

miR-146a 前体多态性对宫颈癌细胞增殖的影响

胡启明¹, 丁波², 崔毓桂¹, 周德兰¹, 梁佳乐¹, 韩男男¹, 韩素萍^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院妇产科, 江苏 南京 210036; ²东南大学附属中大医院妇产科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:通过转染 miR-146a 前体(Pre-miR-146a)多态性真核表达质粒,观察 miR-146a 多态性对 miR-146a 表达情况和宫颈癌 HeLa 细胞增殖能力的影响并探讨可能的作用机制。方法:PCR 扩增含多态性位点的 Pre-miR-146a 目的片段,连接入 pcDNA3.1(+)质粒表达载体得到 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 重组质粒,将重组质粒转染宫颈癌 HeLa 细胞。实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 miR-146a 的表达,CCK8 法检测 HeLa 细胞的增殖情况,real-time PCR 以及 Western blot 检测 miR-146a 靶基因肿瘤坏死因子受体相关激酶-6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)的表达。结果:成功将 miR-146a 多态性前体片段克隆入 pcDNA3.1(+)真核表达质粒,获得 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 重组质粒;转染重组质粒能够在 HeLa 细胞内高效和特异地表达 miR-146a($P < 0.05$),且转染 Pre-miR-146a-C 质粒组 miR-146a 表达量较 Pre-miR-146a-G 质粒组高,差异有统计学意义($P < 0.05$);HeLa 细胞转染重组质粒 48 h 后,其细胞存活率较对照组显著增加($P < 0.05$),细胞内 TRAF6 的蛋白水平显著下降($P < 0.05$),但 TRAF6 的 mRNA 水平无变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:Pre-miR-146a 多态性位点能影响成熟 miR-146a 表达,过表达 miR-146a 可能通过下调 TRAF6 基因抑制 NF- κ B 信号通路,从而促进 HeLa 细胞增殖。

[关键词] 宫颈癌;真核表达载体;miR-146a;细胞增殖;肿瘤坏死因子受体相关激酶-6

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-676-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160607

Polymorphism effect of Pre-miR-146a on the proliferation of cervical cancer cells

Hu Qiming¹, Ding Bo², Cui Yugu¹, Zhou Delan¹, Liang Jiale¹, Han Nannan¹, Han Suping^{1*}

(¹Department of Obstetrics & Gynecology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210036; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To transfect the eukaryotic expression plasmid of Pre-miR-146a with a single nucleotide polymorphism(SNP) and observe the expression efficiency of miR-146a in cervical cancer HeLa cells, and then explore the possible mechanism of miRNA-146a on the proliferation of HeLa cells. **Methods:** We directly cloned a 370-bp fragment including miR-146a precursor from the human gDNA into the pcDNA3.1(+) plasmid to construct recombinant Pre-miR-146a plasmid by PCR. A Pre-miR-146a-G or Pre-miR-146a-C was transfected into HeLa cell line and the expression of miR-146a was analyzed by real-time PCR. Cell proliferation was measured by cell counting kit-8 assay. Real-time PCR and Western blotting assays were performed to assess the expression of TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6). **Results:** The fragment including miR-146a precursor was successfully cloned into the pcDNA3.1(+) plasmid and the recombinant expression plasmid Pre-miR-146a-G or Pre-miR-146a-C was constructed. After transfection of Pre-miR-146a-G or Pre-miR-146a-C recombinant plasmid into HeLa cell line, the expression of miR-146a was significantly increased ($P < 0.05$). The miR-146a expression of the Pre-miR-146a-C plasmid transfected group was higher than that of the Pre-miR-146a-G plasmid group ($P < 0.05$). After transfection with recombinant plasmid 48 h, the cell viability of HeLa cell line was increased ($P < 0.05$) and TRAF6 protein expression was down-regulated ($P < 0.05$), but the mRNA level of TRAF6 did not changed ($P > 0.05$). **Conclusion:** The SNP in Pre-miR-146a enhanced the expression of miR-146a and promoted the proliferation of HeLa cells, probably by inhibiting the NF- κ B signaling pathway by down-regulating TRAF6.

