

雄性大鼠生殖结节中相关 lncRNA 和 mRNA 可能参与邻苯二甲酸二丁酯诱导的尿道下裂形成过程

冯 笑,黄恩馥,张 亚*,周 云*

苏州大学附属儿童医院儿科研究所泌尿外科,江苏 苏州 215003

[摘 要] 目的:探讨雄性大鼠生殖结节中长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和 mRNA 在邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)诱导雄性大鼠尿道下裂形成中的可能作用。方法:在孕鼠孕 13~18 d 时每天按体重 800 mg/kg DBP 溶于 1 mL 玉米油灌胃,对照组每天给予 1 mL 玉米油。于孕 19 d 时取出胎鼠,分别取下灌药组发生尿道下裂胎鼠和对照组雄性胎鼠的生殖结节,提取 RNA,构建 RNA 测序文库测序。对测序结果的 lncRNA 进行筛选、差异分析和功能预测,再随机筛选 8 条 lncRNA 用 qRT-PCR 验证其表达量。结果:与对照组相比,尿道下裂组生殖结节中有 598 个差异 mRNA,427 个差异 lncRNA, qRT-PCR 结果与测序结果一致。在生物过程、细胞组成、分子功能方面,差异表达 mRNA 富集程度最高的分别是红细胞生长、血红蛋白合成、结合珠蛋白结合。分布最多的信号通路为病毒性心肌炎通路。差异 lncRNA 功能最多分布在生长激素释放激素受体的结合;分布最多的信号通路为金葡菌感染通路。结论:邻苯二甲酸二丁酯诱导的尿道下裂雄性大鼠与正常雄性大鼠相比,其生殖结节中 lncRNA 和 mRNA 的差异表达显著, lncRNA 可能通过与 mRNA 相互作用参与尿道下裂的形成过程。

[关键词] 高通量测序;邻苯二甲酸二丁酯;尿道下裂;长链非编码 RNA

[中图分类号] R714.43

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)04-439-07

doi:10.7655/NYDXBNS20180404

LncRNA and mRNA in the genital tubercle of male rats may be involved in the formation of di-n-butyl phthalate-induced hypospadias

Feng Xiao, Huang Enfu, Zhang Ya*, Zhou Yun*

Institute of Pediatrics Research, Department of Urinary Surgery, Soochow University Affiliated Children's Hospital, Soochow 215003, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of long non-coding RNA (lncRNA) and mRNA in the genital tubercle of hypospadiac rats induced by di-n-butyl phthalate (DBP). **Methods:** We placed male and female rats with a ratio of 1:1 in the same cage and then checked if there was white glue frosting vaginal suppository in the next day to determine the female rats mating successfully, confirmed this day as the first day of pregnancy. By giving rats 800 mg/kg DBP dissolved in 1 mL corn oil in the 13 to 18 days of pregnancy to establish model of hypospadias, the pregnant rats in the control group were given only 1 mL/d corn oil. Fetal rats were taken out from pregnant rats for 19 days of pregnancy. The meatus of urethra was observed with an anatomical microscope to find if male fetal rats developed hypospadias. Then, we removed the genital tubercle of male fetal rats and extracted total RNA in it. RNA sequencing library was constructed and then sequenced with sequencing machine. The sequencing result of lncRNA was analyzed and screened, and function prediction was performed. Finally, we chose eight lncRNAs randomly to validate their level of expression by qRT-PCR. **Results:** The sequencing results showed that compared with the control group, the hypospadias group had 598 differential expression mRNA, 427 differential expression lncRNAs. qRT-PCR results were consistent with the results of sequencing. In the biological process, cell component and molecular function, the most differential expressions of mRNA were related to erythrocyte development, extracellular exosome and haptoglobin binding. The most mRNAs were related to the signaling pathways of viral myocarditis. LncRNAs function prediction showed that the most lncRNAs played in combination of growth hormone releasing hormone receptor; The most lncRNAs were related to the signaling pathways of staphylococcus aureus infection. **Conclusion:** Compared with

[基金项目] 江苏省临床医学科技专项基金(BL2012051);苏州市民生科技项目(SS201754)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zy962@aliyun.com; cloudysoochow@189.cn

normal male rats, the male rats of hypospadias induced by DBP have changed the level of expression of lncRNA and mRNA in the genital tubercle significantly. LncRNA may involved in the formation process of hypospadias and interfered development of genital tubercle by interacting with mRNA.

