

文章编号: 1004-0374(2010)07-0649-06

血清 microRNA——一种非侵入性的肿瘤标志物

陈 熹, 张峻峰, 曾 科, 张辰宇*

(南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

摘 要: microRNA (miRNA) 是一类自然形成的非编码小 RNA, 不少 miRNA 分子已被证实与癌症的生成有关联。近期的研究发现人血清中稳定存在一定水平的 miRNA, 并且血清 miRNA 表达谱的变化与多种肿瘤的发生、发展具有明确的相关性, 说明血清 miRNA 可以作为肿瘤临床诊断和预后评估的分子标志物。因此, 特定的血清 miRNA 表达谱可以构成识别癌症与其他疾病的“指纹”, 为癌症及其他疾病的诊断提供一种新的非侵入性的检测方法, 同时, 该技术还可用于肿瘤分类、预后判断、手术疗效监测及疾病复发预测等领域, 并可能带来未来临床医学上的变革。

关键词: miRNA; 血清; 癌症; 分子标志物; 早期诊断

中图分类号: Q52; R730.5 **文献标识码:** A

Serum microRNAs: a novel class of non-invasive biomarkers for human cancers

CHEN Xi, ZHANG Jun-feng, ZENG Ke, ZHANG Chen-yu*

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding RNAs consisting of 19 to 24 nucleotides in length. Dysregulated expression of miRNAs in various tissues has been associated with a variety of diseases, including cancers. Recently, it has been shown that serum contains large amounts of stable miRNAs and that the serum miRNA expression profile can be used as a novel serum-based biomarker potentially offering more sensitive and specific tests than those currently available for early diagnosis of cancer and other diseases. Moreover, this new approach has the potential to revolutionize present clinical management, including determining cancer classification, estimating prognosis, predicting therapeutic efficacy, maintaining surveillance following surgery, as well as forecasting disease recrudescence.

Key words: miRNA; serum; cancer; biomarker; early diagnosis

癌症是严重危害人类身体健康的一类疾病, 据统计, 我国每年新增癌症患者约 160 万人, 每年因癌症死亡的人数约 130 万人。对于癌症的防治来说, 早期诊断是关键。所谓癌症的早期诊断, 即是在患者出现临床症状前或在癌症发生浸润前实现确诊, 从而使患者得到及时治疗, 进而改善预后, 达到提高治愈率、降低死亡率的目的。以肺癌为例, 肺癌是世界上最常见的癌症, WHO 的官方资料显示, 每年死于肺癌的人数约为 130 万人, 在发达国家肺癌是癌症引起的死亡的最主要因素^[1-3]。现今, 对于肺癌最有效的治疗方法是手术, 肺癌的术

后 5 年生存率对于 I 期患者来说大约是 70%, 但对于 III 期以上患者则低于 30%, 大多数的肺癌患者尤其是 I、II 期的患者, 病症并不明显, 难以发现和救治^[4-7]。因此, 早期发现、早期诊断是改善肺癌预后的关键, 如何提高肺癌的早期诊断率是一个急需解决的问题。鉴于癌症发病趋势的增高以及其早期发现与诊断的困难, 目前亟待找到一种比现有方法更准确可靠同时又简单易行的新方法来早期诊

收稿日期: 2010-05-19

*通讯作者 E-mail: cyzhang@nju.edu.cn

断癌症。

寻找肿瘤标志物并对其进行准确检测一直都是癌症研究领域的重点。肿瘤标志物在癌症的早期诊断、个体化治疗、预后判断等诸多方面都具有重要作用,较常见的肿瘤标志物有蛋白酶类、肿瘤特异性抗原、肿瘤代谢产物、激素、癌基因和抑癌基因以及甲基化DNA等。尽管越来越多的肿瘤标志物已经被发现并应用于癌症的普查、诊断和疗效的监控,但是它们的临床应用效果还存在着明显不足,而且目前肿瘤标志物的检测大多程序繁杂且灵敏度低,从而限制了其临床应用。例如,肿瘤标志物甲胎蛋白、乳酸脱氢酶、癌胚抗原等已被广泛应用于临床,但是这些肿瘤标志物还远远不能满足对癌症早期诊断的需要,其主要原因有两个方面:(1)上述肿瘤标志物的灵敏度和特异性相对较低,它们的检测结果还不能作为癌症确诊的指标;(2)癌症的早期诊断率应与治疗的效果呈现正相关,而上述任何一种肿瘤标志物还难以满足癌症的早期诊断的这种要求。由于存在着肿瘤分化类别特异性过强、肿瘤整体敏感性较低、送检标本难以反复采取、标本保存要求条件高等缺陷,同时由于检测价格昂贵,因此在现有条件下难以推广应用现有的肿瘤标志物。因此,目前非常有必要寻找能够弥补现有标志物的上述缺陷的新型、灵敏并且应用方便的肿瘤标志物。

