上海交通大學

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR

论文题目：MicroRNA 的 SNP 与卵巢癌和子宫内膜癌的关系探讨

学生姓名：李姝锦

学生学号：5097409045

专　　业：医学检验

指导教师：倪培华

学院(系)：医学院

MicroRNA 的 SNP 与卵巢癌和子宫内膜癌的关系探讨

摘要

目的：拟研究miR-146a基因的rs2910164位点(G＞C)、miR-196a2基因的rs11614913位点（C＞T）、miR-499基因的rs3746444位点(T＞C)的单核苷酸多态性（SNP）与上海地区女性卵巢癌和子宫内膜癌发生的关联性，并进一步研究上述3个SNP对卵巢癌/子宫内膜癌的发病风险和癌症分期的影响。**方法：**本文选用病例-对照方法，选取上海地区卵巢癌、子宫内膜癌患者外周血共计216例（剔除转移性癌症和数据缺失样本后，卵巢癌75例，子宫内膜癌141例），以健康体检女性外周血100名作为对照，采用NaI法提取全血DNA，运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法（PCR-RFLP）检测SNP位点的基因型，并以基因测序方法验证PCR-RFLP的检测结果；运用SPSS 18.0统计软件分析SNP位点的基因单倍型和等位基因与卵巢癌和子宫内膜癌的关联，运用Epi info 7.0进行等位基因的趋势检验。**结果：**miR-146a的rs2910164多态性位点（G＞C）的三种基因型在子宫内膜癌/卵巢癌病例组与对照组中的分布差异具有显著性（P＜0.05），且以GG基因型作为参照，CC基因型和CG基因型能显著降低罹患子宫内膜癌（OR＝0.238，95% CI＝0.110～0.516；OR＝0.143,，95% CI＝0.068-0.300）和卵巢癌（OR＝0.118, 95% CI＝0.048-0.294; OR＝0.120, 95% CI＝0.053-0.271）的风险。此外，通过趋势检验得出rs2910164减低癌症风险的作用存在显著的等位基因剂量效应。miR-196a2的rs11614913多态性位点（C＞T）各基因型在子宫内膜癌病例组和对照组中的分布无统计学差异（P＞0.05），但以CC基因型为参照得到的CT基因型OR值（2.125,95% CI＝1.053～4.285）显示该基因型可能与子宫内膜癌的患病风险增加存在关联。相反，该多态性位点各基因型在卵巢癌病例组和对照组中的分布存在统计学差异（P＜0.05），以CC基因型为参照，携带CT基因型个体发生卵巢癌的危险增加2.677倍（OR＝3.677，95% CI＝1.375～9.832），携带TT基因型个体发生卵巢癌的风险增加2.012倍（OR＝3.012，95% CI＝1.046～8.675）。miR-499的多态性位点（rs3746444）的两种基因型（即TT型和CT型）在子宫内膜癌病例组和对照组中的分布存在微弱的统计学差异（χ^2＝4.340，P＝0.037）。以TT型为参照，携带CT基因型的个体有更低的子宫内膜癌患病风险（OR＝0.490，95% CI＝0.248-0.966)。同样，T等位基因和C等位基因在两组中的分布也存在统计学差异，且以T等位基因为参照，C等位基因能减低个体子宫内膜癌的患病风险（OR＝0.525，95% CI＝0.275～1.001)。而该多态性位点的基因型分布在卵巢癌病例组和对照组中无显著差异。**结论：**本研究结果显示，miR-146a rs2910164多态性位点可减低子宫内膜癌和卵巢癌患病风险，miR-196a2 rs11614913多态性位点可增加卵巢癌的患病风险，miR-499 rs3746444多态性位点可减低子宫内膜癌的患病风险。同时，此次研究的3个SNP对卵巢癌和子宫内膜癌的癌症分期和病理分级均无显著影响。

关键词： 微小RNA，单核苷酸多态性， 卵巢癌，子宫内膜癌

CORRELATION BETWEEN MICRORNA SNP AND OVARIAN/ENDOMETRIAL CANCER

ABSTRACT

Object: This case-control study conducted in Shanghai China aimed to investigate the relationship between microRNA(miRNA) single nucleotide polymorphism(SNP)(miR-146a G>C, miR-196a2 C>T, and miR-499 T>C) and ovarian/endometrial cancer, and to consider whether the 3 SNPs confer risk of ovarian/endometrial cancer or influence the cancer staging. **Method:** Template DNA of 216 primary ovarian/endometrial cancer cases and 100 healthy controls were extracted by NaI and genotyped for 3 SNPs using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymophism(PCR-RFLP). The results were confirmed by gene sequencing. Employ the SPSS 18.0 to analyze the correlation between haplotypes/alleles and ovarian/endometrial cancer. Using the Epi info 7.0 to conduct trend analysis by Chi Squar for trend. **Result:** The three genotypes of rs2910164 distribute significantly defferently between ovarian/endometrial cancer cases and contros, with P<0.05. Compared with GG homozygote, CC and CG genotypes can significantly reduce the risk of endometrial cancer（OR＝0.238, 95% CI＝0.110-0.516; OR＝0.143, 95% CI＝0.068-0.300, respectively）and ovarian cancer（OR＝0.118, 95% CI＝0.048-0.294; OR＝0.120, 95% CI＝0.053-0.271, respectively）. In addition, there was a significant trend for an allele dose effect on reducing risk of endometrial/ovarian cancer(P＜0.05). For the SNP of rs11614913, there was no significant difference in genotypes distribution between endometrial cancer cases and controls but between ovarian cancer cases and controls. Compared with CC homozygote, individuals carrying CT heterozygote had a marginally increased susceptibility to endometrial cancer(OR=2.125, 95% CI＝1.053-4.285). Furthermore, individuals carrying CT heterozygote had a statistically significant increased susceptibility by 2.677 times to ovarian caner（OR＝3.677, 95% CI＝1.375-9.832）, and the similar effects (increased by 2.012 times) were observed in individuals carrying TT genotypes （OR＝3.012，95% CI＝1.046-8.675）. The CT genotype of rs3746444 showed marginal relation with subdued risk of endometrial cancer when referring to TT genotype (OR=0.494, 95% CI=0.248~0.966). In addition, the similar trend was observed in C allele when compared to T allele (OR=0.525, 95% CI=0.275~1.001). Meanwhile, our data suggest none correlation neither between the 3 SNPs and the cancer staigngs, nor between the 3 SNPs and the histopathological gradings. **Conclusion:** Our results suggest that miR-146a rs2910164 polymophism can reduce the risk of endometrial cancer and ovarian cancer, miR-196a2 rs11614913 polymophism can increase the risk of ovarian cancer and miR-499 rs3746444 can reduce the risk of endometrial cancer. Larger population-based studies should be conducted to validate our findings.Meanwhile, our data suggest none correlation neither between the 3 SNPs and the cancer staigngs, nor between the 3 SNPs and the histopathological gradings.

Key words: microRNA, single nucleotide polymophism(SNP), ovarian cancer, endometrial cancer

目 录

第一章 绪论----1
第二章 MicroRNA的SNP与卵巢癌和子宫内膜癌的关系探讨
2.1 引言----2
2.2 材料与方法----2
2.2.1 研究对象----3
2.2.2 实验试剂与仪器----3
2.2.3 试验方法----4
2.2.4 统计方法----5
2.3 结果----6
2.3.1 研究对象年龄分析----6
2.3.2 PCR产物琼脂糖电泳结果----6
2.3.3 RFLP结果----6
2.3.4 测序结果----7
2.3.5 等位基因及单倍型频率分布与卵巢癌/子宫内膜癌的关联性分析----10
第三章 讨论----13
3.1 microRNA及其SNP与肿瘤的关系----13
3.2 子宫内膜癌和卵巢癌----14
3.3 miR-146a、miR-196a2和miR-499与卵巢癌和子宫内膜癌的关联分析----14
3.4 本研究的优势与不足之处----15
第四章 结论----15
参考文献----16
致谢----18
综述----19
综述参考文献----23
译文----26
译文原文----33

第一章 绪论

子宫内膜癌是女性生殖道三大恶性肿瘤之一，在美国，子宫内膜癌也是妇科恶性肿瘤中最常见的类型。卵巢癌是恶性程度最高的妇科肿瘤，由于早期症状不明显，并缺乏有效的筛查方法，所以大部分患者被诊断时已处于癌症晚期阶段，虽然其发病率低于子宫内膜癌，但卵巢癌引起的死亡远多于子宫内膜癌。研究表明卵巢癌在妇科恶性肿瘤死因中列第一位，而在全美癌症致死因素排第五位[1]。据美国癌症协会估计，2012 年美国出现子宫体癌新增病例 47130 例（多数为子宫内膜癌），占女性恶性肿瘤的 6%；新增子宫体癌死亡病例 8010 例，占女性恶性肿瘤死亡病例的 2.9%；新增卵巢癌病例 22280 例，占女性恶性肿瘤的 2.8%，新增卵巢癌死亡病例 15500 例，占女性恶性肿瘤死亡病例的 5.6%[2]。近年来，我国女性子宫内膜癌和卵巢癌的发病率明显上升，且发病年龄趋于年轻化，虽然我国女性卵巢癌的发病和死亡率不高，并且死亡年龄呈逐年上升趋势，但由于其发病隐匿，病死率高，严重威胁着妇女的健康[3]。

微小 RNA（microRNA，miRNA） 是一类在不同物种间高度保守的小 RNA 分子（约 19~22 个核苷酸），以信使核糖核酸（mRNAs）为目标靶基因，通过与 mRNAs 的 3’非转录区（3’untranslated region，3’UTR）序列完全或不完全特异性互补，在某种程度上导致 mRNA 降解或翻译抑制，从而在转录后水平调控基因的表达[4]。目前普遍认为 miRNA 可作为癌基因（如 miR-155 和 miR-17-92 簇）或抑癌基因（如 miR-15a 和 miR-16-1）而在肿瘤发生中发挥作用[5]， 并因其广泛的调节作用而逐渐成为近年来分子生物科学领域的研究热点。研究表明人类基因组中约 30%的基因受至少一个 miRNA 调控[6]，且据估计约 60%的人类 mRNAs 是 miRNAs 的目标靶基因[7]。目前已发现 1600 种 has-miRNA 前体，2042 种成熟 has-miRNA（http://www.mirbase.org/）。据研究，许多编码 microRNAs 的基因位于肿瘤相关的基因组区域或脆性位点，并且位于缺失区域的 miRNAs 在肿瘤样本中的呈低量表达[8]。单核苷酸多态性（single-nucleotide polymorphism, SNP）是指在基因组水平上，由单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性，是人类可遗传变异种最常见的一种。大量的单个核苷酸变异为阐明人类肿瘤发病机制、临床特点和疗效差异提供了新的研究方向和依据。SNPs 可以直接或间接影响 miRNA：pri-microRNA、pre-microRNA 或成熟 microRNA 中的 SNPs 可影响 miRNA 的加工或其功能；miRNA 基因启动子的 SNPs 能阻止转录因子与之结合，抑制 pri-microRNA 转录，并且 mRNA 中的 SNPs 能产生新的结合位点或破坏原本的结合位点，间接对 miRNA 产生影响[9]。发生在成熟 miRNA 的 SNPs（特别是发生在种子区域的 SNPs）可能影响基因沉默的特异性[10]，而发生在 miRNA 靶基因 3’UTR 的 SNP 可能更具靶位和通路特异性[11]。根据最新的数据显示，202 个 pre-miRNA 中存在 283 个 SNP，在已知的 120 000 个发生在 3’UTRs 的 SNPs 中，约 17%的 SNP 破坏了推定的保守或非保守 miRNA 结合位点[12]。经过大量研究，人们发现 miRNA 在多种肿瘤的发生、分期、预后中发挥一定的作用，但由于 miRNA 对 mRNA 的调节作用不具有特异性，相同的 miRNA 可在不同组织中起到截然不同的调节作用，甚至在不同人种病例中发挥不同的作用，例如减低或增加癌症风险，所以针对单个人种某种肿瘤相关的 miRNA 研究是由其必要的。

此次研究的三种 miRNA 均被证实与多种肿瘤有关。miR-146a 的编码基因位于 5 号染色体长臂 3 区 4 带（5q34），SNP rs2910164（G/C）处于 pre-miR-146a 的茎环结构。miR-146a 具有潜在调节肿瘤坏死因子受体相关的因子 6（TRAF6）和白介素-1 受体相关的激酶 1（IRAK1）基因的作用[13]，这两种物质都是在细胞增殖和免疫识别中起重要作用的信号转导途径中 Toll 样受体和细胞因子受体重要的适配分子下游[14]。Wang[15]等发现，携带 rs2910164-G 等位基因的 pre-miR-146a 在白种人中可作为阻止肿瘤发展的保护因素，然而该种 pre-miR-146a 却是亚洲人、男性患者、吸烟患者病例中的危险因素。Devor[16]等研究发现，miR-146a 在子宫内膜样肿瘤中高表达。由于 SNP 可调节 miRNA 的成熟过程，所以我们可以假设 miR-146a 在子宫内膜样肿瘤中的高表达与 SNP rs2910164 有关。Pre-miR-196a2 的 SNP rs11614913（C/T）位于 12 号染色体（12q13.13），据推测，该 miRNA 能调节同源框基因家族（Homebox genes）的 Hox 基因，这个基因能调控胚胎的细胞发育和分化方向[17]。 编码

miR-499 的基因位于 20 号染色体（20q11.22 ），SNP rs3746444（C/T）位于 pre-miR-499 的种子序列中。Wang[18]等经过 Meta 分析后得出，该 SNP 与亚洲人的癌症发病风险升高尤其相关。

已有大量国内外研究表明，多种 miRNA 与不同人种的卵巢癌和子宫内膜癌有关，包括此两种疾病的发病年龄、预后、药物敏感性。预后方面：Bae[19]等人研究发现，在子宫内膜癌细胞中，miR-625*、-21、-5p、-146b-5p 的表达水平至少上升 400%，miR-633、-29、-29*、-193b 的表达水平下降 50%。miR-27a 的高水平表达与卵巢癌患者的不良预后有关[20]，miR-204 与其靶基因 FOXC1 之间的相互作用与卵巢癌的进展及预后有关[21]。van Jaarsveld[22]等人发现，miR-200 家族在卵巢癌组织中上调，并且高表达水平的 miR-200 家族与卵巢癌的不良预后有关，低水平的 miR-200c 与药物抵抗有关，低水平的 let-7i 与卵巢癌无进展生存期缩短有关，同时与药物抵抗有关的还包括 miR-199a、-130a、-27a、-451[23-26]。Liang[27]等人推测 PDGFC 是 miR-425 的潜在靶基因，而位于 PDGFC 的 SNP（rs1425486:G/A）能影响 miR-425 对该基因表达的抑制作用，并且对卵巢癌的生存期和治疗反应产生影响。在德国卵巢癌患者样本中，Wynendaele[28]等人发现 MDM4 的 3’UTR 的一个 SNP（rs4245739）能产生新的 miR-191 结合位点，miR-191 只与携带 MDM4-C 等位基因的 3’UTR 结合，致使 MDM4-C 的表达下调，因而延缓卵巢癌的进展、减少肿瘤相关的死亡并提高患者对化疗的敏感性，而上述过程在一定程度上独立于 p53 抑癌途径。Rah[29]等人研究发现，miR-196a2 和 miR-146 基因之间的相互作用可能与卵巢早衰的发展有关。Permuth-Wey[30]等人发现，LIN28B 启动子区域的 SNP（rs12194974）与上皮性卵巢癌的易感性有关。Shen[31]等人发现 miR-146a 的 SNP 中携带 C 等位基因的成熟 miR-146a 的表达水平显著高于 G 等位基因，且 C 等位基因数量的增加与美国人卵巢癌癌症确诊年龄的提前显著相关。

虽已有大量与癌症相关的 miRNA 和其靶 mRNA 的 SNP 被陆续发现，但与我国卵巢癌和子宫内膜癌相关的 miRNA SNP 的研究依然匮乏，并且 因为存在人种间差异以及个体差异， microRNA 相关的 SNP 很难作为卵巢癌和子宫内膜癌的独立检测指标，所以，需要大规模的研究来证实 miRNA 相关的 SNP 与卵巢癌和子宫内膜癌的相关性，未来则有希望将 miRNA 相关的 SNP 列入以上两种肿瘤的常规检测指标，以实现个体化的靶向治疗。在此次研究中，我们将针对种上述三种 miRNA（miR-146a、miR-196a2、miR-499），对中国上海地区的卵巢癌和子宫内膜癌患者样本进行研究，希望得出与上述两种癌症密切相关的 miRNA SNP。

第二章 MicroRNA 的 SNP 与卵巢癌和子宫内膜癌的关系探讨

2.1 引言

大量国内外研究表明，多种 miRNA 与不同人种的卵巢癌和子宫内膜癌有关，包括此两种疾病的发病年龄、预后、药物敏感性。拟研究 miR-146a 基因的 rs2910164 位点(G＞C)、miR-196a2 基因的 rs11614913 位点（C＞T）、miR-499 基因的 rs3746444 位点(T＞C)的单核苷酸多态性（SNP）与上海地区女性卵巢癌和子宫内膜癌的关联性，并进一步研究上述 3 个 SNP 对卵巢癌/子宫内膜癌的发病风险和癌症分期的影响。

2.2 材料和方法

2.2.1 研究对象

病例组：病例收集 2011 年 6 月-2013 年 2 月复旦大学附属妇产科医院新诊断的卵巢癌和子宫内膜癌共 223 例，均经组织病理学检查并确诊，其中原发性卵巢癌 75 例，转移性卵巢癌 7 例（剔除），原发性子宫内膜癌 141 例。所有对象均为上海地区初次就诊的女性，确定不存在卵巢癌或子宫内膜癌以外的疾病，且相互之间无血缘关系。所有病例的病理诊断均根据 WHO 组织学分类标准和 WHO 组织学分级标准进行诊断，临床分期按照国际妇产科联盟（FIGO）定制的手术-病理分期进行，并将Ⅰ期定义为癌症早期，Ⅱ期定义为癌症中期，Ⅲ、Ⅳ期定义为癌症晚期。由于分期和分级资料不够完善，子宫内膜癌有 2 例无法进行分期，3 例无法进行病理分级；卵巢癌 16 例无法进行分期，17 例无法进行病理分级，上述病例在做癌症分期和分级分层分析时予以剔除。对照组：收集与病例组性别及年龄匹配的、同期在同一医院进行体检者 100 名。

2.2.2 实验试剂与仪器

2.2.2.1 试剂

试剂名称	生产公司
碘化钠（NaI）	生工生物工程有限公司
氯仿	常熟市杨园化工有限公司
异戊醇	上海试剂一厂
异丙醇	上海大合化学品有限公司
无水乙醇	上海振兴化工一厂
DNA Marker DL 2000	大连宝生物科技公司
DNA Marker DL 500	大连宝生物科技公司
dNTP	美国 Promega 公司
Taq 聚合酶	美国 Promega 公司
琼脂糖（Agarose）	生工生物工程有限公司
引物	生工生物工程有限公司合成
限制性内切酶 Hap Ⅱ（Hpa Ⅱ，Msp Ⅱ）	大连宝生物科技公司
限制性内切酶 Tsp45Ⅰ	美国 New England BioLabs 公司
限制性内切酶 DraⅢ-HF	美国 New England BioLabs 公司

