

## • 基础研究 •

**ADH1B 对鼻咽癌细胞的增殖及迁移能力的影响\***吴梦鸽, 张睿, 刘芮吟, 费继敏<sup>△</sup>, 杨翠萍<sup>△</sup>

650118 昆明, 昆明医科大学第三附属医院 头颈外二科(吴梦鸽、张睿、刘芮吟、费继敏); 650223 昆明, 中国科学院昆明动物研究所(杨翠萍)

**[摘要]** 目的: 鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)已成为我国头颈肿瘤患者的主要病死因素之一, 局部治疗失败和远处转移是晚期 NPC 患者不良预后的主要原因。大量研究证明, *ADH1B* 是多种癌症的风险基因, 本研究探讨 *ADH1B* 在鼻咽癌细胞中的表达差异以及对鼻咽癌细胞增殖和迁移能力的影响。方法: 利用生物信息学方法分析 *ADH1B* 在头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)与正常组织中的相对表达量, 应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测正常永生鼻咽上皮细胞 NP69 及鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、5-8F、6-10B 中 *ADH1B* 的 mRNA 表达水平, 对比两种研究结果的一致性。在此基础上建立稳转 *ADH1B* 高表达鼻咽癌细胞系, 以 pCDH 作为空载体对照。利用生长曲线实验检验鼻咽癌细胞的增殖能力, 利用划痕实验检验鼻咽癌细胞的迁移能力。结果: 生物信息学分析结果显示 *ADH1B* 在头颈鳞状细胞癌中表达量低于正常组织。qRT-PCR 检测发现, *ADH1B* 在鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、5-8F、6-10B 中均比 NP69 细胞表达低, 过表达 *ADH1B* 组鼻咽癌细胞的生长曲线低于 pCDH 组( $P < 0.05$ ), 划痕愈合速度也低于正常表达组 pCDH 组( $P < 0.05$ )。结论: 鼻咽癌细胞中 *ADH1B* 基因表达异常, 明显低于正常鼻咽上皮细胞, 与生物信息学分析结果一致。*ADH1B* 基因在鼻咽癌中高表达影响鼻咽癌细胞的增殖和迁移, 这与 NPC 的发生发展密切相关, 可能是参与调控 NPC 发生发展的一个重要靶标。

**[关键词]** *ADH1B*; 鼻咽癌细胞; 增殖; 迁移**[中图分类号]** R739.62; R739.63 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.06.002

引文格式: Wu MG, Zhang R, Liu RY, et al. Effect of *ADH1B* on proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Cancer Control Treat, 2019, 32(6): 480-485. [吴梦鸽, 张睿, 刘芮吟, 等. *ADH1B* 对鼻咽癌细胞的增殖及迁移能力的影响[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(6): 480-485.]

**Effect of *ADH1B* on Proliferation and Migration of Nasopharyngeal Carcinoma Cells**

Wu Mengge, Zhang Rui, Liu Ruiyin, Fei Jimin, Yang Cuiping

Second Department of Head and Neck Surgery, Yunnan Cancer Hospital & Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University & Yunnan Cancer Center, Kunming 650118, Yunnan, China (Wu Mengge, Zhang Rui, Liu Ruiyin, Fei Jimin); Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Kunming 650223, Yunnan, China (Yang Cuiping)

**Corresponding author:** Fei Jimin, E-mail: jiminf2015@163.com; Yang Cuiping, E-mail: cuipingyang@mail.kiz.ac.cn

This study was supported by Foundation for High-Level Technical Talents Training Project of the Health Planning Commission of Yunnan Province (NO. D-201659)

**[Abstract]** **Objective:** Nasopharyngeal carcinoma (NPC) has become the main cause of death in head and neck cancer in China. Failed local treatment and distant metastasis are the main causes of poor prognosis in patients with advanced NPC. A large number of studies have shown that *ADH1B* is a risk gene for a variety of cancers. This study investigated the differential expression of *ADH1B* in NPC cells and its effect on the proliferation and migration of NPC cells. **Methods:** Bioinformatics analysis was performed to compare

