



DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.014

<http://www.gjbl.net/gjblx/fileup/PDF/201306520.pdf>

MiRNA基因及miRNA相关基因单核苷酸多态性与肿瘤易感性

涂超峰¹, 肖岚^{1,2}, 武明花^{1,2}, 李桂源¹ 综述

(1.中南大学肿瘤研究所, 卫生部癌变原理重点实验室, 教育部癌变与侵袭原理重点实验室, 长沙 410078;

2.湖南省颅底外科与神经肿瘤临床医学技术研究中心, 长沙 410078)

[摘要] MicroRNAs (miRNAs) 是一类进化上高度保守的重要的转录后调控因子, 通过调节基因的表达而参与调控细胞死亡、增殖及分化等生理过程, 同时与肿瘤等疾病的发生、发展密切相关。随着miRNAs基因以及靶基因结合位点的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和miRNA相关基因SNP的生物预测和筛选技术的不断成熟, 以及下一代测序技术在肿瘤基因组研究中的广泛应用, 将发现大量新的miRNAs基因的SNP位点, 这些miRNAs基因以及靶基因结合位点的SNP和miRNA相关基因的SNP与肿瘤等复杂疾病的易感及预后密切相关, 通过检测miRNAs基因SNP或靶基因结合位点SNP或miRNA相关基因的SNP位点, 即可进行肿瘤发病风险的判断和预后预测。

[关键词] microRNA; 单核苷酸多态性; 基因多态性; 下一代测序技术

MiRNA and miRNA related-gene's single nucleotide polymorphism and tumor susceptibility

TU Chaofeng¹, XIAO Lan^{1,2}, WU Minghua^{1,2}, LI Guiyuan¹

(1. Cancer Research Institute of Central South University, Key Laboratory of Carcinogenesis of Ministry of Health, Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion of Ministry of Education, Changsha 410078; 2. Center for Skull Base Surgery and Neuro-oncology of Hunan Province, Changsha 410078, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are a class of highly evolutionarily conserved and important post-transcriptional regulatory factors, which are involved in most important physiological processes, such as cell death, proliferation, differentiation and cell survival by regulating the expression of genes. MiRNAs are closely related to the development of cancer and other diseases simultaneously. With the maturity of technology in biological prediction and screening for miRNAs genes, single nucleotide polymorphism (SNP) of target gene binding sites and miRNA related SNP as well as the wide application of next-generation sequencing technology in cancer genome, numerous

收稿日期 (Date of reception): 2013-01-23

作者简介 (Biography): 涂超峰, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

通信作者 (Corresponding author): 肖岚, Email: xiaolan16@csu.edu.cn

基金项目 (Foundation items): 国家自然科学基金 (81101541); 湖南省自然科学基金 (11JJ4072)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81101541) and Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China (11JJ4072).

SNP gene sites located on the new miRNA will be identified. These miRNAs genes, SNP of target gene binding sites, miRNA related SNP are closely associated with the susceptibility and survival of tumor, which can be used to predict risk of tumor and forecast prognosis.

Key words mircoRNA; single nucleotide polymorphism; gene polymorphism; next generation sequencing

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指在染色体基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性,是一种很常见的人类可遗传性变异,能够导致肿瘤易感性差异。一系列的最新研究表明:MicroRNA(miRNA)是一种重要的基因调控机制,包括肿瘤在内的多种复杂疾病的发病进程与miRNA表达的失调密切相关,通过对相关疾病 miRNA领域研究的不断深入,miRNA基因及miRNA靶基因结合位点的SNP在肿瘤的发生、发展过程中具有重要的研究价值。

1 MiRNA 基因及 miRNA 相关基因的 SNP

MiRNA(microRNA)是一类小分子非编码RNA,是基因表达的负性调节子,在转录后水平降低靶mRNA的稳定性,或者抑制靶mRNA的翻译^[1]。miRNA分子参与了正常细胞的生长发育、分化、凋亡和应激^[2]。一些miRNA的特异性调节和人类肿瘤的形成密切相关,可以作为癌基因或抑癌基因参与肿瘤的病理发病过程^[3-5]。miRNA基因及miRNA相关基因的SNP可通过影响miRNA及其肿瘤相关基因的生物合成,从而影响肿瘤的易感性及临床转归。