[Key words] cervical cancer; eukaryotic expression plasmid; miR-146a; cell proliferation; TNF receptor-associated factor 6

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06):676-681]

[基金项目] 江苏省科技厅基础研究计划(自然科学基金)(BK2012878)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: han_suping@qq.com

miRNA 是长度约 22 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA,广泛存在于真核细胞生物中,通过与靶基因 mRNA 3'-UTR 区互补配对诱导降解或抑制靶基因 mRNA 的翻译,参与基因的表达调控,进而影响肿瘤发生发展^[1]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是指单个核苷酸替代、插入或缺失而形成的基因多态性,是目前最常见的遗传多态现象之一,大约每 1 900 个核苷酸有 1 个碱基发生改变^[2]。针对 miRNA 异常表达机制的研究发现,miRNA 基因前体单核苷酸多态性会引起 miRNA 前体发夹结构不互补,改变 Dorsha 酶加工过程继而影响成熟 miRNA 的表达,最终引起靶基因表达的改变^[3]。miR-146a 是一类与炎症密切相关的 miRNA,发生在 miR-146a 前体区域 G>C 多态性位点 rs2910164 改变了 Pre-miR-146a 茎环结构^[4],多项研究发现 miR-146a(rs2910164)基因多态性与乳头状甲状腺癌、肺癌等疾病发生发展密切相关^[3,5],但其与宫颈癌发病机制方面尚无研究。

本研究通过构建 Pre-miR-146a 真核表达质粒(rs2910164 G 及 C 基因型),检测 miR-146a 在宫颈癌 HeLa 细胞中的表达情况,探究 miR-146a 对宫颈癌细胞增殖能力的影响及其可能作用机制,为宫颈癌的预防和治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

宫颈癌 HeLa 细胞株(中国科学院上海细胞库),高糖 DMEM 培养基(Hyclone 公司,美国),Opti-MEM(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青公司);T4 DNA 连接酶、SYBR green、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本),琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小抽试剂盒(Omega 公司,美国),*Bam*H I、*Hind* III、pcDNA3.1(+)空载体质粒、Lipofectamine 2000、TRIzol Reagent(Invitrogen 公司,美国);抗肿瘤坏死因子受体相关激酶-6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)抗体、抗 actin 抗体(Bioworld 公司,美国),HRP 标记山羊抗鼠 IgG、HRP 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥),ECL 试剂盒(Millipore 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 Pre-miR-146a 真核表达质粒构建

人全血基因组 DNA 为模板,采用 Primer Premier5.0 软件设计包含上下游片段 Pre-miR-146a(370 bp)的引物(Invitrogen 公司,美国),并在引物 5'端添加酶切位点(*Bam*H I/*Hind* III)及保护碱基,

正向引物:5'-CGCGGATCCCACCCACATCAGC-CTTCC-3',反向引物:5'-CCCAAGCTTCTGCCTTCTGTCTCCAGTCTTC-3'(划线处为酶切位点)。PCR 反应体系如下:2×ExTaq Mastermix(TaKaRa 公司,日本)10 μL,正、反向引物(5 pmol/L)各 1 μL,基因组 DNA 模板 3 ng,加去离子水补齐 20 μL。反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,60℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;72℃ 7 min。上述 PCR 反应产物于 2%琼脂糖凝胶电泳,紫外光下观察扩增产物大小和亮度,并切下含目的片段的琼脂糖凝胶,收集于清洁 EP 管中,使用胶回收试剂盒进行回收纯化。经测序确认所含 SNP rs2910164 G 或 C 基因型后,使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 切下,连接于 pcDNA3.1(+)质粒载体的 *Bam*H I 和 *Hind* III 之间的多克隆位点,得到重组质粒 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C,转化至 *E.coli* DH5α,挑取单克隆菌落并扩增,提取质粒进行酶切鉴定并进一步送测序。

