

癌症相关 microRNA 与靶基因的生物信息学分析

周学¹, 杜宜兰², 金萍³, 马飞³

1. 南京师范大学泰州学院化学与生物工程学院, 泰州 225300;

2. 第三军医大学大坪医院健康管理科, 重庆 400042;

3. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046

摘要: MicroRNAs(miRNAs)是一类长度约为 22nt 的内源性非编码 RNA, 通过与靶基因转录本互补结合调控基因的表达。近年来, 研究发现 miRNA 与癌症发生密切相关, miRNA 可以直接充当癌基因或者抑癌基因而影响肿瘤的发生和生长。为进一步揭示癌症相关 miRNA 的特征及靶基因的功能, 文章通过数据库搜索及文献检索, 在人类基因组中发现了 475 个癌症相关 miRNA, 系统地比较了癌症相关 miRNA 与非癌症 miRNA 以及基因内和基因间区癌症相关 miRNA 在保守性、SNP 位点分布、癌谱及转录调控等特性。研究发现, 癌症相关 miRNA 比非癌症 miRNA 保守性要强, 发生 SNP 概率比较低, 同时发现 miRNA 所涉及癌症数目与保守性成正相关。基因组定位分析发现, 癌症相关 miRNA 比非癌症 miRNA 更倾向于成簇存在。进一步对宿主基因、癌症相关 miRNA 及作用的靶基因与癌症发生进行关联分析, 发现一些非癌症 miRNA 的宿主基因倾向于被癌症 miRNA 作用。本研究结果为深入理解 miRNA 与癌症之间的关系, 以及进一步为 miRNA 作为癌症诊断指示物提供理论依据。

关键词: MicroRNAs(miRNAs); 癌症; 靶基因; 宿主基因; 生物信息学

Bioinformatic analysis of cancer-related microRNAs and their target genes

Xue Zhou¹, Yilan Du², Ping Jin³, Fei Ma³

1. School of Chemistry and Biological Engineering, Nanjing Normal University Taizhou College, Taizhou 225300, China;

2. Health Management Department of Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China;

3. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of ~22 nucleotide endogenous noncoding RNAs which regulate gene expression by targeting complementary transcripts. Recent studies have found that miRNAs are closely related to tumorigenesis and can act as oncogenes or tumor suppressor genes to influence the occurrence and development of tumor. To further reveal characteristics of cancer-related miRNAs and the functions of miRNA targets, we obtained 475 miRNAs involved in cancer through database searching and information retrieval. We systematically analyzed and compared the

收稿日期: 2015-03-22; 修回日期: 2015-07-06

基金项目: 南京师范大学泰州学院青年项目(编号: Q201206)资助

作者简介: 周学, 博士, 讲师, 专业方向: 非编码 RNA。E-mail: zhousuxia88@126.com

通讯作者: 马飞, 博士, 教授, 研究方向: 比较基因组学与生物信息学。E-mail: mafei01@tsinghua.org.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.14-439

网络出版时间: 2015-8-25 8:50:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150825.0850.001.html>

features including conservation, SNP distribution, cancer spectrum width, and transcriptional regulation between cancer and non-cancer related miRNAs as well as between intergenic and intragenic miRNAs. Our results showed that cancer-related miRNAs have higher conservation and lower SNP frequency compared to non-cancer-related miRNAs, and the cancer spectrum of one miRNA is positively correlated with its conservation. Genome analysis showed that cancer-related miRNAs tend to present as clusters compared with non-cancer-related miRNAs. Further association analysis between cancer progression and host genes, cancer-related miRNAs or target genes found that the host genes of some non-cancer related miRNAs tend to be targeted by cancer-related miRNAs. This study provides theoretical basis for further understanding the relationship between miRNA and cancer progression as well as the miRNA-based cancer diagnosis.

Keywords: microRNAs (miRNAs); cancer; target gene; host gene; bioinformatics

一系列小分子非编码 RNA 的发现, 包括 siRNA (Small noncoding RNA)、miRNA (microRNA)、piRNA (Piwi-interacting RNA) 和 esiRNA (Endogenous siRNA) 等, 揭开了真核生物基因表达新的调控方式, 极大地丰富了人们对基因表达调控新的认识。miRNA 是小分子非编码 RNA 家族的一个重要成员, 对其进行深入研究, 不但有助于生命规律的认识, 而且也有益于人类健康。miRNA 是一类长度约为 22nt 的内源性非编码 RNA, 通过与靶基因的相互作用在转录及转录后水平调控基因的表达。miRNA 在细胞内首先由 RNA 聚合酶 II 转录为较长的初始转录本 (可长达 1000nt), 后经 *Drosha* 酶剪切成长度约为 70nt 的 miRNA 前体, 最后在 Dicer 酶的作用下生成成熟的 miRNA^[1]。自第一个 miRNA 基因 *lin-4* 于 1993 年在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中被发现以来, 这类参与基因转录后调控的重要非编码小 RNA 一直是生命科学研究的热点, 已在 miRNA 识别、功能及进化等各个方面展开了深入的研究^[2, 3]。研究发现, miRNA 广泛参与一系列生命活动的调控, 包括细胞增殖和分化、器官的形成和发育、激素信号转导、脂肪代谢、行为控制等^[4-6]。此外, miRNA 异常表达还会导致一些人类疾病^[7, 8]。目前, 在 miRBase 数据库中已收录 20 000 多个 miRNA 分子, 涉及从人到病毒等 206 个物种^[9, 10]。

miRNA 在基因组上并非均匀分布, 而是具有位置偏好性, 一部分 miRNA 基因位于基因组的基因间区 (Intergenic region), 而另外一些 miRNA 基因位于蛋白质编码基因的内含子中, 少数位于外显子中, 称之为基因内 miRNA (Intragenic miRNA)。大约 50% 的哺乳动物 miRNA 位于蛋白质编码基因外显子或内含子区的有义链上^[11]。miRNA 通常以单拷贝、多拷贝或基因簇等方式存在于基因组中, 成簇存在是

miRNA 的一个显著特征, 在果蝇基因组中约 50% 的 miRNA 以成簇的方式存在, 在人类基因组中也有超过 30% 的基因成簇排列, 其中包括 mir-17-92 基因簇^[12]。位于同一基因簇的 miRNA 多由同一祖先基因经串联重复而形成^[12, 13]。

