위암에서의 순환종양핵산

이현지, 이선민

양산부산대학교병원 진단검사의학과

Circulating Cell-free Tumor Nucleic Acids in Gastric Cancer

Hyun-Ji Lee, Sun Min Lee

Department of Laboratory Medicine, Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan, Korea

Gastric cancer is still the leading cause of cancer deaths, especially in Asian countries. Recently, many studies have analyzed cell-free nucleic acids (cfNAs) circulating in the blood, for the early diagnosis of cancer and monitoring its progression. Circulating tumor nucleic acids (ctNAs) originate in a tumor and contain tumor-related genetic or epigenetic alterations. This review defines the nomenclatures of each form of cfNAs and describes the characteristics of circulating tumor DNA (ctDNA) and microRNA (miRNA), two major forms of ctNAs studied in gastric cancer research to date. We compare available studies on ctDNA, and explain trends observed in studies of miRNAs in gastric cancers. As these new blood-based biomarkers have attracted increasing attention, we have discussed several important points to be considered before the clinical translation of ctNA detection. We have also discussed the current status of research in this field, and clinical applications of specific ctNAs as tumor markers for gastric cancer diagnosis. (**Korean J Helicobacter Up Gastrointest Res 2018;18:168-173**)

Key Words: Cell-free nucleic acids; Circulating microRNA; Circulating tumor DNA; Liquid biopsy; Stomach neoplasms

서론

위암은 암과 연관된 사망의 주요한 원인이며 특히 우리나라를 비롯한 동양권에서 발생 빈도가 높다.¹ 위암을 조기에 발견하고 사망률을 줄이기 위하여 국가암검진사업의 일환으로 40세 이상의 성인을 대상으로 2년 간격으로 정기적인 내시경검사가 시행되고 있으나 수검률은 아직 대상자의 절반에 미치지 못하고 있다.² 특히 진행성 위암의 경우 예후가 불량하기 때문에, 환자의 경과를 정확히 예측하여 치료 전략을 수립하고 치료반응을 모니터링하며 전이를 조기에 검출하기 위한 추가적인 종양표지자의 개발이 필요한 실정이다.

최근 혈청, 혈장, 소변 또는 다른 체액에서 미량의 무세포 핵산(cell-free nucleic acid, cfNA)을 추출하고 분석할 수 있는 기술이 발전하면서, 특정 암이나 여러 다양한 암의 동시 검출을 위해 보다 민감한 방법으로 종양유전자(oncogene)를 검사하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.³ 무세포 순환종양핵산의 잠재적 검사 대상은 암단백을 코딩하는 종양유전자를 포함하는

유전자의 돌연변이 혹은 코딩 및 비코딩 게놈 서열의 메틸화, 마이크로RNA (microRNA [miRNA]), 미소부수체(microsatellite) 이형성 소실, DNA 무결성(integrity), 카피 수 변화, 암 바이러스 DNA 등 다양하다.^{3,4} 이 종설에서는 혈중에서 순환하는 무세포 종양 핵산의 특성을 순환 종양 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)와 miRNA를 중심으로 알아보고, 위암에서의 적용에 대해 논의하고자 한다.

본론

1. 무세포 핵산

보통 DNA를 비롯한 핵산은 세포에서 추출하는 것으로 생각하기 쉽지만 혈청, 혈장 등의 세포가 없는 체액에도 세포에서 유리된 핵산이 존재하므로 이를 무세포 핵산이라 한다.³ 종양에서 유래하여 혈액 속에서 순환하는 DNA라는 의미의 순환 종양 DNA를 사용하면 혈구세포에서 유래하여 건강인에게도 검출될 수 있는 무세포 DNA (cell-free DNA, cfDNA)^{5,6}보다 종양에 국한된 의미로 분석하려는 대상을 지칭할 수 있다. cfNA는 숙주 세포의 종양발생(oncogenesis)에서 활발한 생물학적 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,⁷ 정량 분석법이 고도로 발달하면서 존재 여부를 넘어 추가적으로 최소 잔여 질환(minimal residual disease)을 확인할 수 있는 가능성이 보고된 이후⁸ 급격히 관심

