

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00870

人 microRNA 相关的遗传变异与肿瘤

李佩尧^{1,2}, 贺福初^{1,2}, 周钢桥^{1,2}

1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 基因组学与蛋白质组学研究室, 北京 100850;
2. 北京蛋白质组研究中心, 功能基因组学研究室, 北京 102206

摘要: 微 RNA(microRNA, miRNA)是新发现的一类进化上高度保守的重要的转录后调控因子, 通过调节基因的表达而参与调控细胞凋亡、增殖及分化等生理过程, 同时与肿瘤等疾病的发生发展密切相关。近年来研究发现, miRNA 生物合成通路基因及 miRNA 的靶基因结合位点的遗传变异(例如单核苷酸多态性和拷贝数变异等)可影响 miRNA 调控功能的发挥, 并产生显著的遗传学效应。文章主要综述了 miRNA 相关的遗传变异与肿瘤易感性和临床转归等的研究进展。

关键词: microRNA; 单核苷酸多态性; 拷贝数变异; 肿瘤

Association of human microRNA related genetic variations with cancer

LI Pei-Yao^{1, 2}, HE Fu-Chu^{1, 2}, ZHOU Gang-Qiao^{1, 2}

1. Department of Genomics & Proteomics, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;
2. Department of Functional Genomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China

Abstract: microRNAs (miRNAs) are a highly conserved class of small noncoding RNAs that regulate gene expression by post-transcriptional degradation or translational repression. miRNAs are involved in the regulation of cell apoptosis, proliferation, differentiation and other physiological processes, and are closely related with the development of cancer. More recently, it has been proposed that the presence of genetic variations (e.g., single nucleotide polymorphism and copy number variation) in microRNA genes, their biogenesis pathway and target binding sites affect the miRNA processing machinery and targeting, and have a significant genetic effect. In this review, we focus on the miRNA-related genetic variations and cancer susceptibility and progression.

Keywords: microRNA; polymorphism; copy number variation; cancer

基因组 DNA 是生物体各种生理、病理性状的物质基础。人类基因组计划研究表明, 不同个体间基因组序列的一致性高达 99% 以上, 其余约 1% 的遗传差异即遗传变异(Genetic variation), 其中最丰富的是单碱基改变, 即单核苷酸多态性(Single nucleotide

polymorphism, SNP), 至今已发现人类基因组中存在约 1 千万个 SNPs, 每 100 ~ 300 个碱基对就有 1 个 SNP 位点^[1]; 其次最常见的遗传变异是拷贝数变异(Copy number variant, CNV)。正是上述这些遗传变异引起基因组和分子表型的异质性, 进而决定了

收稿日期: 2011-04-01; 修回日期: 2011-05-25

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2008ZX10002-016)和国家自然科学基金项目(编号: 30900819, 30901707)资助

作者简介: 李佩尧, 博士在读, 研究方向: 医学遗传学与基因组学。Tel: 010-80727777-1316; E-mail: lipeiyao214@yahoo.com.cn

通讯作者: 周钢桥, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 医学遗传学与基因组学。E-mail: zhougq114@gmail.com

人种、人群和个体间各种性状的差异,包括影响疾病的易感性、疾病的发生发展以及治疗药物的反应性等。

过去大量遗传关联研究发现一些编码基因中的 SNPs 和 CNVs 与肿瘤的易感性和临床转归相关,但是很少涉及到非编码基因如微 RNA(microRNA, miRNA)基因的遗传关联研究。近年来越来越多的研究表明,miRNA 调控网络中的 SNPs 可影响成熟 miRNA 的表达水平和 miRNA 的结构、miRNA 与靶基因的识别等,使 miRNA 调控网络发生异常,从而参与肿瘤的发生发展。本综述结合最近几年关于 miRNA 相关的遗传变异的研究进展,重点讨论 miRNA 基因中的 SNP 与肿瘤的遗传易感性。

1 miRNA 基因结构、生物合成及作用机制

miRNA 基因在染色体上的分布是非随机的,以单拷贝、多拷贝或基因簇(Gene clusters)等多种形式存在于除 Y 染色体外的其它所有染色体。一些 miRNA 基因是单独存在的,并在独立的启动子和调节序列控制下表达^[2]。另外一些 miRNA 基因则紧密相邻,排列成簇,往往构成一个多顺反子(Polycistron),彼此之间连同附近的蛋白编码基因受到共同的调控而一起共表达。其中基因之间同源性高的 miRNA 基因簇就构成了 miRNA 基因家族(miRNA gene family),目前人类基因组中已发现 55 个 miRNA 基因簇,这些成簇的 miRNAs 常常发挥相似的功能,提示 miRNA 基因簇有可能是基因复制的结果^[3]。但也有 miRNA 基因簇中的成员尽管位于同一个转录体系中,却表现出不同的表达水平,甚至不同的表达模式^[4]。还有一些 miRNA 来源于蛋白编码基因的内含

