

中国地鼠口腔颊黏膜癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析

李莉红, 庞文彪, 常凯, 阎小艳, 高继萍, 宋国华*

(山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 目的 构建中国地鼠口腔颊黏膜癌(OSCC)中差异表达的 miRNA 和 mRNA 表达谱, 初步预测与 OSCC 发生发展相关的 miRNA 和 mRNA。方法 运用新一代高通量测序技术构建 miRNA 和 mRNA 表达谱, 通过 Gene Ontology 功能富集和 KEGG Pathway 分析预测与 OSCC 发生发展相关的 miRNA 和 mRNA。结果 成功构建中国地鼠口腔颊黏膜癌中差异表达的 miRNA 和 mRNA 表达谱, 共发现 11 个已知 miRNA、3 个新 miRNA 显著性差异表达和 194 个 mRNA 差异表达, 且一个 miRNA 可调控多个 mRNA, 多个 miRNA 靶向调控某个 mRNA。结论 本实验 OSCC 中差异表达的 miRNA 通过调控 mRNA 形成复杂的调控网络, 在口腔癌的发生发展中发挥重要作用, 为口腔癌的发生、发病机制, 及临床治疗及预后判断提供理论依据。

【关键词】 口腔鳞状细胞癌; miRNA; mRNA; 高通量测序

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 02-0158-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.02.004

Association of expression profiles of miRNA and mRNA in Chinese hamster buccal pouch squamous cell carcinoma

LI Lihong, PANG Wenbiao, CHANG Kai, YAN Xiaoyan, GAO Jiping, SONG Guohua*

(Shanxi Medical University, Laboratory Animal Center, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

Corresponding author: SONG Guohua. E-mail: ghsongg@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish the expression profiles of differentially expressed miRNA and mRNA in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and to investigate the roles of miRNA and mRNA associated with the occurrence and development of OSCC. **Methods** The expression profiles of miRNA and mRNA were constructed using a new generation of high-throughput sequencing techniques. The miRNA and mRNA associated with the occurrence and development of OSCC were predicted by Gene Ontology enrichment analysis and KEGG pathway analysis. **Results** We successfully constructed the differentially expressed miRNA and mRNA profiles of Chinese hamster buccal pouch squamous cell carcinoma. 11 known and 3 novel significantly differentially expressed miRNAs and 194 differentially expressed mRNAs were found. A miRNA can regulate multiple mRNAs, and multiple miRNAs can control one mRNA. **Conclusions** Differential expression of miRNA play a an important role in the carcinogenesis and development of OSCC through regulating mRNA and forming a complex regulatory network. It provides theoretical data for the occurrence, pathogenesis, clinical treatment and prognosis of OSCC.

【Key words】 oral squamous cell carcinoma; OSCC; miRNA; mRNA; high-throughput sequencing

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

【基金项目】 国家自然科学基金(No. 31772551), 山西省自然科学基金(No. 201701D121087), 山西省研究生教育创新项目(No. 2017SY037)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(No. 31772551), Natural Science Foundation of Shanxi Province(No. 201701D121087) and Postgraduate Education Innovation Project of Shanxi Province(No. 2017SY037).

【作者简介】 李莉红(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: 1179407927@qq.com

【通信作者】 宋国华(1973—), 女, 教授, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ghsongg@hotmail.com

口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 已经成为众多癌症中最常见的一种头颈部恶性肿瘤,其发病率呈现逐年上升的趋势,并且趋于年轻化^[1]。研究发现,OSCC 的发生发展是一个多层面调控过程,包括从 DNA 水平、转录水平、转录后水平及蛋白表达水平都参与病变过程^[2]。miRNA 不仅与肿瘤发生、发展、诊断、治疗及预后密切相关,而且与许多细胞信号转导系统共同构成复杂的调控网络,发挥多种生物学作用,成为近年来肿瘤研究领域的热点。miRNA 与靶 mRNA 完全或不完全结合在转录后水平上通过调控基因的表达、细胞增殖凋亡、上皮间质转化等过程参与口腔癌的发生发展^[3-5]。因此,为进一步了解 OSCC 发生和发展相关 miRNA 参与的生物学过程,为疾病的分级、早期诊断及治疗提供重要的信息,本文将采用新一代高通量测序技术,构建中国地鼠口腔颊黏膜癌中 miRNA 和 mRNA 表达谱,筛选差异表达的 miRNA 和 mRNA 并进行二者关联分析,探讨 miRNA 在 OSCC 发生发展中的靶向调控作用,为寻找新的更好的肿瘤标志物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