近年来, miRNA 在癌症发生中的作用已成为研究热点, 通过基因芯片技术鉴定了 miRNA 在多种癌症中的表达模式^[14]。Calin 等^[15]发现超过 50% 的 miRNA 基因位于肿瘤基因相关区域或脆性位点, 这表明 miRNA 在肿瘤的发生发展过程中起着重要的调控作用。miRNA 参与调控肿瘤的多个方面, 包括转录、细胞周期调节、细胞凋亡、血管生成、肿瘤的浸润和转移。miRNA 既可以作为诱癌基因参与恶性肿瘤的发生和发育, 又可作为抑癌基因参与控制恶性肿瘤的形成^[16]。Volina 等^[17]利用芯片分析 540 份病人的相关实体瘤标本中的 miRNA, 从而确定 miRNA-17-59/20a/21/92/106a/15 为肿瘤 miRNA 标志物。miRNA 还可以通过靶向控制癌细胞增殖的癌基因或抑癌基因, 本身作为抑癌基因或者癌基因调控肿瘤细胞增殖, 如在胰腺癌中 miRNA-125b/103/107/21/155/141/200b 作为癌基因^[18, 19], 而 miRNA-34a 则作为抑癌基因^[20, 21], 在结肠癌中 let-7g、miRNA-181b/200c/17-5p/20/25/92-1/92-2/93-1/106a/21 作为癌基因^[22], 而 miRNA-145/143 则作为抑癌基因^[23]。miRNA 在肿瘤中的作用也存在组织特异性和肿瘤特异性, 例如 miR-155 在上皮来源的实体肿瘤、白血病和淋巴瘤中, 其表达量升高起致癌作用, 而在内分泌肿瘤中, 其表达下调, 可起抑癌作用^[24]。目前, 研究发现 miR-21 几乎在已研究过的实体肿瘤中均表达, 其编码基因定位于染色体 17q23.2 上的液泡膜蛋白基因 (Vacuole membrane protein-1, VMP1) 第 10 个内含子中, 并且发现在染色体 17q23.2 区域

一些肿瘤存在基因组扩增突变^[25]。研究还发现 66% 的肺癌患者中, miR-21 的表达水平至少有 2 倍以上的上调, miR-21 可通过对 *Bcl-2* 基因的调节来发挥其癌基因的作用, 调控肿瘤的发生^[26]。以上研究表明在 miRNA 的参与下, 形成了一个更加复杂的基因调控网络。随着研究的深入, 人们发现越来越多的 miRNA 与癌症发生存在关联, 在癌症形成过程中发挥着重要作用, 但具体的一些调控机制仍不清楚。例如是什么调控 miRNA 的表达? 一些宿主基因与 miRNA 之间是否存在关联? 其作用的靶基因是什么? 基于以上问题, 本文对现有癌症相关 miRNA 的特征及与宿主基因、靶基因的关系做进一步研究, 寻找出规律, 为后面 miRNA 作为肿瘤诊断和临床治疗提供理论和实践依据。

1 材料和方法

1.1 数据来源

从 miRBase 数据库中下载人所有的 miRNA 前体及成熟体序列(<http://www.mirbase.org/ftp.shtml>, Version 20.0), miRNA 家族及成簇分类的数据也通过 miRBase 数据库获得。参考数据库中的注释, 将 miRNA 两两之间的距离位于 10 kb 以内认为其成簇存在^[10]。根据 miRBase 及 Ensembl 数据库提供的基因组位置信息将 miRNA 分为基因内和基因间 miRNA。癌症 miRNA 的相关信息通过搜索 miR2Disease 数据库(Updated Date: Mar.14, 2011, <http://www.mir2disease.org/>)、dbDEMC 数据库(<http://www.noncode.org/dbDEMC/statistics.html>)、miRCancer 数据库(<http://mirancer.ecu.edu/download.jsp>)获得。

1.2 miRNA 保守性及 SNP 位点分布分析

根据 miRNA 在不同物种间保守性情况, 将 miRNA 保守性分为 5 类: G1 代表该 miRNA 在脊椎和无脊椎动物中均保守; G2 代表该 miRNA 在脊椎动物中保守; G3 代表该 miRNA 在哺乳动物中保守; G4 代表该 miRNA 只存在于灵长类动物中; G5 代表该 miRNA 在人中特异存在^[27, 28]。根据以上的分类标准, 分别对人中获得的癌症和非癌症 miRNA 进行保守性分类, 并分别统计每种类型所占的比率。同时以 miRNA 成熟体和前体的基因组位置作为输入文件从 UCSC 数据库(GRCh37/hg19, [http://](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables)

genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables)批量下载基于 46 个脊椎动物比对的人类基因组中每个位点的保守值, 并计算其平均值。miRNA 前体序列上分布的 SNP 位点的信息通过 UCSC 数据库获得。

1.3 miRNA 参与的癌症种类及癌谱值(Cancer spectrum width, CSW)计算

参考 HMDD(<http://cmbi.bjmu.edu.cn/hmdd>)数据库中计算 miRNA 疾病宽度的方法, 本文对 miRNA 参与的癌症种类进行统计, 并利用公式计算其癌谱值 CSW, $CSW(i)=n(i)/N$, 其中 $n(i)$ 代表每个 miRNA 涉及的癌症种类数; N 代表所有 miRNA 涉及的癌症总数。在计算癌谱值过程中, 参考文献^[28]中介绍的方法主要基于 miRNA 基因水平进行计算, 即对有些同一家族的 miRNA 前体基因进行合并, 例如将 hsa-let-7f-1 与 hsa-let-7f-2 合并为 hsa-let-7f。