[Key words] RNA-seq; DBP; hypospadias; lncRNA

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(04): 439-445]

尿道下裂是因前尿道发育不全而致尿道开口达不到正常位置的畸形,是阴茎最常见的先天性畸形^[1],平均200~300个新生儿男婴中就有1例^[2]。目前对尿道下裂的治疗主要以手术为主,但手术难度大,并发症较多,对患儿身心发育造成不良影响,因此,研究尿道下裂发病机制具有重要意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类转录本长度超过200个核苷酸的RNA分子,其广泛分布于哺乳动物中,且不少lncRNA存在着时空和组织特异性的表达模式,因此一些lncRNA相对于mRNA和microRNA更有潜力成为一些疾病治疗的特异性靶标^[3]。目前关于lncRNA对泌尿生殖系统疾病影响的研究多集中在肿瘤,已发现多种lncRNA在肿瘤的发生、发展中起到重要作用,但与尿道下裂等先天疾病的关系尚不明确,鉴于lncRNA广泛参与了包括细胞生长周期中增殖和分化、死亡、信号转导、代谢等多个关键生命活动的调控,其在尿道下裂等先天疾病中的潜在价值也值得探索。

1 材料和方法

1.1 材料

Sprague Dawley大鼠(苏州昭衍新药研究中心有限公司); mirVana™ miRNA分离试剂盒(Ambion-1561)、TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold(Illumina公司,美国); AgencourtAMPure XP、AgencourtRNAClean XP(Beckman Coulter公司,美国); QubitRNA分析试剂盒、Qubit dsDNA分析试剂盒(Life Technologies公司,美国); Bioanalyzer 2100 RNA-6000 Nano试剂盒、Bioanalyzer 2100 DNA-1000试剂盒(Agilent公司,美国); SuperScript II反转录酶(Invitrogen公司,美国); HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(Vazyme公司,美国); QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit(Qiagen公司,美国); 引物(Generay公司,美国); 384孔板(Roche公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 尿道下裂模型建立

7周龄体重(240±10)g的清洁级SD大鼠,雌鼠

25只、雄鼠10只,按雌雄1:1的比例合笼交配,以次日清晨在雌鼠阴道口或排泄盘里检查到白色胶冻状阴道栓为依据判断交配成功,以交配成功当天记为妊娠第1天(gestation day 1, GD1)。将成功交配的雌鼠随机分为实验组和对照组,实验组于GD 13~18按照大鼠体重800 mg/kg邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)玉米油灌胃。GD19剖腹取出胎鼠,解剖显微镜下观察雄性胎鼠尿道下裂情况。判定尿道下裂的标准^[4]为:①生殖器突起顶部出现明显裂口;②生殖器突起明显变小,有裂痕,睾丸不外突,呈现雌性外观;③尿道口开口于阴茎腹侧,尿道开口异常;④阴茎弯曲,包皮皱壁未融合。可见正常雄鼠尿道开口位于生殖结节顶端正中处,尿道下裂雄鼠尿道开口位于生殖结节体部近腹侧。正常雄鼠组织生殖结节染色连贯一致,尿道下裂雄鼠染色出现疏松。每组各选取等量成功交配的孕鼠,实验组每只孕鼠所怀胎鼠中取下2只尿道下裂鼠生殖结节,对照组每只孕鼠所怀胎鼠中取2只正常雄性胎鼠的生殖结节,分别记为尿道下裂组和对照组。

1.2.2 RNA Seq文库制备与测序

将同一只孕鼠所怀胎鼠中取下的2个生殖结节样本放入同一个EP管,分别在每个EP管中加入TRIzol裂解,按试剂盒说明书提取总RNA,紫外可见分光光度计及凝胶电泳检查确定样品总RNA浓度和质量。