60 只 8 ~ 10 周龄清洁级中国地鼠,雄性,体重 25 ~ 35 g,由山西医科大学实验动物中心提供【SCXK(晋)2015 - 0001】,饲养于屏障环境【SYXK(晋)2015 - 0001】。随机分为三组,分别为空白对照组(24 只)、溶剂对照组(12 只)、模型组(24 只)。隔天上午用小头棉签在模型组中国地鼠双侧颊囊涂擦 0.5% DMBA 丙酮液,并禁食禁水 2 h。分别在第 6、9、12、15 周进行处死取颊囊组织,一部分低温保存,一部分进行病理学检测。病理学结果详见文献^[6]。本实验应用中国地鼠期间按照山西医科大学实验动物管理委员会的要求进行实验操作,并通过伦理审核。本实验选取 15 周鉴定为鳞癌的 3 个冻存组织和 3 个正常组织作为本实验的研究材料。

1.2 方法

1.2.1 构建差异 miRNA 表达谱

分别从所取得样本中提取总 RNA,经质检合格后,对总 RNA 片段化处理,分离胶技术回收 18 ~ 35nt 的 RNA 片段,加接头逆转录成 cDNA,得到组织样本的测序文库。采用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台^[7]对组织样本的 miRNA 进行测序,得到原始数据之后进行去接头、去低质量以及片段化选

择等处理,获得目标序列。根据 miRBase 数据库 (Release 21) 中的基因注释信息,与已知 miRNA 进行比对^[8],采用 miRDeep2 软件预测新 miRNA^[9],构建 OSCC 组织和正常组织的 miRNA 表达谱。分别将两组织的 miRNA 的表达量归一化,计算出 RPM 值(每百万条测序序列中出现的目标序列的数量),比较分析两组织中显著差异表达的 miRNA [筛选条件: $\text{padj} < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ (Fold Change 表示鳞癌组和正常组表达量的倍数变化)]。

1.2.2 构建差异 mRNA 表达谱

总 RNA 质检合格后用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集 mRNA,加入 fragmentation buffer 片段化,用六碱基随机引物合成 cDNA 第一链,加入缓冲液、dNTPs、RNaseH 和 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 第二链,用 QIAquick PCR 试剂盒纯化后加 EB 缓冲液、双联 cDNA 末端修复、加碱基 A、加测序接头、2% 琼脂糖凝胶电泳回收、PCR 扩增,得到组织样品测序文库。采用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台提供的 PE100 测序策略对组织样本的 mRNA 进行测序。同 miRNA 一样得到 Clean Reads 后采用 TopHat 软件 (v2.0.12)^[10] 和 Bowtie2 软件^[11] 与 UCSC (University of California Santa Cruz) 基因组数据库中的 *Cricetulus griseus* 参考基因组比对分析,构建 mRNA 表达谱。分别将两组织的 mRNA 的表达量归一化,计算出 RPKM 值^[12],采用 DEGseq^[13] 进行基因差异表达分析 [筛选条件: $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$]。

1.2.3 OSCC 和正常组织中差异表达 miRNA/mRNA 对接

应用 Gene Ontology 功能富集和 KEGG Pathway 分析,将 1.2 和 1.3 的结果关联分析,预测与 OSCC 发生发展相关性较高的 miRNA 和 mRNA。

2 结果

2.1 OSCC 和正常组织中差异 miRNA 表达谱

2.1.1 已知 miRNA 表达谱

对照 OSCC 和正常组织中已知的 miRNA,共有 268 个 miRNA 差异表达,其中 137 个表达上调,131 个表达下调,结果见图 1 所示。进一步对差异 miRNA 进行深度分析,显著差异的 miRNA 共有 11 个,其中上调的 miRNA 有 8 个,下调的有 3 个,具体结果见表 1。

2.1.2 新的 miRNA 表达谱

经过分析统计共发现了 208 个新 miRNA, 其中有 112 个表达上调, 96 个表达下调, 结果见图 2。进一步深度分析, 得到显著差异的 miRNA 共有 3 个, 其中上调的 miRNA 有 1 个, 下调的有 2 个。与正常

组相比, 上调的 miRNA 有 Novel-118, padj (padj 为校正之后的 P 值) 为 9.63E-06; 下调的有 Novel-117 和 Novel-135, padj 值均为 0.0412。