**[收稿日期]** 2019-03-09 **[修回日期]** 2019-04-22**[基金项目]** \* 云南省卫计委高层次卫生技术人才培养项目(编号: D-201659)**[通讯作者]** <sup>△</sup> 费继敏, E-mail: jiminf2015@163.com; 杨翠萍, E-mail: cuipingyang@mail.kiz.ac.cn

the relative expression of *ADH1B* in head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) and normal tissue. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression level of *ADH1B* in NP69, a normal immortalized nasopharyngeal epithelial cell, and in CNE-1, CNE-2, 5-8F and 6-10B, NPC cells. On this basis, a stable NPC cell line which highly expresses *ADH1B* and a

pCDH empty vector control was established. The growth curve experiment was used to test the proliferative ability of NPC cells, and the scratch wound healing assay was used to test the migration ability of NPC cells. **Results:** Bioinformatics analysis showed that *ADH1B* expression in HNSC was lower than that in normal tissue. *ADH1B* expression was lower in CNE-1, CNE-2, 5-8F, and 6-10B than in NP69 cells. The proliferation of NPC cells in the over-expressed *ADH1B* group was lower than that in the pCDH group ( $P < 0.05$ ), and the wound healing rate in the former was lower than that in the latter ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of *ADH1B* in NPC cells was significantly lower than that in normal nasopharyngeal epithelial cells, which was consistent with results of bioinformatics analysis. The high expression of *ADH1B* in NPC affects the proliferation and migration of NPC cells, which is closely related to and may be an important target for the occurrence and development of NPC.

[**Key words**] *ADH1B*; Nasopharyngeal carcinoma cells; Proliferation; Migration

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种来源于鼻咽上皮细胞的恶性肿瘤,常发生于鼻咽顶后壁的顶部,以低分化鳞状细胞癌和未分化癌最为常见<sup>[1]</sup>。中国人群的 NPC 发病率及死亡率明显高于世界平均水平,目前以约全球 20% 的人口负担全球 NPC 发病死亡的 40%<sup>[2]</sup>,已成为头颈肿瘤的主要癌种和病死因素<sup>[3]</sup>。由于该病具有发病部位隐匿、深在且侵袭、迁移能力强等组织生物学特性,故病变一般发现晚,手术完全切除困难,同步放疗是目前 NPC 的主要治疗方式<sup>[4]</sup>。对于早期 NPC,放疗能有效改善患者的预后,但晚期患者常存在放疗抵抗,超过 20% 的 NPC 患者在治疗后最终发生远处转移,患者 5 年生存率仅为 43.8%<sup>[5]</sup>。晚期 NPC 患者治疗失败等难题至今尚未找到全面解决的良策,故寻找与 NPC 治疗和预后相关的新的分子标志,对 NPC 的临床防治具有重要意义。由基因 *ADH1B* 编码的 ADH1B 蛋白是将乙醇转化为乙醛的主要酶<sup>[6]</sup>。大量的证据表明,*ADH1B* 基因的差异性表达有导致头颈部肿瘤<sup>[7]</sup>、肝癌<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[9]</sup>、胰腺癌<sup>[10]</sup>、结直肠癌<sup>[11]</sup>等癌症的风险,但该基因在 NPC 中的研究甚少。本研究通过测定鼻咽癌细胞株以及正常的鼻咽上皮细胞株中 *ADH1B* 的 mRNA 表达量,并构建鼻咽癌 *ADH1B* 过表达细胞系,利用生长曲线实验及划痕实验来解析 *ADH1B* 对鼻咽癌细胞增殖及迁移能力的影响,旨在为 NPC 的临床治疗提供新思路 and 靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 生物信息学分析 *ADH1B* 在头颈鳞癌中的表达情况

利用生物信息学分析网站 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 来进行分析,数据来源于癌症和肿瘤基因图谱(Cancer Genome Atlas, TCGA)。进入网站,选择用箱图来显示表达量,输入基因为

