

中华绒螯蟹与长江华溪蟹胚胎发育相关 miRNA 识别与比较分析

孙 宾, 刘莹莹, 李 鹏, 严 洁, 周开亚

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室与江苏省水生甲壳动物病害重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 利用 Illumina/Solexa 高通量测序技术, 开展了中华绒螯蟹和长江华溪蟹胚胎的小 RNA 深度测序. 对测序结果进行生物信息学分析, 分别筛选获得中华绒螯蟹的 8 569 743 条和长江华溪蟹的 8 719 465 条干净序列 (Clean Unique Reads), 长度分布在 20 nt~22 nt 区间内的分别占有 30.47% (Ejs-OB: 中华绒螯蟹胚胎测序文库) 和 30.38% (SY-OJC: 长江华溪蟹胚胎测序文库). 用 SOAP 程序将小 RNA 定位到基因组, 结果 Ejs-OB 中分析筛选出 5 745 279 个小 RNA, 其中 13 472 种小 RNA 与基因组的序列匹配; SY-OJC 中分析筛选出 4 397 509 个小 RNA, 其中 18 407 种小 RNA 与基因组的序列匹配. 分类注释的结果显示, 中华绒螯蟹和长江华溪蟹分别有 6 293 445 (Ejs-OB) 和 5 596 614 (SY-OJC) 条 miRNA 候选序列, 但未预测发现新 miRNA. 在表达水平的差异分析结果中发现 miR-1183、miR-1357、miR-1591、miR-2382 的表达水平上调且差异显著. 在两文库中搜寻到一些共同 miRNA* 序列, 其中 miR-139*、miR-1419g*、miR-1798*、miR-202*、miR-2068* 和 miR-454* 也是表达变异较大. 这些结果表明, miRNA 可能在调控与中华绒螯蟹和长江华溪蟹胚胎发育相关的基因表达中起重要作用.

[关键词] 中华绒螯蟹, 长江华溪蟹, 小 RNA, miRNA

[中图分类号] Q951+4 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2017)02-0065-07

Characterization and Comparative Analysis of MicroRNAs During Embryonic Development Between the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) and the Freshwater Crab (*Sinopotamon yangtsekiense*)

Sun Bin, Liu Yingying, Li Peng, Yan Jie, Zhou Kaiya

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology
and Jiangsu Key Laboratory for Aquatic Crustacean Diseases, Nanjing 210023, China)

Abstract: The deep sequencing of small RNA in *Eriocheir sinensis* and *Sinopotamon yangtsekiense* embryo samples was performed using the Illumina/Solexa high-throughput sequencing technologies. After analyzing the biological information of the sequencing results, 8 569 743 and 8 719 465 clean unique sequence data were screened in *E. sinensis* and *S. yangtsekiense* respectively, and the length distribution in the range of 20 nt–22 nt was 30.47% (Ejs-OB; *E. sinensis* embryonic sequencing library) and 30.38% respectively (SY-OJC; *S. yangtsekiense* embryonic sequencing library). Mapping the small RNA tags to genome by SOAP to analyze their distribution on the genome, 5 745 279 and 4 397 509 small RNAs of Ejs-OB and SY-OJC were screened respectively, 13 472 (Ejs-OB) and 18 407 (SY-OJC) of which were genome-matched reads. Annotated small RNA tags with different kinds of RNA, the results showed that a total of 6 293 445 and 5 596 614 miRNA candidate reads were searched in Ejs-OB and SY-OJC respectively. However, the novel miRNAs were not found. Expression profile analysis found that the expression level of miR-1183, miR-1357, miR-1591, miR-2382 were up-regulated and the difference were significant. Interestingly, some same miRNAs* sequences were also searched in the two library, and miR-139*, miR-1419g*, miR-1798*, miR-454* and miR-2068* of which were also have a significant differences in expression. These results indicated that these miRNAs may be involved in regulating gene expression associated with the development of the embryo in *E. sinensis* and *S. yangtsekiense*.

Key words: *Eriocheir sinensis*, *Sinopotamon yangtsekiense*, microRNA, miRNA

收稿日期: 2016-12-02.

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)、江苏省高校自然科学基金项目 (13KJB180008、15KJD180005).