消化核糖体RNA,将RNA打断成短片段,以打断后的RNA为模板,用六碱基随机引物合成一链cDNA,再根据一链cDNA合成二链cDNA,在cDNA二链合成时以dUTP代替dTTP,连接不同接头,再利用UNG酶法将含有dUTP的一条链进行消化,只保留连接链不同接头的cDNA一链,纯化cDNA一链,将纯化的cDNA一链进行末端修复、加A尾并连接测序接头,然后进行片段大小选择,最后进行PCR扩增;构建好的文库用Agilent 2100生物分析仪质检合格后,使用Illumina HiSeq™ 2500测序仪进行测序。

1.2.3 lncRNA的筛选

采用严格的三步筛选法筛选出lncRNA:①利用

cuffcompare 软件样本转录本与参考转录本(reference transcripts)进行比较分析,筛除已知编码转录本或已知基因座的新转录本;②对第1步筛选得到转录本按长度大于200 bp 和外显子数目 ≥ 2 进行筛选;③对第2步筛选得到的转录本进行编码能力预测分析,筛除掉具有编码潜能的转录本,所用软件为CPC、CNCL、Pfam、PLEK。

1.2.4 mRNA 和 lncRNA 的差异表达分析

将从样本中重建的所有转录本(或见基因座)整体进行差异表达分析,结果无分子类型的偏好。采用bioconductor 里 DESeq 软件包中的负二项分布检验计算基因差异表达量。在利用RNA-seq 数据比较分析2个样品中同一个转录本是否存在差异表达的时候,可以选取两个标准:①两样品中同一个转录本表达水平的变化倍数;FoldChange ≥ 2 或 ≤ 0.5 ;② $P \leq 0.05$ 或 FDR ≤ 0.05 。FDR 值的计算方法先要对每个转录本进行P值的计算,再用FDR 错误控制法对P值作多重假设检验校正。

1.2.5 GO 富集分析

GO 是基因功能国际标准分类体系,GO 分析包括分子功能、生物过程和细胞组成3部分。对差异表达的mRNA 进行GO 富集分析,对其功能进行描述(结合GO 注释结果)。统计每个GO 条目中所包括的差异基因个数,并用超几何分布检验方法计算每个GO 条目中差异基因富集的显著性,计算结果会返回1个富集显著性的P值,小的P值表示差异基因在该GO 条目中出现了富集($P \leq 0.05$ 为封闭阈值)。

1.2.6 KEGG 富集分析

KEGG 是有关通路的主要公共数据库,利用KEGG 数据库对差异基因进行通路分析(结合KEGG 注释结果),并用超几何分布检验的方法计算每个通路条目中差异基因富集的显著性。计算结果会返回1个富集显著性的P值,小的P值表示差

异基因在该通路中出现了富集。相应的计算公式参见GO 富集分析。

1.2.7 差异 lncRNAs 的共表达基因

对于每个差异表达的lncRNA,利用其表达值进行无监督聚类分析,lncRNA 与 mRNA 表达值相关系数的P值不高于0.05 且相关系数绝对值不低于0.99,则认为具有相关性,得到与之共表达的编码基因,由此预测其功能。

1.2.8 qRT-PCR 对测序结果进行验证

根据生物信息学预测及差异倍数筛选出8条lncRNA,用SYBR Green 法,以ACTB 为内参进行荧光实时定量PCR qRT-PCR,验证候选lncRNA 测序结果的可靠性。设计引物序列见表1。PCR 条件:95℃预变性5 min,95℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸20 s,50个循环比较尿道下裂大鼠和对照组大鼠生殖结节中lncRNA 相对表达量的变化。结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的相对定量法。

1.3 统计学方法

使用SPSS 21.0 进行统计学分析。采用负二项分布检验计算基因差异表达量;用超几何分布检验方法计算每个GO 条目中差异mRNA 富集的显著性及每个通路条目中差异基因富集的显著性。采用两独立样本t 检验比较测序和qRT-PCR 两种方法下lncRNA 的相对表达水平;用卡方检验比较尿道下裂组和对照组尿道下裂率差异。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 尿道下裂模型建立