*ADH1B* 和肿瘤类型为 HNSC,点击分析获得结果和 *P* 值。

### 1.2 细胞培养

永生化正常人鼻咽上皮细胞 NP69、鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、5-8F、6-10B 均由中山大学肿瘤防治中心曾木圣研究员提供,HEK-293T 细胞由中国科学院昆明动物研究所肿瘤信号转导实验室提供。其中 CNE-1、CNE-2、5-8F、6-10B 的培养基为补充有 10% 胎牛血清(GIBCO, 10099141, 澳洲)的 RPMI-1640 培养基(CORNING, 10-040-CVR, 美国),NP69 的培养基为补充有 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基(CORNING, 10-092-CVR, 美国),HEK-293T 的培养基为补充有 10% 胎牛血清的 DMEM/High glucose 培养基(CORNING, 10-013-CVRC, 美国)。所有细胞的培养条件如下:温度为 37℃,并控制 CO<sub>2</sub> 浓度为 5%。细胞长至 80%~90% 传代。

### 1.3 质粒构建与稳转细胞系的建立

针对 *ADH1B* 设计过表达的质粒,对照为 pCDH 空载体。将合成好的 *ADH1B* 的 CDS 区核苷酸序列目的片段连接至载体 pCDH,抽取质粒进行 *Nhe* I (NEB, R3131, 美国)和 *Not* I (NEB, R3189, 美国)酶切鉴定,扩增阳性目的质粒。通过磷酸钙转染法将目的质粒导入 HEK-293T 细胞进行病毒制备,病毒液用 0.45 μM 的滤膜(Millipore, SLHV033RB, 爱尔兰)过滤后感染目的细胞 CNE-1、CNE-2、5-8F、6-10B,使用 polybrene (SantaCruz, sc-134220, 美国)促进感染效率,用相应浓度的嘌呤霉素(invivoGen, ant-pr-1, 美国)筛选阳性细胞,扩增并用 RT-qPCR 鉴定目的基因的过表达效率。

### 1.4 qRT-PCR

首先用 Trizol 法(AMBION, 15596026, 美国)提取细胞总 RNA,用超微量核酸蛋白测定仪(Nanodrop, ND2000, 美国)测定 RNA 浓度,用 PrimeScript 反转试剂盒(Takara, RR047A, 美国),在 PCR 仪

(Biorad, T100, 美国) 进行反转录反应 (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR), 将 RNA 反转成 cDNA。然后在实时荧光定量 PCR 仪 (Life, 7500, 美国) 进行 qPCR 反应, 每个样本设置 3 个重复孔。热循环参数如下: 50℃, 2min; 95℃, 2min; 95℃, 10min; 95℃, 15s, 60℃ 1min, 40 ×。

所用引物由昆明硕擎生物技术有限公司合成, *ADH1B* 的上下游引物分别为: 5'-AAGGGGGCTGTT-TATGGTG-3'; 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。β-actin 的上下游引物分别为: 5'-CATGTACGTTGCTA-TCCAGGC-3'; 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。

### 1.5 生长曲线

为测定细胞增殖能力, 取对数期生长的细胞, 消化制成细胞悬液, 进行浓度测定。按照所需细胞数  $1.0 \times 10^4$ /孔, 用完全培养基配制相应的细胞悬液按照 1 mL/孔种至 12 孔板 (NEST, 712001, 中国), 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 6 天; 每天进行计数, 根据浓度分别算出细胞数, 绘制生长曲线。

### 1.6 细胞划痕实验

分别取一盘 6 孔板 (NEST, 703001, 中国) 中细胞生长状态良好、细胞密度相近的实验组和对照组细胞, 用枪头垂直划痕并在 0h 拍照。放入 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。按 12h、24h 时间点取样, 拍照。将实验组和对照组所有图片进行对比, 得出实验结果。

### 1.7 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。qRT-PCR 和细胞划痕实验采用 *t* 检验, 生长曲线采用重复测量资料的方差分析, 检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。文中 \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ , \*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

## 2 结果

### 2.1 *ADH1B* 在鼻咽癌细胞中的表达被抑制

为了明确 *ADH1B* 在 NPC 中的表达情况, 我们首先在临床肿瘤样本中寻求基因表达谱的变化, 目前已有的基因表达谱中没有 NPC 临床肿瘤组织中的数据, 但是 TCGA 数据中 *ADH1B* 在 519 例 HNSC 患者样本和 44 例正常样本的表达的差异结果显示, *ADH1B* 在肿瘤样本中比正常样本低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。NPC 作为头颈肿瘤的主要癌种和病死因素, 病理类型中 90% 为低分化鳞癌及未分化癌, 推测 *ADH1B* 在 NPC 发生发展中发挥了