通讯联系人: 李鹏, 博士, 副教授, 研究方向: 功能基因组学与进化、发育生物学. E-mail: biolipeng@163.com

MicroRNA(miRNA)是一类内源性的具有调控功能的短链非编码RNA分子,由一段具有发夹环结构、长度为70 nt~80 nt的单链RNA前体(pre-miRNA)剪切后生成^[1].通过碱基互补调控靶基因的表达,在细胞分化、个体发育、基因转录和转录后加工、表观遗传以及免疫调控等生命活动中发挥重要作用.根据Sanger miRBase最新版本的miRNA数据库21.0版中记载,miRNA发夹前体序列为28 717条,成熟miRNA序列为35 865条,共涵盖208个物种,但其中甲壳动物仅有蚤状溞*Daphnia pulex*和日本囊对虾*Marsupenaeus japonicus*有miRNA记录.

在真核生物中,miRNA基因约占整个基因组基因总数的2%,miRNA的主要功能是参与基因转录后调控(posttranscriptional regulation),通过与靶基因mRNA的3'非编码区(3'UTR)的结合位点(microRNA binding site)结合,引起靶mRNA的降解或者抑制其翻译,在细胞分化、组织器官形成、个体生长发育、基因转录和转录后加工、表观遗传以及免疫调控等生命活动中发挥重要作用^[2-3].目前,生物试验法和生物信息学法是研究miRNA的两种主要方法,前者主要是直接克隆法,缺点是很难发现许多物种特异的、低表达的miRNA;后者则是通过计算机预测miRNA,但高度依赖物种基因组信息,并且结果需要验证^[4-5].近年来,随着miRNA测序技术的快速发展,利用高通量测序技术结合生物信息学分析手段可以预测新的miRNA,研究miRNA的保守性,建立miRNA表达谱,比较miRNA表达丰度以及发现其他非编码RNA等.1993年Lee等最早发现lin-4能参与线虫发育的时序调控.随着研究的深入,不断发现miRNA与动物生长发育密不可分^[6].2003年Lewis等利用TargetScan方法预测与哺乳动物生长发育相关的miRNA靶基因^[7].欧江涛等于2012年利用Illumina/Solexa高通量深度测序法对中华绒螯蟹正常和感染颤抖病螺原体的血细胞进行miRNA测序和表达分析来研究宿主miRNA表达与病原体感染的关系^[8].这些研究工作与技术为我们研究中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)以及长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*)的miRNA及其在它们胚胎发育过程中的表达模式提供了充分的理论依据.在本研究中以中华绒螯蟹和长江华溪蟹为实验材料,基于高通量测序技术结合生物信息学方法分析、识别与中华绒螯蟹及长江华溪蟹胚胎发育相关的miRNA;并比较分析miRNA在中华绒螯蟹以及长江华溪蟹的胚胎发育过程中作用的差异,了解参与不同生境(咸水和淡水)蟹类胚胎发育调控的miRNA.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物材料

中华绒螯蟹胚胎样品采自江苏省海洋水产研究所吕四基地实验室的水产育苗室,于海水中生活的抱卵蟹中采集100 mg生长至28 d~32 d左右的无节幼体期胚胎.长江华溪蟹胚胎样品采自安徽省宁国市郊淡水溪流中,采集100 mg左右生长至28 d~32 d的无节幼体期胚胎.

1.1.2 主要仪器

HiSeq2000高通量测序仪(Illumina) CBOT簇生成仪(Illumina)、冷冻离心机(Scan speed)、NanoDrop(Thermo)、Qubit(Invitrogen)、电泳仪(天能)、凝胶成像系统(天能)、超声波破碎仪(Biorupter)、浓缩仪(Thermo)、常温离心机(Thermo)、漩涡混合仪vortex-genie2(SI)、摇床(智城)、磁力架(智城)、移液器(Eppendorf)、-80℃超低温冰箱(Thermo)、4℃冰箱(海尔)、普通PCR仪(Life).

1.1.3 主要试剂

氯仿(南京丁贝生物科技有限公司),RNA提取试剂盒TRIzol up(TaKaRa,大连)、TruSeq® miRNA Sample Prep Kit v2(Illumina)、TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS(Illumina)、TruSeq SBS Kit v3-HS(50-cycles)(Illumina)、AmpureBeads(Beckman)、Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit(Life).