实验组和对照组各选取4只成功交配的孕鼠,在孕19天时剖出胎鼠,解剖显微镜下观察胎鼠尿道下裂情况(图1、2)。表2为解剖显微镜下观察胎鼠尿道下裂情况的统计。

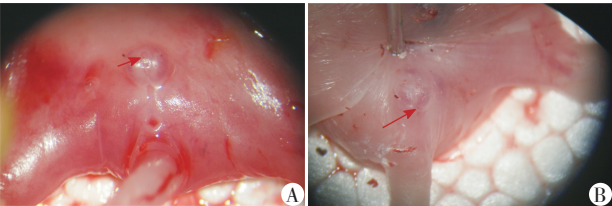
表1 lncRNA 引物序列
Table 1 LncRNA primer sequences

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
NONRATT009918.2	GACATTGGGTCAGGGACT	GGGTCCCTGTATCCACAAA
NONRATT024766.2	AGATCAAGATCAGCTTCACTCA	ACTAAAGACACGACAATCCAT
NONRATT004969.2	GCCTAACAGATAGCTGGCA	CAGGTTCTGACTCACTTGG
NONRATT008453.2	AATCCACTTGATCTTCCACTG	CCATCCTCAAAGACAAGGAAC
NONRATT028181.2	TTCATGGTGGTGTAGGTGATAG	AAAGAACACAGGAGAGCATT
NONRATT028873.2	TGACAAGCATAATCTCTGGTCT	GCTGAAACATTATACAGCACGA
NONRATT024624.2	GAAGTCAAAGTCGTCGCCCTA	TCCTCATGTCTCTCTTCTTCA
NONRATT010304.2	GTGAGCACTCAACACTTGAAT	TTACCCAAAGACGAAACCCT

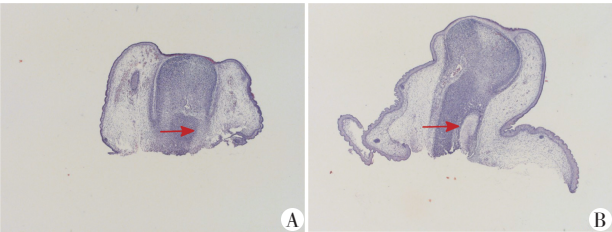
表2 孕鼠在孕13~18天暴露DBP后尿道下裂情况
Table 2 Hypospadias after exposure to DBP on the 13-18 day of pregnancy in pregnant rats

组别	孕鼠数	总胎鼠数	雄性胎鼠数	尿道下裂雄性胎鼠数	尿道下裂率(%)
实验组	14	181	84	41	48.81*
对照组	11	131	67	1	1.49

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。



A:正常雄鼠;B:尿道下裂雄鼠。箭头所指位置为胎鼠尿道开口。
图1 倒置显微镜下雄性胎鼠生殖结节大体观察(×10)
Figure 1 General observation on reproductive nodules of male fetal mice under inverted microscope(×10)



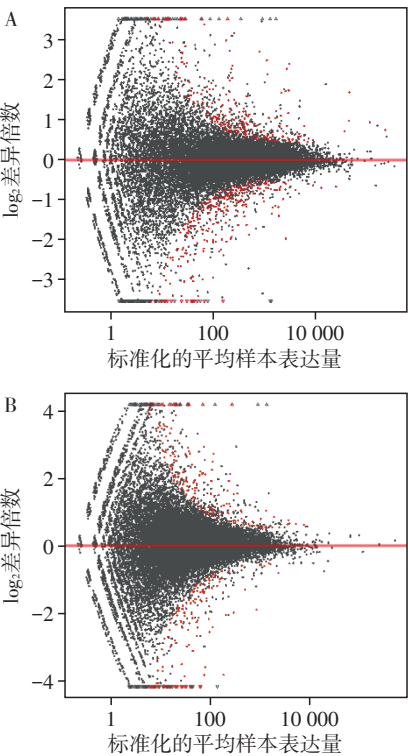
A:正常雄鼠;B:尿道下裂雄鼠。
图2 雄性胎鼠生殖结节组织HE染色(×40)
Figure 2 HE staining of reproductive nodules in male fetal mice(×40)

