

The Diagnostic and Therapeutic Application of Circulating microRNAs in Breast Cancer

Li Xue¹, Yujie Bai²

¹Medical Research Center, Hainan Medical College, Haikou Hainan

²Institute of Stem Cell of Hainan Province, Hainan Medical College, Haikou Hainan

Email: xueli-65@163.com, yujiebai@163.com

Received: Sept. 6th, 2015; accepted: Sep. 22nd, 2015; published: Sept. 29th, 2015

Copyright © 2015 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

MicroRNAs (miRNAs) are a class of short non-coding regulatory RNAs with an etiological contribution to carcinogenesis. The involvement of miRNAs in breast cancer has been reiterated and irrefutably proved by many studies. Circulating miRNAs refer to the cell free miRNAs in the blood or other body fluids, with characteristics such as remarkable stability, ease of access, minimal invasiveness, possibility of repeated sampling, and proven roles in cancer development and progression, so it has been regarded as one of the most potential biomarkers of tumor. This review focuses on recent-finding of circulating miRNAs as biomarkers in early diagnostic, prognostic indications and treatment selection, along with an appraisal of the translational implication of this field. We also addressed the future and the problems and challenges that need to be overcome to achieve clinical implementation of circulating miRNAs.

Keywords

microRNA, Breast Cancer, Biomarker, Diagnosis, Therapy

循环microRNAs在乳腺癌诊治中的应用

薛 丽¹, 白玉杰²

¹海南医学院科学实验中心, 海南 海口

²海南医学院海南省干细胞研究所, 海南 海口

文章引用: 薛丽, 白玉杰. 循环 microRNA 在乳腺癌诊治中的应用[J]. 医学诊断, 2015, 5(3): 47-53.

<http://dx.doi.org/10.12677/md.2015.53010>

摘要

微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)是一类具有调控功能的小分子非编码核糖核酸, 与肿瘤的发生有密切关系。大量研究也充分证实了miRNAs在乳腺癌中的作用。循环miRNAs (circulating miRNAs)指存在于血液或其他体液中的细胞外游离microRNAs, 具有稳定性好、取材方便、创伤小, 可反复取样检测等优点, 且与肿瘤发生和发展相关, 因此被认为是最具潜力的肿瘤标志之一。本综述主要总结循环miRNAs在乳腺癌早期诊断、预后预测及指导治疗等方面研究及其临床应用进展, 并探讨循环miRNAs临床应用所面临的挑战和需解决的问题。

关键词

微小核糖核酸, 乳腺癌, 生物标志, 诊断, 治疗

1. 引言

近年来我国乳腺癌发病率和死亡率逐年上升, 实现乳腺癌早期诊断、疗效监测和预后预测, 准确和实用的诊断是前提。目前临床常用的、以肿瘤组织标本为基础的病理和分子诊断, 因为取材困难、有创伤或风险性、不能多次获取标本等局限性, 无法满足早期诊断和指导个体化治疗的要求, 更难以对疗效、术后复发和转移进行动态监测。因此, 迫切需要无创伤或创伤小、能反复多次检测的样本替代肿瘤组织。体液(包括外周血、尿液、唾液等)标本具有相对安全、创伤小、可反复取样等优点, 目前已有肿瘤相关蛋白如 CEA、CA153 等方法用于肿瘤辅助诊断, 但敏感性和特异性较低。

微小核糖核酸(microRNA)是小分子非编码 RNA, 特异性降解靶 mRNA 或抑制翻译, 发挥转录后调控功能。许多研究证实 MiRNA 参与人体多种生理和病理过程, 尤其在肿瘤的发生和发展过程中的作用备受关注。而存在于外周血和体液中的游离 miRNAs (循环 miRNAs), 因具有出现早、分子小、含量多、稳定性高、组织和肿瘤特异性等优点, 是最具潜力的肿瘤分子标志之一。自从 2008 年被发现以来得到了广泛关注和大量研究, 有望应用于乳腺癌的风险预测、早期诊断、分子分型、疗效预测与监测、预后预测等各个阶段。本综述将总结循环 miRNAs 在乳腺癌诊断和治疗中的最新研究和应用进展、并展望临床应用前景和尚需解决的问题。

