doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.12.042

循环 miRNAs 在几种肝病检测中的研究进展 *

洪杏芳 [1] 申元英 [1,2△]

（1 大理学院公共卫生学院 云南 大理 671000；2 大理学院基础医学院 云南 大理 671000）

摘要：microRNAs(miRNAs)是一类单链非编码的内源性小 RNA 分子，参与细胞、组织甚至个体的生长发育。以往人们主要研究的是肝脏组织中 miRNAs 在肝脏相关疾病检测中的应用，随着 2008 年血液中 miRNAs 的发现，循环 miRNAs 在疾病检测中的研究逐渐成为热点。microRNAs 普遍存在于血液中，与肝癌、肝硬化等多种肝脏疾病的发生发展密切相关。本文介绍了循环 miRNAs 的来源及其特异性、稳定性等特性，简述了循环 miRNAs 传统和最新的检测方法及特点，总结了循环 miRNAs 在肝癌、肝炎、肝硬化、药物性肝损伤等肝脏疾病检测中的研究进展。近年研究表明循环 miRNAs 检测具有采样方便、稳定性好、灵敏度高、可连续监测等优势，在肝脏相关疾病的诊断和预测中发挥了越来越重要的作用，其临床意义及应用前景已引起高度关注。本文重点综述在前人的研究结果中有望成为肝脏相关疾病诊断和预后判断的循环 miRNAs 分子标志物发现目前的很多研究只是停留在实验室阶段，尚缺乏简单有效的诊断方法和统一的诊断标准，未来研究的热点应集中在如何进一步提高有潜力的 miRNAs 分子标志物的敏感性、特异性和标准化，使其真正应用于临床诊断。

关键词：miRNAs；肝脏疾病；生物标记物；临床应用

中图分类号：R446.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2015)12-2366-04

Progress of Circulating MicroRNAs in the Detection of Liver Diseases*

HONG Xing-fang[1], SHEN Yuan-ying[1,2△]

(1 School of public Health,Dali University, Dali, Yunnan, 671000, China;

2 School of Basic Medicine Science, Dali Universiay, Dali, Yunnan, 671000, China)

ABSTRACT: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small, single stranded, and non-coding endogenous RNAs, which not only affect the growth and development of organisms, but also participate in many diseases progresses. In the past, the study of liver tissue's MicroRNAs in the Detection of Liver Diseases is the major trend, with the discovery of miRNAs in blood at 2008, circulating miRNAs in disease detection has been a hot spot. MicroRNAs are widespread in the bloodstream and are closely related with liver cancer, liver cirrhosis and other liver disease. miRNAs surviving from endogenous RNase are stable and abundant in plasma, which indicates that they probably play an important role in tumor diagnosis. The title briefly introduces traditional and the latest detection methods and summarizes the advanced development in liver fibrosis, viral hepatitis, and hepatocellular carcinoma (HCC). In recent years, studies have shown that circulating miRNAs detection has good stability, high sensitivity, and can be continuously monitored and other advantages. More and more attentions are paid to the clinical significance and application for specific miRNA detection and forcast in liver diseases so far. This article focuses on the circulating miRNAs which are expected to become the diagnostic and prognostic molecular markers. We discovered that many of the current study was only in the laboratory stage and was lack of simple and effective diagnostic methods and uniform diagnostic criteria. So the future research should focus on improving the sensitivity, specificity and standardization of the promising circulating miRNAs, making it really used in the clinical diagnosis.

Key words: miRNAs; Liver diseases; Biomarker; Clinical application

Chinese Library Classification(CLC): R446.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)12-2366-04

肝脏不仅是人和动物物质能量代谢的枢纽，而且是重要的免疫器官，具有氧化解毒、储存肝糖原、代谢脂肪、合成蛋白质以及分泌胆汁等功能。肝脏相关疾病如急性乙型肝炎（acute hepatitis B）、慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B，CHB)、非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD)、肝硬化 (liver Cirrhosis, LE)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等严重影响着人类的健康。因此，肝脏相关疾病的诊断成为我国乃至世界医疗卫生机构的重要研究课题。甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase, ALT）等传统的生物学标志物的特异性和敏感性有限，在很大

