

调控 microRNA 成熟的通路基因标签单核苷酸多态性与原发性肝癌易感性的关系

李玉春 宋春花 杨文杰 代丽萍 王鹏 史健翔 张建营 王凯娟

【摘要】 目的 研究调控 microRNA 成熟的通路基因(DICER1、RAN 及 GEMIN4 基因)标签单核苷酸多态性(tSNP)与原发性肝癌遗传易感性的相关性。**方法** 采用 1:1 配对病例-对照研究,将 2008 年 9 月至 2010 年 12 月在郑州某两个教学医院就诊的 532 例原发性肝癌患者纳入病例组,将 532 名健康个体纳入对照组,对其进行面对面调查并采集外周静脉血 5 ml。从 DICER1、RAN 及 GEMIN4 基因中筛选 tSNP,采用 PCR-RFLP 或等位基因特异 PCR 技术对研究对象进行基因分型,应用多因素条件 logistic 回归及多因素降维法(MDR)分析 tSNP 与原发性肝癌易感性的关系及其与环境因素的交互作用。**结果** 在所筛选的 DICER1、RAN 及 GEMIN4 基因 tSNP 中,rs14035 位点 CC、CT、TT 基因型在病例组中的频率分别为 67.29% (358/532)、28.20% (150/532)、4.51% (24/532),在对照组的频率分别为 70.30% (374/532)、28.20% (150/532)、1.50% (8/532) ($\chi^2 = 8.35, P < 0.05$);rs1045491 位点 GG、GA、AA 基因型在病例组中的频率分别为 71.05% (378/532)、26.69% (142/532)、2.26% (12/532),在对照组的频率分别为 80.45% (428/532)、18.42% (98/532)、1.13% (6/532) ($\chi^2 = 13.17, P < 0.01$);rs2291778 位点 GG、GT、TT 基因型在病例组中的频率分别为 53.38% (284/532)、40.23% (214/532)、6.39% (34/532),在对照组的频率分别为 25.94% (138/532)、63.91% (340/532)、10.15% (54/532) ($\chi^2 = 83.71, P < 0.01$)。rs14035 位点 TT 基因型 ($OR = 2.54, 95\% CI: 1.19 \sim 6.32$)、rs1045491 位点 GA 基因型 ($OR = 1.74, 95\% CI: 1.08 \sim 2.66$) 是原发性肝癌的易感基因型,rs2291778 位点的 GT 基因型 ($OR = 0.52, 95\% CI: 0.43 \sim 0.75$) 和 TT 基因型 ($OR = 0.62, 95\% CI: 0.46 \sim 0.86$) 是原发性肝癌的非易感基因型。单体型分析显示,单体型 3 (AACTGGGT) ($OR = 1.42, 95\% CI: 1.10 \sim 1.82$) 和单体型 5 (AGCCAGCC) ($OR = 1.36, 95\% CI: 1.02 \sim 1.80$) 可增加肝癌发病风险,而单体型 2 (AACTATCC) ($OR = 0.69, 95\% CI: 0.52 \sim 0.91$) 和单体型 6 (AACTGTGT) ($OR = 0.61, 95\% CI: 0.45 \sim 0.81$) 可降低原发性肝癌发病风险。具有 rs1045491 (等位基因 A)、rs14035 (等位基因 T) 和 HBV 感染的交互组合的人群是原发性肝癌的高发人群 ($OR = 3.72, 95\% CI: 2.38 \sim 5.56$)。**结论** rs14035 位点 TT 基因型、rs1045491 位点 GA 基因型是原发性肝癌的易感基因型,rs2291778 位点 T 等位基因是原发性肝癌的非易感等位基因。多位点多基因联合作用对于原发性肝癌的发生可能具有协同作用。

【关键词】 微 RNAs; 多态性,单核苷酸; 肝肿瘤; 疾病遗传易感性

Correlation between tag single nucleotide polymorphisms of microRNA regulatory genes and the genetic susceptibility of primary liver cancer

LI Yu-chun, SONG Chun-hua, YANG Wen-jie, DAI Li-ping, WANG Peng, SHI Jian-xiang, ZHANG Jian-ying, WANG Kai-juan. Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University (Henan Key Laboratory of Tumor Epidemiology), Zhengzhou 450001, China