近期,作为新的切入点,microRNA(miRNA)为癌症的诊断与治疗开辟了一条新途径^[8,9]。miRNA是一类长19~23个核苷酸的小分子单链RNA,它由一段具有发夹结构的单链RNA前体经Drosha酶和Dicer酶的剪切后生成。miRNA通过与目标mRNA分子的3'端非编码区域(3'-UTR)互补配对,使目标mRNA分子的翻译受到抑制或引起特异性的对mRNA分子的切割,从而在转录后水平对靶基因的表达进行调控^[10,11]。在已确证功能的miRNA中,lin-4和let-7参与控制秀丽线虫的幼虫发育,lsy-6控制秀丽线虫神经元左右不对称性,bantam控制果蝇细胞的增殖,miR-14控制果蝇细胞的死亡和正常的脂肪代谢,miR172控制拟南芥花的发育,miR-JAW控制植物叶的形态,miR-181调控哺乳动物造血系统分化^[10,11]。上述研究表明,miRNA参与着生物体中很多基本生命过程的调控,在生命活动中起着非常重要的作用。然而,除了与人类的许多正常的生理活动相关,miRNA也与癌症的发生发展存在千丝万缕的联系^[8,9]。研究结果证实,许多miRNA基因存在

于那些与癌症密切相关的人类基因组脆性位点^[12]。此外,miRNA基因还被证实扮演着原癌基因和抑癌基因的角色^[8,9]。随着一次性测定成百上千种miRNA的表达水平的技术的发展和miRNA在肿瘤中地位的明了,研究人员开始探寻不同癌症中miRNA的表达谱。现已证明,miRNA完全有可能作为一种新的肿瘤标志物,其在癌症中发生的特异性变化可以帮助定性癌症,或者诊断癌症的发展阶段,或者判断肿瘤的预后情况,甚至miRNA本身即可作为药物治疗癌症。

虽然肿瘤组织中的miRNA可以作为一种新的肿瘤标志物,但是,为了获得肿瘤组织miRNA,势必需要进行有创的手术或者穿刺等,所以组织miRNA仍然不能满足早期诊断的需要,仍然不能适用于广泛的筛查和预防。基于此,研究人员将目光投向较易获得,甚至常规体检中就可以收集到的血液。由于血液会循环至全身所有组织,向细胞输送营养并清除废物,因此血液能够反映出整个机体的生理病理状况,其检测结果对人体健康具有指导意义。并且,基于血清的检测是无创的、非侵入的,因此可以适用于普查和预防,为早期诊断服务。已知血清中存在着多种蛋白,如总蛋白、白蛋白、球蛋白等;多种脂质,如HDL胆固醇、三甘油酯等;多种糖质、色素、电解质和无机盐;多种酶,如淀粉酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、胆素脂酶、醛缩酶等;同时还汇集了来自全身组织器官的多种信号分子,如细胞因子、激素等。目前,对癌症的诊断仅仅局限于血清中的上述生化指标,还没有关于miRNA的成熟检测方法。人们传统观念中认为血清中没有RNA分子,即使有也会很快被RNase降解为小分子片段而检测不到。但是,由于miRNA分子是19~23个核苷酸单元组成,具有结构上的特殊性和相对稳定性,它们可能可以稳定存在于血清中。同时由于miRNA在组织中已被确立为肿瘤标志物,其在血清中可能也存在类似潜力。因此,科学家希望通过筛选疾病发生过程中特异性变化的血清miRNA,建立疾病的血清miRNA指纹图谱,并根据此指纹图谱来进行疾病的鉴别诊断和早期诊断。

