

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00651

细胞外微 RNA: 一种新型的肺癌分子生物标志物

杨丽华, 董琢, 龚朝辉

宁波大学医学院生物化学与分子生物学研究所, 宁波 315211

摘要: 尽管癌症的早期诊断和治疗在不断发展和进步, 但寻找一种敏感、准确和微创的分子生物标志物, 用于肿瘤的诊断仍是一项艰巨任务。微 RNA(miRNA)是一类长约 21~24 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA。细胞外 miRNA 作为一种新型的分子生物标志物, 在癌症诊断方面具有微创、高灵敏度和高特异性等许多潜在特征。近年来, 细胞外 miRNA 研究成果颇丰。文章就细胞外 miRNA 的来源、功能、检测以及作为分子标志物在肺癌诊断中的作用和目前存在的一些问题进行了综述。

关键词: 细胞外微 RNA; 分子生物标志物; 微创; 肺癌

Extracellular miRNA: a novel molecular biomarker for lung cancer

YANG Li-Hua, DONG Zhuo, GONG Zhao-Hui

Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Though continuous development and progress have been made in the early diagnosis and treatment of cancer, it is still difficult to find a sensitive, accurate and minimally invasive biomarker for cancer diagnosis and treatment. MicroRNA (miRNA) is a class of non-coding small endogenous RNAs of 21-24 nucleotides in length. As a novel molecular biomarker, extracellular miRNA (ec-miRNA) has the potential to be a minimally invasive, highly sensitive and highly specific marker in cancer diagnosis. Many research achievements of ec-miRNA have been accumulated in recent years. In this paper, the origin, function and detection of ec-miRNA, its role in lung cancer diagnosis as a novel molecular biomarker, and some issues are reviewed.

Keywords: extracellular microRNA; molecular biomarker; minimally invasive; lung cancer

美国的调查研究表明, 肺癌的死亡率居所有癌症死亡率首位。小细胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的两种主要类型。尽管通过手术切

除、放射治疗以及辅助化疗等手段可以极大地改善患者的生存质量, 但SCLC和NSCLC患者的5年生存率仅分别只有6%和17%^[1]。因此, 早期诊断是改善肺癌治疗效果和预后的关键。很多研究表明,

收稿日期: 2012-01-12; 修回日期: 2012-03-09

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(编号: Y12C060009), 浙江省教育厅重点项目(编号: Z201119414), 宁波市科技创新团队项目(2011B82014)

和宁波大学王宽诚教育基金项目资助

作者简介: 杨丽华, 硕士研究生, 专业方向: 肿瘤分子遗传学。Tel: 0574-87600754; E-mail: huajj22@163.com

通讯作者: 龚朝辉, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤分子遗传学。E-mail: zhaohui@ncrri.org.cn

网络出版时间: 2012-4-24 11:44:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120424.1144.005.html>

微RNA(MicroRNA, miRNA)与肿瘤的发生发展有很重要的关系,可以作为包括肺癌在内的各种癌症诊断、治疗和预后的靶点^[2-6]。有研究发现,人体液中存在可检测到的miRNA^[7-9],这些细胞外miRNA (Extracellular microRNA, ec-miRNA)与肺癌的关系是近期研究的热点,科研人员希望将ec-miRNA作为肺癌早期诊断和治疗以及预后的分子标志物。

1 细胞外 miRNA 的来源

大部分miRNA存在于细胞内,但是各种体液(包括血浆、尿、唾液、精液等)中的ec-miRNA含量仍然十分丰富。目前关于细胞外miRNA的具体来源尚不清楚,主要观点有:(1)来自坏死或凋亡的细胞。有研究发现大部分血浆和培养细胞中的循环miRNA(Circulating miRNA)与外来体(Exosome)无关,而是通过与Ago2蛋白结合诱导部分miRNA形成沉默复合物^[10]。相比微泡(Microvesicle)而言,大部分miRNA比较容易和蛋白质复合物结合。miRNA对血浆中蛋白酶的刺激比较敏感,表明蛋白复合物可保护miRNA,使其免受RNA酶的降解。实验表明,Ago2蛋白即是循环miRNA稳定存在的关键蛋白。从血浆中免疫共

