

Dicer1 基因单核苷酸多态性与浙江地区 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌的相关性研究

曹文明¹, 高 赞^{1,2}, 杨红健¹, 谢尚闹¹, 孟旭莉¹, 潘志文¹, 陈占红¹,
黄 健¹, 叶魏武¹, 邵喜英¹, 王晓稼¹

(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室, 浙江杭州 310022; 2. 浙江省肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022)

摘 要: [目的] 研究 *Dicer1* 基因单核苷酸多态性与浙江地区 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌易感性的相关性。[方法] 选择 3 个单核苷酸多态性位点(rs74899136, rs2297730 和 rs147668333), 采用 PCR 测序方法对 65 例 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌患者和 100 名健康女性进行分析, χ^2 检验比较两组在等位基因和基因型分布频率上的差异, 非条件 Logistic 回归评价多态性位点与乳腺癌易感性的相关性。[结果] rs2297730 的 G 等位基因和 A/G 基因型在乳腺癌病例组中的分布频率显著高于对照组 (OR=1.873, 95%CI: 1.174~2.988, $P=0.008$; OR=3.133, 95%CI: 1.562~6.287, $P=0.004$)。另外 2 个多态性位点等位基因和基因型分布频率在两组间无显著差异 ($P>0.05$)。rs2297730 在共显性、显性、超显性以及加性遗传模式下与乳腺癌相关 ($P<0.05$), 最佳遗传模式为显性。[结论] *Dicer1* 基因 rs2297730 与浙江地区 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌易感性相关。

关键词: 乳腺肿瘤; 家族性疾病; *Dicer1*; 单核苷酸多态性; 浙江; *BRCA1/BRCA2*

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)05-0364-05

Association of the Single Nucleotide Polymorphism in *Dicer1* Gene with *BRCA1/BRCA2* Negative Familial Breast Cancer Patients from Zhejiang Province

CAO Wen-ming¹, GAO Yun^{1,2}, YANG Hong-jian¹, et al.

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis & Treatment Technology on Thoracic Oncology (Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China; 2. Zhejiang Cancer Research Institute, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the association between single nucleotide polymorphism (SNP) of *Dicer1* gene and susceptibility to *BRCA1/BRCA2* negative familial breast cancer in Zhejiang. [Methods] Polymerase chain reaction-sequencing assay was employed to detect 3 SNPs (rs74899136, rs2297730 and rs147668333) of *Dicer1* in 65 *BRCA1/BRCA2* negative familial breast cancer patients and 100 controls. χ^2 test was used to compare the distributions of allele and genotype frequencies between breast cancer group and control group. The association of the SNPs and susceptibility to breast cancer was examined by non-conditional Logistic regression. [Results] The frequencies of G allele and A/G genotype of rs2297730 (IVS12-91 A>G) were higher in familial breast cancer group than those in control group (OR=1.873, 95%CI: 1.174~2.988, $P=0.008$; OR=3.133, 95%CI: 1.562~6.287, $P=0.004$). No significant difference between breast cancer patients and controls was observed in the allele and genotype distribution of other 2 SNPs ($P>0.05$). According to the minimum value of Akaike's Information Criterion (AIC), the best genetic model for rs2297730 was dominant. [Conclusion] *Dicer1* rs2297730 is associated with risk of *BRCA1/BRCA2* negative familial breast cancer in Zhejiang.

Subject words: breast neoplasms; familial disease; *Dicer1*; single nucleotide polymorphism; Zhejiang; *BRCA1/BRCA2*

据估计, 2008 年中国乳腺癌发病率为 21.6/10 万,

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金(2007A023 和 2012RCB006);
浙江省中医药科技计划项目(2012RCB006)

通讯作者: 王晓稼, 主任, 主任医师, 硕士生导师, 博士; 浙江省肿瘤医院乳腺肿瘤内科, 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号 (310022); E-mail: wxj88851@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2013-01-29; **修回日期:** 2013-03-18