子,由于某些 miRNA 基因与其宿主基因具有共同的启动子,因而常常具有相似的表达水平^[5]。

在细胞核内,编码 miRNA 的基因在 RNA 聚合酶 II 的作用下转录出具有茎-环结构的初始 miRNA (Primary microRNA, pri-miRNA),长度为 100~10 000 nt。pri-miRNA 在 Drosha 酶(Drosha, ribonuclease type III)以及双链 RNA 结合辅助因子 DGCR8(DiGeorge syndrome critical region gene 8)等组成的 DROSHA 复合物的作用下,被剪切成长度为 70nt 左右的保留茎-环结构的前体 miRNA(Precursor microRNA, pre-miRNA)。来源于编码基因内含子中的 miRNAs(称为 mirtrons),则直接通过核内前体 mRNA(Precursor mRNA, pre-mRNA)的剪接机制和去分支酶(Debranching enzyme)的作用形成 pre-miRNA 发夹类似物,所以避开了 Drosha 酶剪切过程^[6]。一般将 pre-miRNA 的二级结构分为 5 个结构域(图 1)^[7]: (1)种子区(Seed region): 成熟 miRNA 5'端的第 2~8 个碱基序列,在识别靶基因时发挥重要作用; (2)成熟体非种子区(MIR^{Δseed}): 成熟 miRNA 序列中除去种子区后的序列; (3)MIR*: 成熟 miRNA 的互补序列; (4)环区(Loop region): 除去成熟 miRNA 及其互补的序列以外的非配对序列; (5)茎区(Stem region): 除去成熟 miRNA 及其互补的序列以外的互补序列。pre-miRNA 在 Ran-GTP 和转运受体 XPO5(Exportin 5)等组成的核输出复合物的作用下从核内运输到胞质中。

在细胞质内,在核酸酶 Dicer 的作用下 pre-miRNA 被剪切成长度为 18~25nt 的双链 RNA。随后双螺旋解旋,其中一条结合到 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中形成非对称 RISC 复合物(Asymmetric RISC assembly)。在成熟

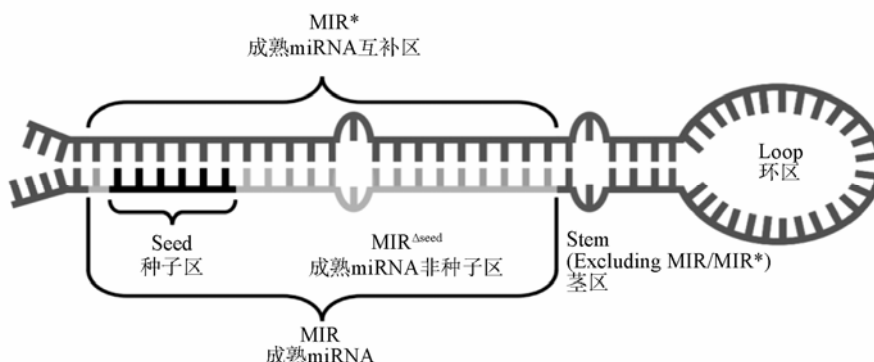


图 1 pre-miRNA 的二级结构分区示意图^[7]

miRNA 的介导下 RISC 识别特异的靶基因 mRNA, 并通过降解 mRNA 或者抑制其蛋白翻译过程实现在转录后水平抑制靶基因的表达^[8]。

2 miRNA 相关的 SNP 与肿瘤

目前已有一些基于病例-对照人群的遗传关联研究结果显示(表 1), miRNA 相关的 SNP 可通过影响 miRNA 的生物合成以及与靶基因的识别, 影响 miRNA 参与的重要调控网络, 从而影响肿瘤的易感性和临床转归以及药物的反应性。

2.1 miRNA 基因中的 SNP 与肿瘤

2.1.1 pri-miRNA 中的 SNP 与肿瘤

2005 年 Croce 等^[9]最先报道位于 pri-miRNA 序列(主要指 pre-miRNA 两侧的序列)中的点突变具有功能效应, 在家族性慢性淋巴细胞白血病病人中编码 miR-16-1 和 miR-15a 基因簇的 pri-miRNA 序列(miR-16-1 下游 7 bp)中存在一个点突变(C→T), 该突变位点可改变成熟 mir-16-1 和 mir-15 的表达水平。另一项研究发现^[10], 位于 let-7e 的 pre-miRNA 序列下游 19 个碱基的突变可导致成熟 let-7e 的表达水平下降。同时, 一些遗传关联研究也表明位于 pri-miRNA 序列中的 SNP 与肿瘤的易感性显著相关, 如 pri-mir-124-1 中的 SNP(rs531564)可增加男性膀胱癌^[11]和食管癌^[12]的发生风险; pri-mir-26a-1 中的 SNP(rs7372209)可使女性膀胱癌的发生率降低 64%^[11], 但使口腔粘膜癌前病变的发生风险升高 2 倍^[13]; pri-mir-219-1 中的 SNP(rs213210)可增加患食管癌的风险^[12]。上述研究提示 pri-miRNA 序列中的 SNP 与肿瘤的发生风险密切相关, 而且这种相关性与肿瘤的类型有关, 然而其分子机制还有待于进一步研究。