2.2 差异表达分析

高通量测序实验中共检测到 29 349 个 mRNA 和 31 829 个 lncRNAs。尿道下裂组和对照组共有 598 个差异 mRNA ($P \leq 0.05$), 其中 269 个上调 mRNA (差异倍数 ≥ 2.0), 329 个下调 mRNA (差异倍数 ≤ 0.5); 427 个差异 lncRNA ($P \leq 0.05$), 其中包括 253 个上调 lncRNA (差异倍数 ≥ 2.0), 174 个下调 lncRNA (差异倍数 ≤ 0.5)。将差异情况比较反映到 MA 图 (图3)。

2.3 GO 富集分析

取 GO 富集分析 top20 条目进行绘图 (图4)。可见, 在生物过程方面, 差异表达的 mRNA 富集程度最高的是红细胞生长; 细胞组成方面, 差异表达 mRNA 富集程度最高的是细胞外泌体; 分子功能方面, 差异表达 mRNA 富集程度最高的是结合珠蛋白的结合。



A:mRNA;B:lncRNA;红色标注的是 $P < 0.05$ 的差异基因。

图3 差异表达基因的MA示意图
Figure 3 MA schematic diagram of differentially expressed genes

2.4 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析 top20 条形图示意图见图5。差异 mRNA 在富集程度最高的前 20 位信号通路中, 富集程度最高的是病毒性心肌炎。

2.5 lncRNA 功能预测

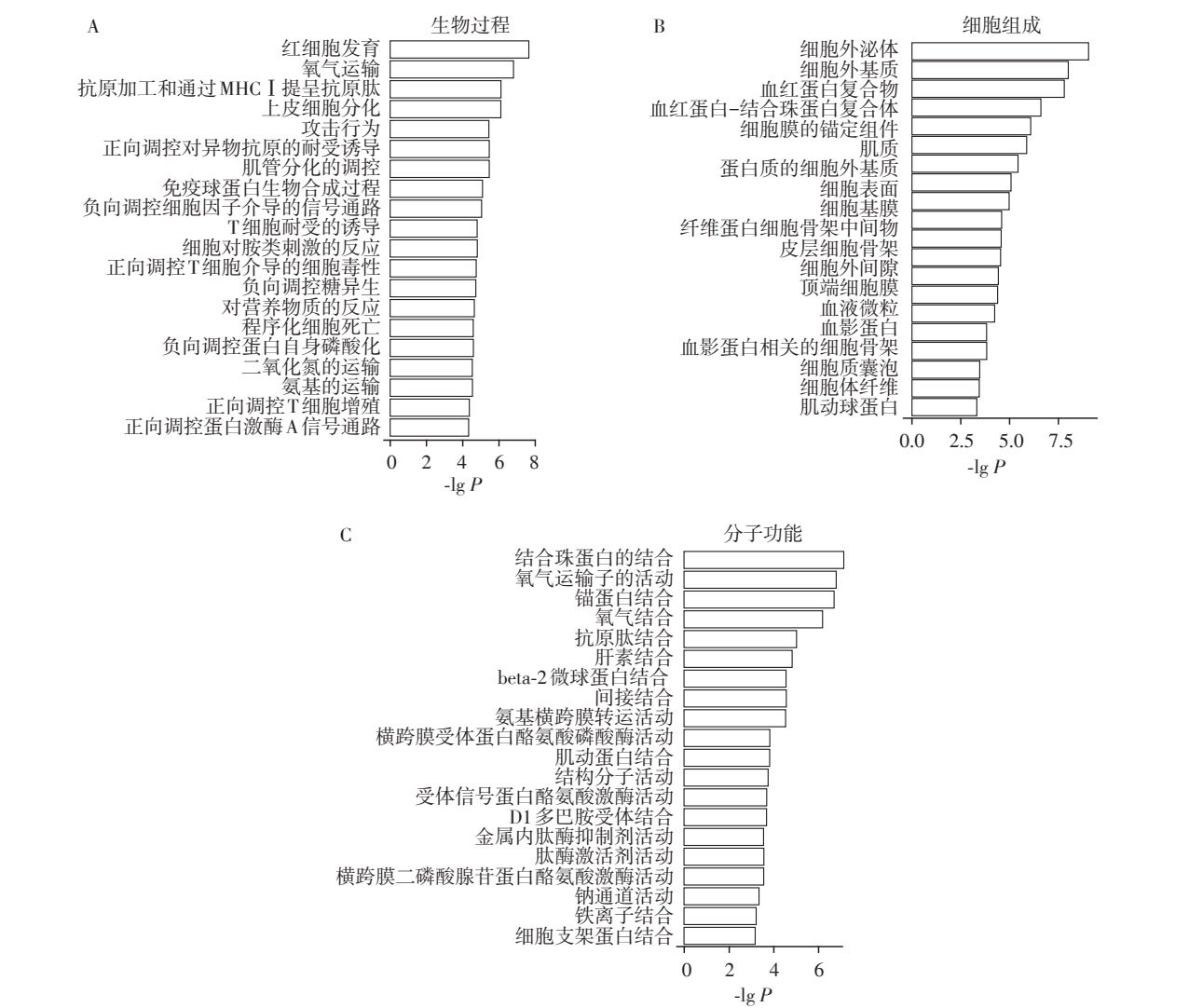
对于每一个差异表达的 lncRNA, 通过计算得到与之共表达的编码基因, 由此预测其功能, 差异表达 lncRNA 功能分布和信号通路分布的整体情况见图6。可见差异表达 lncRNA 分布频次最高的功能为生长激素释放激素受体的结合; 分布频次最高的信号通路为金黄色葡萄球菌感染通路。

