

血清miR-93含量与卵巢癌相关性研究

李佳一^{1#} 吴双^{1#} 范丽菲¹ 刘亚萍^{2*}¹内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021; ²内蒙古医科大学附属医院妇产科, 呼和浩特 010050

摘要 卵巢癌的早期诊断率很低, 多数(约70%)被确诊时已经处于晚期, 所以开发非侵入性的生物标志物协助进行早期诊断十分必要。该文研究了miR-93作为新型生物标志物在卵巢癌早期诊断中的意义。该研究收集了正常人、良性卵巢肿瘤患者和恶性卵巢肿瘤患者各12例的血清, 用荧光定量PCR方法对3组样本血清中miR-93、miR-21、miR-200c和miR-let-7f2的水平进行检测, 并用 $2^{-\Delta Ct}$ 法对受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)等进行分析。结果显示, miR-93在卵巢癌患者中的相对水平明显高于对照组($P < 0.05$), 在ROC分析中, miR-93具有较高的诊断价值(曲线下面积=0.889、灵敏度=0.917、特异性=0.833)。该结果表明, 血清中miR-93标志物作为现有诊断方法的补充, 将有望提高卵巢癌的临床检出率。

关键词 小分子RNA; 卵巢癌; 诊断标志物; miR-93

Study on the Correlation between Serum miR-93 and Ovarian Cancer

Li Jiayi^{1#}, Wu Shuang^{1#}, Fan Lifei¹, Liu Yaping^{2*}¹School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Abstract Most patients (70%) suffered from the ovarian cancer (OvCa) were diagnosed in advanced stage. It is essential to find out the non-invasive biomarkers to facilitate the early detection of OvCa. This study was designed to investigate the role of miR-93 as a potential biomarker in the early diagnosis of ovarian cancer. We collected the serum samples from 12 healthy subjects, 12 benign tumor patients and 12 malignant tumor patients, respectively. Then Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the levels of miR-93, miR-21, miR-200c and miR-let-7f2, and the ROC (receiver operating characteristic curve) was analyzed by $2^{-\Delta Ct}$ method. The results showed that the relative level of miR-93 in ovarian cancer patients was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). miR-93 had a high diagnostic value (AUC=0.889, sensitivity=0.917, specificity=0.833). These results suggested that serum miR-93 could be used as a potential early diagnostic marker for ovarian cancer. And the serum miR-93 as a supplemental test of existing diagnostic methods was expected to improve the clinical detection rate of ovarian cancer.

Keywords microRNA; ovarian cancer; diagnostic biomarker; miR-93

卵巢癌是引起全球女性癌症死亡的第五大原因^[1], 因其具有发病隐匿、难以进行早期诊断、易复发、治疗效果不佳和预后性差等特点, 病死率位居

妇科恶性肿瘤之首^[2], 甚至超过宫颈癌和子宫内膜癌的总和。约70%卵巢癌患者在诊断时已处于晚期, 5年生存率仅不到30%^[3]。与之相反, 早期卵巢癌患

收稿日期: 2017-03-12

接受日期: 2017-05-15

内蒙古大学本科创新基金项目(批准号: 201614236)和内蒙古自治区科技计划资助项目(2016)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0471-3451427, E-mail: wuyun19820221@163.com

Received: March 12, 2017

Accepted: May 15, 2017

This work was supported by the Undergraduate Students' Innovation Foundation Project of Inner Mongolia University (Grant No.201614236) and Inner Mongolia Science & Technology Plan (2016)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-471-3451427, E-mail: wuyun19820221@163.com

网络出版时间: 2017-05-27 16:38:16

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170527.1638.014.html>

者5年生存率却在70%以上^[4]。因此,早期卵巢癌的检测可以大幅度提高患者的预后。所以,敏感、特异性强的肿瘤标志物有助于疾病诊断、分期和预测治疗效果,从而进一步提高生存率^[5]。

CA125(carbohydrate antigen 125)是目前最常用于检测卵巢癌的生物标志物^[6],但是它对早期阶段疾病的敏感性只有记载的40%^[7]。此外,已被证实即使在一个高风险的人群中进行CA125筛选,预测出患癌的病例也大多是处于晚期阶段^[8]。所以,迫切需要寻找更加灵敏的新型生物标志物以及研究当它单独或结合CA125使用时能否更敏感和特异地检测出卵巢癌患者。

