

Biological Significances and Progresses of miRNA in Digestive System Neoplasms

Lina Xu, Hong Zhang

Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong

Email: zhangh111@sina.com

Received: Apr. 14th, 2014; revised: May 20th, 2014; accepted: May 25th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

miRNAs are a group of endogenous non-coding small RNA molecules of 18 - 25 nt. They regulate gene expression at the posttranscriptional level through interaction with inhibition of target gene translation, involving in a variety of important biological processes. They link closely to the proliferation and apoptosis of the tumor cell and play a very important role in the early diagnosis and treatment. They can be regarded as a promising biomarker of carcinoma. This review tries to do a short introduction of the research progresses and biological significances of miRNA in digestive neoplasms.

Keywords

microRNA, Digestive System Carcinoma, Biological Significance, Process

微小RNA在消化系统恶性肿瘤中的生物学意义及进展

许丽娜, 张 弘

南通大学附属医院消化内科, 南通

Email: zhangh111@sina.com

收稿日期: 2014年4月14日; 修回日期: 2014年5月20日; 录用日期: 2014年5月25日

摘要

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度为18~25个核苷酸组成的内源性非编码小分子RNA, miRNA主要通过与其靶基因序列特异性翻译抑制的相互作用在转录后水平对基因表达进行调节, 从而参与多种生物学功能。与肿瘤细胞的增殖, 凋亡等过程密切相关。在肿瘤的早期诊断和治疗中发挥了重要的作用。它们可以作为肿瘤诊断的潜在的生物标志物。本文就微小RNA(microRNA, miRNA)在消化道肿瘤中的生物学意义及进展做出综述。

关键词

微小RNA, 消化系统肿瘤, 生物学意义, 进展

1. 引言

消化系统肿瘤是严重危害人类健康的疾病。消化系统肿瘤生长速度快, 恶性程度高, 极易早期转移, 且患者预后较差。由于得不到早期及时治疗而贻误时机是导致癌症患者死亡的主要原因。因而早期发现并早期进行干预是肿瘤治疗的关键。近些年来, 有关肿瘤生物标志物的研究发现, miRNA 在肿瘤早期即呈现失控性生长, 血循环中 miRNA 含量的检测对早期肿瘤的检测会有帮助。可以作为恶性肿瘤新的生物标志物和治疗反应的检测指标。为恶性肿瘤的诊断和治疗开辟一个新的视野。本文将针对血循环中 miRNA 在消化系统恶性肿瘤的早期诊断, 作用机制及个体化治疗以及预后监测等方面的应用价值做出综述。

2. miRNA 简介

2.1. miRNA 历史起源

Lee 等[1]人在 1993 年首次在线虫中发现基因 lin-4 通过转录生成的 RNA 调控其发育过程。2000 年 Reinhart[2]有在线虫中发现了另外一种具有类似功能的 miRNA-let-7。在随后的时间内研究者通过克隆测序及生物信息学的方法发现了多种 miRNA。至今已达到几千种[3]。miRNA 是一类由 18-25 个核苷酸组成的内源性非编码小分子单链 RNA, 广泛存在于各种植物和动物中。miRNA 对靶基因的调控是在转录后水平上进行, 通过对靶基因的切割或对其翻译抑制两种机制来下调靶基因的表达。miRNA 对基因的调控是通过构成 RISC 来进行的。在人类体内, 大部分 miRNA 不能与靶基因的转录体完全配对, 故被认为主要通过翻译抑制的方式来调控靶基因。

2.2. miRNA 的特征

miRNA 本身的生物学特征: miRNA 广泛存在于真核生物中, 成熟的 miRNA 结构为单链结构, 其 5' 端有一磷酸基团, 3' 端为羟基, 且本身不具有开放阅读框架。这使其区别于大多数寡核苷酸和功能 RNA 的降解片段。miRNA 在不同的物种和组织之间有高度的保守性。仅在 3' 端有 1~2 个碱基变化。miRNA 有细胞特异性和组织特异性。miRNA 的这些生物学特性说明它们在细胞生物学和人体研究中有重要的意义。