* 基金项目：云南省高等学校名师工作室（2012038）；云南省十二五优势特色重点学科项目（2011030）

作者简介：洪杏芳（1989-），女，硕士研究生，研究方向：分子流行病学、病原生物学，E-mail：903793343@qq.com

△ 通讯作者：申元英（1963-），女，教授，研究方向：分子流行病学、环境流行病学、医学病毒学、医学免疫学，
E-mail：yuanyingshen@163.com，电话：0872-2257361

（收稿日期：2014-09-04 接受日期：2014-09-27）

程度上并不能区分肝脏器质性或代谢性病变的类型，也不能准确客观地反映肝脏病变程度。肝穿刺活组织检查虽然相对比较准确，但是由于肝活检有创伤性，且肝穿针的质量、切片、染色等过程均可影响组织病理诊断的准确性，肝脏穿刺费用、侵入性检查损伤以及不宜频繁重复检查等因素都限制其使用。因此，发现和发展更加特异、敏感的检测肝脏相关疾病的标志物对相关肝病的辅助诊断、病情评价等具有十分重要的临床意义。

MicroRNAs(miRNAs)是一组单链的、非编码的长度约为22个核苷酸的内源性小分子RNA，参与调控人体一系列重要生理、病理过程，如细胞的增殖分化和凋亡、胚胎早期发育、病毒感染及肿瘤的发生发展等[1-3]。2008年首次发现miRNAs能够稳定存在于血液中，正常机体循环miRNAs的种类和丰度处于一个相对稳定的状态，而肝脏等器官的代谢异常或器质性病变会直接或间接破坏机体循环miRNAs的稳态，表现为特定异常代谢或疾病状态下某些循环miRNAs的表达水平显著差异。近来研究发现循环miRNAs检测具有创伤小、采样方便、稳定性好、可连续监测等优势[4]，且可以改进疾病诊断、癌症分期、预后评估及复发预测的精度，因此miRNAs有望成为血液中新兴的疾病诊断和预后判断的分子标志物，成为近年疾病检测研究的热点之一，本文就近年循环miRNAs在肝病检测方面的相关文献进行综述。

1 循环miRNAs的来源及特性

目前普遍认为循环miRNAs来自于坏死或凋亡的细胞、正常细胞的主动释放以及血细胞或巨噬细胞的裂解等。近来研究发现成熟的miRNAs在细胞内与脂质或脂蛋白结合成外切酶体，最终形成超微囊泡分泌至胞外并进入血液[5]。循环miRNAs可耐受核酸酶的消化，血清中超过半数miRNAs在RNA酶作用3h后结构仍然保持完整，相反对照大分子RNA，如β-actin、28sRNA、GAPDH等均已被降解，循环miRNAs在久置、反复冻融，强酸(pH=1)、强碱(pH=13)等条件下，均可保持稳定[6]。正常人循环miRNAs的表达谱基本是一致的，但当机体发生病变时，miRNAs会选择性的从组织细胞释放到外周血中，导致循环miRNAs表达谱发生变化。由于循环miRNAs具有良好的稳定性和表达的特异性，因此有望成为血液中新兴的疾病诊断和预后判断的分子标志物。

2 循环miRNAs的检测方法

2.1 经典的循环miRNAs检测方法

目前国内外比较成熟的循环miRNAs检测方法主要有：高通量测序分析法(Illina / Solexa)、RNA印记杂交法、miRNA芯片、实时定量PCR(real－time PCR、RT-PCR)等。高通量测序分析法具有高通量、准确度高的特性[7]，但价格昂贵、数据量大，一般只用于新miRNAs的筛选。RNA印记杂交法主要包括原位杂交和Northern杂交，是验证和确认miRNAs的重要方法[8]，但操作繁琐且灵敏度较低，不适用于临床样本的高通量检测。miRNAs芯片具有快速、高通量的特性，但存在背景及混杂信号干扰，重复性较差，一般只用于miRNAs的初筛。RT-PCR具有操作简便、快速高效、敏感性高、特异性强的特性，是现阶段核酸分子定量检测的金标准[9]，然而由于部分重要miRNAs的水平极低，超出了RT-PCR的检测限，因此RT-PCR法并不是完美无缺的，仍需进一步改进。

