

miRNA靶位点多态性与大肠癌的研究进展

崔健¹ 张晓庆² 杨芳芳² 杨进^{2*}¹青海省中医院检验科, 西宁 810000; ²西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘要 特异微小RNA(miRNA)的过度表达和沉默与大肠癌(colorectal cancer, CRC)的发生发展相关。目前发现, miRNA的调节作用同时受其靶位点多态性的影响, 并参与了多种恶性肿瘤的演进。该文将就miRNA靶位点的多态性作为遗传标志物在肿瘤风险预警中的潜在作用作一综述, 旨在为阐明CRC易感性和药物反应性个体差异提供新的解释。

关键词 miRNA靶位点的多态性; 大肠癌; 遗传标志物

Progress in Research of Polymorphism in MicroRNA Target Sites and Colorectal Cancer

Cui Jian¹, Zhang Xiaoqing², Yang Fangfang², Yang Jin^{2*}¹Clinical Medical Lab, Qinghai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qinghai 810000, China;²College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Overexpression and silencing of specific microRNA (miRNA) are associated with the development and progression of colorectal cancer (CRC). Recent studies have demonstrated that the regulation of miRNA is also influenced by the polymorphism in its target site, which is implicated in the pathobiology of various cancers. In this paper, we will review the potential role of polymorphisms in microRNA target sites as genetic markers for risk assessment of cancers, with an aim to offer new insight into the study of individual difference in CRC susceptibility and pharmacogenetics.

Key words polymorphism in miRNA target sites; colorectal cancer; genetic markers

MicroRNAs(miRNAs)是一类长度约为19-24个核苷酸、较保守、且内源性表达的非编码调控小分子RNA。它在基因转录后调控中起着非常重要的作用, 通过下调基因表达广泛参与许多大肠癌(colorectal cancer, CRC)发生发展的癌基因和抑癌基因通路^[1]。最近研究发现, miRNA靶基因的多态性与许多肿瘤的发生有着密切的关系, 而大肠癌相关方面国内文献报道较少, 本文将就miRNA靶位点的多态性作为遗传标志物在肿瘤风险预警中的潜在作用作一综述, 旨在为阐明CRC易感性和药物反应性个体差异提供新的解释。

1 miRNAs的形成及作用

miRNA最早于1993年被发现, 广泛存在于真核生物中。其基因数占人类基因总数的2%~5%, 以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中, 而且绝大部分定位于基因间隔区。miRNAs分子源于细胞核内, 由最初编码miRNA的基因在RNA聚合酶的作用下转录形成初级miRNA(Pri-miRNA), 长达数千个碱基。在动物体内, Pri-miRNA转化为成熟的miRNA经历了2次连续的剪切。首先, Pri-miRNA在细胞核内被核糖核酸酶Drosha剪切, 形成具有茎环

收稿日期: 2012-12-05 接受日期: 2013-04-02

国家自然科学基金(批准号: 81272707)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-81545087, E-mail: yangjin@nwu.edu.cn

Received: December 5, 2012 Accepted: April 2, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272707)

*Corresponding author. Tel: +86 29 81545087, E-mail: yangjin@nwu.edu.cn

网络出版时间: 2013-06-09 09:41

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130609.0941.001.html>

结构的约70-100 nt的miRNA前体(Pre-miRNA)。Pre-miRNA在转运蛋白Exportin-5/Ran-GTP的作用下由核内转运到胞浆,最终被另一种酶Dicer进一步切割形成成熟miRNA,长约为21-25 nt^[2]。

成熟的miRNA通过形成RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),与靶mRNA特异匹配结合,依据序列互补的程度,采取对靶基因转录体的切割或对其翻译抑制两种机制来下调靶基因的表达。近来诸多研究发现,miRNA调控方式参与了哺乳动物细胞的生长、分化及凋亡,免疫调节及疾病的发生等几乎所有生物学过程,与肿瘤的发生、诊断、治疗和预后密切相关。