1.4 癌症相关 miRNA 的转录因子、宿主基因及其靶基因数据的获得及分析

从 TransmiR 数据库(<http://www.cuilab.cn/transmir>)和 miReg 数据库(<http://www.iioab-mireg.webs.com/>, Version 1.0)分别下载 miRNA 与转录因子间调控的数据。同时从 TarBase 数据库(<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>, Version 5.0)和 miRTarBase 数据库(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>, Version 4.3)分别下载实验验证的 miRNA 作用的靶基因信息。miRNA 靶基因生物功能注释信息通过 DAVID 数据库(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>, Version 6.7)获得。miRNA 靶基因及宿主基因中与癌症相关的信息通过 CGAP(<http://cgap.nci.nih.gov/>)数据库获得。

2 结果与分析

2.1 癌症相关 miRNA 的鉴定

从 miRBase 数据库中总计获得了人类 1872 个 miRNA 前体序列。根据 miRBase 数据库的注释, 其中 1436 个 miRNA 位于基因内, 434 个 miRNA 位于基因间区, 2 个 miRNA 未进行位置标记。在 1436 个基因内 miRNA 中, 其中 198 个 miRNA 位于外显子区域, 1094 个 miRNA 位于内含子区域, 144 个 miRNA 因为基因选择性剪接的原因既可位于外显

子中也可位于内含子内。通过整合 miR2Disease、dbDEMC 和 miRCancer 等 3 个数据库提供的癌症相关 miRNA 数据, 本研究发现 miR2Disease 与 dbDEMC 两个数据库共有的癌症相关 miRNA 共计 313 个, miRCancer 与 dbDEMC 共有的癌症相关 miRNA 共计 243 个, miR2Disease 与 miRCancer 共有的癌症相关 miRNA 总计 236 个, 最终在人类 1872 个 miRNA 中发现 475 个 miRNA 与癌症相关(图 1), 剩余的 1397 个 miRNA 根据现有注释并未发现与癌症相关, 将其称之为非癌症 miRNA。在 475 个癌症相关 miRNA 中, 143 个 miRNA 位于基因间区, 332 个 miRNA 位于基因内, 位于基因间区的癌症相关 miRNA 占间区总 miRNA 的比率为 32.95%(143/434), 位于基因内癌症相关 miRNA 占基因内总 miRNA 比率为 23.12%(332/1436)。根据文献报道, miRNA 在细胞存活和凋亡的通路中, 既可以作为肿瘤抑制基因, 又可以作为癌基因对癌症的抑制和发展产生影响^[16]。与 Wang 等^[27]发表的数据对比, 本文发现 475 个癌症相关 miRNA 中, 48 个 miRNA 为肿瘤抑制 miRNA, 36 个为原癌 miRNA 类型, 其中肿瘤抑制 miRNA 包括 let-7、mir-124 家族的成员 原癌 miRNA 包括 hsa-mir-21、hsa-mir-106a 等 (表 1)。剩余的癌症相关 miRNA 本文未再进行分类。

根据文献^[28]中介绍的方法, 计算了 miRNA 涉及的癌症类别即癌谱值 (CSW)。基于 miRNA 基因水平, 在计算过程中对一些 miRNA 前体进行了合并, 例如将 let-7a-1 和 let-7a-2 合并为 let-7a 进行计算, 最终统计发现 475 个 miRNA 中有 421 个 miRNA 涉及了 102 种癌症类型。每个 miRNA 对应癌症数目为

1~47 不等, 其中 18.53% 的 miRNA 只涉及 1 种癌症, 64.8% 的 miRNA 涉及 2~10 种癌症, 23.99% 的 miRNA 涉及 11~20 种癌症, 1.18% 的 miRNA 涉及 31~47 种癌症, 例如 hsa-mir-21 与 47 种癌症有关, hsa-mir-155 与 38 种癌症有关。各种癌症对应的 miRNA 数目也从 1~342 不等, 其中像乳腺癌、食管癌、肾细胞癌涉及的 miRNA 数目比较多。通过计算 CSW 值, 发现基因内 miRNA 平均癌谱值为 0.08877, 基因间区平均癌谱值为 0.0745。在基因内 miRNA 中, 外显子中分布的 miRNA 癌谱值为 0.11124, 而内含子中 miRNA 癌谱值为 0.07897。结果显示, 参与癌症种类最多的 3 个 miRNA, hsa-mir-21、hsa-mir-155 和 hsa-mir-145, 都位于外显子中。通过统计分析发现基因间区、外显子和内含子中 miRNA 癌谱间存在一定差异 (非参数检验, $P\text{-value} = 8.03\text{e-}13$), 外显子中分布的 miRNA 的癌

