

· 基础研究 ·

血管内皮生长因子基因 3'UTR 不同基因型载体的构建与鉴定 *

汪玉洁^{1#} 白云^{2#} 薛兴阳³ 金磊² 王颖² 王升跃^{1,2△}

(1 复旦大学 生命科学院 微生物学和微生物工程系 上海 200433 ;

2 省部共建疾病与健康基因组学国家重点实验室 , 国家人类基因组南方研究中心 上海 201203 ;

3 广州医学院附属肿瘤医院 广东 广州 510095)

摘要 目的 : 构建含 SNP 位点的血管内皮生长因子 (VEGF) 基因 3'UTR 的荧光素酶报告基因载体 , 为进一步揭示 VEGF 基因 3'UTR 的单核苷酸多态性 (SNP) 影响肺癌发病风险的分子机制奠定基础。方法 : 以 rs3025039 和 rs3025040 两个位点均为 C 纯合子的非癌症病人血液 DNA 为模板 , 扩增出两位点为 C/C 单体型、长度为 1448 bp 的 VEGF 基因 3'UTR 目的片段 , 测序验证后将其克隆至 pMIR-REPORT 荧光素酶报告基因载体上 , 得到重组质粒 pMIR-C/C。同时 , 我们以 pMIR-C/C 为模板定点突变两个 SNP 位点 , 得到具有 T/T 单体型重组质粒 pMIR-T/T。将各重组质粒转化大肠杆菌 DH10B , 筛选阳性克隆后提取质粒进行双酶切鉴定及 DNA 测序鉴定。结果 : 单菌落质粒测序验证显示带有 C/C 单型型的 VEGF 基因 3'UTR 重组质粒 pMIR-C/C 构建成功 , 经两次定点突变 , 成功将 pMIR-C/C 质粒转变为 pMIR-T/T , 经测序验证未引入任何其他突变。同时生物信息学预测还显示 rs3025040 位点位于 miR-199a/b 与 VEGF 基因 mRNA 的结合位置 , 其改变可以影响 miRNA 与 mRNA 的结合效率。结论 : 本研究成功构建了含有两个连锁 SNP 的 VEGF 基因 3'UTR 的荧光素酶报告基因载体 , 为今后 VEGF 基因 3'UTR 的功能研究奠定基础。

关键词 : VEGF 基因 , 单核苷酸多态性 , 3'UTR , 荧光素酶报告基因载体

中图分类号 : Q751 , Q78 文献标识码 : A 文章编号 : 1673-6273(2012)06-1001-05

Construction and Identification of Eukaryotic Expression Vectors Including SNPs in VEGF gene 3'UTR*

WANG Yu-jie[#], BAI Yun[#], XUE Xing-yang³, JIN Lei², WANG Ying², WANG Sheng-yue^{1,2△}

(1 Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2 Shanghai-MOST Key Laboratory of Health and Disease Genomics, China National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China;

3 Guangzhou Medical University Cancer Institute and Hospital 510095, China)

ABSTRACT Objective: To construct luciferase reporter gene vectors containing vascular endothelial growth factor (VEGF) gene 3'UTR with two SNP sites and to detect microRNA binding stability in different genotype VEGF gene 3'UTR. **Methods:** Non-cancer patients' genomic DNA with C/C homozygote in the two linked SNP sites (rs3025039 and rs3025040) was used as a PCR template to amplify 1448bp 3'UTR of VEGF gene. After the PCR product was cloned into the pMIR-REPORT luciferase miRNA expression report vector, this pMIR-C/C vector was used as PCR template to construct the pMIR-T/T by site-specific mutagenesis. Both pMIR-C/C and pMIR-T/T vectors were transferred into E.coli DH10B and verified by double-enzyme digestions and DNA sequencing. **Results:** Two recombinant plasmids were successfully constructed and the sequences of them were the same as expected. Furthermore, the bioinformatics analysis suggested that rs3025040 T allele may increase miR-199 a/b regulation of VEGF gene expression. **Conclusions:** Luciferase reporter vectors pMIR-REPORT-VEGF 3'UTR containing two SNPs homozygotes in VEGF gene 3'UTR were successfully constructed and these constructions of the recombinant plasmids will be further studied in related SNP function analysis in lung cells.

