论著

文章编号:1000-5404(2014)12-1312-05

108例汉族人群let-7a基因调控区多态性与糖尿病肾病的相关性分析

周 吉[1*],彭 睿[2*],罗勇军[3],李天驹[4],孙 艳[1],尹 频[1],彭惠民[5],张 政[1] (400016 重庆,重庆医科大学:分子医学与肿瘤研究中心细胞生物学及遗传学教研室[1],生物信息学教研室[2],附属第一医院感染科[4],实验教学中心[5];400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系军事医学地理学教研室[3])

[摘要] **目的** 探寻循环miRNA let-7a与糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)的关系,分析并评估let-7a调控区域单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)对DN疾病的易感性。**方法** Real-time PCR检测病例组及对照组中let-7a的表达水平。生物信息学方法预测并筛选3个位于let-7a前体(let-7a-2)启动子调控区域标签SNP(Tag SNP),采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(RFLP-PCR)法对108例糖尿病肾病(DN)、104例糖尿病(DM)患者及62例健康人对照(CON)3个SNP进行基因分型。**结果** Real-time PCR结果显示let-7a在DN、DM、CON三组中表达水平有显著差异($P<0.05$)。let-7a-2基因调控区域rs1143770多态位点的CT杂合子基因型在DN、DM、CON三组间有显著差异($P<0.05$),且在DM组和DN组CT+TT两基因型均依次较CON组显著升高($P=0.049$;$P=0.001$)。**结论** miRNA let-7a可能参与调控DN疾病,其启动子调控区rs1143770多态与中国汉族人群糖尿病肾病相关,可能是个潜在的功能位点。

[关键词] 糖尿病肾病;miRNA;let-7a;单核苷酸多态性

[中图法分类号] R363.25;R587.2;R690.02 [文献标志码] A

Correlation of single nucleotide polymorphism of let-7a gene regulatory region with diabetic nephropathy in 108 cases of Chinese Han population

Zhou Ji[1*], Peng Rui[2*], Luo Yongjun[3], Li Tianju[4], Sun Yan[1], Yin Pin[1], Peng Huimin[5], Zhang Zheng[1] ([1]Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine & Cancer Research Center, [2]Department of Bioinformatics, [5]Experimental Teaching Center, [4]Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016;[3]Department of Military Medical Geography, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the relationship between the circulating miRNA let-7a and diabetic nephropathy (DN), and to evaluate the susceptibility of the single nucleotide polymorphism (SNP) of let-7a regulatory region to DN. **Methods** Real-time PCR was carried out to detect the expression level of let-7a in the patients and control groups. We used bioinformatics methods to predict and filter out 3 Tag SNPs in let-7a gene promoter regulatory region. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) was executed to genotype 108 DN patients (DN group), 104 patients with diabetes (DM group) and 62 cases of healthy controls (CON group). **Results** Real-time PCR results showed that the expression level of let-7a were significantly different among the DN, DM, CON groups ($P<0.05$). A variant rs1143770 was found in let-7a-2 regulatory region and the distributions of CT genotypes were significantly different among the 3 groups ($P<0.05$). The CT+TT genotype frequencies were significantly higher in the DM and DN groups than in the CON group ($P=0.049$, $P=0.001$). **Conclusion** miRNA let-7a may participate in the regulation of DN occurrence, and rs1143770 in let-7a-2 regulatory region is significantly associated with the increased risk of DN in Chinese Han population and might be regarded as a potential functionol site.

[**Key words**] diabetic nephropathy; microRNA; let-7a-2; polymorphism

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270912) and the Project of Chongqing Commission of Science and Technology (CSTC2013jcyjA10044). Zhou Ji and Peng Rui are first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Zhang Zheng, E-mail: zhangzheng92@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270912);重庆市科委项目(CSTC2013jcyjA10044)

* 同等贡献者

[通信作者] 张 政,E-mail: zhangzheng92@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140115.1515.005.html(2014-01-15)