最新研究显示,miRNA作为一类小分子调控RNA,由于它们在循环血清中相对稳定,显现出可能成为人类疾病包括癌症的血清标志物的优势^[9]。miRNA为非编码RNA,在转录后水平对基因表达调控起重要作用^[10-11],并在细胞分化、增殖和细胞周期调控中产生重要影响^[12]。血清中存在的循环miRNA具有与不同肿瘤类型相关的特异性,例如用作诊断肺癌的miR-let-7^[13-14]、诊断结肠癌的miR-141^[15-16]、诊断卵巢癌的miR-92等^[17-18]。研究证实,在恶性肿瘤中miRNA基因表达相对于正常人会发生变化。有些miRNA在癌症患者体内表达下调,例如肺癌中的let-7和白血病中的miRNA-15/16,都是肿瘤抑制基因,分别抑制原癌基因*Ras*和*BCL2*(B-cell lymphoma 2)的表达^[19-20]。有些miRNA在癌症患者体内表达上调,例如miR-21和miR-17-92基因簇,这些原癌基因分别靶向实体肿瘤和血液系统恶性肿瘤中的肿瘤抑制基因*PTEN*(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)和*E2F1*(E2F transcription factor 1)^[21-22]。已有研究证明,卵巢癌患者体内来源于肿瘤细胞的循环miRNA和原发性肿瘤的miRNA有明显的相关性^[18],特异性的循环miRNA可代替肿瘤miRNA进行肿瘤的早期诊断^[23]。针对早期诊断较为困难的癌症类别(如卵巢癌)进行无创性血清筛查是一种很有前景的诊断手段,而且还能为肿瘤患者的治疗和预后带来福音。

通过查阅相关参考文献^[24-25],本研究选择了14个在卵巢癌患者体内水平异常的miRNA。经过预实验筛选出4个血清水平较正常对照具有显著差异的miRNA($P<0.05$)。后续我们对这4个miRNA进行了扩大样本的研究,检测它们在不同组别样本中的相对

血清水平,以寻找出敏感而特异的miRNA作为检测卵巢癌的血清生物标志物。研究结果显示,卵巢癌患者血清中miR-93的水平明显高于正常人($P<0.05$),miR-93具有作为卵巢癌早期诊断标志物的潜质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清收集 收集2016年4月至2016年12月内蒙古医科大学附属医院妇产科收治的12例卵巢癌患者(恶性组)、12例良性卵巢肿瘤患者(良性组)和12例健康女性(正常对照组)的血液样本,并检测其血液CA125的含量。血液样本标准为:患者未接受化疗或其他药物治疗。本研究已得到了内蒙古医科大学附属医院伦理委员会批准。

1.1.2 细胞培养 卵巢癌细胞株(A2780)和正常卵巢上皮细胞株(IOSE-80)均由本实验室保存。两细胞系均在37 °C、5% CO₂条件下DMEM培养基中培养。

1.2 miRNA提取

1.2.1 血清miRNA提取 取5 mL血液样本,经3 000 r/min离心10 min处理后,取200 μL血清,加入5倍体积的QiAzol Lysis Reagent,振荡均匀,静置5 min后加入3.5 μL(1.6×10^8 colies/μL)miRNeasy Serum/Plasma Spik-In Control,振荡混匀。其余步骤按照miRNeasy血清/血浆RNA纯化试剂盒(QIAGEN公司GmbH)说明书进行miRNA提取。收集到的RNA置于-80 °C保存。

1.2.2 细胞总RNA提取 使用TransZol™ Up试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),严格按照说明书步骤,采用对贴壁培养细胞处理方法,在无RNase条件下提取总RNA。提取得到的总RNA置于-80 °C保存。

1.3 逆转录和实时定量PCR

1.3.1 血清miRNA逆转录 应用Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit(TaKaRa公司),用上述miRNA作为模版,总反应体系为20 μL,在PCR扩增仪上进行逆转录和cDNA的PCR过程。反应条件为:37 °C 1 h; 85 °C 5 min; 降至4 °C后取出cDNA,加100 μL ddH₂O, -20 °C保存备用。

1.3.2 细胞总RNA逆转录 应用Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit(TaKaRa公司)和gDNA Remover(TransScript. One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix试剂盒,北京全式金生物

表1 实时定量PCR引物序列

基因	上游引物序列(5'→3')
Gene	Upstream primer sequence (5'→3')
miR-93	CAA AGT GCT GTT CGT GCA GGT AG
miR-21	CGT AGC TTA TCA GAC TGA TGT TGA
miR-200a	CGG TAA CAC TGT CTG GTA ACG ATG
miR-let-7f2	GCG TGA GGT AGT AGA TTG TAT AGT T
miR-39	TCA CCG GGT GTA AAT CAG CTT G