居女性所有恶性肿瘤之首, 死亡率为女性恶性肿瘤的第 6 位^[1]。流行病学研究发现乳腺癌是一种遗传易感性肿瘤^[2]。国际上迄今已有 10 余个高、中外显率基因突变被证实与遗传性乳腺癌的发病相关, 如 *BRCA1*、*BRCA2*、*tp53* 和 *RAD51C* 等^[3,4], 这些基因大

部分参与维持基因组稳定。在中国人群中,这些基因突变只能解释不到 20%的家族性乳腺癌的病因^[5,6]。大部分家族性乳腺癌的发生可能与低外显率基因的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)相关,虽然全基因组关联分析已发现一部分乳腺癌的低外显率易感基因,但是大部分乳腺癌的遗传因素仍未被证实^[7-9]。

miRNA 是一组内源性非编码短 RNA,通过结合 mRNA 的 3'端非编码区调节基因的转录后翻译^[10]。在多种肿瘤组织包括乳腺癌中 miRNA 的表达发生异常,而且特异性的 miRNA 亚群可区分不同的肿瘤亚型^[11,12]。miRNA 的表达调控机制是近年研究的热点,其异常表达受多种因素的影响,其中 miRNA 合成通路酶基因的变异是一个重要原因。

人类 *Dicer1* 基因于 2000 年被克隆,定位于 14q32.13, *Dicer* 蛋白是 RNAase III 家族成员,是 miRNA 生成关键酶,在细胞质中将 pre-miRNA 剪切成成熟 miRNA^[13]。*Dicer1* 是一种单倍体不足抑癌基因^[14-16],在多种肿瘤包括乳腺癌中表达常降低^[17-20]。2009 年, Hill 等^[21]首次证实 *Dicer1* 是家族性肺胸膜母细胞瘤的易感基因。随后, *Dicer1* 被证实与多种肿瘤的发病相关。目前已有报道,在 *Dicer1* 突变家系中,有乳腺癌发生^[22,23]。因此,我们推测 *Dicer1* 可能也是乳腺癌的易感基因。

本研究采用 PCR 测序方法检测浙江地区 *BRCA1/BRCA2* 突变阴性家族性乳腺癌患者以及健康对照人群的 *Dicer1* 基因多态性位点,旨在探究 *Dicer1* 基因多态性与 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌发病风险的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2007 年 9 月至 2010 年 11 月在浙江省肿瘤医院就诊的家族性乳腺癌患者 65 例,经组织病理学证实,符合家族性乳腺癌标准:家系中至少有 2 个一级或者二级亲属患乳腺癌,不考虑年龄因素。所有患者通过直接测序法已排除存在 *BRCA1* 和 *BRCA2* 的

胚系致病性突变,肿瘤家族史通过医学记录、标准问卷获得,并且由家族其他成员和患者确认。100 名健康对照女性为浙江省肿瘤医院健康体检者,排除个人和家庭成员的肿瘤病史。所有被检测的患者都签署基因检测知情同意书,该研究得到浙江省肿瘤医院伦理委员会批准同意。

1.2 *Dicer1* SNP 检测

1.2.1 DNA 提取

收集受试者外周血,使用 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany) 提取基因组 DNA (按照说明书操作),提取的 DNA 保存于 -80℃ 备用。

1.2.2 引物设计及合成

选择 3 个 SNP 位点:rs74899136 (IVS10:43 G>A)、rs2297730 (IVS12:91 A>G) 和 rs147668333 (IVS18:60 T>C)。根据 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查取 *Dicer1* 基因组序列 (NC_000014.8)。所有引物及条件参照文献^[21] (Table 1)。引物由 Invitrogen 公司合成。

Table 1 Primers for the 3 SNPs in *Dicer1* gene

SNP_ID	Name	Sequence of primer	Product size (bp)
rs74899136	F1	AAC TTTTATTGCTGCACGATACTG	760
	R1	AGCAGGTTACTTTGGAGTACTGAAG	
rs2297730	F2	AAGTGTTTCATGGTGCATGATTC	585
	R2	TTTACTAGGCAGGACTTTTAAAGATG	
rs147668333	F3	TTTGTGTGCAAAGCATCTCC	589
	R3	TGTAAAGGTGCCATTTAGCTTC	