表 1 口腔颊黏膜鳞癌组织和正常组织中显著差异表达的已知 miRNA

Tab.1 Significant differentially expressed known miRNA between OSCC and normal groups

miRNA	log2 Fold Changes	padj	调节 Regulation
cgr-miR-542-3p	3.229618787	0.00348059	up
cgr-miR-130b-3p	2.521399018	0.025768873	up
cgr-miR-142-5p	2.457994122	0.0109149	up
cgr-miR-34c-3p	2.612689648	0.029082558	up
cgr-miR-34c-5p	3.438803593	1.19E-05	up
cgr-miR-34b-5p	2.942335253	0.046276965	up
cgr-miR-21-3p	4.084835341	8.06E-06	up
cgr-miR-21-5p	3.703010001	3.64E-06	up
cgr-miR-504	-2.694649742	0.015868948	down
cgr-miR-499-5p	-3.396778713	0.000709348	down
cgr-miR-486-3p	-2.819232823	0.010386505	down

注: padj 为校正之后的 P 值; Fold Change 表示鳞癌组和正常组表达量的倍数变化。

Note. Padj is the corrected P value. Fold change indicates the multiple changes in the expression of OSCC and normal group.

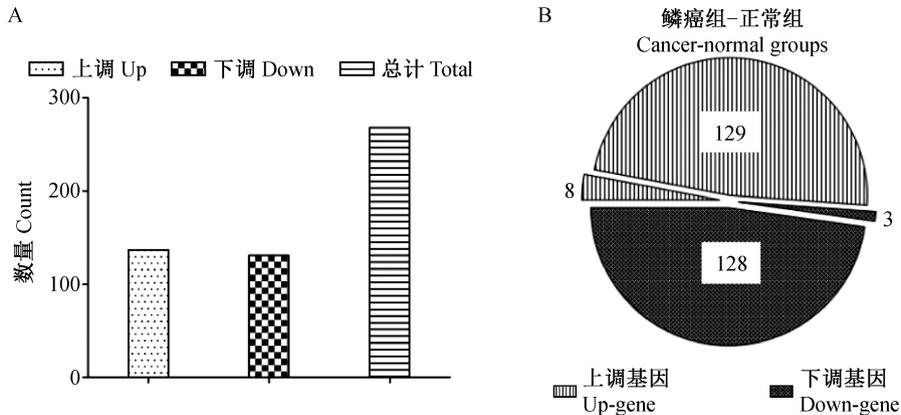


图 1 口腔颊黏膜鳞癌组织和正常组织的差异表达 miRNA 柱状图和饼状图

Fig.1 Histogram (A) and pie chart (B) of differentially expressed known miRNA between OSCC and normal groups

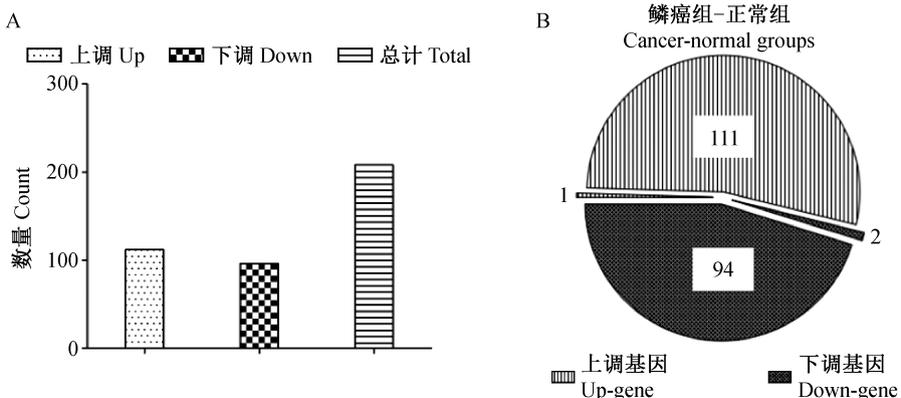


图 2 口腔颊囊黏膜鳞癌组织和正常组织的新 miRNA 差异表达柱状图和饼状图

Fig.2 Histogram (A) and pie chart (B) of differentially expressed novel miRNA between the OSCC and normal groups