2 miRNAs与其靶位点多态的关系

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是染色体基因组水平上单个核苷酸变异引起的DNA序列多态性,miRNA靶结合区内的功能性SNP位点是导致机体内miRNA调控作用失常的重要原因之一,这代表了另一种影响人类疾病(包括CRC)危险因素的遗传变异类型^[3]。

2.1 miRNAs靶位点的预测

目前,认为miRNA可采用两种不同的调控机制^[4],其中一种是miRNA直接指导靶mRNA的切割,由于miRNA序列与靶mRNA的3'UTR或开放阅读框完全匹配。另一种调控机制是miRNA与靶mRNA的3'UTR进行不完全匹配,不影响靶mRNA的稳定,执行转录后翻译抑制的作用。

由于miRNA分布范围广泛,参与的生物学过程复杂,因此miRNA调控靶基因的确定是研究miRNA功能的基础。目前,miRNA靶基因的确定可以依据计算机生物信息学软件的预测和生物学实验方法的验证^[5-6]。根据已知的miRNA及其靶基因序列之间相互作用的规律,现已有许多用于miRNA靶位点预测的生物信息学特殊算法,如miRanda、TargetScan、RNAhybrid、DIANA-microT、PicTar及RNA22等^[7]。在选择预测算法时需要考虑的5个主要因素,即UTR数据库、miRNA数据库、结合的协同性评估、假阳性率评估及实验验证资源^[8]。

2.2 miRNAs靶位点多态对miRNAs调控的影响

近年来的研究表明,miRNAs与mRNAs的结合能力对调节靶基因的表达至关重要,而这种结合容易受到彼此序列中多态位点的影响。与miRNA自身

序列内的多态相比,其靶基因位点内SNPs的形式更加丰富,其中一些结合区附近的SNP位点对miRNA的调节也产生了很大的影响。Sethupathy等^[9]在研究AGTRI基因内一个SNP(rs5186)功能时发现,该多态发生于基因的3'UTR,且经软件预测位于miR-155结合区的下游,有可能影响靶基因mRNA与miR-155的结合。后期的体外细胞功能实验证明,当该位点为A等位基因时,miR-155与AGTRI基因mRNA的结合能力增强,从而下调了AGTRI基因表达水平;而当该位点为C等位基因时,靶基因mRNA的表达不再受miR-155的影响,表明该变异使AGTRI基因丧失了miR-155的结合位点。

事实上,miRNAs靶基因位点内的SNPs,除了可以消除现已存在的结合位点,也可以产生新的miRNA结合位点,甚至与某些特殊表型的发生相关。Clop等^[10]研究引起Texel羊群肌肉异常发育的候选基因时,利用全基因组扫描技术将其定位于2号染色体区域,通过重测序手段确定多态g.6723G>A位于GDF8基因上,且该位点位于基因的3'UTR。相对于野生型G等位基因,99%的Texel羊群都含有突变A等位基因。体外的细胞实验证实,由于A等位基因变异的产生,为miR-1及miR-206提供了结合的新靶点,进而在转录水平上抑制了GDF8基因的表达,从而促使特异表型的产生。Liu等^[11]采用大样本病例分析4个位于TNEAIP2基因3'UTR区miRNA靶位点的SNP与头颈部鳞状细胞癌的易感性之间的关系时,发现SNP(rs8126)突变CC基因型和CC/CT基因型比TT基因型显著增加了头颈部鳞状细胞癌的易感性。研究中发现,SNP(rs8126)不会影响miR-184本身的表达水平,可能该SNP影响miR-184与TNEAIP2基因mRNA的结合而导致TNEAIP2基因表达改变,这需要在以后的功能研究中证明。

2.3 miRNAs靶结合区功能性SNP位点的预测

研究靶基因3'端miRNAs结合位点多态的功能,一般首先会用特殊的计算机算法对可能会影响miRNA与mRNA之间结合能力的SNPs进行初筛;在大样本人群中进行位点的疾病关联分析,选出具有统计学意义的SNPs;最后通过体外构建表达载体,结合特异miRNA干扰,研究证实SNP对靶基因差异表达产生的生物学效应。