糖尿病(diabetes mellitus,DM)是遗传与环境因素共同作用的复杂疾病。糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)作为糖尿病微血管并发症之一,成为慢性肾功能衰竭病因中最重要因素,严重影响患者生存质量和预后。微RNA(microRNA,miRNA)是一类进化上保守、长度为21~23 nt的非编码单链小RNA,能靶向mRNA,使靶mRNA降解或对其翻译产生抑制,从而阻断靶蛋白质的形成。血液中存在循环miRNA,具有疾病特异性、组织特异性和较高稳定性的特点,能被稳定检出。自从Lawrie等[1] 2008年首次报道了循环miRNA,此后研究者便开始在肿瘤等多种疾病中将循环miRNA作为新型生物标记物进行研究[2-4]。最近研究显示,有些miRNAs参与了DN疾病相关基因的调控[5],包括本课题组先前发现mir-21及mir-451为DN中重要的下调miRNA[6-7],提示循环miRNA可能成为诊断DN特异的敏感的新型的潜在生物学标记。miRNA调控网络中的SNPs可影响成熟miRNA的表达水平和miRNA的结构、miRNA与靶基因的识别等,使miRNA调控网络发生异常。因此,对miRNA启动子调控区域SNPs的研究,将具有重要意义。

本课题组前期工作中基因芯片技术筛查到let-7a为DN患者血液中下调miRNA,本研究将采用Real-time PCR方法进一步验证let-7a在DN、DM和健康人群3组中的表达水平,并通过采用生物信息学方法对miRNA let-7a基因启动子调控区域筛选感兴趣的标签SNPs(Tag SNPs),建立相应的分型方法,分析探寻循环miRNA异常存在是否与其启动子调节区多态有关,以评价该多态对中国人群DN易感性的影响。

1 资料与方法

1.1 资料来源

收集2010年9月至2012年7月重庆医科大学附属第一医院内分泌科门诊及住院糖尿病患者,符合1999年WHO糖尿病诊断标准,排除心、肝疾病,排除泌尿系感染及其他肾脏疾病。分为2组:①DM组:糖尿病非肾病患者104例,尿白蛋白排泄率(UAER)<20 μg/min;②DN组:糖尿病肾病患者108例,UAER在20~200 μg/min;另收集2011年9月至2012年7月重庆医科大学附属第一医院体检健康者62例作为健康对照组(CON),无心、脑、肝肾及内分泌代谢疾病。病例组与对照组在区域、年龄及性别频数上均匹配。

1.2 Real-time PCR检测DN、DM、CON组中成熟体let-7a的表达

取3组研究对象新鲜血液1.5 mL,立即转入含有RNA稳定剂的真空采血管中,按照血液RNA提取试剂盒说明书(北京天根)操作提取RNA,采用Hairpin-it™ miRNAs qPCR Quantitation Kit(上海吉玛)试剂盒将提取出的RNA进行逆转录和定量检测,逆转录引物由上海吉玛公司提供,以U6为内参,逆转录反应体系为:dNTP(10 mmol/L)0.75 μL,5×Reverse Transcription Buffer 4 μL,MMLV Reverse Transcriptase(200 U/μL)0.2 μL,MiR-RT primers(1 μmol/L)1.2 μL,RNA 2 ng,RNA-free H_2O补足至20 μL体系。逆转录反应条件:26 ℃ 30 min;42 ℃ 30 min;85 ℃ 10 min;4 ℃放置。采用SYBR法进行定量检测,定量PCR反应体系为20 μL,包括2×Real-time PCR mix 10 μL(含SYBR Green),预混上下游引物(5 μmol/L)0.4 μL,miRNA RT产物2 μL,*Taq* DNA聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,7.4 μL水。每个检验指标做3个复孔。反应条件为:95 ℃ 3 min,95 ℃ 12 s,62 ℃ 40 s,40个循环。最终数据用$2^{-\Delta\Delta Ct}$公式分析[8]。