1.2.3 PCR 扩增及产物测序

总体积为 20μl 的 PCR 反应体系包括:10~20ng 基因组 DNA, 0.2mmol/L dNTP, 2.0mmol/L MgCl₂, 1.0× PCR buffer, 正反向引物各 0.2pmol 和 1.25 单位 DNA 聚合酶 (TaKaRa, 日本)。反应条件如下:95℃ 5min 预变性,随后进行 14 个循环 (94℃ 30s 变性, 63℃ 45s 退火, 70℃ 45s 延伸), 20 个循环 (94℃ 30s 变性, 56℃ 45s 退火, 70℃ 45s 延伸), 最后进行 70℃ 延伸 10min。PCR 产物在 ABI 3130xl 自动测序仪上进行测序 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。

1.3 统计学处理

采用统计学软件 SPSS17.0 版本 (Chicago, USA) 以及在线软件 SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) 进行统计分析。独立样本 *t* 检验比较平均年龄。 χ^2 检验 SNP 位点在各组中是否符合 Hardy-

Weinberg Equilibrium(HWE),当 $P>0.05$ 时表示采样符合 HWE。采用 χ^2 检验比较病例组和对照组在等位基因和基因型上的差异,当 $P<0.05$ 时认为有统计学差异。非条件 Logistic 回归评价多态性位点与乳腺癌易感性的相关性。

2 结 果

2.1 病例特征

总共有 65 个 *BRCA1/BRCA2* 突变阴性的家族性乳腺癌先证者接受 *Dicer1* 基因多态性分析。65 个乳腺癌家系平均每个家系发生乳腺癌 2.4 例。乳腺癌先证者的发病年龄为 22~74 岁,年龄在乳腺癌组与健康对照组间无统计学差异(42.8 ± 1.3 岁 vs 44.9 ± 0.9 岁, $P=0.15$)。家系中乳腺癌以外最常见的恶性肿瘤为胃癌 8 例,其次肺癌 7 例,结直肠癌和卵巢癌各 6 例,子宫内膜癌 5 例,多发性骨髓瘤、脑部肿瘤和肝癌各 2 例,另外膀胱癌、胆管癌、骨肉瘤、食管癌和纵隔恶性肿瘤各 1 例。

2.2 SNP 分析

分析 3 个多态性位点(rs74899136,rs2297730,rs147668333)与家族性乳腺癌发生的相关性,所有 SNPs 的等位基因分布在对照组人群中达到 Hardy-Weinberg 遗传平衡($P>0.05$)(Table 2)。

对这 3 个多态性位点的等位基因进行分析,发现 rs2297730 位点的 G 等位基因在乳腺癌病例组中的分布频率高于对照组,并且在两组之间具有显著性差异 (OR=1.873,95%CI: 1.174~2.988, $P=0.008$)。另外 2 个多态性位点的等位基因频率在乳腺癌病例组和对照组间的分布无显著性差异($P>0.05$)(Table 2)。

对这 3 个多态性位点的基因型进行分析,发现 rs2297730 位点的 A/G 基因型在乳腺癌病例组中的分布频率高于对照组,并且在两组之间具有显著性差异 (OR =3.133,95% CI: 1.562~6.287, $P=0.004$),而 G/G 基因型在两组间无统计学差异($P>0.05$)。

另外 2 个多态性位点的基因型分布频率在乳腺癌病例组和对照组间无显著性差异($P>0.05$)(Table 3)。

采用 Logistic 回归方法分析 rs2297730 的 5 个遗传模式,发现该 SNP 位点在共显性、显性、超显性以及加性遗传模式下与乳腺癌相关($P<0.05$)。根据 Akaike's Information Criterion(AIC),最佳的遗传模式为显性(Table 4)。