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取及质量鉴定

各取50 mg~100 mg胚胎幼体加入1 mL TRIzol,用匀浆仪进行匀浆处理,处理之后室温放置5 min,4℃12 000 r/min离心5 min,取上清转移到新的无酶EP管中,加入0.2 mL氯仿,剧烈振荡15 s,室温放置3 min.4℃12 000 r/min离心15 min,样品分为3层,把主要含有RNA上层水相转移到新的无酶EP管中,加入0.5 mL异丙醇,低温放置30 min以上.4℃12 000 r/min离心15 min,可见RNA沉淀,移去上清,加1 mL 75%乙醇(现用现配).4℃8 000 r/min离心5 min,弃上清,并吸干多余乙醇.加入50 μL~100 μL无

RNase 的水,用枪头吸打几次使之溶解. 加入一半体积的 8 mol/L LiCl 溶液,充分混匀,冰上放置 1 h,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,可见 RNA 沉淀,移去上清,加 1 mL 75%乙醇,4 ℃ 8 000 rpm 离心 5 min,弃上清,并吸干多余乙醇. 加入 20 μ L~50 μ L 无 RNase 的水,用枪头吸打几次使之溶解.

测定浓度,取 1 μ L RNA 使用 NanoDrop 仪器(美国 Thermo 公司)进行定量分析,根据定量结果,取 500 ng RNA 用 1%琼脂糖电泳检测.

1.2.2 miRNAs 文库构建

用 Novex 15% TBE-Urea 凝胶分离长度为 14 nt~30 nt 之间的 RNA 片段. 随后,在纯化的小 RNA 上连接一个 5'端接头,紧接着用 Novex 15% TBE-Urea 凝胶纯化连接产物. 具有 5'端接头的连接产物再被连接上 3'端接头,然后具有 3'和 5'端接头的连接产物用 Novex 10% TBE-Urea 凝胶纯化. 随后,将连接产物反转录后进行 PCR 扩增,从 6% TBE-Urea 凝胶上切掉扩增产物条带. 纯化的 DNA 片段在深圳北京基因组学研究所进行聚类分析和高通量测序. 构建的中华绒螯蟹 miRNAs 文库命名为 Ejs-OB,长江华溪蟹 miRNAs 文库命名为 SY-OJC.

1.2.3 测序数据读取

测序片段从基因组分析仪产生的图像文件中提取并处理成数字化质量数据. HiSeq 测序所得 50 nt 序列,通过去除质量较低的序列、5'和 3'接头污染的序列、没有插入片段的序列、包含 polyA 的序列以及小于 18 nt 的小片段等过程得到的干净序列,之后对其进行序列长度分布的统计及样品间公共序列统计. 将清理后的干净序列进行分类注释,可以获得样品中包含的各组分及表达量信息. 将所有小 RNA 片段注释后,用剩下的未注释片段来进行新 miRNA 的预测和其前体的预测,前体的预测在北京基因组学研究所利用 MIREAP(<http://sourceforge.net/projects/mireap/>)在线软件进行.

2 结果与分析

2.1 高通量测序获取 miRNA

用 Solexa 高通量测序技术对 Ejs-OB(中华绒螯蟹)和 SY-OJC(长江华溪蟹)两个小 RNA 文库同时进行测序,分别共获得高质量的序列片段 8 861 449 和 9 242 020 条. 在去除 5'和 3'端的接头序列后,片段长度就减少了 18 nt,总共 8 569 743 和 8 719 465 条干净序列(Clean Unique Reads:去除 Adaptor,并去除低质量碱基后的数据,长度在 15 bp~32 bp 范围的 reads)被分别选取出来. 分析序列的长度分布如图 1 所示. 结果表明,大多数的序列的长度都是 20 nt~24 nt,其中 22 nt 长度的小 RNA 在的 Ejs-OB(30.47%)和 SY-OJC(30.38%)文库中都是最丰富的,这与成熟 miRNAs 的已知特征一致.