1.3 生物信息法选择候选单核甘酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)位点

利用miRNA SNP在线软件、NCBI数据库搜寻let-7a-2序列上游启动子区域SNP信息。let-7a-2基因5′端上游2.8 kb序列包括转录起始位点及启动子活性区域已经过验证[9],应用UCSC在线数据库提取let-7a-2上游仅2 kb启动子区域序列[10]。挑选SNP位点的策略可以基于CNCV-Tag SNP假说[11]的思路,采用Hapmap在线软件配合hapview 4.0软件包筛选在中国人群中存在的频率分布的Tag SNPs。一般要求Tag SNP的次要等位基因(MAF)大于0.05,杂合度较高。此外,通过TFSEARCHver1.3软件可对挑选出的Tag SNP进行转录因子结合位点的预测。

1.4 基因组DNA提取

取3组研究对象静脉血1 mL,EDTA抗凝,采用小量血液基因组DNA提取试剂盒(北京天根),柱层析法提取血细胞基因组DNA,TB溶解,置-20 ℃保存。

1.5 PCR-RFLP检测let-7a-2基因rs1143770、rs547008、rs562052多态性

从NCBI数据库中下载SNP序列,利用Primer 3.0 Priemier设计引物如下。rs1143770上游5′-AAAACCTTGGCTTGAGATTACC-3′,下游5′-TTCAGTTTTACCAGAGGAACATTTA-3′;rs547008上游5′-GCGGTCCCAAAAGGGTCAGTAGTCAACTCTGGAAAAAGGTGC-3′,下游5′-GCGGTCCCAAAAGGGTCAGTAGATTAAGAAATACCGCAAAAGC-3′;rs562052上游5′-ACCTCATCAAAGCATAAGGAAAT-3′,下游5′-TTCCTGATACTTCTACTGGACTGAT-3′。PCR反应体系为15 μL,包括10×缓冲液1.5 μL,dNTP mix(2.5 mmol/L)0.3 μL,$MgCl_2$ 1.2 μL,*Taq* DNA聚合酶(5 U/μL)0.1 μL,PCR引物(50 pmol/μL)0.2 μL和DNA模板(20 ng/μL)0.5 μL。循环参数:95 ℃预变性5 min,95 ℃变性30 s,68 ℃退火45 s,72 ℃延伸60 s,20次循环。95 ℃变性30 s,58 ℃退火30 s,72 ℃延伸40 s,20次循环,最后再延伸6 min。rs1143770、rs547008、rs562052三个位点PCR产物用依次被*Hpy*8Ⅰ、*Alu*44Ⅰ、*Tsp*RⅠ酶(MBI Fermenta)酶切,酶切产物在含溴化乙锭的3%琼脂糖凝胶上电泳。部分PCR产物经纯化后行DNA全自动测序(上海生工),进一步证实样本基因型分型。

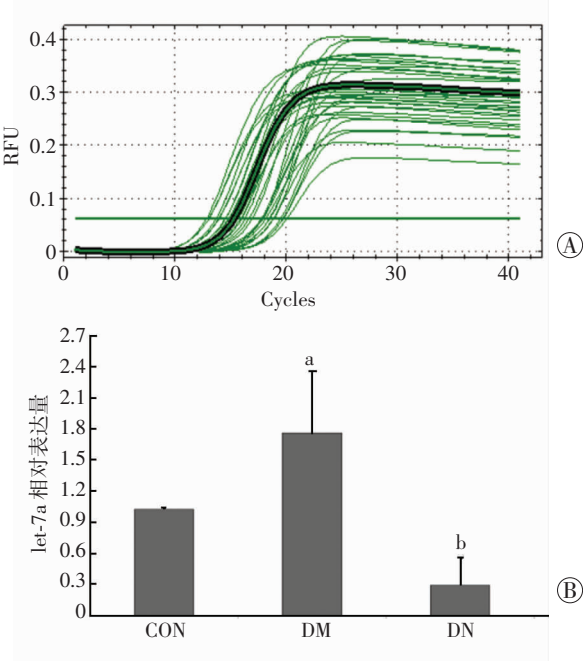
1.6 统计学处理

采用Hardy-Weinberg遗传平衡检验样本群体代表性;采用SPSS 17.0统计软件行χ^2检验分析DN、DM、CON组中基因型及等位基因频率的分布差异。

2　结果

2.1　Real-time PCR 检测 let-7a-2 表达水平

以 U6 为内参，Real-time PCR 扩增结果（图 1A），DM 组中 let-7a 的表达显著高于 CON 组（$P=0.02$），而 DN 组中 let-7a 的表达量显著低于 DM 组及 CON 组（$P<0.01$），见图 1B。提示血液中存在稳定 miRNA let-7a 能够被检出，let-7a 可能与糖尿病及糖尿病肾病的调控密切相关。