限制性内切酶 Hpy188 Ⅰ	美国 New England BioLabs 公司
丙烯酰胺（Acrylamide）	美国 Sigma 公司
双丙烯酰胺（Bisacrylamide）	美国 Sigma 公司
甘油	上海汉光化学试剂有限公司
过硫酸铵（Ammonium persulfate，AP）	广东汕头市西陇化工厂
N,N,N',N'-四甲基乙二胺(简称 N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine， TEMED)	上海展云化工有限公司
硝酸银（$AgNO_3$）	上海展云化工有限公司
氢氧化钠（NaOH）	江苏彤晟化学试剂有限公司
甲醛	上海试剂四厂昆山分厂

2.2.2.2 仪器

仪器名称	公司名称
S1000 Thermal cycler型PCR扩增仪	美国Bio-Rad公司
Bio-Photometer紫外分光光度计	德国Eppendorf公司
台式冷冻离心机	美国Thomer公司
Tanon EPS 100电泳仪	上海天能科技有限公司
多功能水平电泳槽	上海天能科技有限公司
垂直电泳槽	上海天能科技有限公司
Tanon GIS 2010凝胶成像系统	上海天能科技有限公司
水浴箱	上海精宏实验设备有限公司

2.2.2.3 其他耗材

0.2 mL、0.5 mL 、1.5 mL离心管；10μL、200μL、1mL加样枪头；不同量程的量筒；烧杯；滤纸；胶头滴管。

2.2.3 实验方法

(1) 标本采集：

所有被检者均禁食12~14 h，采空腹静脉血5 mL，血样经乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝处理后，置于-80 ℃备用。

(2) 模板 DNA 提取：

取血液标本 150 μL 与双蒸水 150 μL 混匀，加 6mol/L NaI 300 μL 后涡旋震荡 30 s，再加入等体积氯仿/异戊醇（24:1）（600 μL）涡旋震荡 30s，离心后取上清液加入其 0.6 倍体积的异丙醇混匀，室温或 4℃静置 15 min，离心后沉淀以 70 %乙醇洗涤一次，晾干后溶于 TE 中，所提 DNA 经紫外分光光度计定量后，置-20 ℃保存备用。

(3) 引物序列：

SNP 名称	引物序列	扩增片段大小（bp）

miR-146a	rs2910164	5'-CATGGGTTGTGTCAGTGTTAGA- 3' 5'-CCAAGAGTCTCGTATAACAGCA-3'	372
miR-196a2	rs11614913	5'- CCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATA -3' 5'- ACTGGGGAGGGTAGGAGTGGGA -3'	149
miR-499	rs3746444	5'-CCGTCCCTCCCAGAGCCCCA -3' 5'- CGGTGTCCCAGCTGCACAAG-3'	250

(4) PCR扩增体系：

PCR反应总体积为25 μL，其中包含10×PCR缓冲液2.5 μL，25 mmol/L dNTP 0.1 μL，50 μmol/L上游引物、下游引物各0.1 μL，DNA 60 ng，Taq DNA聚合酶1 U，溴酚蓝0.5 μL，用双蒸水补至25 μL。扩增条件如下：

SNP名称	预变性	循环条件	延伸
miR-146a	94 ℃ 5 min	94℃ 40 s、55℃ 40 s、72℃ 90 s，35 次循环	72 ℃ 5 min
miR-196a2	94 ℃ 5 min	94℃ 40 s、58℃ 40 s、72℃ 90 s， 35 次循环	72 ℃ 5 min
miR-499	94 ℃ 5 min	94℃ 40 s、65℃ 40 s、72℃ 90 s，35 次循环	72 ℃ 5 min

(5) 2 % 琼脂糖凝胶配制：

电子天平称取1.7-1.8 g琼脂糖，放入100 mL 1×TAE中，加热至沸腾后，冷却至50℃左右加入EB 1-2 μL，混匀，倒入制胶槽内冷却凝集后使用。

(6) 8 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）配制：

超纯水3.3 ml,，5×TBE 1.25 mL，50 % Acr-Bis 1 mL，50 %甘油 600 μL，10 %AP 50 μL，TEMED 10 μL，混匀后注胶、插梳子。

(7) 酶切反应体系和条件：

酶切反应总体积为10 μL，其中包括缓冲液1 μL，溴酚蓝0.5 μL，（若有BSA，则BSA 0.1 μL），限制性内切酶0.2-1 μL（根据酶的活性调整），PCR产物5 μL，用超纯水补至10 μL。酶切水浴温度为37 ℃（miR-146a、miR-196a2）、65 ℃（miR-499）过夜。

(8)基因型的判断（RFLP 法）：

取 5 μL 酶切产物，经 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），电泳电压为 90-120 V，电泳时间根据上样溴酚蓝的指示带来确定，经 0.1 % $AgNO_3$染色，400 μL 甲醛和 100 mL 1.5 % NaOH 混合显色，直至 DNA 条带清晰显现为止，根据电泳条带和 DNA Marker 的相对位置来判断基因型，并拍照观察结果。

(9) PCR产物核苷酸序列测定：

随机选取 PCR-PAGE 测定的各基因野生型和杂合子各 2 例的 PCR 产物，由北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序分析。miR-146a rs2910164、miR-499 rs3746444均为反向测序；miR-196a2 rs11614913为正向测序。

2.2.4 统计方法

所有数据的统计分析均通过 SPSS 18.0和Epi info 7.0 统计软件完成。使用 χ^2检验，分析各SNP位点基因单倍型和等位基因在病例组和对照组中的分布是否存在差异，使用趋势 χ^2检验估计各SNP的变异等位基因与卵巢癌/子宫内膜癌发病风险是否存在剂量效应关系。使用 χ^2 检验分析对照组中各基因型频率的分布是否符合哈迪-温伯格（Hardy-Weinberg）遗传平衡定律。所有统计检验均为双侧检验，检验水准α=0.05，P＜0.05为差异有显著意义。比值比（odd ratio，OR）及其95%可信区间（confidence intervals，CI）表示关联的强度。

2.3 结果

2.3.1 研究对象年龄分析

本研究共收集血样本 323 例（病例组 223 例，对照组 100 例），病例组中原发性卵巢癌 75 例，平均年龄为 50.5 岁（17～71岁），中位年龄 53 岁，56 岁的患者数量最多；原发性子宫内膜癌 141例，平均年龄为 54.3 岁（26～79岁），中位年龄 55 岁，55 岁和 62 岁的患者数量最多；病例组共计216 例，平均年龄为 53.0 岁（17～79岁），中位年龄 54 岁，62 岁的患者数量最多。对照组年龄与病例组匹配。

2.3.2 PCR产物琼脂糖电泳结果

如图1所示，左图为 miR-146a 的扩增产物电泳结果，目的条带大小为 372 bp；中图为 miR-196a2 的扩增产物电泳结果，目的条带为 149 bp；右图为 miR-499 的扩增电泳结果，目的条带为 250bp。所有目的条带均通过与DNA Marker DL 2000的相对位置判断得出。

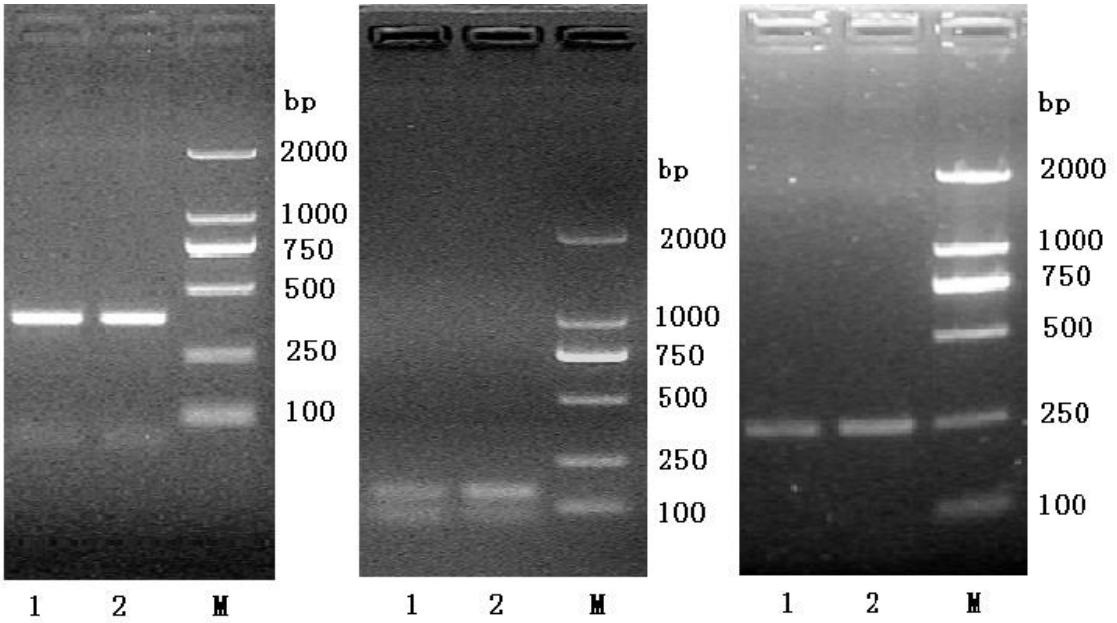

图1 miR-146a PCR电泳图　　miR-196a2 PCR电泳图　　miR-499 PCR电泳图

2.3.3 RFLP结果

如图2中的左图所示，在卵巢癌/子宫内膜癌和对照组中，观察到miR-146a rs2910164的2种等位基因 (C/G) 和 3 种单倍型（CC/GG/CG），其中CC型有三条条带（211bp、134bp、27bp），GG型有两条条带（211bp、161bp），CG型有四条条带（211bp、161bp、134bp、27bp），但由于27 bp 的片段太小无法在凝胶中观察到。

如图2中图所示，在卵巢癌/子宫内膜癌和对照组中，观察到miR-196a2 rs11614913的2种等位基因(C/T)和3种单倍型（CC/TT/CT），其中TT型有一条条带（149bp），CC型有两条条带（125bp、24bp），CT型有三条条带（149p、125bp、24bp），但由于24bp的片段太小且迁移速度快，无法在凝胶中识别。

如图2右图所示，在卵巢癌/子宫内膜癌和对照组中，观察到miR-499 rs3746444的2种等位基因(C/T)和2种单倍型（CT/TT），其中TT型有一条条带（250bp），CT型有三条条带（250bp、162p、88bp）。