沉淀Ago2蛋白发现非小泡相关的循环miRNA。大部分miRNA与Ago2核糖核蛋白复合物结合,只有小部分特殊的miRNA显著的与微泡有关,所以认为血浆中Ago2蛋白复合物是循环miRNA稳定存在的机制之一。大部分血浆和培养细胞中ec-miRNA是独立于外来体和超微小泡而稳定存在的,这是因为ec-miRNA与Ago2蛋白结合形成miRNA/Ago2复合物。至于miRNA/Ago2复合物如何脱离细胞,还有待于进一步的研究。(2)来自活细胞。有研究指出,外来体是血清和血浆中无细胞miRNA的主要来源^[11-13]。该观点认为,循环miRNA对RNA酶耐受是由于其受到外来体的保护^[14]。因此,循环miRNA不仅与蛋白复合物结合,而且可以被包裹在脂质泡中形成RNA结合蛋白质的复合物,从而使其免受RNA酶降解。或者,通过上述两种机制共同保护ec-miRNA,阻止其被降解。近来研究发现一类RNA结合蛋白—核磷蛋白(Nucleophosmin 1, NPM1), NPM1可以介导一部分miRNA从胞内释放至胞外并且保护ec-miRNA不被核酸酶降解(图1)^[12-15-16]。值得注意的是,大多数miRNA的释放是一个依赖能量的主动转运过程,但仍然有些miRNA可以不受胞内ATP减少的影响,这说明miRNA的释放还可能还有其他机制。

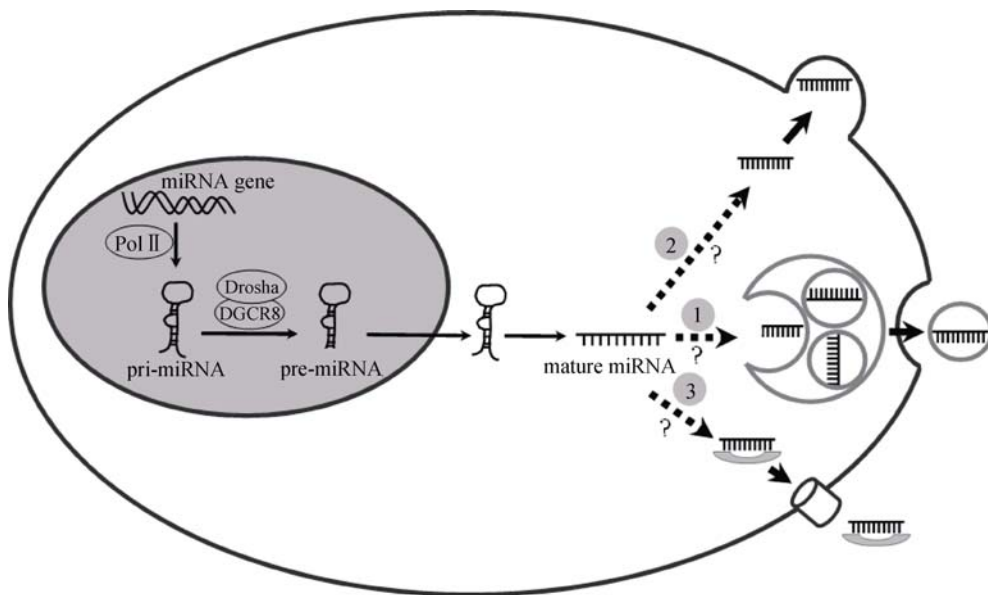


图 1 细胞外微 RNA 的来源

微 RNA 经过核内转录加工和在胞质中加工成为成熟微 RNA, 输出到细胞外主要通过 3 种可能的途径: 形成多泡体, 然后以胞吐方式排到细胞外并形成外来体; 与细胞膜形成膜泡, 以微泡形式排出; 与 RNA 结合蛋白形成复合物, 通过细胞膜通道输出到细胞外。