2.2 OSCC 和正常组织中差异 mRNA 表达谱

对照 OSCC 和正常组织中的 mRNA 进行分析, 筛选后共检测出 194 个基因表达差异, 其中 128 个

基因表达上调, 66 个基因表达下调, 结果见图 3。口腔颊囊黏膜鳞癌组织和正常颊囊黏膜组织中差异表达前 30 位的基因见表 2。

表 2 口腔颊囊黏膜鳞癌组织和正常组织中前 30 位差异表达基因

Tab.2 Differentially expressed genes in the top 30 between OSCC and normal groups

基因 Genes	Log2 ratio	Corrected P-value *	基因 Genes	Log2 ratios	Corrected P-value *
CXCL2	26.69	5.54E-15	CCL7	5.88	2.13E-05
MMP13	11.69	1.18E-14	IL1B	11.53	2.13E-05
CCL3	26.24	4.13E-14	PTX3	7.31	2.38E-05
LCN1	25.19	1.27E-10	CAIV	5.85	2.38E-05
MMP9	7.42	4.35E-09	CXCL7	22.94	4.54E-05
CXCL3	6.52	1.42E-07	OLR1	22.97	4.61E-05
STRA6	7.15	1.68E-07	RN45s	-8.19	5.53E-05
LOC100754872	23.63	6.98E-07	THBS1	4.72	6.72E-05
Serpine1	6.05	8.31E-07	IL-36γ	6.67	9.12E-05
TNN	8.20	1.23E-06	CXCL1	5.77	0.0001
CTHRC1	8.46	1.35E-06	LOC100766767	-7.59	0.0001
GPx6	-24.40	4.67E-06	MS4A7	5.99	0.0001
CTRP6	5.52	6.88E-06	SFRP2	5.02	0.0001
LOC100764819	-8.33	1.40E-05	POSTN	4.81	0.000115
SLN	-6.62	1.49E-05	MMP12	5.23	0.000121

注: Corrected P-value * 为校正之后的 P 值; Ratio 为 Fold Change; Fold Change 表示鳞癌组和正常组表达量的倍数变化。

Note. Corrected P-value * is the corrected P value; Ratio is Fold Change; Fold Change indicates the multiple changes in the expression of OSCC and normal groups.

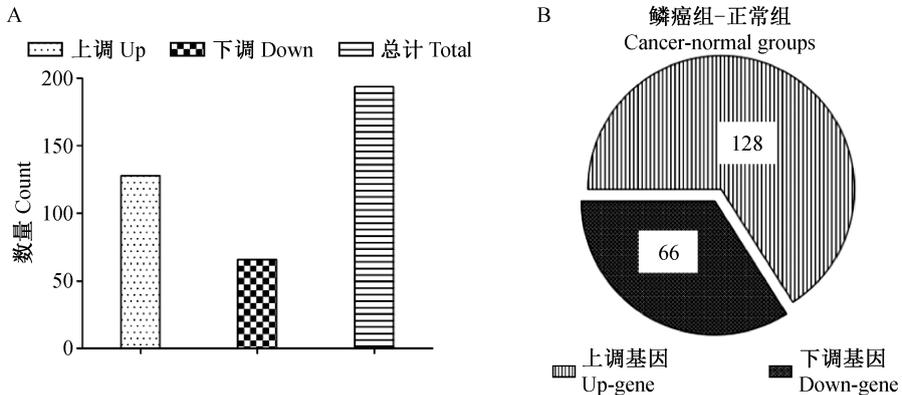


图 3 口腔颊囊黏膜鳞癌组织和正常组织的差异表达基因柱状图和饼状图

Fig.3 Histogram (A) and pie chart (B) of differentially expressed genes between OSCC and normal groups

2.3 OSCC 组织中差异表达 miRNA/mRNA 的对接研究

大量的研究证实, miRNA 通过转录后调节 mRNA 降解或抑制其翻译。据此, miRNA 的表达水平应与其靶 mRNA 的表达水平相反, 利用这一调节机制我们将转录组差异基因库和 miRNA 测序获得的差异的靶基因库做交集, 找出两库重合基因, 然后根据上调 miRNA 得到下调差异靶基因, 下调 miRNA 得到上调差异靶基因。关联分析结果表明, 中国地鼠口腔颊囊黏膜鳞癌组织与正常组织中显著差异表达的 11 个 miRNA 中有 8 个关联到差异靶基因, 其中有 5 个 miRNA 上调 (cgr-miR-21-3p, cgr-miR-34b-5p, cgr-miR-542-3p, cgr-miR-130-3p, cgr-miR-34c-5p), 3 个 miRNA 下调 (cgr-miR-499-5p, cgr-miR-486-3p, cgr-miR-504)。