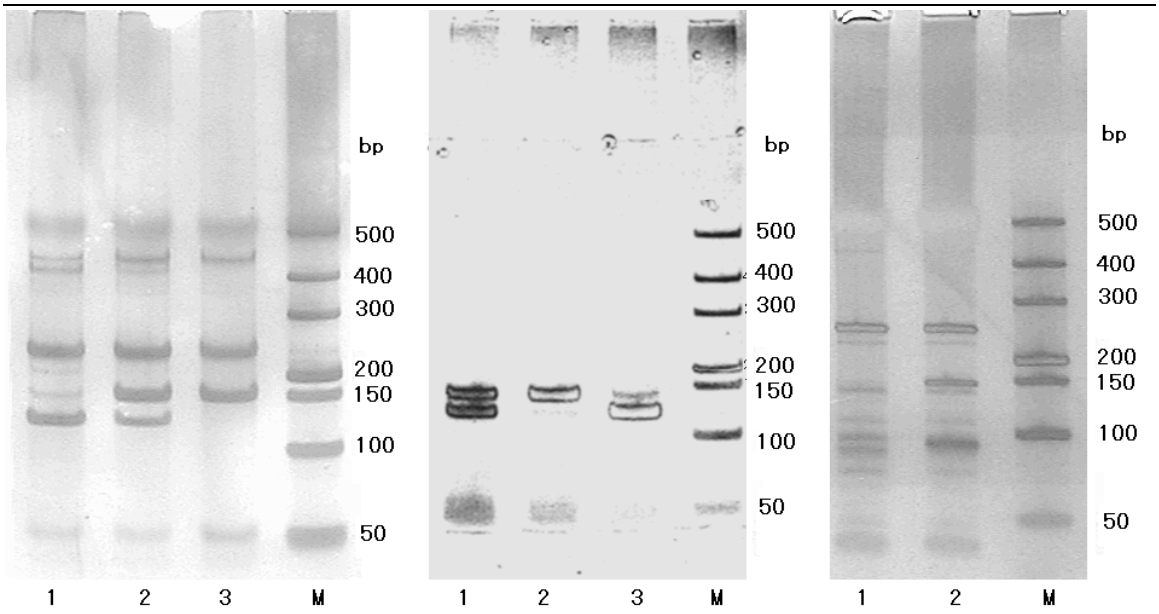

图2　miR-146a PAGE电泳图　　miR-196a2 PAGE电泳图　　miR-499 PAGE电泳图

2.3.4 测序结果

以下分别为miR-146a（图3-1）、miR-196a2（图3-2）、，miR-499（图3-3）的测序图。

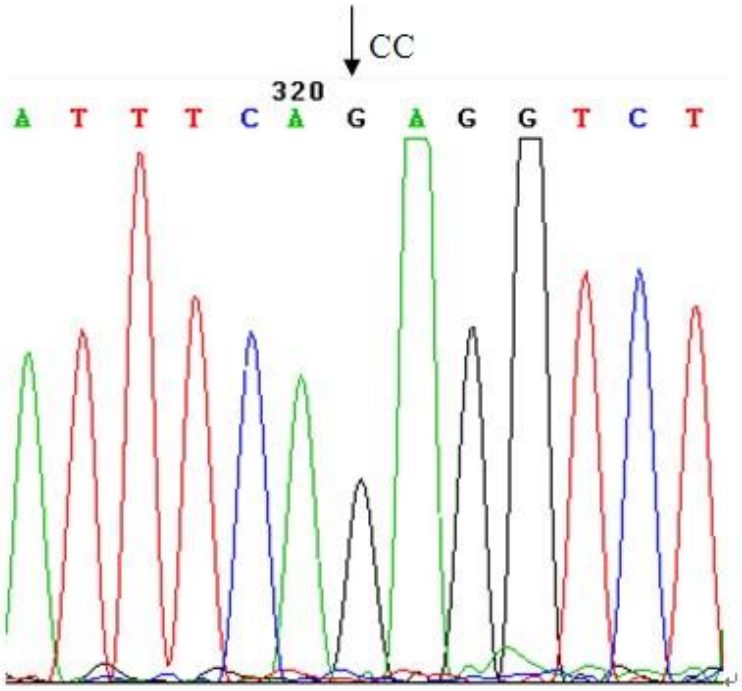

图 3-1-1 rs2910164 CC 基因型测序图

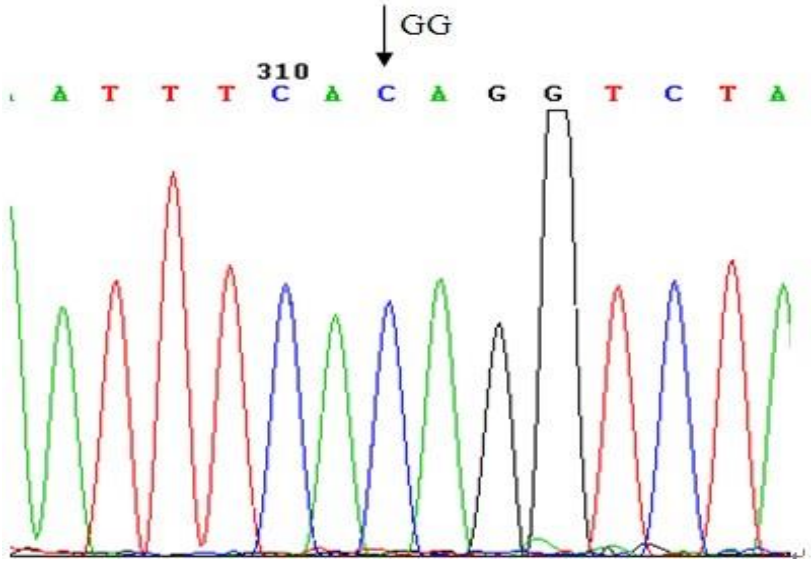

图 3-1-2 rs2910164 GG 基因型测序图

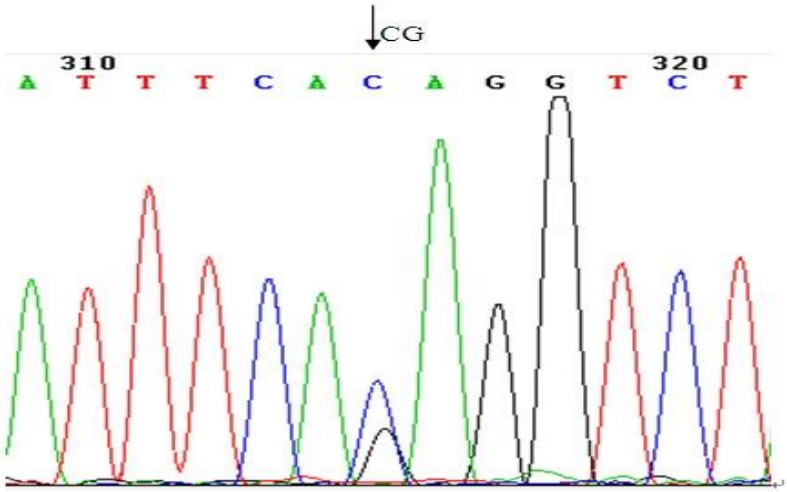

图 3-1-3 rs2910164 CG 基因型测序图

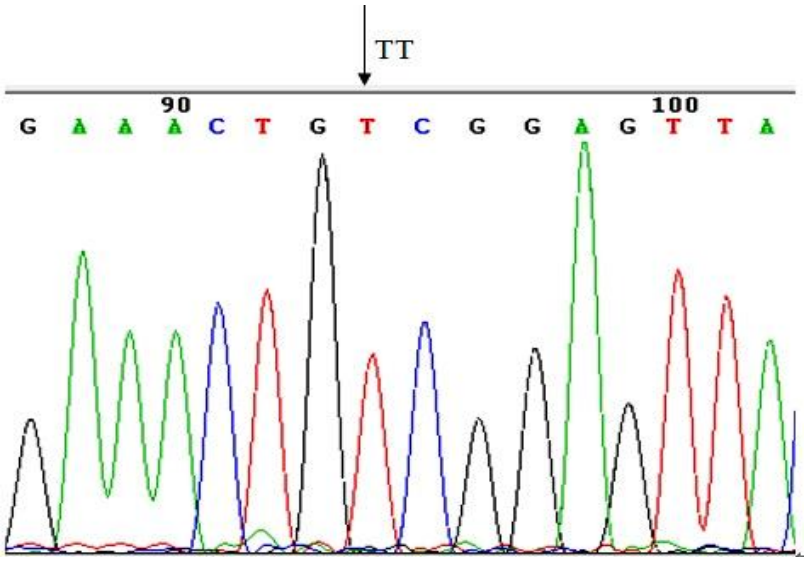

图 3-2-1 rs11614913 TT 基因型测序图

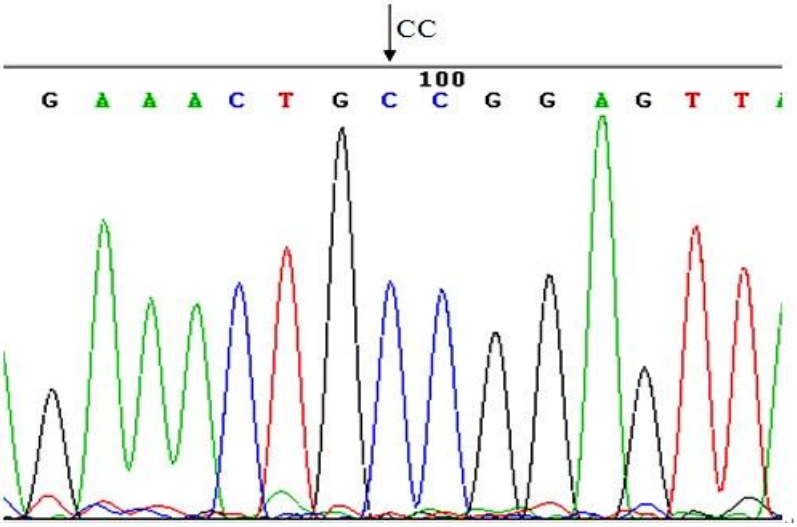

图 3-2-2 rs11614913 CC 基因型测序图

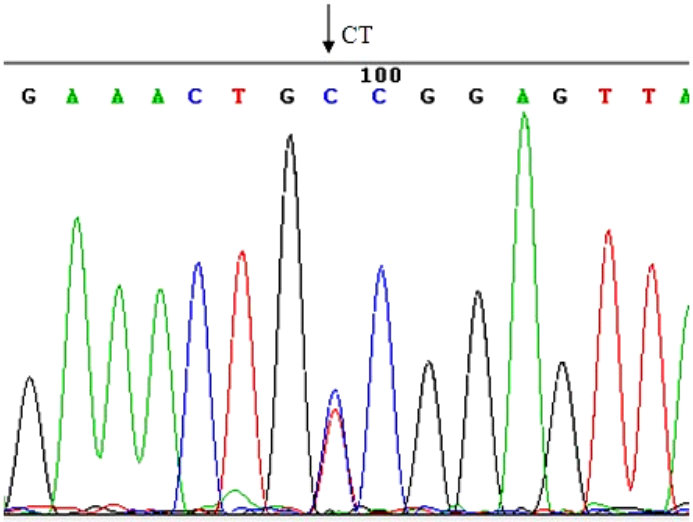

图 3-2-3 rs11614913 CT 测序图

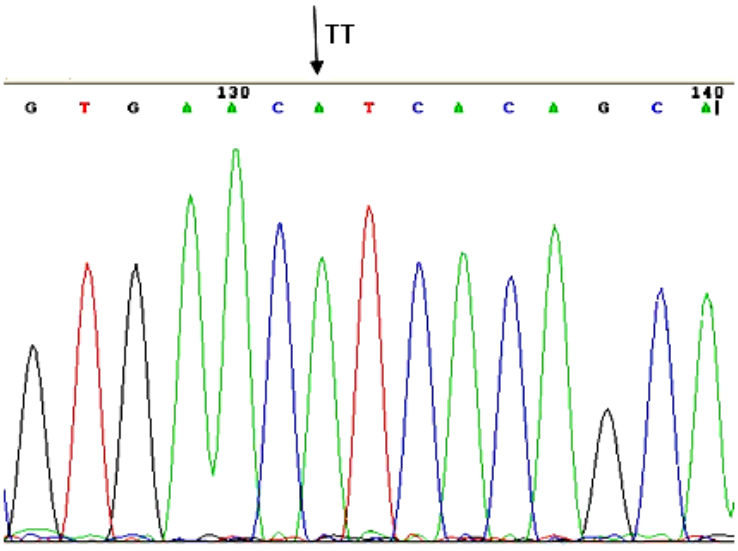

图 3-3-1 rs3746444 TT 测序图

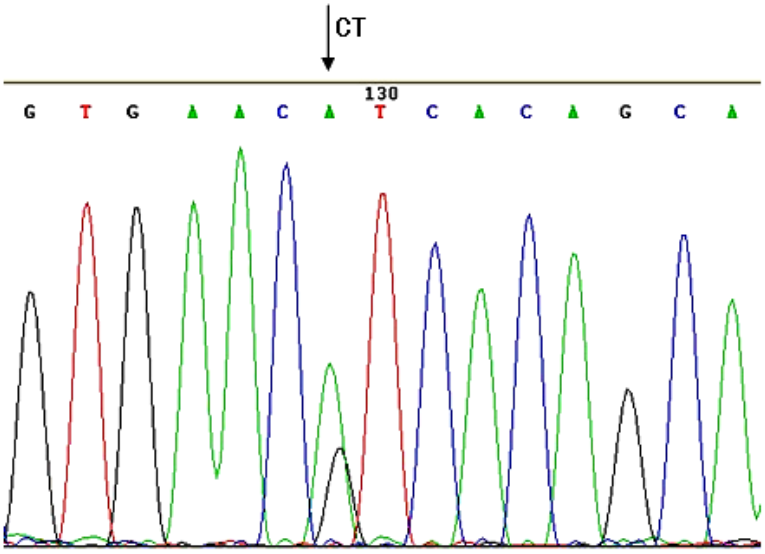

图 3-3-2 rs3746444 CT 测序图

2.3.5 等位基因及单倍型频率分布与卵巢癌/子宫内膜癌的关联性分析

如表1和表2，分别为本次研究的3个miRNA的SNP位点的各个基因型和等位基因在子宫内膜癌病例组与对照组和卵巢癌病例组与对照组中的分布。

表1为3个SNP检测位点单倍型在子宫内膜癌病例组和对照组的分层分析结果。miR-146a（P＝0.132）、miR-196a2（P＝0.861）、miR-499（P＝0.194）的对照组基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律。

miR-146a：rs2910164的三种单倍型（GG/CG/CC）在子宫内膜癌病例组和对照组中的分布有显著差异（χ^2＝29.818，P＜0.0001）。子宫内膜癌病例中CC基因型、CG基因型以及C等位基因的分布频率均低于对照组。以GG基因型（野生型纯合子）作为参照，CC纯合子基因型和CG杂合子基因型均能降低子宫内膜癌的患病风险（OR＝0.238，95% CI＝0.110～0.516；OR＝0.143，95% CI＝0.068～0.300）；同时，CC+CG基因型的OR值（0.179）、C等位基因的OR值（以G等位基因为参照，OR＝0.484）表明，C等位基因可被视作独立保护因子而减低携带者的子宫内膜癌患病风险，且这种保护作用与携带变异等位基因的个数（CG型的变异等位基因为1个，CC型的变异等位基因为2个）存在剂量效应关系（趋势χ^2＝12.988，P_{trend}＜0.001）。相反若以CC基因型作为参照，则GG基因型能增加3.194倍的患病风险（OR＝4.194，95% CI＝1.938～9.073），更加说明了C等位基因可当做独立保护因子而G等位基因可视为子宫内膜癌的危险因素。

miR-196a2：根据已得统计数据，rs11614913的三种基因型（CC/CT/TT）在子宫内膜癌病例组和对照组中的分布无统计学差异（χ^2＝4.682，P＝0.096），只有CT基因型在子宫内膜癌病例组和对照组中的分布存在微弱差异（P=0.033），且以CC基因型为参照得到的CT基因型OR值（2.125,95% CI＝1.053～4.285）显示该基因型可能与子宫内膜癌的患病风险增加存在关联。数据显示，CT＋TT vs CC的P值接近 0.05 , 95% CI的低值也接近于1，若增大病例组样本量可能会得出更能表达T等位基因与子宫内膜癌关联性的数据。

miR-499：在此批样本检测中，我们仅发现了该多态性位点（rs3746444）的两种基因型（即TT型和CT型）。根据统计分析得出，这两种基因型在子宫内膜癌病例组和对照组中的分布存在微弱的统计学差异（χ^2＝4.340，P＝0.037）。以TT型为参照，携带CT基因型的个体有更低的子宫内膜癌患病风险（OR＝0.490，95% CI＝0.248-0.966)。同样，T等位基因和C等位基因在两组中的分布也存在统计学差异，且以T等位基因为参照，C等位基因能减低个体子宫内膜癌的患病风险（OR＝0.525，95% CI＝0.275～1.001)。

表1 3种SNP的各个基因型和等位基因在子宫内膜癌病例组和对照组的分布

基因型	子宫内膜癌病例数（%）	对照组例数（%）	P^a值	OR值[c](95%CI)
总例数	141	100		
allele总数	282	200		
rs2910164 G>C			$P^b<0.001$	
GG	61 (43.3)	12 (12)		1.00(参照)
CC	40 (28.4)	33 (33)		0.238(0.110-0.516)
CG	40 (28.4)	55 (55)		0.143(0.068-0.300)
CC+CG	80 (56.7)	88 (88)		0.179(0.090-0.356)
C allele	120 (42.6)	121 (60.5)		
C vs G			$P^d<0.001$	0.484(0.334-0.699)
rs11614913 C>T			$P^b=0.096$	
CC	19 (13.5)	23 (23)		1.00(参照)
TT	36 (25.5)	28 (28)	$P^b=0.267$	1.556(0.711-3.405)
CT	86 (61.0)	49 (49)	$P^b=0.033$	2.125(1.053-4.285)
TT+CT	122 (86.5)	77 (77)	$P^b=0.055$	1.918(0.980-3.753)
T allele	158 (56.0)	105 (52.5)		
T vs C			$P^d=0.443$	1.153(0.801-1.659)
rs3746444 T>C			$P^b<0.05$	
TT	123 (87.2)	77 (77)		1.00(参照)
CC	0 (0)	0 (0)		/
CT	18 (12.8)	23 (23)	$P^b=0.037$	0.490(0.248-0.966)
CC+CT	18 (12.8)	23 (23)	$P^b=0.037$	0.490(0.248-0.966)
C allele	18 (6.4)	23 (11.5)		
C vs T			$P^d=0.047$	0.525(0.275-1.001)

[a]*P*值是双侧 χ^2检验；[b]基因型在子宫内膜癌病例组和对照组的频率分布检验；[c]95%可信区间的OR值。

表2为3个SNP检测位点单倍型在卵巢癌病例组和对照组的分层分析结果。miR-146a（*P*＝0.132）、miR-196a2（*P*＝0.861）、miR-499（*P*＝0.194）的对照组基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律。

miR-146a：rs2910164的三种单倍型（GG/CG/CC）在卵巢癌病例组和对照组中的分布有显著差异（χ^2＝35.060，*P*＜0.0001）。卵巢癌病例中CC基因型、CG基因型以及C等位基因的分布频率均低于对照组。以GG基因型作为参照，CC纯合子基因型和CG杂合子基因型均能降低卵巢癌的患病风险（OR＝0.118，95% CI＝0.048～0.294； OR＝0.120，95% CI＝0.053～0.271）；同时，CC+CG基因型的OR值（OR=0.119, 95% CI＝0.056～0.254）和C等位基因的OR值（以G等位基因为参照，OR＝0.307,95% CI＝0.197～0.479）均表明，C等位基因可被视作独立保护因子从而减低携带者的卵巢癌患病风险，且这种保护作用与C等位基因的个数存在数量效应（χ^2＝25.799，*P*＜0.0001），即保护作用随着C等位基因的个数增加而增加。相反若以CC基因型作为参照，则GG基因型能增加7.462倍的患病风险（OR＝8.462，95% CI＝3.406～21.021），更加说明了C等位基因可当做独立保护因子而G等位基因可视为子宫内膜癌的高危险因素。

miR-196a2：根据已得统计数据，rs11614913的三种基因型（CC/CT/TT）在卵巢癌病例组和对照组中的分布存在统计学差异（χ^2＝7.305，*P*＝0.026）。卵巢癌病例组中TT基因型、CT基因型以及TT+CT基因型的分布频率均显著高于对照组。以CC基因型（野生型纯合子）为参照，TT基因型、CT基因型以及TT+CT基因型的OR值均大于1（*P*＜0.001），提示基因型TT和CT可增加卵巢癌的患病风险，数据上显示即为携带TT基因型个体发生卵巢癌的危险度增加2.012（OR＝3.012，95% CI＝1.046～8.675），携带CT基因型个体发生卵巢癌的危险度增加2.677（OR＝3.677,95% CI＝1.375～

9.832），携带CT+TT基因型个体发生卵巢癌的危险度增加2.435（OR＝3.435,95% CI＝1.321～8.930）。虽然T等位基因在卵巢癌和子宫内膜癌的分布存在统计学差异，但由于TvsC的 P＞0.05，OR＝1.395（95% CI＝0.908～2.144）无统计学差异，所以不能将T等位基因视作卵巢癌的独立危险因素。

miR-499：通过统计学分析得出，rs3746444的各个基因型和等位基因在卵巢癌病例组和对照组中的分布不具有统计学差异，我们推测该多态性位点与卵巢癌的发病无明显关联。

同时我们对3个SNP的3种基因型在子宫内膜癌和卵巢癌的各个癌症分期和病理分级中的分布情况进行了统计学分析，其分布无统计学差异，但由于样本量较小并且很多病理诊断资料不完整，所以不能确定此次研究的3个miRNA的SNP对子宫内膜癌和卵巢癌的发展有促进或抑制作用。

表2 3种SNP的各个基因型在卵巢癌病例组和对照组的分布

基因型	卵巢癌病例数（%）	对照组例数（%）	P^a值	OR值[c] (95%CI)
总例数	75	100		
allele总数	150	200		
rs2910164 G＞C			P^b＜0.001	
GG	40 (53.3)	12 (12)		1.00(参照)
CC	13 (17.3)	33 (33)		0.118(0.048-0.294)
CG	22 (29.3)	55 (55)		0.120(0.053-0.271)
CC+CG	35 (46.6)	88 (88)		0.119(0.056-0.254)
C allele	48 (32.0)	121 (60.5)		
C vs G			P^d＜0.001	0.313(0.201-0.489)
rs11614913 C＞T			P^b＜0.001	
CC	6 (8.0)	23 (23)		1.00(参照)
TT	22 (29.3)	28 (28)		3.012(1.046-8.675)
CT	47 (62.7)	49 (49)		3.677(1.375-9.832)
TT+CT	69 (92.0)	77 (77)		3.435(1.321-8.930)
T allele	91 (60.7)	105 (52.5)		
T vs C			P^d＝0.128	1.395(0.908-2.144)
rs3746444 T＞C			P^b＝0.959	
TT	58 (53.3)	77 (77)		1.00(参照)
CC	0 (0)	0 (0)		/
CT	17 (22.7)	23 (23)		0.959(0.481-2.003)
CC+CT	17 (22.7)	23 (23)		0.959(0.481-2.003)
C allele	17 (11.3)	23 (11.5)		
C vs T			P^d＝0.961	0.984(0.505-1.915)

[a] P值是双侧 χ^2检验；[b]基因型在卵巢癌病例组和对照组的频分布检验；[c]95%可信区间的OR值。

第三章 讨论

3.1 microRNA 及其 SNP 与肿瘤的关系

microRNA（miRNA）是一类平均长度为22个核苷酸的小分子非编码RNA，最初由Lee等于秀丽隐杆线充虫中发现[32]。miRNA基因一般位于蛋白质编码基因的内含子或非蛋白质编码基因中，首先在RNA聚合酶Ⅱ的参与下，在细胞核中转录生成较长的初级转录产物pri-miRNAs。这些pri-miRNAs折叠形成发夹结构，能与核糖核酸酶Ⅲ（RNaseⅢ）家族中的两种酶（Drosha和Dicer）结合，Drosha在核内将pri-miRNAs剪切成长度约为70个核苷酸的发夹状miRNA前体（pre-miRNA）[33]。接着，这些miRNA前体在Exportin-5的作用下被转运至细胞质，由Dicer酶将其进一步加工为长约20bp的成熟miR/miR*双链结构。成熟的单链microRNA包含在我们所知的miRNA核糖核蛋白复合体（miRNP）、miRgonaute或miRNA诱导的沉默复合体（miRISC）中，而另一条链可能会被降解。这类复合体以mRNAs为目标靶基因，通过与mRNAs的3'UTR完全或不完全序列特异性互补，在某种程度上致使mRNA降解和翻译抑制，从而在转录后水平调控基因的表达[4]。

单核苷酸多态性（single-nucleotide polymorphism, SNP）是指在基因组水平上由单个核苷酸变异引起的DNA序列多态性，是人类可遗传变异种最常见的一种。SNPs可以直接或间接影响miRNA：pri-microRNA、pre-microRNA或成熟microRNA中的SNPs可影响miRNA的加工或其功能；miRNA基因启动子的SNPs能阻止转录因子与之结合，抑制pri-microRNA转录，并且mRNA中的SNPs能产生新的结合位点或破坏原本的结合位点，间接对miRNA产生影响[9]。发生在成熟miRNA的SNPs（特别是发生在种子区域的SNPs）可能影响基因沉默的特异性[34]，而发生在miRNA靶基因3'UTR的SNP可能更具靶位和通路特异性[11]。Gong[35]等发现，在已知的人类1048个pre-miRNA中，共存在30442771个SNP，其中有178个SNP位于149个miRNA的成熟序列上，50个SNP位于41个miRNA的种子序列上，而种子序列上的SNP更有可能产生新的结合位点或破坏原有结合位点，例如miR-499种子序列上的SNP（rs3746444 A＞G）可导致miR-499与其靶基因BCL2的结合位点丧失。癌症的发生是一个多因素参与的复杂的过程，miRNA的SNP可能会对肿瘤发生相关基因的mRNA的调节作用产生影响，并且很多miRNA的编码基因位于肿瘤相关的基因组区域或脆性位点，因此，研究miRNA的SNP与肿瘤发生的相关性有助于早日揭示肿瘤的发生机制。迄今为止，已有越来越多的研究发现，miRNA相关的SNP与不同类型的肿瘤有关，并且在多种肿瘤中发现了miRNA的异常表达。在子宫内膜癌细胞中，miR-625*、-21、-5p、-146b-5p的表达水平至少上升400%，miR-633、-29、-29*、-193b的表达水平下降50%[19]。miR-146a的SNP（rs2910164 G＞C）被发现与肝癌[14, 36]、甲状腺乳头状癌[37]、胃癌[38, 39]、乳腺癌[40]的发病风险或疾病预后有关。miR-196a2的SNP（rs11614913 C＞T）被报道与乳腺癌、肺癌易感性、先天性心脏病、非小细胞肺癌生存率下降有关[41]，并与胃癌[42]的发病风险显著相关。miR-499的SNP（rs3746444 A＞G）经研究证实与头颈部鳞状细胞癌[43]、结直肠癌[44]、乳腺癌[45]有关，并且miR-499的血清水平可作为非小细胞肺癌的预后因素[46]。与乳腺癌罹患风险有关的miRNA的SNP包括：位于成熟miR-608的 rs4919510 C>G[47]、位于pre-miR-423的rs6505162 A＞C[48]和位于miR-27a的rs895819，miR-27a可作为原癌基因在肿瘤发生中发挥作用，SNP rs895819-G等位基因可一定程度地抑制miR-27a的成熟过程从而减低某些癌症如乳腺癌的发病风险，并且研究人员推测，miR-27a可能参与雌激素依赖的调节通路，因此SNP rs895819的作用可能具有性别特异性[49]。另外，与胃癌罹患风险有关的SNP还包括位于pre-miR-30c 的SNP rs928508 A/G[50]。GEMIN4基因是调控miRNA成熟的通路基因标签，其SNP rs2740351和rs7813均能显著减低卵巢癌的患病风险，而GEMIN4的另一个