1.1 MiRNA 基因自身的 SNP 与肿瘤的易感性及其预后预测密切相关

MiRNA基因的SNP主要位于初级miRNA转录本(pri-miRNA)、miRNA前体(pre-miRNA)的茎环结构区,甚至是成熟的miRNA序列^[6]。miRNA基因的SNP主要通过影响miRNA的加工过程和/或影响miRNA-mRNA的相互作用而干扰miRNA的调控能力^[7],与肿瘤患者的易感性和预后预测密切相关。Duan等^[8]通过对人类已知的227个miRNA基因进行SNP分析,发现了12个位于pri-miRNA的SNP,其中miR-125a上的SNP明显阻碍了pri-miRNA加工为pre-miRNA的过程。此外,成熟miR-125a的第8个核苷酸存在U/G改变,严重影响了miRNA125a对靶mRNA的识别。位于miR-146a的种子区SNP(rs2910164)可以影响miRNA的成熟,改变miRNA与靶基因的结合关系,影响miRNA与

靶基因的调控而与肿瘤的易感性密切相关。研究表明该位点的SNP与甲状腺乳头状癌、前列腺癌、肝癌和家族性乳腺癌或卵巢癌的早期发病风险密切相关^[9-12]。Smith等^[13]研究发现:miR-423的pre-miRNA上的rs6505162 SNP(A>C)位点的存在与澳大利亚白人妇女的乳腺癌易感性密切相关。Yoon等^[7]通过检测338例完全经过手术切除的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者外周血中5个pre-miRNAs的SNP和pri-miRNAs中的2个SNP位点发现,具有rs2910164和rs11614913 SNP位点的II和III期NSCLC患者具有较好的无复发生存率,表明miR-146a的rs2910164及miR-196a2的rs11614913的SNP与手术后NSCLC的预后密切相关。

1.2 MiRNA 靶基因结合位点的 SNP 与肿瘤的易感性

广泛存在于miRNA结合的靶基因3'端、5'端甚至是编码区序列的SNP也可以导致肿瘤易感。靶基因3'端、5'端的SNP或突变可以导致miRNA与靶基因结合的障碍,虽不会影响蛋白质的合成,但会引起蛋白质的表达异常,增加肿瘤患者的易感性^[14]。Luo等^[14]研究发现:位于同源盒基因HOXB5(homeobox genes B5)基因3'-UTR(3'-untranslated regions)的SNP(1010A/G)位点通过影响miR-7与HOXB5基因3'-UTR结合的稳定性而导致了HOXB5在膀胱癌中的高表达,从而增加了患者患膀胱癌的易感性。与对照组相比,膀胱癌患者中1010G基因型的频率更高,并与膀胱癌的恶性级别进展密切相关。转录激活因子1(activating transcription factor 1, ATF1)基因是miR-320家族靶基因,ATF1基因3'-UTR的SNP(rs11169571)位点严重影响了miR-320家族基因与靶基因的结合,使得患者患乳腺癌和卵巢癌的风险增加2倍^[15]。

1.3 MiRNA 加工相关基因的 SNP 与肿瘤的易感性

一个成熟miRNA的加工包含如下过程:miRNA基因首先由RNA聚合酶II在胞核内转录成长度大于几千个nt的pri-miRNA,然后由Drosha酶剪切成60~70 nt的pre-miRNA。pre-miRNA在输出蛋白(exportin 5)/Ran-GTP的协同作用出核,在胞浆内由Dicer酶进一步剪切成为成熟的miRNA,成熟

的miRNA与Argonaute (Ago)蛋白结合形成RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)发挥调控靶基因的功能。参与上述成熟miRNA加工形成过程中的任何一个基因的SNP均可以引起细胞整体miRNA表达异常,从而增加肿瘤患病的易感性。Horikawa等^[16]对高加索人11个miRNA加工基因(DROSHA, DGCR8, XPO5, RAN, DICER1, TARBP2, AGO1, AGO2, GEMIN3, GEMIN4, HIWI)的SNP进行分析发现:miRNA加工基因的遗传SNP与肾细胞癌的遗传易感性密切相关。其中,GEMIN4基因(the human gem associated protein 4)的两个SNP位点Asn929Asp和Cys1033Arg可以明显降低肾细胞癌的发生风险。Yang等^[17]分析了746对高加索膀胱癌患者中的24个miRNA发生相关基因的41个SNP位点,发现携带GEMIN3(rs197414)的AA基因型的膀胱癌患者的发病风险是其他基因型的2.5倍。由此可见,miRNA加工相关基因的SNP与肿瘤发病密切相关。