2. miRNAs 的功能和特性

在细胞核内 miRNA 基因由 RNA 聚合酶(Rnase-II)转录生成初始 miRNA (pri-miRNA), 再经 Pasha (RNase-II Drosha 与 DGCR8 蛋白组成的复合体)剪切生成 70-90 核苷酸的 miRNA 前体(pre-miRNA), 在输出蛋白(exportin5)的辅助下从细胞核转运至细胞浆中。经 Dicer(RNase III)进一步降解生成 19-24 个核苷酸的成熟 miRNA。成熟 miRNA 与 Argonaute 蛋白等共同构成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), miRNA 特异性识别并结合靶 mRNA 发挥调控作用。miRNA 与靶 mRNA 完全互补时, RICS 中 Argonaute 蛋白发挥切割作用降解 mRNA; 而当 miRNA 与靶 mRNA 不完全互补时, 结合于 mRNA 的 3'-UTR 的 RICS 阻滞蛋白的翻译过程。

目前 miRNA 数据库收集的人 miRNAs 达到 2578 条, 所识别的靶 mRNA 3'-UTR 结合位点超过 45,000

个, 人体 2/3 的编码基因受到 miRNA 调控。一种 miRNA 可调控多个靶 mRNAs, 同时同一个 miRNA 也可能受多个 miRNA 调控, 因此构成复杂的调控网络。miRNA 基因约 50% 位于基因间区域(intergenic region), 50% 位于内含子区域(intronic region), 内含子区域的 miRNAs 半数以上与肿瘤相关。miRNA 基因多位于染色体的脆性位点区域, 而这些区域在肿瘤细胞中常发生扩增或缺失, 扩增区域的 miRNAs 发挥类似癌基因作用, 而缺失区域的 miRNAs 类似肿瘤抑制基因。

miRNAs 不仅调控癌基因、抑癌基因编码蛋白的表达, 也调控肿瘤发生发展相关信号途径中蛋白、肿瘤微环境中血管上皮细胞、免疫细胞的重要蛋白。因此 miRNA 与肿瘤的发生发展、转移和复发密切相关, 也可通过调控药物靶分子、药物转运蛋白、甲基化或组蛋白修饰酶、细胞周期调控蛋白, 影响药物敏感性和继发耐药等。

miRNA 不仅调控细胞内的转录和翻译, 还以微囊(microvesicles)或外泌体(exosome)为载体, 通过“细胞间通讯”调控其它细胞。Le 等[1]发现高转移性乳腺癌细胞分泌含有 miR-200 的外泌体, 被低转移性乳腺癌细胞所内吞后, 转化为高转移性乳腺癌细胞。Bovy 等[2]最新发现乳腺癌肿瘤周围上皮细胞所分泌外泌体中 miR-503 水平低, 化疗后外泌体中的 miR-503 水平增高, miR-503 可调控其靶基因 CCND2 和 CCND3, 抑制肿瘤细胞增殖和转移。因此, miRNAs 介导肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与肿瘤微环境中其他细胞间的相互作用, 充当“信使分子”的功能。

肿瘤患者外周血和体液中的循环 miRNAs 水平和种类与肿瘤组织中 miRNA 存在关联, 循环 miRNA 来源于肿瘤细胞坏死裂解或者主动分泌等。循环 miRNAs 包裹于微囊或外泌体中, 或与蛋白(如 Argonaute、高密度脂蛋白等)结合, 可抵御体液中 RNA 酶的降解, 因此具有高稳定性。在高温、酸碱、反复冻融等条件下保持稳定, 在石蜡包埋组织标本中能稳定保存数年, 加之取材方便等优点, 是比较理想的检测分析材料。

3. 循环 microRNAs 在乳腺癌中应用

miRNAs 与肿瘤发生、发展和药物反应等密切相关。肿瘤组织原位杂交等实验证明 miRNA 的表达水平和分布与肿瘤起源、组织分型和分期相关, miRNA 可区分肿瘤类型及其分化程度, 是最有潜力的肿瘤分子标志之一。依据临床意义可分为诊断标志(diagnostic biomarkers)、预后标志(prognostic biomarkers)和预测标志(predictive biomarkers)。

3.1. 乳腺癌诊断生物标志

尽管赫赛汀等靶向药物, 以及生物治疗等新医疗技术提高乳腺癌的疗效和生存率, 但早期诊断依然决定预后的最主要因素。早期局部乳腺癌的 5 年生存率高达 99%, 临界期患者可达到 84%, 而晚期和转移癌患者仅为 24%。钼靶 X 线检测是目前临床最常用筛查的方法, 但高假阳性(12.1%~65.8%)使患者接受不必要的影像检测或活检。钼靶 X 线结合 CT、核磁共振等可提高早期诊断率, 但费用高不适合作为筛查方法。

