Larenks Yassı Hücreli Karsinoma Hep-2 hücre Hattında mir-1825'in Fonksiyonel Rolünün Araştırılması

Investigation of the Functional Role of mir-1825 in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Hep-2 Cell Line

Esra Güzel Tanoğlu
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ: *Larenks yassı hücreli karsinoma, dünyada en sık tanısı konan baş boyun kanserlerindendir. Larenks yassı hücreli karsinoma'nın son yıllardaki insidansının artışı, bu kanserin tanısında erken ve etkili biyobelirteç ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır. mikroRNA'ların kanser progresyonunda önemli rolleri bulunmaktadır. Bu çalışmada mir-1825'in larenks yassı hücreli karsinoma hücre hattı olan Hep-2'de fonksiyonel rolünün araştırılmasını amaçladık.*

YÖNTEM ve GEREÇLER: *Çalışma kapsamında; Hep-2 hücre hattında inhibitör mir-1825'in transfeksiyon etkinliği Kantitatif Realtime PCR ile doğrulandı. Hep-2 hücrelerinin proliferasyon, migrasyon etkileri Xcelligence RTCA cihazı ile, invazyon kapasiteleri Matrigel yöntemi ile, apoptoz düzeyleri ise caspase-3 seviyelerinin değişimleri ile gerçekleştirildi.*

BULGULAR: *Çalışmalar neticesinde mir-1825'in Hep-2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası hücrelerin proliferasyon ($p<0,05$), migrasyon ($p<0,05$) ve invazyon ($p<0.001$) düzeylerinin kontrol miRNA transfekte edilen hücrelere göre azaldığı, mir-1825'in apoptozu ise indüklediği tespit edildi ($p<0,01$).*

TARTIŞMA ve SONUÇ: *Larenks yassı hücreli karsinoma Hep-2 hücre hatlarında miR-1825'in proliferasyon, migrasyon, invasyon seviyelerini azalttığı ve apoptozu indüklediği in vitro deneylerle literatürde ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir.*

Anahtar Kelimeler: *larinks yassı hücreli karsinoma, mikroRNA, mir-1825, biyobelirteç*

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Laryngeal cancer (LCa) is one of the most commonly diagnosed head and neck cancers in the world. The increase in the incidence of LCa in recent years reveals the need for an early and effective biomarker in the diagnosis of LCa cancer. In this study, we aimed to investigate the functional role of mir-1825 in Hep-2, the LCa cell line.*

METHODS: *In the study, transfection efficiency of inhibitor mir-1825 in Hep-2 cell line was confirmed by Realtime PCR. Proliferation and migration effects of Hep-2 cells were performed with Xcelligence RTCA device, invasion capacity was performed by matrigel method, and apoptosis levels were measured by changes in caspase-3 levels.*

RESULTS: *As a result of the studies, it was determined that the proliferation ($p<0,05$), migration ($p<0,05$) and invasion ($p<0.001$) levels of the cells after transfection of mir-1825 into Hep-2 cells decreased compared to the control miRNA transfected cells, while mir-1825 induced apoptosis ($p<0,01$).*

DISCUSSION AND CONCLUSION: *Our study have been shown that miR-1825 reduces proliferation migration invasion levels and induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cell lines for the first time in the literature.*

Keywords: *laryngeal squamous cell carcinoma, microRNA, mir-1825, biomarker*

İletişim / Correspondence:
Dr.Öğr.Üyesi Esra Güzel Tanoğlu
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: esra.guzel@sbu.edu.tr
Başvuru Tarihi: 02.11.2020
Kabul Tarihi: 08.03.2021

GİRİŞ

Larenks yassı hücreli karsinoma, dünyada en sık tanısı konan baş boyun kanserlerinden olup agresif seyirli bir tümördür (1,2). Larenks yassı hücreli karsinoma için uygulanan tedaviler arasında cerrahi yaklaşım, kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları yer almasına rağmen yüksek ölüm oranları hala varlığını devam ettirmektedir. Larenks yassı hücreli karsinomalı hastalarda yüksek oranda metastaz ve sık nüks gelişimine rastlanmakta ve bu durumlar kötü klinik seyire yol açmaktadırlar (3). Tedavi seçeneklerinin sınırlı başarıya sahip olması nedeniyle yassı hücreli karsinomanıin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve kanseri erken dönem tanıyabilme potansiyeline sahip biyomarkırların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