2.1.2 pre-miRNA 中的 SNP 与肿瘤

2007 年 Duan 等^[14]发现 pre-mir-125a 的种子区中存在一个 SNP(rs12975333), 该位点使 pre-miRNA 的二级结构发生改变而显著抑制 pri-mir-125a 加工成 pre-mir-125a 的过程, 减少了 miR-125a 的表达量, 最终抑制 miR-125a 对其靶基因——*Lin-28*[*lin-28* homolog (*C. elegans*)]的翻译抑制作用。Adams 等^[15]在 miR-206 的种子区引入一个突变位点, 可使 miR-206

与其靶基因 *hER-α-1* 和 *hER-α-2* 的结合减弱。在 miR-146a* 的种子区中存在一个 SNP(rs2910164), 目前对该位点与肿瘤的遗传关联及其机制研究最为系统和深入。基于 3 个独立病例-对照人群的遗传关联结果显示: 携带杂合子(G/C 基因型)的个体患甲状腺乳头状癌的风险显著高于携带纯合子(G/G 或 C/C 基因型)的个体^[16]。关于杂合子基因型作为一种遗传风险因素的报道较少, 推测这可能是一种遗传上位效应(Genetic epistasis)。进一步的研究发现, 携带杂合子基因型的个体表达 3 种成熟的 miRNAs: 其中 1 个成熟的 miRNA(miR-146a)来源于 pre-mir-146a 的 5'端, 另外 2 个成熟的 miRNAs(miR-146a*-C 和 miR-146a*-G)来源于 pre-mir-146a 的 3'端; 而携带纯合子基因型的个体只表达其中的 2 种, 且这 3 种成熟 miRNAs 的靶基因谱具有显著差异^[17]。该 SNP 位点还与前列腺癌^[18]、肝癌^[19]和家族性乳腺癌或卵巢癌^[20]的早发风险显著相关。因此, 位于 miRNA 种子区的 SNP 可改变 miRNA 成熟、miRNA 与靶基因的调控关系而与肿瘤的易感性相关。

在 pre-mir-196a-2 的成熟 miRNA 互补区中存在一个 SNP(rs11614913), 大量研究相继报道该 SNP 与乳腺癌^[21,22]、肺癌^[23,24]、胃癌^[25]、食管鳞癌^[26]、头颈癌^[27]和肝癌^[28,29]的发生风险相关, 且与非小细胞肺癌的存活时间相关^[30]。在乳腺癌中的功能研究显示, 该 SNP 位点可影响 pre-mir-196a-2 加工为成熟 miR-196a-2 的过程, 其 C 等位(风险等位)可使 miR-196a-2 的表达显著上调, 因此, 携带 C 等位的个体由于 miR-196a-2 的表达增高而增加了乳腺癌的发生风险^[22]。但是另一些病例-对照遗传关联研究发现携带 T 等位的个体患食管癌^[12]、前列腺癌^[31]、胆囊癌^[32]、神经胶质瘤^[33]和胃癌^[34]的发病风险高于携带 C 等位的个体。该 SNP 在多个人群、多个肿瘤中的遗传关联结果提示, miRNA 基因中的 SNP 与肿瘤的易感性存在组织类型特异性和人种差异。

在 pre-mir-27a 的环区中存在一个 SNP(rs895819), 携带 G 等位的女性(尤其是年龄小于 50 岁)患家族性乳腺癌的风险降低^[35]。进一步研究发现在 *BRCA2* 基因突变携带者中携带杂合子(A/G 基因型)的个体患乳腺癌、卵巢癌的风险可降低 50%^[36]。使用 RNAfold 软件分析发现该 SNP(rs895819)并不影响 pre-mir-27a 的二级结构和自由能, 然而在 pre-mir-27a 的环