Key words: VEGF gene; Single-nucleotide polymorphism; 3'UTR; Luciferase reporter gene vector

Chinese Library Classification: Q751 , Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)06-1001-05

前言

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种对血管生成有极强诱导作用的蛋白质 , 它可由肿瘤细胞、血管内皮细胞和巨噬细胞合成 , 并通过自分泌和旁

分泌方式特异地作用于血管内皮细胞上的受体 , 从而促进内皮细胞的生长、增殖、迁移、细胞外基质降解等^[1]。流行病学研究发现 VEGF 基因 3' 非翻译区 (3'UTR) 的 SNP rs3025039 可以影响多种肿瘤的发病风险 , Krippel P 等研究发现 VEGF 基因 SNP rs3025039 的 T 基因型可以明显降低个体 VEGF 的表达水平 ,

* 基金项目 : 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目子项目 (2005CB522407) , 国家青年科学基金项目 (30901240)

作者简介 : # 两位作者贡献相同 , 汪玉洁 (1986-) , 女 , 硕士研究生 , 白云 (1977-) , 男 , 博士后

△ 通讯作者 : 王升跃 , 男 , 研究员 , E-mail: wangsy@chgc.sh.cn

(收稿日期 : 2011-09-16 接受日期 : 2011-10-10)

从而降低个体乳腺癌的发病风险^[2]; Heist RS 等还发现 rs3025039 位点的 T 基因型可以提高非小细胞肺癌患者的手术后生存率^[3]。本课题组前期的研究通过 HapMap 检索发现 VEGF 基因 3'UTR 的两个 SNP 位点 rs3025039 与 rs3025040 完全连锁,然而截至到目前该两位点的具体生物学机制还不十分清楚。鉴于此,本研究拟构建含 SNP rs3025039 和 rs3025040 两相互连锁位点的 VEGF 基因 3'UTR 荧光素酶表达载体,为今后探索它们的生物学功能奠定基础。同时本研究还应用生物信息学方法对所研究的 VEGF 基因 3'UTR SNP rs3025039 和 rs3025040 两个位点与特定 microRNA(miRNA)的结合效率进行预测,初步探索该 SNP 位点起作用的生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

非癌症病人血液 DNA 由广州肿瘤医院提供; 荧光素酶报告基因载体 pMIR-REPORT(AM5795)购自 Applied Biosystems Inc 公司, 定点突变试剂盒 Muta-direct™(SDM-15)购自北京赛百盛基因技术有限公司, 限制性内切酶 *Hind* (#R0104V)和 *Mlu* I(#R0198V)购自 NEB 公司, T4DNA 连接酶(M180A)购自 Promega 公司, Ex Taq DNA 聚合酶 (DRR001A) 购自 TaKaRa 公司, 质粒提取试剂盒(DP103-02)购自 TIANGEN 公司, 胶纯化回收试剂盒(AP-GX-250)购自 AXYGEN 公司, 感受态细胞 *E.coli* DH10B 和培养基等其他试剂均由南方中心实验室提供。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成, PCR 产物和质粒测序均由本中心测序完成。

1.2 引物设计与目的基因获得

以含有 rs3025039 和 rs3025040 两个 SNP 位点, 长度为 1448bp 的 VEGF 基因 3'UTR 为目的基因, 用 Primer 3 在线引物设计软件设计两端引物, 并且在正义链 5' 末端加上保护碱基和 *Mlu* 酶切位点, 反义链 5' 末端加上保护碱基和 *Hind* 酶切位点, 得到引物序列如下:

正向引物 5'-GTAGACGCGTGGAACACAGATCTCT-CACCA-3',

反向引物 5'-TCCAAAGCTTGGGCAGAGCTGAGTGT-TAGC-3'