MikroRNA'lar (miRNA), yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda endojen olarak sentezlenen, tek zincirli kısa ribonükleik asitlerdir (4). Kanser araştırmalarında popüler konulardan olan miRNA'ların deregülasyonun larenks yassı hücreli karsinoma dahil birçok hastalıkların patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (5-7). miRNA'lar hedefledikleri genlerin rollerine bağlı olarak onkogen ya da tümör süpresör olarak işlev görmektedirler (8). Örneğin miR-423-3p, Hep-2 hücrelerinde onkolojik role sahip olduğu gösterilen miRNA'lardandır (10). miR-21'in de larenks tümör dokularında onkojenik davrandığı ve Hep-2 hücrelerinin proliferasyonunun ve hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonuna yol açtığı bilinmektedir (9). Benzer şekilde mir-1825 tümör onkojeni olarak rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (11) fakat larenks yassı hücreli karsinomadaki fonksiyonel rolünün araştırılması ilk kez tarafımızdan bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Mir-1825'in olgun dizisi 5'-UCCAGUGCCCUCCUCUCC-3''dür (12). Mir-1825'in hedeflediği genler arasında larinks yassı hücreli karsinoma gelişiminden sorumlu olduğu bilinen; squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3 (SART3), SID1 transmembrane family, member 2 (SIDT2), myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL), large tumor suppressor kinase 1 (LATS1) genleri yer almaktadır (13,14).

Son yıllarda miRNA'ların proliferasyon, migrasyon, invazyon gibi karsinogenezdeki rolü üzerine bir çok çalışma mevcuttur (15-17). Bununla birlikte, miRNA'ların larenks karsinogenezi sürecindeki rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada amacımız, larenks yassı hücreli karsinomada daha önceki mikrodizi çalışmalarında deregülasyona uğradığı tanımlanmış olan (18) mir-1825'in larenks yassı hücreli karsinoma Hep-2 hücre hatlarında fonksiyonel rolünü incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız hayvan veya insan deneylerini içermediği ve bir hücre hattı çalışması olduğu için etik onay gerektirmemektedir.

Hücre hattı ve hücre kültürü

İnsan larenks yassı hücreli karsinoma hücre hattı Hep-2, American Type Culture Collection (ABD) tarafından sağlandı. Hücreler %10 fetal buzağı serumu (Invitrogen), 1% penisilin ve 100 U/mL streptomisin ilavesiyle hazırlanan RPMI 1640 ortamında (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD), %5 CO2'de 37°C'de etüvde kültüre edildi.

MiRNA Transfeksiyonu ve Hücre Canlılığı

Çoğalma deneyleri, 37°C'de ve %5 CO2'de nem üretebilen bir inkübatörlü bir Xcelligence RTCA (Roche Applied Science, Basel, İsviçre) sSistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Hep-2 hücreleri e-platelere kuyucuk başına 15x103 hücre düşecek şekilde üç tekrarlı olarak ekildi. siRNA tranfection reagent karışımıyla muamele edilen inhibitör mir-1825 ve kcontrol miRNA (non-targeting miRNA) hücrelere transfekte edildikten sonra üç gün süreyle ve XCELLigence'ta 15 dakikada bir ölçüm alınarak hücrelerin proliferasyon değişimlerine ait veriler elde edildi. Hücrelere mir-1825'in transfeksiyon başarısını test etmek için "Taqman Reverse Transcriptase Kit" kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre qRT-PCR ile doğrulama işlemi yapıldı.