但是, 由于 miRNA 与 mRNA 靶向调控关系是

一对多, 多对一的关系, 即单个 miRNA 可以靶向调控多个基因, 多个 miRNA 靶向调控某个基因, 因此, 并不是上调的每个 miRNA 所靶向的每个基因都是呈现低表达, 下调的每个 miRNA 所靶向的每个基因都是呈现高表达。最终, 我们得到靶向调控的 5 个基因下调 (Ttn, Ryr1, Tgm7, Pfkf, LOC100766767), 靶向参与上调的基因有 14 个 (Slc1a1, Islr2, Hoxa1, Thbs1, Inhbb, Palm, Gpr176, Fkbp10, Fam71f2, C1qtnf6, Krt19, LOC100767496, LOC100765213, LOC100762478) (如图 4 所示)。因新预测出的显著差异的 miRNA 在与基因进行关联分析时未发现靶基因, 故后续不再研究。

进一步根据显著差异表达的 miRNA 和基因表达的相关性构建 miRNA-基因作用网络 (如图 5 所示)。椭圆形表示基因, 菱形表示 miRNA, 相互作用用直线表示。

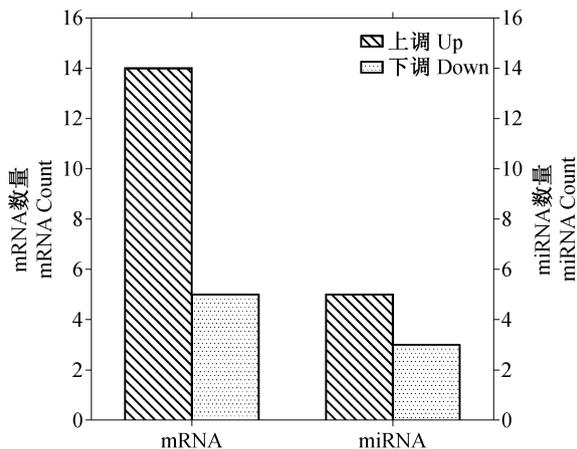


图 4 显著差异表达的已知 miRNA 及其差异表达靶基因统计

Fig. 4 Summary of significantly differentially expressed miRNA and its differentially expressed target genes

3 讨论

OSCC 是一种严重威胁生命的恶性肿瘤。由于广泛危险因素的联系,以及不可预测的治疗结果使 OSCC 成为最复杂的癌症之一。目前尽管已有许多治疗方式,但是在过去的 40 年里,OSCC 患者的 5 年生存率并没有超过 50%^[14-15]。大量的证据表明,miRNA 不仅可以作为癌症的诊断和预后标记,而且还能提供靶向治疗的靶点^[16]。其在转录后水平上使靶 mRNA 降解,也可以与靶 mRNA 不完全互补在

蛋白质翻译水平上抑制其表达^[17]。新一代高通量测序技术是近十年来逐步从新技术成长为主流的测序技术,以其简单、快速、高分辨率和高通量的特点,在肿瘤研究领域得到广泛应用^[18],但是在口腔癌的研究中应用鲜少。本研究首次在中国地鼠中成功构建口腔颊黏膜癌 miRNA 和 mRNA 的表达谱,对研究口腔颊黏膜癌机制具有参考意义。

大量研究表明,miRNA 通过靶向 mRNA 参与肿瘤的发生发展,在许多肿瘤中 miR-21^[19], miR-130^[20], miR-142^[21] 表达上调,而 miR-486^[22] 表达下调。我们此次 miRNA 测序结果显示, cgr-miR-21-3p、cgr-miR-21-5p、cgr-miR-130b-3p、cgr-miR-142-5p 表达量升高, cgr-miR-486-3p 降低,与口腔黏膜正常组织比较具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这充分显示与 OSCC 相关的 miRNA 的表达水平与已有研究一致,证实了测序结果可信。在转录组测序中,我们得到了 194 差异表达的基因。从前 30 位差异表达的基因看出,这些基因主要是促炎与抗炎因子、促瘤与抑瘤因子,其中基质金属蛋白酶 (MMPs) 家族中的 MMP9、MMP13 在多项口腔鳞癌研究中已经证实显著高表达^[23-24];趋化因子 CXCL2、CXCL3 由 Peng^[25] 在大鼠口腔鳞癌微阵列芯片分析中检测出显著高表达。这些研究表明:与口腔癌相关的差异表达基因的表达水平与本实验一致,在 OSCC 的发生、侵袭、转移等方面发挥重要作用。