技术有限公司), 按照说明书要求对细胞总RNA进行逆转录。总反应体系和反应条件与血清miRNA逆转录相同。

1.3.3 实时定量PCR 按照SYBR® Premix Ex Taq™ II(购自TaKaRa公司)说明书配制RT反应体系, 每个样本设置3个平行反应复孔, 并进行3次平行实验, 反应条件为: 95 °C预变性30 s; 定量分析模式(45个循环): 95 °C 5 s; 60 °C 30 s; 熔解曲线模式: 95 °C 5 s; 60 °C 1 min; 95 °C, Continuous; 降温: 50 °C 30 s。实验所需上游引物均按照实时定量PCR引物设计原则及miRNA的序列设计, 并交由上海生工生物工程有限公司合成。选择*Caenorhabditis elegans* miR-39 miRNA作为内参^[26]。实时定量PCR所用上游引物序列如表1, 下游引物使用mRQ 3'Primer(TaKaRa公司)。所得数据用 $2^{-\Delta Ct}$ 法^[27]进行分析。

1.4 统计分析

采用SPSS 22.0软件进行数据处理。两组间比较使用*t*检验, 3组间比较使用单因素方差分析, 用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)表示对血清中miR-93、miR-21、miR-200c和miR-let-7f2对卵巢肿瘤早期诊断价值的评估。 $P < 0.05$ 为组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清miRNA相对水平比较

通过查阅相关参考文献^[24-25], 我们筛选出14个在卵巢癌患者体内水平异常的miRNA(表2)。通过对8个样本(正常人、良性卵巢肿瘤各3例, 恶性卵巢肿瘤2例)进行预实验, 筛选出4个表达水平相对于正常对照具有显著差异($P < 0.05$)的miRNA, 即miR-93、miR-21、miR-200c和miR-let-7f2。随后, 对正常人、良性卵巢肿瘤患者、恶性卵巢肿瘤患者(各12例)进行4个miRNA水平的检测(表3), 其中, miR-93水平在

表2 预实验miRNA相对水平变化趋势

Table 2 Changes of relative levels of miRNA in pre-experiment			
上调		下调	其他
Upregulated		Downregulated	Else
miR-141	miR-21	miR-let-7f2	miR-200b
miR-200a	miR-200c		miR-let-7f1
miR-205	miR-494		miR-let-7i
miR-29c			miR-296
miR-93			miR-106b

“其他”一栏所列miRNA水平变化包括趋势不明显, 或者趋势与已有研究不符。

The changes in miRNA levels listed in the “Else” column include trends that are not obvious, or not consistent with existing research.

恶性组、良性组较正常对照组差异最为显著, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。miR-21、miR-200c和miR-let-7f2水平在良性组与正常对照组的差异具有显著性($P < 0.05$), 而在恶性组与正常对照组的差异不具有显著性($P > 0.05$)(图1)。

2.2 细胞miRNA相对水平比较

我们分别在卵巢癌细胞株(A2780)和正常卵巢上皮细胞株(IOSE-80)中提取得到miRNA, 并通过荧光定量PCR检测了两种不同细胞系中miR-93等4个miRNA的相对水平。如图2所示, miR-21、miR-200c在细胞株A2780的相对水平相较细胞株IOSE-80没有显著差异($P > 0.05$)。miR-let-7f2却在细胞株A2780中上调, 这与其他相关研究结果不符^[28]。miR-93在卵巢癌细胞系中的水平明显高于正常卵巢上皮细胞, 此结果与血清中miRNA一致。

2.3 miRNA与CA125水平趋势的分析

目前, CA125是最为普遍的检测卵巢癌的生物标志物^[6]。我们将良性组(编号1~12)和恶性组(编号13~24)的所有个体的CA125水平和miR-93的相对水平进行对比(图3), 可明显观察到它们的组间差异较大。由于个体水平的差异, CA125水平和miR-93的相对水平之间没有明显的相关性(图4A, $r_A = 0.634$)。将良性组与恶性组进行比较, 可看出CA125水平与肿瘤发展显著相关($P < 0.001$), miR-93的相对水平在这两组之间没有显著差异, 但良性组和恶性组的miR-93的相对水平均显著高于正常对照组(图1A)。

在良性组中, 有80%的个体CA125水平属于正常范围(< 35 U/mL)。91.6%的个体miR-93的相对水平高于正常对照组, 且有50%的相对水平是正常对

表3 正常对照组、良性组、恶性组血清中4种miRNA相对水平

Table 3 The serum relative levels of the four miRNAs for normal (N), benign tumor (BT) and ovarian cancer (OvCa)