以肺部正常组织 DNA 为模板, 按以下条件进行 PCR 反应: 94℃ 5min 第 1 次循环, 94℃ 1min、60℃ 1min、72℃ 1.5min, 35 个循环, 72℃ 10min 1 个循环。反应产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 切胶回收后测序检测, 筛选出两个 SNP 位点均为 C/C 纯合子的 PCR 产物, 并且将其与 T 载体连接, 电击转化入感受态细胞 *E.coli* DH10B, 培养后再次对质粒测序验证以保证引物两端序列正确。

1.3 两种重组质粒的获得

分别将上述扩增出的 VEGF 基因 3'UTR 区 PCR 产物和 pMIR-REPORT 载体用 *Mlu* 和 *Hind* 双酶切 37℃ 温育 2h、电泳分离、目的片段切胶纯化后回收, 计算比例(目的片段摩尔数:载体摩尔数=3:1~10:1)后在 T4DNA 连接酶作用下 16℃ 水浴连接过夜, 使目的片段插入线性化后的 pMIR-REPORT 载体中, 次日取出连接液于 70℃ 水浴 10min 灭活连接酶, 得到重组质粒 pMIR-C/C, 经电击转化入感受态细胞 *E.coli* DH10B, 涂

在含有氨苄霉素的 LB 琼脂培养基上 37℃ 过夜培养, 挑取单克隆, 放入 3mL LB 培养液 37℃ 摇床(250rpm)过夜培养, 根据质粒提取试剂盒操作说明书提取目的重组质粒 pMIR-C/C 后进行双酶切鉴定和测序验证。

根据定点突变试剂盒 Muta-direct™ 的说明, 以验证正确的重组质粒 pMIR-C/C 为模板, 通过两对互补引物(下划线加粗代表突变位点)对两个位点逐次定点突变:

rs3025039 突变引物:

5'-GGCGGGTGACCCAGCATGGTCCCTCTTGAATT-3',
5'-AATTCCAAGAGGGACCATGCTGGGTACCCGCC-3';

rs3025039 位点 C→T 定点突变 PCR 反应: 95℃ 30s 第 1 次循环, 95℃ 30s、55℃ 1min、72℃ 8min, 18 个循环, 72℃ 10min 1 个循环, 将 rs3025039 位点由 C 突变为 T。在 PCR 产物中加入 1μl (10U/μl) Mutazyme™ 酶 37℃ 温育 1h, 消化甲基化质粒从而选择突变质粒即有缺口的重组质粒 pMIR-T/C, 经电击转化入感受态细胞 *E.coli* DH10B, 涂在含有氨苄霉素的 LB 琼脂培养基上 37℃ 过夜培养, 得到环化的重组质粒 pMIR-T/C, 挑取单克隆, 3mL LB 培养液 37℃ 摇床(250rpm)过夜培养, 提取重组质粒 pMIR-T/C 后测序验证。

rs3025040 突变引物:

5'-ACAGGGATGAGGACACTGGCTCT-GACCAGGAGT-3' 5'-ACTCCTGGTCAGAGCCAGTGTCT-CATCCCTGT-3',

以验证正确的重组质粒 pMIR-T/C 为模板, rs3025040 位点 C→T 定点突变 PCR 反应: 95℃ 30s 第 1 次循环, 95℃ 30s、55℃ 1min、72℃ 8min, 18 个循环, 72℃ 10min 1 个循环, 将 rs3025040 位点由 C 突变为 T。同理在 PCR 产物中加入 1μl (10U/μl) Mutazyme™ 酶 37℃ 温育 1h, 消化甲基化质粒从而选择突变质粒即有缺口的重组质粒 pMIR-T/T, 经电击转化入感受态细胞 *E.coli* DH10B, 涂在含有氨苄霉素的 LB 琼脂培养基上 37℃ 过夜培养, 得到环化的重组质粒 pMIR-T/T, 挑取单克隆, 3mL LB 培养液 37℃ 摇床(250rpm)过夜培养, 提取目的重组质粒 pMIR-T/T 后进行双酶切鉴定和测序验证。

1.4 生物信息学预测 VEGF 基因 3'UTR 的 SNP 位点与 miRNA 的结合性

应用 miRSNP 数据库(<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>)^[4], 找出 VEGF 基因 SNP rs3025039 和 rs3025040 两位点的相关 miRNA; 运用 RNAhybrid(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>)^[5]预测 VEGF 3'UTR 的两个 SNP 位点和成熟 miRNA 分子的结合效率。