2 细胞外 miRNA 的功能

目前大部分生物标志物是血液中特定表达的蛋白, 比如血液中癌胚抗原和多种癌症相关, 前列腺特异抗原可用于前列腺癌的诊断, 谷丙转氨酶和天冬氨酸转氨酶以及谷草转氨酶的表达水平可以反映肝功能。开发新的用于诊断疾病的蛋白质具有一定的挑战性, 因为不仅蛋白质成分复杂、在血液中翻译后修饰呈多样化、丰度相对较低, 而且在不同的临床标本中有一些序列还在不断改变, 所以开发出合适的高亲和力的诊断标志物十分困难^[16]。近来, 人们发现来自血浆、血清、尿液和唾液中miRNA表达水平和许多不同疾病有着密不可分的关系^[17-20]。不同细胞株可以释放不同的循环miRNA, 这些ec-miRNA具有作为肿瘤分子标志物所必须的特点: 比如在各种体液中相对较稳定; 在不同物种中大部分序列较为保守; 一些肿瘤组织中miRNA表达会出现异常; miRNA的表达水平可以通过实时定量PCR(Real-time quantitative PCR)等方法检测。miRNA在肿瘤和其他疾病中的表达均会有所改变, 且肿瘤细胞可以释放某些miRNA, 通过检测这些ec-miRNA, 并可以作为诊断分子标志物来预测肿瘤^[21]。在NSCLC患者的生存率研究中, 与对照组相比, 有11种miRNA的表达增加了5倍以上, 其中4种来自血清的循环miRNA(miR-486、miR-30d、miR-1和miR-499)和患者生存率有明显关系^[3]。目前, 在抗肿瘤药物的研究中, 人们仍然将循环miRNAs作为研究的重点^[22]。尽管ec-miRNA的生物学意义至今尚未完全明确, 但其功能可能是参与细胞间通讯。当细胞接受生物学刺激之后, 分泌出特定的miRNA并传递特定的信息, 这种分泌的miRNA可以介导细胞间的通讯^[23]。

目前, 已经发现绝大部分人类miRNA分子在不同病理和生理状况下都进行表达, 并且多数miRNA能够在人体液中检出。一直以来, 人们把微创性生物诊断标志物作为癌症治疗和预测的一个突破点。随着ec-miRNA的研究越来越深入, 在探究它能否成为肿瘤生物标志物且应用于临床的同时, 人们已提出几点设想^[17, 24]。比如ec-miRNA可以在人体血浆或血清中被检测到; 某些miRNA只在肿瘤患者中检测到, 而在其他非癌症患者中检测不到其表达; 或者

在正常组织中表达正常, 表达异常的情况只在肿瘤患者中可以被发现; 在福尔马林固定的组织中miRNA仍稳定存在。目前简单的胸透和痰液化验对肺癌早期诊断的敏感性非常低, 而支气管镜检查是深入肺部的侵入式检查, 具创伤性。因此, 找到一种微创而又特异灵敏的肺癌诊断标志物是当务之急。血浆来源丰富, 创伤性极小, 可以通过对许多肿瘤血浆或者血清的特异性分子的表达进行检测, 从而进行诊断。现已确定ec-miRNA具有分子标志物的潜能^[25]。Shen等^[26]验证了NSCLC相关miRNA表达谱的变化, 用基因芯片技术鉴定出肿瘤组织中NSCLC期有关的12个miRNA(miR-21、miR-126、miR-145、miR-139、miR-182、miR-200b、miR-205、miR-210、miR-375、miR-429、miR-486-5p和miR-708), 然后用实时定量PCR技术分析血清中上述12个miRNA, 发现有5个miRNA的检测结果显示与肿瘤组织是高度一致的。这些结果说明, ec-miRNA具有特异的检测诊断价值。

3 细胞外 miRNA 的检测

目前, 检测ec-miRNA的方法有很多(表1)。其中, Northern blotting是验证和确认miRNA的经典检测方法, 但是该方法灵敏度较低并且繁琐, 并不适用于临床样本的高通量检测^[27]。尽管芯片技术(Microarray)检测方法可以实现快速、高通量的检测^[28], 但是基因芯片检测方法的重现性和定量准确性不好, 所以此法一般只用于初筛, 对其所获得的结果通常需要再采用Northern blotting或实时定量PCR进行验证。定量PCR是检测miRNA表达一种极常用的方法, 常见的有茎-环法(Stem-loop)和加尾法^[29]。目前, 定量PCR是基础研究和临床应用中检测ec-miRNA的金标准。