组别 Groups	miR-93		miR-21		miR-200c		miR-let-7f2	
	相对水平	P值	相对水平	P值	相对水平	P值	相对水平	P值
	Relative level	P value	Relative level	P value	Relative level	P value	Relative level	P value
N	0.112 [0.018; 0.394]		0.146 [0.024; 0.255]		0.009 [0.0001; 0.026]		0.052[0.007; 0.137]	
BT	0.345 [0.108; 0.163]	0.024 6	1.332 [0.512; 2.582]	0.000 1	0.028 [0.005; 0.066]	0.007 7	0.188[0.057; 0.674]	0.026 7
OvCa	0.513 [0.077; 1.994]	0.023 8	1.191 [0.138; 6.431]	0.051 8	0.054 [0.001; 0.240]	0.060 9	0.143[0.757; 0.004]	0.156 9

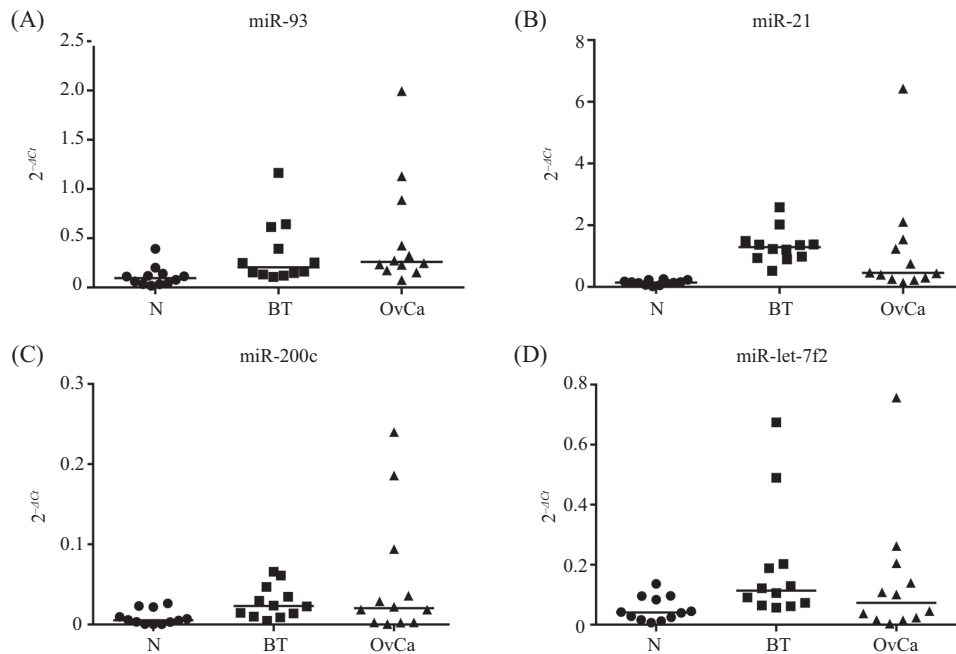
图1 恶性组、良性组、正常对照组的miR-93(A)、miR-21(B)、miR-200c(C)、miR-let-7f2(D)的 $2^{-\Delta C_t}$ 的散点图

Fig.1 Scatter plots of miR-93 (A), miR-21 (B), miR-200c (C), miR-let-7f2 (D) serum relative concentrations of normal, benign tumor and ovarian cancer

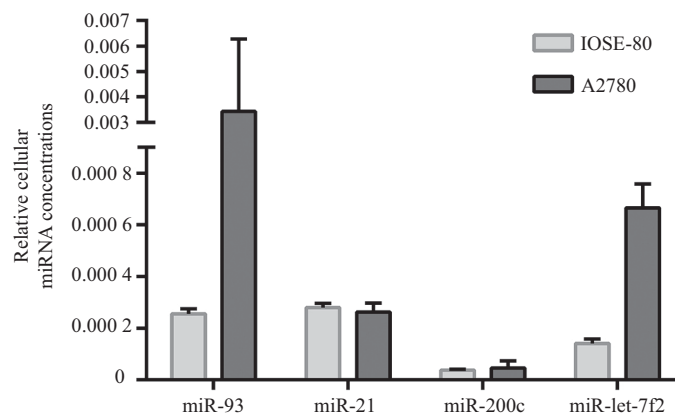


图2 不同细胞系中miR-93、miR-21、miR-200c和miR-let-7f2的相对水平

Fig.2 The relative levels of miR-93, miR-21, miR-200c and miR-let-7f2 in different cell lines

照组的2倍以上。CA125作为现有的临床检测手段,对良性卵巢肿瘤、早期卵巢癌的诊断准确度均不高。就本文的数据来看,CA125对于良性卵巢肿瘤的检测准确率仅约20%,其中12号样本还患有盆腔重度