Received: April 6, 2018 Revised: June 5, 2018 Accepted: June 6, 2018

Corresponding author: Sun Min Lee
Department of Laboratory Medicine, Pusan National University Yangsan Hospital, 20 Geumo-ro, Mulgeum-eup, Yangsan 50612, Korea
Tel: +82-55-360-2851, **Fax:** +82-55-360-1880, **E-mail:** yaong97@paran.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2896-3365>

이 증가하고 있다. 이러한 검사는 대개 혈액을 검체로 하므로 비침습적이며, 핵산의 증폭이나 염기서열을 분석하는 기술을 적용하는 방식에 따라 고도의 민감도와 특이도를 가질 수 있고, 연속적으로 측정하여 개인별로 질병의 상태를 추적할 수 있는 특징이 있다.⁹ 그러나 cfNA를 측정하는 시기뿐만 아니라 그것이 유래한 세포의 종류(세포자멸 세포 또는 암세포), 분석 전 변수(preanalytical variables), 종양 크기(tumor burden)에 따른 cfNA의 크기, 무결성 및 종양 아클론(subclone)의 표현에 따라 임상적 유용성이 다를 수 있다.^{3,10-12}

1) 순환 종양 DNA

ctDNA는 순환종양세포(circulating tumor cell, CTC)와 함께 액체 생검의 분석 대상 중 가장 대중적인 종양표지자 종류로¹³ 초기 암환자의 혈장에서도 비교적 쉽게 검출되고⁶ 진행성 암종을 가진 환자는 높은 농도를 가지므로¹⁴ 비교하기 쉽다는 장점이 있지만, 미량만 존재하면 기저 신호(background signal, noise)와 위음성을 구분하기 어려운 단점이 있다.¹⁵ 암 환자에서 추출된 ctDNA는 정상적 cfDNA에 비해 길이가 길어 제거가 느리며 반감기가 길고,⁴ 유전자 서열의 상당한 변이를 나타내며 종양 특이적 DNA 메틸화도 일관되게 측정되기 때문에 일상적인 암 검출에 광범위하게 적용할 수 있다.^{3,6,13,15} 가장 흔한 형태는 돌연변이 ctDNA 검출로 몇몇 종양에서는 임상적 사용을 승인받은 표적치료법이 있기 때문에 더 주목받고 있다.^{4,16}

2) 마이크로RNA

miRNA는 최대 22개의 뉴클레오타이드 길이의 짧은 비코딩(noncoding) RNA로 RNA 침묵(silencing)과 전사 후 단계에서 유전자 발현을 음성적으로 조절한다.¹⁷ 2014년 기준으로 2,588개의 miRNA의 위치, sequence, 전사 목록 정보가 밝혀졌고¹⁸ 최근에 miRBase 22로 데이터베이스가 갱신되었다.¹⁹ miRNA 유도 침묵 기전으로 전사 억제나 messenger RNA (mRNA) 분해를 일으키는데, 단백질 코딩 유전자의 약 60%를 조절하는 것으로 추정된다.²⁰ 하나의 miRNA가 수백에서 수천 개의 mRNA를 표적으로 할 수 있으며 반대로 단일 mRNA가 여러 miRNA에 의해 조절될 수 있다.²¹ RNA에 비해 안정적인 특성과 함께 다른 질환보다 특히 암에서 이상조절 순환 miRNA 발현 프로파일이 우세한 것으로 확인되어 새로운 종양표지자로서 관심을 받고 있다.²²

3) 기타 핵산

혈중에는 종양표지자의 mRNA나 DNA 혹은 RNA를 함유하고 있는 엑소좀(exosome)과 CTC가 존재하여 ctDNA와 ctRNA를 방출할 수 있다.⁴ 혈중의 암세포를 분리하는 것이 비교적 용이한 혈액암에서는 민감도가 낮은 검사법으로도 암세포가 포함된 단핵구에서 추출한 mRNA 변이에 따른 암종 분류와 예후 예측을 할 수 있었고,²³ 혈장에서도 특정 유전자의 변이가