4 细胞外 miRNA 在肺癌诊断中的应用

在肺癌诊断中 ec-miRNA 如果作为一种理想的生物标志物, 要在肿瘤细胞中有表达, 在健康细胞中不表达; 或者在肿瘤细胞中高表达(或低表达), 而在健康人细胞中正常表达。由于肺癌标本来源的局限性, 使其在研究中存在一定的局限性, 而外周血或痰液的获得比较容易。因此, 在血液或其他体液中直接检测具有癌症特异性的 miRNA 并将其作

为癌症的生物学标志物(表 2), 对于早期癌症确诊具有非常重要的意义^[30]。

4.1 外周血 miRNA 与早期诊断

由于在肺癌发生发展过程中miRNA的表达谱会发生改变, 因此, 早期检测血清miRNA表达谱有利于肺癌的早期诊断^[31]。在无临床症状的高危人群中,

通过检测血清中 34 种miRNA的表达, 确认早期 NSCLC患者的正确率达 80%。该miRNA表达谱能区分良性和恶性肿瘤, 并表现出一定的临床相关性^[32]。通过比较健康人和NSCLC患者血清中的miRNA表达谱发现, 有 28 种存在于正常血清中的miRNA在患者血清中未检出, 但在患者中检测出 63 种正常血清中没有的miRNA。同时也发现, 肺癌患者的血清

表 1 miRNA 主要研究技术及优缺点

技术	优点	缺点
Northern 印记	成本较低; 应用广泛	操作繁琐、耗时长、灵敏度低; 检测时需要大量的样品及分离富集步骤
深度测序	可发现未知的 miRNA	成本很高; 数据海量难处理
微阵列芯片	通量高	制作和检测费用很高; 特异性灵敏度不高
定量 PCR	茎环法	特异性较好
	加尾法	时间短; 通量相对大
原位杂交	直观展现 miRNA 时空表达模式	miRNA 易丢失; 特异性和灵敏度较低

表 2 细胞外 miRNA 作为肺癌分子生物标志物

细胞外 miRNA	染色体定位	表达变化	来源	意义	文献
miR-486	8p11. 21	↑	血清	NSCLC 总生存率较短	[3]
miR-30d	8q24. 22				
miR-1	20q13. 33/18q11. 2	↓	血清	NSCLC 总生存率较短	[3]
miR-499	20q11. 22				
miR-155	21q21. 3	↑	血浆	早期(I 期)肺癌诊断	[14]
miR-197	1p13. 3				
miR-182	7q32. 2	↑	血浆	早期(I 期)NSCLC 检测	[26]
miR-21	17q23. 1				
miR-210	11p15. 5	↓	血浆	早期(I 期)NSCLC 检测	[26]
miR-126	9q34. 3				
miR-486-5p	8p11. 21	↓	全血	NSCLC 诊断	[34]
let-7a	9q22. 32/11q24. 1/ 22q13. 31				
miR-96	7q32. 2	↑	血清	肺原位癌总生存率低	[35]
miR-182					
miR-183	7q32. 2	↑	血清、血浆、痰液	NSCLC 的早期诊断和预后指标	[37, 38] [50]
miR-21	17q23. 1				
miR-10b	2q31. 1	↑	血清	肺癌淋巴结转移	[40]
miR-141	12p13. 31				
miR-155	21q21. 3	↑	血清	早期(I 期)肺癌筛查	[43]
miR-1254	10q21. 3				
miR-574-5p	4p14	↓	血浆	NSCLC 总生存率和无病生存率低	[44]
let-7f	9q22. 32/Xp11. 22				
miR-30e-3p	1p34. 2	↑	血浆	区分肺癌和良性孤立性肺结节患者	[46]
miR-21	17q23. 1,				
miR-210	11p15. 5	↓	痰液	肺腺癌早期诊断	[48]
miR-486-5p	8p11. 21				
miR-21	17q23. 1	↑	痰液	肺鳞状细胞癌的早期诊断	[49]
miR-375	2q35				
miR-200b	1p36. 33	↓	痰液	肺鳞状细胞癌的早期诊断	[49]
miR-486	8p11. 21				
miR-205	1q32. 2	↑	痰液	肺鳞状细胞癌的早期诊断	[49]
miR-210	11p15. 5				
miR-708	11q14. 1				