2 MiRNA 基因、靶基因结合位点及 miRNA 加工相关基因的 SNP 的预测和筛选

2.1 MiRNA 基因、靶基因结合位点及 miRNA 加工相关基因的 SNP 的生物预测

随着对相关疾病 miRNA领域研究的不断深入,促使了miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP生物预测的发展,Thomas等^[18]通过一种软件分析影响miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP,可以帮助识别miRNA基因SNP与疾病的关联程度,并预测miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP的生物作用,研究者通过连锁不平衡绘制全基因组关联分析(genomewide association studies, GWAS)中与miRNA加工相关基因的SNP图谱,其预测效果明显优于基于自由能差异的TargetScan软件。此外,研究者还通过预测数据库(网址为<http://www.bigr.medisin.ntnu.no/miRNA加工相关基因的SNPscore/>)分析了miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP,并进一步得到了显著关联的miRNA加工相关基因的SNP数据集。随着这些软件和预测数据库的应用不断成熟,miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP的生物预测将更为精准。

2.2 MiRNA 基因、靶基因结合位点及 miRNA 加工相关基因的 SNP 的筛选

用关联研究分析miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP与包括肿瘤在内的疾病的易感或预测之间的关系,得到了很多研究者的青睐,该方法在针对miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP研究中非常常见。此前的研究已经表明miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP与人类肿瘤发生关系密切,Horikawa等^[19]就在279个高加索肾细胞癌患者和278个正常对照中检测了11个miRNA加工基因和15个miRNA基因中的40个SNP,发现GEMIN4基因的变异型基因型与肾细胞癌的发病显著性相关。此外,研究者们也通过GWAS研究,探讨了miRNA基因、靶基因结合位点及miRNA加工相关基因的SNP与肿瘤发生的关系。Nicoloso等^[20]利用与乳腺癌患病风险相关基因编码序列区(CDS区)、5'UTR和3'UTR的SNP序列和预测miRNA结合的最小自由能之间的差值,筛选出乳腺癌相关的潜在miRNA加工相关基因的SNP。研究者对已经公布的GWAS数据进行比对分析和筛选,也可确定潜在的miRNA加工相关基因的SNP^[21]。

3 高通量测序技术在 miRNA 基因、靶基因结合位点及 miRNA 加工相关基因的 SNP 检测中的应用

3.1 下一代测序技术在基因组 SNP 检测中的应用

由于miRNA在转录后基因调节中发挥的巨大作用,快速获取特定样品的miRNA表达谱,对于探索特定生理及病理过程中发挥作用的miRNA及其作用机制十分必要。近年来发展的下一代测序技术采用全基因组测序方法,大大增加了新miRNA的检出速度^[22]。下一代测序技术可用于miRNA表达谱检测,具有准确、高效的特点,并且在发现新的miRNA方面具有突出优势。此外,下一代测序技术在miRNA互补链、miRNA编辑和miRNA异构体检测,探索miRNA功能及调控机制、miRNA靶基因检测方面具有新的应用。因此通过下一代测序技术对miRNA基因及其相关SNP进行检测,可以大大地提高检出效率及准确性^[23]。

3.2 第三代测序技术将在 miRNA 基因 SNP 位点检出中发挥重要作用

第三代测序技术,也叫下一代测序技术

(next-next-generation sequencing)是2009年由Pacific Biosciences公司开发研制出的新一代测序技术, 也称之为单分子实时DNA测序 [single molecule real time (SMRT™) DNA sequencing]^[24-25]。该项技术与下一代测序技术相比, 除了读长大大增加外, 还具有以下优势: 一是直接进行RNA序列的测序, 既然第三代测序技术可以对DNA聚合酶实时观测, 以RNA为模板复制DNA的逆转录酶同样也可以实时检测, 这样就大大地降低了体外逆转录产生的误差。另一个优势是可以对甲基化的DNA序列直接测序。这主要根据DNA聚合酶复制A, T, C和G的速度是不同的。根据复制各个碱基的时间差异, 可以判断模板的C是否发生甲基化。因此, 通过第三代测序技术, 可以更好地发现基因的SNP及DNA或RNA的甲基化修饰, 对于成熟miRNA, pri-miRNA, pre-miRNA以及靶基因结合位点和miRNA加工基因SNP的发现将发挥重要的作用。

