

粪便 miRNA 标志物在结直肠癌筛选和诊断中的应用研究进展

连戴政, 刘雅洁

(北京大学深圳医院, 广东 深圳 518020)

摘要: 结直肠癌是一个受多种因素影响的病理过程, 缺乏理想的无创诊断方法。结直肠癌患者死亡率偏高的主要原因之一是中晚期才表现出临床症状, 因此, 临床上急需可靠的用于结直肠癌筛选和诊断的生物标志物。MicroRNAs 是一类小分子非编码 RNA, 在肿瘤的发生、转移等机制中具有重要作用。随着检测技术的发展, 粪便 microRNA 作为无创分子生物标志物得到深入的研究, 并用于结直肠癌的筛选和诊断。全文对粪便 miRNA 在结直肠癌筛选和诊断中的应用及检测进展作一综述, 重点介绍可用于结直肠癌早期诊断的 miRNA。

主题词: 结直肠肿瘤; 筛选; 诊断; 粪便; miRNA

中图分类号: R735.3⁵; R735.3⁷ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)04-0310-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B005

Application of Stool miRNA Markers in Screening and Diagnosis of Colorectal Cancer

LIAN Dai-zheng, LIU Ya-jie

(Shenzhen Hospital of Peking University, Shenzhen 518020, China)

Abstract: Colorectal cancer is a pathological process that is affected by many factors, and there is lack of ideal noninvasive methods for early detection and diagnosis of colorectal cancer. MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs which play important roles in the tumorigenesis, progression and metastasis of cancers. Over the past decade, stool microRNAs as non-invasive molecular biomarkers have been extensively studied and used for the screening and diagnosis of colorectal cancer. This article reviews the recent progress in the application of stool miRNAs for detection and diagnosis of colorectal cancer, focusing on miRNAs which can be used for screening of colorectal cancer.

Subject words: colorectal cancer; screening; diagnosis; stool; miRNAs

在全球, 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是继肺癌和乳腺癌之后的第三大常见恶性肿瘤, 尤其是在发达国家。据估计, CRC 的患病率和死亡率分别高达 120 万例/年和 60 万例/年^[1]。在中国、新加坡、韩国和日本等亚洲国家, CRC 的发病率也表现出快速增长趋势^[2]。病情进展快和临床表现晚是导致 CRC 患者死亡率偏高的两大根本原因。如果能在疾

病早期得到诊断, 95% 的 CRC 患者将从治愈性手术中获益, 因此, 早期发现具有 CRC 高风险的结直肠腺瘤是降低 CRC 死亡率的关键。然而, 目前的筛查方法的准确性有限, 并且难以辨别出不会进展至 CRC 的腺瘤^[3]。结肠镜检查是现有的诊断结肠直肠癌的金标准, 但由于结肠镜检查的高成本和侵入性, 在人口筛查中受到限制^[4]。粪便是最易取的无创的筛查和早期诊断癌症材料。基于愈创木脂的粪便隐血试验是最常用的测试, 但是这种测试的敏感性和特异性相对较差^[5]。基于人口研究的报告显示, 大便隐血试验的敏感性约为 24%~86%, 但在腺瘤和

基金项目: 深圳市卫生计生系统科研项目(201506001)

通信作者: 刘雅洁, 主任, 主任医师, 教授, 博士; 北京大学深圳医院肿瘤放疗科, 广东省深圳市福田区莲花路 1120 号(518020); E-mail: Anthea1966@163.com

收稿日期: 2018-04-15; **修回日期:** 2018-07-16

CRC 极早期阶段,其结果常常是模棱两可的^[6]。粪便 DNA 检测,诸如 DNA 突变、DNA 完整性、癌症相关甲基化分析,虽然是无创性的,敏感度和特异性也较理想,但因操作复杂、费时、检测成本偏高而限制了推广^[7]。然而,miRNA 的生物学意义及相对稳定的性质使其成为从粪便中寻找生物标志物的有吸引力的靶标。现对粪便 miRNA 生物标记物在 CRC 患者筛选和诊断中的应用作一综述。

1 miRNA

miRNA 是一类由 21~25 个核苷酸组成的非编码 RNA,能够在转录后调节基因表达并介导各种肿瘤生物学机制^[8-10]。以往的 mRNA 与 miRNA 互补性鉴定结果显示 miRNA 可能调节高达 30% 的人类基因组,表明 miRNA 是生物学过程中重要的潜在调节剂,并证实癌症等疾病与其表达异常相关^[11]。一些 miRNA 在肿瘤的进展过程中可以充当肿瘤促进剂和/或肿瘤抑制剂,其表达异常会引起癌症的发生^[12]、侵袭、转移^[13]、血管新生^[14]以及耐药性^[15]。