Corresponding author: WANG Kai-juan, Email: kjwang@163.com

【Abstract】 Objective This study aimed to understand the correlation between tag single nucleotide polymorphisms (tSNP) of microRNA regulatory genes and the genetic susceptibility of primary liver cancer. **Methods** 1:1 case-control study was applied in this research. A total of 532 primary liver cancer patients in 2 teaching hospitals in Zhengzhou city were enrolled as case group. 532 healthy individuals were enrolled as control group. The subjects were surveyed by a face-to-face interview and 5 ml of peripheral venous blood were collected. Candidate tSNP were screened from DICER1, RAN and GEMIN4 gene,

respectively. PCR-RFLP or Allele specific PCR was applied for genotyping of the subjects. Conditional logistic regression model and Multifactor-Dimensionality Reduction method were applied for analyzing the correlation between tSNP of above genes and genetic susceptibility of primary liver cancer. The gene-environment interaction was also analyzed. **Results** The frequencies of genotype CC, CT, TT in rs14035 locus were 67.29% (358/532), 28.20% (150/532), 4.51% (24/532) in case group, and 70.30% (374/532), 28.20% (150/532), 1.50% (8/532) in control group, respectively ($\chi^2 = 8.35, P < 0.05$). The frequencies of genotype GG, GA, AA in rs1045491 locus were 71.05% (378/532), 26.69% (142/532), 2.26% (12/532) in case group, and 80.45% (428/532), 18.42% (98/532), 1.13% (6/532) in control group, respectively ($\chi^2 = 13.17, P < 0.01$); the frequencies of genotype GG, GT, TT in rs2291778 locus were 53.38% (284/532), 40.23% (214/532), 6.39% (34/532) in case group, and were 25.94% (138/532), 63.91% (340/532), 10.15% (54/532) in control group ($\chi^2 = 83.71, P < 0.01$). TT genotype in rs14035 locus ($OR = 2.54, 95\% CI: 1.19 - 6.32$) and GA genotype in rs1045491 locus ($OR = 1.74, 95\% CI: 1.08 - 2.66$) were susceptible genotype of primary liver cancer, whereas GT ($OR = 0.52, 95\% CI: 0.43 - 0.75$) and TT genotype ($OR = 0.62, 95\% CI: 0.46 - 0.86$) in rs2291778 locus were protective genotype. Haplotype analysis showed that haplotype 3 (AACTGGGT) ($OR = 1.42, 95\% CI: 1.10 - 1.82$) and haplotype 5 (AGCCAGCC) increased the risk of occurrence of primary liver cancer ($OR = 1.36, 95\% CI: 1.02 - 1.80$), whereas haplotype 2 (AACTATCC) ($OR = 0.69, 95\% CI: 0.52 - 0.91$) and haplotype 6 (AACTGTGT) ($OR = 0.61, 95\% CI: 0.45 - 0.81$) decreased the risk. Subjects exposed to allele A of rs1045491, allele T of rs14035 and HBV infection intend to be the high risk population of primary liver cancer ($OR = 3.72, 95\% CI: 2.38 - 5.56$). **Conclusion** Genotypes of TT in rs14035 locus, and GA in rs1045491 locus may be susceptible genotypes of liver cancer carcinogenesis. T allele in rs2291778 locus is a non-susceptible allele of primary liver cancer. Combined effects of multigene alleles and multi-locus genotype may have a synergistic role in the carcinogenesis of liver cancer.

【Key words】 MicroRNAs; Polymorphism, single nucleotide; Liver neoplasms; Genetic predisposition to disease

肝癌是世界范围内第 5 大常见恶性肿瘤,在世界恶性肿瘤排名顺位中居第 3 位^[1]。中国 2008 年新发肝癌病例约 40.1 万例,占全球当年新发病例 (74.9 万例) 的 53.5%^[2]。MicroRNA (miRNA) 是一类小型非编码 RNA,由大约 22 个核苷酸组成,其由染色体 DNA 编码,在转录后水平发挥调控基因表达的功能。miRNA 既可以在肿瘤中表达上调,起到癌基因的作用,也可以在肿瘤中表达下调,起到抑癌基因的作用。研究发现,调控 miRNA 成熟的通路基因的 SNP 可以影响 miRNA 的成熟和表达^[3]。因此,在原发性肝癌发生和发展过程中,对 DICER1、RAN 及 GEMIN4 等 3 个调控 miRNA 成熟的通路基因上标签单核苷酸多态性 (tSNP) 进行分析,有可能发现肝癌基因治疗的新靶点。笔者采用 1:1 个体匹配病例-对照研究分析河南汉族人群上述基因 tSNP 与原发性肝癌遗传易感性的关系,现报道如下。