1 肿瘤组织miRNA作为肿瘤标志物

miRNA在肿瘤学的研究起始于慢性粒细胞性白血病。研究发现miR-15a、miR-16-1在慢性粒细胞性白血病中下调,进一步发现,这两个miRNA分子的下调与抗凋亡蛋白BCL2的高表达有关,BCL2

是 miR-15a 和 miR-16-1 的下游靶点^[13]。之后大量研究证实, miRNA 在肿瘤的发生、发展中扮演着重要角色, miRNA 的遗传变异、扩增、缺失或基因沉默都可能引起肿瘤的发生或者提高个体的肿瘤易感性, 目前一些与癌症发生相关的 miRNA 已被命名为“oncomir”。

miRNA 表达谱的紊乱将加剧癌症的发生, 这是因为 miRNA 可以起到肿瘤抑制因子和原癌基因的作用^[8,9], 其具体机制如下: (1) 在正常组织中, miRNA 正常转录、加工、结合到靶 mRNA 的互补位点, 通过抑制蛋白翻译或是改变 mRNA 的稳定性来抑制基因表达。最终的结果是, 细胞生长、增殖、分化和死亡保持在一个正常的水平。(2) 一个起肿瘤抑制基因作用的 miRNA 表达下降或者缺失, 导致肿瘤形成。成熟 miRNA 水平下降可能是由于 miRNA 生物合成的任何步骤的缺陷造成的, 而这最终将导致 miRNA 靶蛋白的不适当表达。最后的结果可能导致过度增殖、侵入、不能凋亡、不能正常分化或者去分化, 进而引起肿瘤的形成。(3) 具有癌基因功能的 miRNA 的过表达也将导致肿瘤发生。在这种情形下, 在异常组织或是不适当的发育阶段这些 miRNA 的表达增加, 可能导致其靶基因(抑癌基因)的表达下降, 引起肿瘤形成。miRNA 的表达增加, 可能是由于 miRNA 基因的扩增, 持续性的启动子激活, miRNA 加工的效率增高, 或是 miRNA 的稳定性提高。

目前, 科学家通过对人肺癌、乳腺癌等疾病中 miRNA 的表达谱进行分析比较, 发现每一种肿瘤都有若干特定的 miRNA 的表达水平相对于正常组织发生了变化^[14-17]。这些研究奠定了 miRNA 作为肿瘤生物学标志物在肿瘤诊断中的地位, 并且提示 miRNA 的研究已经从实验室开始走向临床。此外, 研究人员开始使用 miRNA 表达特征来对肿瘤进行分类, Lu 等^[18]发现, 相对较少的 miRNA (约 200 个) 表达谱就可以对人类癌症进行分类, 他们设计了一种基于微珠的流式细胞技术的新方法来研究正常对照和肿瘤组织的 miRNA 的表达, 对多种组织来源的肿瘤通过 miRNA 表达谱进行归类, 最终发现归类结果与肿瘤组织的胚胎来源一致。因此, 肿瘤的 miRNA 表达特征反映了其发育起源, 这也与 miRNA 指导组织特异性发育功能相一致。这项研究的意义在于, miRNA 特征可以成功地对组织学上难以诊断的癌症样品进行分类。有趣的是, miRNA 不仅可以作为癌症的诊断学标志, 还可以作为预后预测的

标志。Takamizawa 等^[19]指出, let-7 miRNA 的表达往往在人肺癌中缺失, 而 let-7 miRNA 表达的减少与术后生存期的缩短显著相关。同时, Yanaihara 等^[20]发现 miR-155 的高表达和 let-7a-2 的低表达与肺腺癌的低生存率相关。Roldo 等^[21]则发现 miR-21 在胰腺肿瘤中的过表达与高 Ki-67 增殖指数及出现肝转移高度相关。这些研究结果表明, miRNA 表达水平的改变与恶性肿瘤的进展状态相关。总之, miRNA 完全有可能作为一种新的肿瘤标志物, 其在癌症中发生的特异性变化可以帮助定性癌症, 或者诊断癌症的发展阶段, 或者判断肿瘤的预后情况, 甚至 miRNA 本身即可作为药物治疗癌症。