注: NSCLC: Non-small cell lung cancer; ↓: 表达下调; ↑: 表达上调。

与肺癌血细胞(Lung cancer blood cell, LCC)miRNA表达谱也存在明显差别,有57种miRNA为肺癌患者的血清和LCC所共有,但有76种miRNA仅在肺癌患者的血清中检出。健康人血清和血细胞的miRNA谱基本相同,其中显著高表达的miR-25和miR-223用定量PCR技术在肺癌患者的血清中得到了验证^[33]。let-7a在NSCLC患者全血中表达降低,可作为肺癌早期诊断的血清学指标^[34]。在原发肺癌患者血清中miR-183家族(包括miR-96、miR-182和miR-183)要显著高于正常对照组,其中miR-96在肿瘤中的表达与在血清中的表达呈正相关。Log-rank检验和Cox回归分析表明,血清中miR-183家族的表达水平可作为肺癌诊断的潜在标志物^[35]。

4.2 外周血 miRNA 与预后判断

在NSCLC肿瘤切除后,与免疫相关的重要调节因子,如miRNA在外周血单核细胞中的表达水平在术后显著升高。因此,外周血单核细胞中miRNA的表达谱变化可用于预后判断^[36]。血清中高水平miR-21与NSCLC患者的淋巴结转移密切相关,而血浆miR-21表达在NSCLC患者诊断中的敏感性和特异性分别为76.2%和70.0%^[37,38]。有研究发现,外周血中miR-126、miR-183和miR-222表达在正常人和IV期NSCLC患者之间存在显著差异,其中miR-126和miR-183表达在I/II和IV期患者间也存在统计学差异^[39]。肺癌患者血清miR-10b、miR-141和miR-155表达水平要显著高于肺部良性病变者,血清miR-10b高表达与肺癌淋巴结转移和组织多肽抗原水平升高有关,而血清miR-141高表达与尿激酶纤溶酶原激活物水平升高联系密切。这些循环miRNA可作为肺癌预后判断和风险评估的新型微创诊断工具^[40]。在肺癌发生前1~2年分析吸烟者血浆中miRNA表达谱,并结合螺旋CT检测有很强的肺癌预测、诊断和预后作用^[41]。

4.3 联合检测外周血 miRNA

在诊断中联合检测两种或两种以上肿瘤标志物可提高诊断准确性。通过分析74例肺癌患者和68例同龄正常对照时发现,在I期患者的血浆中miR-155、miR-197和miR-182的水平显著高于对照组。在鉴别肺癌患者和对照时,联合分析3个miRNA的敏感性和特异性分别达到81.33%和86.76%。其中肺

癌转移患者血浆中miR-155和miR-197的表达高于未转移患者,并在化疗敏感患者中的表达水平显著降低。这些结果说明,联合检测miR-155、miR-197和miR-182可作为肺癌早期诊断的非侵害性分子标志物^[44]。将血清miRNA作为NSCLC的指纹分析已有初步结果,研究表明NSCLC患者中联合检测10种差异表达的miRNA能区分患者与正常对照组,其敏感性和特异性分别达到93%和90%。而且这10种血清miRNA与NSCLC患者TNM分期密切相关,特别是在年轻患者和有吸烟习惯的患者中表现更为明显^[42]。miR-1254和miR-574-5p在早期NSCLC患者的血清中表达显著升高,联合检测这两种miRNA区分早期NSCLC和正常对照的灵敏性和特异性分别达82%和77%^[43]。联合检测血浆中miR-21、miR-126、miR-210和miR-486-5p水平,区分NSCLC患者和健康对照的灵敏性和特异性分别为86.22%和96.55%;在鉴别I期NSCLC患者中的灵敏性和特异性分别达到73.33%和96.55%^[26]。let-7f、miR-20b和miR-30e-3p在NSCLC患者血浆小泡中表达降低,而且let-7f和miR-30e-3p的表达水平能用于患者的疾病分期和手术能力评价,并分别与总体生存率和无病生存率较低有关^[44]。仅分析14个外周miRNA表达谱即可区分肺癌患者和慢阻肺患者,其准确率、特异性和灵敏性分别达到90.4%、89.2%和91.7%^[45]。联合检测血浆中miR-21、miR-210和miR-486-5p在区分肺癌和良性的孤立性肺结节的敏感性和特异性分别达到75.00%和84.95%。这表明在无创诊断肺癌和孤立性肺结节中,血浆miRNA可作为潜在的循环分子标志物^[46]。