由于传统的miRNAs检测方法都有其不完善的地方，随着科技的进步，将传统检测方法的优点进行综合或全新的检测技术手段也逐渐诞生。

2.2 新型的循环miRNAs检测方法

2.2.1 纳米金标记法 最近Labib等[10]开发了一种建立在杂交(H-SENS)、p19蛋白结合(P-SENS)和蛋白质位移(D-SENS)基础之上的三模式金纳米粒子修饰的电化学传感器，用于直接对超低水平miRNA的检测，不用进行PCR就能检测的最低限为5aM，并可以在10aM到1 μM进行动态分析，同时能够在单一电极上同时分析多个miRNAs。由于该方法具有超低检测限、动态分析和同时多元分析的优势，因此有望成为新的miRNAs检测方法而应用与临床。

2.2.2 酶探针法 Wu等[11]将氧化石墨烯(GO)荧光猝灭作用和核酸内切酶对特异位点的裂解作用相结合建立了一种快速、灵敏度高、选择性好的miRNA检测方法，首先设计一个单链探针，这个探针既有与诱导5'-末端标记的荧光素(FAM，6-羧基荧光素)荧光猝灭的氧化石墨烯相结合的区域，又具有能特异性识别目标miRNA的感应区，且能与目标miRNA杂交，形成双链，这个双链在RsaI内切酶的作用下从氧化石墨烯表面释放，导致荧光恢复，它通过对回收荧光信号的检测，实现了对目标miRNA浓度的检测，该方法不受因非特异性干扰物吸附而引起的假信号的干扰，因而具有良好的特异性。

2.2.3 生物素标记法 Wang等[12]将功能化纳米金电化学传感器技术用于循环miRNAs的检测，生物素标记的miRNA与目标miRNA有相同的核酸序列，生物素标记miRNA加入样品中并与目标miRNA竞争提前免疫固定在金电极上的寡核苷酸(ODN)探针并进行杂交，形成杂交双链，生物素miRNA与二茂铁(FC)封端的黄金纳米粒子 / 链霉亲和素结合后，用伏安法进行检测，当目标miRNA的浓度为10fM至2.0pM时，FC氧化电流与之成反比。该方法具有高度重复性(RSD<5%)、可再生性(至少8个再生或检测循环没有明显的信号下降)、选择性好(单核苷酸错配序列特异性)、低的检测限(10fM)等特性，无需进行样品预处理，就可实现对循环miRNA的直接量化，有望成为临床核酸样品检测的新方法。

虽然上述新方法相对于经典方法有灵敏度高、检测限低等诸多优势，但是这些新技术仍处与探索阶段，诊断过程比较复杂，费用昂贵，但是还不能对miRNAs实现直接标记、检测及消除同源miRNAs(如pre-miRNAs)的影响也不能像基因芯片那样实现高通量检测，因此并没有实际应用于临床诊断。因此在开发新型的分析检测技术如联用仪器的开发、高通量阵列研究的同时，我们需要结合具体的实验目的和各种检测方法的优缺点综合考虑，以获得最经济和最优化的实验结果。

3 循环miRNAs与几种常见肝病的检测

3.1 循环miRNAs与肝炎病毒感染的早期检测

HBV和HCV感染是最常见的肝炎病毒感染，每年约有数

百万人死于 HBV 和 HCV 感染导致的肝硬化、肝衰竭和原发性肝癌。我国属肝炎病毒尤其是 HBV 和 HCV 感染的高流行区。因此通过对循环 miRNAs 的检测实现对 HBV 和 HCV 感染的早期诊断具有十分重要的意义。

3.1.1 循环 miRNAs 与乙型肝炎病毒感染的检测 Chen 等[13]在用 qRT-PCR 法研究隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI)患者血清 miRNA 表达时发与健康对照者相比 OBI 患者血清 let-7c, miR-23b, miR-122 和 miR-150 均异常表达，而血中 ALT 的变化并无显著性差异，这四组 miRNA 在区分 OBI 患者(AUC=0.999)和非感染控制的 HBV 患者(AUC=0.989)时具有很高的准确度,聚类分析也显示这四组 miRNA 也能将 OBI 患者和健康对照组清楚的区分开。这项研究第一次表明血清 miRNA 可以作为检测 OBI 的灵敏且准确的生物标记物。最近研究发现,在慢性乙型肝炎四个不同发病时期(免疫耐受期、免疫清除期、非活动期、再活动期)中,人外周血浆中肝脏特异性 miR-122 在四个时期表达量均明显升高,尤其在免疫耐受期和免疫清除期升高显著(P<0.01),miR-122 与 HBsAg 和 ALT 相关性较强[14]。