非同义突变SNP（nsSNP）rs2740340也能显著减低卵巢癌的发病风险；而该研究也发现，2个分别属于TLR4和KRAS的SNP与卵巢癌的预后和药物反应有关，KRAS的SNP可能升高卵巢癌发病风险但却能使铂类药物更好地杀死肿瘤细胞[27]。

3.2 子宫内膜癌和卵巢癌

据资料显示（中国妇科肿瘤学，2011），子宫内膜癌有很多发病危险因素，如月经（初潮提前绝经延迟）、生育（未产妇女危险增加2-3倍）、激素代替治疗、他莫昔芬（一种选择性的雌激素受体调节剂）、肥胖（特别是绝经后肥胖）、高脂肪和低糖类低纤维膳食、大量饮酒（导致雌激素水平升高）、地区（美国和欧洲北部发病率高，亚洲和中南美地区发病率低，国内地区差异气候差异环境和生活习惯差异大，不利于研究）、种族（白种人患病风险高但疗效好，黑种人的低分化癌和晚期病例百分比明显高于白种人）、生活习惯（吸烟、饮酒降低风险，可能与吸烟、饮酒有抗雌激素作用有关）。目前研究出，Ⅰ型子宫内膜癌的基因突变有PTEN基因、微卫星不稳定性、K-ras、β-catenin基因，Ⅱ型子宫内膜癌的基因突变有p53、p16、HER-2/neu基因，而其中p53在子宫内膜癌中阳性表达，但不在子宫内膜和子宫内膜增生过长中表达，且癌中阳性率为16.7%-75%，随着临床分期、组织学分级以及肌层浸润深度增加，p53阳性表达率随之升高，故该基因的突变被看做是子宫内膜癌的相对晚期事件。年龄分布情况则为：95%的子宫内膜癌发生于40岁以上人群，90%为45岁以上人群。卵巢癌是恶性程度最高的妇科肿瘤，其危险因素包括：年龄＞40、白种人、不孕、有子宫内膜癌或乳腺癌史。能降低其发病风险的因素包括：降低发病风险的因素：分娩、口服避孕药、哺乳、输卵管结扎、子宫切除。而60-65为卵巢癌发病高峰，40岁以后发病率开始上升，这可能与妇女更年期相关：随着卵巢功能衰退，卵巢分泌的雌孕激素减少，垂体分泌的卵泡刺激素和黄体生成素增加，但这些对卵巢癌发病的影响至今还没有明确结论。卵巢癌的遗传因素：BRCA1基因相关的卵巢癌中90%为浆液性癌，散发性的卵巢癌中仅为60%为浆液性癌。卵巢癌的流行地域：在斯堪的纳维亚半岛，以色列和北美是卵巢癌高发区，日本和一些发展中国家的发病则较低。

3.3 miR-146a、miR-196a2 和 miR-499 与卵巢癌和子宫内膜癌的关联分析

在此次实验中，我们发现携带 miR-146a-C 等位基因能显著减低卵巢癌和子宫内膜癌的发病风险。在文章中我们提到，miR-146a 具有潜在调节肿瘤坏死因子受体相关的因子 6（TRAF6）和白介素-1 受体相关的激酶 1（IRAK1）基因的作用，而这两个物质是 Toll 样受体（TLR）和细胞因子受体的适配分子下游。TLR4 是 TLR 家族中的一员，许多证据证明 TLR 能促进肿瘤的生长和转移，且在 Liang 的实验中，TLR4 能促进肿瘤的生长并保护肿瘤细胞逃避免疫应答[27]。因此，我们可以推测，miR-146a 的单核苷酸多态性可能与 TLR 对肿瘤的调节作用有关。携带 miR-196a2-CT 基因型能增加子宫内膜癌患病风险，携带 miR-196a2-CT 和 TT 基因型均能增加卵巢癌的患病风险。miR-196a2 以 Hox 基因为靶基因，而其对卵巢癌和子宫内膜癌的患病风险影响是否与 Hox 基因有关还有待研究。据报道，p53 能在转录水平下调 miR-499 的表达并且 miR-499 的表达水平能影响细胞凋亡[51,52]，miR-499 能下调 HepG2 肝癌细胞中 ETS1 原癌基因的表达[53]。结合 miR-499 多态性位点分析结果，我们猜想携带变异 C 等位基因的 miR-499 可作为子宫内膜癌的保护因素，并且该保护作用可能与上述 miR-499 的作用有关，但由于其 P 值接近于 0.05，因此要证实这一猜想需要更大规模的样本检测。在对子宫内膜癌和卵巢癌的各癌症分期和病理分级中的基因型分布进行统计学分析后，我们认为此次研究的三种 miRNA 的 SNP 与上述分期和分级无统计学关联。在此次研究结果中，多个 OR 值的 95%可信区间上限（下限）接近于 1，因此我们推测，增加样本量进行统计学分析则有助于将单独的基因型或等位基因列为子宫内膜癌或卵巢癌独立危险因素。

3.4 本研究的优势与不足之处

本次实验对 miR-146a、miR-196a2、miR-499 的 SNP 与子宫内膜癌和卵巢癌的关联性进行研究，在国内尚属首次。本次实验的结果为深入研究子宫内膜癌和卵巢癌的发病机制提供了新的方向。不足：（1）由于样本量较小，吸烟情况、饮酒情况、BMI 等指标以及卵巢癌和子宫内膜癌的危险因素如生育情况、癌症家族史、激素使用情况等均未进行调查统计，所以不能排除遗传因素和环境等外界因素对子宫内膜癌和卵巢癌患病的影响。（2）子宫内膜癌和卵巢癌的癌症分期和病理分级缺失数据较多，不利于统计学分析；（3）仅对患者样本的基因层面进行检测，若能深入到基因表达层面（miRNA、miRNA 靶基因的 mRNA、miRNA 靶基因编码的蛋白质）则更利于癌症机制研究。

第四章 结论

本研究结果显示，miR-146a rs2910164 多态性位点可减低子宫内膜癌和卵巢癌患病风险，miR-196a2 rs11614913 多态性位点可增加卵巢癌的患病风险，miR-499 rs3746444 多态性位点可减低子宫内膜癌的患病风险。同时，此次研究的 3 个 SNP 对卵巢癌和子宫内膜癌的癌症分期和病理分级均无显著影响。

参考文献

[1] Cramer D W , The epidemiology of endometrial and ovarian cancer. Hematol Oncol Clin North Am, 2012. 26(1): 1-12.

[2] Siegel R, D Naishadham, A Jemal, Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin, 2012. 62(1): 10-29.

[3] 杨念念, 严亚琼, 龚洁, 等. 中国 2003~ 2007 年卵巢癌发病与死亡分析. 中国肿瘤, 2012, 21(006): 401-405.

[4] Iorio M V, C M Croce. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. Journal of Clinical Oncology, 2009, 27(34): 5848-5856.

[5] Calin G A, C M Croce. MicroRNA signatures in human cancers. Nature Reviews Cancer, 2006, 6(11): 857-866.

[6] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[7] Martignani E, S Miretti, P Accornero, et al. miRNAs Highlights in Stem and Cancer Cells. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11(13): 1165-1182.

[8] Calin G A, C Sevignani, C D Dumitru, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(9): 2999-3004.

[9] Salzman D W, J B Weidhaas. SNPing cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. Pharmacol Ther, 2013. 137(1): 55-63.

[10] Duan S, S Mi, W Zhang, et al. Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes. RNA biology, 2009, 6(4): 412-425.

[11] Mishra P J, J R Bertino. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. Pharmacogenomics, 2009, 10(3): 399-416.

[12] Ryan B M, A I Robles, C C Harris. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Nat Rev Cancer, 2010. 10(6): 389-402.

[13] Taganov K D, M P Boldin,K J Chang, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(33): 12481-12486.

[14] Xu T, Y Zhu, Q K Wei, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis, 2008, 29(11): 2126-2131.

[15] Wang A X, B Xu, N Tong, et al. Meta-analysis confirms that a common G/C variant in the pre-miR-146a gene contributes to cancer susceptibility and that ethnicity, gender and smoking status are risk factors. Genet Mol Res, 2012. 11(3): 3051-3062.

[16] Devor E J, A M Hovey, M J Goodheart, et al. microRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. Oncol Rep, 2011. 26(4): 995-1002.

[17] Linhares J J, M Jr Azevedo, A A Siufi, et al. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in microRNAs (hsa-miR-196a2 rs11614913 C/T) from Brazilian women with breast cancer. BMC Med Genet, 2012. 13: 119.

[18] Wang L, S Qian, H Zhi, et al. The association between hsa-miR-499 T>C polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. Gene, 2012. 508(1): 9-14.

[19] Cochrane D R, N S Spoelstra, E N Howe, et al. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents[J]. Molecular cancer therapeutics, 2009, 8(5): 1055-1066.

[20] Eitan R, M Kushnir, G Lithwick-Yanai, et al. Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients. Gynecol Oncol, 2009. 114(2): 253-259.

[21] Chung T K H, T S Lau, T H Cheung, et al. Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. Int J Cancer, 2012. 130(5):1036-1045.

[22] Van Jaarsveld M, J Helleman, E M J J Berns, et al. MicroRNAs in ovarian cancer biology and

therapy resistance[J]. International journal of biochemistry & cell biology, 2010, 42(8): 1282-1290.

[23] Nam E J, H Yoon, S W Kim, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. Clin Cancer Res, 2008. 14(9): 2690-2695.

[24] Sorrentino A, C G Liu, A Addario, et al. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. Gynecol Oncol, 2008. 111(3): 478-486.

[25] Kamazawa S, J Kigawa, Y Kanamori, et al. Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of Paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer. Gynecol Oncol, 2002. 86(2): 171-176.

[26] Zhu H, H Wu, X Liu, et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. Biochem Pharmacol, 2008. 76(5): 582-588.

[27] Liang D, L Meyer, D W Chang, et al. Genetic variants in MicroRNA biosynthesis pathways and binding sites modify ovarian cancer risk, survival, and treatment response. Cancer Res, 2010. 70(23): 9765-9776.

[28] Wynendaele J, A Böhnke, E Leucci, et al. An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. Cancer Res, 2010. 70(23): 9641-9649.

[29] Rah H, Y J Jeon, S H Shim, et al. Association of miR-146aC>G, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with risk of premature ovarian failure in Korean women. Reprod Sci, 2013. 20(1): 60-68.

[30] Permuth-Wey J, D Kim, Y Y Tsai, et al. LIN28B polymorphisms influence susceptibility to epithelial ovarian cancer. Cancer Res, 2011. 71(11): 3896-3903.

[31] Shen J, C B Ambrosone, R A DiCioccio, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. Carcinogenesis, 2008. 29(10): 1963-1966.

[32] Lee R C, R L Feinbaum, V Ambros. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 1993. 75(5): 843-854.

[33] Lee Y, C Ahn, J J Han, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 2003, 425(6956): 415-419.

[34] Duan S, S Mi, W Zhang, et al. Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes. RNA Biol, 2009. 6(4): 412-425.

[35] Gong J, Y Tong, H M Zhang, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. Hum Mutat, 2012. 33(1): 254-263.

[36] Zhou J, R Lv, X Song, et al. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population. DNA Cell Biol, 2012. 31(4): 524-530.

[37] Jazdzewski K, E L Murray, K Franssilaet, al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(20): 7269-7274.

[38] Zeng Y, Q M Sun, N N Liu, et al. Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population. World J Gastroenterol, 2010. 16(28): 3578-3583.

[39] Okubo M, T Tahara, T Shibata, et al. Association Between Common Genetic Variants in Pre‐microRNAs and Gastric Cancer Risk in Japanese Population[J]. Helicobacter, 2010, 15(6): 524-531.

[40] Lian H, L Wang, J Zhang. Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Has-miR-146a Rs2910164 polymorphism in Europeans. PLoS One, 2012. 7(2): e31615.

[41] Li X D, Z G Li, X X Song, et al. A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis. Pathology, 2010. 42(7): 669-673.

[42] Peng S, Z Kuang, C Sheng, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. Dig Dis Sci, 2010. 55(8): 2288-2293.

[43] Liu Z, G Li, S Wei, et al. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer, 2010. 116(20): 4753-4760.

[44] Liu X, Z Zhang, L Sun, et al. MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. Carcinogenesis, 2011. 32(12): 1798-1805.

[45] Alshatwi A A, G Shafi, T N Hasan, et al. Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients. PLoS One, 2012. 7(2): e30049.

[46] Hu Z, X Chen, Y Zhao, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2010. 28(10): 1721-1726.

[47] Huang A J, K D Yu, J Li, et al. Polymorphism rs4919510: C> G in Mature Sequence of Human MicroRNA-608 Contributes to the Risk of HER2-Positive Breast Cancer but Not Other Subtypes. PLoS One, 2012. 7(5): e35252.

[48] Smith R A, D J Jedlinski, et al. A genetic variant located in miR-423 is associated with reduced breast cancer risk. Cancer Genomics Proteomics, 2012. 9(3): 115-118.

[49] Yang R, B Schlehe, K Hemminki, et al. 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.

[50] Mu Y P, X L Su. Polymorphism in pre-miR-30c contributes to gastric cancer risk in a Chinese population. Med Oncol, 2012. 29(3): 1723-1732.

[51] Wang J X, J Q Jiao, Q Li, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. Nat Med, 2011. 17(1): 71-78.

[52] Akkiz H, S Bayram, A Bekar, et al. Genetic variation in the microRNA-499 gene and hepatocellular carcinoma risk in a Turkish population: lack of any association in a case-control study. Asian Pac J Cancer Prev, 2011. 12(11): 3107-3112.

[53] Wei W, Z Hu, H Fu, et al. MicroRNA-1 and microRNA-499 downregulate the expression of the ets1 proto-oncogene in HepG2 cells. Oncol Rep, 2012. 28(2): 701-706.

致　谢

本论文是在瑞金临床医学院检验系导师倪培华老师和吴洁敏老师的悉心指导下完成。两位老师都是非常优秀的教师，具有丰富的分子生物学知识和实验经验，在整个论文实验和写作过程中，对我进行了耐心的指导和帮助。在此，我向倪培华老师和吴洁敏表示最诚挚的谢意！

感谢梁璆荔老师在实验过程中对我的帮助。

microRNA 相关的 SNP 与肿瘤的关系

摘要

microRNA 是一类在不同物种间高度保守的小 RNA 分子（约 19~22 个核苷酸），能在多种组织中表达，并且其表达具有组织特异性和时序性。多项实验已证实 microRNA 在调节生长发育、增殖、分化、细胞凋亡、应激反应等重要过程中发挥了关键作用。越来越多的研究证明，microRNAs 可能具有癌基因或抑癌基因的功能，并且 miRNA 相关的单核苷酸多态性（SNP）与肿瘤易感性、发病年龄、肿瘤分期、药物反应性以及预后均存在一定的关联。本文综述了近年来某些 microRNAs 相关的 SNP，包括 microRNAs 基因的 SNPs 和 microRNAs 靶基因的 SNPs 与肿瘤的关系。

关键词：微小 RNA；单核苷酸多态性；肿瘤

1. microRNA 及其功能特性

微小 RNA（ microRNA，miRNA）是一类平均长度为 22 个核苷酸的小分子非编码 RNA，最初由 Lee 等人于秀丽隐杆线虫中发现[1]。 很多 miRNA 在基因组上聚集排列形成基因簇，首先在 RNA 聚合酶 II 的参与下，miRNA 编码基因在在细胞核中转录生成较长的初级转录产物 pri-miRNAs，接着 pri-miRNAs 与核糖核酸酶III（ribonucleaseIII，RNaseIII）家族中的两种酶（Drosha 和 Dicer）结合，Drosha 在核内将 pri-miRNAs 剪切成长度约为 70 个核苷酸的发夹状 miRNA 前体（pre-miRNA）[2]。随后这些 miRNA 前体在 Exportin-5 的作用下被转运至细胞质，由 Dicer 酶将其进一步加工为长约 20bp 的成熟 miR/miR*双链结构。成熟的单链 microRNA 包含在我们所知的 miRNA 核糖核蛋白复合体（micorRNA ribonucleoprotein complex ， miRNP）、miRgonaute 或 miRNA 诱导的沉默复合体（microRNA induced silencing complex， miRISC）中，而另一条链可能会被降解。这类复合体以 mRNAs 为目标靶基因，通过与 mRNAs 的 3’非转录区（3’untranslated regio，3’UTR）完全或不完全序列特异性互补，在某种程度上致使 mRNA 降解和翻译抑制，从而在转录后水平调控基因的表达[3]。研究表明，人类基因组中约 30%的基因受至少一个 microRNA 调控[4]。目前已发现 1600 种 has-miRNA 前体，2042 种成熟 has-miRNA（miRBase，http://www.mirbase.org/）。据研究，许多编码 microRNAs 的基因位于肿瘤相关的基因组区域或脆性位点，并且位于缺失区域的 miRNAs 在肿瘤样本中呈现低表达量[5]。多数 miRNA 的高度保守性和组织特异性，以及上述研究提示 miRNA 可能在不同肿瘤中起不同的作用。

2. miRNA 相关的单核苷酸多态性

单核苷酸多态性（single-nucleotide polymorphism, SNP）是指在基因组水平上由单个核苷酸变异引起的DNA序列多态性，是人类可遗传变异种最常见的一种。大量的单个核苷酸变异已被列入研究范围，且为阐明人类肿瘤发病机制、临床特点和疗效差异提供了新的研究方向和研究依据。SNPs可以直接或间接影响miRNA： pri-microRNA、pre-microRNA或成熟microRNA中的SNPs可影响miRNA的加工或其功能；miRNA基因启动子的SNPs能阻止转录因子与之结合，抑制pri-microRNA转录，并且mRNA中的SNPs能产生新的结合位点或破坏原本的结合位点，间接对miRNA产生影响[6]。发生在成熟miRNA的SNPs（特别是发生在种子区域的SNPs）可能影响基因沉默的特异性[7]，而发生在miRNA靶基因3’UTR的SNP可能更具靶位和通路特异性[8]。Duan等[9]发现，227个人类miRNA基因中存在323个SNP，其中有12个位于miRNA前体，1个位于成熟miR-125a的第8个核苷酸位点。而

根据最新的数据显示，202个pre-miRNA中存在283个SNP，在已知的120 000个发生在3'UTRs的SNPs中，约17%的SNP破坏了推定的保守或非保守miRNA结合位点[10]。通过对Patrocles数据库进行分析，发现有8.6%的SNP能产生预期的靶位点[10,11]。