CRC 患者从息肉或良性腺瘤发展到恶性肿瘤,与 Wnt/ β -catenin、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β ,TGF- β)等关键信号通路上的 miRNA 表达变化息息相关^[1]。据报道,在 CRC 中,miR-552 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路直接靶向 DACH1 来促进肿瘤细胞增殖和迁移^[16]。miR-150 介导 Wnt/ β -catenin 和 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein,CREB)信号通路之间的串扰,其过表达导致上皮间充质转化并可促进 CRC 细胞的侵袭与转移^[17]。miR-4775 通过 Smad7/TGF- β 介导的上皮间质转化,促进 CRC 细胞侵袭转移^[18]。miR-545 则能通过上调 EGFR 的表达,介导 CRC 细胞增殖^[19]。Alam 等^[20]还报道,miR-375 通过抑制 EGFR 信号通路,调控结肠癌细胞增殖和侵袭。以上说明,miR-552、miR-150、miR-4775 和 miR-545 等各种 miRNA 的表达异常可能会通过影响信号通路,参与肿瘤细胞的生长、增殖和转移。

值得注意的是,与成千上万个已知的 mRNA 相比较,需要鉴定的 miRNA 数量(约 700 个)是相对较少的,因此,获得 miRNA 整体表达情况是相对简单

的。此外,miRNA 的小尺寸和茎环结构使得这些分子较 mRNA 更不容易被 RNA 酶降解,所以,粪便中的 miRNA 是保守并易于检测的^[21]。

2 粪便 miRNA 检测

Ahmed 等^[22]证实结肠癌患者粪便中的 miR-7、miR-17、miR-20a、miR-21 表达增加,miR-9、miR-29b、miR-138 和 miR-143 表达减少。Hu 等^[23]报道,早期 CRC 患者粪便中的 miR-221 表达上调,可能参与疾病的发生发展,提示粪便 miR-221 有可能成为诊断早期 CRC 的无创标志物。Zhu 等^[24]对以往资料进行回顾性分析,以判断 miRNA 水平的变化是否可用作筛查和诊断 CRC 的无创生物标志物。他们通过分析发现,采用粪便 miR-29a 和 miR-224 诊断 CRC 的 AUC 分别为 0.777 (灵敏度 85%,特异性 61%)和 0.745(灵敏度 75%,特异性 63%),表明它们是潜在的筛查和诊断 CRC 的无创生物标志物。Wu 等^[25]发现与正常对照者比较,CRC 患者的粪便 miR-21 和 miR-92a 水平明显升高,尤其是在粪便 RNA 临界值为 435 拷贝/ng 时,miR-92a 的敏感度可达 71.6%,特异性达 73.3%,证实粪便 miRNA 是一种稳定的、具有高重复性的检测方法。在 Ghanbari 等^[26]的研究中,受试者工作特征曲线分析表明,采用粪便 let-7f 表达水平区分 CRC 患者和健康受试者,具有较好敏感性和特异度。如果该结果在更大样本量的患者中得以证实,在 CRC 患者中低表达的 let-7a-5p 和 let-7f-5p miRNA 具有作为 CRC 早期检测无创分子生物标志物的潜能。Koga 等^[27]采用 RT-qPCR 技术对从 CRC 患者粪便中脱落的结肠细胞的 hsa-miR-17、hsa-miR-18a、hsa-miR-19a、hsa-miR-19b、hsa-miR-20a、hsa-miR-92a、hsa-miR-21、hsa-miR-135a 和 hsa-miR-135b 表达进行了分析,发现直肠癌患者粪便中的 miR-17 簇(灵敏度 69.5%,特异性 81.5%)和 miR-135(灵敏度 46.2%,特异性 95%)明显高于对照者。与近端结肠癌相比,似乎 miR-17-92 簇更有效地检测远端结肠癌,在远端和近端结肠癌的检测中,miR-17-92 表达的敏感性分别为 81.5%和 52.9%;远端和近端结肠癌患者粪便中的 miR-221 和 miR-18a 的表达却无明显的差异^[28]。