重要的作用。因此, 我们分析了 *ADH1B* 在正常永生鼻咽上皮细胞 NP69 及鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、5-8F、6-10B 中的相对 mRNA 表达。结果显示, *ADH1B* 的 mRNA 表达在所有鼻咽癌细胞中显著下调, 分别下调了 99.95%、99.94%、99.97%、99.96% ( $P < 0.001$ , 图 2)。

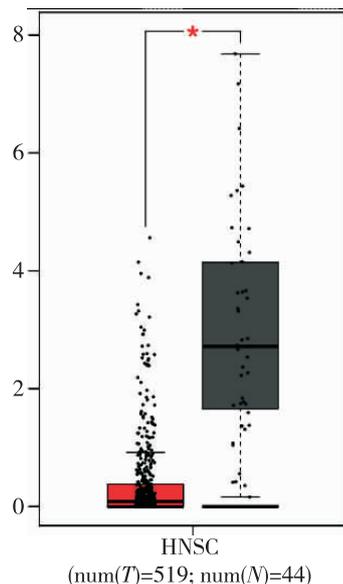


图 1 *ADH1B* 在头颈鳞状细胞癌及正常组织中的相对表达量 (\*  $P < 0.05$ )

Figure 1. Relative Expression of *ADH1B* in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Normal Tissue

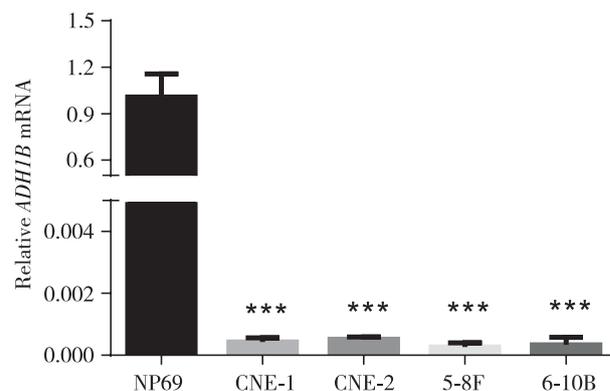


图 2 不同鼻咽癌细胞中 *ADH1B* 的相对 mRNA 表达  
Figure 2. Relative mRNA Expression of *ADH1B* in Different Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines

NP69 (normal immortalized nasopharyngeal epithelial cells) and CNE-1, CNE-2, 5-8F, 6-10B (nasopharyngeal carcinoma cells) were included in analysis. \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 2.2 构建 *ADH1B* 在鼻咽癌细胞中的过表达稳转细胞系

在鼻咽癌细胞中 *ADH1B* 表达被抑制的基础上, 构建 *ADH1B* 过表达载体及对照载体 pCDH, 转

染 HEK-293T 细胞包装病毒后收上清感染鼻咽癌细胞系 CNE-1、CNE-2、5-8F、6-10B, 在  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  的嘌呤霉素作用下, 构建了不同的鼻咽癌稳转细胞系, 并用 qRT-PCR 方法验证了 *ADH1B* 过表达的效率 ( $P < 0.001$ , 图 3), 从实验结果显示四株鼻咽癌细胞均被过表达, 分别过表达了 9 766、1 757、1 032、3 987 倍。

### 2.3 过表达 *ADH1B* 抑制鼻咽癌细胞的增殖能力

肿瘤细胞的特点之一是肿瘤细胞增殖出现异常, 因此利用建立好的 *ADH1B* 稳定过表达细胞系, 通过生长曲线实验来验证其对鼻咽癌细胞增殖能力的影响。生长曲线结果显示, 与对照组 pCDH 相比, 过表达 *ADH1B* 组鼻咽癌细胞的增殖均受到了抑制, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 4)。第 6 天过表达 *ADH1B* 组的细胞数量分别是 pCDH 对照组的