表 1 miRNA 相关的 SNPs 与肿瘤的遗传关联

| SNP 位置分类 | 多态性位点 | 基因 | 肿瘤 |
|----------------------------|------------|---|--|
| 1 位于编码 miRNA 基因 | | | |
| (1)pri-miRNA 序列 | rs531564 | has-mir-124-1 | 膀胱癌 ^[11] ，食管癌 ^[12] ， 口腔粘膜癌前病变 ^[13] |
| | rs7372209 | has-mir-26a-1 | 膀胱癌 ^[11] |
| | rs213210 | has-mir-219-1 | 食管癌 ^[12] |
| | rs4938723 | hsa-mir-34b/c | 肝癌 ^[51] |
| (2)pre-miRNA 序列 | | | |
| 种子区(seed region) | rs12975333 | hsa-mir-125a | 无关联研究报道 |
| | rs2910164 | hsa-mir-146a* | 甲状腺乳头状癌 ^[16] ，前列腺癌 ^[18] ， 肝癌 ^[19] ，乳腺癌 ^[20] |
| | rs3746444 | hsa-mir-499* | 乳腺癌 ^[20] ，前列腺癌 ^[31] ，宫颈鳞癌 ^[52] |
| 成熟 miRNA 互补区(MIR*) | rs11614913 | hsa-mir-196a2 | 乳腺癌 ^[21,22] ，肺癌 ^[23,24] ，胃癌 ^[25] ，食管鳞癌 ^[26] ， 头颈癌 ^[27] ，肝癌 ^[28,29] ；前列腺癌 ^[31] ，食管癌 ^[12] ， 胆囊癌 ^[32] ，神经胶质瘤 ^[33] ，胃癌 ^[34] |
| | rs5745925 | hsa-mir-631 | 食管癌 ^[12] |
| 环区(loop region) | rs6505162 | hsa-mir-423 | 膀胱癌 ^[11] ，卵巢癌 ^[36] ，食管癌 ^[12] |
| | rs895819 | hsa-mir-27a | 乳腺癌 ^[35] ，卵巢癌 ^[36] |
| 2 位于 miRNA 生物合成通路和作用机制相关基因 | | | |
| 核输出复合物 | rs11077 | <i>XPO5</i> | 食管癌 ^[12] |
| | rs14035 | <i>RNA</i> | 食管癌 ^[12] |
| DICER 复合物 | rs3742330 | <i>DICER1</i> | 口腔粘膜癌前病变 ^[13] |
| RISC 复合物 | rs197412 | <i>GEMIN3</i> | 口腔粘膜癌前病变 ^[13] |
| | rs197414 | <i>GEMIN3</i> | 膀胱癌 ^[11] ，食管癌 ^[12] |
| | rs2740348 | <i>GEMIN4</i> | 肾细胞癌 ^[39] |
| | rs7813 | <i>GEMIN4</i> | 肾细胞癌 ^[39] |
| 3 位于 miRNA 靶基因 | rs17281995 | <i>CD86</i> (miR-337, -582, -200a, -184, -212 的靶基因) | 结肠癌 ^[46] |
| | rs61764370 | <i>KRAS</i> (let-7 靶基因) | 非小细胞肺癌 ^[48] ，口腔癌 ^[50] |
| | rs1434536 | <i>BMPRI1B</i> (miR-125b 靶基因) | 乳腺癌 ^[53] |

状序列中人工引入一个突变位点(A→G), 则可使 pre-mir-27a 和 miR-27a 的表达量同时下降。由此推测, 该 SNP 位点可能减小 pre-mir-27a 发夹结构中环的大小, 进而影响 DROSHA 对 pri-mir-27a 的识别, 阻碍 pre-mir-27a 二级发夹结构的形成, 进而减少成熟 miR-27a 的生成^[35,37]。在 pre-mir-423 的环区中存在一个 SNP(rs6505162), 该 SNP 位点可增加患膀胱癌^[11]和 *BRCA2* 基因突变携带者患卵巢癌^[36]的风险, 但降低食管癌^[12]的发生风险, RNAfold 软件分析发现该 SNP 位点也不改变 pre-mir-423 的二级结构。同样, 经预测 pre-let-7a 的环状区中的一个 SNP(rs41275792)也不影响其二级结构和自由能, 但也可减少成熟 let-7a 的表达^[10]。因此, 位于 pre-miRNA 环区中的 SNP 可能影响 DROSHA 复合体将 pri-miRNA 剪接加工成 pre-miRNA 的过程, 进而减少成熟 miRNA 的表达, 与肿瘤的发生发展相关。