Migrasyon Assay

Mir-1825 ile muamele edilen ve kontrol miRNA'ların transfekte edildiği hücrelerin invazyon değişimleri XCELLigence RTCA sistemine ait olan CIM plate kuyucuklarında gerçekleştirildi. FBS içermeyen medyum ile 15.000'er hücre karışımı eklenerek gerçekleştirildi. Hücreler plate yüzeyinin altında bulunan FBS'li medyuma göç potansiyelleri 24 saat boyunca cihaz yardımıyla ölçüldü. Böylece miRNA'ların kanser hücreleri üzerinde invazyon potansiyellerine olan etkileri tespit edildi.

İnvazyon Assay

mir-1825 için insertler (Corning Transwell, Life Sciences, ABD) kullanılarak migrasyon etkileri Hep-2 hücre hatlarında çalışıldı. 1:5 oranında hazırlanan matrigel (Corning® Matrigel® Matrix,

Life Sciences, ABD) -Tris HCl karışımı insertlere 500 µl olacak şekilde eklenerek 4 saat 37°C'de inkübe edildi. mir-1825 ve kontrol miRNA transfekte edilen hücreler insert başına 300.000 olacak şekilde ekildi, insertlerin alt yüzeyine FBS'li medyum konarak 24 saat boyunca hücrelerin göç ve invazyon potansiyellerini öğrenmek için hücreler inkübatörde bekletildi. Ertesi gün insertlerin alt yüzeyine geçen hücrelerin fiksasyonu için %100 metanolde 5 dakika bekletildi. Boyama işlemi için insertlere kristal viyole (%0,01), etanol (%10) ve distile sudan oluşan karışım 20 dakika süresince muamele edildi. Ardından yıkama işlemleri için üç kez PBS ile muamele edildi. İnsertlerde görünen hücreler sayılarak analiz işlemi gerçekleştirildi.

Apoptoz Assay

mir-1825'in Hep-2 hücrelerindeki apoptotik seviye değişimlerinin tespiti "CaspACETM Assay System, Colorimetric (Promega)" kiti kullanılarak kaspaz assayi üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. miRNA transfekte edilen hücreler ile kontrol miRNA içeren Hep-2 hücrelerinin her biri iki tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere kuyucuk başına 3x103 hücre ekildi. Hücrelerin apoptotik düzeylerinin tespiti 405 nm'de abzorbans ölçümü Multiskan FC micro plate reader (Thermo, Rockford USA) ile gerçekleştirildi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler, log-dönüştürülmüş veriler üzerinde "iki taraflı Student's t testi" kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ± standart hata değerleri kullanılarak hata çubukları çizildi.

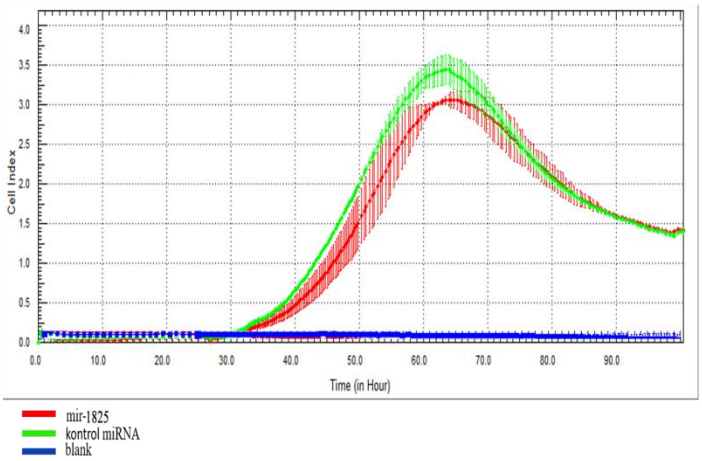
BULGULAR

Hep-2 hücrelerine miR-1825'in transfeksiyonunun başarısı qRT-PZR ile doğrulandı (p<0,01). mir-1825'in Hep-2 hücrelerindeki inhibitör etkinliğinin gösterilmesi için, proliferasyon migrasyon invasyon ve apoptoz assayler yapıldı.