73.75%、70.87%、73.02%、71.52%。

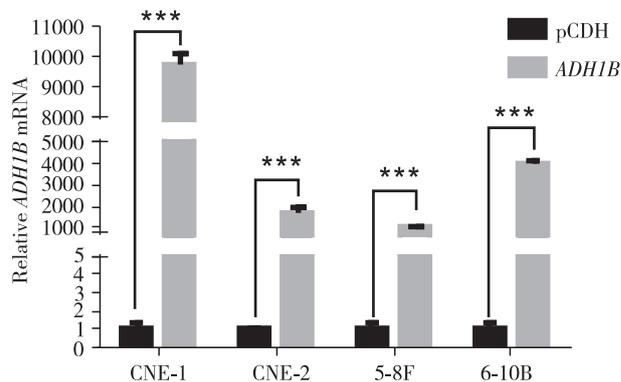


图 3 RT-qPCR 验证鼻咽癌细胞 *ADH1B* 过表达效率  
Figure 3. Efficiency of *ADH1B* (Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line) Overexpression Verified by RT-qPCR  
pCDH was set as control group. \*\*\*  $P < 0.001$ .

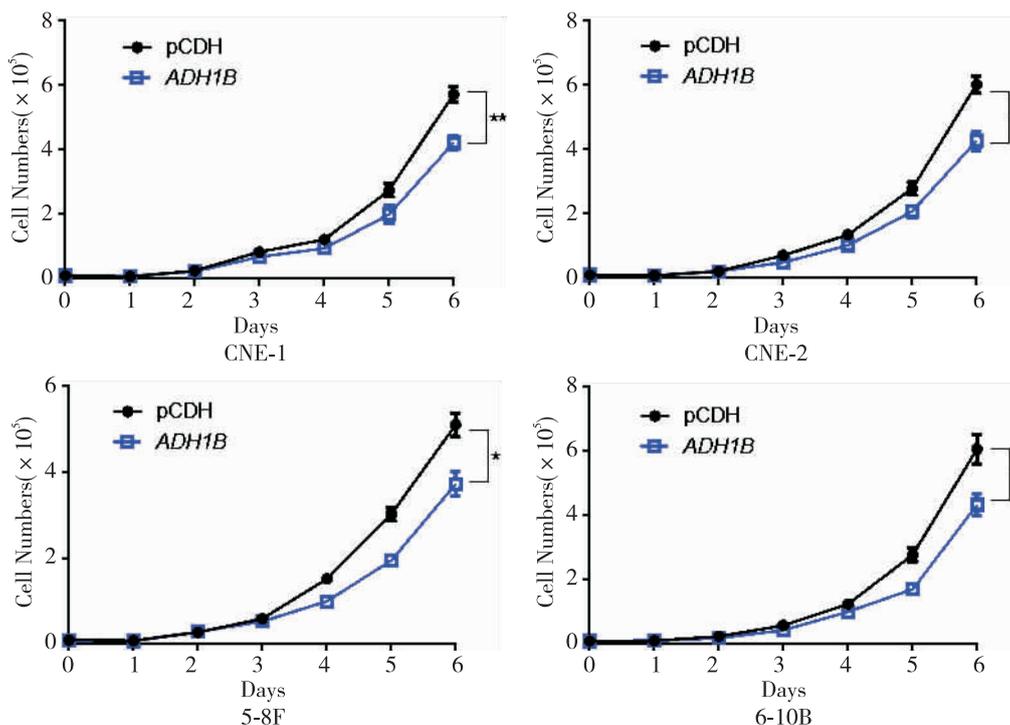


图 4 过表达 *ADH1B* 抑制鼻咽癌细胞的增殖能力 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Figure 4. Proliferation of Nasopharyngeal Carcinoma Cells Inhibited by *ADH1B* Overexpression (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

### 2.4 过表达 *ADH1B* 抑制鼻咽癌细胞的迁移能力

NPC 的另一显著特点即迁移能力强, 因此, 我们设计了细胞划痕实验, 通过比较同一时间点细胞愈合的面积, 发现过表达 *ADH1B* 后鼻咽癌细胞的迁移能力也明显受到抑制 ( $P < 0.001$ , 图 5)。其中 CNE-1 细胞对照组 24h 划痕创口面积为 9.21%, 过表达 *ADH1B* 的实验组划痕创口面积为 36.3% ( $P <$

0.001); CNE-2 细胞对照组 24h 划痕创口面积为 18.1%, 过表达 *ADH1B* 的实验组划痕创口面积为 45.4% ( $P < 0.001$ ); 5-8F 细胞对照组 24h 划痕创口面积为 27.2%, 过表达 *ADH1B* 的实验组划痕创口面积为 44.6% ( $P < 0.001$ ); 6-10B 细胞对照组 24h 划痕创口面积为 25.1%, 过表达 *ADH1B* 的实验组划痕创口面积为 41.2%。