2 结果

2.1 VEGF 基因目的片段的获得

以非癌症病人血液基因组 DNA 为模板, 在引物中分别引入 *Mlu* 和 *Hind* 酶切识别序列, 扩增得到含有 rs3025039 和 rs3025040 两个 SNP 位点的 VEGF 基因 3'UTR 基因片段。PCR 结果如图 1 所示, 扩增的片段大小与预期相符。

2.2 重组质粒双酶切检测和测序鉴定

经过 *Mlu* 和 *Hind* 双酶切, C/C 纯合型的 VEGF 基因 3'UTR 片段与 pMIR-REPORT 载体连接重组, 并转化到感受态细胞中。挑选成功长出单克隆的菌株进行小规模培养后抽提质

粒,再用 *Mlu* 和 *Hind* 对重组质粒 pMIR-C/C 进行双酶切验证,电泳结果如图 2 的第一泳道所示,目的片段大小为 1448bp。

以重组质粒 pMIR-C/C 为模板经过一次 rs3025039 位点的 C→T 定点突变后,得到突变的中间质粒 pMIR-T/C,挑选成功长出单克隆的菌株,测序验证正确后进行小规模培养后抽提质粒;再以该中间质粒 pMIR-T/C 为模板经过一次 rs3025040 位点的 C→T 定点突变后,得到突变的重组质粒 pMIR-T/T。

同理挑选成功长出单克隆的菌株进行小规模培养后抽提质粒,再用 *Mlu* 和 *Hind* 对重组质粒 pMIR-T/T 进行双酶切验证,电泳结果如图 2 的第二泳道所示,目的片段大小也为 1448bp。

我们采用 ABI 3730xl 测序仪对各个重组质粒进行测序验证,如图 3 所示 A、B 和 C、D 分别表示重组质粒 pMIR-C/C 和 pMIR-T/T,由图可见 rs3025039 和 rs3025040 两位点的 C 基因型在重组质粒 pMIR-T/T 中均成功转变成 T 基因型。

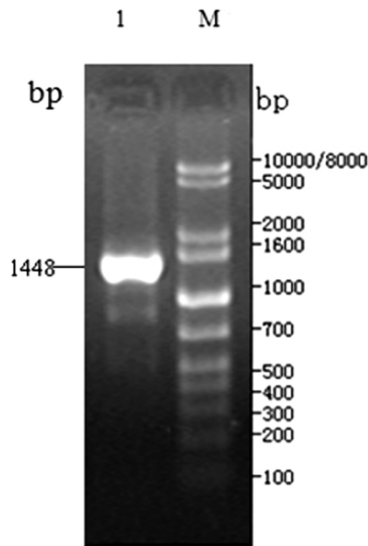


图 1 3'UTR PCR 电泳图 1:1448bp VEGF 基因 3'UTR 片段, M:1 kb plus DNA Marker

Fig. 1 3'UTR PCR electrophoresis, 1: 1448bp VEGF 3'UTR; M: 1 kb plus DNA Marker

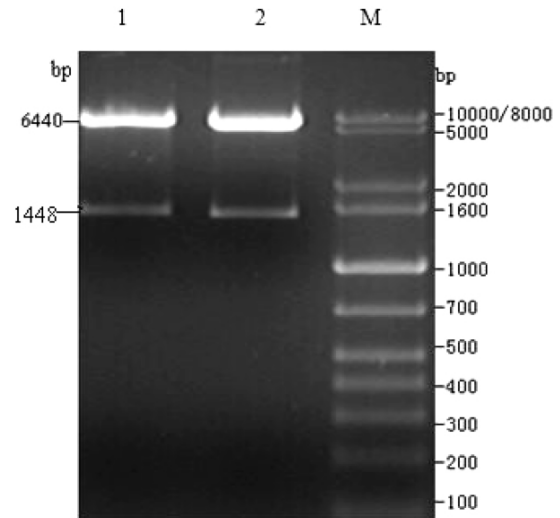


图 2 重组质粒 pMIR-C/C 和 pMIR-T/T 双酶切鉴定 1: 重组质粒 pMIR-C/C 2: 重组质粒 pMIR-T/T; M: 1 kb plus DNA Marker