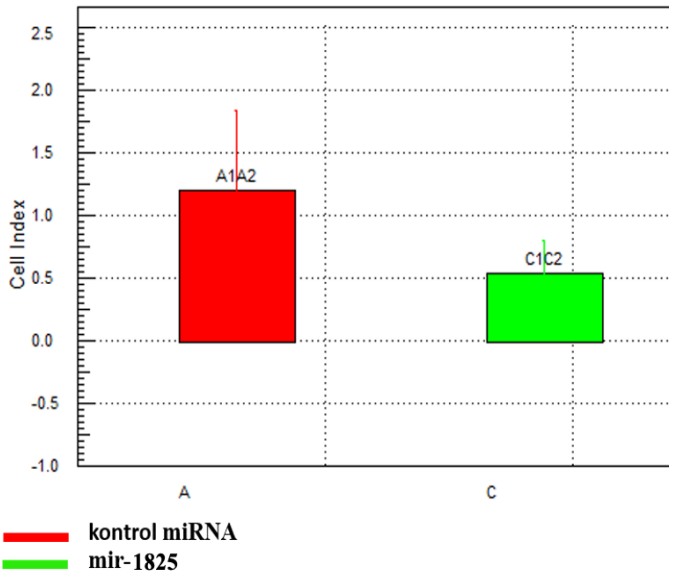
İnhibitör miR-1825 transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde Xcelligence RTCA ile yapılan proliferasyon assayleri sonucunda miR-1825'in transfekte edildiği Hep-2 hücrelerinde kontrol miRNA'ya göre proliferasyon hızında azalış gözlendi (Şekil 1, p<0,05).

Hücrelerin migrasyon kapasiteleri değerlendirmek için Xcelligence RTCA ile gerçekleştirilen deney sonucunda Hep-2 hücrelerine transfekte edilen miR-1825 ve kontrol miRNA sonrası, miR-1825 ile muamele edilen Hhep-2 hücrelerinde belirgin azalış olduğu saptanmıştır (Şekil 2, p<0,05).

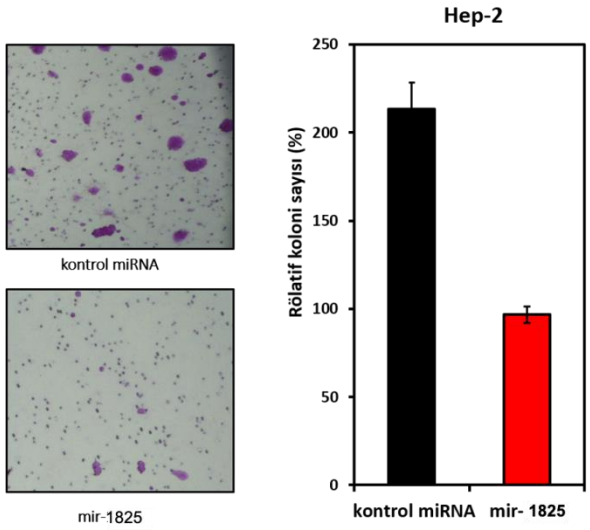
MiR-1825 transfekte edilen Hep-2 hücrelerinin invazyon oranlarında kontrol miRNA'ya göre belirgin azalma olduğu gözlendi (Şekil 3, p<0.001). Apoptoz assay deneyi hücrelerin Kaspaz-3 seviyelerinin ölçümüyle gerçekleştirildi. Çalışma neticesinde; mir-1825'in kontrol miRNA transfekte edilen Hep-2 hücrelerine göre artış gösterdiği belirlenerek mir-1825'in apoptotik süreçteki etkinliği gösterildi (Şekil 4, p<0,01).