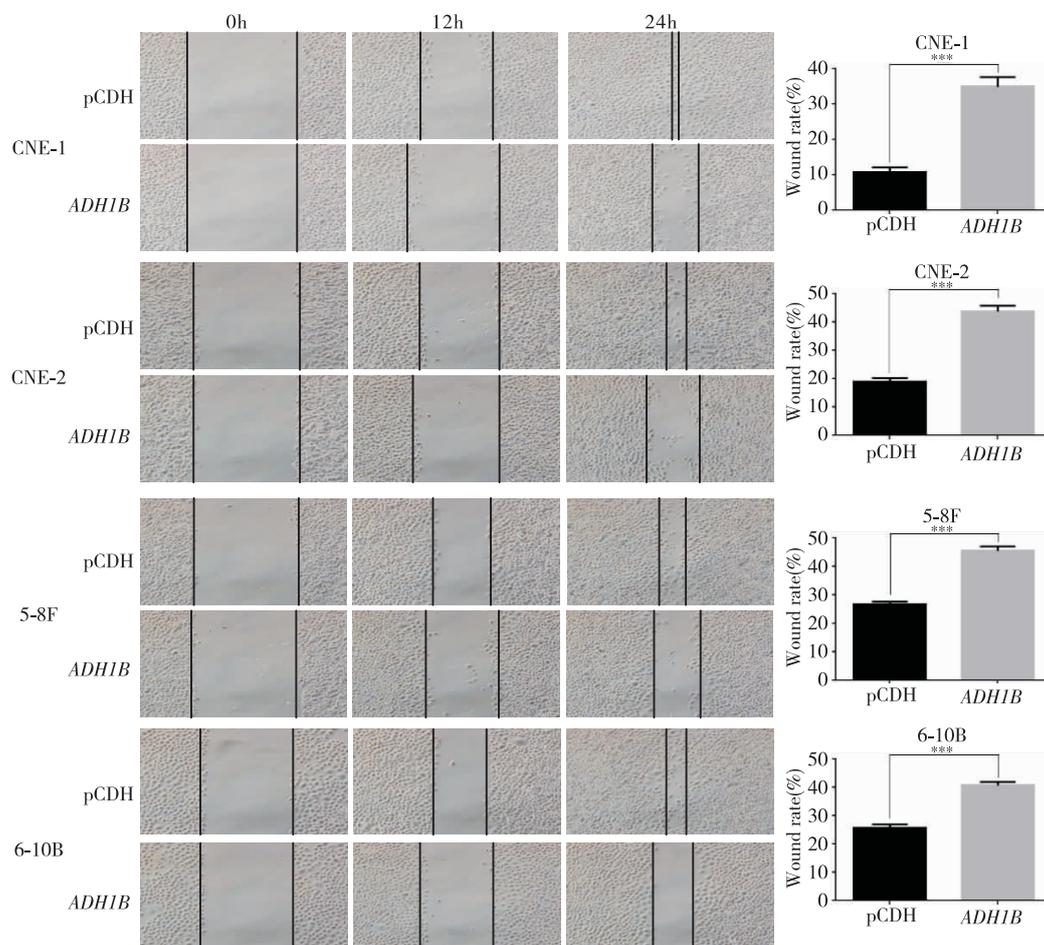


图 5 过表达 *ADH1B* 抑制鼻咽癌细胞的迁移能力 (\*\*\*  $P < 0.001$ )

Figure 5. Migration of Nasopharyngeal Carcinoma Cells Inhibited by *ADH1B* Overexpression (\*\*\*  $P < 0.001$ )