Li 等^[29]对粪便 mRNA-21 用于 CRC 诊断的文献

进行 Meta 分析,发现汇总灵敏度欠佳,但特异性好,而多个 miRNA 联合诊断 CRC 能够降低误诊率。Chang 等^[30]在检测互补效应后,联合分析 CRC 患者粪便中的 miR-223 和 miR-92a,最高灵敏度为 96.8%,特异性为 75.0% (AUC=0.907),提示联合检测粪便 miRNA 标志物,有助于提高 CRC 检测的灵敏度。Koga 等^[31]观察了免疫化学粪便隐血试验联合粪便 microRNA 测试诊断 CRC 的效果,采用 miR-106a 检测 CRC 的敏感度和特异性分别为 34.2% 和 97.2%,而免疫化学粪便隐血试验的敏感度和特异性分别为 60.7% 和 98.1%,两种方法联合检测的总体灵敏度和特异性可达到 70.9% 和 96.3%,提示对于免疫化学粪便隐血试验中假阴性结直肠癌患者而言,粪便 miR-106a 是一个有用的筛选指标。

粪便 miRNA 检测效果较少受粪便中隐血、是否使用抗生素等因素的影响。Phua 等^[32]报道,miR-451、miR-223 和 miR-135b 在人体血液中均存在,尤其是 miR-451 和 miR-223 的含量丰富。即使是粪便中的血红蛋白浓度低至 0.1mg/g 粪便,粪便中的 miR-451 水平也显著提高,但 miR-223 的水平不受影响,直至粪便中的血红蛋白浓度增加至 10mg/g 粪便。与此相反,粪便中的 miR-135b 水平不受血红蛋白浓度影响。在 Yau 等^[28]的研究中,26 例 CRC 患者在粪便采集前 1 个月内服用了抗生素,而剩余的 162 例 CRC 患者未服用,结果显示,粪便中 miR-221 和 miR-18a 表达在有或无抗生素摄入组之间差异无统计学意义。

3 分析方法

现有的粪便 miRNA 的检测方法包括定量实时逆转录 PCR、基于 Taqman 的微阵列和深度测序技术,这些方法各具特色。

3.1 逆转录 PCR

定量实时逆转录 PCR (qRT-PCR) 是用于基因差异表达分析的便捷、可靠方法,并且是非常敏感的和靶特异性的。尽管 qRT-PCR 分析在生物学上和技术上的有一定的限制,使得其在临床上的应用受到制约,但在临床实验室中,操作相对容易,价格便宜而且数据容易分析,常用于 CRC 患者粪便 miRNA 检测^[35-37]。

3.2 微阵列技术

基于 Taqman 的微阵列在 miRNA 分析中十分常用。茎环引物扩展了 miRNA 序列的长度,使其更容易被 Real-Time PCR 检测到。此外,这些引物降低了检测基因组 DNA 或前体 miRNA 的可能性,增强了 miRNA-引物复合物的稳定性,从而提高了效率和测定灵敏度^[38]。微阵列虽然能够提供 miRNA 的整体表达情况,且实验成本较小,但在用于差异表达的检测时,有可能缺乏特异性,不能够较好地呈现 miRNA 表达细节^[39]。

3.3 深度测序技术

深度测序技术是一系列从核酸样本中产生大量序列数据的技术,正在迅速取代微阵列,成为量化和注释 miRNAs 的首选技术。深度测序能够捕捉到整个转录的规模和复杂性^[40]。短读取深度测序尤其适合于 miRNA,因为可以用一个读数即可测序完整的 miRNA。微阵列设计依赖于正在研究的 miRNA 的先前信息,但深度测序允许发现新的 miRNA。此外,微阵列方法缺乏检测和定量低丰度转录的动态范围,但深测序可以识别出低于微阵列检测阈值水平的 miRNA。此外,深度测序消除了微阵列中交叉杂交造成的背景问题,从而有利于信号的解读,避免了微阵列所需的非线性数据操作步骤。因此,将深度测序应用于 miRNA 分析,有可能发现新的 miRNAs,并检测出罕见但功能显著的 miRNA 的表达^[41]。

3.4 下一代测序技术

近年来,下一代测序(next generation sequencing, NGS) 技术被逐渐引入数字基因表达谱分析中^[42,43]。该技术阅读长度短,覆盖率高,尤其适合计算 miRNA 和计算差异表达。与公认的定量转录金标准 qPCR 比较,HTS 提供了全基因组方法,并且克服了基于阵列的分析的局限性^[44]。