以上两项研究说明,miR-122 作为一种潜在的判断 HBV 感染的标志物，且与血中 ALT 的变化相比,miRNA 的变化发生的更早,更具有组织特异性和可靠性。

Zhang 等[15]在研究慢性乙型肝炎(CHB)传统中医(TCM) ZHENG 分化中的肝胆湿热证（LGDHS）和肝肾阴虚综合征(LKYDS) 的血清 miRNA 表达谱时发现,LGDHS 患者血清 miR-583、miR-663 比 LKYDS 患者显著增高(P＜0.001),且灵敏度和特异性良好。表明血清 miR-583 和 miR-663 是区分慢性乙型肝炎(CHB)ZHENG 分化肝胆湿热证(LGDHS)和肝肾阴虚综合征(LKYDS)潜在的生物标记物。

3.1.2 循环 miRNAs 与丙型肝炎病毒感染的检测 Shrivastava 等[16]在研究丙型肝炎病毒(HCV)感染导致的肝纤维化患者血清样品 miRNA 表达谱时发现，与健康志愿者和非 HCV 相关的肝脏疾病者相比,HCV 感染的肝纤维化患者血清 miR-20a 和 miR-92a 水平明显上调,且与健康志愿者相比,急性和慢性 HCV 感染患者的血清 miR-20a 与 miR-92a 水平上调。说明 miR-20a 和 miR-92a 有望成为新的丙型肝炎病毒感染早期检测的生物标志物，且 miR-20a 可作为预测 HCV 介导的肝纤维化的生物标志物。

另有研究表明,HCV 感染者血清中循环 miR-196 和 miR-222 的表达水平均显著下降，可能是 HCV 感染直接或间接改变了 miR-196 和 miR-222 的表达 [16]。因此推测循环 miR-196 和 miR-222 有可能成为 HCV 感染的辅助诊断指标。

3.2 循环 miRNAs 与肝硬化

Ninomiya 等[18]在研究 10 例原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者、5 例慢性乙型肝炎（CHB）患者、5 例慢性丙型肝炎患者、5 例健康志愿者血清 miRNA 表达谱时发现,与健康对照组相比，PBC 患者血清中的 hsa-miR-505-3p、197-3p、500a-3p 水平显著降低。与病毒性肝炎患者相比,PBC 患者血清中 hsa-miR-505-3p,139-5p 和 197-3p 水平显著降低，因此下调的血清 hsa-miR-505-3p 和 miR-197-3p 可以作为 PBC 临床检测的生物标记物。

Chen 等[19]对 80 份血浆样品进行全基因组调查,确定了 6 个可能与隐匿性肝硬化检测相关的 miRNA,并在其后的研究中发现,miR-106b 和 miR-181b 联合检测 CHB 相关肝硬化、隐匿型 CHB 相关肝硬化、非 CHB 相关肝硬化的精确度分别为 0.882、0.774、0.915,该研究结果表明 miR-106b 和 miR-181b 联合检测对肝硬化尤其是早期肝硬化的诊断具有很大的价值。

3.3 循环 miRNAs 与肝癌的检测

Tomimaru 等[20]在研究 120 例肝细胞癌(HCC)患者、30 例慢性肝炎患者和 50 名健康志愿者的循环 miRNAs 时发现，HCC 患者循环 miR-21 水平远远高于慢性肝炎患者和健康志愿者，区分 HCC 和慢性肝炎的灵敏度为 61.1%和特异性为 83.3%，区分 HCC 和健康者的灵敏度为 87.3%和特异性为 92.0%,两组值都优于甲胎蛋白的检测和改进后的 miR-21 和甲胎蛋白的结合检测,miR-21 有望成为 HCC 新的生化检测标记物。

Koberle 等[21]从 195 例肝癌病人和 54 例肝硬化病人分别抽取血清调查 miR-1 和 miR-122 在肝癌患者血清中的表达时发现,miR-1 是肝癌患者一个新的独立参数，能够提高肝癌分期的预测水平。