黏连,也导致了CA125的升高,而miR-93的检测准确度高于50%。对于良性卵巢肿瘤,血清miR-93或具有比CA125更高的诊断价值。

图4显示,卵巢癌患者血清中miR-93、miR-21、

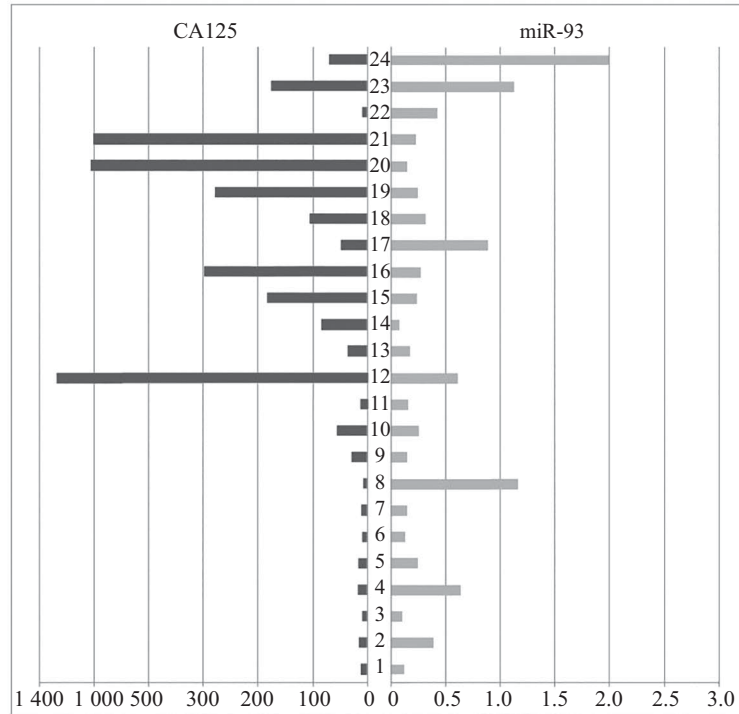


图3 良性组(12例, 编号1~12)和恶性组(12例, 编号13~24)的血清miR-93相对水平($2^{-\Delta Ct}$)和CA125(U/mL)水平比较
 Fig.3 Individual profiles of the levels of miR-93 ($2^{-\Delta Ct}$) and CA125 (U/mL) in serum samples from patients with benign ovarian diseases ($n=12$, numbers 1-12) and OvCa patients ($n=12$, numbers 13-24)