1.2.2 细胞培养及转染宫颈癌 HeLa 细胞株

采用含有 10%胎牛血清 DMEM 高糖培养基,37℃、5% CO₂ 常规培养 HeLa 细胞,实验分 3 组。阴性对照组:转染空载体质粒 pcDNA3.1(+)组;2 个实验组:转染质粒 Pre-miR-146a-G 组、转染质粒 Pre-miR-146a-C 组。转染前 1 d 铺 6 孔板,24 h 后待细胞贴壁达 60%~70%时进行转染,每孔转染质粒 3 μg,按 Lipofectamine 2000 操作说明书进行转染。48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.2.3 real-time PCR 检测 miR-146a 及 TRAF6 mRNA 的表达水平

HeLa 细胞在转染空载体质粒、质粒 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 48 h 后,使用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA。TRAF6、GAPDH 引物根据 GenBank 中的 mRNA 序列采用 Primer Premier5.0 软件进行设计(Invitrogen 公司,美国);miR-146a、U6 引物采用 Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Primer Set(miR-146a)及 U6 snRNA qPCR Primer Set(U6)(广州锐博公司)。7700 型实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国)进行扩增和检测。TRAF6 正向引物序列:5'-TTTGCTCTTATG-GATTGTCCCC-3',反向引物序列:5'-CATTGATGCAGCACAGTTGTC-3',扩增长度为 120 bp;GAPDH 正向引物序列:5'-GAAGGTCCGAGT-CAACGGATTT-3',反向引物序列:5'-CTG GAA-GATGGTGATGGGATTTTC-3',扩增长度为 223 bp;TRAF6、GAPDH 的扩增反应条件:95℃ 1 min;95℃

15 s, 60°C 1 min, 共 40 个循环。熔解曲线反应条件: 95°C 15s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。miR-146a、U6 扩增反应条件: 95°C 20 s; 95°C 10 s, 60°C 20 s, 70°C 10 s, 共 40 个循环。熔解曲线反应条件: 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。根据公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 miR-146a 与 U6 的相对表达量以及目的基因(TRAF6) 与内参基因(GAPDH)的相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.4 CCK8 法检测宫颈癌 HeLa 细胞株增殖能力

收集转染各组质粒细胞, 重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 按 5 000 个/孔接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔, 培养 24、48 h 时, 加入 CCK8 与培养基混合液 110 μL (比例为 1:10), 继续常规培养 1.5 h, 以空白对照孔调零, 置酶联检测仪上测定各孔吸光度值, 检测波长为 450 nm, 各组取 5 孔吸光度值的平均值, 并计算细胞增殖率。细胞增殖率 (%) = (实验组吸光度值 - 空白组吸光度值) / (对照组吸光度值 - 空白组吸光度值) × 100%, 设对照组细胞增殖率为 100%。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测靶基因蛋白表达

转染各组质粒 48 h 后收集细胞抽提总蛋白, 二辛可宁酸(BCA)法测定蛋白浓度, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离蛋白, 湿转法转膜, 5% 脱脂奶粉溶液 37°C 封闭 1 h, 一抗 4°C 过夜孵育后洗膜, HRP 标记的二抗 37°C 孵育 1 h, 洗膜后使用 ECL 试剂盒显影。采用天能 Gel Image System 软件进行灰度值分析, 以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值比值均数作为各蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

SPSS20.0 软件进行统计学处理与分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行正态分布、方差齐性检验, 多组间比较用方差分析, 两两比较用 SNK-q 检验。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pre-miR-146a 真核表达质粒的构建与鉴定