### 3 讨论

我国 NPC 的发病率和死亡率居世界首位,并且在老年人口中相对较高。鉴于我国社会人口老龄化的形势将愈加严峻,未来 NPC 的发病率有可能还会持续上升<sup>[12]</sup>。同步放化疗一直是 NPC 主要和首选的治疗手段。早期 NPC 高度可逆,但局部治疗失败和远处转移仍是晚期 NPC 患者不良预后的主要原因<sup>[13]</sup>。NPC 的病因尚未完全明确,目前认为 NPC 的发生是多因素的,为 EB 病毒 (Epstein-Barr Virus, EBV) 潜伏感染<sup>[14]</sup>、酒精、职业接触粉尘以及吸烟等环境因素相互作用的多步骤发展过程。其中,酒精是 NPC 确定的危险因素<sup>[15-16]</sup>。基于足够的流行病学证据,国际癌症研究机构 (IARC) 已经将酒精饮料定义为“对人类致癌”类食品,如口腔癌、咽癌、喉癌、食道癌、肝癌、结肠直肠癌和女性乳腺癌等。

作为乙醇脱氢酶 (ADH) 家族的一员, *ADH1B* 基因编码 I 类 ADH 的  $\beta$  亚基,是组成功能性酶蛋白的主要亚基, *ADH1B* 基因与其他人 ADH 基因 (*ADH4*,

*ADH5*, *ADH6* 和 *ADH7*) 一起定位于染色体 4q23<sup>[17]</sup>。 *ADH1B* 将乙醇代谢为乙醛,乙醛通过醛脱氢酶进一步氧化成乙酸。如果累积超过一定阈值,乙醛可以与 DNA 嵌入形成致癌物质,从而增加癌症发生的机会<sup>[18]</sup>。对 ADH 的研究开始于 1937 年首次从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中纯化出 ADH 蛋白,以往对 *ADH1B* 的研究多集中在酒精代谢和饮酒行为等问题,在肿瘤的形成及发生发展中的研究相对较少。近年来,有研究者在多种肿瘤模型的研究中发现了 *ADH1B* 基因的差异表达对肿瘤有很大的影响<sup>[19]</sup>。Li 等<sup>[20]</sup>通过一种新的方法-交叉值关联分析 (Cross-Value Association Analysis, CVAA) 研究发现,从 Broadhos Institute 的基因组数据分析鉴定肿瘤类型与肿瘤类型正常样品之间差异表达的基因, *ADH1B* (排名第一) 在几乎所有癌症类型中都被抑制,并且细胞体外实验证实了 *ADH1B* 有抑制癌细胞的能力。Polimanti 等<sup>[21]</sup>研究 *ADH1B* 分子途径,发现 *ADH1B* 基因参与多种抗肿瘤药物的代谢,包括异环磷酰胺和环磷酰胺。Gharpure 等<sup>[22]</sup>也在卵巢癌

中发现 *ADH1B* 的差异表达能使细胞分泌 MMP-7、CD-26 和组织蛋白酶来促进癌症进展。

*ADH1B* 在鼻咽癌的发生发展中是否起到了一定作用目前仍不明确。本研究发现, *ADH1B* 在 HNSC 患者样本中显著低表达, 且 *ADH1B* 在鼻咽癌细胞中被下调, 通过在鼻咽癌细胞中过表达 *ADH1B* 后, 模拟正常细胞内 *ADH1B* 蛋白的表达, 可以显著抑制鼻咽癌细胞的增殖和迁移能力, 逆转细胞的恶性程度, 提示 *ADH1B* 在 NPC 的发生发展中发挥了重要功能。因此, *ADH1B* 在调节鼻咽癌细胞增殖、迁移中具有关键作用, 或可作为 NPC 治疗中的潜在治疗靶标或预测指标。然而, *ADH1B* 通过何种方式来影响鼻咽癌细胞的恶性生物学行为, 其上游及下游是否存在特异性的调控通路, 目前尚未得知, 需要收集大量的样本进行深入研究, 结合其他因素进行多指标、多因素综合分析, 进一步研究解析其作用机制。这将对 NPC 的临床防治具有重要意义, 并为 NPC 的防治开拓新思路 and 提供一定的理论意义和应用价值。