4.4 胸腔积液和痰液 miRNA 检测

比较良性和恶性胸腔积液中miRNA表达谱发现,miR-24、miR-26a和miR-30d的表达差异显著,表明分析积液上清中的无细胞miRNA能有助于诊断^[47]。通过检测肺癌患者痰液,发现4个miRNA(miR-21、miR-484、miR-375和miR-200b)联检能很好区分肺癌患者和健康人,其灵敏性和特异性分别达80.6%和91.7%^[48]。痰液检测中发现miR-205、miR-210和miR-708的表达有助于区分肺鳞状细胞癌和健康人,其灵敏性和特异性分别达73%和96%^[49]。NSCLC患者痰液中miR-21的表达上调,检测miR-

21 表达对 NSCLC 诊断的灵敏性和特异性分别为 69.66% 和 100.00%，而痰细胞学检测灵敏性和特异性分别为 47.82% 和 100.00%^[50]。

临床诊断检测中，在血液中精确检测 miRNA 含量仍是非常棘手。基于 α -溶血素的微孔传感器能选择性从肺癌患者血浆标本中检测单个 miRNA，且无需对 miRNA 标记或扩增。该传感器使用可编程的寡核苷酸探针产生靶特异信号，能对微摩尔水平的癌相关 miRNA 进行定量，并能够区分 miRNA 家族成员中单核苷酸差异^[51]。该方法在 miRNA 定量分析和肺癌早期非侵害性诊断中必将发挥重要作用。

5 问题与展望

迄今为止，虽然肿瘤相关的 miRNA 释放入外周血，形成细胞外 miRNA，其在血液中存在的形式尚不完全清楚。另外，其他体液中也含有丰富的 RNA 酶，不论是长链或者短链 RNA 分子都非常容易被其降解，而 ec-miRNA 为什么能如此稳定存在而不会被破坏掉？从整体上看，现有 ec-miRNA 检测的灵敏性和特异性都还很低，需要改进技术路线，而且实验费用也较高，需要进一步将 miRNA 应用到其他体液检测中，从而寻找更稳定可靠的肿瘤生物标志物。我们用已经发现的 ec-miRNA 作为分子生物标志物去判断不同患者的同一种肿瘤，结果能否令人信服也是个重要问题。

在肺癌不同病理状态下，miRNA 表达谱也不同，这使得 miRNA 在一定程度上可成为反映肺癌不同临床阶段的生物标志物^[52]。目前 ec-miRNA 的检测尚不可直接用于肺癌早期诊断和疗效判断，但其可提供一些肺癌病理状态和治疗疗效相关的信息，其在临床上应用的价值正逐步为人们所了解。然而，肺癌的发生发展是多基因联合作用的结果，若只去检测某一种或几种与肺癌相关的 miRNA，其灵敏性和特异性很有限，将其作为肺癌的诊断标志物应用于临床还有很长的路要走^[53]。尽管 ec-miRNA 应用于肿瘤诊断和肿瘤治疗具有广阔的前景，但仍需进一步提高灵敏度和特异性上开展深入研究。

参考文献(References):