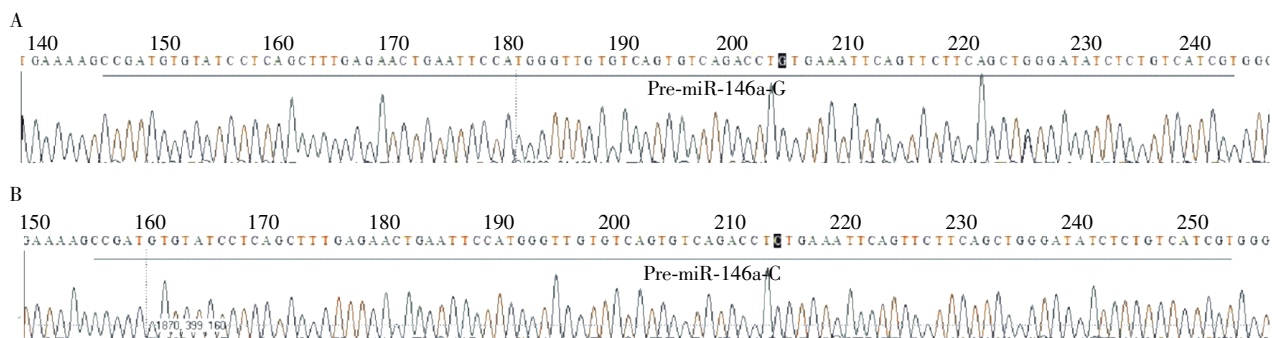
使用 pcDNA3.1(+) 载体构建 Pre-miR-146a 真核表达质粒, PCR 反应扩增含侧翼序列 Pre-miR-146a 片段, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 DNA Maker 300~400 bp 之间可见一明亮特异的条带, 即为 PCR 扩增出的 Pre-miR-146a 片段, 经测序确认得到 SNP rs2910164 G 或 C 基因型片段(图 1), 连接于 pcDNA3.1(+) 载体 BamH I 和 Hind III 多克隆位点, 得到重组质粒 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C。随机挑取 4 个质粒菌落克隆进行 PCR 反应鉴定可见一特异条带(图 2), 重组质粒经双酶切鉴定(图 3)并进一步送测序, 将测序结果与目的载体序列进行 BLAST 比对分析, 结果显示两段序列完全匹配, Pre-miR-146a 真核表达质粒构建成功。

2.2 宫颈癌 HeLa 细胞株转染 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 质粒后 miR-146a 的表达

宫颈癌 HeLa 细胞转染空载体质粒、重组质粒 Pre-miR-146a-G 或 Pre-miR-146a-C 后 48 h, 对照组 miR-146a 相对表达量为 0.86 ± 0.18, Pre-miR-146a-G 质粒组和 Pre-miR-146a-C 质粒组 miR-146a 的相对表达量分别为 436.30 ± 24.59、569.20 ± 53.31, 与对照组相比均显著增高, 且 Pre-miR-146a-C 质粒组 miR-146a 表达较 Pre-miR-146a-G 质粒组增加, 差异有统计学意义(P < 0.01, 图 4)。

2.3 过表达 miR-146a 促进宫颈癌 HeLa 细胞株增殖

转染重组质粒后采用 CCK-8 法检测对宫颈癌 HeLa 细胞增殖能力的影响, 转染后 24 h, 与对照组相比, Pre-miR-146a-G 质粒组和 Pre-miR-146a-C 质粒组细胞增殖率轻度增高, 分别为 (103.6 ± 2.3)%、(112.3 ± 7.1)%, 但差异无统计学意义(P > 0.05, 图 5A); 转染后 48 h, 与对照 pcDNA3.1(+) 组相比, 转



A: Pre-miR-146a-G 质粒; B: Pre-miR-146a-C 质粒。横线标出部分为插入 pcDNA3.1(+) 质粒的 Pre-miR-146a 序列。