对象与方法

1. 对象:将 2008 年 9 月至 2010 年 12 月在郑州市两家医院经病理学确诊为原发性肝细胞癌的 532 例新发病例纳入病例组;以 1:1 个体匹配方式,按照与病例同性别、年龄 ± 5 岁以内、无肿瘤病史和临床体征的标准,选择 532 名健康个体作为对照 (均来自河南省新乡县居民)。所有研究对象均无直系亲属关系。从医院病案室获得病例的性别、年龄以及

吸烟史、饮酒史和家族史等资料,对照组则采用专门的调查表由经过统一培训的调查员进行面对面调查,核对无误。本研究通过了郑州大学生命科学研究伦理委员会的批准,所有研究对象均知情同意参加本研究,并签订了知情同意书。

2. DNA 提取:采集研究对象外周静脉血 5 ml 于 EDTA 抗凝管中, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。用离心柱型全血基因组 DNA 提取试剂盒 (购自北京市鼎国生物技术有限公司) 提取 DNA,分装母液后,取出 1 份,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 备用。

3. tSNP 的筛选:由 Hapmap 数据库获得中国人 (CHB) DICER1 基因、RAN 基因及 GEMIN4 基因的 SNPs 信息,将数据导入 Haploview 4.2 软件运行,按照如下标准选取 tSNP: $r^2 > 0.8$, 最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 的最小值为 0.05。采用连锁不平衡值 (D' 值) 置信区间法,将 D' 值的 95% CI 值在 0.70 ~ 0.98 的相邻 SNP 归入同一个单体型块^[4]。

4. 基因分型:对于突变位点有限制性内切酶酶切位点的基因位点,优先采用 PCR-RFLP 进行基因分型,其余则采用等位基因特异 PCR 分型^[5]。使用 Primer premier 5.0 软件自行设计多态性位点的引物序列,由北京赛百盛生物有限公司合成。不同多态性位点基因分型的引物序列,限制性内切酶及限制性片段长度见表 1。

5. 统计学分析:应用统计学软件 SPSS 17.0 对性别、年龄、吸烟、饮酒、基因型等进行频数统计,使用 McNemar 配对 χ^2 检验,分析各因素在病例组和对照组分布的差异,采用多因素条件 logistic 回归计算校正后的 OR 值及其 95% CI 值。根据文献[6-7]提出的 2 型交互作用模型,对有统计学意义的位点与 HBV 感染在原发性肝癌发生中的交互作用进行分析,根据交互作用系数(γ)判断交互作用、基因-环境作用类型,及其对原发性肝癌的影响。对每个单体型进行易感性分析时,将其他所有单体型合并为一组作为对照,同时采用多因素降维法(MDR)^[8]分析基因-环境交互作用。以上分析均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 对象的一般特征:532 对研究对象年龄为(54.9 ± 12.7)岁,其中男性 360 对,占 67.7%,女性 172 对,占 32.3%。病例组与对照组吸烟率分别为 38.2% (203/532)、36.3% (193/532),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.18, P = 0.67$)。病例组与对照组饮酒率分别为 30.0% (160/532)、18.1% (96/532),差异有统计学意义($\chi^2 = 22.82, P < 0.01$)。病例组与对照组中有癌症家族史者所占比例分别为 21.3% (113/532)、8.6% (46/532),差异有统计学意义($\chi^2 = 26.24, P < 0.01$)。病例组和对照组中 HBV 感染阳性率分别为 54.70% (291/532)、11.09% (59/532),差异有统计学意义($\chi^2 = 9.68, P < 0.01$)。

2. 基因多态性与原发性肝癌关联:从 RAN 基因中筛选出 2 个 tSNP (rs14035、rs3803012);从

GEMIN4 基因中筛选出 5 个 tSNP (rs7813, rs1045491, rs2291778, rs2740348 和 rs3744741);从 DICER1 基因中筛选出 1 个 tSNP (rs3742330)。表 2 仅列出了存在阳性结果的各位点基因型在研究人群中的频率。对照组中基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。rs14035 位点 TT 基因型、rs1045491 位点 GA 基因型是原发性肝癌的易感基因型,rs2291778 位点的 GT 基因型和 TT 基因型是原发性肝癌的非易感基因型。