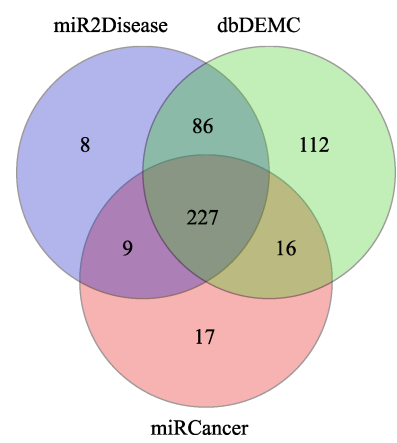


图 1 miR2Disease、dbDEMC 和 miRCancer 数据库中癌症相关 miRNA 的韦恩图

表 1 48 个肿瘤抑制和 36 个原癌 miRNA

miRNA 类型	miRNA
原癌 miRNA 基因	hsa-mir-106a、hsa-mir-106b、hsa-mir-107、hsa-mir-146a、hsa-mir-146b、hsa-mir-150、hsa-mir-155、hsa-mir-17、hsa-mir-18a、hsa-mir-18b、hsa-mir-191、hsa-mir-194-1、hsa-mir-194-2、hsa-mir-196a-1、hsa-mir-196a-2、hsa-mir-19a、hsa-mir-19b-1、hsa-mir-19b-2、hsa-mir-203a、hsa-mir-20a、hsa-mir-20b、hsa-mir-21、hsa-mir-210、hsa-mir-214、hsa-mir-221、hsa-mir-222、hsa-mir-223、hsa-mir-224、hsa-mir-24-1、hsa-mir-24-2、hsa-mir-27a、hsa-mir-372、hsa-mir-373、hsa-mir-92a-1、hsa-mir-92a-2、hsa-mir-93
抑癌 miRNA 基因	hsa-let-7a-1、hsa-let-7a-2、hsa-let-7a-3、hsa-let-7b、hsa-let-7c、hsa-let-7d、hsa-let-7e、hsa-let-7f-1、hsa-let-7f-2、hsa-let-7g、hsa-let-7i、hsa-mir-1-1、hsa-mir-1-2、hsa-mir-101-1、hsa-mir-101-2、hsa-mir-122、hsa-mir-124-1、hsa-mir-124-2、hsa-mir-124-3、hsa-mir-125a、hsa-mir-125b-1、hsa-mir-125b-2、hsa-mir-126、hsa-mir-127、hsa-mir-141、hsa-mir-143、hsa-mir-145、hsa-mir-15a、hsa-mir-16-1、hsa-mir-181a-1、hsa-mir-181a-2、hsa-mir-181b-1、hsa-mir-181b-2、hsa-mir-181c、hsa-mir-195、hsa-mir-200a、hsa-mir-200b、hsa-mir-200c、hsa-mir-26a-1、hsa-mir-26a-2、hsa-mir-26b、hsa-mir-29a、hsa-mir-29c、hsa-mir-34a、hsa-mir-34b、hsa-mir-34c、hsa-mir-451a、hsa-mir-98

谱值要高于基因间区和内含子区域 miRNA 的平均癌谱值,本文推测 miRNA 参与癌症的种类与 miRNA 的基因组位置分布存在一定关联。

2.2 miRNA 保守性及 SNP 分布分析

研究发现,从酵母到人类中一个基因的保守性与基因关联性之间存在显著的相关性,一个基因越保守,表明与其他基因之间的关联越多,如果其功能发生突变后将会带来致命性的影响^[29, 30]。为了揭示 miRNA 保守性与癌症发生之间的关联,本文系统分析了癌症与非癌症 miRNA 保守性、SNP 位点分布以及与癌谱值之间的关系。通过对 475 个癌症相关 miRNA 与 1397 个非癌症 miRNA 跨物种间的保守性进行分析,发现基于 miRBase 数据库中家族分类的数据,可以将 miRNA 在不同物种中保守性情况分为 5 类(G1~G5,详见材料和方法部分),通过比较发现人类中癌症相关 miRNA 与非癌症 miRNA 在 5 种类型中并非均匀分布,癌症相关 miRNA 比非癌症 miRNA 保守性要强,16% (76/475) 和 24.63% (117/475) 的癌症相关 miRNA 出现在 G1 和 G2 的类型中,这个比率要高于非癌症 miRNA (0.14%, 2/1397; 0.86%, 12/1397)。进一步比较发现,在非癌症 miRNA 中,绝大多数 miRNA (70.15%, 980/1397) 属于人特异存在的,而在癌症相关 miRNA 中 G5 类型只占 0.63% (3/475)。以上的结果表明癌症相关 miRNA 由于其功能重要性具有较强的保守性。通过进一步分析癌症相关 miRNA 保守性与其所处的基因组位置之间是否存在关联,发现 G1 保守类型中 17.47% (58/332) 癌症相关 miRNA 位于基因内,12.59% (18/143) 癌症相关 miRNA 位于基因间区, G2 保守类型中基因内癌症相关 miRNA 占 28.31% (94/332), 基因间区 miRNA 占 16.08% (23/143)。利用 UCSC 中 phastCons 数据计算癌症相关 miRNA 的保守值并分析与 miRNA 癌谱之间的关联性,结果发现 421 个癌症相关 miRNA 平均保守值为 0.6265, 癌谱平均值为 0.0852, 统计分析结果显示 miRNA 涉及癌症数目与保守性成正相关 ($R=0.5625$, $P=2.2E-16$, Spearman's correlation), 即越保守的 miRNA 其参与的癌症种类越多。

单核苷酸多态性 (SNP) 常可以用于评估基因进化的保守性,人类基因组中保守基因发生 SNP 突

变的频率比较低^[31,32]。本文利用 UCSC 数据库提供的数据分析了 miRNA 基因上 SNP 位点的分布密度,并比较了癌症相关 miRNA 与非癌症 miRNA 上 SNP 位点分布的差异。结果显示癌症相关 miRNA 与非癌症 miRNA 上 SNP 位点分布密度存在一定差异。在 475 个癌症相关 miRNA 中有 68 个 miRNA 序列发现了 85 个 SNP 位点的分布, SNP 发生的频率为 14.32% (68/475), 而 1395 个非癌症 miRNA 中仅有 392 个 miRNA 发生了 SNP 突变, SNP 发生频率为 28.10% (392/1395)。68 个癌症 miRNA 上分布的 SNP 位点数目为 1~5 不等, 88.88% miRNA 上分布了 1 个 SNP 位点; 16.18% miRNA 上分布了 2 个 SNP 位点; hsa-mir-550a-3 上分布了 3 个 SNP 位点; hsa-mir-650 上分布了 5 个 SNP 位点, SNP 的分布密度为 0.013。而非癌症 miRNA 中每个 miRNA 上分布的 SNP 位点数目为 1~7 不等, 其中 73.72% miRNA 分布了 1 个 SNP 位点, 21.68% miRNA 上分布了 2 个 SNP 位点, 3.32% miRNA 上分布了 3 个 SNP 位点, 1 个 (0.26%) miRNA 上分布了 4 个 SNP 位点, 3 个 (0.77%) miRNA 上分布了 5 个 SNP 位点, 1 个 (0.26%) miRNA 上分布了 7 个 SNP 位点, SNP 的平均分布密度为 0.017。以上分析结果表明,癌症相关 miRNA 具有较强的保守性,其发生 SNP 概率也比较低,这可能与行使特殊的功能存在一定的关联。以上发现对理解人类疾病易感性提供一定的启发。