Fig. 2 *Mlu* and *Hind* enzyme identification of the recombinant plasmid pMIR-C/C and pMIR-T/T 1: pMIR-C/C 2: pMIR-T/T; M: 1 kb plus DNA Marker

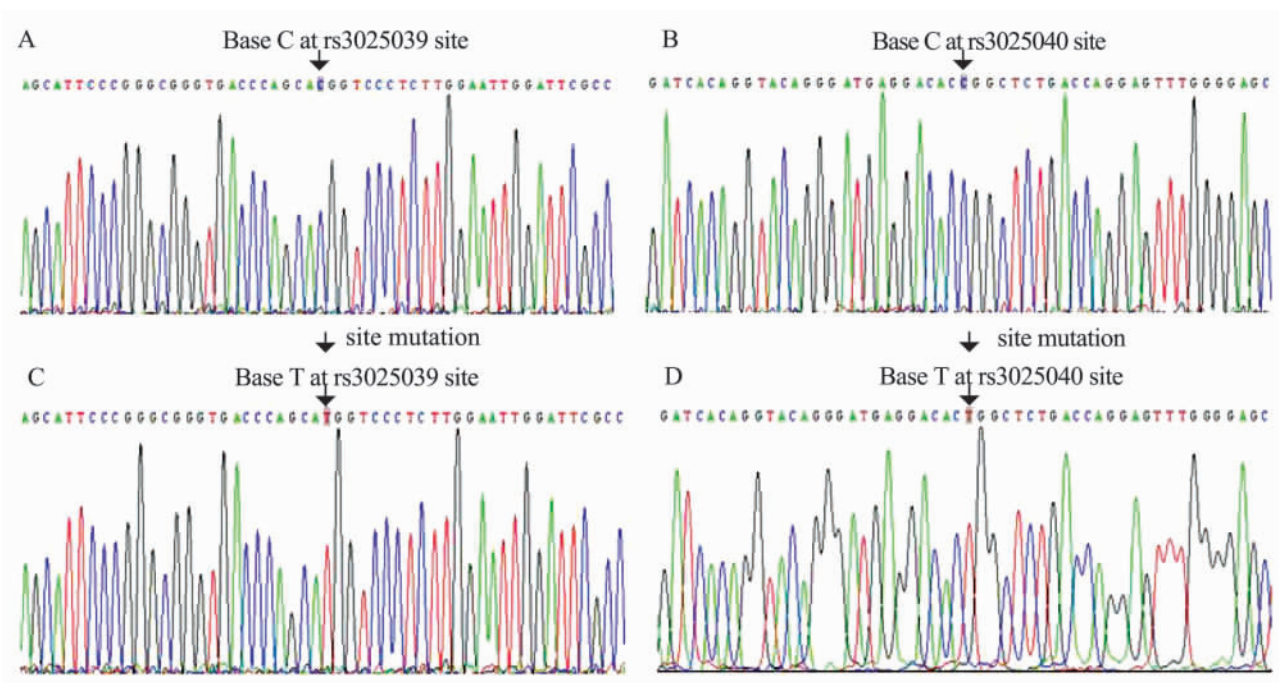


图 3 rs3025039 和 rs3025040 处两个 SNP 位点由 C 突变为 T 的测序验证图, A :rs3025039 位点为碱基 C ; B :rs3025040 位点为碱基 C ; C :rs3025039 位点定点突变为碱基 T ; D :rs3025040 位点定点突变为碱基 T

Fig. 3 Plasmid sequencing validation of two SNPs at rs3025039 and rs3025040 mutated C into T respectively, A :Base C at rs3025039 site; B :Base C at rs3025040 site; C :Base T at rs3025039 site after site mutation; D :Base T at rs3025040 site after site mutation

将重组的真核表达载体 pMIR-C/C 和 pMIR-T/T 的插入片段序列与 NCBI 公布的 VEGF 基因 3' UTR 序列进行核酸比对验证,证实克隆得到的目的片段为 VEGF 基因 3'UTR 序列(如