2.3. 血循环中 miRNA 特征

血循环中的 miRNA 有几个主要的特征: 第一, miRNA 是小分子非编码 RNA, 在血循环中有很高的

稳定性,能够抵制 RNA 酶的降解。现已证明血清中 miRNA 在严酷的状态下(如煮沸、冻存时间过长、过高或过低的 PH 值)仍然保持完整,这种稳定性使其成为潜在的生物标志物,用于临床监测和病理标本的检查[4]。研究发现这种稳定性和 miRNA 的高度保守性相关[5]。第二,miRNA 在肿瘤的早期失控性生长,其表达水平和正常组织相比有很大的改变。因此可以用于临床上肿瘤早期的监测。第三,miRNA 组成复杂,任何某个 miRNA 都可以调节很多基因,每个基因都可以被不同的 miRNA 调节。miRNA 作用于细胞功能、信号系统和生物过程的调节。一个单个 miRNA 可以调节多个 mRNA 的表达水平,有实验证明通过比较一些 miRNA 在良性肿瘤和恶性肿瘤中表达水平的改变,显示 miRNA 比 mRNA 能提供更简单的表达谱,有更优的生物学特征[6]。第四,miRNA 分布广泛,不仅存在于植物和动物体内,在人体的任何体液内也可以检测到。组织中,血浆及血清中都可以检测到[7]。因此增加了其临床应用的可行性。因此,miRNA 可以用于区分恶性肿瘤和正常组织。更重要的是,可以辨别不同的癌症亚型。

2.4. microRNA 的加工、成熟与分布

microRNA 是动、植物自身基因组编码形成的一类小分子首先由基因组转录形成长链 RNA 分子—pri-miRNA,约 60%的 microRNA 为独立转录表达;约 15%miRNA 为成簇存在而共同转录;其余还有约 25%的 miRNA 定位于功能基因内含子,随基因转录表达。Pri-miRNA 经双链 RNA 核酸酶 Drosha 酶作用,加工形成 70~100 nt 长度的 pre-miRNA。Pre-miRNA 在 Exportin5 介导作用下,转运出胞核至胞质中进行下一步加工。Pre-miRNA 在胞质中,经双链 RNA 核酸酶 Dicer 酶作用加工形成单链成熟 miRNA 分子。miRNA 的加工成熟过程与 RNAi 技术中常用的 siRNA 有许多相似之处—均经过 Dicer 酶对双链 RNA 的识别加工而形成单链 RNA 分子。18~25nt 的成熟 miRNA 形成后与其他蛋白共同组成 RNA 介导的沉默复合体(RISC)参与 RNA 干扰途径。miRNA 形成 RISC 后可与特定的靶 mRNA 结合,这种结合不要求严格的互补配对。结合后导致靶 mRNA 翻译的抑制和降解。

3. miRNA 检测常用的方法

目前实验室常用的方法有基因表达谱芯片技术,高流量通过技术和新一代的基因测序技术,RT-qPCR 技术,nanostring 技术和原位杂交技术等。另一方面,原位杂交技术也是一项技术挑战,这项技术的优点是比 RT-qPCR 技术和基因芯片技术更加精确,能够将肿瘤细胞和周围的基质区分出来。其缺点是只能在高温状态进行定位,而在低温条件下难以进行[8]。基因芯片技术可以在未知序列的情况下对 miRNA 进行分析,其缺点是价格比较昂贵。不适合普通实验室。Northernblot 技术步骤较繁琐,需要较多的样本且灵敏度比较低。不适合较多临床样本的分析研究。nanostring 技术是建立在 miRNA 表达谱的基础上,可以用于多个 miRNA 的能力的检测。是一项新的技术。各种技术相比较,RT-qPCR 技术更易建立,稳定,可重复性较强,同时具有高度的敏感性和特异度[9]。是目前应用度最广的一种实验室方法了。而实时定量 PCR 又有茎环法和试剂盒法两种。研究证明茎环反转录法方法灵敏度高,成本低,适用于少量 RNA 检测。试剂盒法成本高,工作量小,可以运用于多个 miRNA 的检测工作。茎环法在少量重要的 miRNA 检测中有优势,但试剂盒法适用于大量的 miRNA 的筛选[10]。

