达 miRNAs, 其中 18 个 miRNA 在鼻咽癌中表达下调, 6 个 miRNA 在鼻咽癌表达上调。在鼻咽癌表达下调 2 倍以上的有: miR- 203, miR- 503, miR- 424, miR- 141 和 miR- 148a 共 5 个; 在鼻咽癌表达上调 2 倍以上的有: miR- 25, miR- 195 和 miR- 15a 共 3

个。Irio 等^[15]用基因芯片研究了乳腺癌的 miRNA, 共发现了 29 个明显的差异表达的 miRNA, 其中 miR- 10b, miR125b, miR- 145 是下调的, 而 miR- 21, miR- 155 是上调的, 推测他们可能分别做为肿瘤的抑癌基因和原癌基因。

结合生物信息学的方法, 使 miRNA 功能的研究更简单, 而且有可能开辟一条新的研究路线, 逐一找到 miRNA 的靶基因并揭示他们的功能。研究人员设计了多种计算机软件, 对 miRNA 靶基因预测具有较高的准确性, 应用 Pictar, tangetscan, miRanda, mirBase 等 miRNA 预测软件, 对前面实验得出的鼻咽癌细胞下调表达的 miR- 203 的靶基因进行检索和研究。我们选取至少在三个软件中出现的基因作为 miR- 203 的靶基因, 发现其靶点非常广泛, 涉及到癌基因, 细胞周期调控, 细胞分化, 转录调控, 信号转导通路基因等 46 个潜在可能的靶基因。结合本组鼻咽癌细胞人类全基因表达谱结果(未发表资料), 其中有 5 个基因为上调表达, 它们是: SPARC, CCNG1, ID2, INSIG1 和 CITED2, 有 3 个基因表现为下调表达, 其余基因无明显变化或者无数据。在表达上调的 5 个靶基因中, 我们挑选 SPARC 和 CCNG1 来进行蛋白水平的验证, 结果表明相对于正常鼻咽上皮细胞, SPARC 和 CCNG1 在鼻咽癌细胞中是高表达的, 由此我们认为 SPARC 和 CCNG1 可能是 miR- 203 的靶基因之一。较早期时研究者认为 miRNA 是与靶 mRNA 形成不完全互补双链来阻遏翻译。然而 Wu 等^[3]的研究则表明其调节基因表达机制不尽如此。他们认为 miRNA 除了阻遏翻译外, 还可引起 mRNA 快速脱腺苷酸化而被降解以抑制基因表达。这种对 miRNA 的研究在理论上丰富了我们对于 miRNA 基因调控的认识。Cyclin G1 参与 DNA 损伤后检查点调控、DNA 修复和凋亡, 细胞增生, 并且在很多细胞增生活跃的组织/病变中都可以看到 Cyclin G1 的过度表达。Cyclin G1 可以和 GAK, CDK5, pRb 相互作用参与多种凋亡通路。分泌性富含半胱氨酸的酸性蛋白 (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC) 又称作骨连接蛋白 (osteonectin), 编码基因位于染色体 5q31- 33。SPARC 作为一种调节细胞外基质的糖蛋白, 又是抗粘附蛋白, 与某些基质成份、生长因子和细胞因子作用, 参与组织重建、形态生成、细胞迁移和增殖, 调节机体的生理和病理过程。近来发现 SPARC

在多种肿瘤中表达异常, 尤其是有证据表明 SPARC 异常表达与肿瘤的侵袭和转移关系密切, 抑制肿瘤细胞 SPARC 的表达, 不但可以减少体外黑色素瘤肿瘤细胞的侵袭和粘附能力, 而且还可完全遏制其致瘤能力。近年来, SPARC 在肿瘤内皮的表达被确定, 被论证为与 MMP-2 和肿瘤生长因子- 相似的调节血管生成的相关基因。

综上所述, 本研究首次以 miRNAs 芯片技术, 对鼻咽癌 miRNAs 表达谱进行研究, 发现鼻咽癌细胞存在一系列上调和下调的 miRNAs; 定量 RT-PCR 验证结果表明该 miRNA 芯片技术可靠。专业靶点预测软件预测鼻咽癌下调表达 miR-203 的靶基因, 发现其靶点非常广泛, 涉及到癌基因, 细胞分化, 转录调控, 信号转导通路等。将 miRNA 芯片, 靶点预测结果以及基因表达谱芯片结果综合分析, 推断 SPARC 和 CCNG1 可能是 miR-203 的靶基因, 为进一步研究 miR-203 在鼻咽癌发生发展过程中的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] CAI X, SCHAFFER A, LU S, et al. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed [J]. *Plos Pathog*, 2006, 2(3): e23.
- [2] DAVID P B. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] WU L G, FAN J H, BELASCO J G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(11): 4034-4039.
- [4] CALIN G A, DUMITRU C D, SHIMIZU M, et al. Frequent deletions and down regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [5] MICHAEL M Z. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(12): 882-891.
- [6] JOHNSON S M, GROSSHANS H, SHINGARA J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family [J]. *Cell*, 2005, 120(5): 635-647.
- [7] CALIN G A, SEVIGNANIC, DUMITRU C D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [8] 宗永生, 吴秋良, 林素暇, 等. EB 病毒相关性疾病病理学研究的进展 [J]. *中山大学学报: 医学科学报*, 2005, 26(5): 481-487.
- [9] KREK A. Combinatorial microRNA target predictions [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(5): 495-500.
- [10] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [11] HUMPHREYS D T, WESTMAN B J, MARTIN D I, et al. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly (A) tail function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (2005): 16961-16966.
- [12] GRIFFITHS - JONES S, GROCOCK R J, VAN DONGENS, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue): D140-144.
- [13] CHEN C, RIDZON D A, BROOMER A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [14] TAKAMIZAWA J, KONISHIH, YANAGISAWA K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [15] IORIO M V, FERRACIN M, LIU C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065-7070.

(编辑 徐杰)