图 4),两载体插入片段除两个 SNP 位点外未引入任何其他突变,可以进行 3'UTR 的不同单体型 SNP 与 miRNA 相互作用对 VEGF 基因表达影响的相关功能研究。

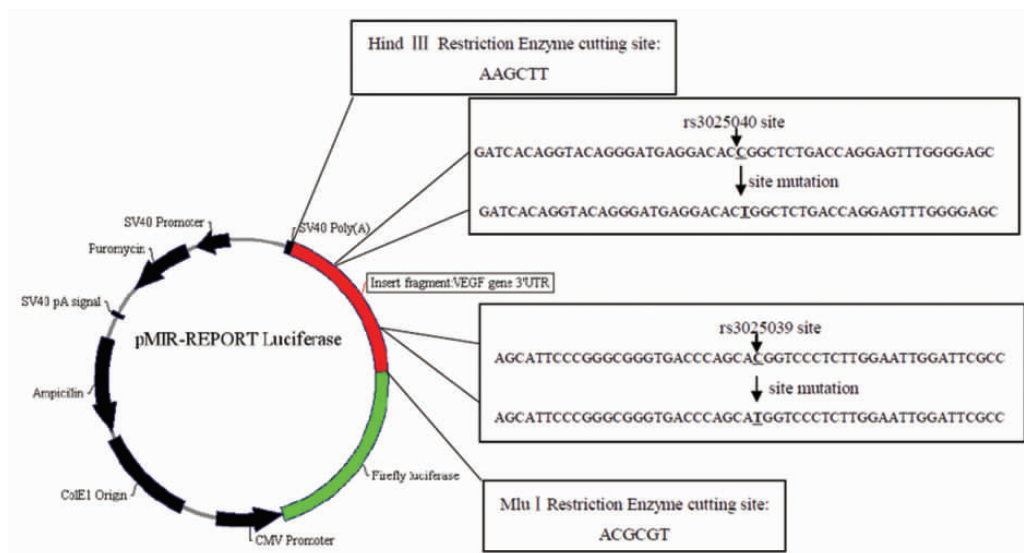


图 4 重组质粒 pMIR-C/C 和 pMIR-T/T 示意图

Fig. 4 Schematic diagram of recombinant plasmid pMIR-C/C and pMIR-T/T

2.3 确定 VEGF 基因 3'UTR SNP 位点以及与相关 miRNA 的结合效率

我们检索 miRSNP 数据库,发现 VEGF 基因 SNP rs3025039 和 rs3025040 两位点分别位于 miR-591、miR-199a 和 miR-199b 的结合位点。从理论上来说,成熟 miRNA 分子的 5' 端与结构基因的 3'UTR 区结合越紧密,则越容易导致结构基因的 mRNA 降解,而在 miRNA 结合位点上的 SNP 往往会影响 miRNA 与 mRNA 的结合效率,从而影响 mRNA 的表达水平。因此,本研究中我们进一步运用 RNAhybrid 进行不同基因型

RNA 结合效率比较,结果如图 5 所示,其中尤以 has-miR-199a 和 has-miR-199b 最为明显。成熟 miRNA has-miR-199a 的 5' 端与 rs3025040 位点 T 基因型的最小折叠自由能 (Minimal folding free energy, MFE) 为 -27.6kcal/mol,明显低于 C 基因型的 -23.1kcal/mol,要破坏该结合所需的自由能更大,miRNA 结合得更紧密,因此,T 基因型更易导致 VEGF 基因 mRNA 降解。同理成熟 has-miR-199b 的 5' 端也可以与 rs3025040 位点的 T 基因型结合得更紧密,从而更易降解 VEGF 基因 mRNA。