발현된 mRNA의 검출이 보고되어 왔다.²⁴ 따라서 고형암에서도 환자 혈액에서 CTC를 분리하여 그로부터 추출한 RNA를 분석하는 것이 민감도와 특이도를 높이는 방법이 될 수 있다. 그 외 혈장 long non-coding RNA (lncRNA)나 엑소좀에 포함된 핵산까지 포함하면 혈액 속에는 많은 종류의 핵산이 존재한다고 할 수 있다.

2. 위암에서의 무세포 순환종양핵산

1) 순환 종양 DNA

초기 연구에서는 환자 혈장에서 추출한 DNA의 총 농도를 측정하거나²⁵ real-time polymerase chain reaction (PCR) 등 정량 분석법을 사용해 상대적인 유전자 증폭이나 변이의 비율을 검출하였으나,^{26,27} 이후 변이 유전자를 직접 정량하는 방향으로 접근하고 있다. 예를 들어, 원발 종양에서 *TP53* 돌연변이를 보인 환자에서 혈장 ctDNA를 임상 경과 중 추적하였을 때 *TP53* ctDNA의 분율과 질병의 진행 상태 사이에 상관관계가 관찰되었다.²⁸ 위암 환자의 혈액에서 ctDNA의 유전자 변이를 검출한 연구는 타 암종에 비해 적는데(Table 1),²⁶⁻³¹ Fang 등²⁹은 진행성 위암 환자 277명에서 8개 유전자의 68개 변이의 copy 수를 정량 측정하였을 때 병기에 따라 증가되며, 높은 수치를 보이는 경우 복강 재발률이 높고 5년 생존율이 낮음을 보고하였다. 최근에 발표된 메타 분석에서는 위암에서 메틸화된 ctDNA를 검출한 16개 연구를 합한 위암 진단의 area under the SROC (summary receiver operating characteristic curve) 값은 0.94, 전체 생존율에 대한 위험률은 1.77이었다.³² 방사선 치료 후 ctDNA로 치료 반응을 모니터링하는 연구도 지속되어 왔는데 최근 다중 생물정보학을 통하여 선정한 종양유전자들의 변이를 총량적으로 측정하는 연구도 발표되었다.^{14,33}

2) 마이크로RNA

위암에서 miRNA에 대한 연구로 2014년 Kim 등³⁴이 혈청 miRNA 중 림프절 전이와 연관된 miR-21, miR-146a, miR-148a 세 가지 조합의 area under the curve (AUC) 값을 0.764로 보고하였으며, 2017년 Huang 등³⁵도 위암 혈청에서 증가된 6개의 miRNA (miR10b-5p, miR132-3p, miR185-5p, miR195-5p, miR-20a3p, miR296-5p) 조합의 AUC 값을 0.702로 보고하는 등 검증군에서의 진단 능력은 좋지 않았다. 이들 miRNA들은 위암 조직에서 예후인자로 보고된 세 가지 miR-145-3p, miR-125-5p, miR-99a-5p³⁶와는 모두 다른 miRNA들이다. miR338은 상피-간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition)에서 Wnt/ β -catenin 신호 전달 체계에 의해 위암 세포가 증식, 이동, 침윤하는 것을 방해하는 기전과 연관이 있음이 보고되었다.³⁷ miRNA 조절 시스템의 복잡성³⁸을 감안할 때 단일 miRNA가 특정 암에 특이적인 표지자로 사용