2.3 癌症相关 miRNA 基因组定位及成簇分析

miRNA 在基因组上并非均匀分布,而是存在分布的热点,通过分析癌症与非癌症 miRNA 在基因组上的分布 (图 2), 发现 475 个癌症相关 miRNA 分布于 23 条染色体上,其中 Y 染色体上未见癌症相关 miRNA 的分布,平均每条染色体上分布的 miRNA 数为 21,在染色体 14、19 和 X 上分布的 miRNA 较多,各自分布了 49、64 和 49 个 miRNA,而在染色体 21 和 18 上分布的 miRNA 最少,均只分布了 5 个 miRNA。1397 个非癌症 miRNA 分布于 24 条染色体,平均每条染色体上 miRNA 数为 58,且在染色体 1 和染色体 2 上分布的 miRNA 数比较多,分别为 131 和 100 个 miRNA,在染色体 Y 和 21 上分布 miRNA 较少,分别分布了 2 个和 17 个 miRNA。miRNA 可以位于基因内,人类中 miRNA 总计位于

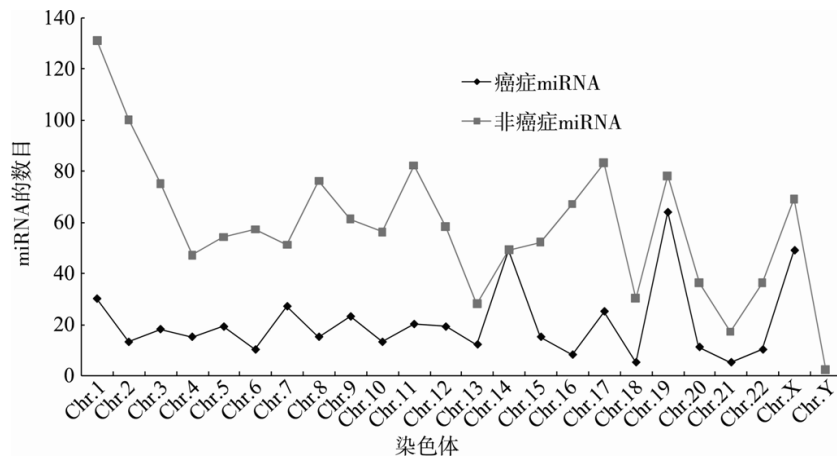


图2 癌症相关 miRNA 与非癌症 miRNA 染色体分布统计

1219 个宿主基因, 其中癌症相关 miRNA 宿主基因 266 个, 非癌症 miRNA 宿主基因 995 个。根据 CGAP、TAG 及 COSMIC 数据库分析结果发现, 1219 个宿主基因中有 350 个基因与癌症相关, 其中标注为原癌基因 12 个, 肿瘤抑制基因 24 个, 350 个癌症相关的宿主基因中有 67 个宿主基因中包含癌症相关的 miRNA ($67/350=19.14\%$), 发现非癌症相关 miRNA 倾向于位于癌症相关的宿主基因内。

成簇存在是 miRNA 的一个典型特征, 成簇存在的 miRNA 可能具有共转录的特性并且功能上相关^[12,13]。根据 miRBase 提供的成簇 miRNA 信息, 将位于 10 kb 以内的 miRNA 认为其成簇存在, 总计获得了由 465 个 miRNA 组成的 153 个 miRNA 簇, 465 个 miRNA 中癌症相关的 miRNA 为 247 个, 占总癌症相关 miRNA 数目的 52% (247/475), 而非癌症 miRNA 中成簇 miRNA 的比率仅为 15.60% (218/1397), 结果表明癌症相关 miRNA 比非癌症 miRNA 更倾向于成簇存在。

2.4 癌症相关 miRNA 的转录调控分析

miRNA 的转录受转录因子 (Transcription factors, TFs) 调控。TFs 对 miRNA 的正确调控具有关键性, 并且越来越多的证据表明 TFs 对 miRNA 的异常调控能够引起表型变化和疾病^[33]。本研究从 TransmiR 和 miReg 数据库获得了 TF-miRNA 转录调控关系的数目, 并统计每一个 miRNA 上游转录因子的数目。对 TransmiR 里获得的 649 个和 miReg 数据库中 295 个 TF-miRNA 调控数目进行处理, 最后总计获得了 160 个 miRNA 和 205 个 TF, 其中 156 个 miRNA 与癌症

相关, 205 个 TF 里面绝大多数也是参与调控癌症发生的转录因子, 如 TP53、AKT1、MYC 等。通过统计发现 miRNA 上游转录因子的调控数目从 1~26 不等, 其中 hsa-mir-21 发现有 26 个转录因子参与调控, 包括 AP-1、TCF4、RAS 等转录因子。将 miRNA 所有宿主基因与转录因子进行比较, 发现有些宿主基因同时也是 miRNA 的转录因子 (表 2)。同时本研究还发现一些非癌症的 miRNA 的宿主基因倾向于调控一些癌症 miRNA 的表达。

2.5 癌症相关 miRNA 的靶基因

miRNA 主要通过和靶 mRNA 之间的互补配对切割信使 RNA 或抑制翻译这两种转录后调控机制, 实现下调靶基因表达。在动物中 miRNA 通常与靶 mRNA 的 3' 非翻译区域以不完全配对方式结合, 从而导致翻译抑制。本文从 TarBase 数据库下载了人类中 miRNA 作用的靶标数据, 总计获得了 1088 个 miRNA-Target 之间作用关系, 涉及 109 个 miRNA 和 859 个靶基因, 109 个 miRNA 均为本工作中分析的癌症相关 miRNA。1088 个 miRNA-Target 作用的关系中有 52 个位点属于 mRNA 裂解的活性, 132 个位点属于 mRNA 抑制的活性, 剩余的靶位点暂未明确注释。根据 TarBase 数据库的注释, 1088 个 miRNA-Target 之间作用关系中有 81 个 miRNA-Target 与各种肿瘤相关, 例如 let-7 作用在 HMGA2 基因上, 涉及肿瘤类型为肉瘤和恶性肿瘤。结果显示, 人中各个癌症 miRNA 作用的靶标数量从 1~201 不等, 其中 miR-1 作用了 201 个靶基因。另外还发现同一家族的不同 miRNA 所作用的靶基因