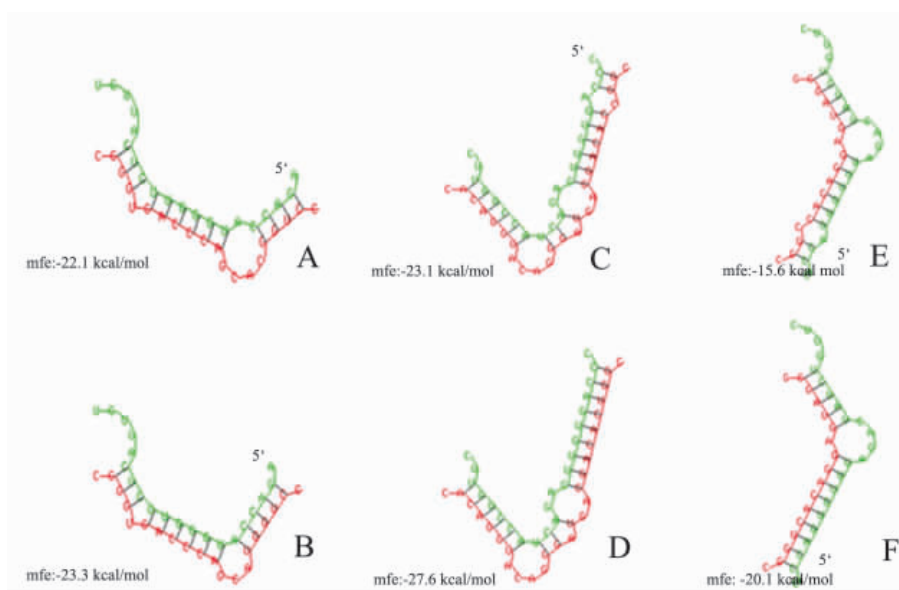


图 5 VEGF 基因 3'UTR mRNA 与相关 miRNA 的结合效率(自由能负值越大二级结构越稳定 红色 3'UTR 绿色 miRNA) A: hsa-miR-591 与 rs3025039 位点的碱基 C 互作 B: hsa-miR-591 与 rs3025039 位点的碱基 T 互作 C: hsa-miR-199a 与 rs3025040 位点的碱基 C 互作 D: hsa-miR-199a 与 rs3025040 位点的碱基 T 互作 E: hsa-miR-199b 与 rs3025040 位点的碱基 C 互作 F: hsa-miR-199b 与 rs3025040 位点的碱基 T 互作

Fig. 5 Hybridization efficiencies between VEGF 3'UTR pre-mRNA and related miRNAs (larger negative free energy, more stable secondary structure; Red: 3'UTR, Green: miRNA) A: hsa-miR-591 & rs3025039 C hybridization B: hsa-miR-591 & rs3025039 T hybridization C: hsa-miR-199a & rs3025040 C hybridization D: hsa-miR-199a & rs3025040 T hybridization E: hsa-miR-199b & rs3025040 C hybridization F: hsa-miR-199b & rs3025040 T hybridization

3 讨论

在所有生物的基因表达中,结构基因的3'UTR是非常重要的调控元件,它包括了介导发育进程的空间调控元件(SCR)、维持 mRNA 稳定的胞质聚腺苷酸化元件(CPE)、调控转录产物的命运和特殊基因的表达的富含 "A" 区和富含 "U" 区等^[6]。近几年随着 miRNAs 研究的不断深入,发现生物的 3'UTR 具有更广泛的生物学功能,其可以与机体内的多种 miRNAs 互补结合,调控自身基因的表达^[7]。比较典型的例子是在大鼠肉瘤中发现的 Ras 蛋白表达调控,Johnson SM 等发现人类 RAS 基因的 3'UTR 包含多个与 let-7 miRNA 家族结合的位点,而且 let-7 miRNA 的高表达能够降低原癌基因 RAS 的表达水平^[8]。最近有文献报道在 VEGF 基因 3'UTR 也存在多个 miRNAs 的结合位点^[9],从而提示 VEGF 基因的表达也同样受多种 miRNAs 的调控。