已有许多方法可初步预测可能的miRNAs靶结合区功能性SNP位点,如miRBase^[12]网站通过提

供相关基因序列片段,利用内部的miRNAs数据库,自动检索有可能与序列配对的miRNAs,并利用工具内设的评估值域给出相关的参考分数,用户可通过改变提供的序列来比对前后位点的影响大小;此外利用最小自由能改变的情况进行评估的平台有pknotsRG、RNAhybrid及RNAcofold等^[13-14],分别通过评估多态对靶mRNA本身空间结构、miRNA与靶mRNA序列配对结构分子稳定性的影响,进而预测是否具有生物学意义。Paun等^[15]在2009年的一项研究结果显示了*RB1CC1*基因3'UTR区T碱基的缺失可能影响了肿瘤抑制性miR-138的负调控作用,其就是利用pknotsRG软件进行的初始预测。

3 miRNA靶位点多态性与大肠癌的关系

散发性大肠癌(sCRC)是一类没有明显家族遗传倾向和家族史、由大肠黏膜上皮起源的恶性肿瘤,其患病比例约占大肠癌的70%。由于sCRC早期症状表现不明显,常漏诊、误诊而延误治疗;同时与遗传性大肠癌的早期防治相比,目前缺乏一些直接用于疾病风险预警和早期诊断的明显的遗传标志物。而从miRNA靶位点多态性角度入手,在认识和研究较少的非编码区筛查功能性SNP位点,将为解释和预测CRC疾病易感性提供新的研究方向。

3.1 miRNAs在大肠癌调控网络中的作用

大肠癌(CRC)是临床最常见的恶性肿瘤之一,CRC的发生是一个多因素、多阶段和多基因改变协同作用的过程,癌基因和抑癌基因的表达失调是CRC发生的分子基础。近年来诸多研究认为miRNAs通过多种信号通路广泛参与恶性肿瘤的发生和发展,如Wnt/ β -连环蛋白、表皮生长因子受体、胰岛素受体底物和P53信号通路等^[15]。miRNA调控网络的失常,可能会赋予细胞诸如无限增殖、抵抗凋亡、侵袭转移、促血管生成等恶性表型,与肿瘤的发生发展密切相关。

影响miRNAs与CRC关系的因素主要表现在5个方面,控制miRNA形成相关基因的多态性、miRNA自身的多态性、miRNA靶位点的多态性、表观遗传的改变及细胞微环境的改变^[16]。目前,研究miRNAs和CRC之间关系的两种常用方法,即表达谱研究和功能研究。表达图谱研究方面,诸多研究证实,在CRC发病机制中常存在特异miRNAs的过表达和表达沉默^[17]。如仅仅从“miRNAs量的改变”角度出发,不能

很全面地解释肿瘤的致病机制。而功能研究方面的成果,通过确定miRNAs在调控网络中的直接作用靶点,提出从影响miRNAs与靶mRNA结合的角度考虑,引起人们对“miRNAs调控质的改变”因素的研究^[18-19]。

3.2 miRNA靶位点多态的功能验证

目前,已发现与许多肿瘤(包括CRC)及其他疾病密切相关的3'UTR多态,有的表现为低频率的SNPs,这些位点通过特异miRNA调节,仅影响靶基因以及下游效应分子,因此引起的效应相对特异,基本包括对疾病发生风险、药物拮抗反应以及患者生存率等方面的报道。Margarita等^[20]最近在患有焦虑综合征的人群中检测到*NTRK3*基因的两个稀有SNP(0.2%),ss102661458和ss102661460被证明分别是miR-765和miR-509的种子区结合位点,实验结果显示,变异后的序列干扰了两种miRNAs对*NTRK3*基因的负调控作用,增加了受体蛋白在细胞中的表达,进而参与疾病的发生。Kontorovich等^[21]研究表明,结合在*ATF1*基因3'端rs11169571的miRNA-320家族分子,参与乳腺癌和卵巢癌的发生。Mishra等^[22]研究位于*DHFR*基因3'UTR miR-24靶结合序列下游14 bp处的SNP-829C>T位点时,发现其与二氢叶酸还原酶表达增加相关,突变型等位基因T可影响miR-24与mRNA的结合能力,减弱了miR-24的负调控作用,体内二氢叶酸还原酶表达水平增高,从而导致对抗肿瘤药物甲氨喋呤的抵抗。let-7是CRC发生发展的重要调控因子,其可通过抑制细胞生长促进细胞凋亡发挥抑癌基因的作用^[23],let-7靶基因*KRAS* 3'UTR存在一多态位点*KRAS-LCS6*(rs61764370),这一SNP并不会提高人们患CRC的风险,但能引起*KRAS*的过表达^[24-26]。同时,Graziano等^[27]研究*KRAS*基因3'UTR调控区内*KRAS-LCS6*多态位点功能时,研究数据表明该多态位点与依赖EGFR治疗sCRC病人的存活率相关。携带*KRAS-LCS6*的CRC患者生存时间明显延长,且携带不同基因型的CRC患者临床治疗效果也存在差异。