- [1] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society, 2012. [DOI](#)
- [2] Maddalena B, Armando F, Massimo R, Salvatore G, Walter M, Malorni GP. Reducing the risk of overdiagnosis in lung cancer: A support from molecular biology. *Cell Physiol*, 2011, 226(9): 2213–2214. [DOI](#)
- [3] Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2010, 28(10): 1721–1726. [DOI](#)
- [4] Ferracin M, Veronese A, Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(3): 297–308. [DOI](#)
- [5] 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): 703–711. [DOI](#)
- [6] Wang QZ, Xu W, Habib N, Xu R. Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(4): 572–594. [DOI](#)
- [7] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 2010, 56(11): 1733–1741. [DOI](#)
- [8] Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, van Kuijk PF, Wiermer EAC, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*, 2010, 124(3): 217–226. [DOI](#)
- [9] Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem*, 2009, 387(2): 303–314. [DOI](#)
- [10] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(12): 5003–5008. [DOI](#)
- [11] Hunter MP, Ismail N, Zhang XL, Aguda BD, Lee EJ, Yu LL, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarijoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3694. [DOI](#)
- [12] Hadi V, Karin E, Apostolos B, Margareta S, James JL, Jan OL. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654–659. [DOI](#)
- [13] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1): 13–21. [DOI](#)

- [14] Zheng D, Haddadin S, Wang Y, Gu LQ, Perry MC, Freter CE, Wang MX. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011, 4(6): 575–586. [DOI](#)
- [15] Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(9): 1143–1149. [DOI](#)
- [16] Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res*, 2011, 717(1-2): 85–90. [DOI](#)
- [17] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513–10518. [DOI](#)
- [18] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5473–5477. [DOI](#)
- [19] Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 7223–7233. [DOI](#)
- [20] Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6229. [DOI](#)
- [21] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 2010, 50(4): 298–301. [DOI](#)
- [22] Liu X, Sempere LF, Guo YL, Korc M, Kauppinen S, Freemantle SJ, Dmitrovsky E. Involvement of microRNAs in lung cancer biology and therapy. *Transl Res*, 2011, 157(4): 200–208. [DOI](#)
- [23] Wang K, Zhang SL, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(20): 7248–7259. [DOI](#)
- [24] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Waincoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): 672–675. [DOI](#)
- [25] Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. Focus on lung cancer. *Cancer Cell*, 2002, 1(1): 49–52. [DOI](#)
- [26] Shen J, Todd NW, Zhang H, Yu L, Xing LX, Mei YP, Guarnera M, Liao JP, Chou A, Lu CL, Jiang ZR, Fang HB, Katz RL, Jiang F. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest*, 2011, 91(4): 579–587. [DOI](#)
- [27] Pall GS, Hamilton AJ. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1077–1084. [DOI](#)
- [28] Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9740–9744. [DOI](#)
- [29] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179. [DOI](#)
- [30] Liu M, Chen HP. The role of microRNAs in colorectal cancer. *J Genet Genomics*, 2010, 37(6): 347–358. [DOI](#)
- [31] Keller A, Leidinger P, Gislesfoss R, Haugen A, Langseth H, Staehler P, Lenhof HP, Meese E. Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis. *RNA Biol*, 2011, 8(3): 506–516. [DOI](#)
- [32] Bianchi F, Nicassio F, Marzi M, Belloni E, Dall'olio V, Bernard L, Pelosi G, Maisonneuve P, Veronesi G, Di Fiore PP. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(8): 495–503. [DOI](#)
- [33] Chen X, Ba Y, Ma LJ, Cai X, Yin Y, Wang KH, Guo JG, Zhang YJ, Chen JN, Guo X, Li Q, Li XY, Wang WJ, Zhang Y, Wang J, Jiang XY, Xiang Y, Xu C, Zheng PP, Zhang JB, Li RQ, Zhang HJ, Shang XB, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang JF, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997–1006. [DOI](#)
- [34] Jeong HC, Kim EK, Lee JH, Lee JM, Yoo HN, Kim JK. Aberrant expression of let-7a miRNA in the blood of non-small cell lung cancer patients. *Mol Med Report*, 2011, 4(2): 383–387. [DOI](#)
- [35] Zhu WY, Liu XG, He JY, Chen DD, Hunag YY, Zhang Y. Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study. *BMC*