图 1 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 质粒测序结果

Figure 1 Sequencing results of Pre-miR-146a-G and Pre-miR-146a-C

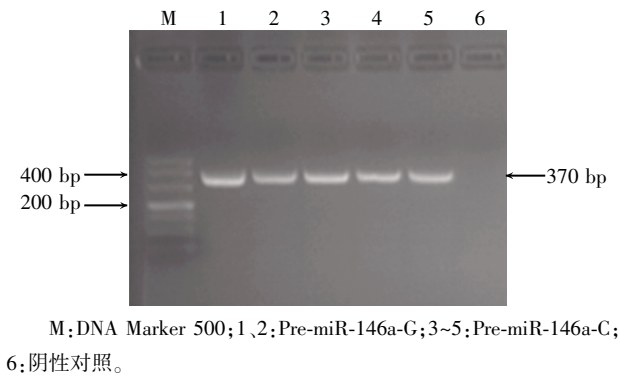


图 2 PCR 检测阳性菌液

Figure 2 Agarose gel electrophoresis map of Pre-miR-146a-G/C PCR products

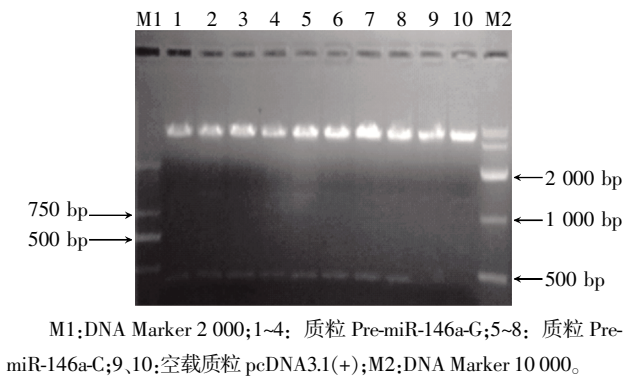


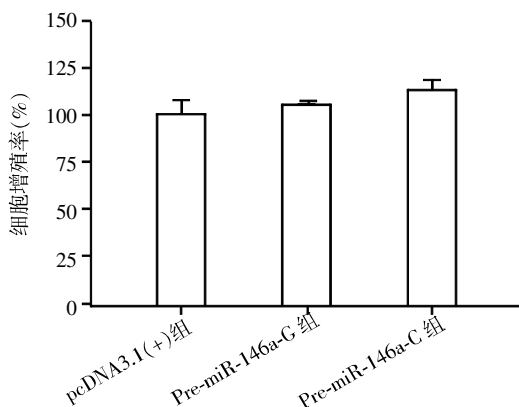
图 3 Pre-miR-146a-G/C 质粒的酶切鉴定

Figure 3 Restriction enzyme analysis of Pre-miR-146a-G/C

染 Pre-miR-146a-G 质粒组和 Pre-miR-146a-C 质粒组细胞增殖率明显增加, 分别为 $(116.4 \pm 6.3)\%$ 、 $(133.2 \pm 13.9)\%$, 且 Pre-miR-146a-C 质粒组细胞增殖率较 Pre-miR-146a-G 质粒组显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5B)。

2.4 宫颈癌 HeLa 细胞株过表达 miR-146a 后靶基

A



A: 转染 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 质粒后 24 h 细胞增殖能力; B: 转染 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 质粒后 48 h 细胞增殖能力; 两组比较, $*P < 0.05, n=5$ 。

图 5 转染重组质粒后宫颈癌 HeLa 细胞的增殖

Figure 5 Proliferation of HeLa cells after transferred with Pre-miR-146a-G or Pre-miR-146a-C

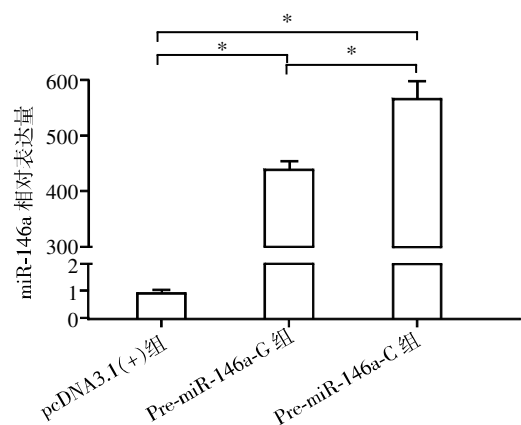


图 4 转染重组质粒后 miR-146a 的表达

Figure 4 Expression of miR-146a after transferred with Pre-miR-146a-G or Pre-miR-146a-C