4 展望

癌症是致命的疾病之一,肿瘤学家最棘手的问题是癌症的筛查和早期追踪。MicroRNA 是所有类型恶性肿瘤中研究最为深入的非编码 RNA,结直肠癌也不例外。迄今为止,一些研究描述了 miRNA 在 CRC 的无创检测中的应用,并发现它们在 CRC 患者和健康对照者粪便中的表达存在差异。但许多有关

CRC 患者粪便 miRNA 检测的研究是回顾性的,仅涉及小样本量人群,且未考虑临床分期和可重复性,所以难以准确预测疾病进展。然而,在临床引入粪便 miRNA 作为 CRC 筛选和诊断生物标志物之前,仍有需要重要的问题需要落实。例如,需要更多的样本,更多的前瞻性临床试验和更长期的评估来验证这些小样本量结果;考察不同的粪便 miRNA 联合检测,以提高 CRC 检测的特异性和敏感性;建立可靠的、标准化粪便 miRNA 检测方法,以减少不同个体之间的变异对结果的影响。总之,在临床上广泛推广粪便 miRNA 作为 CRC 的筛选诊断生物标志物仍有许多研究工作亟待开展。

参考文献:

- [1] Shirafkan N, Mansoori B, Mohammadi A, et al. MicroRNAs as novel biomarkers for colorectal cancer: new outlooks[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 1319–1330.
- [2] Moghimi-Dehkordi B, Safaee A. An overview of colorectal cancer survival rates and prognosis in Asia [J]. World J Gastrointest Oncol, 2012, 4(4): 71–75.
- [3] Hoff G, Dornitz JA. Contrasting US and European approaches to colorectal cancer screening: which is best?[J]. Gut, 2010, 59(3): 407–414.
- [4] Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, et al. American college of gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening[J]. Am J Gastroenterol, 2009, 104: 739–750.
- [5] Corté H, Manceau G, Blons H, et al. MicroRNA and colorectal cancer[J]. Digestive and Liver Disease, 2012, 195–200.
- [6] Xie YH, Gao QY, Cai GX, et al. Fecal clostridium symbiosum for noninvasive detection of early and advanced colorectal cancer: test and validation studies [J]. Engl Biomedicine, 2017, 25: 32–40.
- [7] Xuan Y, Yang HL, Zhao LJ, et al. MicroRNAs in colorectal cancer: small molecules with big functions [J]. Cancer Lett, 2015, 360: 89–105.
- [8] Moretti F, D'Antona P, Finardi E, et al. Systematic review and critique of circulating miRNAs as biomarkers of stage I – II non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(55): 94980–94996.
- [9] Karmakar S, Kaushik G, Nimmakayala R, et al. MicroRNA regulation of K-Ras in pancreatic cancer and opportunities for therapeutic intervention [J]. Semin Cancer Biol, 2017, pii: S104–579X(17)30234–1.
- [10] Awasthi R, Rathbone MJ, Hansbro PM, et al. Therapeutic prospects of microRNAs in cancer treatment through nanotechnology[J]. Drug Deliv Transl Res, 2018, 8(1): 97–110.
- [11] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120: 15–20.
- [12] Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, et al. A panel of methylated microRNA biomarkers for identifying high-risk patients with ulcerative colitis-associated colorectal cancer [J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1634–1646.
- [13] Park YR, Kim SL, Lee MR, et al. MicroRNA-30a-5p(miR-30a) regulates cell motility and EMT by directly targeting oncogenic TM4SF1 in colorectal cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(10): 1915–1927.
- [14] Oliveira RC, Ivanovic RF, Leite KRM, et al. Expression of micro-RNAs and genes related to angiogenesis in ccRCC and associations with tumor characteristic [J]. BMC Urol, 2017, 17(1): 113.
- [15] Nijhuis A, Thompson H, Adam J, et al. Remodelling of microRNAs in colorectal cancer by hypoxia alters metabolism profiles and 5-fluorouracil resistance [J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(8): 1552–1564.
- [16] Cao J, Yan XR, Liu T, et al. MicroRNA-552 promotes tumor cell proliferation and migration by directly targeting DACH1 via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3): 3795–3802.
- [17] Guo Y, Wang L, Li B, et al. Wnt/ β -catenin pathway transactivates microRNA-150 that promotes EMT of colorectal cancer cells by suppressing CREB signaling [J]. Oncotarget, 2016, 7: 42513.
- [18] Zhao S, Sun H, Jiang W, et al. miR-4775 promotes colorectal cancer invasion and metastasis via the Smad7/TGF β -mediated epithelial to mesenchymal transition [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 12.
- [19] Huang X, Lu S. MicroR-545 mediates colorectal cancer cells proliferation through up-regulating epidermal growth factor receptor expression in HOTAIR long non-coding RNA dependent [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 431 (1–2): 45–54.
- [20] Alam KJ, Mo JS, Han SH, et al. MicroRNA 375 regulates proliferation and migration of colon cancer cells by suppressing the CTGF-EGFR signaling pathway[J]. Int J Cancer, 2017, 141(8): 1614–1629.
- [21] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 10513–10518.
- [22] Ahmed FE, Ahmed NC, Vos PW, et al. Diagnostic mi-

- croRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. proof of principle [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2013, 10: 93–113.
- [23] Hu JJ, Zeng L, Li KX, et al. The importance of microRNA-221 in stool for diagnosis early colorectal cancer[J]. *Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2016, 26(22): 25–27. [胡晶晶, 曾理, 李开学, 等. 粪便 microRNA-221 对早期结直肠癌检出的意义 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2016, 26(22): 25–27.]
- [24] Zhu YX, Xu AD, Li JM, et al. Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(2): 259–264.
- [25] Wu CW, Ng Simon SM, Dong Y, et al. Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps [J]. *Gut*, 2012, 61(5): 739–745.
- [26] Ghanbari R, Mosakhani N, Sarhadi VK, et al. Simultaneous underexpression of let-7a-5p and let-7f-5p microRNAs in Plasma and Stool Samples from Early Stage Colorectal Carcinoma[J]. *Biomark Cancer*, 2016, 7(Suppl 1): 39–48.
- [27] Koga Y, Yasungaga M, Takahashi A, et al. MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(11): 1435–1442.
- [28] Yau TO, Wu CW, Dong Y, et al. microRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111, 1765–1771.
- [29] Li Y, Zhen CH, Huang K, et al. Evaluation of microRNA-21 expression in serum and stool as a potential biomarker for diagnosis of colorectal cancer: a meta-analysis [J]. *Lingnan Modern Clinics in Surgery*, 2016, 16(5): 546–552. [李阳, 甄潮辉, 黄楷, 等. MicroRNA-21 对结直肠癌诊断价值的 Meta 分析 [J]. *岭南现代临床外科*, 2016, 16(5): 546–552.]
- [30] Chang PY, Chen CC, Chang YS, et al. MicroRNA-223 and microRNA-92a in stool and plasma samples act as complementary biomarkers to increase colorectal cancer detection[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10663–10675.
- [31] Koga Y, Yamazaki N, Yamamoto Y, et al. Fecal miR-106a is a useful marker for colorectal cancer patients with false-negative results in immunochemical fecal occult blood test[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013, 22(10): 1844–1852.
- [32] Phua LC, Chue XP, Koh PK, et al. Global fecal microRNA profiling in the identification of biomarkers for colorectal cancer screening among Asians[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32: 97–104.
- [33] Tong L, Xue H, Xiong L, et al. Improved RT-PCR Assay to Quantitate the Pri-, Pre-, and Mature microRNAs with Higher Efficiency and Accuracy[J]. *Mol Biotechnol*, 2015, 57(10): 939–946.
- [34] Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, et al. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: e43.
- [35] Planell-Saguer MD, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46: 869–878.
- [36] Rotelli MT, Di Lena M, Cavallini A, et al. Fecal microRNA profile in patients with colorectal carcinoma before and after curative surgery[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2015, 30(7): 891–898.
- [37] Ahmed FE, Ahmed NC, Vos PW, et al. Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. Proof of principle[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2013, 10(3): 93–113.
- [38] Guerau-de-Arellano M, Alder H, Ozer HG, et al. miRNA profiling for biomarker discovery in multiple sclerosis: from microarray to deep sequencing[J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 248: 32–39.
- [39] Stokowy T, Eszlinger M, Swierniak M, et al. Analysis options for high-throughput sequencing in miRNA expression profiling[J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 1–12.
- [40] Costa V, Angelini C, De Feis I, Ciccociola A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 853916.
- [41] Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, et al. Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106314.
- [42] Jiang JL, Mao MG, Lü HQ, et al. Digital gene expression analysis of *Takifugu rubripes* brain after acute hypoxia exposure using next-generation sequencing [J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2017, 24: 12–18.
- [43] Matsumura H, Yoshida K, Luo S, et al. High-throughput Super SAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12010.
- [44] Stokowy T, Eszlinger M, Swierniak M, et al. Analysis options for high-throughput sequencing in miRNA expression profiling[J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 1–12.