表 1 不同位点的引物序列、限制性内切酶及片段长度

基因多态性位点	引物序列(5'-3')	限制性内切酶	片段及其长度(bp)
rs3742330	F:GTCTCAGTTTGGTGGCTTCA R:TTCTGATACCCCTGCCTTGAC	BshNI	239,199,49
rs3803012	F:GGAGTGAATGTGGCAGTTTA R:CTTCCCTACTTTAGTGGTTTCC	NdeI	170,91
rs14035	F:GCAGTGTTTGCTCCACCTTC R:ATGTCCTGCTCTGCTGTGCT	XagI	448,277,171
rs7813	F:CCTCACCTGCTATGAGACTTTG R:CACCATTATTGCCATGACTTTT	HhaI	214,119,74,45 ^b
rs1045491	F:TGTCAGCTCCTTGCTCCA R:GCATATTTAATCCTGGGCTATT	AvaI	410,230,80
rs2291778 ^a	F1:GCCCCAGAACTAAAACGAAGG F2:GGCCCAGAACTAAAACGAAGT R:CTGCTGCCGCTCCATAA		200
rs2740348 ^a	F1:CAGGGCCCTTTCCAAC F2:CAGGGCCCTTTCCAAG R:CCTGTTGGGAGGCACTCT		274
rs3744741 ^a	F1:GGTCTGGAGCCAGTATTCCTATC F2:GGTCTGGAGCCAGTATTCCTATT R:CTTCCCTGCCCTTAGTTTG		320

注:^a 采用等位基因特异 PCR 法扩增,^b 引物扩增序列中有两个相同的酶切位点,因此可产生 4 个酶切片段,F:上游引物,R:下游引物

表 2 RAN 及 GEMIN4 不同基因型在研究人群的分布情况

位点 基因型	病例组	对照组	OR(95% CI)值 ^a	χ^2 值	P 值
rs14035				8.35	<0.05
CC	358(67.29)	374(70.30)	1.00		
CT	150(28.20)	150(28.20)	1.38(0.86~1.74)		
TT	24(4.51)	8(1.50)	2.54(1.19~6.32)		
rs1045491				13.17	<0.01
GG	378(71.05)	428(80.45)	1.00		
GA	142(26.69)	98(18.42)	1.74(1.08~2.66)		
AA	12(2.26)	6(1.13)	1.89(0.93~5.86)		
rs2291778				83.71	<0.01
GG	284(53.38)	138(25.94)	1.00		
GT	214(40.23)	340(63.91)	0.52(0.43~0.75)		
TT	34(6.39)	54(10.15)	0.62(0.46~0.86)		

注:限于篇幅,本表仅列出有统计学意义的位点,括号外数值为人数(例或名),括号内数值为基因型分布频率(%),^a校正性别、年龄、吸烟、饮酒、肿瘤家族史和 HBV 感染后的 OR(95% CI)值

表 3 不同位点基因多态性与 HBV 感染的交互作用

位点 基因型	HBV 感染	病例组	对照组	OR(95% CI) ^a 值	γ 值
rs14035				1.00	
CC	-	148 (27.82)	345 (64.85)	1.89 (1.15 ~ 2.69)	1.30
CT + TT	-	93 (17.48)	128 (24.06)	6.78 (4.23 ~ 11.32)	
CC	+	97 (18.23)	29 (5.45)	12.08 (7.95 ~ 21.17)	
CT + TT	+	194 (36.47)	30 (5.64)		
rs1045491				1.00	
GG	-	175 (32.89)	383 (71.99)	1.00	1.19
GA + AA	-	66 (12.41)	90 (16.92)	1.83 (1.06 ~ 2.47)	
GG	+	203 (38.16)	45 (8.46)	7.89 (5.92 ~ 12.38)	
GA + AA	+	88 (16.54)	14 (2.63)	11.76 (6.34 ~ 21.65)	
rs2291778				1.00	
TT	-	100 (18.80)	113 (21.24)	1.00	0.57
GT + GG	-	141 (26.50)	360 (67.66)	0.48 (0.32 ~ 0.63)	
TT	+	184 (34.59)	25 (4.70)	8.52 (4.79 ~ 12.76)	
GT + GG	+	107 (20.11)	34 (6.40)	3.36 (2.01 ~ 5.89)	