虽然针对 miRNA 基因中的 SNP 与复杂疾病(如肿瘤)的遗传关联研究已有一些进展, 但尚有很多问题值得深入研究: ①随着新一代测序技术——深度测序(Deep sequencing)的应用, 使得大量新的 miRNA 和 SNP 位点被发现。2007 年 Saunders 等^[7]搜索 474 个人源 pre-miRNA 序列中的 SNP, 发现 49 个 pre-miRNAs 中共存在 65 个 SNPs。pre-miRNA 序列中 SNP 的发生频率为每千个碱基中有 1.3 个 SNPs, 而在 pre-miRNA 两侧序列中 SNP 的发生频率为每千个碱基中有 3 个 SNPs, 远远高于 pre-miRNA 序列中的 SNP 的发生率。而根据目前最新的 miRNA 数据库和 dbSNP 数据库的分析发现, 迄今已知的 1 048 个人源 pre-miRNAs(2010 年 9 月, Release 16.0 版)序列中, 336 个 pre-miRNAs 中共含有 563 个 SNPs, SNP 在 pre-miRNA 序列中的发生频率为每千个碱基中有 7.2 个 SNPs。其中大部分 miRNA 基因中的 SNPs 的次要等位频率(Minor allele frequency, MAF)未知, 而部分已知 SNPs 的 MAF 在不同种族间差异很大, 因而必须明确在不同种族中这些 SNPs 的 MAF 分布。②全基因组关联研究(Genome-wide association study, GWAS)所使用的芯片(包括 Affymetrix 和 Illumina 公司)中只覆盖了极少数几个 miRNA 基因中的 SNPs, 因此, 大量 miRNA 基因中的 SNPs 与疾病的关系还未得到系统研究。③由于目前大部分 pri-miRNAs 序列的长度没有得到界定, 使得目前的

研究主要集中于 pre-miRNA 序列(pre-miRNA 的结构清楚, 在染色体上的起始位置明确)中的 SNP。

2.2 miRNA 生物合成通路和作用机制基因中的 SNP 与肿瘤

位于 miRNA 生物合成及作用机制相关基因中的 SNP 通过影响基因的功能从而在整体水平上影响所有 miRNAs 的表达。①DROSHA 复合物: DROSHA 低表达与肿瘤预后差相关^[38], 但是遗传关联研究发现 *DROSHA* 和 *DGCR8* 基因中的 SNPs 与食管癌^[12]、肾细胞癌^[39]、膀胱癌^[11]和口腔粘膜癌前病变^[13]等的发生风险均无关联。②核输出复合物: *XPO5* 基因的 3'端非翻译区(3'Untranslated region, 3'UTR)的 SNP(rs11077)、*RAN*(Member RAS oncogene family)基因的 3'UTR 的 SNP(rs14035)均可增加患食管癌的易感性^[12]。*XPO5* 与 miRNA 的核输出相关, 敲低 *XPO5* 的表达可使 miRNAs 的表达水平整体下降^[40]。*XPO5* 在细支气管肺泡癌和临床期肺癌的第 1 阶段中表达显著下降^[41], 但是在高分化的前列腺癌中表达显著上升^[42]。因此 SNP(*XPO5* rs11077 和 *RAN* rs14035)可能影响 *XPO5* 和 *RAN* mRNA 的稳定性而影响整体 miRNA 的表达, 参与肿瘤的发生发展。③DICER 复合物: *DICER1*(Dicer 1, ribonuclease type III)基因的 3'UTR 的 SNP(rs3742330)可使粘膜白斑病或粘膜红斑病的病人患口腔粘膜癌前病变的风险显著增加^[13]。已知 *DICER1* 是双等位抑癌基因(Haploinsufficient tumor suppressor), 其 mRNA 表达水平的降低可显著降低肿瘤患者的存活率^[43], 因此位于该基因 3'UTR 的 SNP(rs3742330)可能影响 *DICER1* mRNA 的稳定性而减少 *DICER1* 基因的表达。④RISC 复合物: *GEMIN3*(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20, *DDX20*)基因中的一个非同义 SNP(rs197412)可使口腔粘膜癌前病变的发生风险显著降低^[13], 而另一个非同义 SNP(rs197414)则增加膀胱癌^[11]和食管癌^[12]的发生风险。*GEMIN4*(gem (nuclear organelle) associated protein 4)基因中的两个 SNPs(rs2740348 和 rs7813)可降低肾细胞癌^[39]的发生风险, 携带两个风险基因型的个体发生肾细胞癌的风险显著升高^[39]。位于这些 miRNA 生物合成及作用机制相关基因中的 SNPs, 可通过影响基因的表达或功能发挥而影响 miRNA 整体的转录、加工、转运和与靶基因的识别,

进而改变 miRNA 介导的调控作用。最近, 经数据库搜索发现^[44]miRNA 生物合成通路及作用机制相关基因中存在 3 921 个 SNP 位点, 其中 83 个 SNPs 可能改变其蛋白编码产物, 因而将来需要对这些 SNPs 进行系统的遗传关联和深入的功能研究。