3. miRNA 相关的 SNP 与肿瘤的关系

越来越多的研究发现，miRNA 相关的 SNP 与不同类型的肿瘤有关，并且在多种肿瘤中发现了 miRNA 的异常表达。Yu[12]等在表达序列标签（expressed sequence tag, EST）数据库和单核苷酸多态性数据库（single nucleotide polymorphisms database, dbSNP）数据库中，对肿瘤和正常组织的 miRNAs 靶基因的 SNPs 进行分析，发现在肿瘤组织中有 12 个 miRNAs 靶基因的 SNPs 出现了显著的异常等位基因。研究证明，不论是存在于 miRNA 基因的 SNPs 还是位于 miRNA 靶基因的 SNPs，都能直接或间接影响 miRNA，从而影响 miRNA 靶基因的表达和功能，可能与肿瘤密切相关。在已知的人类 1048 个 pre-miRNA 中，共存在 30442771 个 SNP，其中有 178 个 SNP 位于 149 个 miRNA 的成熟序列上，50 个 SNP 位于 41 个 miRNA 的种子序列上，而种子序列上的 SNP 更有可能产生新的结合位点或破坏原有结合位点，并且 miR-499 种子序列上的 SNP（rs3746444 A＞G）可导致 miR-499 与其靶基因 BCL2 的结合位点丧失[13]。癌症的发生是一个多因素参与的复杂的过程，miRNA 的 SNP 可能会对肿瘤发生相关的 mRNA 的调节作用产生影响，并且很多 miRNA 的基因位于肿瘤相关的基因组区域或脆性位点，因此，研究 miRNA 的 SNP 与肿瘤发生的相关性有助于早日揭示肿瘤的发生机制。

3.1 miRNA 基因的 SNPs 与肿瘤的关系

3.1.1 miRNA-146a

miR-146a 的编码基因位于 5 号染色体长臂 3 区 4 带（5q34），SNP rs2910164（G/C）处于 pre-miR-146a 的茎环结构。研究发现，miR-146a 具有潜在调节肿瘤坏死因子受体相关的因子 6 和白介素-1 受体相关的激酶 1 基因的作用[14]，这两种物质都是在细胞增殖和免疫识别中起重要作用的信号转导途径中 Toll 样受体和细胞因子受体重要的适配分子下游[14]。Xu[15]等发现， pre-miR-146a 的 rs2910164（G＞C）与中国广州地区汉族男性对肝细胞癌的易感性密切相关（GG 基因型男性个体的易感性超出 CC 基因型达 2 倍之多），同时 G 等位基因的 pre-miR-146a 能增加成熟 miR-146a 的量。Jazdzewski[16]等对美国、芬兰、波兰的部分甲状腺乳头状癌（PTC）患者的 rs2910164 位点进行分析后发现，C 等位基因的 pre-miR-146a 可减少成熟 miR-146a 的量，减弱对靶基因（其中一个靶基因为 PTC1，也称作 CCDC6 或 H4，在 PTC 中常与 RET 原癌基因一起基因重组）的抑制作用；杂合子 GC 基因型携带者有较高的 PTC 患病风险，并且这一多态性位点能通过体细胞突变在肿瘤发生中发挥重要作用。有研究指出，携带上述 SNP 的 GG 和 GC 型的年龄≤58 岁、不吸烟的中国男性有较高的胃癌患病风险[17]，CC 型 rs2910164 可显著提高日本人罹患胃癌的风险[18]。而与上述研究结果不同的是，Shen[19]等发现上述 SNP 的 C 等位基因的成熟 miR-146a 的表达水平显著高于 G 等位基因，且 C 等位基因数量的增加与美国人乳腺癌/卵巢癌癌症确诊年龄的提前显著相关。Lian[20]等对近年来 miR-146a 的研究成果进行 Meta 分析后发现，上述 SNP 的 CC 基因型可增加欧洲人乳腺癌的易感性。Zhou[21]等发现，在我国人群中，携带至少一个 G 等位基因的原发性肝癌患者有更年轻的发病年龄，并有相对较好的肝脏功能。

3.1.2 miR-196a2

Pre-miR-196a2 的 SNP rs11614913（C/T）位于 12 号染色体（12q13.13），据推测，该 miRNA 能调节同源框基因家族（Homebox genes）的 Hox 基因，这个基因能调控胚胎的细胞发育和分化方向[22]。Hu[23]等发现，hsa-mir-196a2 的 rs11614913（C＞T）SNP 与中国非小细胞肺癌患者的生存率相关，CC 基因型携带患者的生存人数明显降低，且 CC 基因型可显著增加成熟 has-mir-196a2 的表达，并影响成熟 has-mir-196a2-3p 与靶 mRNA 的结合。在对日本人胃癌的研究中发现，上述 SNP 与胃炎的组织学严重性有关，且 TT 基因型是高度的单核细胞浸润的独立因素[18]。Peng[24]等发现，在中国汉族人群中，携带上述 SNP CC 基因型的个体有较高的胃癌风险，并且这个 SNP 位点能增加 93%的非

贲门胃癌患病风险，同时指出 CC 基因型纯合子与胃癌的淋巴结转移密切相关。最近一项研究指出，携带有 miR-196a2 的变异等位基因的沙乌地阿拉伯女性有更高的乳腺癌患病风险[25]。

3.1.3 miR-27a

miR-27a 的编码基因位于 19 号染色体短臂 1 区 3 带 1 亚带 3 次亚带（19p13.13），单核苷酸多态性位点 rs895819 （A/G）位于 miR-27a 前体（pre-miR-27a）的茎环结构。研究发现，miR-27a 的靶基因包括白介素-6 受体的一个前身链、Toll 样受体 8 前体、白介素-12 受体 β-1 前身链、核因子 κB 激酶 ε 亚族的抑制因子、干扰素调节因子，这些都是与炎症反应和免疫应答相关的分子。另外，RET 原癌基因前体、多种细胞凋亡相关分子（Fas 细胞凋亡抑制分子 1、FAS 相关死亡功能域、caspase-8 前体、肿瘤坏死因子受体相关因子 1、CASP8、FADD 样细胞凋亡调节因子前体）、MAP 激酶活性蛋白激酶 3 和维甲酸 α 受体也都是 miR-27a 的靶基因[26]。Arisawa [26]等发现在日本男性中，miR-27a 的 SNP 与胃黏膜萎缩有关，GG 型的萎缩和化生评分显著高于其他基因型。Sun[27]等首次发现，has-mir-27a 的 rs895819 通过调节 miR-27a 和其靶基因 ZBTB10 的表达来影响中国人的胃癌易感性。他们在中国汉族年龄＞58 岁的男性老年胃癌患者中观察到，上述 SNP 的 AG+GG 型携带者的胃癌风险显著高于 AA 型携带者，此患病风险在不吸烟的患者病历中更为明显，与胃癌的淋巴结转移显著相关。Shi [28]等指出，中国人群中，rs895819 的 AG 型杂合子能显著降低肾细胞癌的患病风险，AG 和 GG 型有较低的肾细胞癌易感性。据研究发现，miR-27a 可作为原癌基因在肿瘤发生中发挥作用，SNP rs895819-G 等位基因可一定程度地抑制 miR-27a 的成熟过程从而减低某些癌症如乳腺癌的发病风险，并且研究人员推测，miR-27a 可能参与雌激素依赖的调节通路，因此 SNP rs895819 的作用可能具有性别特异性[29]。

3.1.4 miR-499

编码 miR-499 的基因位于 20 号染色体（20q11.22 ），SNP rs3746444（C/T）位于 pre-miR-499 的种子序列中。Liu[30]等发现 miR-499 SNP（rs3746444）的 AG 和 GG 基因型与减低白种人头颈部鳞状细胞癌风险有关。Hu[31]等发现血清中的 miR-499 水平能作为非小细胞肺癌（NSCLC）的预后因素。Liu[32]等发现我国结直肠癌病例中，miR-499-5p 能通过调节靶基因 FOXO4 和 PDCD4 进而促进体外癌细胞迁移和浸润，并促进体内肝和肺部转移。也有研究称，携带有 miR-499 的 CT 基因型的沙乌地阿拉伯绝经后的女性相对于 CC 和 TT 基因型有更高的乳腺癌患病风险[25]。

3.1.5 其他

Huang[33]等发现，成熟 miR-608 的 SNP（rs4919510:C>G）与我国汉族女性乳腺罹患癌风险有关，携带有变异等位基因（CG/GG）以剂量效应的方式使女性有更高的 HER2 阳性乳腺癌患病风险。Mu[34]等发现，位于 pre-miR-30c 的 SNP（rs928508:A/G）通过调整成熟 miR-30c 的表达来影响我国人群罹患胃癌的风险，其中 AA 型携带者有更高的胃癌风险。Smith[35]等研究发现，CC 型 pre-miR-423（rs6505162:A＞C）能减低澳大利亚女性乳腺癌患病风险。

3.2 miRNA 靶基因的 SNPs 与肿瘤的关系

miRNA 靶基因 SNP 的能在一定程度上影响 miRNA 与 mRNA 的结合，从而通过调节 miRNA-mRNA 之间的相互作用对许多肿瘤的发生发展产生影响。

在消化系统肿瘤中，Ma[36]等发现，DICER 3’UTR 的 rs1057035（C/T）可影响 miRNA 与 DICER 的结合，与我国人群罹患口腔癌的风险相关。RAS 相关蛋白基因（RAP1A）的 3’UTR 内存在 miR-196a 的结合位点，而该 3’UTR 的 SNP(rs6573:A＞C)可提高 RAP1A 的组成型表达，在对我国汉族的部分样本进行分析后发现，RAP1A 的高表达可见于食管鳞状细胞癌（ESCC）的大多数组织并且与 RAP1A 的基因型以及淋巴结转移有关[37]。MTMR3 是 miR-181a 的结合位点，位于 MTMR3 的 SNP（rs12537）被证实与我国南方地区汉族人胃癌患病风险以及预后有关，携带 T 等位基因的上述位点使得 miR-181a 的抑制作用增强，并且 CT 和 TT 型的 rs12537 有更高的胃癌罹患风险[38]。Ryan[39]等对结直肠癌患者进行研究后发现，GG 基因型的 has-mir-608 的 (rs4919510:C/G)能显著增加白种人患者

的死亡风险，而降低非裔美国患者的死亡风险。LCS6 是 KRAS 3'UTR 中 let-7 的完全结合位点，最近研究发现 KRAS-LCS6 中存在一个 SNP，携带该 SNP 的 G 等位基因的荷兰早期结直肠癌患者有较好的预后，KRAS-LCS6 基因型有希望成为预后指标并指导治疗方案的选择[40]。Naccarati[41]等对捷克的 1098 例结肠直肠癌患者和 1469 例健康人进行研究后发现，核苷酸切除修复基因（nucleotide excision repair NER）3'UTR 的 miRNA 结合位点的 SNP 与结直肠癌患病风险有关，并且与肿瘤位置密切相关。组蛋白甲基转移酶 SET8 的 3'UTR 是 miR-502 的结合位点，Guo 等发现，位于该 3'UTR 的 SNP（rs16917496）与我国肝细胞癌患者的生存期有关，携带 SET8 CC 基因型的患者有更长的术后生存期，低表达的 SET8 与更长的生存期有关，推测此现象可能与 3'UTR 的 SNP 所致的 miR-502 与其靶基因的结合亲和力改变有关[42]。miR-106b-25 在 MCM7 的 13 内含子内成簇排列，可能在免疫应答和肿瘤发生中发挥部分作用，研究发现 MCM7 的启动子区域存在一个 SNP（rs999885），在我国持续感染 HBV 的人群中， rs999885 AG 型和 GG 型携带者的正常肝脏组织中 miR-106b-25 的表达量显著高于 AA 型携带者，并可能增加肝细胞癌的患病风险[43]。

在头颈部癌中，Ma[44]等发现，位于 DICER 3'UTR 的 SNP（rs1057035）可通过 has-miR-574-3p 抑制 miRNAs 与 DICER mRNA 的结合，从而影响中国人群口腔癌的发病风险。据研究称，SMC1B 是 miRNA 靶基因，Zhang[45]等发现位于 SMC1B 的 SNP（rs3747238）与头颈癌的复发有关，且该 SNP 的变异等位基因增加癌症复发风险有关。

在泌尿生殖系统的肿瘤中，有研究发现， 位于 HOXB5 3'UTR 的一个 SNP 能影响 miRNA-7 与 HOXB5 的结合活性和 SNP 相关 mRNA 的稳定性，从而调控 HOXB5 的表达，并有望成为膀胱癌的预后指标[46]。BMPR1B 的 3'UTR 是 miR-125b 的靶结合位点之一，位于该 3'UTR 的 SNP（rs1434536）会影响 miR-125b 与 BMPR1B mRNA 的结合，并对我国局部地区的汉族人群的前列腺癌易感性产生影响[47]。而 Wang[48]等发现，SET8 CC 基因型能减低中国女性卵巢上皮癌的患病风险。Liang[49]等推测 PDGFC 是 miR-425 的潜在靶基因，而位于 PDGFC 的 SNP（rs1425486:G/A）能影响 miR-425 对该基因表达的抑制作用，并且对卵巢癌的生存期和治疗反应产生影响。Wynendaele[50]等在德国卵巢癌患者样本中发现 MDM4 的 3'UTR 的一个 SNP（rs4245739）可产生新的 miR-191 结合位点，miR-191 只与携带 MDM4-C 等位基因的 3'UTR 结合，致使 MDM4-C 的表达下调，因而延缓卵巢癌的进展、减少肿瘤相关的死亡并提高患者对化疗的敏感性，而上述过程在一定程度上独立于 p53 抑癌途径。

总结与展望

microRNA 已成为近年来分子生物科学领域的研究热点。miRNA 基因的 SNP 能影响 miRNA 的生成，而位于靶 mRNA 的 3'UTR 的 SNP 能通过产生新结合位点或破坏原有的结合位点来影响与 miRNA 的结合，从而影响 miRNA 的生物调节作用。经过大量的研究，人们发现 miRNA 在肿瘤发生、分期、预后等方面均发挥一定的作用，但由于 miRNA 对 mRNA 的调节作用不具有特异性，因此相同的 miRNA 可能在不同组织中起到截然不同的调节作用，甚至在不同人种病例中发挥不同的作用，例如减低或增加癌症风险。目前的研究都只能证实 miRNA 的 SNP 与部分研究人群的肿瘤发生、分期或预后相关，并且只有少数 miRNA 能作为一个明确的检测指标，同时这些指标在不同人种中的使用会受到限制。肿瘤发生、分期、预后都是多因素参与的过程，虽然有大量 miRNA 和其靶 mRNA 的 SNP 被陆续发现，但 SNP 很难作为独立因素 miRNA 相关的 SNP 对上述过程产生影响。所以，需要开展大规模的涉及多人种的研究来证实 miRNA 相关的 SNP 与肿瘤的关系，未来则有希望将 miRNA 相关的 SNP 列入肿瘤常规检测指标，并实现个体化的靶向治疗。

参考文献

[1] Lee R C, R L Feinbaum, V Ambros. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 1993. 75(5): 843-854.

[2]Lee Y, C Ahn, J J Han, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 2003, 425(6956): 415-419.

[3]Iorio M V, C M Croce. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. J Clin Oncol, 2009. 27(34): 5848-5856.

[4] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004. 116(2): 281-297.

[5] Calin G A, C Sevignani, C D Dumitru, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(9): 2999-3004.

[6] Salzman D W, J B Weidhaas. SNPing cancer in the bud: MicroRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. Pharmacol Ther, 2013. 137(1): 55-63.

[7] Duan S, S Mi, W Zhang, et al. Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes. RNA Biol, 2009. 6(4): 412-425.

[8] Mishra P J, J R Bertino. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. Pharmacogenomics, 2009. 10(3): 399-416.

[9] Duan R, C Pak, P Jin. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. Hum Mol Genet, 2007. 16(9): 1124-1131.

[10] Ryan B M, A I Robles, C C Harris. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Nat Rev Cancer, 2010. 10(6): 389-402.

[11] Georges M, A Clop, F Marcq, et al. Polymorphic microRNA-target interactions: a novel source of phenotypic variation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. 71: 343-350.

[12] Yu Z, Z Li, N Jolicoeur, et al. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. Nucleic Acids Res, 2007. 35(13): 4535-4341.

[13] Gong J, Y Tong, H M Zhang, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. Hum Mutat, 2012. 33(1): 254-263.

[14] Taganov K D, M P Boldin, K J Chang, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(33): 12481-12486.

[15] Xu T, Y Zhu, Q K Wei, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis, 2008. 29(11): 2126-2131.

[16] Jazdzewski K, E L Murray, K Franssila, et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(20): 7269-7274.

[17] Zeng Y, Q M Sun, N N Liu, et al. Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population. World J Gastroenterol, 2010. 16(28): 3578-3583.

[18] Okubo M, T Tahara, T Shibata, et al. Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population. Helicobacter, 2010. 15(6): 524-531.

[19] Shen J, C B Ambrosone, R A DiCioccio, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. Carcinogenesis, 2008. 29(10): 1963-1966.

[20] Lian H, L Wang, J Zhang. Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Has-miR-146a Rs2910164 polymorphism in Europeans. PLoS One, 2012. 7(2): e31615.

[21] Zhou J, R Lv, X Song, et al. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population. DNA Cell Biol, 2012. 31(4): 524-530.

[22] Linhares J J, M Jr Azevedo, A A Siufi, et al. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in microRNAs (hsa-miR-196a2 rs11614913 C/T) from Brazilian women with breast cancer. BMC Med Genet, 2012. 13: 119.

[23] Hu Z, J Chen, T Tian, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. J Clin Invest, 2008. 118(7): 2600-2608.

[24] Peng S, Z Kuang, C Sheng, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. Dig Dis Sci, 2010. 55(8): 2288-2293.

[25] Alshatwi A A, G Shafi, T N Hasan, et al. Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients. PLoS One, 2012. 7(2): e30049.

[26] Arisawa T, T Tahara, T Shibata, et al. A polymorphism of microRNA 27a genome region is

associated with the development of gastric mucosal atrophy in Japanese male subjects. Dig Dis Sci, 2007. 52(7): 1691-1697.

[27] Sun Q, H Gu, Y Zeng, et al. Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression. Cancer Sci, 2010. 101(10): 2241-2247.

[28] Shi D, P Li, L Ma, et al. A genetic variant in pre-miR-27a is associated with a reduced renal cell cancer risk in a Chinese population. PLoS One, 2012. 7(10): e46566.

[29] Yang R, B Schlehe, K Hemminki, et al. 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.

[30] Liu Z, G Li, S Wei, et al. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer, 2010. 116(20): 4753-4760.

[31] Hu Z, X Chen, Y Zhao, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2010. 28(10): 1721-1726.

[32] Liu X, Z Zhang, L Sun, et al. MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4. Carcinogenesis, 2011. 32(12): 1798-1805.

[33] Huang A J, K D Yu, J Li, et al. Polymorphism rs4919510: C> G in Mature Sequence of Human MicroRNA-608 Contributes to the Risk of HER2-Positive Breast Cancer but Not Other Subtypes. PLoS One, 2012. 7(5): e35252.

[34] Mu Y P, X L Su. Polymorphism in pre-miR-30c contributes to gastric cancer risk in a Chinese population. Med Oncol, 2012. 29(3): 1723-1732.