从联合分析的结果来看,一个 miRNA 可调控多

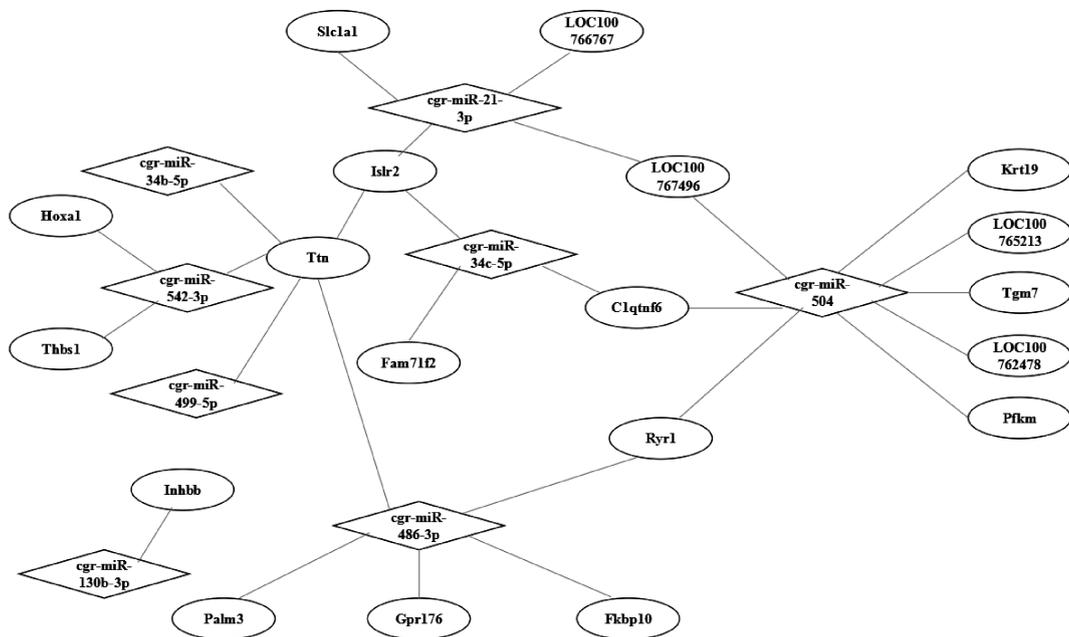


图 5 显著差异表达 miRNA 与差异表达靶基因的通路图

Fig. 5 Pathway map between significantly differentially expressed miRNA and differentially expressed target genes

个靶基因,如:cgr-miR-21-3p、cgr-miR-542-3p、cgr-miR-34c-5p、cgr-miR-486-3p、cgr-miR-504。同样,一个基因被多个 miRNA 调控,如:Ttn、C1qtnf6、Ryr 1。据报道,功能失调的 miR-21-3p 在卵巢癌细胞中通过靶向基因 RBPMS、RCBTB1、ZNF608 和 NAV3 促进癌细胞增殖和侵袭^[26-27]。miR-542-3p 在结肠直肠癌中靶向基因 OTUB1、CTTN 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移^[28-29]。Gandla 等^[30]研究恶性癌症疼痛时,深入的生物信息学分析显示,在 miR-34c-5p 的高度靶向的目标基因中,有 Cav2.3、12 P2rx6、Oprd1 和 Oprm1。至于 miR-486-3p,目前没有直接的研究指明其在口腔鳞状细胞癌的发生发展中发挥的作用以及如何调控 OSCC 机制,但是有肺癌中 miR-486-5p 通过下调促癌基因 Arhgap5 和胰岛素生长因子信号转导的肿瘤抑制基因被确定为肿瘤抑制基因,其表达在血浆样品中也得到验证^[31-33]。MiR-504 通过直接结合肿瘤抑制基因 TP53 的 3'-UTR 和靶基因 FOXP1 影响细胞凋亡、细胞周期和细胞的生长^[34-35]。以上研究虽未在口腔癌中充分证实,但也暗示出一个 miRNA 可以调控多个基因,与我们的实验结果一致。