3 讨 论

Dicer 酶在个体的生长发育中发挥重要作用,Dicer 缺失的胚胎干细胞在发育早期即失去干细胞特性,说明 Dicer 在生命早期发育过程中是不可或缺的^[24]。*Dicer1* 是一种单倍体不足抑癌基因,在肿瘤中为单等位基因缺失,而双等位基因都缺失时肿瘤的侵袭性反而减弱,这与 *RB1* 等抑癌基因不同^[25],不符合抑癌基因经典的二次敲除假说^[14,16]。当 *Dicer1* 发生胚系突变后,在肿瘤中仍保存一条正常功能的等位基因,引起整体 miRNA 表达水平的变化,而

Table 2 Distribution of *Dicer1* SNPs allele frequencies in the breast cancer group (n=65) and control group (n=100) in a Chinese population

SNP_ID	Allele	Control(%)	Case(%)	P	OR (95%CI)
rs74899136	G	192(96)	124(95)	0.786	1.000
	A	8(4)	6(5)		1.161(0.393~3.428)
	HWE(P)	1	1		
rs2297730	A	145(72)	76(58)	0.008	1.000
	G	55(28)	54(42)		1.873(1.174~2.988)
	HWE(P)	1	0.011		
rs147668333	T	194(97)	124(95)	0.642	1.000
	C	6(3)	6(5)		1.565(0.494~4.960)
	HWE(P)	1	1		

SNP: single nucleotide polymorphism;HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium;
OR: odd ratio;CI: confidence interval.

Table 3 Distribution of *Dicer1* SNPs genotype frequencies in the breast cancer group (n=65) and control group (n=100) in a Chinese population

SNP_ID	Genotype	Control(%)	Case(%)	P	OR (95%CI)
rs74899136	G/A	92(92)	59(91)	0.782	1.000
	G/G	8(8)	6 (9)		1.169(0.386~3.541)
rs2297730	A/A	52(52)	17(26)	0.004* 0.113*	1.000
	A/G	41(41)	42(65)		3.133(1.562~6.287)
	G/G	7(7)	6(9)		2.622(0.774~8.882)
rs147668333	T/T	94(94)	59(91)	0.435	1.000
	T/C	6(6)	6(9)		1.593(0.491~5.172)

SNP: single nucleotide polymorphism;OR: odd ratio;CI: confidence interval;*:comparing with genotype A/A.

Table 4 The association of polymorphism rs2297730 with *BRCA1/BRCA2* negative familial breast cancer cases in a Chinese population using Logistic regression

Model	Genotype	Control (%)	Case (%)	OR (95%CI)	P	AIC	BIC
Codominant	A/A	52(52)	17(26)	1.00	0.004	216.0	225.4
	A/G	41(41)	42(65)	3.13(1.56~6.29)			
	G/G	7(7)	6(9)	2.62(0.77~8.88)			
Dominant	A/A	52(52)	17(26)	1.00	0.001	214.1	220.3
	A/G-G/G	48(48)	48(74)	3.06(1.55~6.03)			
Recessive	A/A-A/G	93(93)	59(91)	1.00	0.610	225.0	231.2
	G/G	7(7)	6(9)	1.35(0.43~4.22)			
Overdominant	A/A-G/G	59(59)	23(35)	1.00	0.003	216.4	222.6
	A/G	41(41)	42(65)	2.63(1.38~5.01)			
Log-additive	-	-	-	2.12(1.25~3.60)	0.004	217.1	223.3

OR: odd ratio; CI: confidence interval; AIC: Akaike's Information Criterion; BIC: Bayesian Information Criterion.

miRNA 调控人类约 30%左右基因的表达,这些后续事件导致肿瘤的发生。因为参与肿瘤发生的整个过程中需要较多基因的参与,因此 *Dicer1* 胚系突变携带者的肿瘤发生风险相对较低^[22]。而且基因突变相关肿瘤主要为相对少见的肿瘤,如肺胸膜母细胞瘤^[21~23,26]、家族性囊性肾瘤^[22,23,27]和卵巢性索间质瘤^[22,23,26,28]等。