2.6 qRT-PCR 验证芯片筛选结果

根据生物信息学预测及差异倍数选择了 8 条在尿道下裂组和对照组大鼠的生殖结节中存在显著差异的 lncRNA, 通过 qRT-PCR 对测序结果进行了验证, 分析结果见图7。结果显示, 8 条 lncRNA 差异趋势与测序结果一致, 不存在差异趋势与测序结果的差异趋势相反的 lncRNA。

3 讨论

关于尿道下裂病因学研究, 大多数人认为是基



A:在生物过程的富集程度;B:在细胞组成方面的富集程度;C:在分子功能方面的富集程度。

图 4 差异 mRNA 的 GO 富集分析

Figure 4 GO enrichment analysis of differential mRNA

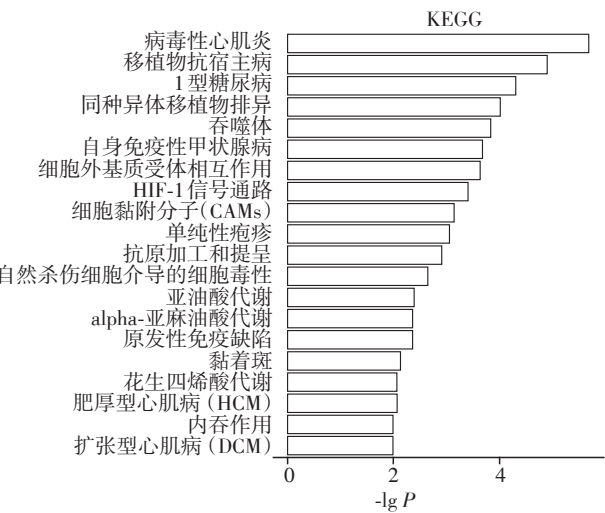


图 5 差异 mRNA 的 KEGG 富集分析

Figure 5 KEGG enrichment analysis of differential mRNA

因和环境因素共同作用的结果。环境方面,近年来显现出因环境污染和职业暴露导致尿道下裂发生率明显增高的趋势,环境内分泌干扰物(EEDs)是最大的影响因素。本研究选取EEDs中的典型代表DBP建立大鼠尿道下裂模型,它作为增塑剂被广泛应用于玩具、胶粘剂、化妆品、农药载体、医疗器械等制品中,日常接触广泛。已有大量实验证实DBP会对男性生殖系统产生明显影响,例如,母体孕期暴露DBP会导致新生雄性后代有发生尿道下裂、隐睾和精子形成功能紊乱的可能^[5-11]。有研究发现,在胎鼠发育的关键时期每天给予孕鼠800 mg/kg剂量的DBP尿道下裂发生率高,毒性相对较小^[12]。目前对于DBP导致雄性生殖系统畸形的研究集中在干扰胚胎期睾丸中睾酮合成途径以及影响生殖结