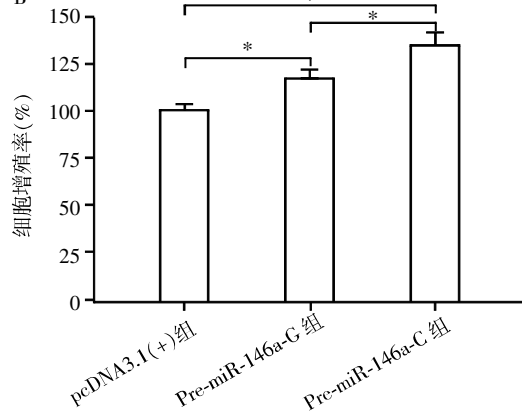
因 TRAF6 mRNA 与蛋白表达水平的变化

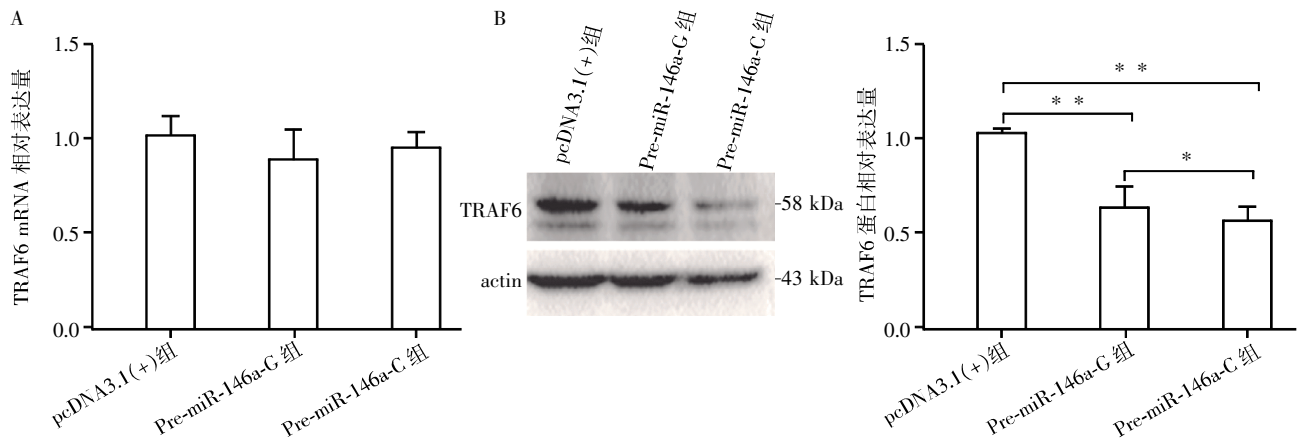
采用 miRanda、PicTar 和 TargetScan 等 miRNA 靶基因预测软件分析, 结果显示 TRAF6 是 miR-146a 的靶基因。宫颈癌 HeLa 细胞转染重组质粒后 48 h, 3 组 TRAF6 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 6A)。Pre-miR-146a-G 组与 Pre-miR-146a-C 组 TRAF6 蛋白表达较对照 pcDNA3.1 (+) 组分别减少 38% 和 58%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 且 Pre-miR-146a-G 组与 Pre-miR-146a-C 组比较差异也有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 6B)。

3 讨论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率位居女性恶性肿瘤第 2 位, 仅次于乳腺癌。全球每年约有 50 万新发病例及 27 万死亡病例^[6]。高危

B





A: 转染重组质粒后 48 h, 实时荧光定量 PCR 检测 TRAF6 mRNA; B: Western blot 检测 TRAF6 蛋白水平, 两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图 6 转染重组质粒后抑制 TRAF6 表达