2.3 miRNA 靶基因中的 SNP 与肿瘤

已有研究表明全基因组水平 mRNA 的 3'UTR 中存在约 120 000 个 SNPs, 其中约 17% 的 SNPs 可能破坏 miRNA 靶位点; 另外约 8.6% 的 SNPs 可能产生新的 miRNA 靶位点^[45]。Landi 等^[46]发现 37 个候选结肠癌基因的 3'UTR 中 miRNA 靶位点存在 57 个 SNPs, 经推测其中 8 个 SNPs 可能具有生物学效应, 经群体水平的遗传关联研究发现其中 *CD86* (*CD86 molecule*) 基因的 3'UTR 中的一个 SNP(rs17281995) 可显著增加结肠癌的发病风险。已知 *Let-7* 和其靶基因 *KRAS* 与肺癌密切相关^[47], Chin 等^[48]研究发现, 位于 *KRAS* 3'UTR 中的一个 SNP(rs61764370) 可使经常吸烟的个体患非小细胞肺癌的风险提高 2.3 倍, 进一步的体外实验证明该 SNP 可增加 *KRAS* 的表达; 另一项研究^[49]显示该 SNP 位点与非小细胞型肺癌的生存期不相关, 说明该 SNP 在非小细胞肺癌的临床应用上的价值有限。但是, Christensen 等^[50]发现该 SNP 位点可显著降低口腔癌患者的存活率。随着人们对 miRNA 识别靶基因的机制的理解增多, 位于基因 3'UTR 中 miRNA 结合部位的 SNPs 将成为遗传关联研究领域新的热点。

3 miRNA 相关的 CNV 与肿瘤

2006 年 Redon 等^[54]对 270 个个体的全基因组进行了 CNV 的扫描, 发现有 43 个 miRNA 基因位于基因组 CNV 区域。2007 年 Wong 等^[55]鉴定出 14 个 CNV 区域中包含 21 个 miRNAs。2009 年 Duan 等^[44]发现 193 个 pre-miRNAs 中具有 385 个 CNV 标记, 其中 *let-7* 家族中有 10 个成员位于 CNV 区域, *Let-7* 与肺癌的发生密切相关^[47], 推测 *let-7* 的 CNV 可能是肿瘤发生的早期分子事件。2009 年 Kan 等发现^[56]miR-106b-25 多顺反子(包括 miR-106b、miR-93 和 miR-25)所在的基因组序列发生扩增, 使 miR-106b、miR-93 和 miR-25 的表达显著上调, 并通过抑制 *p21* 和 *Bim* 的表达而参与食管癌的发生发展。

Duan 等^[44]对 13 个 miRNA 生物合成及作用机制相关基因进行 CNV 研究, 发现 *SNIP1* (*Smad nuclear interacting protein 1*)、*RNASEN*、*XPO5*、*PIWIL1* (*piwi-like 1 (Drosophila)*)、*DICER1*、*GEMIN4* 和 *DGCR8* 基因中存在 CNVs。其中 *DICER1* 基因中存在一个 350 bp 的缺失, 该缺失可产生 *DICER1* 的截断体。*DICER1* 基因的缺失可加快肿瘤的发展^[57], *DICER1* 的截断体是否也参与肿瘤的发生发展尚需要进一步的研究。

4 miRNA 异构体

2008 年 Morin 等^[58]提出“isomiR”即“miRNA 异构体”, 指同一 miRNA 基因在加工成熟过程中经剪接修饰等形成多个不同的成熟 miRNAs。至今发现的 miRNA 序列修饰主要有 3'端缺失/插入、5'端缺失/插入和中间修饰 3 种类型, 与 miRNA 基因中 SNP 不同的是这些修饰经常发生在发夹结构中 *DROSHA* 和 *DICER1* 的剪接位点。通过深度测序发现并鉴定了大量的 miRNA 异构体, 但功能不明确, 经推测其可能会影响 miRNA 的半衰期、亚细胞定位和靶基因的特异性(尤其是 5'端缺失/插入)^[59]。目前最引人注目的是 5'端缺失/插入产生的 miRNA 异构体, 这些 miRNA 异构体可具有不同的 miRNA 种子区, 而具有大量不同的靶基因, 进而参与不同的生物学过程。已在白血病小鼠模型中发现一些 miRNA 异构体可能参与肿瘤的发生发展, 如白血病小鼠中 *mmu-miR-10a*、*mmu-miR-155*、*mmu-miR-27a*、*mmu-miR-27c*、*mmu-let-7a*、*mmu-miR-223-5p* 和 *mmu-miR-222* 等的 miRNA 异构体的表达发生显著异常^[60], 尤其 *mmu-miR-223-5p* 在转移的癌细胞中比非肿瘤组织中表达显著下降约 2 500 倍。虽然目前尚未见人类肿瘤 miRNA 异构体功能的报道, 但这将是未来的一个研究热点问题。

5 问题与展望

尽管近几年对 miRNA 调控网络中的遗传变异与肿瘤易感性的研究越来越多, 然而仍处于起步阶段, 进一步的研究需要注意两点: ①目前大多数均是基于病例-对照的研究, 不同的研究往往结果不一致, 可能的原因包括人群异质性、缺少足够大的样本量, 也可能是病例-对照研究的不严谨性, 从而导