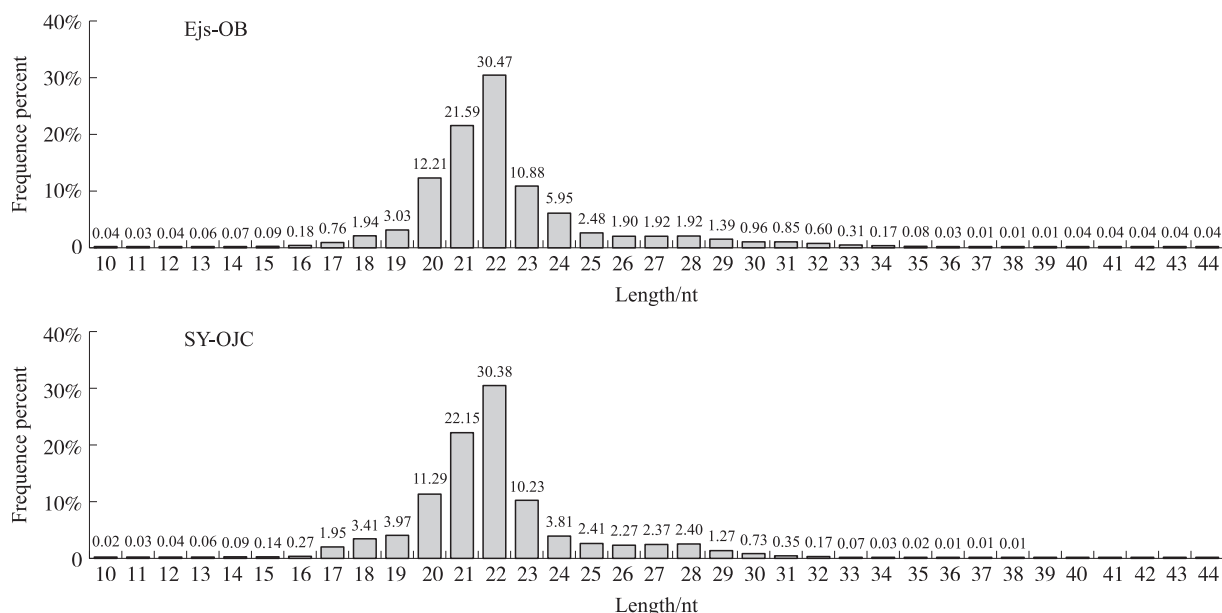


图 1 所有小 RNA 片段的分布情况

Fig. 1 The length distribution of small RNA

对比发现,Ejs-OB 和 SY-OJC 文库中公共特有的小 RNA 总数占总序列数的 79.43%,而两个样本中各自特有的小 RNA 总数分别占总数的 8.70%和 11.88%(图 2B). 然而,两个文库间公共特有的小 RNA 种数占总序列种数的 3.12%(图 2A),这显著低于总序列种数,表明两个样本中各自特有小 RNA 种数占比相对较高,分别为 48.04%和 48.84%. 总的来说,正如数据库中所示,这揭示了两个文库之间在序列长度分布上不显著的多样性和小 RNA 的高复杂程度.

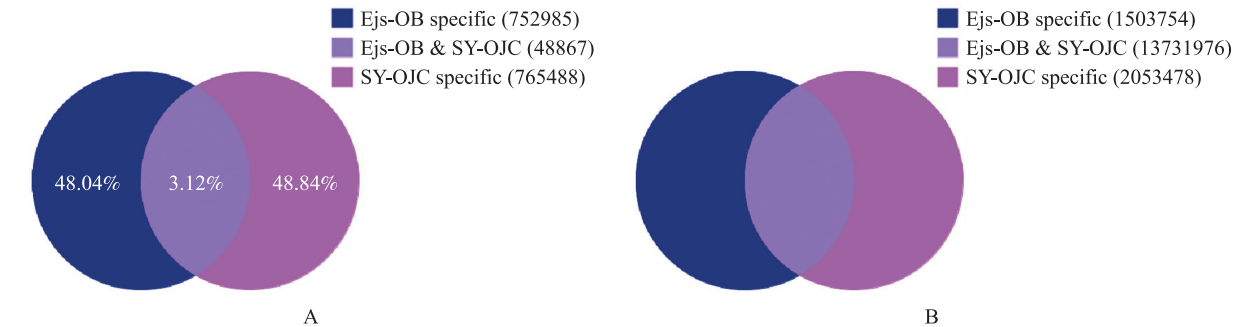


图 2 两样品间公共、特有小 RNA 的种数和总数

Fig. 2 The proportion of unique(A)/total(B) small RNA in common between samples and sample specific

2.2 小 RNA 的注释

选取的干净序列用 SOAP 程序定位到人类基因组来分析它们在基因组中的表达和分布,结果 Ejs-OB 文库中共有 5 745 279 个小 RNA 与基因组总数匹配,占 67.04%;共有 13 472 种小 RNA 比对上基因组的种数,占 1.68%. 而 SY-OJC 文库中有 4 397 509 个小 RNA 与基因组总数匹配,占 50.43%;共有 18 407 种小 RNA 比对上基因组的种数,占 2.26%.