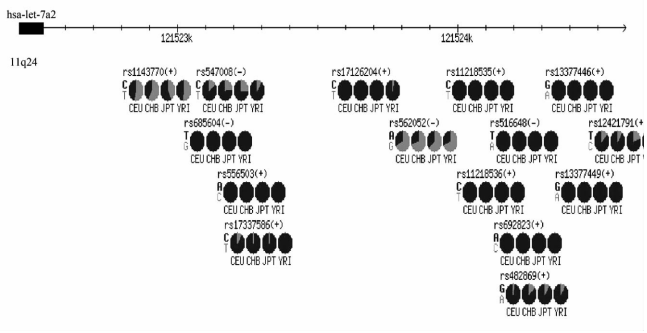


A：let-7a 基因 SYBR Green 荧光染料荧光定量 PCR 扩增曲线；B：let-7a 相对表达水平定量分析　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 CON 比较

图 1　Real-time PCR 检测 let-7a 的表达水平

2.2　生物信息学方法预测

通过采用国际人类基因组单体型图工程数据库 Hapmap 在线软件配合 Hapview 软件包上搜寻 let-7a-2 上游 2 kb 内启动子区域 SNPs，下载其中公布有中国汉族人群分布信息的 SNP 位点（图 2），其中有 Tag SNP 有 5 个，且通过 TFSEARCHver1.3 软件对 5 个 Tag SNP 进行转录因子结合位点的预测，发现 rs1143770、rs547008、rs562052 三个位点预测杂合度较高，离启动子距离较近，且突变前后转录因子均发生了变化（表 1），因此，优先考虑该 3 个位点进行下一步分析。

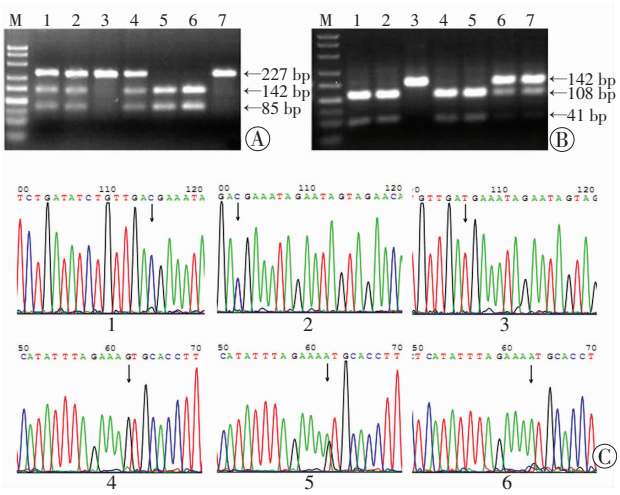


YRI：尼日利亚约鲁巴人群；JPT：东京日本人群；CHB：中国北京汉族人群；CEU：犹他州居民与祖先来自北欧和西欧人群

图 2　let-7a-2 上游 2kb 内有基因频率人群分布信息的 SNP

2.3　PCR-RFLP 法基因分型

采用 PCR-RFLP 法对 rs1143770、rs547008、rs562052 进行基因分型，经过统计，rs1143770（$P=0.16$）与 rs547008（$P=0.07$）均在总体中符合（hardy-weinberg，HW）遗传平衡，rs562052 由于未符合 HW 平衡，还需进一步扩大样本数研究，故以下仅呈现 rs1143770 和 rs547008 研究结果，酶切结果如图 3A 所示。PCR 产物经验证，结果与 PCR-RFLP 分型结果完全一致（图 3B）。