4. miRNA 与肿瘤

4.1. miRNA 在肿瘤中的作用机制

miRNA 是一类非编码的单链小分子 RNA,它们主要通过诱导目标 mRNA 的降解或干扰蛋白质的翻译过程下调特异性基因的表达,在控制细胞的生长、分化和凋亡等方面起着重要作用。miRNA 在肿瘤的发生过程中起着重要作用。很多实验证明 miRNA 在人类恶性肿瘤中有异常表达的现象[11]。Let[12]家族

主要是通过负调节 RAS 基因来抑制肿瘤的生长, ras 原癌基因参与细胞的分化和增殖。约有 15%~30% 的肿瘤中有 ras 基因。He[13]等将 miR-17-92 簇中脊椎动物特异的部分 miR-17-19b 和 c-myc 在 B 细胞淋巴瘤小鼠模型的造血干细胞中共表达, 发现 miR-17-19b 加快恶性淋巴瘤形成的速度, 共表达 miR-17-19b 和 c-myc 的细胞比仅表达 c-myc 的细胞有更高的增殖速度和更低的死亡率。Dews 等人[14]发现 miR-17-92 簇可以抑制抗血管新生的因子 Tsp1 和结缔组织生长因子 CTGF, 从而促进肿瘤中血管的新生, 这些研究都表明 miR-17-92 具有原癌基因的功能而该簇中 miR-17-5p 和 miR-20a 可以降低 E2F1 的水平, E2F1 通过调控与 DNA 复制、细胞分裂和凋亡相关的基因控制细胞从 G1 期到 S 期, miR-17-92 簇通过降低 E2F1 的水平又起到了抑癌基因的作用。miR-17-92 簇是作为原癌基因还是抑癌基因发挥作用, 要依赖于 miRNA 所在的组织、细胞类型以及胞内存在靶基因的种类。例如原癌基因 miR-10b 通过抑制 HOXD10 来促进转移, 而 HOXD10 是与肿瘤细胞增殖和转移相联系的负调节基因[15]。部分 miRNA 是有丝分裂的关键调节器, 例如 RAS 和 HMGA2。但是仍有部分基因在。郭俊明等[16]认为 DNA 甲基化和组蛋白修饰影响 miRNA 基因的表达后引起肿瘤的发生。为 miRNA 基因表达与表观遗传调控的关系在肿瘤发生中的作用的研究提供了一个新的方向。Xing T.J. [17]等人使用实时定量 PCR 和流式细胞仪技术检测了肝细胞癌 huh7 等细胞系中 miR-122 的水平, 以及使用脱氧胞苷前后水平差异, 认为 miR-122 在肝细胞癌细胞的增殖和凋亡机制中的作用与 DNA 的甲基化有关。Fornari F[18]等研究发现肝癌病人血清中 miR-122 通过促进细胞周期 G1 期从而抑制了 P53 的活性。同时发现 miR-122 也影响阿霉素对肝癌细胞的作用。

4.2. miRNA 与胰腺癌

胰腺癌是恶性程度高, 预后较差的肿瘤之一。A.E. Szafranska[19]等发现 miRNA217 和 miRNA196a 在胰腺导管腺中高表达。Marry Dillhoff[8]等用原位杂交技术和基因芯片技术分析了 12 例良性肿瘤和 45 例慢性胰腺炎病人及 80 例胰腺癌病人的血清 miRNA 水平发现 miRNA-21 在胰腺癌中过表达。而在胰腺炎和良性肿瘤中水平波动变化不大。