这些基因组匹配的序列根据生物合成和注释的不同被分为不同的小 RNA 类别. 为了获取详细的数据,在 Rfam 比对中直观地显示了不同物种比对到 GenBank 和 Rfam 中各类非编码 RNA 的小 RNA 种数和总数(图 3). 在内含子外显子分析中直观地显示着两个物种比对到内含子/外显子的正义链,反义链的 sRNA 片段种数和总数(图 4). Ejs-OB 和 SY-OJC 文库都含有不同种类的小 RNA 片段. 有相当大的比例序列是来源于 rRNA、tRNA 及其他非编码 sRNA(snRNAs、snoRNAs、重复偶联小 RNAs). 丢弃这些序列后,最终在 Ejs-OB 和 SY-OJC 文库中分别筛得 6 293 445 和 5 596 614 条 miRNA 候选序列用于后续分析(图 5).

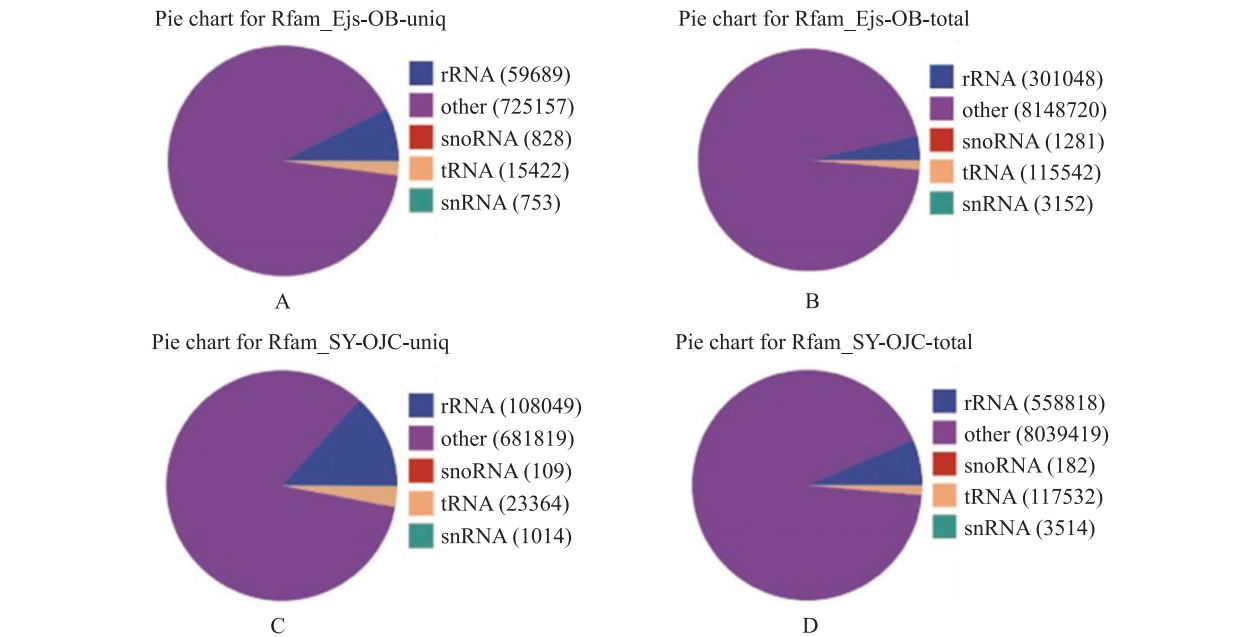


图 3 比对到 GenBank 中各类非编码 RNA 的小 RNA 的种数和总数

Fig. 3 The proportion of unique/total small RNA matched to each category of non-coding RNA in GenBank