[35] Smith R A, D J Jedlinski, P N Gabrovska, et al. A genetic variant located in miR-423 is associated with reduced breast cancer risk. Cancer Genomics Proteomics, 2012. 9(3): 115-118.

[36] Ma H, H Yuan, Z Yuan, et al. Genetic variations in key microRNA processing genes and risk of head and neck cancer: a case-control study in Chinese population. PLoS One, 2012. 7(10): e47544.

[37] Wang K, J Li, H Guo, et al. MiR-196a binding-site SNP regulates RAP1A expression contributing to esophageal squamous cell carcinoma risk and metastasis. Carcinogenesis, 2012. 33(11): 2147-2154.

[38] Lin Y, Y Nie, J Zhao, et al. Genetic polymorphism at miR-181a binding site contributes to gastric cancer susceptibility. Carcinogenesis, 2012. 33(12): 2377-2383.

[39] Ryan B M, A C McClary, N Valeri, et al. rs4919510 in hsa-mir-608 is associated with outcome but not risk of colorectal cancer. PLoS One, 2012. 7(5): e36306.

[40] Smits K M, T Paranjape, S Nallur, et al. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. Clin Cancer Res, 2011. 17(24): 7723-7731.

[41] Naccarati A, B Pardini, L Stefano, et al. Polymorphisms in miRNA-binding sites of nucleotide excision repair genes and colorectal cancer risk. Carcinogenesis, 2012. 33(7): 1346-1351.

[42] Guo Z, C Wu, X Wang, et al. A polymorphism at the miR‐502 binding site in the 3′‐untranslated region of the histone methyltransferase SET8 is associated with hepatocellular carcinoma outcome. International Journal of Cancer, 2012. 131(6): 1318-1322.

[43] Liu Y, Y Zhang, J Wen, et al. A genetic variant in the promoter region of miR-106b-25 cluster and risk of HBV infection and hepatocellular carcinoma. PLoS One, 2012. 7(2): e32230.

[44] Ma H, H Yuan, Z Yuan, et al. Genetic variations in key microRNA processing genes and risk of head and neck cancer: a case-control study in Chinese population. PLoS One, 2012. 7(10): e47544.

[45] Zhang X, H Yang, J J Lee, et al. MicroRNA-related genetic variations as predictors for risk of second primary tumor and/or recurrence in patients with early-stage head and neck cancer. Carcinogenesis, 2010. 31(12): 2118-2123.

[46] Luo J, Q Cai, W Wang, et al. A microRNA-7 binding site polymorphism in HOXB5 leads to differential gene expression in bladder cancer. PLoS One, 2012. 7(6): e40127.

[47] Feng N, B Xu, J Tao, et al. A miR-125b binding site polymorphism in bone morphogenetic protein membrane receptor type IB gene and prostate cancer risk in China. Mol Biol Rep, 2012. 39(1): 369-373.

[48] Wang C, Z Guo, C Wu, et al. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3′ untranslated region of the SET8 gene is associated with the risk of epithelial ovarian cancer. Cancer Genetics, 2012. 205(7-8): 373-376.

[49] Liang D, L. Meyer, D W Chang, et al. Genetic variants in MicroRNA biosynthesis pathways and binding sites modify ovarian cancer risk, survival, and treatment response. Cancer Res, 2010. 70(23): 9765-9776.

[50] Wynendaele J, A Böhnke, E Leucci, et al. An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. Cancer Res, 2010. 70(23): 9641-9649.

miR-146a 基因的一个功能性多态位点与家族性乳腺癌/卵巢癌诊断年龄相关性研究

MiR-146a 前体的序列中有一 G/ C 多态性（rs2910164），此多态性可导致 miR-146a 的茎区中出现由 G:U 变为 C:U 的错配。预测 miR-146a 靶基因有乳腺癌和卵巢癌的关键基因 BRCA1 和 BRCA2。为了检测 rs2910164 是否在乳腺癌和/或卵巢癌中起作用，本文对 42 位家族性乳腺癌病人和 82 位家族性卵巢癌病人的诊断年龄与此多态性位点的相关性进行研究。携带至少一个 miR-146a 变异等位基因的乳腺癌病人被确诊时的年龄小于不携带变异等位基因的乳腺癌患者（中位年龄分别为 45 和 56 岁，*P*=0.029）；携带至少一个 miR-146a 变异等位基因的卵巢癌病人被诊断时比没有携带任何变异等位基因的卵巢癌患者更年轻（中位年龄分别为 45 和 50 岁，*P*=0.014）。在进一步的功能性分析中，我们发现相对于常见的等位基因来说，变异等位基因增加了 microRNA 前体的产物，即成熟 miR-146a 的量。在靶基因体外检测中，我们观察到 miR-146a 能结合到 BRCA1 和 BRCA2 mRNAs 的 3'非翻译区，潜在地调节 mRNA 的表达，与预测的靶基因一致。有趣的是，BRCA1 3'非翻译区和有变异 C 等位基因的 miR-146a 的结合能力显著强于常见 G 等位基因（*P*=0.046）。综上所述，我们的数据表明，携带变异 C 等位基因 miR-146a 的乳腺癌/卵巢癌患者可能有高水平的成熟 miR-146a，并且这个变异使他们发生家族性乳腺癌和卵巢癌的年龄提前。

引言

MicroRNAs（miRNAs）是一类长度约为 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA，其能通过一种特定序列的方式抑制基因的表达[1]。因为 miRNA 这种特殊的作用方式—以若干具有重要功能的编码蛋白质的基因作为靶位，并推测这种由种系遗传获得 miRNAs 基因的变异能够影响肿瘤抑癌基因或致癌基因的表达水平，并影响癌症的发病风险[2]。而每个 miRNA 都有大量的基因靶位，这就很有可能使得两个或多个来源于不同分子途径或相互作用途径的蛋白质编码基因被干扰，那么这些遗传变异就可能对细胞有重要的影响。许多证据证明 miRNA 基因遗传变异能影响 miRNA 的加工和/或 miRNA 靶基因的选择，这些证据也支持了变异对癌症风险的作用[3-5]。例如，Calin [3]等报告了一个慢性淋巴细胞白血病患者的 pre-miR-16-1/15a 前体的突变，且这个患者的一级亲属患有家族性慢性淋巴细胞白血病和乳腺癌。这一突变会引起体内和体外 miRNA 低水平表达并且与常见等位基因的缺失有关。他们还在一个有着明显癌症家族史（母亲患有食管癌，哥哥患有前列腺癌，姐姐患有乳腺癌）并同时患有慢性淋巴细胞白血病和前列腺癌的患者标本中发现了另一个位于 pre-miR-206 的突变，导致 miRNA 在体内、外的低表达。

miR-146a 被发现在乳腺癌组织中有不正常表达[6]。miRNA-146a 前体中的一个 G/C 的多态性位点（rs2910164），这个改变导致 miR-146a 的茎区中出现由 G:U 变为 C:U 的错配[7]。目前，这一多态性位点的生物学意义尚未明确。通过运用一个非参数的热力学模型，即 PITA[8]，来预测 miRNAs 的目标靶位，发现 BRCA1 和 BRCA2 都可能是 miR-146a 的目标靶位。BRCA1 和 BRCA2 是家族性乳腺癌和卵巢癌中两个最重要的遗传易感基因。家族史一贯作为乳腺癌和卵巢癌的主要危险因素，miRNA 中的遗传变异可能与这些疾病极其相关。因此，在本项研究中，我们拟探求 miR-146a 多态性位点（rs2910164）在家族性乳腺癌和卵巢癌中的作用，并进一步阐明这一多态性位点的生物学功能。

材料和方法

研究人群

本研究包括 42 例无亲缘关系的遗传性乳腺癌家族先证者的淋巴细胞基因组样本和 82 例无亲缘关系的遗传性卵巢癌家族先证者的淋巴细胞基因组样本。乳腺癌患者的 DNA 样本从 Coriell 医学研究所（Camden, NJ）获得，在这些患者中，有 40 名女性和 2 名男性，人种分布为 35 名白种人、4 名黑种人、3 名患者种族未知。这些患者的癌症诊断年龄从 30 岁到 78 岁不等；其中 23 名患者为

BRCA1 突变携带者，8 名患者为 BRCA2 突变携带者，11 名患者无 BRCA1/2 中的任一突变。卵巢癌患者的 DNA 样本来源于吉尔达瑞德尔家族性卵巢癌登记中心的无亲缘关系的遗传性卵巢癌家族先证者，这些遗传性卵巢癌家族中至少有 2 个一级或二级亲属在任意年龄诊断出上皮性卵巢癌。所有的卵巢癌 DNA 样本均来自白种女性，且均不携带 BRCA1/2 或 MLH1/MSH2 突变，其诊断年龄为 25 到 83 岁不等。

基因分型

通过直接 DNA 测序来进行基因型分析。使用 5'-CCGATGTGTATCCTCAGCTTTG-3'和 5'-GCCTGAGACTCTGCCTTCTG-3'引物扩增，该 192bp 大小片段包含了 miR-146a 前体区域和多态性位点（rs2910164）。多聚酶链反应的实验循环条件为 94℃ 5min，94℃ 30s 进行 35 个循环，60℃ 30s，72℃ 30s 和 72℃ 7min 的最后延伸步骤。PCR 扩增产物采用双脱氧链末端终止法进行测序。PCR 产物的双链都在罗斯维尔癌症研究所生物聚合物中心使用 ABI-PRISM 3730xl 自动测序仪（Applied Biosystems, Foster City, CA）进行测序。为了进行质量控制，会在每一轮序列分析中进行随机重复样本（5%）测定。

miRNA 克隆、表达和检测

为了研究多态性对成熟 miR-146a 表达水平的影响，我们通过运用 pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning® 试剂盒将包含了 GG 或 CC 基因型 miR-146a 前体的 192bp 大小的 DNA 片段插入 pcDNA3.3 哺乳动物表达质粒（Invitrogen, Carlsbad, CA）。通过序列分析来确认片段的插入点和插入方向。这两种构建的质粒分别被命名为 pcDNA3.3-miR-146G 和 pcDNA3.3-miR-146C。根据说明书，我们使用了 DOTAP 脂质体转染试剂（Roche, Indianapolis, IN）将 pcDNA3.3-miR-146G 或 pcDNA3.3-miR-146C 转染进入 MCF-7 乳腺癌细胞系中。48 小时后，使用 mirVana™ miRNA 分离试剂盒（Applied Biosystems）分离 miRNAs。成熟 miR-146a 的表达水平通过基于 Taqman 荧光探针的 microRNA 分析（Applied Biosystems）与 ABI StepOne 系统（Applied Biosystems）的联合使用来进行测量。起始密码子所需的每个 miRNA 对于 tRNA 的相对量 2^{-dCT} 来描述，其中 dCT=（CT_{miRNA}－CT_{U6}）。每个实验都重复 3 次，结果使用 3 次实验的平均值。

靶点体外分析

基于荧光素酶的靶点体外分析用于检测 miR-146a 是否能与 BRCA1 或 BRCA2 的信使 RNA（mRNA）的 3' 非翻译区（UTR）结合。通过对人类基因组 DNA 进行 PCR 扩增获得 BRCA1 和 BRCA2 的 mRNAs 的 3' UTR 片段，这一片段预期能与 miR-146a 相互作用。BRCA1 中 3' UTR 的一个大小为 544bp 的片段通过使用以下引物进行扩增：5'-CTGCTTGAAGTCTCCCTTGG-3'和 5'-CACCATGACCGGCTAATTTC-3'，BRCA2 中 3' UTR 的一个大小为 698bp 的片段通过使用以下引物进行扩增：5'-GCCCGATTCCGTATTGGTAT-3'和 5'-TTTGGATGACCATTTTGTTGA-3'。 通过紧接着荧光素酶基因终止密码子下游的 *Pem*I 酶切位点，将两种 PCR 产物插入到 pMIR-REPOR™ miRNA 表达报告载体（Applied Biosystems）。通过序列分析来确认片段的插入点和插入方向。构建的这两种质粒被分别命名为 pMIR-REPOR™-BRCA1 和 pMIR-REPOR™-BRCA2。按操作说明书使用 DOTAP 脂质体转染试剂,将 pMIR-REPOR™-BRCA1/2 单独或/和 pcDNA3.3-miR-146a 一起被转染进入 MCF-7 乳腺癌细胞系， G 和 C 等位基因均被纳入研究。转染 48 小时后使用荧光素酶分析（Promega Madison，WI）来测量荧光素酶活性。BRCA1/2 与 miR-146a 之间的相互作用水平由共转染 pMIR-REPOR™-BRCA1/2 和 pcDNA3.3-miR-146a 的细胞与单独转染 pMIR-REPOR™-BRCA1/2 的细胞之间的荧光素酶活性差异决定。每个实验都重复 3 次，结果使用 3 次实验的平均值。

统计学分析

使用非参数秩和检验来比较 miR-146a 不同基因型别的乳腺癌或卵巢癌诊断年龄之间有无统计学差异。同时对性别、BRCA1/2 状态和种族进行划分调整，运用线性回归分析，对乳腺癌或卵巢癌的诊断年龄与 miR-146a 基因型的关系进行进一步的研究。t 检验用于判定 miRNA 表达检测中 G 和 C 等位基因的 miR-146a 的平均表达水平有无显著差异，也用于比较共转染 pMIR-REPOR™-BRCA1/2 和 pcDNA3.3-miR-146a 的细胞与单独转染 pMIR-REPOR™-BRCA1/2 的细胞之间的平均荧光素酶活性。当 $P<0.05$ 时考虑有统计学意义，所有统计学检验均为双侧检验。所有分析均使用 STATA 软件（Version9.0, STATA, College Station, TX）。

结果

因为遗传性癌症更有可能低的诊断年龄，所以我们就 miR-146a 的遗传多态性与癌症诊断年龄之间的关系进行了检验（表 1）。变异 C 等位基因在乳腺癌患者中的基因频率为 0.286，在卵巢癌患者中为 0.238。在乳腺癌研究中，基因剂量效应会对诊断年龄产生影响，且基因型为 GG 的病人平均诊断年龄为 56 岁，基因型为 GC 的病人平均诊断年龄为 46 岁，基因型为 CC 的病人平均诊断年龄为 43 岁。

表 1.　miR-146a 遗传变异和癌症诊断年龄

基因型	n	平均诊断年龄（范围）	*P* 值
乳腺癌患者			
GG	22	56(32-79)	对照
GC	16	46(36-68)	0.062
CC	4	43(30-57)	0.095
GC＋CC	20	45(30-68)	0.029
卵巢癌患者			
GG	50	50(26-83)	对照
GC	25	41(21-69)	0.026
CC	7	43(25-52)	0.16
GC＋CC	32	45(21-69)	0.014

校正 BRCA1/2 状态、性别和种族的影响之后，相较于基因型为 GG 的病人而言，基因型为 GC 或 CC 的病人有更低的诊断年龄，但此差异不显著。在校正了 BRCA1/2 状态、性别和种族的影响的情况下，我们将基因型为 GC 和 CC 的两组合并，发现至少有一个 C 等位基因的患者的诊断年龄显著低于 GG 基因型的患者（$P=0.029$）。我们在卵巢癌研究中观察到了类似的情况，GG 基因型的患者平均诊断年龄为 50 岁，GC 型的平均诊断年龄为 41 岁，CC 型的平均诊断年龄为 43 岁。将 GC 和 CC 型的两组合并后，我们发现携带至少一个 C 等位基因的患者的诊断年龄显著低于 GG 型患者的诊断年龄（$P=0.014$）。除此之外，在乳腺癌和卵巢癌患者中均能观察到 C 等位基因数量的增加与癌症确诊年龄的提前显著相关（乳腺癌 $P=0.022$，卵巢癌 $P=0.016$）。

这一遗传变异位于茎环发夹结构的中央部分，并且造成碱基对的错配（图 1 的补充信息可从 Carcinogenesis Online 获取）。最佳自由能从 G 所需的 - 42.40Kcal/mol 减低至 C 所需的 - 39.60Kcal/mol，表明 G 等位基因的二级结构比 C 变异等位基因的二级结构稳定。假设前体 miRNAs 的遗传变异可改变其二级结构的构型，从而改变成熟 miRNAs 的表达。当我们将包含 G 或 C 等位基因的 miR-146a 前体克隆至 pcDNA3.3，并将 pcDNA3.3 转染至 MCF-7 乳腺癌细胞系，并运用 Taqman 荧光探针的 miRNA 分析来检测成熟 miR-146a 的表达水平时，发现 C 等位基因的成熟 miR-146a 的表达水平显著高于 G 等位基因（P＝0.013）（图 1）。C 等位基因的成熟 miR-146a 的表达水平比 G 等位基因的表达水平高 60%，这表明 miR-146a 的这一多态性能改变成熟 miRNA 的表达。

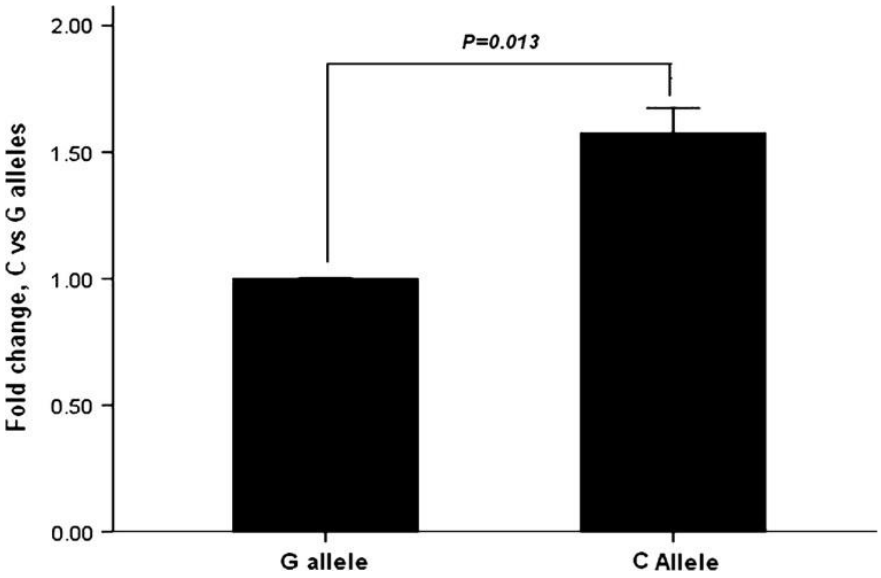

图 1. 实时定量 PCR 检测转染 pcDNA3.3-miR-146G 或 pcDNA3.3-miR-146C 的细胞中成熟 miR-146a 的表达。实验数据为 3 次独立实验获得的平均值（±标准差）。实验数据通过 tRNA 校正。