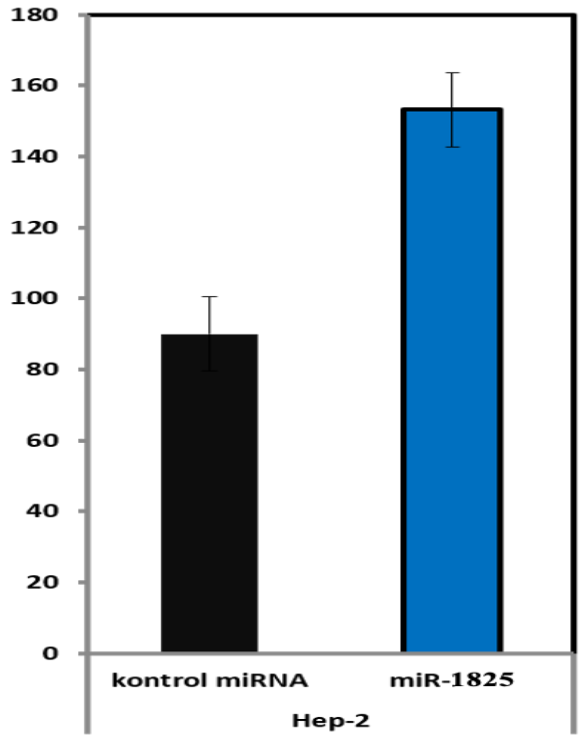
Şekil 1. mir-1825'nin Hep-2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası Hep-2 hücrelerinde azalan proliferasyon assay görüntüsü



Şekil 2. mir-1825'nin Hep-2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası Hep-2 hücrelerinde azalan migrasyon assay görüntüsü



Şekil 3. mir-1825'nin Hep-2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası Hep-2 hücrelerinde azalan invazyon assay görüntüsü



Şekil 4. mir-1825'in Hep-2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası Hep-2 hücrelerindeki relatif Kaspaz-3 seviyeleri ve transfeksiyon sonrası artan apoptoz assay görüntüsü

TARTIŞMA

Karataş ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınlanan makalesinde, larenks yassı hücreli karsinoma tanısı alan ve CD133+ ile CD133- olarak ayrıştırılan hasta doku örneklerinde mikroarray profillemesi yapılmış ve çalışmaları sonucunda mir-1825'in artan ekspresyon düzeyine sahip olduğunu bildirilmişlerdir (18). Bu veriden yola çıkarak biz de bu hücre hattı çalışmamızda, Hep-2 hücrelerinde mir-1825'in fonksiyonel analizlerini gerçekleştirdik. Sonuçlarımız doğrultusunda mir-1825'in larenks yassı hücreli karsinoma progresyonunda, proliferasyon, invasyon, migrasyon ve apoptoz süreçlerinde etkin rol oynadığını literatürde ilk kez göstermiş bulunuyoruz. Önceki çalışmalarda larenks kanserli hücrelerde onkojenik etkiye sahip miRNA'lardan miR-5000-3p'nin ekspresyonunun azalmasının, laringokarsinomda hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu baskıladığını göstermişlerdir (19). Başka bir çalışmada mir-93'ün ifade düzeyinin artışıyla larenks kanserinin indüklendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (20). Benzer şekilde miR-221 ekspresyonunun inhibisyonunun, larenks kanseri hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, hem apoptozu hem de hücre döngüsünün durdurulmasını indüklediği gösterilmiştir (21). mir-21 düzeyine sahip larenks kanserli hastaların kötü prognostik değerler gösterdiği, larenks kanseri diagnoz ve prognozunda aday biyomarkır olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (22).

Yapılan başka bir çalışmada, prostat kanserinde artan mir-1825 seviyesinin tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) sınıflandırmasında, tedavi etkilerinin değerlendirilmesinde aday biyomarkır olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (23). Aynı zamanda mir-1825'in benign prostat hiperplazi ile prostat kanserli hastaların saptanmasındaki duyarlılığı ve özgüllüğünün yüksek olduğu bildirilmiştir (24). Hepatoselüler karsinoma tanılı hastaların serumunda, aynı hastaların kanlarına göre mir-1825'in yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğu gösterilmiş ve mir-1825'in vasküler invazyon ve kanser immün gözetimini DUSP1, PD-L1 ve MUC1'in regülasyonunu sağlayarak düzenlediği rapor edilmiştir (25). Glioblastomalarda miR-1825 artan regülasyonunun hücre canlılığını, tümör büyümesini, invazyonunu ve migrasyonunu Wnt/β-catenin sinyal yolağını baskılayarak etkilediği gösterilmiştir (26). miR-1825'in glioma tanılı hastaların serumunda yapılan bir diğer çalışmada, mir-1825'in ekspresyonunun, sağlıklı kontrollere kıyasla glioma hastalarında önemli ölçüde azaldığı, yüksek miR-1825 ekspresyonuna sahip hastaların daha uzun hayatta kalma oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda mir-1825 in vitro deneylerinde glioma hücre hattında apoptoz, proliferasyon ve invazyon dahil olmak