- Cancer*, 2011, 11: 393. [DOI](#)
- [36] Kossenkov AV, Vachani A, Chang C, Nichols C, Billouin S, Horng W, Rom WN, Albelda SM, Showe MK, Showe LC. Resection of non-small cell lung cancers reverses tumor-induced gene expression changes in the peripheral immune system. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(18): 5867–5877. [DOI](#)
- [37] Wang ZX, Bian HB, Wang JR, Cheng ZX, Wang KM, De W. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*, 2011, 104(7): 847–851. [DOI](#)
- [38] Wei J, Gao W, Zhu CJ, Liu YQ, Mei Z, Cheng T, Shu YQ. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer*, 2011, 30(6): 407–414. [DOI](#)
- [39] Lin QF, Mao WD, Shu YQ, Lin F, Liu SP, Shen H, Gao W, Li SQ, Shen D. A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(1): 85–93. [DOI](#)
- [40] Roth C, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Schwarzenbach H. Screening for circulating nucleic acids and caspase activity in the peripheral blood as potential diagnostic tools in lung cancer. *Mol Oncol*, 2011, 5(3): 281–291. [DOI](#)
- [41] Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, Calabrò E, Croce CM, Pastorino U, Sozzi G. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9): 3713–3718. [DOI](#)
- [42] Chen X, Hu ZB, Wang WJ, Ba Y, Ma LJ, Zhang CN, Wang C, Ren ZJ, Zhao Y, Wu SJ, Zhuang R, Zhang YX, Hu H, Liu CZ, Xu L, Wang J, Shen HB, Zhang JF, Zen K, Zhang CY. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis. *Int J Cancer*, 2012, 130(7): 1620–1628. [DOI](#)
- [43] Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(3): 482–488. [DOI](#)
- [44] Silva J, García V, Zaballos Á, Provencio M, Lombardía L, Almonacid L, García JM, Domínguez G, Peña C, Diaz R, Herrera M, Varela A, Bonilla F. Vesicle-related microRNAs in plasma of non-small cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J*, 2011, 37(3): 617–623. [DOI](#)
- [45] Leidinger P, Keller A, Borries A, Huwer H, Rohling M, Huebers J, Lenhof HP, Meese E. Specific peripheral miRNA profiles for distinguishing lung cancer from COPD. *Lung Cancer*, 2011, 74(1): 41–47. [DOI](#)
- [46] Shen J, Liu ZL, Todd NW, Zhang H, Liao JP, Yu L, Guarnera MA, Li RY, Cai L, Zhan M, Jiang F. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers. *BMC Cancer*, 2011, 11: 374. [DOI](#)
- [47] Xie L, Chen X, Wang LF, Qian XP, Wang TT, Wei J, Yu LX, Ding YT, Zhang CY, Liu BR. Cell-free miRNAs may indicate diagnosis and docetaxel sensitivity of tumor cells in malignant effusions. *BMC Cancer*, 2010, 10: 591. [DOI](#)
- [48] Yu L, Todd NW, Xing LX, Xie Y, Zhang H, Liu ZQ, Fang HB, Zhang J, Katz RL, Jiang F. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2870–2878. [DOI](#)
- [49] Xing LX, Todd NW, Yu L, Fang BH, Jiang F. Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers. *Mod Pathol*, 2010, 23(8): 1157–1164. [DOI](#)
- [50] Xie Y, Todd NW, Liu ZQ, Zhan M, Fang HB, Peng H, Alattar M, Deepak J, Stass SA, Jiang F. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2010, 67(2): 170–176. [DOI](#)
- [51] Wang Y, Zheng DL, Tan QL, Wang MX, Gu LQ. Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6(10): 668–674. [DOI](#)
- [52] Fanini F, Vannini I, Amadori D, Fabbri M. Clinical implications of microRNAs in lung cancer. *Semin Oncol*, 2011, 38(6): 776–780. [DOI](#)
- [53] Hennessey PT, Sanford T, Choudhary A, Mydlarz WW, Brown D, Adai AT, Ochs MF, Ahrendt SA, Mambo E, Califano JA. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32307. [DOI](#)