2 血清中存在 miRNA

虽然肿瘤组织 miRNA 表达谱与肿瘤发病及预后相关, 但是检测技术复杂、创伤大, 难以真正应用于临床诊断。相比较而言, 外周血血清较易获得和检测, 临床应用便捷, 利于推广。那么, 血清中是否存在 miRNA 呢? Chen 等^[22]选取 21 例健康人, 其中 11 例男性, 10 例女性, 同时还选了肺癌、直肠癌、糖尿病患者, 用 Solexa 技术对其血清中所有的小于 30 nt 的小 RNA 进行测序, 结果显示不论健康人或患者血清中都存在大量的 miRNA、部分 mRNA 碎片和 rRNA 碎片以及少量未知 RNA, 证明了血清中确实含有大量的 miRNA, 并且该实验还发现大鼠、小鼠、牛、马等的血清中也存在大量的 miRNA。此外, Gilad 等^[23]发现利用 qRT-PCR 技术可以对人体的尿液、唾液、羊水及胸水中的 miRNA 进行定量。这些发现为研究 miRNA 开辟了新的途径, 证明了体液中普遍含有 miRNA, 但这些体液中的 miRNA 表达谱是否可能预示着机体功能的改变和疾病状态, 还有待进一步研究。

3 血清 miRNA 的稳定性

虽然血清中确实含有大量的 miRNA, 但血清中也含有各种消化酶, 包括核糖核酸酶, 那么 miRNA 究竟是瞬时表达的, 还是稳定存在的, 为什么没有被核糖核酸酶消化掉? 目前, 科学家对这个问题进行了深入的研究。Mitchell 等^[24]发现将人工合成的 在人类中无表达的线虫 miRNA (miR-39、miR-54、miR-238) 加入到新鲜的血浆中, 不到 2 min 这些 miRNA 就很快消失了, 说明对于外源的 miRNA 核糖核酸酶将其降解的活性很强。有趣的是, 在此过程中, 人体内源的 miR-15b、miR-16、miR-24 作为对照则

无明显改变,说明血清中内源的miRNA可以逃脱核糖核酸酶的消化。Chen等^[22]发现A549细胞提取物中的大分子RNA,如18S rRNA、28S rRNA、GAPDH、 β -actin和U6,能轻易地被核糖核酸酶降解,而miRNA能一定程度对抗核糖核酸酶,并且在血清中加入核糖核酸酶,也不会造成miRNA的降解。这些数据证明了血清miRNA可以一定程度对抗核糖核酸酶的作用。但是,对于miRNA逃脱酶消化的机制到目前为止还不是完全清楚。一种解释是血清中的miRNA先被一种50~90 nm大小的外切酶体(exosome)包装,在条件成熟后才被释放出来。Valadi等^[25]报道外切酶体中含有miRNA,血清中的miRNA是受到外切酶体的保护才免于被消化。然而,关于miRNA是怎样被外切酶体包裹及哪些因素引起释放,这些过程中miRNA的功能是否发生变化等问题,还没有合理的解释。

紧接着有许多研究者对血清中的miRNA的稳定性做了进一步的观察,并设计了各种可能影响miRNA变化的因素,包括放置时间长短、温度变化、pH值的高低等,结果显示这些均对血清中miRNA无明显影响^[22,24]。由此证明了血清中miRNA不但可以抵抗酶的消化,而且耐酸耐碱,更不受温度变化及置留时间的影响,比一般的蛋白更适宜作为肿瘤标志物。

综上所述,miRNA在血清中可长期稳定存在,耐RNA酶降解,煮沸、反复冻融、酸碱环境、长期保存等各种处理方法均不会造成血清miRNA的损失,因此血清中的miRNA有潜力作为一种有价值的肿瘤标志物,其受外来干扰因素影响小,临床实用性强。

4 血清miRNA作为肿瘤标志物

最近一些研究发现,miRNA不仅可以在血清中稳定存在,并且许多肿瘤患者血清中的一些miRNA的表达明显与正常人不同,血清miRNA有潜力作为一种特异的肿瘤标志物应用于临床。这些研究为血清miRNA作为分子标记应用于肿瘤的早期诊断和预后提供了工作基础。