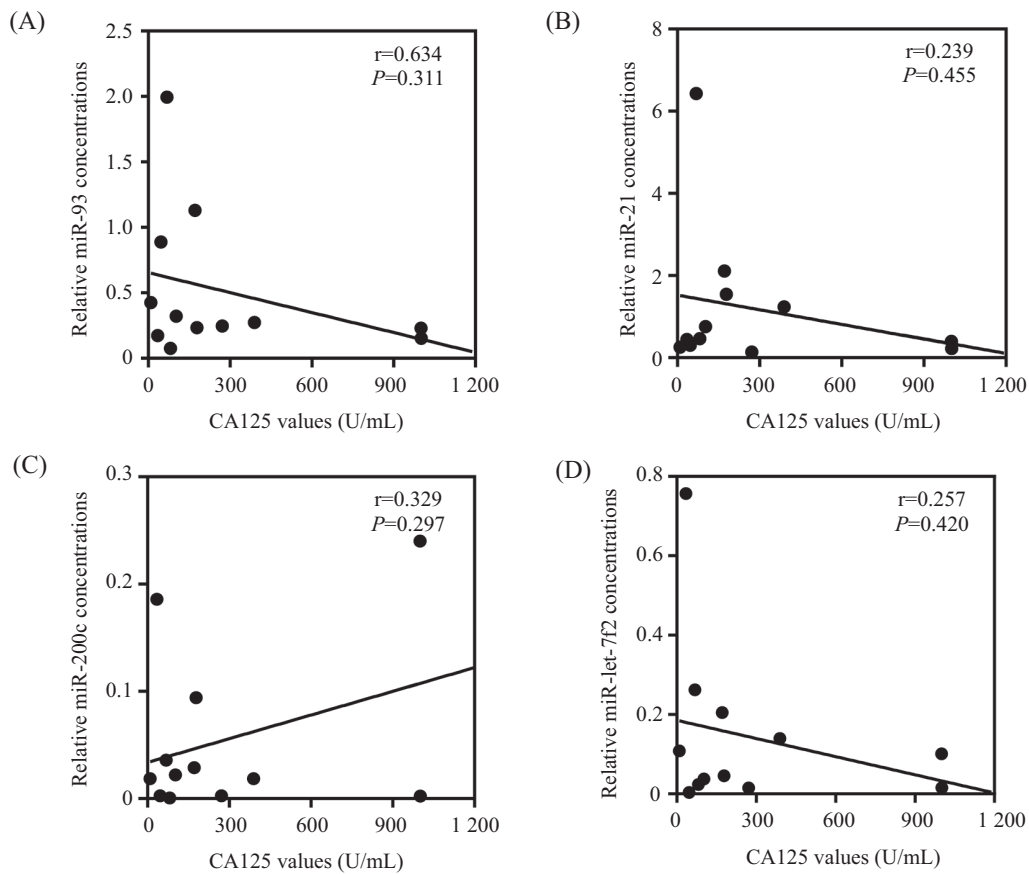


图4 血清miR-93、miR-21、miR-200c、miR- let-7f2相对水平($2^{-\Delta Ct}$)和CA125(U/mL)水平的相关性
 Fig.4 The scatter plots show the correlations of the levels ($2^{-\Delta Ct}$) of serum miR-93, miR-21, miR-200c and miR-let-7f2 with the CA125 values (U/mL) of OvCa patients

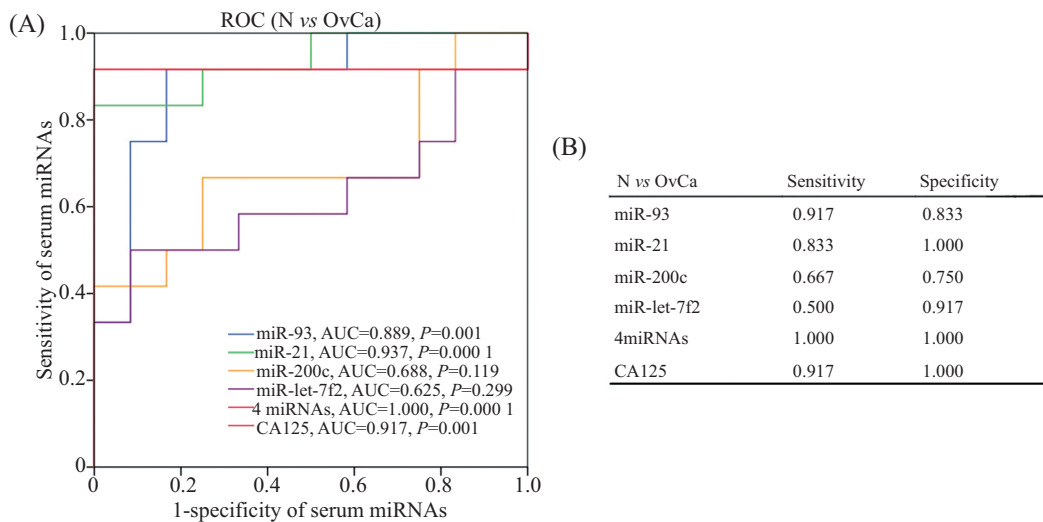
miR-200c 和 miR-miR-let-7f2 的相对水平与 CA125 水平相关性较弱 ($r_A=0.634$ 、 $r_B=0.239$ 、 $r_C=0.329$ 、 $r_D=0.257$)。

2.4 miRNA与CA125的ROC曲线分析

参照CA125的正常范围(<35 U/mL), 选择中位数18 U/mL作为对照组的CA125值; 以病理诊断结果作为金标准并利用各miRNA的 2^{-4Ct} 值将正常对照组和恶性组进行ROC分析(图5A)。结果显示, ROC分析中CA125的AUC=0.917($P<0.01$), 同时4个miRNA的曲线下面积分别为0.889、0.937、0.688、0.625, 均具有一定的诊断价值(图5B)。将4个miRNA逐

个联合分析, AUC均高于0.940($P<0.001$), 其中将miR-93、miR-21、miR-200c、miR-let-7f2进行联合后AUC=1.000($P<0.001$), 但由于miR-let-7f2和miR-200c在恶性组和正常对照组的水平差异不具有显著性($P_{miR-21}=0.119$, $P_{miR-200c}=0.299$), 此组合是否用于临床诊断还需进一步实验验证。

综上所述, miR-93水平在恶性组相较对照组具有稳定且显著的上调, 且miR-93的AUC>0.850, 表示具有较高的诊断价值。因此, 血清miR-93具有作为卵巢癌早期诊断标志物的潜力, 如果把血清miR-93作为现有诊断方法的补充检测手段将有望可以提高



A: ROC曲线显示miRNAs的诊断价值; B: 最佳截断点的灵敏度和特异性。

A: the ROC curve shows the diagnostic value of miRNAs; B: sensitivity and specificity of optimal cut off point.