在 miRNA 靶基因结合位点上的基因变异如 SNP,可以影响 miRNA 与靶基因 mRNA 的亲和力,改变该基因的降解程度,从而影响特定基因的表达^[10]。Nicoloso MS 等人发现 TGF- β 1 基因 3'UTR rs334348 不同基因型的荧光素酶质粒和 miR-628-5p 分子共转染入 MCF7 细胞后,G 基因型细胞的荧光素酶活性明显低于 A 基因型,从而说明 SNP rs334348 与乳腺癌易感性有关^[11]。通过报告基因沉默实验,Sethupathy P 等发现位于 AGTR1 基因 3'UTR 的 SNP rs5186 的 A 基因型可以与位于 21 号染色体的 miR-155 相互作用,抑制 AGTR1 基因的表达,并由此证实 rs5186 在患者血压调控中的作用^[12]。本研究中我们首次通过检索 miR SNP 数据库,发现 VEGF 基因 SNP rs3025039 和 rs3025040 两位点分别位于 miR-591、miR-199a 和 miR-199b 的结合位点,且 SNP 的基因型变化可以影响 miRNA 与 mRNA 的结合效率,由此我们推测该两位点可能通过以上机制影响 VEGF 基因的表达。

综上所述,十几年来 VEGF 在血管生成调节方面的作用一直是人们研究的焦点之一。Linderholm B 等发现 VEGF 可以明显促进乳腺癌的生长,其表达水平高者,肿瘤体积较大且恶性程度较高^[13]。Masuya D 等在对肺癌的研究中也发现 VEGF 的表达水平与肺癌的肿瘤局部淋巴结远处转移分期(TNM)密切相关^[14]。而围绕 VEGF 基因多态性在血管生成与肿瘤生长中的作用也进行了大量的研究^[15]。本实验首次借助 pMIR-REPORT 载体和基因突变技术成功构建了含 rs3025039 和 rs3025040 两 SNP 位点不同单体型的 VEGF 基因 3'UTR 报告基因载体,不仅为研究 VEGF 基因与 microRNA 相互作用提供方便,也为 VEGF 基因 3'UTR 区 SNP 的相关功能研究奠定基础。除此之外,以往研究证实 VEGF 基因 3'UTR 区多态性可以影响多种癌症的易感性,然而其机制一直不清楚。本研究首次将该 SNP 与相关 miRNA 的交互作用相联系,提出 VEGF 基因 3'UTR 多态性可以影响相关 miRNA 与基因 mRNA 结合的假说,并通过

生物信息学分析证实 rs3025040 位点 T 基因型可以促进 miR-199a/b 与 VEGF 基因的结合,这些均为将来该位点的功能研究提供参考。

参考文献(References)

- [1] Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8: 579-591
- [2] Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106:468-471
- [3] Heist RS, Zhai RH, Liu G, et al. VEGF Polymorphisms and Survival in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 856-862
- [4] Bao L, Zhou M, Wu L, et al. PolymirTS Database: linking polymorphisms in microRNA target sites with complex traits [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 00: D1-D4
- [5] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes [J]. *RNA*, 2004, 10:1507-1517
- [6] Rosende SS, Becerra M, Salgado MT, et al. Growth phase-dependent expression of *Kluyveromyces fragilis* genes and involvement of 3'-UTR elements [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43: 1153-1157
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function [J]. *Cell*, 2004, 116:281-297
- [8] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family [J]. *Cell*, 2005, 120: 635-647
- [9] Hua Z, Lv Q, Ye W, et al. MiRNA-Directed Regulation of VEGF and Other Angiogenic Factors under Hypoxia [J]. *PLoS ONE*, 2006, 1: e116
- [10] Clop A, Marcq F, Takeda H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep [J]. *Nature Genetics*, 2006, 38:813-818
- [11] Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms Inside MicroRNA Target Sites Influence Tumor Susceptibility [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 2789-2798
- [12] Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3'untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes [J]. *Am. J. Hum. Genet*, 2007, 81: 405-413
- [13] Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, et al. p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma [J]. *Int. J. Cancer*, 2000, 89: 51-62
- [14] Masuya D, Huang CL, Liu D, et al. The Intratumoral Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8 Associated with Angiogenesis in Non-small Cell Lung Carcinoma Patients [J]. *Cancer*, 2001, 92(10):2628-2638
- [15] Ferrara N, Gerber HP, Coughlin JL. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(6): 669-676