常见恶性肿瘤与 *Dicer1* 变异的相关性研究主要集中在 SNP 研究。已证实 *Dicer1* SNP 位点 rs3742330 和 rs13078 与膀胱癌^[29]、食管癌^[30]、肾癌^[31]和肝癌^[32]的易感性无关。而 rs3742330 A/G 和 G/G 基因型增加口腔癌癌前病变的发生风险^[33],rs1057035 T/G 基因型降低头颈部肿瘤的发生风险^[34]。

在乳腺癌的易感性研究中,已有多个 miRNA 合成酶基因的 SNP 被证实与乳腺癌发生相关。Sung 等^[35]分析 559 例韩国女性乳腺癌和 567 名健康对照女性,总共 14 个 miRNA 合成通路酶基因的 41 个 SNP 位点,发现 *AGO1* rs595055 GA/AA 基因型和 *AGO2* rs3864659 降低乳腺癌风险,而 p68 rs1991401 包含 G 的基因型增加乳腺癌风险。在该研究中同时分析 *Dicer1* 的 2 个 SNP 位点(rs1057035 和 rs2282265),未发现与乳腺癌的发生存在相关性。在乳腺癌生存相关性研究中^[36],发现 *AGO2* 的 rs11780640、rs2292779 和 *Dicer1* 的 rs1057035 与乳腺癌患者无病生存期和总生存期相关;*HIWI* 的 rs4759659、rs11060845 和 *DGCR8* 的 rs9606250 仅与乳腺癌患者无病生存期相关;另外 *DROSHA* rs874332 和 *GEMIN4* rs4968104 与总生存期相关。说明 miRNA 合成通路酶基因既影

响乳腺癌发生,又影响生存。

本研究分析 3 个 SNP 位点(rs74899136、rs2297730 和 rs147668333)在 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌病例组和健康对照组间的分布频率,提示 rs2297730 (IVS12-91 A>G) 在两组间存在显著性差异,等位基因 G (OR=1.873,95%CI: 1.174~2.988, P=0.008) 和基因型 A/G (OR=3.133,95%CI:1.562~

6.287,P=0.004) 在乳腺癌病例组中的分布频率明显增高,说明该 SNP 位点与 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌相关,增加这类乳腺癌的发生风险,并且主要以显性模式遗传。其他 2 个 SNPs 位点与乳腺癌的发生不存在显著相关性(P>0.05)。Rotunno 等^[37]分析 *Dicer1* rs2297730 与意大利人群的肺癌相关性,发现 G 等位基因在肺癌病例组和健康对照组的分布频率分别为 8.7%(334/3 854)和 8.1%(316/3 902),明显低于本研究所报道的分布频率(乳腺癌组和健康对照组分别为 42%和 28%);基因型 A/G 与肺癌的发生风险 (OR=1.12,95%CI: 0.91~1.39,P=0.2819) 以及生存 (HR=0.95,95%CI: 0.82~1.10,P=0.5113) 均不存在显著相关性。说明 rs2297730 在不同种族中的分布频率不同,并且影响不同肿瘤的发生。

通过对 65 例浙江地区 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌患者的 *Dicer1* 基因 SNP 分析,证实 SNP 位点 rs2297730 与 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌的发生相关,可增加这部分人群的乳腺癌发生风险。这是首次在浙江地区 *BRCA1/BRCA2* 阴性家族性乳腺癌中研究 *Dicer1* SNP 与乳腺癌的发生风险。所证实的乳腺癌相关 SNP 位点将有助于将来乳腺癌高危人群的筛查。

参考文献:

[1] Dai M, Ren JS, Li N, et al. Estimation and prediction on cancer related incidence and mortality in China, 2008 [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2012, 33(1): 57-61. [代敏, 任建松, 李霓, 等. 中国 2008 年肿瘤发病和死亡情况估计及预测[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(1): 57-61.]