A：rs1143770 多态位点酶切结果　M：DNA 标准；1、2、4：CT 型；3、7：TT 型；5、6：CC 型；B：rs547008 多态位点酶切结果　M：DNA 标准；1、2、4、5：CC 型；3：TT 型；6、7：CT 型；C：PCR 产物测序结果　1～3：rs1143770-F CC、CT、TT 型；4～6：rs547008-R CC、CT、TT 型

图 3　rs1143770 和 rs547008 多态位点 PCR 产物酶切测序结果

表 1　let-7a-2 启动子调控区域（<2kb）5 个标签 SNP 信息

位点	距离 5′端 pre-let-7a-2	预测杂合度	HW p-value	MAF	突变类型	突变前转录因子	突变后转录因子
rs1143770	−297 bp	0.482	0.262	0.405	C→T	CREB	No
rs547008	−560 bp	0.358	1.0	0.233	C→T	C/EBPb	CdxA，C/EBpb
rs17337586	−661 bp	0.022	1.0	0.011	C→T	Nkx-2，HNF-3b	HNF-3b
rs562052	−1 249 bp	0.425	0.716	0.307	A→G	CdxA，CDP CR	No
rs482869	−1 645 bp	0.223	0.963	0.128	G→A	No	No

2.4 rs1143770与rs547008位点基因型与等位基因频率分布

rs1143770与rs547008位点表型在中国人群中分布情况见表2。rs1143770多态位点,在等位基因频率分布上无显著差异,但CT和TT基因型的频率分布在CON、DM、DN三组中有显著的总体差异(DN *vs* CON,$P=0.035$;DN *vs* DM,$P=0.021$)。在DN组和DM组中CT基因型频率较CON组显著增加(66% *vs* 40%,$P=0.001$;50% *vs* 40%,$P=0.049$)。且CT+TT基因型频率在DN与DM组中也显著高于CON组(85% *vs* 68%,$P=0.007$;82% *vs* 68%,$P=0.040$)。而547008位点在等位基因与基因型频率分布上均未出现统计学差异($P>0.05$)。

表2 3组rs1143770与rs547008位点基因型和等位基因的分布 [例(%)]

	CON ($n=62$)	DM ($n=104$)	DN ($n=108$)
rs1143770			
CC	20(32)	19(18)	16(15)
CT	25(40)	52(50)[a]	71(66)[b]
TT	17(27)	33(32)	21(19)
CT+TT	42(68)	85(82)[a]	92(85)[b]
T	59(48)	117(57)	113(52)
rs547008			
CC	33(53)	56(54)	64(59)
CT+TT	29(47)	48(46)	44(41)
T	36(29)	56(27)	54(25)

a: $P<0.05$,与CON比较;b: $P<0.01$,与CON比较

3 讨论

hsa-let-7家族成员有11个同分异构体,因其种子区2~8个核苷酸相同而被认为执行着相同的功能,let-7是在秀丽线虫中最早发现的miRNA,作为肿瘤抑制因子被广泛研究。本课题组前期工作也发现let-7a通过抑制k-Ras和c-Myc能够阻碍肺癌的增生[12]。最近发现,let-7与糖尿病也有一定的关联,主要通过参与调节葡萄糖代谢和胰岛素的分泌合成调控糖尿病的发生、发展。Frost等[13]在诱导激活的let-7a/d/f/g转基因小鼠中发现,小鼠中过量表达let-7会表现出葡萄糖耐量受损和胰岛素分泌减少,且形体、体质量、脂肪量均相应减少。Zhu等[14]也在同年研究揭示了在小鼠肌肉组织细胞中的lin28/let-7途径,RNA结合蛋白lin28能够抑制let-7的进程,失去lin28或是let-7过表达会导致胰岛素抵抗和葡萄糖耐量受损,同时他们还验证了被let-7抑制的靶基因有IGF1R、INSR、IRS2、HMGA2和IGF2BP2,这些基因均与葡萄糖代谢及胰岛素分泌密切相关。以上数据都说明let-7家族在调节代谢疾病方面的作用。然而,关于let-7与糖尿病肾病之间的关系还尚不清楚。