Qu 等[22]分析 105 例 HCC 患者、107 例慢性肝炎患者及 71 例正常人的血清时发现,HCC 患者 miR-16 水平较慢性肝炎患者下降约 2 倍,较正常人群下降达 8 倍,进一步研究发现,单用 AFP 诊断 HCC 的敏感性为 59%，联合 miR-16 则上升至 87.6%,AFP、AFP－L3 和 DCP 联合应用敏感性为 75.2%,加入 miR-16 后上升至 92.4%，特别是早期 HCC 敏感性从 51.2%上升至 88.4%,提示 miR-16 可作为新的肝癌标志物。

Sukata 等 [23] 应用 qRT-PCR 法检测肝癌患者血清时发现 let-7a、let-7f 和 miR-98 在肝癌发生早期就显著升高，可能作为肝癌早期检测的标志物。Li 等[24]应用 qRT-PCR 法检测 46 例肝癌患者血清 miR-221 时发现,miR-221 的高表达与肿瘤大小、分期呈显著正相关，且 miR-221 低表达者的生存率明显高于 miR-221 高表达者。

Xu 等 [25] 在研究肝细胞癌患者血清时发现,miR-122、miR-223 在肝细胞癌患者血清中显著升高,有很大潜力成为新的肝癌诊断的生物标记物。

郭晓东等采用 RT-PCR 法检测 38 例乙肝肝癌患者手术前后血清乙肝病毒特异性 miRNA 时发现，乙肝肝癌患者血清 miR-22 明显高于良性肝病和正常对照组，手术前后血清 miR-22 表达差异显著,且 miR-22 低表达组的复发转移率显著低于高表达组，说明 miR-22 在乙肝肝癌患者血清中表达上调与肝癌复发转移率高和预后差密切相关,提示其可能是一个潜在的 HCC 预后分子标志物[26]。

Liu 等[27]发现 HCC 患者血清中 miR-15b 和 miR-130b 的水平也显著上调,其中 miR-130b 的曲线下面积为 0.913,灵敏度为 87.7%，特异性为 81.4%;miR-15b 的灵敏度高达 98.3%,但是其特异性较低（15.3%），说明 miR-15b 和 miR-130b 作为 HCC 的血清学检测指标具有很高的灵敏度，在检测早期血清甲胎蛋白 AFP(alpha-fetoprotein)水平较低的 HCC 方面具有潜在的应用价值。

Li 等 [28] 在研究 86 例由乙型肝炎病毒感染引起的肝癌患者、30 例肝炎或肝硬化患者和 45 例健康志愿者血清 miRNA

表达时发现,乙型肝炎病毒感染引起的肝癌患者血清 miR-18a 水平明显高于健康对照组(P<0.01),其敏感度为 86.1%,特异度为 75.0%,说明血清 miR-18a 是潜在的乙型肝炎病毒相关肝癌筛查的生物标记物。

综上所述, 可以发现目前很多单一的 miRNA 对肝脏相关疾病的诊断特异性和灵敏度并不十分理想, 而将 miRNA 与传统的肝脏疾病诊断标记物如 ALT、AFP 等联合检测,或者几种 miRNAs 联合检测能够在很大程度上提高诊断的灵敏度和特异性,因此在开发新的更灵敏的检测技术的同时,采用联合检测的手段能够在很大程度上促进 miRNAs 检测实际应用于临床实践。

4 问题与展望

目前的很多关于肝脏相关疾病诊断和预后判断的循环 miRNAs 分子标志物的研究只是停留在实验室阶段,尚缺乏简单有效的诊断方法和统一的诊断标准,未来研究的重点应集中在开发新的更灵敏的检测技术,同时探索更为合理的、标准化的、联合诊断方案,进一步提高有潜力的 miRNAs 分子标志物对肝脏相关疾病诊断和预后判断的敏感性、特异性和标准化,使其真正应用于临床诊断。

循环 miRNAs 在肝脏疾病诊断中的研究主要集中在肝炎、肝硬化、肝癌等较为常见的肝病的检测[29],而对 Gilbert 综合征和海绵状肝血管瘤等先天性或遗传性肝病、红斑狼疮引起的肝炎、细菌感染引起的肝结核等肝脏疾病的检测很少甚至没有。