表 2 miRNA 宿主基因与转录因子信息统计

基因	宿主 miRNA	转录因子 miRNA	基因描述
<i>AKT2</i>	hsa-mir-641*	hsa-mir-22*	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
<i>ASH1L</i>	hsa-mir-555	hsa-mir-375*	Ash1 (absent, small, or homeotic)-like (<i>Drosophila</i>)
<i>BECN1</i>	hsa-mir-6781	hsa-mir-30a*, hsa-mir-30e*, hsa-mir-30d*	Beclin 1, autophagy related
<i>DDX5</i>	hsa-mir-3064	hsa-mir-182*, hsa-mir-21*	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5
<i>EP300</i>	hsa-mir-1281	hsa-mir-141*, hsa-mir-200c*	E1A binding protein p300
<i>ERBB2</i>	hsa-mir-4728	hsa-mir-181a-1*, hsa-mir-221*, hsa-mir-222*, hsa-mir-30a*, hsa-mir-30e*, hsa-mir-342*, hsa-mir-520a*	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
<i>ETSI</i>	hsa-mir-6090	hsa-mir-146a*, hsa-mir-222*	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
<i>HDAC4</i>	hsa-mir-2467	hsa-mir-1-1*, hsa-mir-200c*	Histone deacetylase 4
<i>HMGA1</i>	hsa-mir-6835	hsa-mir-101-1*, hsa-mir-29c*, hsa-mir-331*, hsa-mir-101-2*, hsa-mir-196a-2*, hsa-mir-222*, hsa-mir-29a*, hsa-mir-29b-1*	High mobility group AT-hook 1
<i>JAG1</i>	hsa-mir-6870	hsa-mir-143*, hsa-mir-145*	Jagged 1
<i>KAT2B</i>	hsa-mir-3135a	hsa-mir-141*, hsa-mir-200c*	K(lysine) acetyltransferase 2B
<i>PRKCA</i>	hsa-mir-634*	hsa-mir-15a*	Protein kinase C, alpha
<i>RXRA</i>	hsa-mir-4669	hsa-mir-193a*	Retinoid X receptor, alpha
<i>TCF4</i>	hsa-mir-4529	hsa-mir-181a-1*, hsa-mir-181b-2*, hsa-mir-21*	Transcription factor 4
<i>TP63</i>	hsa-mir-944	hsa-mir-181a-1*, hsa-mir-374a*, hsa-mir-193a*, hsa-mir-519a-1*, hsa-mir-630*	Tumor protein p63
<i>YY1</i>	hsa-mir-6764	hsa-mir-1-1*, hsa-mir-29a*, hsa-mir-29b-1*, hsa-mir-29c*	YY1 transcription factor

注: 宿主 miRNA 即该基因为该 miRNA 的宿主基因; 转录因子 miRNA 即该基因为该 miRNA 的转录因子; *标记表明该 miRNA 为癌症相关 miRNA。

也存在差异, 例如 let-7 家族中 let-7a 作用了 2 个靶基因, let-7b 作用了 86 个靶基因, let-7c 作用了 1 个靶基因。通过对靶基因的比较发现, 作用于每个靶基因上的 miRNA 的数量也存在差异, 分别在 1 ~ 12 不等。

为了更好地理解 miRNA 作用靶基因的功能, 利用 DAVID 数据库提供的基因功能注释工具对 109 个癌症相关 miRNA 作用的靶基因进行靶基因功能和参与的调控通路分析, 结果表明, 靶基因相关的分子功能中包括结合活性、核酸结合活性、酶调节活性、蛋白质激酶活性、转录因子结合活性等。参与的生物进程中包括参与血管形成、调节细胞粘附、调节细胞凋亡、免疫系统的发育、肌肉细胞分化、细胞内的信号级联、调节 T 细胞分化等。通过 KEGG 通路分析发现, miRNA 靶基因中有 489 个基因参与了 35 个通路(图 3), 涉及的通路包括: 膀胱癌、胰腺癌、慢性粒细胞白血病、前列腺癌、p53 信号通

路、MAPK 信号通路等。同时还发现多数靶基因参与一些癌症通路, 例如在癌症通路 hsa05200 中发现有 43 个靶基因参与了 14 种癌症的通路, 这些靶基因包括 *MET*、*ALK4*、*P21*、*E2F1*、*E2F3*、*CDK6* 和 *VEGF* 等, 涉及的 miRNA 包括 miR-155、miR-24、miR-34a、miR-16、miR-30a-3p 和 miR-17-5p 等。

miRNA 可负反馈调控其宿主基因。利用 miRWalk 数据库将宿主基因作为输入序列, 预测出被 miRNA 作用的靶基因, 结果发现人类中总计 1232 个宿主基因中有 242 个宿主基因能被 407 个 miRNA 作用。通过分析发现宿主基因与内含子 miRNA 及靶基因间存在复杂的调控关系, 例如宿主基因能被本身宿主 miRNA 作用, 两个宿主基因与其各自的内含子 miRNA 形成双向负调节回路。例如, 宿主基因 *HOXB3* 能被本身编码的 miRNA hsa-miR-10a 作用; 主基因 *NFYC* 编码的 miRNA miR-30e 和 miR-30c 其作用的靶基因 *C9orf5* 为 miR-32 的宿主基因, 而宿