图5 血清miRNAs和CA125的ROC分析

Fig.5 ROC analyses of serum miRNAs and CA125

卵巢癌的临床检出率。

3 讨论

我们使用实时定量PCR检测血清, 结果发现, miR-93、miR-21、miR-200c和miR-let-7f2水平在卵巢肿瘤患者中较正常对照具有显著差异($P<0.05$)。其中, miR-93、miR-21和miR-200c的水平上调, miR-let-7f2的水平下调。miRNA作为通过调控原癌基因或抑癌基因的表达参与肿瘤发生, 具有成为卵巢癌生物标志物的前景。

本研究中, 在卵巢肿瘤患者和正常对照组血清miR-93水平的差异最为明显且稳定。ROC分析显示, miR-93具有较高的诊断价值(AUC=0.889、灵敏度=0.917、特异性=0.833)。对于卵巢肿瘤患者, miR-

93基因的过度表达常与较短的生存时间相联系^[29]。已有研究表明, 在淋巴瘤转基因小鼠模型中过表达与miR-93属于同家族的miR-17-92基因将会加速淋巴瘤的形成和扩散^[30]。在胃癌中, miR-17-92基因簇负调控TGF β (transforming growth factor β)肿瘤抑制因子的活性^[31]。这些已有的结论都与本研究结果相一致, 并且为miR-93具有作为卵巢癌血清标志物的潜力提供了实验支持。

外周血中的miRNA可以在一定程度上抵抗核糖核酸酶的破坏, 并且miRNA具有较强的耐酸碱性, 可反复冻融, 能长期保存并且稳定存在^[32]。由于血清miRNA提取的技术不断进步, 提取纯度升高且成本下降, 这为miRNA作为卵巢肿瘤检测的生物标志物提供了技术上的支持。综上所述, 使用miR-93作

为卵巢癌血清标志物或血清CA125检测的有效补充,在一定程度上提高卵巢癌诊断的准确性。

鉴于本研究发现miR-93在卵巢癌患者血清里的表达水平显著上升,我们希望能进一步探明miR-93在卵巢癌细胞里表达异常的分子机制。Chen等^[33]在卵巢癌细胞系OVCAR3、SKOV3/DDP和HO8910-PM中过表达miR-93发现,细胞在G₁期或S期出现异常停滞或凋亡,癌细胞的增殖受到了抑制;同时检测到,RhoC(Ras homolog gene family member C)、P70S6K(ribosomal protein S6 kinase, 70 kDa)、Bcl-xL(B-cell lymphoma-extra large)等在mRNA水平或蛋白质水平的下调。但由于miRNA的作用与靶基因相关,miR-93在不同癌症里所担任的角色往往不同。Lyu等^[34]发现,miR-93直接靶向抑制TGFβR2(transforming growth factor β receptor 2)的表达,导致PI3K(phosphatidylinositol 3 kinase)/PKB(protein kinase B,也称为Akt)信号通路的失调,进而促进鼻咽癌的发展。Tang等^[35]对miR-93在结肠癌里的研究发现,miR-93通过靶向Smad7参与Wnt/β-catenin信号通路,从而抑制结肠癌的发展。我们利用生物信息学手段预测的miR-93潜在靶基因数量有上千个。同时,还有一些研究表明,miRNA与它的靶基因呈反馈环式调节^[36]。miRNA的调控机制十分复杂,它是如何特异性发挥其表观遗传调控功能还有待于进一步的研究。