由于循环 miRNAs 与肝脏相关疾病的发生和发展密切相关,因此在提高肝癌的早期诊断水平、预后预测和提高对隐匿性肝炎的早期诊断等方面具有很大的发展前景。相信随着 miRNAs 研究的进一步深入,特别是 miRNA 芯片技术的发展,循环 miRNAs 将作为诊断肝脏相关性疾病的新型标志物而用于临床[30]。同时循环 miRNAs 还可能成为药靶或模拟这一分子进行肝脏相关疾病新药开发,给人类肝脏疾病的治疗提供一种新手段。

参 考 文 献(References)

[1] Friedman JM, Jones PA. microRNAs: Critical mediators of differentiation, development and disease [J]. Swiss Med Wkly, 2009, 139(33-34): 466-470

[2] Brase J C, Wuttiq D, Kuner R, et al. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 306

[3] Boutz DR, Collins PJ, Suresh U, et al. A two-tiered approach identifies a network of cancer and liver diseases related genes regulated by mir-122[J]. J Biol Chem, 2011, 286(20): 8066-18078

[4] Zhang B, Pan X, Cobb G P, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12

[5] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9: 654-659

[6] 陆婉玲, 李小龙, 党亚正. 血清 microRNA 与肺癌研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(4): 875-877
Lu Wan-ling, Li Xiao-long, Dang Ya-zheng. Serum miRNAs and lung cancer research progress[J]. Modern Oncology, 2013, 21(4): 875-877

[7] Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing[J]. Methods, 2008, 44(1): 3-12

[8] Pall GS, Hamilton AJ. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1077-1084

[9] Jamnikar Ciglenecki U, Grom J, Toplak I, et al. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes[J]. J Virol Methods, 2008, 47(2): 25-26

[10] Labib M, Khan N, Ghobadloo SM, et al. Three-mode electrochemical sensing of ultralow microRNA levels [J]. J Am Chem Soc, 2013, 135 (8):3027-3038

[11] Yunqiu Tu,Wen Li, Ping Wu, et al. Fluorescence Qunenching of Graphene Oxide Integrating with the Site-Specific Cleavage of the Endonuclease for Sensitive and Selective MicroRNA Detection [J]. Anal. Chem, 2013, 85: 2536-2542

[12] Wang Jian-xiu, Yi Xin-yao, Tang Hai-lin, et al. Direct quantification of microRNA at low picomolar level in sera of glioma patients using a competitive hybridization followed by amplified voltammetric detection[J]. Anal Chem, 2012, 84(15): 6400-6406

[13] Chen Y, Li L, Zhou Z, et al. A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection [J]. Med Microbiol Immunol, 2012, 201(3): 389-395

[14] 李祥云, 陈兆军, 潘峰, 等. Micor-RNA122 在不同时期慢性乙肝患者外周血浆中表达变化的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 4(23): 874-876
Li Xiang-yun, Cheng Zhao-jun, Pan Feng, et al. Expression of yserum micor-RNA122 in HBV patients in patients at different times[J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 4(23): 874-876

[15] Zhang H, Guan Y, Lu YY, et al. Circulating miR-583 and miR-663 Refer to ZHENG Differentiation in Chronic Hepatitis B [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 751341

[16] Shrivastava S, Petrone J, Steele R, et al. Up-regulation of circulating miR-20a is correlated with hepatitis C virus mediated liver disease progression[J]. Hepatology, 2013, 58(3): 863-871

[17] 张广杰.HCV 感染患者中循环 microRNA-196 和 microRNA-222 的检测及临床意义初探[D].重庆:重庆医科大学, 2012: 3
Zhang Guang-jie. Detection of circulating microRNA-196 and microRNA-222 in patients with HCV infection and the initial exploration of their clinical significance [D]. ChongQing:ChongQing Medical University, 2012: 3

[18] Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, et al. Distinct MicroR NAs Expression Profile in Primary Biliary Cirrhosis and Evalua tion of miR-505-3p and miR-197-3p as Novel Biomarkers [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66086

[19] Chen YJ, Zhu JM, Wu H, et al. Circulating microRNAs as a Fingerprint for Liver Cirrhosis[J]. PLoS One. 2013, 8(6):e66577

[20] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2012, (561): 167-175

[21] Koberle V, Kronenberger B, Pleli T, et al. SerummicroRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Histol Histopathol, 2013, 28(4): 437-451

(下转第 2306 页)