成熟miRNA的SNP与肿瘤易感性和预后转归密切相关。研究显示,miR-196a2基因C/T多态(rs11614913)与多种恶性肿瘤患癌风险增加相关。在CRC患者中,该多态的C等位基因是肿瘤风险因子,相关SNP在韩国人和中国人群中均与CRC肿瘤易感性增加有关,CC基因型的韩国人群患癌风险显著高于TT/CT型人群,这一相关在非糖尿病患者和直肠癌患者中尤为显著,在中国人群中则表现为CT/CC基因型

人群的患病风险显著高于TT基因型人群,在进展期(Dukes C和D) CRC患者中,这一风险因子作用尤为显著。而在CRC发病率极高的高加索人群中,这一多态位点并不与该人群的患病风险具有显著相关性^[28]。

结直肠癌相关miRNA的表观遗传调控作用miRNA对DNA翻译后修饰(如甲基化)具有一定的调控作用,而表观遗传状态的改变与肿瘤发生关系密切。最新研究揭示,miR-342靶向DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1),抑制其表达,通过去甲基化作用激活一系列下游基因,诱导细胞周期阻滞,进而抑制细胞增殖。然而,在结直肠癌细胞系及癌组织中观察到miR-342表达下降,而DNA高甲基化修饰,可见miRNA能够调节DNA甲基化,从而调控结直肠癌的发生过程^[29]。

3.3 miRNA靶位点多态性与大肠癌的患病风险

对大肠癌来讲,考虑到sCRC易感性的影响范围及临床特殊性,目前主要针对该类人群及候选基因展开miRNA靶位点多态性的筛查。Landi等^[30]在2008年通过大样本人群病例-对照研究发现了与捷克人群患sCRC风险相关的miRNA靶位点多态,其首先选择了104个候选基因,利用8种计算机生物信息分析工具(PicTar、DianaMicroT、miRBase、miRanda、TargetScan及microInspector),模拟预测出57个位于特定miRNAs结合位点的SNPs,通过比较SNP对miRNAs结合前后自由能改变的大小,选出8个位点在1 321个捷克人群中进行关联分析,研究结果表明,CD86基因C/G多态(rs17281995)和INSR基因(rs1051690)与捷克人群患sCRC的危险性显著相关,其miRNAs靶位点SNPs变异纯合子可能增加患病的相对风险值分别为2.74和1.94。Lin等^[31]针对1 097例CRC患者进行回顾性分析,发现miR-219-1和miR-608基因多态均与接受过联合化疗的TNMIII期CRC患者的死亡率显著相关,其中miR-608基因T/C多态(rs213210)和miR-608基因C/G多态(rs4919510)两者任一发生即可使CRC患者死亡率增加2.51倍,而当两种SNP共存的情况下,CRC患者死亡率增加了5.6倍,提示多重SNP可能会对接受联合化疗的进展期CRC患者预后产生叠加影响,相关联系的具体分子机制还有待于功能学实验的进一步探索。