注:HBV 感染列中:“+”为 HBV 感染阳性,“-”为 HBV 感染阴性;^a校正性别、年龄、吸烟、饮酒和肿瘤家族史;括号外数值为人数(例或名),括号内数值为基因型分布频率(%)

表 4 DICER1、RAN 及 GEMIN4 基因不同单体型在研究人群中的分布情况

单体型	病例组	对照组	OR(95% CI) 值	χ ² 值	P 值
Hap1(AACTGTGC)	149(14.12)	135(12.71)	1.13(0.88~1.45)	0.86	0.35
Hap2(AACTATCC)	98(9.29)	137(12.89)	0.69(0.52~0.91)	7.12	<0.05
Hap3(AACTGGGT)	168(15.93)	125(11.82)	1.42(1.10~1.82)	7.52	<0.05
Hap4(AGCTGTGT)	107(10.12)	112(10.58)	0.95(0.72~1.25)	0.16	0.69
Hap5(AGCCAGCC)	123(11.71)	93(8.83)	1.36(1.02~1.80)	4.47	<0.05
Hap6(AACTGTGT)	79(7.52)	125(11.80)	0.61(0.45~0.81)	11.29	<0.05
Hap7(AACCAGCC)	96(9.13)	81(7.62)	1.21(0.89~1.64)	1.43	0.23
Hap8(AACTGGGC)	36(2.91)	51(3.01)	0.68(0.44~1.06)	2.97	0.09

注:病例组、对照组列括号前为人数(例或名),括号内为基因型分布频率(%)

3. HBV 感染与 rs14035、rs1045491 和 rs2291778 位点的交互作用:由表 3 可见,在校正了年龄、性别、吸烟、饮酒和肿瘤家族史的影响后,rs14035T 或 rs1045491A 等位基因与 HBV 感染同时存在时,可增加 HBV 感染的危险作用,两者存在交互作用,为 4 型交互作用中的超相乘模型;rs2291778 T 等位基因与 HBV 感染同时存在时,可降低 HBV 感染的危险作用,两者存在交互作用,为 4 型交互作用中的次相乘模型。

4. 单倍型分析:8 个多态性位点共产生 17 个单体型 SNP 位点,排列顺序依次为 rs3803012、

rs3742330、rs3744741、rs7813、1045491、rs2291778、rs2740348、rs14035,舍弃病例组和对照组中频率小于 0.03 的单体型,分析了其中 8 个单体型(表 4)。研究发现单体型 2、3、5、6 在病例和对照组的分布差异有统计学意义。其中,单体型 3、5 可增加肝癌发病风险,而单体型 2、6 可降低肝癌发病风险。

5. 基因-环境的交互作用:采用 MDR 软件分析基因-环境之间的交互作用,将获得的 8 个 SNP 位点以及吸烟史、饮酒史、肿瘤家族史和 HBV 感染史导入软件,经拟合,产生了 1~4 阶不同交互情况下的模型(表 4)。由表 5 可见所给模型均有统计学意

表 5 1~4 阶基因-环境交互作用模型分析结果(MDR)

模型	训练集平均精度	测试集平均精度	十重交叉验证一致率	χ ² 值	P 值	OR(95% CI)
X9	0.6372	0.6372	10/10	12.96	<0.01	2.25(1.39~3.28)
X8X9	0.6384	0.6208	7/10	29.35	<0.01	2.86(1.84~4.75)
X5X8X9	0.6691	0.6692	10/10	36.94	<0.01	3.72(2.38~5.56)
X3X5X8X9	0.6716	0.6597	7/10	82.69	<0.01	4.22(3.03~5.34)

注:X3 为 rs3744741 位点;X5 为 rs1045491 位点;X8 为 rs14035 位点;X9 为 HBV 感染

义,1 阶模型和 3 阶模型的十重交叉验证的一致率(比值)均为 10:10,但 3 阶模型的训练集和测试集平衡精度值分别为 0.6691 和 0.6692,因此选择 3 阶模型为最优模型,其中包含 2 个多态性位点,具有 rs1045491(等位基因 A)、rs14035(等位基因 T)以及 HBV 感染史组合的人群的原发性肝癌发病风险是非上述组合人群的 3.72 倍($\chi^2 = 36.94, P < 0.01$)。