31(6): 1177-1182

[12] Garcia P, Leal P, Alvarez H, et al. Connective Tissue Growth Factor Immunohistochemical Expression Is Associated With Gallbladder Cancer Progression[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(2): 245-250

[13] Garcia P, Leal P, Ili C, et al. Inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in gallbladder cancer cells leads to decreased growth in vitro[J]. Int J Exp Pathol, 2013, 94(3): 195-202

[14] Kikuchi R1, Kikuchi Y, Tsuda H, et al. The expression and clinical significance of connective tissue growth factor in advanced head and neck squamous cell cancer[J]. Hum Cell,2014 Apr 4. [Epub ahead of print]

[15] Bai YC, Kang Q, Luo Q, et al. Role of connective tissue growth factor (CTGF) in proliferation and migration of pancreatic cancer cells[J]. Chinese Journal of Oncology, 2011, 33(10): 732-736

[16] Kevin L Bennewith, Xin Huang, Christine M Ham, et al. The Role of Tumor Cell-Derived Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) in Pancreatic Tumor[J]. Growth Cancer Res, 2009, 69 (3): 775-784

[17] Jia XQ, Cheng HQ, Li H, et al. Inhibition of connective tissue growth factor overexpression decreases growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. Chin Med J, 2011, 124(22): 3794-3799

[18] Cheng TY, Wu MS, Hua KT, et al. Cyr61/CTGF/Nov family proteins in gastric carcinogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7): 1694-700

[19] Tsai HC, Huang CY, Su HL, et al. CCN2 enhances resistance to cisplatin-mediating cell apoptosis in human osteosarcoma [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90159

[20] Ladwa R, Pringle H, Kumar R, et al. CTGF and Cyr61 in colorectal cancer[J]. Clin Pathol, 2011, 64(1): 58-64

[21] Lin BR1, Chang CC, Chen RJ, et al. Connective tissue growth factor acts as a therapeutic agent and predictor for peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(10): 3077-3088

[22] Chen PP, Li WJ, Wang Y, et al. Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer[J]. PLoS One, 2007, 2(6): e534

[23] Xie D, Nakachi K, Wang H, et al. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8917-8923

[24] Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, et al. Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7[J]. Biol Chem, 1999, 274(52): 37461-37466

[25] Inverse Expression of Cystein-rich 61 (Cyr61/CCN1) and Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) in Borderline Tumors and Carcinomas of the Ovary[J]. Int J Gynecol Pathol, 2012, 31(5): 405-4 15

(上接第 2369 页)

[22] Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellar carcinoma[J]. J Clin Gastroenterol, 2011, 45(4): 355-360

[23] Sukata T, Sumida K, Kushida M, et al. Circulating miRNAs,possible indicators of progress of rat hepatocarcinogenesis from early stages [J]. Toxicol Lett, 2011, 200(1-2): 46-52

[24] Li J, Wang Y, Yu W, et al. Expression of serum miRNA-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(1): 70-73

[25] Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis[J]. Mol Carcinog, 2011, 50(2): 136-142

[26] 郭晓东, 杨美, 皋月娟, 等. 肝癌患者血清乙肝病毒特异性 miRNAs 水平指标检测与术后肿瘤复发的相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 9: 1742-1744
Guo Xiao-dong, Yang Mei, Gao Yue-juan, et al. Serum miRNAs index detection of HBV-specific hepatocellular carcinoma is correlated with Tumor recurrence [J]. Modern Adv Biomedicine, 2013, 9: 1742-1744

[27] Liu AM, Yao TJ, Wang W, et al. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study[J]. BMJ open, 2012, 2(2): e000825

[28] Li L, Guo Z, Wang J, et al. SerummiR-18a:a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(11): 2910-2916

[29] 吴瑞珊,温旺荣.外周血 miRNA 的诊断意义[J].分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(2): 131-134
Wu Rui-shan, Wen Wang-rong. Diagnostic significance of peripheral blood miRNA[J]. J Molecular Diagn Treat, 2012, 4(2): 131-134

[30] 胡学玲, 范公忍. microRNA 在乙型、丙型肝炎中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(11): 877-880
Hu Xue-ling, Fan Gong-ren. Functional role of miRNAs in viral hepatitis infections[J]. J Clin Hepatol, 2012, 28(11): 877-880