üzere glioma gelişiminde rol oynadığı, mir-1825'in hücre proliferasyonunu ve invazyonu inhibe ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (11).

Kanserlerin yanısıra mir-1825'in bazı diğer kronik hastalıklarda da ekspresyon seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir. Örneğin, kronik konjestif kalp yetmezliği tanısı alan hastalarda sağlıklı gruba göre artış gösteren ekspresyona sahip olduğu bildirilmiştir (27). Amyotrofik lLateral skleroz geninde mutasyon tespit edilen hastaların serumlarında ise bir önceki verilerin tersi olarak mir-1825'in ekspresyon seviyesinin belirgin azalış gösterdiği rapor edilmiştir (28). Bir diğer çalışmada in vitro kültür sırasında 20q11.21 artış gösteren üç insan embriyonik kök hücre (hESC) hattında miR-1825'in olgunlaşmamış formunun mutant hücrelerdeki regülasyonunda artış olduğu bildirilmiştir (29). Larenks yassı hücreli karsinomanın tanı ve tedavisi için aday biyobelirteç olarak kullanılması için aday olarak sunulan mir-1825'in ileri moleküler çalışmalara, taze kanser doku örnekleri ve hayvan deneylerinde doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

SONUÇ:

Larenks yassı hücreli karsinoma Hep-2 hücre hatlarında miR-1825'in proliferasyon, migrasyon, invasyon seviyelerini azalttığı ve apoptozu indüklediği in vitro deneylerle literatürde ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1.Li M, Zhao X, Liu Y, An J, Xiao H, Wang C. Aberrant expression of CDK8 regulates the malignant phenotype and associated with poor prognosis in human laryngeal squamous cell carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2017;274(5):2205-13.

2. Yu D, Liu Y, Yang J, Jin C, Zhao X, Cheng J, et al. Clinical implications of BMI-1 in cancer stem cells of laryngeal carcinoma. Cell Biochem Biophys. 2015;71(1):261-9.

3. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020;70(3):145-64.

4. Guzel E, Okyay TM, Yalcinkaya B, Karacaoglu S, Gocmen M, Akcakuyu MH. Tumor suppressor and oncogenic role of long non-coding RNAs in cancer. North Clin Istanb. 2020;7(1):81-6.

5. Helferich AM, Brockmann SJ, Reinders J, Deshpande D, Holzmann K, Brenner D, et al. Dysregulation of a novel miR-1825/TBCB/TUBA4A pathway in sporadic and familial ALS. Cell Mol Life Sci. 2018;75(23):4301-19.

6. Yilmaz SS, Guzel E, Karatas OF, Yilmaz M, Creighton CJ, Ozen M. MiR-221 as a pre- and postoperative plasma biomarker for larynx cancer patients. Laryngoscope. 2015;125(12):E377-81.

7. Guzel E, Karatas OF, Semercioz A, Ekici S, Aykan S, Yentur S, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. Int J Cancer. 2015;136(4):875-9.

8. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. Eur J Cancer. 2007;43(10):1529-44.

9. Liu M, Wu H, Liu T, Li Y, Wang F, Wan H, et al. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. Cell Res. 2009;19(7):828-37.

10. Guan G, Zhang D, Zheng Y, Wen L, Yu D, Lu Y, et al. microRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(9):5683-91.

