

1 μ l 加样缓冲液混匀,再将混合液置入 ABI Prism 373 DNA 测序仪(Applied Biosystems, USA)测序。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件对研究数据进行统计分析。基因频率采用基因计数法计算;组间基因型及等位基因频率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-196a2 T>C 基因型及等位基因在肝硬化组及健康对照组的分布 miR-196a2 T>C 基因型及等位基因在肝硬化组及健康对照组的分布如表 1 所示,病例组及对照组均符合 Hardy-Weinberg 定律。两组都是以 CT 基因型为主,CC 基因型及等位基因 C 在肝硬化组的分布频率低于健康对照组,但差异无统计学意义,说明 miR-196a2 T>C 基因多态性与肝硬化的发生并没有明显相关性。

2.2 miR-196a2 T>C 基因多态性与男性或女性发生肝硬化的关系 我们将所有研究个体按照性别分成男性及女性

个体两组,试图探讨 miR-196a2 T>C 基因多态性与男性或女性患者肝硬化的发生是否具有相关性。表 2 表明,同所有研究对象一样,男性或女性个体中 miR-196a2 T>C 基因多态性与肝硬化的发生也没有明显相关性。

表 1 肝硬化组及对照组 miR-196a2 基因型及等位基因频率分布

[n(%)]			
基因多态性	健康对照组 (N=391)	肝硬化组 (N=110)	P 值 ^a
基因型			
TT	102(26.1)	38(34.5)	-
CT	197(50.4)	51(46.4)	0.472
CC	92(23.5)	21(19.1)	0.564
等位基因			
T	401(51.3)	127(57.7)	-
C	381(48.7)	93(42.3)	0.525

^a 经年龄和性别校正后的 P 值

表 2 肝硬化组及对照组不同性别 miR-196a2 基因型及等位基因频率分布

[n(%)]						
基因多态性	男性			女性		
	健康对照组(N=271)	肝硬化组(N=81)	P 值 ^a	健康对照组(N=120)	肝硬化组(N=29)	P 值 ^a
基因型						
TT	67(24.7)	28(34.6)	-	35(29.2)	10(34.5)	-
CT	134(49.5)	36(44.4)	0.465	63(52.5)	15(51.7)	0.691
CC	70(25.8)	17(21.0)	0.587	22(18.3)	4(13.8)	0.604
等位基因						
T	268(49.4)	92(56.8)	-	133(55.4)	35(60.3)	-
C	274(50.5)	70(43.2)	0.553	107(44.6)	23(39.7)	0.587

^a 经年龄校正后的 P 值

3 讨论

肝硬化是肝细胞外基质异常过度沉积的结果,其过程十分复杂,受多种因素的影响。在我国,引起肝硬化的主要原因是 HBV 感染,而在西方主要是长期过量饮酒。临床上可以观察到肝硬化的形成具有一定的“体质性”,即不同的患者对相同病症表现出不同的转归,这可能与患者的遗传背景有关。

表观遗传学变化或者存在于 miRNA 初级转录产物(primary miRNA)、pre-miRNA 或成熟 miRNAs 基因序列中的 SNP 能够潜在影响 miRNAs 调节的细胞功能网络,因此 miRNAs 在疾病的发生、发展中的作用成为近年来研究的热点^[6]。Iwai 等^[7]首次发现了存在于 pre-miRNAs 中的 SNP。他们通过对 96 例日本人的 173 种人 pre-miRNAs 进行测序研究后,发现了 10 个存在于 10 种 pre-miRNAs 发卡结构中的 SNPs。几个研究组对人 miRNAs 基因及其靶点进行生物信息学分析和实验,发现在大约 6%~10% 的 pre-miRNA 存在 SNPs,但成熟型的 miRNAs 几乎没有 SNPs^[2,7-8];而且只有不到 1% 的 SNPs 位于功能性种子区域^[2]。

研究发现,pre-miRNA SNP(rs11614913)可通过影响成熟 miR-196a 的表达水平从而而影响包括肺癌^[3]、先天性心脏

病^[4]、乳腺癌^[5]多种疾病的易感性。本研究探讨了该位点的多态性与肝硬化的关系。结果发现,肝硬化患者和正常对照者的 miR-196a2 都是以 CT 基因型为主,虽然 CC 基因型及等位基因 C 在肝硬化组的分布频率(0.191,0.423)低于健康对照组(0.235,0.487),但这种差异并没有统计学意义,表明 miR-196a2 T>C 基因多态性与肝硬化的发生并没有显著的相关性。随后我们又分别对男性及女性个体中 miR-196a2 T>C 基因多态性进行分析,发现基因型及等位基因在男性或女性个体中的分布趋势与整体趋势相似,相关差异也没有统计学意义。因此我们认为,在中国人群中,miR-196a2 T>C 基因多态性与肝硬化的发生无密切关系,但该结论尚需进一步扩大样本验证。

(志谢 本研究标本的获取得了上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科的支持和帮助,在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

- [1] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001, 294: 853-858.
- [2] Saunders M A, Liang H, Li W H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites[J]. Proc Natl Acad Sci

- USA,2007,104:3300-3305.
- [3] Tian T,Shu Y,Chen J,Hu Z,Xu L,Jin G, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,2009,18:1183-1187.
- [4] Xu J,Hu Z,Xu Z,Gu H,Yi L,Cao H, et al. Functional variant in microRNA-196a2 contributes to the susceptibility of congenital heart disease in a Chinese population[J]. *Hum Mutat*,2009,30:1231-1236.
- [5] Hu Z,Liang J,Wang Z,Tian T,Zhou X,Chen J, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women[J]. *Hum Mutat*,2009,30:79-84.
- [6] 戚 鹏,高春芳. miRNA 在肝细胞癌中的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*,2008,28:94-101.
- [7] Iwai N,Naraba H. Polymorphisms in human pre-miRNAs[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2005,331:1439-1444.
- [8] Duan R,Pak C,Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA [J]. *Hum Mol Genet*,2007,16:1124-1131.

[本文编辑] 孙 岩