肿瘤患者循环 miRNAs 由坏死肿瘤细胞释放, 或者活肿瘤细胞主动分泌, 直接来源于肿瘤细胞[3], 可能与肿瘤细胞存在一致性。Si 等[4]比较 48 例早期乳腺癌组织和 100 份血清样本中的 miRNAs。发现 miR-92a 表达降低、miR-21 表达增高在组织和血清中呈一致性变化, 且变化程度与肿瘤大小和淋巴结转移状态相关。可见循环 miRNAs 具有组织和肿瘤特异性, 其含量和组成变化直接反应肿瘤来源和发生, 甚至在肿瘤发生的早期出现, 具备肿瘤诊断生物标志的潜力。

Roth 等[5]对 59 例原发性乳腺癌患者、30 例转移性乳腺癌患者和 29 例健康对照者的血清 miRNAs 比较分析, 发现 miR-155、miR-10b 和 miR-34a 水平不仅可区分乳腺癌与健康对照, 而且可鉴别原发和转移性

乳腺癌。Schwarzenbach 等[6]研究 102 例手术前和 34 例手术后乳腺癌患者、32 例良性肿瘤患者和 53 例健康人血浆 miRNAs 水平,发现 miR-20a 和 miR-21 在良、恶性肿瘤患者均高于健康对照,而乳腺癌患者血浆 miR-214 显著高于良性肿瘤患者。循环 miRNAs 对早期乳腺癌检测敏感性和特异性优于目前临床常用的肿瘤标志物检测,例如 Gao 等[7]对 89 例早期乳腺癌患者和 55 例健康对照者,分别采用 qRT-PCR 测定循环 miR-21,用化学发光法检测 CEA 和 CA-153,循环 miR-21 检测敏感性为 87.6%,特异性为 87.3%;而 CEA 和 CA-153 的敏感性分别为 22.4%和 15.7%。Liu 等[8]对包括 16 篇文献报道,31 项研究,1668 例乳腺癌和 1111 例健康对照的荟萃分析(meta-analysis)显示 miRNAs 对乳腺癌诊断的总敏感性为 77%、特异性为 88%,阳性似然率(PLR)为 4.2%、阴性似然率(NLR) 0.29、曲线下面积(AUC)为 0.89。

新一代测序和 PCR 芯片等高通量技术分析循环 miRNAs 表达谱,可提高检测的灵敏度。Kodahl 等[9]采用 miRNA 芯片分析了 48 例 ER⁺乳腺癌患者和 24 例健康对照者血清 miRNAs 表达谱,筛选得到 9 种 miRNAs (miR-15a、miR-18a、miR-107、miR-133a、miR-139-5p、miR-143、miR-145、miR-365、miR-425)。对 60 例早期乳腺癌患者和 51 例健康对照者血清样本进行验证,9 个 miRNAs 表达谱综合运算得出的风险值准确性远高于单一 miRNA,不仅可以诊断早期乳腺癌,还可以用于乳腺癌发病风险的筛查。Cuk 等[10]类似的研究也筛选出一组 miRNAs (miR-127-3p、miR-376a、miR-652、miR-148b、miR-409-3p、miR-801、miR-376c)可鉴别乳腺癌和良性肿瘤(AUC = 0.81),且对年轻女性(<50 岁)的准确性更高(AUC = 0.86)。

3.2. 乳腺癌预后生物标志

乳腺癌转移和术后复发是影响预后和生存期的重要难题,目前临床采用的 CT、PET/CT、MRI 等影像技术难以早期发现转移癌。miRNAs 调控肿瘤细胞游走、侵袭、上皮间质细胞转换、新生血管相关蛋白,与肿瘤的恶性程度和转移复发密切相关,近年来研究发现与肿瘤细胞及肿瘤微环境组成细胞相关 miRNAs,如上皮细胞相关 miRNAs (miR-10b、miR-31、miR-141、miR-200b、miR-205、miR-335)、肿瘤相关成纤维细胞相关 miRNAs (miR-21、miR-26b)和新生血管相关 miRNA (miR-126),这些循环 miRNAs 表达水平和变化可作为乳腺癌复发和转移的生物标志。