let-7a-2基因(编码let-7a)位于11q24.1,许多研究利用全基因组扫候选基因的方法发现11q24是存在2型糖尿病易感基因的明显区域[15-16]。在Rich等[17]的研究中,非裔美国人IRAS家族基因主要聚集在11q24.1,IRAS家族基因在胰岛素抵抗和B细胞中的功能上起着重要作用。Puppala等[18]通过基因定位连锁分析对肾小球过滤率的研究中发现,11q是潜在的连锁区域。此外,有报道11q24被认定是伴有节段性肾小球硬化症和遗传性肾炎的常染色体显性肾病区域[19]。因此,鉴于let-7a-2位于此区域,极有可能参与调控DN的发生、发展。本课题组前期芯片结果及Real-time PCR验证结果中,成熟体let-7a的表达在DN组中显著下调,也进一步表明let-7a与DN之间密切相关。可见,在血液中能够被检出稳定存在的循环let-7a,运用循环miRNA作为诊断DN的新型生物标记,可能具有重要意义。

miRNA的单核苷酸多态性在许多疾病中的作用逐渐被验证。大多数的研究主要集中在miRNA及其靶位点的SNP。然而,关于miRNA启动子调控区域SNP研究还较少。发生在miRNA前体(pre-miRNA)及其调节区域的SNP能通过改变成熟miRNA的生物合成进而影响其表达水平[20-21]。Luo等[22]首次报道了miRNA启动子调控区SNP与疾病的关联性,研究发现miR-146a启动子区域存在一个功能突变rs57095329会影响miR-146a的表达,其G等位基因会减弱miR-146a启动子区的活性,使miR-146a下调,增加患系统性红斑狼疮的风险。同年Xu等[23]报道了miRNA启动子区SNP与癌症的易感性,研究发现pri-miR-34b/c启动子调控区域rs4938723携带基因型CT/CC与携带基因型TT的个体相比,显著增加了发生肝癌的风险,可见,miRNA调控区域发生的SNP在疾病的进程中起着重要作用。我们发现rs1143770位点,虽在基因频率分布没有差异,但基因型的分布却存在显著差异,由于符合Hardy-Weinberg平衡,考虑这一结果可能与某个核苷酸突变单独存在时并不起作用,只有它处于纯合或者杂合状态时才与疾病相关,即在此处,T突变单独存在时并不起作用,当处于TT或CT时与DN相关。提示我们let-7a-2启动子调控区域的rs1143770多态可能是易患DN疾病的一个相关位点,其CT/TT基因型增加了发生DN的风险。

miRNA的调节区域对其编码蛋白的影响,可能归因于SNP与其转录因子结合位点的重叠[24]。rs1143770位点的碱基变异引起了蛋白转录结合因子发生改变,C-T突变后发生转录因子CREB的丢失,认为在该启动子区域的变异可能导致该区域对反式作用因子亲和力或者引起DNA的次级结构的核苷酸的改变,进而影

响转录因子的进入。有报道细胞核内调控因子 CREB 作为 cAMP 应答元件结合蛋白,在 DN 的发展进程中起重要的作用[25],是 DN 相关的一个重要因子[25-27]。综合本研究提示我们,在 let-7a-2 启动子调控区域的 rs1143770,其 CT 和 TT 基因型可能是由于失去部分转录因子 CREB,从而导致成熟体 let-7a 的表达水平改变。具体途径还有待进一步研究验证。

综上所述,本研究通过对循环 miRNA let-7a-2 调控区域多态与 DN 疾病之间的关联分析,认为 let-7a-2 极有可能参与调控 DN,并发现 let-7a-2 启动子调控区域多态 rs1143770,其 CT/TT 基因型显著增加罹患 DN 的风险,提示我们 rs1143770 很可能是个潜在的功能位点,对该多态基因型的检测,可筛选 DN 高危人群作为重点防治对象,在基因水平治疗 DN 及研制相关药物等方面也具有重要意义。

参考文献:

[1] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, *et al*. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.