2010年, Landi等^[32]进一步将实验结果的关联性扩大到巴西CRC患者人群中,并进一步追加了体外功能实验的验证。通过构建携带SNP 3'UTR

片段的荧光素酶报告基因载体,在HeLa细胞系中进行miRNAs干预表达分析,结果证实了CD86(rs17281995)和INSR(rs1051690)两个SNP多态位点分别影响了miR-582-3p和miR-618的负调控作用,并在疾病发生发展过程中影响着淋巴细胞共同刺激性配体和胰岛素受体的表达水平。

针对目前miRNAs靶位点多态性的研究热潮,2011年Landi等^[33]以大肠癌为例设计出一套用于预测可能有功能性的miRNAs靶位点多态的实验方案,首先利用5种计算机分析算法(miRBase、miRanda、PicTar、Diana-MicroT及TargetScan Human)预测140个CRC候选基因可能存在的miRNAs靶位点,结合dbSNP数据库确定位于miRNAs靶位点内的SNPs,以此排除了109个候选基因,剩余31个基因中存在61个这样的SNPs;排除其中在高加索人群中最小等位基因频率低于0.24的,剩余38个SNPs位点;利用RNAfold软件计算多态位点对每个结合的miRNA引起的自由能改变值,最终利用每个SNP对结合其上的所有miRNAs产生的改变自由能绝对总和进行排序,绝对值总和越大的说明其对miRNAs靶位点产生影响力的可能性越大。然而这些SNPs的生物学意义仍需要在人群中进行关联分析,并最终通过体外功能性实验加以明确。

4 问题与展望

由于SNPs在不同人群中出现的频率不同,人群关联分析的结果具有很明显的地域性、种群性及个体差异性,因此在利用关联分析初筛miRNA靶位点多态时必须要考虑研究人群样本的特异性。我国人口众多,CRC发病率很高,且多数表现为没有明显家族遗传倾向,临床诊断较难的sCRC,而且国外这方面的报道仍缺乏较多的体外功能实验,所以在我国开展相关方面的研究可为确定大肠癌易感人群提供更多风险预警的遗传标志物,并为以后在CRC发病机制中阐明复杂的miRNAs调控网络提供理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Manne U, Shanmugam C, Bovell L, Katkooori VR, Bumpers HL. miRNAs as biomarkers for management of patients with colorectal cancer. *Biomark Med* 2010; 4(5): 761-70.
- 2 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 259-69.
- 3 Rossi S, Kopetz S, Davuluri R, Hamilton SR, Calin GA. MicroRNAs, ultraconserved genes and colorectal cancers. *Int J*