Madhavan 等[11]采用 miRNA 芯片筛选与循环肿瘤细胞(CTC)状态相关的 mRNAs,在 61 例阳性(CTC⁺)、60 例低水平和 72 例阴性(CTC⁻)转移性乳腺癌(MBC)患者中验证,发现血浆 miRNAs (miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-210、miR-375、miR-801)在 CTC⁺的 MBC 患者血浆中水平高于 CTC⁻的 MBC 患者,其中 miR-200b 表达差异最为显著。单独 miR-200b 和上述 miRNAs 表达谱均与总生存期(OS)和无进展生存期(PFS)相关,表达谱的预后预测准确性优于单一 miR-200b。Kleivi Sahlberg 等[12]对 60 例 ER⁻/PR⁻/HER2⁻ (TNBC)乳腺癌患者血清 miRNAs 表达谱分析,筛选并验证一组 miRNAs (miR-18b、miR-103、miR-107、miR-652)表达水平与肿瘤复发和总生存期相关。Madhavan 等[11]发现在 CTC 阳性的乳腺癌患者中循环 miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-203 和 miR-210 表达水平升高,miR-375 和 miR-768-3p 表达水平降低,循环 miRNA 表达谱与患者总生存期的相关性高于 CTC 状态。Eichelser 等[13]也报道了血浆中外泌体的 miRNA-373 表达水平在 TNBC 和 ER⁻/PR⁻乳腺癌患者高于激素受体阳性(ER⁺/PR⁺)乳腺癌患者,miR-373 水平与侵袭表型相关。类似研究也相继发现血浆/血清 miR-210、miR-21、miR-155、miR-214、miR-19a 等表达水平与淋巴结转移或远处转移相关[14]-[16]。

因此循环 miRNAs 可作为一种低创伤的预后评价和转移复发监测手段,准确性甚至高于 CTC 状态分析。

3.3. 乳腺癌疗效监测生物标志

miRNAs 调控激素受体、药物代谢、细胞周期、凋亡、组蛋白修饰和 DNA 损伤修复等相关蛋白的表

达[17], 与乳腺癌治疗疗效关系密切。同时因循环 miRNAs 可以重复取材和连续动态监测等优点, 使得循环 miRNAs 成为理想的预测生物标志, 可指导个体化用药并动态监测治疗效果和发现获得性耐药等。

Heneghan 等[18]对乳腺癌和对照组血液中 7 种候选 miRNAs 比较分析, 确认 miR-195 和 let-7a 在乳腺癌患者高表达, 手术切除肿瘤后分别降低 11 倍和 19 倍, miR-195 和 let-7a 不仅可诊断乳腺癌, 还可作为治疗效果评价指标。Li 等[19]比较分析多柔比星+紫杉醇联合化疗敏感和耐药的乳腺癌患者的血清 miRNAs, 发现 miR-19a 和 miR-205 在药物敏感和耐药组间相差显著, 预测耐药的敏感性达 81.25%, 特异性为 75%。Jung 等[20]报道 HER2⁺乳腺癌患者治疗前血浆 miR-210 表达水平低, 采用曲妥珠单抗或手术治疗后血浆 miR-210 水平升高, 且与临床病理完全缓解水平相一致。更多临床研究也相继发现血 miR-21、miR-125b、miR-373、miR-210、miR-30c、miR-519、miR-221 等与他莫昔芬、曲妥珠单抗、拉帕替尼药物敏感性相关[21] [22]。Mackenzie 等报道 miR-10b、miR-21、miR-155 表达水平高的 TNBC 患者, 预后较差, 总生存期和无复发生存期均较短。相比目前采用的以 mRNA 为基础的预后预测(如 FDA 批准的 Oncotype DX 和 Mannaprint 芯片), 循环 miRNA 具有稳定和便捷的优势。