运用靶位点的可接受性预测公式得出的相互作用的可能性，我们预测出 miR-146a 的靶基因为 BRCA1 和 BRCA2。补充图 2（可从 Carcinogenesis Online 获取）描述了预测的 miR-146a 与 BRCA1 及 BRCA2 3' UTRs 的结合情况。为了用实验方法证实 miR-146a 与 BRCA1/2 之间的相互作用，我们应用靶点体外实验来评价 miR-146a 与 BRCA1、BRCA2 的 mRNAs 3' UTRs 之间的相互作用。首先将 BRCA1 或 BRCA2 的 3' UTR 片段克隆入 pMIR-REPORT™ miRNA 表达报告载体（Applied Biosystems），并将 pMIR-REPORT™-BRCA1 和 pMIR-REPORT™-BRCA2 分别单独或分别与 pcDNA3.3-miR-146a 一起转染进入 MCF-7 细胞系，G 和 C 等位基因均被纳入研究。48 小时后我们观察到，相较于只转染了 pMIR-REPORT™-BRCA1 或 pMIR-REPORT™-BRCA2 的细胞，转染了 pcDNA3.3-miR-146a 和 pMIR-REPORT™-BRCA1 或 pcDNA3.3-miR-146a 和 pMIR-REPORT™-BRCA2 的细胞的荧光素酶活性显著减低，表明 miR-146a 能在体外与 BRCA1 或 BRCA2 mRNAs 的 3' UTRs 结合（图 2）。

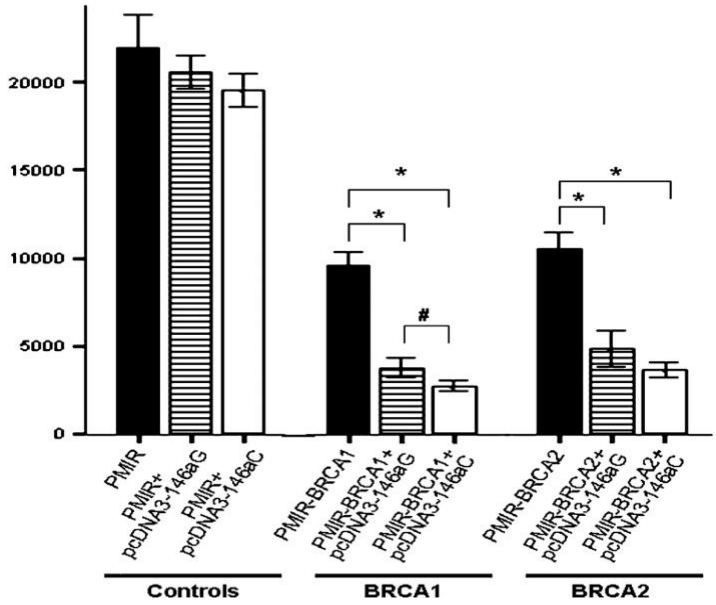

图 2. miR-146a 对载有来自 BRCA1 或 BRCA2 3’非翻译区片段的荧光素酶报告基因的作用

上图为 3 组实验结果。第 1 组实验中， 20 nM pMIR-REPORT™ 报告载体被单独（柱 1）转染进入 MCF7 细胞或与（柱 2）20 nM pcDNA3.3-miR-146G 一起转染入细胞或与（柱 3）20 nM pcDNA3.3-miR-146C 一起转染入细胞。第 2 组实验中，20 nM pMIR-REPORT™-BRCA1 被单独（柱 4）转染入 MCF7 细胞或与（柱 5）20 nM pcDNA3.3-miR-146G 一起转染入细胞或与（柱 6）20 nM pcDNA3.3-miR-146C 一起转染入细胞。第 3 组实验中，20 nM pMIR-REPORT™-BRCA2 被单独（柱 7）转染入 MCF7 细胞或与（柱 8）20 nM pcDNA3.3-miR-146G 一起转染入细胞或与（柱 9）20 nM pcDNA3.3-miR-146C 一起转染入细胞。误差线代表三个独立实验的标准差。双侧计算得出 P 值，两样本 t 检验，※P＜0.001，#P＜0.05。

相对于只转染了 pMIR-REPORT™-BRCA1 的细胞而言，转染了 pMIR-REPORT™-BRCA1 和 pcDNA3.3-miR-146aG 的细胞荧光素酶活性减低了 60.9%（平均荧光素酶活性：3743 比 9571；*P*＝0.001）。相对于只转染了 pMIR-REPORT™-BRCA1 的细胞而言，转染了 pMIR-REPORT™-BRCA1 和 pcDNA3.3-miR-146aC 的细胞荧光素酶活性减低了 71.6%（平均荧光素酶活性：2719 比 9571；*P*＝0.001）。变异 C 等位基因中 miR-146a 和 BRCA1 3’ UTR 的结合能力在统计学上显著高于常见 G 等位基因（平均荧光素酶活性：2719 比 3743；*P*＝0.046）。在 BRCA2-结合分析中，相对于只转染了 pMIR-REPORT™-BRCA2 的细胞而言，转染了 pMIR-REPORT™-BRCA2 和 pcDNA3.3-miR-146aG 的细胞荧光素酶活性减低了 54%（平均荧光素酶活性：4846 比 10541；P＝0.002）。与只转染了 pMIR-REPORT™-BRCA2 的细胞比较，转染了 pMIR-REPORT™-BRCA2 和 pcDNA3.3-miR-146aC 的细胞荧光素酶活性减低了 54%（平均荧光素酶活性：3649 比 10541；P＝0.001）。然而，miR-146a 与 BRCA2 的 3’UTR 的结合能力在 G 与 C 等位基因之间无显著差异（平均荧光素酶活性：4846 比 3649；*P*＝0.145）。在对照实验中，单独转染了 pMIR-REPORT™ 报告对照载体的细胞与转染了 pMIR-REPORT™ 报告对照载体和 pcDNA3.3-miR-146aG（*P*＝0.289）或 pcDNA3.3-miR-146aC（*P*＝0.108）的细胞之间的荧光素酶活性无统计学差异。

讨论

miRNAs 可调节至少 50%的人类基因，包括肿瘤抑制基因如 BRCA1、BRCA2、p53 和 PTEN。因为 miRNA 有着特别的作用途径，即以大量重要的功能性蛋白质编码基因为靶标，那么我们可以假设 miRNA 基因的遗传变异和/或它们的靶位 mRNA 的反应元件的遗传变异可能代表一种新型的肿瘤易感性描述机制。此次研究的结果完全支持这个假设。我们发现 miR-146a 基因（rs2910164）的

遗传多态性与低龄的家族性乳腺癌/卵巢癌诊断年龄有关。miR-146a 前体的 G 到 C 的突变致使成熟 miR-146a 的表达提升。在进一步的分析中，我们发现 rs2910164 与低龄的家族性乳腺癌/卵巢癌诊断年龄之间的联系可能是通过调节 BRCA1/2 mRNA 的表达来实现的。

已报道 miR-146a 的过表达是乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌的特异性标志[6]。在基于基因芯片的 miRNA 表达分析中，相比于正常乳腺组织的 miR-146a，乳腺癌组织的 miR-146a 明显上调。miR-146 的高表达也与甲状腺乳头状癌有关。miR-146a 的上调对应于 KIT 转录和 Kit 蛋白的急剧下降，KIT 基因是甲状腺肿瘤发生途径的一个关键的抑癌基因。另外，有研究称 miR-146a 能调节肿瘤坏死因子受体相关的因子 6 和白介素-1 受体相关的激酶 1[10]。肿瘤坏死因子受体相关的因子 6 和白介素-1 受体相关的激酶 1 都是在细胞增殖和免疫识别中起重要作用的信号转导途径中 Toll 样受体和细胞因子受体重要的适配分子下游。着眼于 rs2910164 与乳腺癌和卵巢癌的侵袭性生物学特征的联系可能会很有趣。遗憾的是，这些病人的临床数据都无法获得。

据观察，序列改变所致的 miRNA 前体二级结构的干扰可影响 miRNA 的成熟过程[4,11]。例如，在茎区域的 G:C 碱基对被 U:C 错配碱基对代替时，成熟 miR-125a 的表达减低[4]。此外，在 miR-30 前体和 miR-2 前体的茎区引入人为的突变，揭示了茎区域的大凸起对 miRNA 的形成是不利的[11]。与这些观察结果相反，我们发现 G 到 C 的突变使前体 miR-146a 茎区域的 G:U 错配为 C:U 时，成熟 miR-146a的产量增加。本文的研究结果与他们的研究结果之间的差异十分耐人寻味。遗传变异可影响成熟 miRNA 表达的分子机制还有待确定。其他一些因素也可能影响遗传变异与成熟 miRNA 表达之间的关系，比如，变异在茎环结构中的位置，核苷酸之间的结合强度等。显然，进一步研究生物学机制是十分必要的。

当前所知的高危乳腺癌或卵巢癌基因（如 BRCA1/2）中的突变在家族性乳腺癌和卵巢癌中很常见，但是它们能解释乳腺癌中至多 20-25%增加的家族风险性，且只有一半的卵巢癌家族聚集性是由于这些突变，这预示其他未知易感基因的存在可能授予个体易感性。鉴定新的遗传易感性基因的传统方法着眼于蛋白编码基因，非蛋白质编码基因所致的遗传易感性常常被忽略，如 miRNAs。已经有预测认为 miR-146a 能调控乳腺癌/卵巢癌的重要基因 BRCA1 和 BRCA2。与预测一致，在我们的靶标体外实验中，观察到 miR-146a 能直接结合到 BRCA1/2 的 3’ UTR，从而潜在调控 BRCA1/2 mRNAs 的表达。更有趣的是，观察到 miR-146a 和 BRCA1 3’ UTR 的结合能力在常见等位基因与异常等位基因间有显著差异，转染了异常 C 等位基因的细胞系比转染了 G 等位基因的细胞系有更强的结合能力。与我们的观察一致，实验结果显示异常 C 等位基因比常见 G 等位基因有更高的成熟 miR-146a 表达水平。综合本文的实验数据，我们提出了一个新的模型，即 miR-146a 可能通过调节 BRCA1 mRNA 的表达在家族性乳腺癌和卵巢癌中发挥重要作用，且 miR-146a 的功能性遗传变异能改变成熟 miR-146a 的表达，因此也影响了乳腺癌和卵巢癌的诊断年龄。令人惊讶的是，我们并没有在 BRCA2 结合实验中观察到等位基因之间的显著差异。不论是常见等位基因还是变异等位基因，miR-146a 与 BRCA1 的结合能力强于与 BRCA2 的结合能力。较强的结合能力有助于差异的检测，这有可能是我们没有观察到 BRCA2 结合中等位基因间差异的原因之一，但我们也不能排除其他的影响因素。

因为我们研究的问题是寻找 miR-146a 多态性与发病年龄之间的联系，所以我们适当选择了患有家族性乳腺癌和家族性卵巢癌的病人。家族性病例的年龄差异比散发病例更为明显，然而我们病例的选择限制了我们在散发病例中进行相同的研究。由于此次研究缺乏对照人群，所以此遗传变异对于家族性乳腺癌/卵巢癌风险的作用无法评定。考虑到此变异对家族性癌症发病年龄有显著影响，我们推测它可能对家族性乳腺癌/卵巢癌的患病风险产生影响，但这一假设仍需被证实。此外，研究对癌症诊断年龄和癌症风险的影响在家族性和散发性乳腺癌/卵巢癌间有无差异将会是很有趣的研究。散发性癌症患者通常年长于家族性癌症患者，变异是否影响散发性癌症患者的发病年龄还有待证实，不过迄今为止还没有任何可用数据。科学家们可能考虑将携带有 BRCA1/2 突变的乳腺癌患者列为研究对象。若突变发生在 miR-146a 的结合靶点，那么 BRCA1/2 与 miR-146a 间的相互作用也可能会受到显著影响，这一点在本次研究中没有涉及。我们检测了全部 31 个患者的突变信息，这些患者都携带有 BRCA1/2 突变，但没有一个人的突变是发生在 3’UTR 中的 miR-146a 结合位点上的。

这是首次报告 miRNA 基因遗传变异与家族性乳腺癌/卵巢癌发病年龄之间的关系。由于样本量限制和体外功能性检测的性质，在解释实验数据时需谨慎。进一步大量的研究和先进的体内分子检测对于确证我们的发现是必须的，特别需要大量基于家族和人群的病例对照研究，来探讨这个遗传变异对家族性乳腺癌和卵巢癌风险的作用。虽然如此，我们的发现强调了 miRNA 基因自然遗传变异的意义，为 miRNA 多态性和人类疾病之间联系的进一步研究奠定了基础。

参考文献

[1] Lichtenstein P, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analysis of cohorts of twin from Sweden, Denmark, and Finland. N. Engl J. Med. 2000;343:78-85.

[2] Calin GA, et al. MicroRNA signatures in human cancers. Nat. Rev. Cancer. 2006;6:857-866.

[3] Calin GA, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N. Engl J. Med. 2005;353:1793-1801.

[4] Duan R, et al. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. Hum. Mol. Genet. 2007;16:1124-1131.

[5]Sevignani C, et al. MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007;104:8017-8022.

[6] Volinia S, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors define cancer gene targets. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006;103:2257-2261.

[7] Iwai N, et al. Polymorphisms in human pre-miRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005;331:1439-1444.

[8] Kertesz M, et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat. Genet. 2007;39:1278-1284.

[9].He H, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005;102:19075-19080.

[10] Taganov KD, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA mir-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006;103:12481-12486.

[11] Zheng Y, et al. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. RNA 2003;9:112-123.

Carcinogenesis vol.29 no.10 pp.1963–1966, 2008
doi:10.1093/carcin/bgn172
Advance Access publication July 27, 2008

A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis

A G to C polymorphism (rs2910164) is located within the sequence of miR-146a precursor, which leads to a change from a G:U pair to a C:U mismatch in its stem region. The predicted miR-146a target genes include BRCA1 and BRCA2, which are key breast and ovarian cancer genes. To examine whether rs2910164 plays any role in breast and/or ovarian cancer, we studied associations between this polymorphism and age of diagnosis in 42 patients with familial breast cancer and 82 patients with familial ovarian cancer. Breast cancer patients who had at least one miR-146a variant allele were diagnosed at an earlier age than with no variant alleles (median age 45 versus 56, P 5 0.029) and ovarian cancer patients who had at least one miR-146a variant allele were diagnosed younger than women without any variant allele (median age 45 versus 50, P 5 0.014). In further functional analysis, we found that the variant allele displayed increased production of mature miR-146a from the precursor microRNA compared with the common allele. Consistent with the target prediction, in a target in vitro assay, we observed that miR-146a could bind to the 3# untranslated regions (UTRs) of BRCA1 and BRCA2 messenger RNAs (mRNAs) and potentially modulate their mRNA expression. Intriguingly, the binding capacity between the 3# UTR of BRCA1 and miR-146a was statistically significantly stronger in variant C allele than those in common G allele (P 5 0.046). Taken together, our data suggest that breast/ovarian cancer patients with variant C allele miR-146a may have high levels of mature miR-146 and that these variants predispose them to an earlier age of onset of familial breast and ovarian cancers.

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding $22 nucleotide RNAs, which suppress gene expression in a sequence-specific manner (1). Because of the particular way in which miRNA functions—by targeting a number of functionally important protein-coding genes—it is hypothesized that genetic variations in miRNA genes, if inherited in the germ line, could affect the levels of expression of tumor suppressor genes or oncogenes and, thereby, cancer risk (2). These genetic variations could have important consequences for the cell because of the large number of targets of each miRNA, making it very likely that two or more protein-coding genes from different molecular pathways or interacting pathways may be disturbed. Several lines of evidence support a role for genetic variants in miRNA genes in affecting the processing and/or target selection of human miRNAs and thereby cancer risks (3–5). For example, Calin et al. (3) reported a germ line mutation in the pre-miR-16-1/15a precursor in a chronic lymphocytic leukemia patient with familial chronic lymphocytic leukemia and breast cancer in first-degree relatives. This germ line mutation caused low levels of miRNA expression in vitro and in vivo and was associ-ated with deletion of the normal allele. They also found another germ line mutation in the pre-miR-206 in a patient with chronic lymphocytic leukemia and prostate cancer with strong family history of can-cer (esophageal cancer diagnosed in the mother, prostate cancer diagnosed in the brother and breast cancer diagnosed in the sister). This germ line mutation caused low levels of miRNA expression in vitro and in vivo. Misexpression of miR-146a has been observed in breast tumor tissues (6). A G . C polymorphism (rs2910164) has been identified in the miR-146a precursor, which results in a change from a G:U pair to a C:U mismatch in its stem region (7). To date, the biomedical significance of this polymorphism is undetermined. Using probability of interaction by target accessibility (8), a parameter-free thermodynamic model to predict targets for miRNAs, we found that both BRCA1 and BRCA2 are potential targets for miR-146a. BRCA1 and BRCA2 are two most important

genetic susceptible genes in familial breast and ovarian cancers. Inherited variations in miRNAs may be extremely relevant for breast or ovarian cancer as family history has consistently been regarded as a major risk factor for these diseases. Therefore, in this study, we explored the role of the miR-146a polymorphism (rs2910164) in familial breast and ovarian cancers and further elucidated the biological function of this polymorphism.

Abbreviations: mRNA, messenger RNA; miRNA, microRNA; PCR, polymerase chain reaction; UTR, untranslated region.

Materials and methods

Study population

This study included genomic DNA samples from lymphocytes of 42 nonrelated probands from families with inherited breast cancer and from 82 non-related probands from families with inherited ovarian cancer. The DNA samples from breast cancer patients were obtained from Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). Among them, there were 40 women and 2 men, with a racial distribution of 35 White, 4 Black and 3 unknown. The age at cancer diagnosis ranged from 30 to 78; 23 of the patients were BRCA1 mutation carriers, 8 had BRCA2 mutations and 11 were non-carriers of BRCA1/2 mutations. The ovarian cancer DNA samples were obtained from the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry from non-related probands from families with inherited ovarian cancer in which at least two first- or seconddegree relatives had epithelial ovarian cancer diagnosed at any age. All the samples were from White women, who were non-carriers of BRCA1/2 or MLH1/MSH2 mutations, with age at diagnosis ranging from 25 to 83 years.

Genotyping

Genotypes were analyzed by direct DNA sequencing. A 192 bp fragment containing the pre-miR-146a region and polymorphism site (rs2910164) was amplified using the following primers: 5'-CCGATGTGTATCCTCAGCTTTG- 3' and 5'-GCCTGAGACTCTGCCTTCTG-3'. The polymerase chain reaction (PCR) cycling conditions for the assay were 94 ℃ for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s with a final extension step at 72 ℃ for 7 min. The amplified PCR products were sequenced using the dideoxynucleotide chain termination method. Both strands of the amplified PCR products were sequenced with an ABI-PRISM 3730xl Autosequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the Roswell Park Cancer Institute Biopolymer Core. For quality control, random duplicate samples (5%) were run for each sequence analysis.

miRNA cloning, expression and detection

To study the effect of polymorphism on expression levels of mature miR-146a, we inserted the 192 bp DNA fragment containing precursor of miR-146a with GG or CC genotype into pcDNA3.3 mammalian expression plasmid (Invitro- gen, Carlsbad, CA) by using pcDNATM3.3-TOPOÒ TA CloningÒ Kit. The insertion and orientation of the fragment were confirmed by sequence analysis. The yielded plasmids were named pcDNA3.3-miR-146G and pcDNA3.3-miR-146C, respectively. The pcDNA3.3-miR-146G or pcDNA3.3-miR-146C was transfected into MCF-7 breast cancer cell line using DOTAP Liposomal Transfection Reagents (Roche, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's recommendations. After 48 h, miRNAs were isolated using mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems). The expression levels of matureMiR-146a were measured by Taqman-based microRNA assays (Applied Biosystems) with the use of the ABI StepOne System (Applied Biosystems). The relative amount of each miRNA to tRNA for initiator methionine was described using the equation 2ÀdCT, where dCT 5 (CTmiRNA À CTU6). Each experiment was triplicated and the mean of the triplicates was used.