- Biochem Cell Biol 2010; 42(8): 1291-7.
- 4 刘利英, 徐纪茹, 宋土生, 黄辰. miRNA及其靶位点多态性的研究进展. 遗传(Liu Liying, Xu Jiru, Song Tusheng, Huang Chen. Progress of polymorphism in microRNA and microRNA target sites. Hereditas) 2010; 32(11): 1091-6.
- 5 夏伟, 曹国军, 邵宁生. MicroRNA靶基因的寻找及鉴定方法研究进展. 中国科学(Xia Wei, Cao Guojun, Shao Ningsheng. Science China) 2009; 39(1): 121-8.
- 6 Kim S, Choi M, Cho KH. Identifying the target mRNAs of microRNAs in colorectal cancer. Comput Biol Chem 2009; 33(1): 94-9.
- 7 侯妍妍, 应晓敏, 李伍举. microRNA计算发现方法的研究进展. 遗传(Hou Yanyan, Ying Xiaomin, Li Wujun. Computational approaches to microRNA discovery. Hereditas) 2008; 30(6): 687-96.
- 8 John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human microRNA targets. PLoS Biol 2004; 2(11): e363.
- 9 Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, *et al.* Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: A mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. Am J Hum Genet 2007; 81(2): 405-13.
- 10 Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, *et al.* A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat Genet 2006; 38(7): 813-8.
- 11 Liu Z, Wei S, Ma H, Zhao M, Myers JN, Weber RS, *et al.* A functional variant at the miR-184 binding site in TNFAIP2 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Carcinogenesis 2011; 32(11): 1668-74.
- 12 Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. MiRBase: MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res 2006; 34 (Database issue): 140-4.
- 13 Reeder J, Steffen P, Giegerich R. pknotsRG: RNA pseudoknot folding including near-optimal structures and sliding windows. Nucleic Acids Res 2007; 35(Web Server issue): 320-4.
- 14 Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. RNA 2004; 10(10): 1507-17.
- 15 Paun BC, Cheng Y, Leggett BA, Young J, Meltzer SJ, Mori Y. Screening for microsatellite instability identifies frequent 39-untranslated region mutation of the RB1-inducible coiled-coil 1 gene in colon tumors. PLoS One 2009; 4(11): e7715.
- 16 杨建军, 马延磊, 秦环龙. microRNAs调控网络在大肠癌发病机制中的研究进展. 世界华人消化杂志(Yang Jianjun, Ma Yanlei, Qin Huanlong. Advances in understanding the role of microRNA regulatory network in the pathogenesis of colorectal cancer. World Chinese Journal of Digestology) 2010; 18(14): 1478-84.
- 17 Bandres E, Agirre X, Bitarte N, Ramirez N, Zarate R, Roman-Gomez J, *et al.* Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. Int J Cancer 2009; 125(11): 2737-43.
- 18 Liu M, Lang N, Chen X, Tang Q, Liu S, Huang J, *et al.* miR-185 targets RhoA and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells. Cancer Lett 2011; 301(2): 151-60.
- 19 Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. Oncogene 2008; 27(15): 2128-36.
- 20 Muiños-Gimeno M, Guidi M, Kagerbauer B, Martín-Santos R, Navinés R, Alonso P, *et al.* Allele variants in functional microRNA target sites of the neurotrophin-3 receptor gene (NTRK3) as susceptibility factors for anxiety disorders. Hum Mutat 2009; 30(7): 1062-71.
- 21 Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M, Nir U, Friedman E. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. Int J Cancer 2010; 127(3): 589-97.
- 22 Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. A miR-24 microRNA binding site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(33): 13513-8.
- 23 Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. Endocr Relat Cancer 2010; 17(1): F19-36.
- 24 Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, *et al.* A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. Cancer Res 2008; 68(20): 8535-40.
- 25 Zhang W, Winder T, Ning Y, Pohl A, Yang D, Kahn M, *et al.* A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. Ann Oncol 2011; 22(1): 104-9.
- 26 Ruzzo A, Graziano F, Vincenzi B, Canestrari E, Perrone G, Galluccio N, *et al.* High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. Oncologist 2012; 17(6): 823-9.
- 27 Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, Ruzzo A, Galluccio N, Santini D, *et al.* Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. Pharmacogenomics J 2010; 10(5): 458-64.
- 28 Zhu L, Chu H, Gu D, Ma L, Shi D, Zhong D, *et al.* A functional polymorphism in miRNA-196a2 is associated with colorectal cancer risk in a Chinese population. DNA Cell Biol 2012; 31(3): 350-4.
- 29 Wang H, Wu J, Meng X, Ying X, Zuo Y, Liu R, *et al.* MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. Carcinogenesis 2011; 32(7): 1033-42.
- 30 Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L, *et al.* Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. Carcinogenesis 2008; 29(3): 579-84.
- 31 Lin M, Gu J, Eng C, Ellis LM, Hildebrandt MA, Lin J, *et al.* Genetic polymorphisms in MicroRNA related genes as predictors of clinical outcomes in colorectal adenocarcinoma patients. Clin Cancer Res 2012; 18(14): 3982-91.
- 32 Landi D, Moreno V, Guino E, Vodicka P, Pardini B, Naccarati A, *et al.* Polymorphisms affecting micro-RNA regulation and associated with the risk of dietary-related cancers: A review from the literature and new evidence for a functional role of rs17281995 (CD86) and rs1051690 (INSR), previously associated with colorectal cancer. Mutat Res 2011; 717(1/2): 109-15.
- 33 Landi D, Barale R, Gemignani F, Landi S. Prediction of the biological effect of polymorphisms within microRNA binding sites. Methods Mol Biol 2011; 676(2): 197-210.