Table 1. Clinical Studies of ctDNA in Gastric Cancer Patients

Outcome	Patient (n)	Control (n)	Detection method	Genes for ctDNA detection	Detection results	Number of total positive case (%)	Conclusion	Reference
Diagnostic	20	22	Methylation-specific PCR	Promoters of MGMT, p15, and hMLH1	Cell-surface-bound circulating DNA (csb-cirDNA) detected 70, 50, and 25% in pts. vs. 36, 18, and 9% in NC control	15/20 (75%)	Detection of GC by visible bands in PAGE (Sens 75%, Spec 54%)	Kolesnikova et al. (2008) ²⁷
Diagnostic	57	79	Realtime PCR	MYC/GAPDH	Pts. 5.226±3.578 (range: 1.25~18.35) Control 2.436±0.881 (range: 1.00~5.00)	36/57 (63.2%)	Diagnostic performance on cutoff 2.725 (Sens 75.4%, Spec 76.9%)/5.225 (Sens 38.6%, Spec 100%)	Park et al. (2009) ²⁶
Diagnostic	81	103	Realtime PCR	HER2 and MYC to HBB ratios	Differentiate pts. to cancer-free control HER2 ratio 2.0 (AUC 0.760)	56/81 (69.1%)	Differentiate pts. to NC combination model (AUC 0.850)	Park et al. (2014) ³⁰
Monitoring	42 ^a	24	Direct sequencing	TP53	Proportion of mutated ctDNA (%) to total ctDNA quantity (ng/mL)	10/42 (23.8%)	Mutant ctDNA (%) correlates with response to therapy in 3 pts.	Hamakawa et al. (2015) ²⁸
Diagnostic Prognostic	277	95	MassARRAY (multiplex PCR)	TP53, ARID1A, PIK3CA most frequently	Mutation (median 4,280 copies/mL) 71.4% in Stage I, 30.8% in Stage II, 28.8% in Stage III, and 66.7% in Stage IV	35/277 (12.6%)	Reference value 1,478 copies/mL Only for late stage gastric cancer, ctDNA was associated with a lower 5-year overall survival	Fang et al. (2016) ²⁹
Diagnostic Monitoring	60	30	Droplet digital PCR	HER2 to RPPH1 ratios	HER2-negative Pts. 1.790±0.383 HER2-positive Pts. 4.912±5.284 Ratio correlated with tumor size and operation	14/46 (30.4%)	Diagnostic performance on cutoff 2.1 (Sens 73.3%, Spec 93.3%) Positive conversion (7/13) at the time of recurrence	Shoda et al. (2017) ³¹

ctDNA, circulating tumor DNA; PCR, polymerase chain reaction; pts., patients; NC, non-cancer; GC, gastric cancer; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; Sens, sensitivity; Spec, specificity; AUC, area under the curve; cfDNA, cell-free DNA.

^aAll advanced stage.

되기는 어려운 것으로 보는 견해도 있지만²² 다양한 암종에서 예후인자로 보고된 miR-21의 과발현은 새로운 치료 표적으로 각광받고 있고³⁹ 위암에서도 보고된 바 있으므로⁴⁰ 추가적인 연구 결과가 기대된다.

3) 그 외 RNA 연구

암의 전이 유발 역할을 하는 것으로 알려진 S100A4 유전자의 mRNA 발현량이 예후적 가치가 없다는 메타분석 결과⁴¹와 아시아인 대상 10개 연구를 메타분석하여 효용이 있다는 결과가 같은 해에 각각 발표되었다.⁴² lncRNA 중에서는 H19가 위암 환자군에서 현저히 높고 수술 후 감소된다는 보고가 있다.⁴³

3. 순환종양핵산 검출 및 분석법

1977년 암환자에게서 더 높은 농도가 보고된 이후 ctDNA를 검출하기 위한 여러 방법이 사용되어 왔지만,¹⁵ 일반적인 PCR은 민감도가 충분치 못해 어레이(array)-기반 비교 게놈 혼성화(comparative genome hybridization, CGH), 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 분석, 차세대 염기서열 분석(next-generation sequencing, NGS)이 주로 사용되고 있다.¹⁵ Microarray 칩을 사용하는 방법은 여러 가지 고형암종을 가진 환자들의 체액에 순환하는 특정 종양유전자의 발현을 검출하는데 효과적인 것으로 알려졌으나³ 최근에는 NGS 기술이 발전하면서 전장유전체 염기서열을 분석하는 whole genome sequencing이나 whole exome sequencing, DNA 분자를 구획화하여 변이 분자를 정량화하는 digital PCR,^{14,44} 혹은 표적 유전자를 더 좁혀 민감도를 극대화시킨 cancer personalized profiling by deep sequencing (CAPP-Seq)과 같은 검출법^{14,45}을 사용하였을 때의 이점이 보고되고 있다.