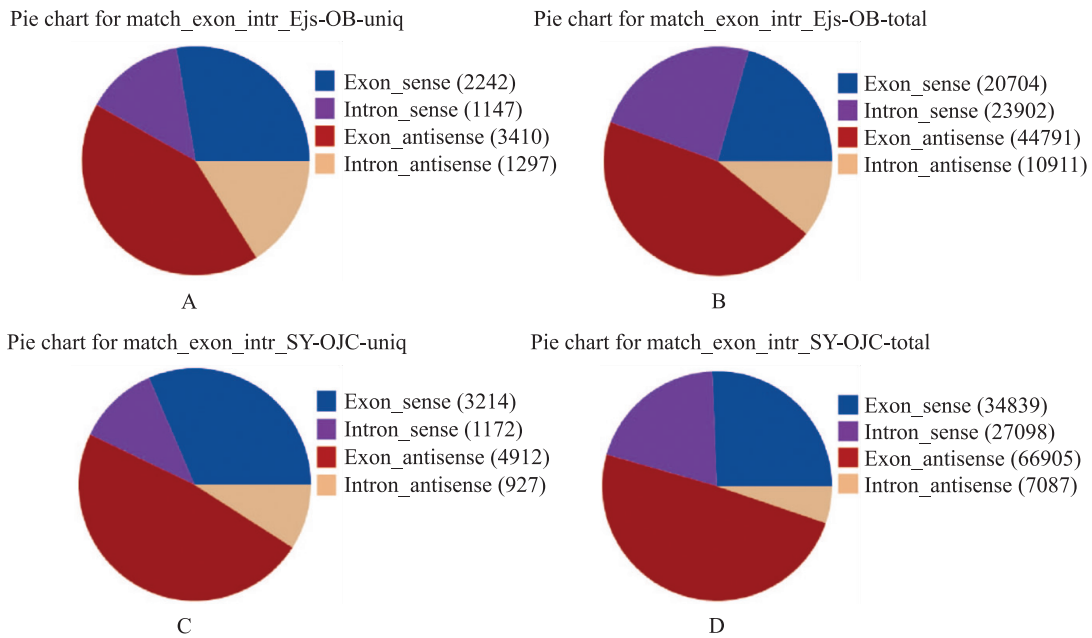


图 4 比对到外显子/内含子的正义链/反义链的小 RNA 种数和总数

Fig. 4 The proportion of unique/total small RNA matched to sense/antisense strand of exon/intron

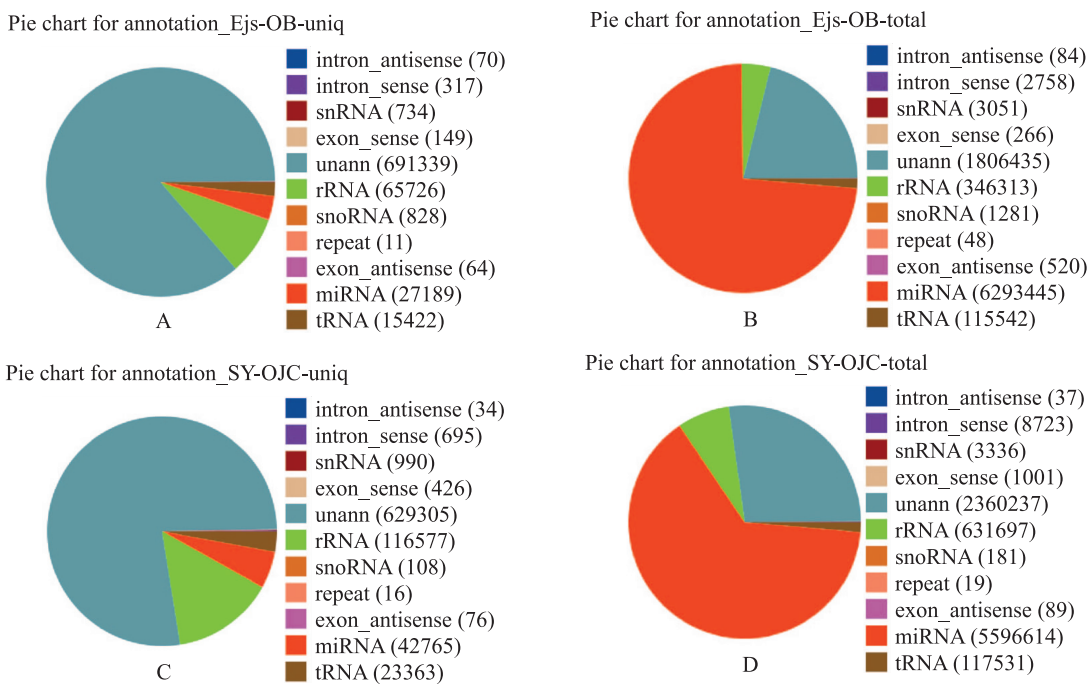


图 5 比对到所有种类的 RNA 的小 RNA 种数和总数

Fig. 5 The proportion of unique/total small RNA matched to all categories of RNA

2.3 已知 miRNA 的差异表达谱

在 Ejs-OB 文库中鉴定出 24 条成熟的 miRNAs 和 98 条 miRNAs*, 在 SY-OJC 文库中筛得 28 条成熟的 miRNAs 和 76 条 miRNAs*. 根据测序的频率, 在 NBE 文库中, miR-184(1 942 090) 是最丰富的 miRNA, 同时, miR-1-3p、miR-184-3p 和 miR-1 是高度表达的并且各被测序超过 105 次, 而有些 miRNAs (比如 miR-236、miR-306b、miR-30a-5p、miR-222、miR-208b-3p) 仅被测序 1 次. 这些数据表明, 在 Ejs-OB 和 SY-OJC 文库中, 不同 miRNAs 呈明显的内部表达差异.