4 展望

目前, 关于miRNA基因及其miRNA相关基因SNP与肿瘤易感性的研究正方兴未艾, 同时存在的问题也随之而来。如目前的大多数研究仍然是基于病例-对照研究的研究策略, 由于地域、种族等异质性的存在及样本量的限制, 使得通过这类方法所得结果的假阳性和假阴性率比较高。因此, 后续研究需要加强多中心合作, 在多个独立的大样本人群中验证, 同时要进一步确定显著关联的SNP位点在肿瘤发病过程中的功能意义。此外, 要充分利用下一代测序技术或者是下下一代测序技术在miRNA基因及miRNA相关基因检测方面的优势。相信在不久的将来, 有关miRNA基因及相关基因SNP与肿瘤易感性的研究将会取得更大的突破。

参考文献

1. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs[J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 351-379.
2. Hammond SM. MicroRNA as oncogens[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16(1): 4-9.
3. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev*, 2006, 6(4): 259-269.
4. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1768-1771.
5. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866.
6. Wu MQ, Jolicoeur N, Li Z, et al. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(9): 1710-1716.
7. Yoon KA, Yoon H, Park S, et al. The prognostic impact of microRNA sequence polymorphisms on the recurrence of patients with completely resected non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2012, 144(4): 794-807.
8. Duan RH, Pak CH, Jin P. Single nucleotide polymorphism, associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(9): 1124-1131.
9. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(20): 7269-7274.
10. Tian T, Shu YQ, Chen JP, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(4): 1183-1187.
11. Kim MJ, Yoo SS, Choi YY, et al. A functional polymorphism in the pre-microRNA-196a2 and the risk of lung cancer in a Korean population[J]. *Lung Cancer*, 2010, 69(1): 127-129.
12. Peng S, Kuang ZS, Sheng CY, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(8): 2288-2293.
13. Smith RA, Jedlinski DJ, Gabrovská PN, et al. A genetic variant located in miR-423 is associated with reduced breast cancer risk[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2012, 9(3): 115-118.
14. Luo J, Cai Q, Wang W, et al. A microRNA-7 binding site polymorphism in HOXB5 leads to differential gene expression in bladder cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40127.
15. Kontorovich T, Levy A, Kman E. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(3): 589-597.
16. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23): 7956-7962.
17. Yang H, Dinney CP, Ye Y, et al. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2530-2537.
18. Thomas LF, Saito T, Saetrom P. Inferring causative variants in microRNA target sites[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): e109.

19. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23): 7956-7962.
20. Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R, et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2789-2798.
21. Richardson K, Lai CQ, Parnell LD, et al. A genome-wide survey for SNPs altering microRNA seed sites identifies functional candidates in GWAS[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 504.
22. 李桂源, 向娟娟, 武明花, 等. 癌症(基础卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 3-25.
LI Guiyuan, XIANG Juanjuan, WU Minghua, et al. *Cancer (basic volume)*[M]. Beijing: Science Press, 2012: 3-25.
23. 汤海明, 陈红, 张静, 等. 新一代测序技术应用于microRNA检测[J]. *遗传*, 2012, 34(6): 784-792.
TANG Haiming, CHEN Hong, ZHANG Jing, et al. A new generation of sequencing technology applied in microRNA detection[J]. *Genetics*, 2012, 34(6): 784-792.
24. Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. *Science*, 2009, 323(5910): 133-138.
25. Korlach J, Bjornson KP, Chaudhuri BP, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. *Methods Enzymol*, 2010, 472: 431-455.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 涂超峰, 肖岚, 武明花, 李桂源. MiRNA 基因及 miRNA 相关基因单核苷酸多态性与肿瘤易感性[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(6): 520-524. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.014

Cite this article as: TU Chaofeng, XIAO Lan, WU Minghua, LI Guiyuan. MiRNA and miRNA related-gene's single nucleotide polymorphism and tumor susceptibility[J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2013, 33(6): 520-524. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.014