4.3. 循环 miRNA 与肝癌

肝细胞癌是世界上第五大恶性肿瘤, 死亡率居恶性肿瘤第三位。五年生存率只有 0%~14%[20]。因此亟需早期诊断和早期介入治疗。尽管 alpha-fetoprotein(AFP)在肝癌的诊断中起到非常重要的作用。但是仍缺乏一定的敏感性和特异性。因此仍需要更特异的新的生物标志物联合诊断。而 miRNA 被证实在肝癌早期就有异常表达。可用于肝癌早期的检测。Xu[21]等发现 miR-21 miR-122 在肝癌中的高表达。gramantieri 等[22]发现 miRNA-122a 可以负性调控细胞周期蛋白的表达, 而另外一种差异表达的 miR-221 可以促进肝细胞癌的恶性增殖, 说明组织中 miRNA 与肝细胞癌的发生和发展有着密切的关系。tokuo sukata 等[23]发现与正常肝脏组织相比七种 miRNA(miR-34a, miR-7a, let-7f, miR-331, miR-98, miR-338, miR-652)在肝癌血清中高表达。同时发现这七种 miRNA 是随着肝癌的临床进展而显著增加的。由此可以看出 miRNA 可以作为肝癌检测的临床标志物。Yusuke Yamamoto 等[24]用 RT-qPCR 方法发现 miR-500 在肝癌中高表达, 可以作为肝癌的临床诊断的生物标志物。同时发现一些 miRNA 例如 miR-142-5P、miR-451 miR-223 在血细胞中早期高表达, 随着肝脏的生长表达也随之下降, 其机制也许和肝脏是一个造血器官的生理功能有关。异常表达的 miRNA 可能与干细胞的分化、信号转导有关。同时亦有研究表明 miR-199 家族(miR-199a.b.c)在大部分肝癌病人组织中表达下调。MiR-199 低表达的肝癌病人复发率较 miR-199 表达水平高的病人复发率更高[25]。MiR-199 在肝癌病人体内作用的目标基因主要有 MET、mTOR 和 PTEN, AKT3 and TIMP2 及 HIF-1a[26]-[30]。同时 Henry J.C.等[31]人认为 CD44 也是 miR-199 在肝癌病人体内重要的目标基因。因为 CD44 在细胞间作用, 细胞粘附和细胞转移中起到重要作用。miR-199 也可能通过影

响 CD44 的表达从而影响肝癌细胞的转移。

4.4. 循环 miRNA 与结直肠癌

结直肠癌(CRC)是目前世界发病率较高的一种消化道肿瘤,每年大约有 100 万发病率,死亡率也较高,因此结直肠癌的早期诊断和筛选对降低结直肠癌的病死率很重要,但是目前临床上尚未有非常确切的生物标志物。de krijger I.等[32]发现 miRNA 在结直肠癌的肿瘤生成机制中是关键性的调节因子,同时在肿瘤的转移过程(包括肿瘤凋亡细胞的逃逸,上皮间质细胞转换,肿瘤血管的生成,以及肿瘤细胞侵袭)中也起到重要的作用。

4.5. 循环 miRNA 与胃癌

研究证明 miRNA 在胃癌的发生、转移、预后以及诊断治疗过程中起着重要的作用。Zheng Y. [33]等发现 miR-21 在胃癌血清中的水平显著升高。Song J.等[34]应用 RT-PCR 方法发现 miR-93 miR-16 在胃癌的血液中表达水平远远高于正常对照组水平,可以用于胃癌的早期诊断及预后判断标志物的相关研究。

4.6. miRNA 与食管癌

食管癌是世界上最常见的消化系统恶性肿瘤之一。其死亡率居恶性肿瘤第四位。食管癌的早期发现和早期治疗可以极大的提高食管癌的生存率。但是临床上灵敏度高特异度强的生物标志物仍缺乏。新兴出现的 miRNA 的发现有可能弥补这一缺陷。Liu R.等[35]现血循环 miR-155 在食管癌患者血清中过表达。蒋敏[36]等使用 xAMP 液态芯片技术检测了 45 名食管癌患者和 45 名正常对照组外周血单个核细胞中 miR-21 水平。结果发现食管癌患者外周血单个核细胞中 miR-21 的表达显著高于正常对照组。在鳞癌和腺癌中表达无显著性差异。且与食管癌的分期无关,预示 miR-21 可能参与食管癌的发病过程。

4.7. miRNA 和其他生物标志物联合诊断的临床意义

Ling Gao 等将 miR-16 和 CA19-9 进行联合诊断发现明显可以提高胰腺癌的早期诊断和筛选,克服了临床上缺乏确切的生物标志物的不足,同时增加了诊断的可信度。比单个生物标志物的临床特异度,敏感度以及准确度都高[37]。Angela M. Liu 等使用基因芯片技术及 RT-qPCR 方法研究认为 miR-15b 与 miR-130b 联合检测肝细胞癌其准确度达 94.83%。其早期诊断效果优于其他单个标志物[38]。