Figure 6 TRAF6 expression after transferred with Pre-miR-146a-G or Pre-miR-146a-C

型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是宫颈上皮内瘤变和宫颈癌发生的必要因素,但大部分女性 HPV 感染均为一过性,经过一段时间后能被机体自然清除,只有少数持续高危型 HPV 感染才可能导致宫颈上皮内瘤变,并发展为宫颈癌^[7]。多项研究表明宫颈癌的发生与 miRNA 的异常表达密切相关,其中 miR-34a、miR-21 等在宫颈癌中呈现高表达,发挥致癌基因作用^[8-9];而 miR-182、miR-125b、miR-133a、let-7a 等 miRNA 在宫颈癌中表达明显下调,发挥抑癌基因作用^[8,10-11]。

miR-146a 在不同恶性肿瘤中表达及作用机制各异,与癌旁口腔黏膜组织比较,口腔鳞状细胞癌组织中 miR-146a 明显高表达,并且 miR-146a 在口腔鳞状细胞癌患者血清中的表达也明显高于健康对照组,高表达的 miR-146a 能通过下调靶基因 interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)、TRAF6 和 numb homolog (NUMB) 的表达,从而促进口腔鳞状细胞癌的发生发展^[11-12]。miR-146a 在乳腺癌外周静脉血中的表达水平明显高于健康对照组^[13],在乳腺癌中,p53-binding protein-1 (53BP1) 基因起抑癌作用,与正常对照组相比,乳腺癌组织中 53BP1 呈低表达,miR-146a 表达上调可抑制 53BP1 基因,阻滞 NF- κ B 信号通路,进而影响乳腺癌细胞的侵袭和转移^[14]。Wang 等^[15]发现 miR-146a 在宫颈癌中呈高表达,并且过表达 miR-146a 能促进宫颈癌细胞增殖。

位于 miR-146a 前体区域 rs2910164 多态性位点导致 Pre-miR-146a 发夹结构茎部由 GU 配对变成 CU 错配,Jazdzewski 等^[3]首次在乳头状甲状腺癌中证实了 miR-146a rs2910164 基因多态性能影响成

熟体 miR-146a 的表达,导致个体对乳头状甲状腺癌易感性不一。miR-146a 启动子区域存在多个核转录因子 NF- κ B 结合位点,LPS、IL-1 和 TNF- α 等多种炎症相关因子都可通过与该位点结合从而诱导激活 NF- κ B 信号通路,miR-146a 通过与靶基因 TRAF6 或 IRAK1 mRNA 的 3'UTR 区域结合从而抑制其表达,减少下游炎症相关因子的产生,参与细胞增殖、凋亡和免疫识别等过程^[16]。我们的前期研究发现,miR-146a 前体区域的多态性能影响成熟体 miR-146a 的表达,在宫颈癌组织中,同 rs2910164 CC 基因型相比,GG 基因型明显减少了成熟 miR-146a 的表达^[17]。因此,本研究通过构建 Pre-miR-146a-G 及 Pre-miR-146a-C 质粒,将其转染宫颈癌 HeLa 细胞,检测成熟体 miR-146a 表达,并探讨转染重组质粒后对 HeLa 细胞增殖能力的影响及可能的作用机制。

研究结果显示,宫颈癌 HeLa 细胞株转染 Pre-miR-146a-G 或 Pre-miR-146a-C 质粒后,miR-146a 表达量显著增高,且转染 Pre-miR-146a-C 组明显高于 Pre-miR-146a-G 组,进一步证实了 miR-146a rs2910164 基因多态性能改变成熟 miR-146a 的表达。转染 Pre-miR-146a-G 或 Pre-miR-146a-C 质粒后,HeLa 细胞增殖率在转染 24 h 后无明显差异,miR-146a 转染进入细胞后到其发挥作用可能需要一定时间,在此期间 miR-146a 对 HeLa 细胞增殖率的影响可能无法显现,转染 48 h 后细胞增殖率明显增强,且转染 Pre-miR-146a-C 组细胞增殖率显著高于 Pre-miR-146a-G 组,miR-146a 能显著促进 HeLa 细胞增殖,miR-146a 表达量与细胞增殖能力呈正相关。在本研究中,转染 Pre-miR-146a-G 或 Pre-miR-146a-C 质粒