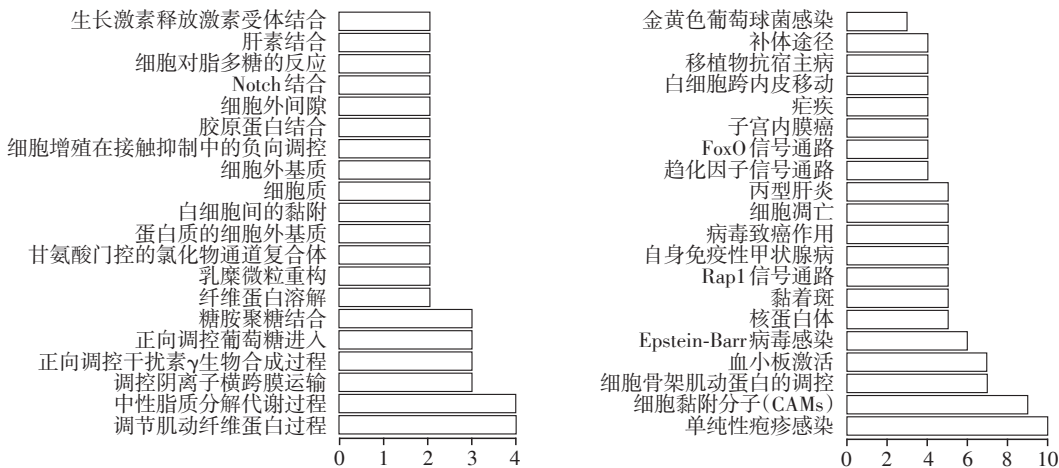


图6 差异 lncRNA 功能及信号通路分布的整体情况

Figure 6 The overall situation of the distribution of differ-ential lncRNAs function and signal pathway

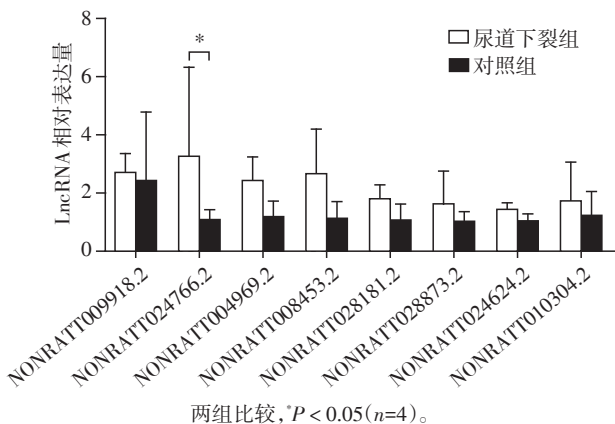


图7 qRT-PCR 验证测序结果

Figure 7 Quantitative RT-PCR validate result of RNA-seq

节发育的信号通路等方面^[13-14],邻苯二甲酸酯类物质可以直接或间接作用于生殖结节,影响多种有关生殖发育的细胞因子或蛋白,导致尿道下裂的发生^[15],因此本研究将大鼠生殖结节作为研究对象。关于DBP与生殖结节的关系,有研究发现经DBP处理的孕鼠,子代发生尿道下裂的雄鼠尿道上皮内膜联蛋白A3的表达下调,使尿道沟融合过程发生障碍,导致尿道下裂的发生^[15]。

lncRNA广泛分布于哺乳动物基因组中,其数量远远大于编码基因,早期研究者认为lncRNA不具有生物学功能^[16-17],目前发现lncRNA的序列保守性较低,但组织和时空特异性强,且在基因组上的位置往往与其功能有一定相关性,现已成为继microRNA后的研究热点。近年来研究显示,lncRNA与人类多种重大疾病发生、发展和防治都密切相关。目前虽未有关于lncRNA在尿道下裂中的报道,但关于lncRNA在泌尿系统肿瘤中的作用已有不少报