Pfahler 等^[36]研究发现 TTN 作为存在于黑色素瘤相关性视网膜病患者的血清抗体中的抗原,是黑色素瘤潜在的生物标记,可能具有致癌作用。C1qtnf6 是重组人补体肿瘤坏死因子相关蛋白 6,在卵巢癌患者血清和卵巢癌细胞系中表达显著下调,C1qtnf6 可抑制 IL-8/VEGF 通路从而抑制卵巢癌细胞的增殖和转移^[37]。兰尼碱受体 1 (ryanodine receptors 1, Ryr 1)是一种同种四聚体钙离子通道蛋白,有学者采用基因沉默技术,使肺癌细胞中的 Ryr1 基因表达下调,证实 Ryr1 基因沉默可使细胞增殖能力下降,使细胞凋亡率显著增高,进而证实 Ryr1 基因沉默可使肺癌细胞生物学活性减低,使肿瘤的生长受到抑制^[38]。虽然目前还没有基因 Ttn、C1qtnf6、Ryr1 被多个 miRNA 调控的报道,但是已有许多生物测序实验如:廖江铨等^[39]在冠心病血瘀证相关 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络研究时得到,基因 CTSS 可以被 hsa-miR-106a-5p、hsa-miR-106b-5p 和 hsa-miR-20b-5p 调节,而 RTKN2 可被 hsa-miR-3158-3p 和 novel-m9052-5p 调控,暗示我们的 miRNA-mRNA 调控网络分析选出的基因 Ttn、C1qtnf6、Ryr1 被多个 miRNA 调控的结果是可信的。

本实验通过对 OSCC 和正常组织中 miRNA 和 mRNA 表达谱的建立以及二者联合分析,使我们更加深入的了解到:一个 miRNA 可调控多个 mRNA,同时一个 mRNA 可由多个 miRNA 调控,它们相互

作用形成复杂的调控网络,在口腔癌的发生发展中发挥重要作用,为口腔癌的发生、发病机制,及临床治疗及预后判断提供理论依据,同时也为我们筛选口腔癌标志物提供了理论依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] 徐佳琪,杨丽丽,马超,等. IL-17、COX-2 在口腔扁平苔藓和口腔鳞癌中的表达分析[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(5): 480-482.
Xu JY, Yang LL, Ma C, et al. Analysis of expression of COX-2 and IL-17 in the oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma [J]. Pract J Cancer, 2013, 28(5): 480-482.
- [2] Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma [J]. Mol Pathol, 2000, 53(4): 165-172.
- [3] Li J, Huang H, Sun L, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(12): 3998-4008.
- [4] Chang CJ, Hsu CC, Chang CH, et al. Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer [J]. Oncol Rep, 2011, 26(4): 1003-1010.
- [5] Long XB, Sun GB, Hu S, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer [J]. Oncol Rep, 2009, 22(5): 1189-1195.
- [6] 皇甫冰,庞文彪,宋国华,等. 中国小鼠口腔颊黏膜癌模型的建立及癌变的动态观察[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(1): 56-65.
Huangfu B, Pang WB, Song GH, et al. Development of oral buccal pouch mucosa cancer in Chinese hamsters and dynamic observation of their carcinogenesis [J]. Carcinog Teratog Mutag, 2016, 28(1): 56-65.
- [7] Markus Hafner, Pablo Landgraf, Janos Ludwig, et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing [J]. Methods, 2008, 44(1): 3-12.
- [8] Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features [J]. Bioinformatics. 2010, 26(6): 841-842.
- [9] Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, et al. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(1): 37-52.
- [10] Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq [J]. Bioinformatics, 2009, 25(9): 1105-1111.
- [11] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome [J]. Genome Biol, 2009, 10(3): R25.
- [12] Wagner GP, Kin K, Lynch VJ. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples [J]. Theory Biosci, 2012, 131(4): 281-285.
- [13] Wang L, Feng Z, Wang X, et al. DESeq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 136-138.
- [14] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence

- and mortality worldwide; sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-86.
- [15] Lippman SM, Hong WK. Molecular markers of the risk of oral cancer [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(17): 1323-1326.
- [16] Vandenberg Li TG, Li Y, Philip PA, et al. MicroRNA and cancer; tiny molecules with major implications [J]. *Curr Genomics*, 2008, 9(2): 97-109.
- [17] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 858-862.
- [18] 肖岚. 新一代测序技术及其在肿瘤研究中的应用 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(4): 322-326.
Xiao L. Next generation sequencing technology and its application in cancer research [J]. *Int J Pathol Clin Med*, 2013, 33(4): 322-326.
- [19] Li SJ, Zhou J, Zhang L, et al. The effect of miR-21 on SWO22 glioma cells and its biological mechanism [J]. *J BUON*, 2017, 22(2): 468-473.
- [20] Jiang H, Yu WW, Wang LL, et al. miR-130a acts as a potential diagnostic biomarker and promotes gastric cancer migration, invasion and proliferation by targeting RUNX3 [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(3): 1153-1161.
- [21] Liu LQ, Liu SC, Duan QX, et al. MicroRNA-142-5p promotes cell growth and migration in renal cell carcinoma by targeting BTG3 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(5): 2394-2402.
- [22] Wang J, Tian X, Han R, et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33(9): 1181-1189.
- [23] 张琰, 钱忠义, 普萃, 等. VEGF、MMP-9、TIMP-2 在口腔颌面部鳞癌中的表达研究 [J]. *口腔医学研究*, 2012, 28(11): 1141-1148.
Zhang Y, Qian ZY, Pu P, et al. Expression and significance of VEGF, MMP-9 and TIMP-2 in OSCC [J]. *J Oral Sci Res*, 2012, 28(11): 1141-1148.
- [24] 苏颖颖, 朱恩新, 马卫东, 等. c-fos 及基质金属蛋白酶 13 在人口腔鳞状细胞癌发生中的表达及病理意义 [J]. *口腔医学研究*, 2009, 25(1): 23-25.
Su YY, Zhu EX, Ma WD, et al. Expression and pathological significance of c-fos and MMP13 in human oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Sci Res*, 2009, 25(1): 23-25.
- [25] Peng X, Li W, Johnson WD, et al. Overexpression of lipocalins and pro-inflammatory chemokines and altered methylation of PTGS2 and APC2 in oral squamous cell carcinomas induced in rats by 4-nitroquinoline-1-oxide [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116285.
- [26] Pink RC, Samuel P, Massa D, et al. The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(1): 143-151.
- [27] B úez-Vega PM, Echevarría Vargas IM, Valiyeva F, et al. Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36321-36337.
- [28] Yuan L, Yuan P, Yuan HJ, et al. miR-542-3p inhibits colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting OTUB1 [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(1): 159-172.
- [29] Long HC, Gao X, Lei CJ, et al. miR-542-3p inhibits the growth and invasion of colorectal cancer cells through targeted regulation of contactin [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 1112-1118.
- [30] Gandla J, Lomada SK, Lu J, et al. miR-34c-5p functions as pronociceptive microRNA in cancer pain by targeting Cav2.3 containing calcium channels [J]. *Pain*, 2017, 158(9): 1765-1779.
- [31] Wang J, Tian X, Han R, et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33: 1181-1189.
- [32] Peng Y, Dai Y, Hitchcock C, et al. Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, an underexpressed microRNA in lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(37): 15043-15048.
- [33] Mozzoni P, Banda I, Goldoni M, et al. Plasma and EBC microRNAs as early biomarkers of non-small-cell lung cancer [J]. *Biomarkers*, 2013, 18(8): 679-686.
- [34] Hu W, Chan CS, Wu R, et al. Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504 [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 689-699.
- [35] Kikkawa N, Kinoshita T, Nohata N, et al. MicroRNA-504 inhibits cancer cell proliferation via targeting CDK6 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2014; 44(6): 2085-2092.
- [36] Pfohler C, Preuss KD, Tilgen W, et al. Mitofilin and titin as target antigens in melanoma-associated retinopathy [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(4): 788-795.
- [37] 王林, 刘子冬, 段利利, 等. C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 6 (CTRP6) 抑制卵巢巢癌细胞的增殖和迁移 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(12): 1664-1668.
Wang L, Liu ZD, Duan LL, et al. C1q tumor necrosis factor-related protein 6 (CTRP6) inhibits the proliferation and migration of ovarian cancer cells [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2015, 31(12): 1664-1668.
- [38] 薄龙, 潘泓, 赵冰冰, 等. Ryr1 基因沉默对入肺癌细胞生物学活性的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2013, 30(6): 856-859.
Bo L, Pan H, Zhao BB, et al. Effect of Ryr1 gene silencing on biological activity of human lung cancer cells [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2013, 30(6): 856-859.
- [39] 廖江铨, 王阶. 冠心病血瘀证相关 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络研究 [D]. 北京中医药大学, 2017.
Liao JQ, Wang J. Study on related lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network in CHD Blood Stasis syndrome [D]. Beijing University of Chinese Medicine, 2017.