后,TRAF6 蛋白水平明显下降。TRAF6 是 TRAF 蛋白家族中一员,通过作用于 TNF 受体超家族及 Toll/IL-1 受体家族调节信号转导途径,在 NF- κ B 信号通路中,通过激活 I κ B 激酶(IKK)从而活化下游炎症因子,使得下游 I κ B 磷酸化降解,激活 NF- κ B 信号通路^[18-19],TRAF6 表达下降后将抑制下游 NF- κ B 信号通路的激活,降低机体免疫反应,使得 HPV 持续感染成为可能,从而介导宫颈癌的发生发展。

本研究发现,miR-146a 前体区域的多态性能影响 miR-146a 的表达,miR-146a 能够通过下调 TRAF6 基因,从而促进宫颈癌细胞增殖。因此采用分子生物学技术降低宫颈上皮细胞中 miR-146a 表达或上调 TRAF6 基因表达有可能是抑制宫颈癌发生发展的方法之一,进一步研究 miR-146a 在宫颈癌发病机制中的作用有望为宫颈癌的预防和治疗提供新线索。

[参考文献]

[1] Tay FC, Lim JK, Zhu H, et al. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 81: 117-127

[2] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms[J]. *Nature*, 2001, 409 (6822): 928-933

[3] Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(20): 7269-7274

[4] Iwai N, Naraba H. Polymorphisms in human pre-miRNAs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331 (4): 1439-1444

[5] Li J, Yang H, Li Y, et al. microRNA-146 up-regulation predicts the prognosis of non-small cell lung cancer by miRNA *in situ* hybridization[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96 (2): 195-199

[6] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 212-236

[7] Ho GF, Einstein MH, Romney SL, et al. Risk factors for persistent cervical intraepithelial neoplasia grades 1 and 2 [J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2011, 15(4): 268-275

[8] Ribeiro J, Marinho-Dias J, Monteiro P, et al. miR-34a and miR-125b expression in HPV infection and cervical cancer development[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 304584

[9] Shishodia G, Shukla S, Srivastava Y, et al. Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1): 116

[10] Sun J, Ji J, Huo G, et al. miR-182 induces cervical cancer cell apoptosis through inhibiting the expression of DNMT3a[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4755-4763

[11] Hung PS, Chang KW, Kao SY, et al. Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression[J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(5): 404-408

[12] Hung PS, Liu CJ, Chou CS, et al. miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79926

[13] Kumar S, Keerthana R, Pazhanimuthu A, et al. Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients[J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2013, 50(3): 210-214

[14] Li X, Xu B, Moran MS, et al. 53BP1 functions as a tumor suppressor in breast cancer via the inhibition of NF- κ B through miR-146a[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(12): 2593-2600

[15] Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2557

[16] Stickel N, Prinz G, Pfeifer D, et al. MiR-146a regulates the TRAF6/TNF-axis in donor T cells during GVHD [J]. *Blood*, 2014, 124(16): 2586-2595

[17] Yue C, Wang M, Ding B, et al. Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(1): 33-37

[18] Xia X, Cui J, Wang HY, et al. NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF- κ B signaling by targeting TRAF6 and IKK[J]. *Immunity*, 2011, 34(6): 843-853

[19] Zhang X, Zhang J, Zhang L, et al. UBE2O negatively regulates TRAF6-mediated NF- κ B activation by inhibiting TRAF6 polyubiquitination[J]. *Cell Res*, 2013, 23(3): 366-377

[收稿日期] 2015-09-22