道,如前列腺癌非编码RNA1(PRNCR1)、尿路上皮癌相关基因1(UCA1)、母系遗传的印记基因H19(H19)、人肺腺癌转移相关转录本1(MALAT1)、牛磺酸上调基因1(TUG1)、FGG-ncRNA、COL18A1-ncRNA、CREBBP-ncRNA、LEPR-ncRNA、CDC42EP3-ncRNA、np-5318、np-17586^[18]。目前,对lncRNA的研究面临最大的挑战是其有限的准确性,不同实验室得出的结论不相重叠,有的甚至完全相反,大多研究旨在认定单一分子来作为生物标志,但这种标志物很难符合所有情况,需要将对单一分子生物标志物的寻找拓展到对功能单位、通路和网络的研究^[19]。

本研究旨在利用新一代高通量全转录组测序技术,结合生物信息学分析手段,筛选出尿道下裂大鼠转录组中的lncRNA,对其进行差异表达分析、并通过GO和KEGG生物学通路分析其共表达mRNA的生物学功能,推断其与mRNA共表达关系并进一步对lncRNA的功能进行预测。从GO分析可看出差异lncRNA的潜在靶基因主要与红细胞的生长及功能有关,可能红细胞状态的改变在DBP诱导尿道下裂形成过程中产生了影响。在KEGG生物学通路分析中,富集的生物学通路主要集中在病毒性心肌炎、抗宿主移植病,上述结果可能与DBP诱导尿道下裂有关联。本研究为尿道下裂相关基础研究提供了数据信息,为后续开展对这些差异表达基因的功能、结构、调控机制或通路的研究奠定基础。随着不同物种lncRNA文库的构建,未来将会发现更多新的lncRNA并有待深入研究其功能。

[参考文献]

[1] Ságodi L, Kiss A, Kiss-Tóth E, et al. Prevalence and possi-

- ble causes of hypospadias (in Hungarian) [J]. *Orv Hetil*, 2014, 155(25):978-985
- [2] Blaschko SD, Cunha GR, Baskin LS. Molecular mechanisms of external genitalia development [J]. *Differentiation*, 2012, 84(3):261-268
- [3] Qi P, Du X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(2):155-165
- [4] Marks R, Barton SP, Shuttleworth D, et al. Assessment of disease progress in psoriasis [J]. *Arch Dermatol*, 1989, 125(2):235-240
- [5] Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy [J]. *Toxicol Lett*, 2000, 111(3):271-278
- [6] Foster PM, Cattley RC, Mylchreest E. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment [J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38(1 Suppl):S97-S99
- [7] Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, et al. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl)phthalate during late gestation [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 55(1):143-151
- [8] Carruthers CM, Foster PM. Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2005, 74(3):277-285
- [9] Foster PM. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters [J]. *Int J Androl*, 2006, 29(1):140-147
- [10] Jiang J, Ma L, Yuan L, et al. Study on developmental abnormalities in hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) [J]. *Toxicology*, 2007, 232(3):286-293
- [11] Kim TS, Jung KK, Kim SS, et al. Effects of in utero exposure to Di(n-butyl)phthalate on development of male reproductive tracts in Sprague-Dawley rats [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2010, 73(21-22):1544-1559
- [12] 胡玉霞, 巩海亮. 邻苯二甲酸二丁酯建立尿道下裂大鼠模型的实验研究 [J]. *中国医药导刊*, 2014, 16(11):1422-1423
- [13] Barlow NJ, Phillips SL, Wallace DG, et al. Quantitative change in gene expression in fetal rat testes following exposure to di-n-butyl phthalate [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 73(2):431-441
- [14] Zhang LF, Qin C, Wei YF, et al. Differential expression of the Wnt/ β -catenin pathway in the genital tubercle (GT) of fetal male rat following maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2011, 57(5):244-250
- [15] 张鸿毅, 崔 洁. 邻苯二甲酸类物质与尿道下裂发生相关性的研究进展 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2015, 36(11):875-877
- [16] Kapranov P, Willingham AT, Gingeras TR. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(6):413-423
- [17] Kapusta A, Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications [J]. *Trends Genet*, 2014, 30(10):439-452
- [18] 张彩虹. 泌尿系统相关疾病中链非编码RNA表达变化的研究进展 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2015, 35(3):46-49
- [19] Chen J, Miao Z, Xue B, et al. Long non-coding RNAs in urologic malignancies: Functional roles and clinical translation [J]. *J Cancer*, 2016, 7(13):1842-1855

[收稿日期] 2017-07-27

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。