Target in vitro assay

Luciferase-based target in vitro assay was applied to test whether miR-146a could bind to the 3'untranslated region (UTR) of BRCA1 or BRCA2 messenger RNA (mRNA). The 3'UTR segments of BRCA1 and BRCA2 mRNAs predicted to interact with miR-146a were amplified by PCR from human genomic DNA. A 544 bp fragment of the 3# UTR segment of BRCA1 was amplified using the following primers: 5'-CTGCTTGAAGTCTCCCTTGG-3' and 5'-CACCATGACCGGCTAATTTC-3', and a 698 bp fragment of the 3' UTR segment of BRCA2 was amplified using the following primers: 5'-GCCCGATTCCGTATTGGTAT-3' and 5'-TTTGGATGACCATTTTGTTGA-3'. Both PCR fragments were inserted into pMIR-REPORTTM miRNA Expression Reporter Vector (Applied Biosystems), using the PmeI site immediately downstream from the stop codon of the luciferase gene. The insertion and orientation of the fragment were confirmed by sequence analysis. The yielded plasmids were named pMIR-REPORTTM-BRCA1 and pMIR-REPORTTM-BRCA2, respectively. Then, pMIR-REPORTTM-BRCA1/2 was transfected into the MCF-7 breast cancer cell line with or without pcDNA3.3-miR-146a using DOTAP Liposomal Transfection Reagents according to the manufacturer's recommendations. Both G and C alleles were used in the analyses. Luciferase activities were measured by using luciferase assays (Promega, Madison, WI) 48 h after transfection. The levels of interaction between BRCA1/2 and miR-146a were determined by the difference of luciferase activities between cells cotransfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1/2 and pcDNA3.3-miR-146a and cells transfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1/2 alone. Each experiment was triplicated and the mean of the triplicates was used.

Statistical analysis

The non-parametric Wilcoxon rank-sum test was used to compare age at diagnosis of breast or ovarian cancer between miR-146a genotype strata. Linear regression analysis was performed to further investigate the relationship between age at diagnosis of breast or ovarian cancer and miR-146a genotypes by adjusting for gender, BRCA1/2 status and ethnicity simultaneously. Student's t-test was used to compare mean expression levels for significant differences between the G and C alleles of miR-146a in miRNA expression assay and compare the mean luciferase activities between cells cotransfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1/2 and pcDNA3.3-miR-146a and cells transfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1/2 alone. A P value ,0.05 was considered statistically significant, and all statistical tests were two sided. All analyses were performed using STATA software (Version 9.0, STATA, College Station, TX).

Results

Because inherited cancers are more likely to be diagnosed at a younger age, we examined the relationships between genetic polymorphism in miR-146a and the age of cancer diagnosis (Table I). The frequency of the variant C allele was 0.286 in breast cancer patients and 0.238 in ovarian cancer patients. In the breast cancer study, there was a gene dosage effect on age at diagnosis, with a median age at diagnosis of 56 for patients with GG genotypes, 46 years for those with GC genotypes and 43 for patients with CC genotypes. Compared with patients with GG genotypes, those with GC or CC genotypes had marginally significantly younger age at diagnosis after adjusting for BRCA1/2 status, gender and ethnicity. When we combined GC and CC groups together, we found that those with at least one C allele had significantly younger age at diagnosis compared with those with GG genotype (P 5 0.029) after adjusting for BRCA1/2 status, gender and ethnicity. Similar relationships were observed for ovarian cancer, with a median age at diagnosis of 50 years for women with GG genotypes, 41 for those with GC genotypes and 43 for women with CC genotypes. When we combined GC and CC groups together, we found that patients with at least one C allele had

significantly younger age at diagnosis compared with those with GG genotype (P 5 0.014). Furthermore, significant trends of decreasing age at cancer

Table I. Genetic variant in miR-146a and age of cancer diagnosis

Genotypes	n	Median age at diagnosis (range)	P value
Breast cancer patients			
GG	22	56 (32–79)	Reference
GC	16	46 (36–68)	0.062
CC	4	43 (30–57)	0.095
GC þ CC	20	45 (30–68)	0.029
Ovarian cancer patients			
GG	50	50 (26–83)	Reference
GC	25	41 (21–69)	0.026
CC	7	43 (25–52)	0.16
GC þ CC	32	45 (21–69)	0.014

diagnosis with increasing number of C variant alleles were observed in both breast and ovarian cancer patients (P 5 0.022 for breast cancer and P 5 0.016 for ovarian cancer). This genetic variant is located in the middle of the stem hairpin and creates a base pairing mismatch (supplementary Figure 1 is available at Carcinogenesis Online). The optimal free energy was decreased from À42.40 Kcal/mol for G to À39.60 Kcal/mol for C alleles, suggesting a less stable secondary structure for the C variant allele compared with the G allele. It is hypothesized that genetic variants in pre-miRNAs might change the conformation of the secondary structure and thereby alter the expression of mature miRNAs. When we cloned the precursor of miR-146a containing G or C allele into pcDNA3.3, transfected the constructs into MCF-7 breast cancer cell lines and measured expression levels of mature miR-146a by Taqman-based miRNA assays, we found that the expression levels of mature miR-146a in C allele were significantly higher than those in G allele (P 5 0.013) (Figure 1).

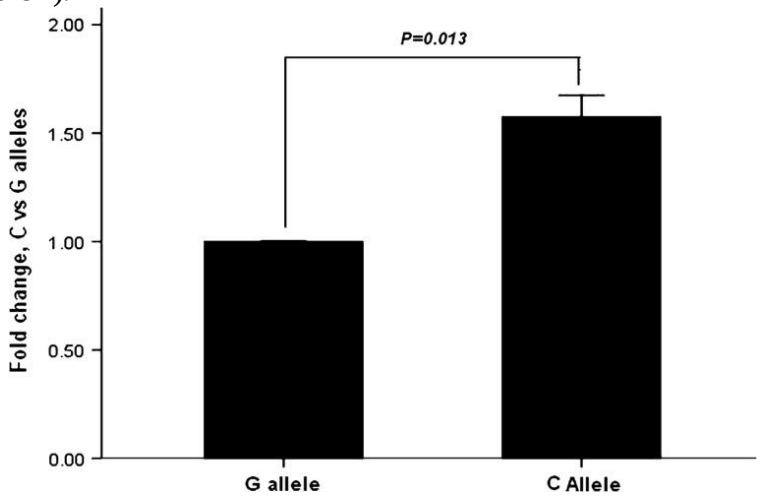

Fig. 1. Real-time quantitative PCR for mature miR-146a expression in the cells transfected with pcDNA3.3-miR-146G or pcDNA3.3-miR-146C. Data are means (±SDs) from three independent experiments. Data are normalized with reference tRNA, as mentioned in the text. P value was calculated from a two-sided, one-sample t-test.

The expression levels of mature miR-146a were 60% higher in C allele than G allele, suggesting that this polymorphism in miR-146a could alter the mature miRNA expression.

Using the probability of interaction by target accessibility prediction algorithm, BRCA1 and BRCA2 were predicted as targets of miR-146a. The predicted binding between miR-146a and the 3' UTRs of BRCA1 and BRCA2 are depicted in supplementary Figure 2 (available at Carcinogenesis Online). To experimentally confirm the interaction between miR-146a and BRCA1/2, we applied target in

vitro assay to assess the interaction between miR-146a and the 3' UTRs of BRCA1 and BRCA2 mRNAs. We cloned fragments of 3' UTR segments of BRCA1 or BRCA2 into pMIR-REPORTTM miRNA Expres- sion Reporter Vector (Applied Biosystems). Then, we transfected pMIR-REPORTTM-BRCA1 and pMIR-REPORTTM-BRCA2 into MCF-7 cell lines with or without pcDNA3.3-miR-146a. Both G andC alleles of miR-146a were used in the analyses. After 48 h, we observed significant reduction of luciferase activity in the cells transfected with both pcDNA3.3-miR-146a and pMIR-REPORTTM-BRCA1 or pMIR-REPORTTM-BRCA2 compared with the cells transfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1 or pMIR-REPORTTM-BRCA2 alone, indicating that miR-146a could bind to the 3' UTRs of BRCA1 and BRCA2 mRNAs in vitro (Figure 2). Compared with the cells transfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1 alone, the cells cotransfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1 and pcDNA3.3-miR-146aG had 60.9% decreased luciferase activities (mean luciferase activities: 3743 versus 9571; P 5 0.001). Compared with the cells transfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1 alone, the cells cotransfected with pMIR-REPORTTM-BRCA1 and pcDNA3.3-miR-146aC had 71.6% decreased luciferase activities (mean luciferase activities: 2719 versus 9571; P 5 0.001). The binding capacity between miR-146a and the 3' UTR of BRCA1 was statistically significantly higher in variant C allele than those in common G allele (mean luciferase activities: 2719 versus 3743; P 5 0.046). In BRCA2-binding analysis, compared with the cells transfected with pMIR-REPORTTM-BRCA2 alone, the cells cotransfected with pMIR-REPORTTM-BRCA2 and pcDNA3.3-miR-146aG had 54% decreased luciferase activities (mean luciferase activities: 4846 versus 10 541; P 5 0.002). Compared with the cells transfected with pMIR-REPORTTM-BRCA2 alone, the cells cotransfected with pMIR-REPORTTM-BRCA2 and pcDNA3.3- miR-146aC had 54% decreased luciferase activities (mean luciferase activities: 3649 versus 10 541; P 5 0.001). However, the binding capacity between miR-146a and the 3' UTR of BRCA2 was not

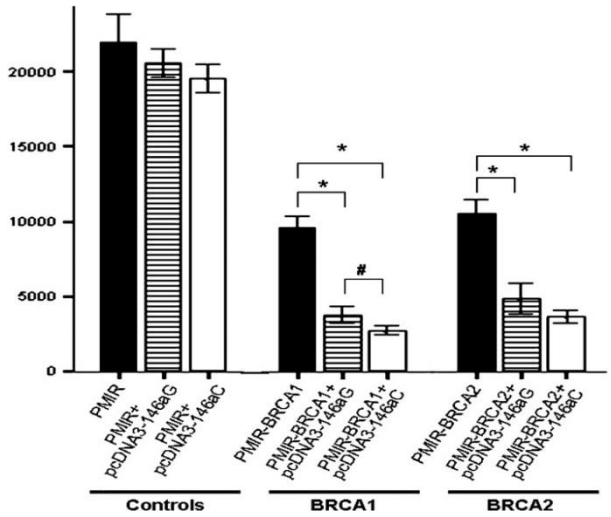

Fig. 2. Effects of miR-146a on the luciferase reporter gene bearing 3' UTR segments from the BRCA1 or BRCA2 3' UTR. Three sets of experiments are presented. In the first set, MCF7 cells were transfected with 20 nM pMIR-REPORTTM reporter vector without (bar 1) or with (bar 2) 20 nM pcDNA3.3-miR-146G or with (bar 3) pcDNA3.3-miR-146C. In the second set, MCF7 cells were transfected with 20 nM pMIR-REPORTTM-BRCA1 without (bar 4) or with (bar 5) 20 nM pcDNA3.3-miR-146G or with (bar 6) pcDNA3.3-miR-146C. In the third set, MCF7 cells were transfected with 20 nM pMIR-REPORTTM-BRCA2 without (bar 7) or with (bar 8) 20 nM pcDNA3.3-miR-146G or with (bar 9) pcDNA3.3-miR-146C. Error bars indicate 1 SD of three independent experiments. P value was calculated from a two-sided, two-sample t-test. ※ P ＜0.001 and #P ＜0.05.

significantly different between G and C alleles (mean luciferase activities: 4846 versus 3649; P = 0.145). In control experiment, the luciferase activities were not statistically different between cells transfected with pMIR-REPORTTM reporter control vector with or without pcDNA3.3-miR-146aG (P = 0.289) or pcDNA3.3-miR-146aC (P = 0.108).

Discussion

It has been estimated that miRNAs can regulate at least 50% of human genes, including tumor suppressor genes such as BRCA1, BRCA2, p53 and PTEN. Because of the particular way in which miRNA functions, by targeting a number of functionally important protein-encoding genes, it is appealing to propose that genetic variations in miRNA genes and/or their responsive elements in their target mRNA might represent a newly described mechanism of cancer predisposition. The results from this study fully support this hypothesis. We found that the genetic polymorphism in the miR-146a gene (rs2910164) was associated with young age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. This G to C change in the precursor of miR-146a resulted in elevated expression of mature miR-146a. In further analysis, we found that the link between rs2910164 and young age of breast/ovarian cancer diagnosis might be through regulation of BRCA1/2 mRNA expression. Overexpression of miR-146a has been reported as a signature in breast, pancreatic and prostate cancers (6). In a microarray-based miRNA expression analysis, miR-146a was significantly upregulated in breast carcinoma tissues compared with normal breast tissues (6). miR-146 overexpression has also been linked to papillary thyroid carcinoma (9). Upregulation of miR-146a corresponded to dramatic loss of KIT transcript and Kit protein, a key tumor suppressor gene in the thyroid carcinogenesis pathway. In addition, miR-146a has been reported to regulate tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 and interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (10). Both tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 and interleukin-1 receptor- associated kinase 1 are key adapter molecules downstream of the Toll-like and cytokine receptors in the signaling pathway that plays a crucial role in cell growth and immune recognition. It might be interesting to look at the links between rs2910164 and the invasive biological features of breast and ovarian cancers. Unfortunately, the clinical data are not available for these patients. It has been observed that the disturbance of the secondary structure of miRNA precursor by sequence variations may affect the maturation process of miRNA (4,11). For example, the expression of mature miR-125a is decreased when a G:C match is replaced by a U:C mismatch in the stem region (4). Furthermore, introduction of an artificial mutation to the stems of miR-30 and miR-21 precursors revealed that large bulges in the stem regions were detrimental to the production of miRNA (11). In contrast to these observations, we found the G to C variation causes a change from a G:U pair to a C:U mismatch in its stem region of miR-146a precursor and results in increased production of mature miR-146a. The discrepancy between our study and other studies is intriguing. The molecular mechanism of how genetic variants might affect the mature miRNA expression remains to be determined. Some other factors might affect the relationship between genetic variations and mature miRNA expression, such as, the location of the variants in the stem–loop structure, the strength of the binding between nucleotides, etc. Obviously, further studies on the biological mechanisms are warranted. Germ line mutations in the currently known high-risk breast or ovarian cancer genes (such as BRCA1/2) are common in familial breast and ovarian cancers, but they can explain, at best, 20–25% of the overall excess familial risk in breast cancer and half of the familial aggregation of ovarian cancer, suggesting the presence of other unidentified predisposition genes which confer susceptibility. Traditional approaches to identification of novel genetic predisposition genes focus on protein-encoding genes. The genetic susceptibility by non-protein-encoding genes, such as miRNAs, is often overlooked. miR-146a has been predicted to regulate the

key breast/ovarian cancer genes BRCA1 and BRCA2. Consistent with the prediction, in our target in vitro assay, we observed that miR-146a could directly bind to the 3' UTR of BRCA1/2 and thereby potentially regulate the expression of BRCA1/2 mRNAs. More interestingly, we observed that the binding capacity between miR-146a and the 3# UTR of BRCA1 was significantly different between common and variant alleles. The binding capacity was stronger in cell lines transfected with variant C allele compared with those transfected with G allele. The results are consistent with our observation that the variant C allele exhibited higher levels of mature miR-146a than the common G allele. Putting all these pieces of evidence together, our data suggest a model how miR-146a might play a role in familial breast and ovarian cancer through regulation of BRCA1 mRNA expression, and a functional genetic variant in miR-146a can alter expression of mature miR-146 and thereby affect the age of breast and ovarian cancer diagnosis. Surprisingly, we did not observe the significant allelic discrepancy for BRCA2 binding. The binding capacity of miR-146a is stronger for BRCA1 than BRCA2, regardless of the common or variant alleles. It might be easier to detect the difference if the binding capacity is strong. This might be one of the reasons we did not see the allelic discrepancy for BRCA2 binding. However, we cannot rule out other possible factors. Selection of patients with familial breast and ovarian cancer in this study is appropriate because our research question is to seek the association between miR-146a polymorphism and age of onset. The age effect usually is more evident in familial cases than sporadic cases. However, our case selection limits our ability to test the same questions in sporadic cases. Due to the lack of a control population in this study, the contribution of this genetic variant to familial breast/ovarian cancer risks cannot be assessed. Considering the significant effect of this variant on age of familial cancer onset, we might assume that it will have an impact on the risks of familial breast/ovariancancers. However, the assumption needs to be determined. Further-more, it would be interesting to investigate whether the effect on age of cancer diagnosis and cancer risks differs between familial and sporadic breast and ovarian cancers. Patients with sporadic cancers are generally older than those with familial cancers. Whether or not the variant affects age of onset in sporadic cancer remains to be determined. So far, there are no data available. There might be a concern to include breast cancer patients with BRCA1/2 mutation in the analysis. If the mutations occur at the binding sites for miR-146a, the interaction between BRCA1/2 and miR-146a will be significantly affected. However, this is not the case in this study. We checked the mutation information for all 31 patients who are carriers of BRCA1/2 mutations. None of these mutations occur at the 3# UTR-binding sites for miR-146a. This is the first report showing the relationship between genetic variants in miRNA genes and age of onset of familial breast and ovarian cancers. The data need to be interpreted with caution because of the small sample size and the nature of in vitro functional assays. Future large studies and advanced in vivo molecular assays are warranted to confirm our findings. Especially, large family- and population-based case–control studies are needed to investigate the roles of this genetic variant in risks of familial breast and ovarian cancers. Nevertheless, our findings underscore the significance of natural genetic variations in miRNA genes and warrant further investigations on the association of miRNA polymorphisms with human diseases.

Supplementary material
Supplementary Figures 1 and 2 can be found at http://carcin.oxfordjournals.org/

Funding
Roswell Park Alliance Foundation

Acknowledgements
Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Lichtenstein,P. et al. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analysis of cohorts of twin from Sweden, Denmark, and Finland. N. Engl J. Med., 343, 78–85.

2. Calin,G.A. et al. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. Nat. Rev. Cancer, 6, 857–866.

3. Calin,G.A. et al. (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N. Engl J. Med., 353, 1793–1801.

4. Duan,R. et al. (2007) Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. Hum. Mol. Genet., 16, 1124–1131.

5. Sevignani,C. et al. (2007) MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 104, 8017– 8022.

6. Volinia,S. et al. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors define cancer gene targets. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 103, 2257–2261.

7. Iwai,N. et al. (2005) Polymorphisms in human pre-miRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 331, 1439–1444.

8. Kertesz,M. et al. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat. Genet., 39, 1278–1284.

9. He,H. et al. (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 102, 19075–19080.

10. Taganov,K.D. et al. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA mir-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 103, 12481–12486.

11. Zheng,Y. et al. (2003) Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. RNA, 9, 112–123.