4. 应用前景及尚待解决问题

循环 miRNAs 具备作为肿瘤生物标志的特征和临床应用潜力, 但目前仍处于临床前研究阶段, 在成功应用于临床之前尚有一些理论和技术问题有待解决: 从已发表文献不难看出, 虽然大量临床和基础研究筛选到与乳腺癌诊断、病理分期、受体状态、药物反应、复发转移等相关的 miRNAs, 但结果的可重复性和一致性不高, 甚至有些相互矛盾。例如 Ng 等报道原发乳腺癌患者血浆 miR-145 表达水平降低, 而 Mar-Aguilar 等却报道 miR-145 表达水平增高。其原因既有肿瘤异质性和 miRNAs 本身特性也有研究方法(如患者选择、分析样本、检测方法、数据处理和实验设计等)的差别: 1) 乳腺癌与其他肿瘤一样存在高度异质性, 发生和发展过程涉及多个基因的改变, 相关的 miRNAs 数量和种类繁多。循环 miRNAs 既可由坏死肿瘤细胞被动释放, 又可由活细胞主动分泌, 因而循环 miRNAs 的组成和含量可能呈现随机性和动态波动性; 2) 许多相关性研究采用病例-对照方法, 研究对象的特征(年龄、种族、病理分期、肿瘤组织学分型, 分子亚型)影响研究结果。例如不同种族患者的 miRNAs 表达谱可存在差异, Zhao 等[23]对比白人和黑人乳腺癌患者全血 miRNAs 表达谱, 绝大多数不一致, 仅见 miR-181a 和 miR-1304 在 2 个人群呈一致性; 3) 检测分析样本的影响: 循环 miRNAs 的研究采用了全血、血浆和血清样本, 全血标本因受到淋巴细胞内 miRNAs 的干扰, 对结果的影响较大; 血清和血浆相对更为稳定, 但也存在细微差别, 因在凝血过程中少量淋巴细胞裂解释放 miRNAs, 通常血清中 miRNAs 浓度略高于血浆; 4) 样本量的大小、取样时机、筛选和验证程序等实验设计的影响: 一些研究的样本量偏小造成结果的偏差; 循环 miRNAs 受到手术、药物治疗等影响, 选择手术后或治疗后患者会影响用于早期诊断分子标志的 miRNAs 的筛选结果; 5) 检测和数据处理方法: qRT-PCR 是最常用检测方法之一, PCR 结果的校正方法和参照不同也会产生偏差。如 Cookson 等对血清 miRNAs 的 RT-PCR 结果用 miR-16 等内参基因校正, 未发现显著差异的 miRNAs, 而改用 miRNA 的平均值进行校正后获得阳性结果。

目前新一代测序技术(NGS)应用于 miRNAs 研究, 将加快 miRNAs 的筛查和发现。陆续出现的新技术也将拓展样本范围和简化检测操作, 如 Erbes 等[24]从尿液中筛选 4 种 miRNA (miR-155、miR-21、miR-125b、miR-451)在乳腺癌患者高于健康对照, 尿液 miRNA 检测无创伤也更加方便。Asaga 等[25]建立了不需要分离 RNA 直接 RT-PCR 检测 miRNAs 的技术, 操作更为简便和快捷。

随着循环 miRNAs 临床研究和方法的成熟, 可以预期不久的将来可应用于临床肿瘤的早期诊断、用药指导和预后预测等, 服务于乳腺癌的个性化诊断和治疗。而且, miRNAs 在无典型症状或临床诊断乳腺癌前数年可被检出, 有望用于高风险人群的早期筛查和预防。

参考文献 (References)