**作者声明:** 本文第一作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;

**利益冲突:** 本文全部作者均认同文章无相关利益冲突;

**学术不端:** 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网 (CNKI) 科技期刊学术不端文献检测系统学术不端检测;

**同行评议:** 经同行专家双盲外审, 达到刊发要求。

#### [参考文献]

- [1] 杨健筌, 郭文, 文世民, 等. 新辅助化疗联合同步放疗对局部晚期鼻咽癌预后影响的 Meta 分析[J]. 肿瘤预防与治疗, 2017, 30(3): 174-181.
- [2] Tang LL, Chen WQ, Xue WQ, et al. Global trends in incidence and mortality of nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Lett, 2016, 374(1):22-30.
- [3] Wei KR, Zheng RS, Zhang SW, et al. Nasopharyngeal carcinoma incidence and mortality in China, 2013 [J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1):90.
- [4] Wang W, Yang H, Guo L, et al. Radiation-induced optic neuropathy following external beam radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma: A retrospective case-control study[J]. Mol Clin Oncol, 2016, 4(5):868-872.
- [5] Zeng H, Zheng R, Guo Y, et al. Cancer survival in China, 2003-2005: A population-based study [J]. Int J Cancer, 2015, 136(8):1921-1930.
- [6] Polimanti R, Gelernter J. *ADH1B*: From alcoholism, natural selection, and cancer to the human phenome [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2017, 177(2):113-125.
- [7] Liu WS, Wu MF, Tseng HC, et al. The role of pretreatment fdg-uptake in nasopharyngeal carcinoma treated with intensity-modulated radiotherapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 82(2):561-566.
- [8] Shih S, Huang YT, Yang HL. A multiple mediator analysis approach to quantify the effects of the *ADH1B* and *ALDH2* genes on hepatocellular carcinoma risk [J]. Genet Epidemiol, 2018, 42(4):394-404.
- [9] Ishioka K, Masaoka H, Ito H, et al. Association between *ALDH2* and *ADH1B* polymorphisms, alcohol drinking and gastric cancer: a replication and mediation analysis [J]. Gastric Cancer, 2018, 21(6):936-945.
- [10] Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, et al. *CYP2A13*, *ADH1B*, and *ADH1C* gene polymorphisms and pancreatic cancer risk [J]. Pancreas, 2010, 39(2):144-148.
- [11] Offermans NSM, Ketcham SM, van den Brandt PA, et al. Alcohol intake, *adh1b* and *adh1c* genotypes, and the risk of colorectal cancer by sex and subsite in The Netherlands Cohort Study [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(3):375-388.
- [12] Gioacchini FM, Tulli M, Kaleci S, et al. Prognostic aspects in the treatment of juvenile nasopharyngeal carcinoma: a systematic review [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2017, 274(3):1205-1214.
- [13] He J, Wu P, Tang Y, et al. Chemoradiotherapy enhanced the efficacy of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma patients: a network meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 8(24):39782-39794.
- [14] Nakao K, Mochiki M, Nibu K, et al. Analysis of prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: impact of in situ hybridization for Epstein-Barr virus encoded small RNA 1 [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2006, 134(4):639-645.
- [15] Yong SK, Ha TC, Ming CRY, et al. Associations of lifestyle and diet with the risk of nasopharyngeal carcinoma in Singapore: a case-control study [J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1):3.
- [16] Chen YP, Zhao BC, Chen C, et al. Alcohol drinking as an unfavorable prognostic factor for male patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Sci Rep, 2016, 6:19290.
- [17] Ikuta T, Fujiyoshi T, Kurachi K, et al. Molecular cloning of a full-length cDNA for human alcohol dehydrogenase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(9):2703-2707.
- [18] Seitz HK, Stickel F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism [J]. Genes Nutr, 2010, 5(2):121-128.
- [19] Galinsky K, Bhatia G, Loh PR, et al. Fast principal-component analysis reveals convergent evolution of *ADH1b* in Europe and East Asia [J]. Am J Hum Genet, 2016, 98(3):456-472.
- [20] Li QG, He YH, Wu H, et al. A normalization-free and nonparametric method sharpens large-scale transcriptome analysis and reveals common gene alteration patterns in cancers [J]. Theranostics, 2017, 7(11):2888-2899.
- [21] Polimanti R, Kranzler HR, Gelernter J. Phenome-wide association study for alcohol and nicotine risk alleles in 26394 women [J]. Neuropsychopharmacology, 2016, 41(11):2688-2696.
- [22] Gharpure KM, Lara OD, Wen Y, et al. *ADH1B* promotes mesothelial clearance and ovarian cancer infiltration [J]. Oncotarget, 2018, 9(38):25115-25126.