本研究存在样本量有限,缺乏长期随访调查而无法推测卵巢肿瘤患者接受治疗后血清miRNA水平的变化等不足。此外,我们尚不清楚这些与卵巢肿瘤相关的血清miRNA到底是由肿瘤组织产生分泌到内环境里,还是与涉及宿主免疫反应和应激过程产生的miRNA,也不清楚它们的具体作用机制和信号通路,这些都有待于进一步的研究。同时,通过制作基因芯片筛选出更多与卵巢肿瘤相关的miRNA,或将为卵巢癌的诊断和治疗提供更多途径。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 张彦骅, 何荣霞. 卵巢癌相关肿瘤标志物研究进展. *卫生职业教育*(Zhang Yanyi, He Rongxia. *Advances in tumor markers related to ovarian cancer. Health Vocational Education*) 2015; 33(24): 155-7.
- Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004; 351(24): 2519-29.
- Ahmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP, Nicol B, Shepherd J, Blake P, *et al.* Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1996; 14(11): 2968-75.
- 岳娟, 刘菲, 李艳红. 卵巢癌早期诊断的血清肿瘤标志物研究进展. *国际妇产科学杂志*(Yue Juan, Liu Fei, Li Yanhong. *Research progress in serum tumor markers of early diagnosis of ovarian cancer. Journal of International Obstetrics and Gynecology*) 2015; 42(5): 560-3.
- Suh KS, Park SW, Castro A, Patel H, Blake P, Liang M, *et al.* Ovarian cancer biomarkers for molecular biosensors and translational medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10(8): 1069-83.
- Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(4): 355-66.
- Olivier RI, Lubsen-Brandsma MA, Verhoef S, van Beurden M. CA125 and transvaginal ultrasound monitoring in high-risk women cannot prevent the diagnosis of advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 100(1): 20-6.
- Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: A new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9(6): 703-11.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4): 642-55.
- Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation: Shared themes amid diversity. *Nat Rev Genetics* 2008; 9(11): 831-42.
- Jannot G, Simard MJ. Tumour-related microRNAs functions in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene* 2006; 25(46): 6197-201.
- Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10(1): 42-6.
- Silva J, Garcia V, Zaballos A, Provencio M, Lombardia L, Almonacid L, *et al.* Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 2011; 37(3): 617-23.
- Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, *et al.* Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 2011; 6(3): e17745.
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, *et al.* Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: A potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58(10): 1375-81.
- Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; 112(1): 55-9.
- Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1): 13-21.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(39): 13944-9.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family.

- Cell 2005; 120(5): 635-47.
- 21 Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008; 133(2): 217-22.
- 22 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133(2): 647-58.
- 23 熊火梅, 王小中. 循环miRNA在疾病诊断中的应用. *实验与检验医学(Xiong Huomei, Wang Xiaozhong. Application of circulatory miRNA in disease diagnosis. Experimental and Laboratory Medicine)* 2009; 27(6): 641-4.
- 24 Mezzanzanica D, Bagnoli M, De Cecco L, Valeri B, Canevari S. Role of microRNAs in ovarian cancer pathogenesis and potential clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(8): 1262-72.
- 25 Prahm KP, Novotny GW, Hogdall C, Hogdall E. Current status on microRNAs as biomarkers for ovarian cancer. *APMIS* 2016; 124(5): 337-55.
- 26 李雅楠, 郝玉宾, 张志, 戴二黑. 实时荧光定量PCR相对定量法检测循环miRNA的内参选择. *生物技术通讯(Li Yannan, Hao Yubin, Zhang Zhi, Dai Erhei. Selection of endogenous reference gene for RT-qPCR analysis of circulating microRNA levels. Letters in Biotechnology)* 2015; 26(1): 146-8.
- 27 Lin XJ, Chong Y, Guo ZW, Xie C, Yang XJ, Zhang Q, *et al.* A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma: A multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study. *Lancet Oncol* 2015; 16(7): 804-15.
- 28 Zheng H, Zhang L, Zhao Y, Yang D, Song F, Wen Y, *et al.* Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PLoS One* 2013; 8(11): e77853.
- 29 Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, *et al.* MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14(9): 2690-5.
- 30 He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435(7043): 828-33.
- 31 Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, *et al.* E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008; 13(3): 272-86.
- 32 曾玉, 陈辰, 吴畏, 姚辉, 高玲娟. 血清miRNA-21和miRNA-203在上皮性卵巢癌中的表达及诊断价值. *临床肿瘤学杂志(Zeng Yu, Chen Chen, Wu Wei, Yao Hui, Gao Lingjuan. Expression and diagnostic value of serum miRNA-21 and miRNA-203 in epithelial ovarian cancer. Chinese Clinical Oncology)* 2016; 21(8): 722-6.
- 33 Chen X, Chen S, Xiu YL, Sun KX, Zong ZH, Zhao Y. RhoC is a major target of microRNA-93-5P in epithelial ovarian carcinoma tumorigenesis and progression. *Mol Cancer* 2015; 14: 31.
- 34 Lyu X, Fang W, Cai L, Zheng H, Ye Y, Zhang L, *et al.* TGFbetaR2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness. *Mol Cancer* 2014; 13: 51.
- 35 Tang Q, Zou Z, Zou C, Zhang Q, Huang R, Guan X, *et al.* MicroRNA-93 suppress colorectal cancer development via Wnt/beta-catenin pathway downregulating. *Tumour Biol* 2015; 36(3): 1701-10.
- 36 Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, *et al.* An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2011; 22(10): 1686-98.