为了分析 miRNAs 在两文库中的表达水平差异, 文库中已知的 miRNA 表达量以散点图的形式呈现 (图 6). 在 miRNAs 不表达的时候, 散点图被校正到 0.01. 高表达的 miRNAs 应该有广谱功能, 为了尽可能

多地涵盖高表达的 miRNAs,并反映两个文库之间的差异,将 $|\text{fold_change}(\log 2)| \geq 1$ 和 $0.01 \leq p\text{-level} < 0.05$ 作为选择标准.最终,共得到 784 个异常表达的 miRNAs,其中 514 个 miRNAs 为表达上调,270 个 miRNAs 为表达下调.在 SY-OJC 文库中,miR-1183、miR-1357、miR-1591、miR-2382 和 miR-5438 在表达水平上表现出显著的变化,其中 miR-1183、miR-1357、miR-1591、miR-2382 为表达上调,而 miR-5438 为表达下调.观察到的最明显的变化是 miR-2382,它的表达水平与 Ejs-OB 文库中相比,在 SY-OJC 文库中下降了大概 20 倍.也在两文库中搜寻到一些相同的 miRNA* 序列,如 miR-139*、miR-1419g*、miR-1798*、miR-202*、miR-2068* 和 miR-454* 也是表达变异较大.

2.4 新 miRNA 发现

从其他内源性小 RNA 中区别 miRNA 的一个重要特征是它们前体带有特征性的茎环发夹二级结构,在 Ejs-OB 和 SY-OJC 文库中用非注释序列通过 Mireap 来预测新 miRNA,结果在 Ejs-OB 和 SY-OJC 文库中均未发现新 miRNA.

2.5 已知 miRNA 家族分析

对比对出的已知 miRNA 进行家族分析,探索其所属的 miRNA 家族在其他物种中的存在情况,其中 let-7、mir-1 和 mir-2 等在其他物种中普遍存在,而 mir-2494、mir-2489 和 mir-1013as 只在 *Drosophila melanogaster* 与 *Drosophila virilis* 物种中存在,说明一些小 RNA 有物种特异性,其余的详细数据未在本文中展示.

3 讨论

中华绒螯蟹是甲壳动物短尾类中生活史跨越海水和淡水生活的代表性经济物种,从遗传信息基础来说,它必定印记了蟹类由海洋进入淡水的进化历史,而长江华溪蟹是典型的淡水蟹类,隶属于甲壳动物亚门(Crustacea)软甲纲(Malacostraca)十足目(Decapoda)短尾次目(Brachyura)中一个特殊的分支,终身生活在淡水环境中,对这两种蟹的 miRNA 比较研究有利于揭示胚胎发育相关 miRNA 在中华绒螯蟹胚胎的间接发育(幼蟹发育成成蟹,经过溞状幼体、大眼幼体、仔蟹、成蟹不同的发育阶段,并且每一阶段的身体结构都不相同,即经过变态发育过程,尾部向腹部的折叠消失)与长江华溪蟹胚胎的直接发育(幼蟹发育成成蟹,身体结构不变,生活习性变化不大)过程中的不同调控模式.迄今,多个研究小组在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、蜜蜂(*Apis mellifera*)、冈比亚疟蚊(*Anopheles gambiae*)、斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)等节肢动物中鉴别出了近两百种 miRNA,并且发现某些 miRNA 在生物个体的胚胎发育、变态发育等生命进程中起着重要的调控作用^[9-11]. miRNA 作为动物发育中一个关键的调控因子,其在水生甲壳动物胚胎发育中的相关研究至今未见相关报道.本研究的测序结果中,中华绒螯蟹和长江华溪蟹胚胎样本中的 miRNA 在种类数量上并不存在十分显著的差异,而在 miRNA 的表达水平上差异十分显著.但是两个物种的 miRNA 高通量测序结果分析并没有发现新的 miRNA,而且发现已知功能的 miRNA 成熟体的数量偏少,对测序结果的比对分析发现中华绒螯蟹有 24 个 miRNA 成熟体,长江华溪蟹有 28 个 miRNA 成熟体.本研究鉴定的已知功能的重要 miRNA,在海水中生活的中华绒螯蟹胚胎期与淡水中生活的长江华溪蟹胚胎期表达出现显著差异,如 let-7-5p、Mir-34a、Mir-1 等.最早发现 let-7 能参与线虫发育的时序调控,let-7 在秀丽隐杆线虫等多个物种的变态发育进程中起到重要的调控作用^[12];对其功能研究发现,let-7 的表达同时也与蜕皮激素的分泌有关^[13]. miR-34a 在细胞中受染色体、p53 及其启动子甲基化等因素的调节,并通过调控多种靶分子的方式参与调节细胞的增殖与凋亡^[14]. miR-1 在心脏、骨骼肌以及多种肿瘤进展中扮演了重要的角色,参与肿瘤增殖、侵袭、迁移和凋亡,miR-1 在生命体中发挥抑癌基因的角色,有可能成为许多肿瘤的新的治疗靶点^[15].对中华绒螯蟹和长江华溪蟹中的 miRNA 及其表达模式的初步分析结果,提示这些表达差异显著的 miRNA 参与了其胚胎发育与适应生境变化过程.而