5. miRNA 与个体化治疗

目前关于 miRNA 的研究越来越多,miRNA 在肿瘤的发生,发展转移过程中扮演着重要的角色。miRNA-125 在甲状腺癌中表达下调且被证实可以抑制细胞的扩增和细胞循环的延长而起到抑制肿瘤形成的作用[39]。然而在成神经细胞瘤和前列腺癌中,miR-125b 则抑制细胞的凋亡促进细胞的扩增和转移而起到致癌作用[38] [40]。在许多人类肿瘤病例中存在 miRNA 表达异常的现象,miRNA 表达水平的改变在肿瘤的形成和转移过程中起到重要的作用。近年研究证明 miRNA 在肿瘤中既可以充当原癌基因也可以作为肿瘤抑制基因。致癌 miRNA 通过负调节机制抑制抑癌基因或促进细胞分化从而促进肿瘤生长。如果在治疗过程中找到这些 miRNA 的类似物或拮抗剂来促进或抑制这些基因,将会为肿瘤的治疗提供一个新的治疗理念。在肿瘤患者体内导入反义 miRNA 降低肿瘤组织中高表达的 miRNA 或者提高低表达及表达缺失的 miRNA 也许会成为一种新的抗肿瘤治疗方法。Park 等证明反义寡核苷酸能抑制上调的 miRNA,用其治疗胰腺癌,同时观察 miR-21、miR-221 的水平变化,发现 miR-21/221 都能抑制癌 cell 增殖提高肿瘤细胞的凋亡。可以用于胰腺癌病人的治疗[41]。Huang JW[42]等研究发现 miR-103 和 miR-107 通过作用于靶基因 RAD51 和 RAD51D 有助于损伤 DNA 的修复,从而增强药物的敏感性。Ye J.等[43]通过研究

miR-27b 在结直肠癌血管中的作用发现 miR-27b 可以作用于血管内皮影响因子 C 从而抑制肿瘤的发展和血管生成。可以用于结直肠癌的临床治疗。

6. miRNA 作为治疗效果监测的标志物

在肿瘤患者中,改变 miRNA 的表达或 miRNA 基因的多肽性和 miRNA 的结合位点与治疗反应有关。Nakajima G. [44]认为在大肠癌患者体内 let-7 和 miRNA-181b 的表达水平与 S-1 的化学反应密切相关。在食管癌患者血清中, miR-21 浓度比健康人高,而术后比术前明显降低。对化疗药物敏感的食管鳞状细胞癌患者,血清 miR-21 水平下降,而对化疗药物不敏感的患者 miR-21 水平没有明显改变。所以 miRNA-21 被认为是食管鳞状细胞癌的诊断标志物,同时也可以用来作为化疗药物治疗反应的检测[45]。另外,有研究表明,一些血循环 miRNA 在肿瘤切除术后水平会下降。也为 miRNA 治疗效果的监测提供了一个新的无创方法。1999 年 Yamamoto 等[24]研究发现人 miRNA-500 在 HCC 病人血清中显著升高,当行外科手术六个月后,病人血清中 miR-500 水平下降。