결 론

ctDNA 검출량은 유래하는 종양의 크기와 유형뿐만 아니라 혈장 뉴클레아제의 활성과 같은 다른 잠재적 생물학적 기전에 따라 달라진다.^{10,46} 추출한 ctDNA의 총 농도를 측정하거나 모든 세포에 보편적으로 존재하는 여러 유전자를 한꺼번에 증폭하면 암환자의 병기나 수술에 따라 높은 수치를 보일 수 있으나,^{29,34} 세포 내 핵산에 비하면 미량인 순환 무세포 핵산이 혈액 응고 과정이나 원심분리 시 백혈구에서 방출되는 과량의 핵산에 의해 오염될 수 있다는 점에 유의해야 한다.^{4,47} 위암의 경우 내시경검사라는 접근성이 높은 검진법이 있으므로 선별용 표지자로는 다른 고형암에 비해 민감도가 더 높아야 적합한 것으로 생각된다. 조기 암 검출을 위해서는 여러 암종을 아우를 수 있는 접근이 필요하지만,^{9,48} 진행성 위암의 치료 반응을 보기 위해서는 다른 암종처럼 단일 표지자가 추가로 발굴되는 것

이 유리할 수 있다.¹⁶ 따라서 검사의학적으로는 채취부터 추출 법까지의 검사 전 단계의 변이에 따른 차이에 대한 연구도 필요하며, 민감도 높은 검출법과 시퀀싱 기술의 표준화가 이루어져야 임상검사에서 종양표지자로서 사용이 가능할 것이다.⁴⁹ 또한 조직과 CTC, ctDNA에서 유전자 변이나 RNA 발현이 서로 다른 양상을 보일 수 있기 때문에⁵⁰ 혈액에서 종양표지자를 개발하기 위한 연구를 진행할 때 한 가지만 대상으로 하는 것보다는 조직이나 CTC와 함께, ctNA를 동시에 분석하는 것이 도움이 될 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Jung KW, Won YJ, Kong HJ, Lee ES. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2018. *Cancer Res Treat* 2018; 50:317-323.
- National Cancer Screening Business Information System [Internet]. Goyang: National Cancer Center, 2017 Nov 20 [cited 2018 Mar 12]. Available from: http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtl-PageDetail.do?idx_cd=1440
- Jain S, Pincus MR, Bluth MH, McPherson RA, Bowne WB, Lee P. Diagnosis and management of cancer using serologic and other body fluid markers. In: Richard A. McPherson, ed. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. St. Louis: Elsevier, 2017:1145-1449.
- Liandou E, Hoon D. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. In: Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 6th ed. St. Louis: Elsevier, 2018: 1111-1158.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:65-73.
- Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* 2016;6:479-491.
- García-Olmo DC, García-Olmo D. Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genomemastasis. *Crit Rev Oncog* 2013;18:153-161.
- Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2012;22:220-231.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:224ra24.
- El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 2013; 424:222-230.
- Yu J, Gu G, Ju S. Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity. *Lab Med* 2014;45:6-11.
- Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification.