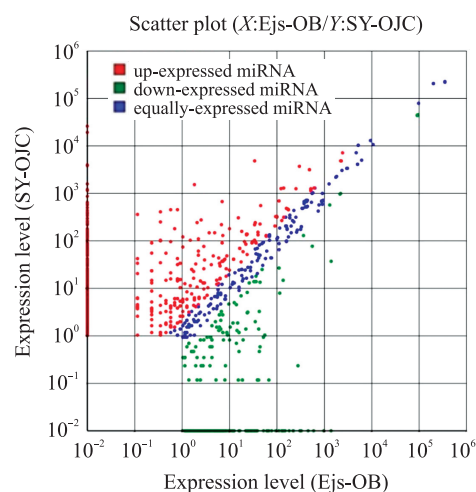


图 6 miRNA 在两样品中的表达水平

Fig. 6 The expression level of miRNA in two samples

其具体的作用需要进一步的功能实验验证。长江华溪蟹是终生淡水生活,胚胎直接发育成幼蟹,幼蟹跟随母体腹部生活一段时间后,才慢慢离开母体独自生活,而中华绒螯蟹从抱卵到溞状幼体 I 期就离开了母体生活,经过变态发育到大眼幼体时开始进入淡水中生活。本研究中筛选到的这些重要 miRNA 为下一步深入探究小 RNA 在甲壳类从海水到淡水生境改变过程中的调控作用提供了目标与方向。

[参考文献]

- [1] VOLINIA S,CROCE C M. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America,2006,103(7):2 257-2 261.
- [2] DU T,ZAMORE P D. MicroPrimer; the biogenesis and function of microRNA [J]. Development, 2005, 132(21): 4 645-4 652.
- [3] HWANG H W,MENDELL J T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis[J]. British journal of cancer, 2006, 94(6): 776-780.
- [4] LI Y,LI W,JIN Y X. Computational identification of novel family members of microRNA genes in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2005, 37(2): 75-87.
- [5] WANG X J,REYES J L,CHUA N H, et al. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets[J]. Genome biology, 2004, 5(9): R65.
- [6] LEE R C,FEINBAUM R,AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [7] LEWIS B P,SHIH I H,JONES-RHOADES M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. Cell, 2003, 115(7): 787-798.
- [8] OU J,MENG Q,LI Y, et al. Identification and comparative analysis of the *Eriocheir sinensis* microRNA transcriptome response to *Spiroplasma eriocheiris* infection using a deep sequencing approach[J]. Fish shellfish immunology, 2012, 32(2): 345-352.
- [9] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [10] CHATTERJEE R,CHAUDHURI K. An approach for the identification of microRNA with an application to *Anopheles gambiae*[J]. Acta biochimica polonica, 2006, 53(2): 303-309.
- [11] LI S,MEAD E A,LIANG S, et al. Direct sequencing and expression analysis of a large number of miRNAs in *Aedes aegypti* and a multi-species survey of novel mosquito miRNAs[J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 581
- [12] REINHART B J,SLACK F J,BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [13] SEMPERE L F,AL E. The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*[J]. Developmental biology, 2002, 244(1): 170-179.
- [14] 王洪一,郭洪,李娟,等. mir-34a 的表达调控及其与肿瘤发生的关系[J]. 医学综述, 2012, 18(7): 1 020-1 023.
- [15] 潘晴,顾万娟,孙丽丽,等. miR-1 在淮安地区食管癌患者癌组织中的表达特征及其临床意义[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(7): 902-903.

[责任编辑:黄 敏]