第一个被发现的血清肿瘤标志物miRNA是miR-21等。Lawrie等^[26]证实,弥漫性大B细胞淋巴瘤患者的血清中miR-155、miR-210、miR-21表达量明显高于正常对照组,并且miR-21的水平与存活率密切相关。其后,Mitchell等^[24]发现miR-141

在25例前列腺癌患者血清中均高表达,可以达到60%的敏感性、100%的特异性,并且与前列腺特异性抗原(PSA)的表达水平有一定的关系。此外,我们对非小细胞肺癌、结肠癌和糖尿病患者的血清miRNA水平进行了分析,发现非小细胞肺癌、结肠癌和糖尿病患者血清中的miRNA与健康人明显不同,非小细胞肺癌患者与健康人相比28个miRNA是缺失的,而63个miRNA是非小细胞肺癌患者所特有的,并且血清miRNA指纹同样能很好地诊断结肠癌^[22]。有趣的是,我们还发现肺癌患者血清和血细胞中的miRNA表型是不同的,而在健康人,这两者则完全一致。我们还发现非小细胞肺癌与直肠癌患者之间含有部分相同的miRNA,如miR-134、miR-146a、miR-221、miR-222、miR-23a等,这部分miRNA很可能参与各种肿瘤的形成,是癌症共性的。近来Resnick等^[27]对卵巢上皮癌患者血清中的miRNA也进行了测定,28例患者的血清均在治疗前收集,正常未婚者作对照,结果显示miR-21、miR-92、miR-93、miR-126、miR-29b在患者中明显高表达,而miR-155、miR-127、miR-99b则低表达,并且发现miR-21、miR-92、miR-93在患者CA-125升高以前出现,所以预示着这3种miRNA可以作为卵巢上皮癌早期发现的标志物。血浆miR-92被成功用作结直肠癌的分子标志物,灵敏度可达89%,特异性达到70%,且肿瘤切除后miR-92的表达量较术前显著降低^[28]。另外,Wang等^[29]在小鼠肝损伤模型中发现一些在肝组织中高表达的miRNA,如miR-122、miR-192可以在小鼠血清中持续高表达,这些血清中的miRNA在肝损伤早期就可以检测出来,所以他们提出miR-122、miR-192可以作为药物性肝损伤的早期诊断指标。上述研究结果提示,血清miRNA与组织中miRNA的表达谱相关,进一步的研究将加速血清miRNA作为肿瘤标志物应用于临床检测的进程。

5 血清miRNA作为肿瘤标志物的优势

血清miRNA作为肿瘤诊断和预后的标志物,其优点有:检测的损伤小、稳定性好、灵敏度高,可应用于早期肿瘤的检测。另一方面,仅仅采用一种血清miRNA作为肿瘤标志物往往特异性不足,不同患者,甚至是患同一种肿瘤的不同患者的多样性可能导致只用一种血清miRNA来判断肿瘤显得极不可靠。然而,若将多种miRNA组合使用并与其他

类型肿瘤标志物检测相结合, 建立一个 miRNA 的指纹库, 更准确的评估将变得可能。因此, 寻找和验证各种肿瘤特异性 miRNA 是目前首先需要解决的问题。

6 血清 miRNA 的应用前景

由于血清中 miRNA 的表达量较低, 寻找一种灵敏度高、操作简便且成本低廉的检测方法是目前血清 miRNA 应用于肿瘤临床检测亟待解决的问题, 实时荧光定量 PCR 是目前检测血清 miRNA 的主要方法, 该方法快速、便捷, 精确度和灵敏度可满足临床需求。另外, 在选择肿瘤标志物时, 应优先选择在肿瘤中表达上调的血清 miRNA, 这样也可提高检测的灵敏性和特异性。随着技术的不断成熟, miRNA 测定将变得更容易, 更快捷, 也更便宜。为了显示它在早期诊断癌症上的作用, 确定如何更早使这些标志物更加显著——当癌症还在早期或者甚至可能在肿瘤完全成形之前将更加有趣。大体上说, 前面提到的每个测定血清标志物的实验样本都来源于有限人群中 150 名癌症患者, 因此, 在任何其他标志物被证实可用于临床之前, 进一步的大样本实验是十分必须的。因此, 建立适合临床应用的标准化检测体系, 包括质控和诊断阈值的确定等都有待继续努力。