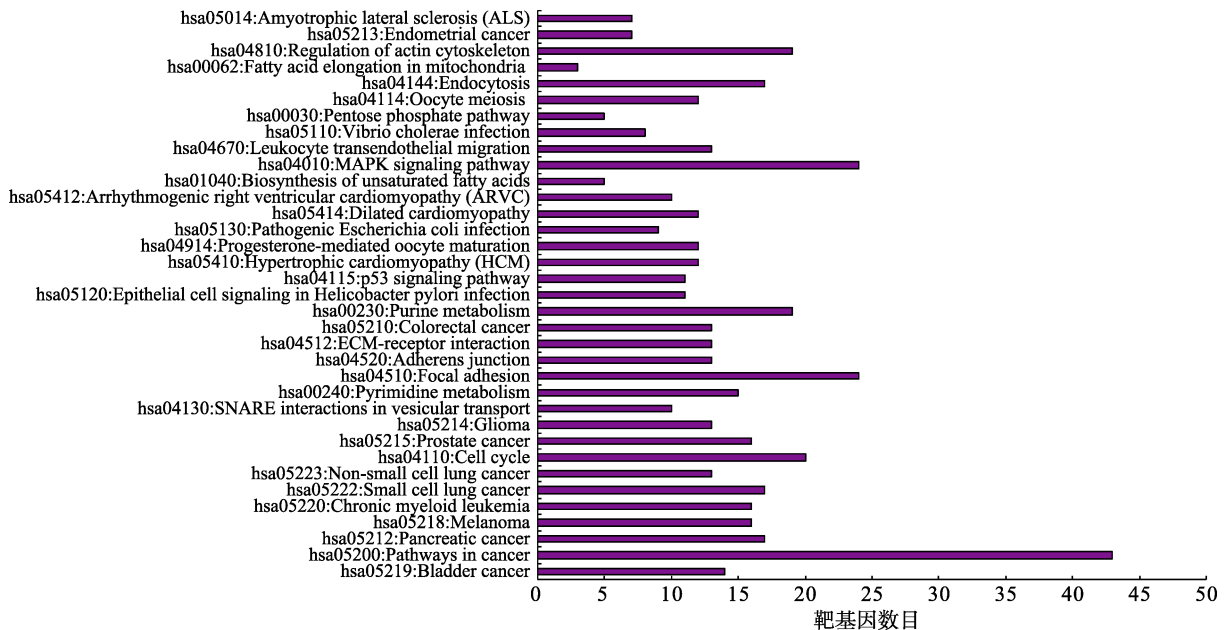


图 3 癌症相关 miRNA 靶基因参与的调控通路

主基因 *NFYC* 又能被 miR-32 作用。进一步分析发现 281 个宿主 miRNA 中有 68 个 miRNA 宿 (68/281=24.20%) 与癌症相关, 407 个 miRNA 中有 342 个 miRNA (342/407=84.03%) 与癌症相关。本文发现非癌症 miRNA 所在宿主基因倾向于被癌症 miRNA 作用。以上结果表明, 癌症相关 miRNA 与其靶基因、宿主基因之间形成了一个更加复杂的基因调控网络。

3 讨论

miRNA 这类由大约 22nt 构成的微小分子成熟体, 调节着哺乳动物绝大部分基因的表达, 其发现极大的丰富了人们对蛋白质合成调控的认识, 补充了在 RNA 水平对靶 mRNA 分子进行更迅速和有效的调节, 展现了细胞内基因表达调控全方位多层次的网络系统^[1, 5, 6, 34]。近年来, 随着肿瘤研究的深入, miRNA 已经成为肿瘤生物治疗领域的一个新亮点, 越来越引起研究人员的关注。目前, 已在人类中发现了 1000 多个 miRNA, 可以调控人类大约 1/3 基因的表达水平。尽管目前已研究证实 miRNA 突变可激活相关癌基因的表达或引发抑癌基因的缺失, 导致肿瘤的发生^[6, 16, 35]。然而目前科学家们尚未全面了解 miRNA 在癌症发展中的作用。本研究在广泛搜集癌症相关的 miRNA 信息的基础上, 通过与非癌症

miRNA 在基因组位置分布特征、保守性、SNP 位点分布、癌谱值及作用的靶基因等方面进行比较, 总结出 miRNA 在癌症中的作用规律, 为深入理解 miRNA 在癌症中的功能提供帮助, 也将为 miRNA 作为肿瘤及其他疾病诊断和治疗提供重要的依据。

miRNA 的保守性分析结果表明, 40.63% 癌症相关 miRNA 出现在 G1 和 G2 保守类型中, 即在脊椎动物及进化距离更远的物种间保守, 而非癌症 miRNA 中只有 1.0% 的 miRNA 属于 G1 和 G2 的类型, 70.15% 的非癌症 miRNA 属于人特异存在的, 而癌症相关 miRNA 中只有 1.05% miRNA 属于人特异存在的, 这些 miRNA 包括 hsa-mir-659、hsa-mir-585、hsa-mir-620, 其中 hsa-mir-620 与食道癌有关, hsa-mir-585 和 hsa-mir-659 与乳腺癌有关。保守的 miRNA 暗示着其在进化过程中具有相似的功能, 例如人保守的癌症 miRNA miR-21 在小鼠中具有启动调节坏死的功能^[36]。进一步分析发现, 人特异的非癌症 miRNA 多为新发现的一些 miRNA, 因目前研究还不深入, 导致其功能或在其他物种中同源基因还有待进一步挖掘, 相信随着研究的深入以及新技术的发现, 将会发现更多新的癌症 miRNA。SNP 即单核苷酸多态性是人类基因组上比较常见的一种遗传多态性^[37], SNP 常可以用于评估 miRNA 进化的保守性, 一般人类基因组中保守的基因发生 SNP 突

变的频率比较低^[31, 32]。本文中, 为了更深入分析癌症相关 miRNA 的保守性, 我们对 miRNA 基因上 SNP 位点的分布密度进行了分析, 并比较癌症相关 miRNA 与非癌症 miRNA 上 SNP 位点分布的差异, 结果显示癌症相关 miRNA 具有较强的保守性, 其发生 SNP 突变的概率要低于非癌症 miRNA。