- [1] Le, M.T., Hamar, P., Guo, C.Y., Basar, E., Perdigão-Henriques, R., Balaj, L. and Lieberman, J. (2014) miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cellmetastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, **124**, 5109-5128. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI75695>
- [2] Bovy, N., Blomme, B., Frères, P., Dederen, S., Nivelles, O., Lion, M., Carnet, O., Martial, J.A., Noël, A., Thiry, M., Jérusalem, G., Josse, C., Bours, V., Tabruyn, S.P. and Struman, I. (2015) Endothelial exosomes contribute to the anti-tumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget*, **6**, 10253-10266.
- [3] Cookson, V.J., Bentley, M.A., Hogan, B.V., Horgan, K., Hayward, B.E., Hazelwood, L.D. and Hughes, T.A. (2012) Circulating microRNA profiles reflect the presence of breast tumours but not the profiles of microRNAs within the tumours. *Cellular Oncology*, **35**, 301-308. <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-012-0089-1>
- [4] Si, H.Y., Sun, X.M., Chen, Y.J., Cao, Y., Chen, S.M., Wang, H.C. and Hu, C.J. (2013) Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **139**, 223-229. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-012-1315-y>
- [5] Roth, C., Rack, B., Müller, V., Janni, W., Pantel, K. and Schwarzenbach, H. (2010) Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, **12**, R90. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2766>
- [6] Schwarzenbach, H., Milde-Langosch, K., Steinbach, B., Müller, V. and Pantel, K. (2012) Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, **134**, 933-941. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-012-1988-6>
- [7] Gao, J., Zhang, Q., Xu, J., Guo, L. and Li, X. (2013) Clinical significance of serum miR-21 in breast cancer compared with CA153 and CEA. *Chinese Journal of Cancer Research*, **25**, 743-748.
- [8] Liu, L.H., Wang, S., Cao, X.T. and Liu, J.C. (2014) Analysis of circulating microRNA biomarkers for breast cancer detection: A meta-analysis. *Tumor Biology*, **35**, 12245-12253. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-014-2533-5>
- [9] Kodahl, A.R., Lyng, M.B., Binder, H., Cold, S., Gravgaard, K., Knoop, A.S. and Ditzel, H.J. (2014) Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: A case control study. *Molecular Oncology*, **8**, 874-883. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.002>
- [10] Cuk, K., Zucknick, M., Heil, J., Madhavan, D., Schott, S., Turchinovich, A., *et al.* (2013) Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *International Journal of Cancer*, **32**, 1602-1612. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27799>
- [11] Madhavan, D., Zucknick, M., Wallwiener, M., Cuk, K., Modugno, C., Scharpf, M., Schott, S., Heil, J., Turchinovich, A., Yang, R.X., Benner, A., Riethdorf, S., Trumpp, A., Sohn, C., Pantel, K., Schneeweiss, A. and Burwinkel, B. (2012) Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **18**, 5972-5982. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1407>
- [12] Kleivi Sahlberg, K., Bottai, G., Naume, B., Burwinkel, B., Calin, G.A., Børresen-Dale, A.L. and Santarpia, L. (2015) A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negativebreast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, **21**, 1207-1214.
- [13] Eichelser, C., Stückrath, I., Müller, V., Milde-Langosch, K., Wikman, H., Pantel, K. and Schwarzenbach, H. (2014) Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget*, **5**, 9650-9663.
- [14] Jung, E.J., Santarpia, L., Kim, J., Esteva, F.J., Moretti, E., Buzdar, A.U., Di Leo, A., Le, X.F., Bast Jr., R.C., Park, S.T., Pusztai, L. and Calin, G.A. (2012) Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*, **118**, 2603-2614. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.26565>
- [15] Sun, Y., Wang, M.G., Lin, G.J., Sun, S.P., Li, X.X., Qi, J. and Li, J.M. (2012) Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS ONE*, **7**, e47003. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047003>
- [16] Anfossi, S., Giordano, A., Gao, H., Cohen, E.N., Tin, S., Wu, Q., *et al.* (2014) High serum miR-19a levels are associated with inflammatory breast cancer and are predictive of favorable clinical outcome in patients with metastatic HER2⁺ inflammatory breast cancer. *PLoS ONE*, **9**, e83113. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083113>
- [17] Eroles, P., Tormo, E., Pineda, B., Espin, E. and Lluch, A. (2015) MicroRNAs in breast cancer: one more turn in regulation. *Current Drug Targets*, (Epub Ahead of Print).
- [18] Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J., Newell, J. and Kerin, M.J. (2010) Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals of Surgery*, **251**, 499-505.
- [19] Li, Q., Liu, M., Ma, F., Luo, Y., Cai, R.G., Wang, L.M., Xu, N.Z. and Xu, B.H. (2014) Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal A subtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel. *PLoS ONE*, **9**, e104870.

-
- [20] Jung, E.J., Santarpia, L., Kim, J., Esteva, F.J., Moretti, E., Buzdar, A.U., *et al.* (2012) Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*, **118**, 2603-2614. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.26565>
- [21] Müller, V., Gade, S., Steinbach, B., Loibl, S., von Minckwitz, G., Untch, M., Schwedler, K., Lübbe, K., Schem, C., Fasching, P.A., Mau, C., Pantel, K. and Schwarzenbach, H. (2014) Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: A translational research project within the Geparquinto trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, **147**, 61-68. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-3079-3>
- [22] Ward, A., Shukla, K., Balwierz, A., Soons, Z., König, R., Sahin, O., *et al.* (2014) MicroRNA-519a is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumour-suppressor genes in ER+ breast cancer. *The Journal of Pathology*, **233**, 368-379. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4363>
- [23] Zhao, H., Shen, J., Medico, L., Wang, D., Ambrosone, C.B. and Liu, S. (2010) A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS ONE*, **5**, e13735
- [24] Erbes, T., Hirschfeld, M., Rücker, G., Jaeger, M., Boas, J., Iborra, S., Mayer, S., Gitsch, G. and Stickeler, E. (2015) Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer*, **15**, 193. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1190-4>
- [25] Asaga, S. and Hoon, D.S. (2013) Direct serum assay for microRNA in cancer patients. *Methods in Molecular Biology*, **1024**, 147-155. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-453-1_11