7 血清 miRNA 的来源

然而, 血清 miRNA 是如何产生的, 其生物学功能又是什么。这一系列的问题还有待阐明。据猜想, 血清 miRNA 可能来自于凋亡或坏死的癌细胞, 正常细胞的主动释放, 以及血细胞、巨噬细胞等的裂解。虽然血清 miRNA 的来源尚无定论, 最新的研究结果提示, 血清 miRNA 可能来源于组织细胞的主动分泌过程。Valadi 等^[25]发现成熟的 miRNA 在细胞内被脂质或脂蛋白包被成外切酶体, 分泌至胞外并进入血液。进入血液的外切酶体可经内吞作用进入受体细胞并去包被, 释放出 miRNA 发挥生物学功能。外切酶体介导的细胞间 miRNA 的交流, 是细胞通讯的一种新的途径, 对维持内环境的稳态有重要作用^[25]。因此, 对血清 miRNA 的了解将丰富对 RNA 生物学功能的认识, 这对全面阐释生命的本质, 提高人类的健康水平具有重要意义。

8 结语

现在临床使用的肿瘤标志物促进了诊断的发

展, 但是目前的诊断技术大都具有较大的创伤性, 其临床应用受到限制。而血清 miRNA 作为肿瘤诊断标志物不仅具有创伤小、方法准确、便捷的优势, 而且还可改进疾病诊断、癌症分类、预后估计、疗效及复发预测的精度。然而, 血清 miRNA 作为新兴的肿瘤分子标志物距离临床应用还有一定距离。寻找和验证各种肿瘤的特异性 miRNA 是我们首先需要解决的问题, 建立适合临床应用的标准化检测体系, 包括质控和诊断阈值的确定等都有待继续努力。除此之外, 血清 miRNA 的功能还有待去探索, 包括 miRNA 是如何进入到血清中及稳定存在的机制还不清楚。虽然有关血清中的 miRNA 研究刚刚开始, 但血清 miRNA 的出现为肿瘤标志物的研究开辟了新的途径, 随着研究深入, 血清 miRNA 在肿瘤诊疗中的应用将会取得更多硕果。

综上所述, 血清 miRNA 分子标志物将改变和补充对肿瘤发生发展的传统认识, 提供肿瘤诊断和治疗的新生物标志物。随着血清 miRNA 检测方法的标准化, 以及对血清 miRNA 的生成机制、生物学功能和与相关肿瘤关系的逐步阐明, 可以相信血清 miRNA 在未来的临床无创疾病诊断和预后中将展示出广阔的临床应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57: 43-66
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 2001, 94: 153-6
- [3] Ganti AK, Mulshine JL. Lung cancer screening. *Oncologist*, 2006, 11: 481-7
- [4] Patz EF, Goodman PC, Bepler G. Screening for lung cancer. *N Engl J Med*, 2000, 343: 1627-33
- [5] Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, et al. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J, Suppl* 2003, 39: 36s-44s
- [6] Rossi A, Maione P, Colantuoni G, et al. Screening for lung cancer: new horizons? *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 56: 311-20
- [7] Dominioni L, Imperatori A, Rovera F, et al. Stage I non-small cell lung carcinoma: analysis of survival and implications for screening. *Cancer*, 2000, 89: 2334-44
- [8] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 259-69
- [9] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 857-66
- [10] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 522-31
- [11] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281-97
- [12] Calin GA, Sevignani C, Dan Dumitru C, et al. Human

- microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2999-3004
- [13] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15524-9
- [14] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 11755-60
- [15] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2257-61
- [16] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65: 7065-70
- [17] Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3627-32
- [18] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435: 834-8
- [19] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2004, 64: 3753-6
- [20] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006, 9: 189-98
- [21] Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, 2006, 24(29): 4677-84
- [22] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18: 997-1006
- [23] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 2008, 3: e3148
- [24] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10513-8
- [25] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654-9
- [26] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 2008, 141: 672-5
- [27] Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*, 2009, 112: 55-9
- [28] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 2009, 58: 1375-81
- [29] Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4402-7