[2] Pritchard C C, Kroh E, Wood B, *et al*. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2012, 5(3): 492-497.

[3] Li Y Q, Zhang M F, Wen H Y, *et al*. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction[J]. Clinics, 2013, 68(1): 75-80.

[4] Bala S, Petrasek J, Mundkur S, *et al*. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases[J]. Hepatology, 2012, 56(5): 1946-1957.

[5] Alvarez M L, Distefano J K. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: potential applications as biomarkers for disease development and progression[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2013, 99(1): 1-11.

[6] Zhang Z, Peng H, Chen J, *et al*. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice[J]. FEBS Lett, 2009, 583(12): 2009-2014.

[7] Zhang Z, Luo X, Ding S, *et al*. MicroRNA-451 regulates p38 MAPK signaling by targeting of Ywhaz and suppresses the mesangial hypertrophy in early diabetic nephropathy[J]. FEBS Lett, 2012, 586(1): 20-26.

[8] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.

[9] Guan H, Zhang P, Liu C, *et al*. Characterization and functional analysis of the human microRNA let-7a2 promoter in lung cancer A549 cell lines[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(8): 5327-5334.

[10] Fujita P A, Rhead B, Zweig A S, *et al*. The UCSC genome browser database: update 2011[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D876-D882.

[11] Collins F S, Guyer M S, Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation[J]. Science, 1997, 278(5343): 1580-1581.

[12] He X Y, Chen J X, Zhang Z, *et al*. The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(7): 1023-1028.

[13] Frost R J, Olson E N. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(52): 21075-21080.

[14] Zhu H, Shyh-Chang N, Segre A V, *et al*. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism[J]. Cell, 2011, 147(1): 81-94.

[15] Elbers C C, Onland-Moret N C, Franke L, *et al*. A strategy to search for common obesity and type 2 diabetes genes[J]. Trends Endocrinol Metab, 2007, 18(1): 19-26.

[16] Hara K, Fujita H, Horikoshi M, *et al*. Comprehensive evaluation of type 2 diabetes susceptibility loci in the Japanese population by using 1000 Genomes Project data[J]. Endocrine Abstracts, 2012, 29(5): 503.

[17] Rich S S, Bowden D W, Haffner S M, *et al*. Identification of quantitative trait loci for glucose homeostasis: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family Study[J]. Diabetes, 2004, 53(7): 1866-1875.

[18] Puppala S, Arya R, Thameem F, *et al*. Genotype by diabetes interaction effects on the detection of linkage of glomerular filtration rate to a region on chromosome 2q in Mexican Americans[J]. Diabetes, 2007, 56(11): 2818-2828.

[19] Prakash S, Chung K W, Sinha S, *et al*. Autosomal dominant progressive nephropathy with deafness: linkage to a new locus on chromosome 11q24[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(7): 1794-1803.

[20] Jazdzewski K, Murray E L, 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 U S A, 2008, 105(20): 7269-7274.

[21] Mencia A, Modamio-Hoybjor S, Redshaw N, *et al*. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss[J]. Nat Genet, 2009, 41(5): 609-613.

[22] Luo X, Yang W, Ye D Q, *et al*. A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus[J]. PLoS Genet, 2011, 7(6): e1002128.

[23] Xu Y, Liu L, Liu J, *et al*. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2011, 128(2): 412-417.

[24] Schmeier S, Schaefer U, MacPherson C R, *et al*. dPORE-miRNA: polymorphic regulation of microRNA genes[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16657.

[25] Sanchez A P, Sharma K. Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Expert Rev Mol Med, 2009, 11: e13.

[26] Won J, Silva A J. Molecular and cellular mechanisms of memory allocation in neuronetworks[J]. Neurobiol Learn Mem, 2008, 89(3): 285-292.

[27] Faherty N, O'Donovan H, Kavanagh D, *et al*. TGFβ and CCN2/CTGF mediate actin related gene expression by differential E2F1/CREB activation[J]. BMC genomics, 2013, 14: 525.

(收稿:2013-10-28;修回:2013-12-28)

(编辑 汪勤俭)