7. miRNA 的研究前景和展望

体液中 miRNA 的检测在生物标志物领域是一个爆炸性的研究,目前在人类基因组中,有超过 1500 种 miRNA 被发现,因为 miRNA 可以作为检测生物标志物的一个潜在的标准,同时也可用于检验癌症治疗反应。尽管有很多临床试验已证明 miRNA 的临床诊断价值,但是,这项新发现仍有很多问题尚未解决,第一,缺乏长期有用的数据来验证这些结果,因此还需要大量的前瞻性临床试验来验证这项技术。第二,体液中 miRNA 的表达水平的上调和下降反映了肿瘤的变化,但是仍缺乏一个明确的通用参数用于临床广泛推广。第三,一种肿瘤中可能有很多 miRNA 异常表达,而同时一种 miRNA 可以在不同的肿瘤中异常表达,缺乏肿瘤特异性,为 miRNA 的临床研究增加了一定的难度,我们仍需要大量的研究寻找出具有高度特异性的临床生物标志物如具有肝脏特异性的 miR-122[46]。目前已有很多研究者提出联合检测可以提高肿瘤的早期检出率和有利于早期诊断。例如肿瘤相关抗原(例如 PSA)、突变基因(例如 BRCA1、RB1、TP53)和染色体异位等。为临床研究打开了一个新的窗口。以血液为基础的癌症标志物 miRNA 有着自己的优点和潜在的优势。随着现代医学的发展和有关研究的不断深入,关于 miRNA 的研究将会进行得更广,其作用机制以及和肿瘤之间的关系也会更加的完善。同时也会有越来越多的临床研究来验证这些结果,将会证明血循环 miRNA 是一项非常有研究价值的临床生物标志物,同时也发明了很多检测血液中 miRNA 含量和水平的先进方法。我们相信随着对循环 miRNA 的研究的不断发展以及对其认识的不断深入。将 miRNA 作为一些肿瘤的早期检测和肿瘤无创检测的标志物将会实现。

参考文献 (References)

- [1] Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, **75**, 843-854.
- [2] Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C. and Rougvie, A.E. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**, 901-906.
- [3] Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2011) miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, **39**, D152-D157.
- [4] Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y. and Wang, K. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, **18**, 997-1006.
- [5] Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D. and Wang, K. (2011) Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutation Research*, **717**, 85-90.
- [6] Tsongalis, G.J., Calin, G., Cordelier, P., Croce, C., Monzon, F. and Szafranska-Schwarzbach, A.E. (2013) MicroRNA analysis: Is it ready for prime time? *Clinical Chemistry*, **59**, 343-347.

- [7] Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H. and Lee, M.J. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, **56**, 1733-1741.
- [8] Dillhoff, M., Liu, J., Frankel, W., Croce, C. and Bloomston, M. (2008) MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, **12**, 2171-2176.
- [9] Jiang, J., Lee, E.J., Gusev, Y. and Schmittgen, T.D. (2005) Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research*, **33**, 5394-5403.
- [10] 闵自信, 杜小云, 宁启兰, 钟楠楠, 郑悦雯, 韩燕 (2013) 两种实时定量 RT-PCR 方法检测 miRNAs 表达的技术分析. *西安交通大学学报(医学版)*, **34**, 3029-3035.
- [11] Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R. and Cheng, A. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, **120**, 635-647.
- [12] Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 857-866.
- [13] He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D. and Goodson, S. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, **435**, 828-833.
- [14] Dews, M., Fox, J.L., Hultine, S., Sundaram, P., Wang, W. and Liu, Y.Y. (2010) The myc-miR-17~92 axis blunts TGF β signaling and production of multiple TGF β -dependent antiangiogenic factors. *Cancer Research*, **70**, 8233-8246.
- [15] Ma, L., Teruya-Feldstein, J. and Weinberg, R.A. (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, **449**, 682-688.
- [16] 郭俊明, 肖丙秀, 钟久昌 (2010) 肿瘤相关微小 RNA 基因表达的表现遗传调控机制. *中国细胞生物学学报*, **32**, 321-325.
- [17] Xing, T.J., Xu, H.T., Yu, W.Q. and Jiang, D.F. (2013) Methylation regulation of liver-specific microRNA-122 expression and its effects on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Genetics and Molecular Research*, **12**, 3588-3597.
- [18] Fornari, F., Gramantieri, L., Giovannini, C., Veronese, A., Ferracin, M. and Sabbioni, S. (2009) MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Research*, **69**, 5761-5767.
- [19] Szafranska, A.E., Davison, T.S., John, J., Cannon, T., Sipos, B. and Maghnoij, A. (2007) MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, **26**, 4442-4452.
- [20] Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, **127**, 2893-2917.
- [21] Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D. and Zhang, T. (2011) Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Molecular Carcinogenesis*, **50**, 136-142.
- [22] Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S. and Liu, C.G. (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, **67**, 6092-6099.
- [23] Sukata, T., Sumida, K., Kushida, M., Ogata, K., Miyata, K. and Yabushita, S. (2011) Circulating microRNAs, possible indicators of progress of rat hepatocarcinogenesis from early stages. *Toxicology Letters*, **200**, 46-52.
- [24] Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., Koizumi, F., Kanai, Y. and Mizutani, T. (2009) MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*, **14**, 529-538.
- [25] Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H. and Okanoue, T. (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, **25**, 2537-2545.
- [26] Jia, X.Q., Cheng, H.Q., Qian, X., Bian, C.X., Shi, Z.M. and Zhang, J.P. (2012) Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-199a inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **62**, 237-244.
- [27] Fornari, F., Milazzo, M., Chieco, P., Negrini, M., Calin, G.A. and Grazi, G.L. (2010) MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Research*, **70**, 5184-5193.
- [28] Kim, S., Lee, U.J., Kim, M.N., Lee, E.J., Kim, J.Y. and Lee, M.Y. (2008) MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 18158-18166.
- [29] Wang, C., Song, B., Song, W., Liu, J., Sun, A. and Wu, D. (2011) Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1 α in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **26**, 1630-1637.