讨 论

本研究的对象均来自河南省,Hardy-Weinberg 平衡表明对象的来源具有代表性。笔者分析了 DICER1 基因 1 个 tSNP(rs3744330),RAN 基因 2 个 tSNP(rs14035 和 rs3803012)及 GEMIN4 基因 5 个 tSNP(rs7813, rs1045491, rs2291778, rs2740348 和 rs3744741)与原发性肝癌的相关性。这些位点与原发性肝癌遗传易感性的相关性在中国人群中尚未见报道,在单个位点的分析中发现 rs14035 位点的 TT 基因型,rs1045491 的杂合子 GA 基因型是原发性肝癌的危险基因型,rs2291778 的 T 等位基因是原发性肝癌的保护性等位基因。

在单体型分析中,与对照组相比携带单体型 3 或单体型 5 的个体原发性肝癌发病风险分别提高了 1.42 倍和 1.36 倍。单体型 3 中,rs1045491 位点上的等位基因为 A,rs14035 位点上的等位基因为 T,这与单位点分析结果相符,进一步提示这两个等位基因联合增加原发性肝癌的发病风险。单体型 2 和单体型 6 中,rs2291778 位点上的等位基因为 T,这也与单位点分析结果相符。MDR 分析也验证了上述结果,即具有 rs1045491(等位基因 A)和 rs14035(等位基因 T)及 HBV 感染交互组合的人群是原发性肝癌的高发人群。

位于 miRNA 生物合成及作用机制相关基因中的 SNP 主要是通过影响基因的功能进而在整体水平上影响所有 miRNAs 的表达。有报告指出核输出复合物 RAN 基因 3'端非编码区(3'UTR)的 SNP(rs14035)可增加个体患食管癌的易感性^[9]。本研究亦发现 rs14035 可增加原发性肝癌的易感性。Clague 等^[10]认为 DICER1 基因的 3'UTR 的 SNP(rs3742330)可使黏膜白斑或黏膜红斑病患者患口腔黏膜癌的风险显著增加。其可能机制该基因

3'UTR 的 SNP(rs3742330)可能影响 DICER1 mRNA 的稳定性进而减少 DICER1 基因的表达^[11]。然而,笔者并未发现 rs3742330 与原发性肝癌发病相关。Horikawa 等^[12]发现 GEMIN4 基因中的两个 SNP(rs2740348 和 rs7813)可降低肾细胞癌的发生风险。笔者未发现携带 rs7813 T 等位基因可以增加肝细胞癌的发病风险。

综上所述,rs14035 TT 基因型和 rs1045491 GA 基因型是原发性肝癌的易感基因型,而 rs2291778 T 等位基因是原发性肝癌的非易感等位基因。单体型分析及 MDR 分析结果表明多位点多基因联合作用对于原发性肝癌的发生具有协同作用。

参 考 文 献

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007, 132(9):2557-2576.
- [2] World Health Organization. International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2008. Geneva: WHO, 2008.
- [3] 张新伟,潘善东,冯耀良,等.微小 RNA 前体区域基因多态与肝细胞肝癌遗传易感性关联的研究. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(6):239-243.
- [4] Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 2002, 296(5576):2225-2229.
- [5] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA, the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(7):2503-2516.
- [6] Ottman R. An epidemiologic approach to gene-environment interaction. *Genet Epidemiol*, 1990, 7(3):177-185.
- [7] Khoury MJ, Wagener DK. Epidemiological evaluation of the use of genetics to improve the predictive value of disease risk factors. *Am J Hum Genet*, 1995, 56(4):835-844.
- [8] Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*, 2003, 19(3):376-382.
- [9] Ye YQ, Wang KK, Gu J, et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (phila pa)*, 2008, 1(6):460-469.
- [10] Clague J, Lippman SM, Yang H, et al. Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Mol Carcinog*, 2010, 49(2):183-189.
- [11] Kumar MS, Pester RE, Chen CY, et al. Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev*, 2009, 23(23):2700-2704.
- [12] Horikawa Y, Wood CG, Yang HS, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23):7956-7962.

(收稿日期:2012-02-29)

(本文编辑:杨文杰 吕相征)