致阳性关联结果得不到后续研究的重复验证。因此, 后续的研究需要在多个独立的大样本人群中验证。同时, 还需开展功能研究以进一步明确显著关联的 SNP 位点的功能意义。②除了目前被人们所熟悉的依赖 DROSHA 的 miRNA 生物合成通路、miRNA 通过与靶基因的 3'UTR 结合来调控靶基因, 其他新的 miRNA 生物合成通路和调控机制的发现, 如不依赖 DROSHA 的 miRNA 生物合成、miRNA 靶位点可能存在于除 3'UTR 的其他区域(其中 miRNA 靶位点存在于 5'UTR 已被实验证实^[61])等, 使得 miRNA 调控网络中的遗传变异需要扩展研究。系统深入研究 miRNA 调控网络中的遗传变异, 将为疾病的诊断、预后和治疗等提供理论依据和应用基础, 同时也有助于阐明疾病易感性、药物反应性等个体差异的分子机制。

参考文献(References):

- [1] The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 2005, 437(7063): 1299–1320.
- [2] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294(5543): 853–858.
- [3] Yuan XY, Liu CN, Yang PC, He SM, Liao Q, Kang SL, Zhao Y. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol*, 2009, 3: 65.
- [4] Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4663–4670.
- [5] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 2004, 14(10A): 1902–1910.
- [6] Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 130(1): 89–100.
- [7] Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3300–3305.
- [8] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [9] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1793–1801.
- [10] Wu MQ, Jolicoeur N, Li Z, Zhang LH, Fortin Y, L'Abbe D, Yu ZB, Shen SH. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*, 2008, 29(9): 1710–1716.
- [11] Yang HS, Dinney CP, Ye YQ, Zhu Y, Grossman HB, Wu XF. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2530–2537.
- [12] Ye YQ, Wang KK, Gu J, Yang HS, Lin J, Ajani JA, Wu XF. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2008, 1(6): 460–469.
- [13] Clague J, Lippman SM, Yang H, Hildebrandt MA, Ye Y, Lee JJ, Wu X. Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Mol Carcinog*, 2010, 49(2): 183–189.
- [14] Duan RH, Pak CH, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(9): 1124–1131.
- [15] Adams BD, Furneaux H, White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor- α (ER α) and represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(5): 1132–1147.
- [16] Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in *pre-miR-146a* decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(20): 7269–7274.
- [17] Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of *pre-miR-146a* contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(5): 1502–1505.
- [18] Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, Tong N, Wang JF, Song NH, Zhang W, Hua LX, Wu HF. A functional polymorphism in *Pre-miR-146a* gene is associated with prostate cancer risk and mature *miR-146a* expression *in vivo*. *Prostate*, 2010, 70(5): 467–472.
- [19] Xu T, Zhu Y, Zhu Y, Wei QK, Yuan YF, Zhou F, Ge YY, Yang JR, Su H, Zhuang SM. A functional polymorphism in the *miR-146a* gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2008, 29(11): 2126–2131.
- [20] Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the *miR-146a* gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*, 2008, 29(10): 1963–1966.
- [21] Hu ZB, Liang J, Wang ZW, Tian T, Zhou XY, Chen JP, Miao

- RF, Wang Y, Wang XR, Shen HB. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum Mutat*, 2009, 30(1): 79–84.
- [22] Hoffman AE, Zheng TZ, Yi CH, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, Zhang YW, Paranjape T, Zhu Y. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5970–5977.
- [23] Tian T, Shu YQ, Chen JP, Hu ZB, Xu L, Jin GF, Liang J, Liu P, Zhou XY, Miao RF, Ma HX, Chen YJ, Shen HB. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(4): 1183–1187.
- [24] Kim MJ, Yoo SS, Choi YY, Park JY. A functional polymorphism in the pre-microRNA-196a2 and the risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer*, 2010, 69(1): 127–129.
- [25] Peng S, Kuang ZS, Sheng CY, Zhang Y, Xu H, Cheng QH. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(8): 2288–2293.
- [26] Wang K, Guo H, Hu HM, Xiong G, Guan XY, Li J, Xu XQ, Yang K, Bai Y. A functional variation in pre-microRNA-196a is associated with susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma risk in Chinese Han. *Biomarkers*, 2010, 15(7): 614–618.
- [27] Christensen BC, Avissar-Whiting M, Ouellet LG, Butler RA, Nelson HH, McClean MD, Marsit CJ, Kelsey KT. Mature microRNA sequence polymorphism in *MIR196A2* is associated with risk and prognosis of head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(14): 3713–3720.
- [28] Qi P, Dou TH, Geng L, Zhou FG, Gu X, Wang H, Gao CF. Association of a variant in *MIR 196A2* with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol*, 2010, 71(6): 621–626.
- [29] Li XD, Li ZG, Song XX, Liu CF. A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis. *Pathology*, 2010, 42(7): 669–673.
- [30] Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, Zeng Y, Miao R, Jin G, Ma H, Chen Y, Shen H. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*, 2008, 118(7): 2600–2608.
- [31] George GP, Gangwar R, Mandal RK, Sankhwar SN, Mittal RD. Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(3): 1609–1615.
- [32] Srivastava K, Srivastava A, Mittal B. Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of gallbladder cancer in North Indian population. *J Hum Genet*, 2010, 55(8): 495–499.
- [33] Dou T, Wu Q, Chen X, Ribas J, Ni X, Tang C, Huang F, Zhou L, Lu D. A polymorphism of microRNA196a genome region was associated with decreased risk of glioma in Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(12): 1853–1859.
- [34] Okubo M, Tahara T, Shibata T, Yamashita H, Nakamura M, Yoshioka D, Yonemura J, Ishizuka T, Arisawa T, Hirata I. Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population. *Helicobacter*, 2010, 15(6): 524–531.
- [35] Yang RX, Schlehe B, Hemminki K, Sutter C, Bugert P, Wappenschmidt B, Volkmann J, Varon R, Weber BHF, Niederacher D, Arnold N, Meindl A, Bartram CR, Schmutzler RK, Burwinkel B. A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 121(3): 693–702.
- [36] Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M, Nir U, Friedman E. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int J Cancer*, 2010, 127(3): 589–597.
- [37] Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*, 2005, 24(1): 138–148.
- [38] Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*, 2008, 359(25): 2641–2650.
- [39] Horikawa Y, Wood CG, Yang HS, Zhao H, Ye YQ, Gu J, Lin J, Habuchi T, Wu XF. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23): 7956–7962.
- [40] Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, 303(5654): 95–98.
- [41] Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Luo JH, Mantha G, Sobol RW, Dacic S. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 2345–2350.
- [42] Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Acquafondata M, McHale T, Sobol RW, Dhir R. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate

- adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 2006, 169(5): 1812–1820.
- [43] Kumar MS, Pester RE, Chen CY, Lane K, Chin C, Lu J, Kirsch DG, Golub TR, Jacks T. Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev*, 2009, 23(23): 2700–2704.
- [44] Duan SW, Mi SL, Zhang W, Dolan ME. Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes. *RNA Biol*, 2009, 6(4): 412–425.
- [45] Georges M, Coppieters W, Charlier C. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(3): 166–176.
- [46] Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L, Novotny J, Försti A, Hemminki K, Canzian F, Landi S. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 2008, 29(3): 579–584.
- [47] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753–3756.
- [48] Chin LJ, Ratner E, Leng SG, Zhai RH, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zelterman D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinsky SA, Slack FJ, Weidhaas JB. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8535–8540.
- [49] Nelson HH, Christensen BC, Plaza SL, Wiencke JK, Marsit CJ, Kelsey KT. KRAS mutation, KRAS-LCS6 polymorphism, and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2010, 69(1): 51–53.
- [50] Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, Marsit CJ, Kelsey KT. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis*, 2009, 30(6): 1003–1007.
- [51] Xu Y, Liu L, Liu JB, Zhang YX, Zhu J, Chen JG, Liu S, Liu Z, Shi HB, Shen HB, Hu ZB. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2011, 128(2): 412–417.
- [52] Zhou B, Wang K, Wang YY, Xi MR, Zhang Z, Song YP, Zhang L. Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs and risk of cervical squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog*, 2011, 50(7): 499–505.
- [53] Sætrom P, Biesinger J, Li SM, Smith D, Thomas LF, Majzoub K, Rivas GE, Alluin J, Rossi JJ, Krontiris TG, Weitzel J, Daly MB, Benson AB, Kirkwood JM, O'Dwyer PJ, Sutphen R, Stewart JA, Johnson D, Larson GP. A risk variant in an miR-125b binding site in *BMPIRB* is associated with breast cancer pathogenesis. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7459–7465.
- [54] Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen WW, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodward C, Yang FT, Zhang JJ, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 2006, 444(7118): 444–454.
- [55] Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet*, 2007, 80(1): 91–104.
- [56] Kan T, Sato F, Ito T, Matsumura N, David S, Cheng Y, Agarwal R, Paun BC, Jin Z, Olaru AV, Selaru FM, Hamilton JP, Yang J, Abraham JM, Mori Y, Meltzer SJ. The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology*, 2009, 136(5): 1689–1700.
- [57] Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 673–677.
- [58] Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao YJ, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*, 2008, 18(4): 610–621.
- [59] Borel C, Antonarakis SE. Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mamm Genome*, 2008, 19(7–8): 503–509.
- [60] Kuchenbauer F, Morin RD, Argiropoulos B, Petriv OI, Griffith M, Heuser M, Yung E, Piper J, Delaney A, Prabhu AL, Zhao YJ, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Hansen CL, Marra MA, Humphries RK. In-depth characterization of the microRNA transcriptome in a leukemia progression model. *Genome Res*, 2008, 18(11): 1787–1797.
- [61] Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(23): 9667–9672.