癌症相关 miRNA 的转录调控及靶基因分析结果显示, 癌症相关 miRNA 预测的转录因子中绝大多数参与调控癌症的发生, 如 *TP53*、*AKT1*、*MYC* 等, 并且发现一些 miRNA 的宿主基因能调控 miRNA 的表达, 尤其是一些非癌症的 miRNA 的宿主基因倾向于调控一些癌症 miRNA 的表达。例如, *hsa-mir-555* 的宿主基因 *ASH1L* 为 miRNA *hsa-mir-375* 的转录因子在肺癌细胞中 *miR-375* 能被 *ASH1* 激活后以细胞系依赖方式抑制 *YAP1* 表达^[38]; 肿瘤基因 *TP63* 为 *hsa-mir-944* 的宿主基因能调控癌症相关 miRNA *hsa-mir-181a-1*、*hsa-mir-374a*、*hsa-mir-193a*、*hsa-mir-519a-1* 和 *hsa-mir-630* 的表达, 其中 *mir-181a*、*mir-519a*、*mir-374a* 和 *mir-630* 又为 *p63* 重要的下游靶基因^[39]; *hsa-mir-6090* 的宿主基因 *ETS1* 本身是一个原癌基因, 同时也是癌症相关 miRNA *hsa-mir-146a* 和 *hsa-mir-222* 的转录因子^[40]。对癌症相关 miRNA 作用的靶基因功能和参与的调控通路进行分析, 结果发现这些通路中包括膀胱癌、胰腺癌、慢性粒细胞白血病、前列腺癌、*p53* 信号通路、*MAPK* 信号通路等。进一步分析发现, miRNA 可负反馈调控其宿主基因, 一些非癌症 miRNA 所在的宿主基因倾向于被癌症 miRNA 作用。综合以上的分析结果, 癌症 miRNA 与其宿主基因及靶基因与癌症发生之间存在复杂的调控关系, 然而由于目前癌症相关 miRNA 的了解还不是很充分, 另外仅有少量的靶基因经实验验证, 许多层面的调控还有待于进一步通过实验研究证实, 相信随着这些研究的开展, 将全面揭示 miRNA 在癌症发生中的作用机制, 并将会为 miRNA 作为癌症的诊断和治疗提供依据。

参考文献

- [1] Lee Y, Kim M, Han JJ, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051–4060. [DOI]
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854. [DOI]
- [3] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75(5): 855–862. [DOI]
- [4] Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen XM, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 2003, 9(3): 277–279. [DOI]
- [5] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 175–205. [DOI]
- [6] Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol*, 2008, 59(5): 725–737. [DOI]
- [7] Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer*, 2010, 9(1): 306. [DOI]
- [8] Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(6): 703–711. [DOI]
- [9] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Database issue): D152–D157. [DOI]
- [10] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D154–D158. [DOI]
- [11] Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, Davidson BL. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 2010, 16(3): 495–505. [DOI]
- [12] Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8): 2697–2706. [DOI]
- [13] Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW, Zhang JW. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(1): 59–68. [DOI]
- [14] Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(12): 849–864. [DOI]
- [15] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 10154–10159. [DOI]

- 2999–3004. [DOI]
- [16] Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 2007, 302(1): 1–12. [DOI]
- [17] Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2257–2261. [DOI]
- [18] Lee YS, Kim HK, Chung S, Kim KS, Dutta A. Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 16635–16641. [DOI]
- [19] Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, 2006, 24(29): 4677–4684. [DOI]
- [20] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 745–752. [DOI]
- [21] Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 2008, 7(16): 2591–2600. [DOI]
- [22] Nakajima G, Hayashi K, Xi YG, Kudo K, Uchida K, Takasaki K, Yamamoto M, Ju JF. Non-coding microRNAs *hsa-let-7g* and *hsa-miR-181b* are associated with chemoresponse to S-1 in colon cancer. *Cancer Genomics Proteomics*, 2006, 3(5): 317–324. [DOI]
- [23] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep*, 2006, 16(4): 845–850. [DOI]
- [24] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857–866. [DOI]
- [25] 杨昶, 康春生. miRNA-21 与肿瘤相关研究新进展. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(6): 357–360. [DOI]
- [26] Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*, 2008, 14(11): 2348–2360. [DOI]
- [27] Wang D, Qiu CX, Zhang HJ, Wang J, Cui QH, Yin YX. Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS One*, 2010, 5(9): e13067. [DOI]
- [28] Lu M, Zhang QP, Deng M, Miao J, Guo YH, Gao W, Cui QH. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3420. [DOI]
- [29] Fraser HB, Hirsh AE, Steinmetz LM, Scharfe C, Feldman MW. Evolutionary rate in the protein interaction network. *Science*, 2002, 296(5568): 750–752. [DOI]
- [30] Jordan IK, Mariño-Ramírez L, Wolf YI, Koonin EV. Conservation and coevolution in the scale-free human gene coexpression network. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(11): 2058–2070. [DOI]
- [31] Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nat Genet*, 2003, 33(4): 457–458. [DOI]
- [32] Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet*, 2006, 38(12): 1452–1456. [DOI]
- [33] Wang J, Lu M, Qiu C, Cui Q. TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D119–D122. [DOI]
- [34] 李成梅, 郑继刚, 杜桂森. miRNA: 一种新的基因表达调节子. *遗传*, 2004, 26(1): 133–136. [DOI]
- [35] 吴易阳, 李岭. MicroRNA 与肿瘤相关的信号转导通路. *遗传*, 2007, 29(12): 1419–1428. [DOI]
- [36] Ma XD, Conklin DJ, Li F, Dai ZP, Hua X, Li Y, Xu-Monette ZY, Young KH, Xiong W, Wysoczynski M, Sithu SD, Srivastava S, Bhatnagar A, Li Y. The oncogenic microRNA miR-21 promotes regulated necrosis in mice. *Nat Commun*, 2015, 6: 7151. [DOI]
- [37] Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet*, 2001, 27(3): 234–236. [DOI]
- [38] Nishikawa E, Osada H, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. *Cancer Res*, 2011, 71(19): 6165–6173. [DOI]
- [39] Huang YP, Guerrero-Preston R, Ratovitski EA. Phospho-ΔNp63α-dependent regulation of autophagic signaling through transcription and micro-RNA modulation. *Cell Cycle*, 2012, 11(6): 1247–1259. [DOI]
- [40] Mattia G, Errico MC, Felicetti F, Petrini M, Bottero L, Tomasello L, Romania P, Boe A, Segnalini P, Di Virgilio A, Colombo MP, Carè A. Constitutive activation of the ETS-1-miR-222 circuitry in metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24(5): 953–965. [DOI]