11. Xing W, Zeng C. A novel serum microRNA-based identification and classification biomarker of human glioma. Tumour Biol. 2017;39(5):1010428317705339.

12. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D155-D62.

13. Yang CW, Wang SF, Yang XL, Wang L, Niu L, Liu JX. Identification of gene expression models for laryngeal squamous cell carcinoma using co-expression network analysis. Medicine (Baltimore). 2018;97(7):e9738.

14. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. Nucleic Acids Res. 2020;48(D1):D127-D31.

15. Takeuchi T, Kawasaki H, Luce A, Cossu AM, Misso G, Scrima M, et al. Insight toward the MicroRNA Profiling of Laryngeal Cancers: Biological Role and Clinical Impact. Int J Mol Sci. 2020;21(10).

16. Tanoglu A, Balta AZ, Berber U, Ozdemir Y, Emirzeoglu L, Sayilir A, et al. MicroRNA expression profile in patients with stage II colorectal cancer: a Turkish referral center study. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(5):1851-5.

17. YalÇinkaya B, GÜzel E, TaŞtekİn D, PenÇe S. Role of Mir-33a, Mir-203b, Mir-361-3p, Mir-424 in Hepatocellular Carcinoma. Turk J Med Sci. 2020.

18. Karatas OF, Suer I, Yuceturk B, Yilmaz M, Oz B, Guven G, et al. Identification of microRNA profile specific to cancer stem-like cells directly isolated from human larynx cancer specimens. BMC Cancer. 2016;16(1):853.

19. Chen H, Ali M, Ruben A, Stelmakh D, Pak M. E2F6-Mediated Downregulation of MIR22HG Facilitates the Progression of Laryngocarcinoma by Targeting the miR-5000-3p/FBXW7 Axis. Mol Cell Biol. 2020;40(10).

20. Xiao X, Zhou L, Cao P, Gong H, Zhang Y. MicroRNA-93 regulates cyclin G2 expression and plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2015;46(1):161-74.
21. Sun X, Liu B, Zhao XD, Wang LY, Ji WY. MicroRNA-221 accelerates the proliferation of laryngeal cancer cell line Hep-2 by suppressing Apaf-1. Oncol Rep. 2015;33(3):1221-6.
22. Hu A, Huang JJ, Xu WH, Jin XJ, Li JP, Tang YJ, et al. miR-21 and miR-375 microRNAs as candidate diagnostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the larynx: association with patient survival. Am J Transl Res. 2014;6(5):604-13.
23. Guo X, Han T, Hu P, Zhu C, Wang Y, Chang S. Five microRNAs in serum as potential biomarkers for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention. Int Urol Nephrol. 2018;50(12):2193-200.
24. Haj-Ahmad TA, Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Potential Urinary miRNA Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients. J Cancer. 2014;5(3):182-91.
25. Pascut D, Krmac H, Gilardi F, Patti R, Calligaris R, Crocè LS, et al. A comparative characterization of the circulating miRNome in whole blood and serum of HCC patients. Sci Rep. 2019;9(1):8265.
26. Lu F, Li C, Sun Y, Jia T, Li N, Li H. Upregulation of miR-1825 inhibits the progression of glioblastoma by suppressing CDK14 though Wnt/β-catenin signaling pathway. World J Surg Oncol. 2020;18(1):147.
27. Cakmak HA, Coskunpinar E, Ikitimur B, Barman HA, Karadag B, Tiryakioglu NO, et al. The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study. J Cardiovasc Med (Hagerstown). 2015;16(6):431-7.
28. Freischmidt A, Müller K, Zondler L, Weydt P, Mayer B, von Arnim CA, et al. Serum microRNAs in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging. 2015;36(9):2660.e15-20.
29. Nguyen HT, Geens M, Mertzanidou A, Jacobs K, Heirman C, Breckpot K, et al. Gain of 20q11.21 in human embryonic stem cells improves cell survival by increased expression of Bcl-xL. Mol Hum Reprod. 2014;20(2):168-77.