- Anal Bioanal Chem 2014;406:6499-6512.
13. Bardelli A, Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet). *Cancer Cell* 2017;31:172-179.
14. Chaudhuri AA, Binkley MS, Osmundson EC, Alizadeh AA, Diehn M. Predicting radiotherapy responses and treatment outcomes through analysis of circulating tumor DNA. *Semin Radiat Oncol* 2015;25:305-312.
15. Han X, Wang J, Sun Y. Circulating tumor DNA as biomarkers for cancer detection. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2017;15:59-72.
16. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016;27:1386-1422.
17. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
18. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D68-D73.
19. miRBase: the microRNA database. Release 22 [Internet]. Manchester: Griffiths-Jones lab, 2018 Mar 12 [Cited 2018 Mar 12]. Available from: <http://www.mirbase.org/>
20. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
21. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
22. Singh R, Ramasubramanian B, Kanji S, Chakraborty AR, Haque SJ, Chakravarti A. Circulating microRNAs in cancer: hope or hype? *Cancer Lett* 2016;381:113-121.
23. Gabali A, Bluth MH. Molecular diagnosis of hematopoietic neoplasms. In: Richard A. McPherson, ed. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. St. Louis: Elsevier, 2016:1465-1491.
24. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774-779.
25. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-650.
26. Park KU, Lee HE, Park DJ, et al. MYC quantitation in cell-free plasma DNA by real-time PCR for gastric cancer diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:530-536.
27. Kolesnikova EV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, et al. Circulating DNA in the blood of gastric cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:226-231.
28. Hamakawa T, Kukita Y, Kurokawa Y, et al. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA. *Br J Cancer* 2015;112:352-356.
29. Fang WL, Lan YT, Huang KH, et al. Clinical significance of circulating plasma DNA in gastric cancer. *Int J Cancer* 2016;138:2974-2983.
30. Park KU, Lee HE, Nam SK, et al. The quantification of HER2 and MYC gene fragments in cell-free plasma as putative biomarkers for gastric cancer diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1033-1040.
31. Shoda K, Ichikawa D, Fujita Y, et al. Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2017;20:126-135.
32. Gao Y, Zhang K, Xi H, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor DNA in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8:6330-6340.
33. Rostami A, Bratman SV. Utilizing circulating tumour DNA in radiation oncology. *Radiother Oncol* 2017;124:357-364.
34. Kim K, Shin DG, Park MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res* 2014;86:136-142.
35. Huang Z, Zhu D, Wu L, et al. Six serum-based miRNAs as potential diagnostic biomarkers for gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26:188-196.
36. Zhang C, Zhang CD, Ma MH, Dai DQ. Three-microRNA signature identified by bioinformatics analysis predicts prognosis of gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2018;24:1206-1215.
37. Song B, Lin HX, Dong LL, Ma JJ, Jiang ZG. MicroRNA-338 inhibits proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:1290-1296.
38. Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2010;11:136-146.
39. Javanmardi S, Aghamaali MR, Abolmaali SS, Mohammadi S, Tamaddon AM. miR-, an oncogenic target miRNA for cancer therapy: molecular mechanisms and recent advancements in chemo and radio-resistance. *Curr Gene Ther* 2017;16:375-389.
40. Sekar D, Krishnan R, Thirugnanasambantham K, Rajasekaran B, Islam VI, Sekar P. Significance of microRNA 21 in gastric cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2016;40:538-545.
41. Wang Y, Zhou LB, Li XH. S100A4 expression and prognosis of gastric cancer: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2014;13:10398-10403.
42. Ling Z, Li R. Clinicopathological and prognostic value of S100A4 expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Markers* 2014;29:e99-e111.
43. Arita T, Ichikawa D, Konishi H, et al. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2013;33:3185-3193.
44. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014;20:548-554.
45. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10:704-714.
46. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev*

- Genet 2005;6:109-118.
47. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:299-307.
48. Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359:926-930.
49. Creemers A, Krausz S, Strijker M, et al. Clinical value of ctDNA in upper-GI cancers: a systematic review and meta-analysis. *Biochim Biophys Acta* 2017;1868:394-403.
50. Lowes LE, Bratman SV, Dittamore R, et al. Circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) workshop 2016: scientific opportunities and logistics for cancer clinical trial incorporation. *Int J Mol Sci* 2016;17:E1505.