- [2] Warner E. Clinical practice. Breast cancer screening [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(11): 1025–1032.
- [3] Ripberger T, Gadzicki D, Meindl A, et al. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counseling [J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(6): 722–731.
- [4] Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(5): 410–414.
- [5] Cao W, Wang X, Li JC. Study of hereditary breast cancer in the Han Chinese population [J]. *J Epidemiol*, 2013, 23(2): 75–84.
- [6] Cao W, Wang X, Gao Y, et al. BRCA1 germ-line mutations and tumor characteristics in eastern Chinese women with familial breast cancer [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2013, 296(2): 273–278.
- [7] Fletcher O, Johnson N, Orr N, et al. Novel breast cancer susceptibility locus at 9q31.2: results of a genome-wide association study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(5): 425–435.
- [8] Turnbull C, Ahmed S, Morrison J, et al. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(6): 504–507.
- [9] Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF, et al. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(26): 2796–2803.
- [10] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(2): 102–114.
- [11] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857–866.
- [12] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834–838.
- [13] Macrae IJ, Zhou K, Li F, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer [J]. *Science*, 2006, 311(5758): 195–198.
- [14] Kumar MS, Pester RE, Chen CY, et al. Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(23): 2700–2704.
- [15] McCarthy N. Cancer: small losses, big gains with microRNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(1): 8.
- [16] Lambertz I, Nittner D, Mestdagh P, et al. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(4): 633–641.
- [17] Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(25): 2641–2650.
- [18] Dedes KJ, Natrajan R, Lambros MB, et al. Down-regulation of the miRNA master regulators Drosha and Dicer is associated with specific subgroups of breast cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(1): 138–150.
- [19] Karube Y, Tanaka H, Osada H, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(2): 111–115.
- [20] Yan M, Huang HY, Wang T, et al. Dysregulated expression of dicer and drosha in breast cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(2): 343–348.
- [21] Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, et al. Dicer1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma [J]. *Science*, 2009, 325(5943): 965.
- [22] Slade I, Bacchelli C, Davies H, et al. Dicer1 syndrome: clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumor predisposition syndrome [J]. *J Med Genet*, 2011, 48(4): 273–278.
- [23] Foulkes WD, Bahubeshi A, Hamel N, et al. Extending the phenotypes associated with Dicer1 mutations [J]. *Hum Mutat*, 2011, 32(12): 1381–1384.
- [24] Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, et al. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(34): 12135–12140.
- [25] Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1(2): 157–162.
- [26] Schultz KA, Pacheco MC, Yang J, et al. Ovarian sex cord-stromal tumors, pleuropulmonary blastoma and Dicer1 mutations: a report from International Pleuropulmonary Blastoma Registry [J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(2): 246–250.
- [27] Bahubeshi A, Bal N, Rio Frio T, et al. Germline Dicer1 mutations and familial cystic nephroma [J]. *J Med Genet*, 2010, 47(12): 863–866.
- [28] Rio Frio T, Bahubeshi A, Kanellopoulou C, et al. Dicer1 mutations in familial multinodular goiter with and without ovarian Sertoli-Leydig cell tumors [J]. *JAMA*, 2011, 305(1): 68–77.
- [29] 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.
- [30] Ye Y, Kang KK, Gu J, et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2008, 1(6): 460–469.
- [31] Horikawa Y, Wood CG, Yang H, et al. Single nucleotide polymorphism of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23): 7956–7962.
- [32] Li YC, Song CH, Yang WJ, et al. Correlation between tag single nucleotide polymorphisms of microRNA regulatory genes and the genetic susceptibility of primary liver cancer [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2012, 46(6): 533–537. [李玉春, 宋春花, 杨文杰, 等. 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 [J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(6): 533–537.]
- [33] Clague J, Lippman SM, Yang H, et al. Genetic variation in microRNA genes and risk of oral premalignant lesions [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(2): 183–189.
- [34] Ma H, Yuan H, Yuan Z, et al. Genetic variations in key microRNA processing genes and risk of head and neck cancer: a case-control study in Chinese population [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47544.
- [35] Sung H, Lee KM, Choi JY, et al. Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and risk of breast cancer: a case-control study in Korea [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(3): 939–951.
- [36] Sung H, Jeon S, Lee KM, et al. Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer survival [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 195.
- [37] Rotunno M, Zhao Y, Bergen AW, et al. Inherited polymorphisms in the RNA-mediated interference machinery affect microRNA expression and lung cancer survival [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(12): 1870–1874.