- [30] Fornari, F., Milazzo, M., Chieco, P., Negrini, M., Marasco, E. and Capranico, G. (2012) In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. *The Journal of Pathology*, **227**, 275-285.
- [31] Henry, J.C., Park, J.K., Jiang, J., Kim, J.H., Nagorney, D.M. and Roberts, L.R. (2010) miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **403**, 120-125.
- [32] de Krijger, I., Mekenkamp, L.J., Punt, C.J. and Nagtegaal, I.D. (2011) MicroRNAs in colorectal cancer metastasis. *The Journal of Pathology*, **224**, 438-447.
- [33] Zheng, Y., Cui, L., Sun, W., Zhou, H., Yuan, X. and Huo, M. (2011) MicroRNA-21 is a new marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Cancer Biomark*, **10**, 71-77.
- [34] Song, J., Bai, Z., Han, W., Zhang, J., Meng, H. and Bi, J. (2012) Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Digestive Diseases and Sciences*, **57**, 897-904.
- [35] Liu, R., Liao, J., Yang, M., Shi, Y., Peng, Y. and Wang, Y. (2012) Circulating miR-155 expression in plasma: A potential biomarker for early diagnosis of esophageal cancer in humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, **75**, 1154-1162.
- [36] 蒋敏, 顾国浩, 张静, 陈旭 (2013) 食管癌患者外周血单个核细胞中 miR-21 的表达. *中国现代医学杂志*, 34-38.
- [37] Gao, L., He, S.B. and Li, D.C. (2014) Effects of miR-16 plus CA19-9 detections on pancreatic cancer diagnostic performance. *Clinical Laboratory*, **60**, 73-77.
- [38] Liu, A.M., Yao, T.J., Wang, W., Wong, K.F., Lee, N.P. and Fan, S.T. (2012) Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *BMJ Open*, **2**, e000825.
- [39] Visone, R., Pallante, P., Vecchione, A., Cirombella, R., Ferracin, M. and Ferraro, A. (2007) Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*, **26**, 7590-7595.
- [40] Nam, E.J., Yoon, H., Kim, S.W., Kim, H., Kim, Y.T. and Kim, J.H. (2008) MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **14**, 2690-2695.
- [41] Park, J.K., Lee, E.J., Esau, C. and Schmittgen, T.D. (2009) Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, **38**, e190-e199.
- [42] Huang, J.W., Wang, Y., Dhillon, K.K., Calses, P., Villegas, E. and Mitchell, P.S. (2013) Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Molecular Cancer Research*, **11**, 1564-1573.
- [43] Ye, J., Wu, X., Wu, D., Wu, P., Ni, C. and Zhang, Z. (2013) miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor C to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer. *PLoS One*, **8**, e60687.
- [44] Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K. and Takasaki, K. (2006) Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*, **3**, 317-324.
- [45] Kurashige, J., Kamohara, H., Watanabe, M., Tanaka, Y., Kinoshita, K. and Saito, S. (2012) Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, **106**, 188-192.
- [46] Castoldi, M., Vujic Spasic, M., Altamura, S., Elmen, J., Lindow, M. and Kiss, J. (2011) The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, **121**, 1386-1396.