

DU 145 İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinde Hsa-Mir-8072'nin Potansiyel Rolü

Potential Role of Hsa-Mir-8072 in Prostate Cancer DU 145 Cells

Şule AYLA^{1,5}, Cüneyd PARLAYAN^{2,5}, Nihal KARAKAŞ^{3,5}, Eda AÇIKGÖZ⁴
Gülperi ÖKTEM⁴

1. Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

2. Medipol Üniversitesi Doğa Bilimleri ve Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendislik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

3. Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

4. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

5. Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda, insan prostat kanser hücre hattı (DU145) ve prostat normal epitel hücre hatları (RWPE) arasında miRNA ifadesinin analizini yapmak ve kanser gelişiminde olası rolünü incelemeyi amaçladık.

Gereçler ve Yöntem: İnsan prostat epitel hücre hattı (RWPE) ve prostat kanseri hücre hatları (DU-145) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edildi. Hücre hatlarının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde RPMI 1640 besi ortamı kullanıldı. Transkriptom analizi için RNA izolasyonu yapılarak, kütüphane oluşturuldu, kütüphanenin kantitasyonunun ardından NextSeq500 (illumina) ile sekanslama yapıldı. Dizileme, haritalandırma, bağıl gen ifade ölçümleri gibi biyoinformatik analizler Genomics Workbench v 8 yazılımı kullanılarak GRCh38 referans sekansı ile yapıldı.

Bulgular: RWPE normal prostat epitel hücre kültürleri ile DU145 prostat kanser hücreleri karşılaştırıldığı zaman DU-145 prostat kanser hücre kültürlerinde, miRNA (hsa-mir-8072) ifadesinde anlamlı bir artma ($p < 0,05$) görüldü.

Sonuç: Bu sonuç bize hsa-mir-8072 ifadesinin prostat kanserinde onkogenik miRNA olarak rol oynayabileceğini düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: kanser, miRNA, onkogen

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to analyze miRNA expression between prostate cancer cell line (DU145) and prostate normal epithelial cell lines (RWPE) and to investigate its possible role in cancer development.

Material and Methods: Human prostate epithelial cell line (RWPE) and prostate cancer cell line (DU145) were acquired from ATCC. Both cell lines were maintained in RPMI 1640 medium. Total RNA were isolated and fragmented. Adapters were ligated to prepare RNA library for whole transcriptome experiments. Statistics and bioinformatics analysis including mapping, clustering, sequencing were done by using Genomics Workbench v 8. software.

Results: As we compared the normal prostate epithelial cells (RWPE) and prostate cancer cells (DU 145); miRNA (hsa-mir-8072) were significantly ($p < 0.05$) up-regulated in DU145 cells.

İletişim

Sorumlu Yazar: Dr. Şule AYLA

Adres: Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Göztepe Mah. Atetürk Cad. No: 40 Beykoz, İstanbul, Türkiye

Tel: +90 (216) 681 51 00 İnt. 2113

E-Posta: sayla@medipol.edu.tr

Makale Geliş: 30.01.2019

Makale Kabul: 11.04.2019

DOI: http://dx.doi.org/10.16948/zktpb.519592

Conclusion: This result suggests that the hsa-mir-8072 expression may play a role as a oncogen in prostate cancer.

Keywords: cancer, miRNA, oncogene

Çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi, İstanbul'da yapılmıştır.

GİRİŞ

Prostat kanseri erkeklerde en yaygın kanser türüdür ve kansere bağlı ölümler arasında ikinci en sık neden olarak karşımıza çıkmaktadır (1). Prostat kanserinin progresyonu ve metastazı esnasında birçok moleküler mekanizma rol oynasa da, bu mekanizmaların altında yatan detaylar halen daha açıklanmaya muhtaçtır (2). Günümüzde erken evre prostat kanseri prostatektomi ve radyasyon terapileri ile tedavi edilebilir (3). Geç evre prostat kanserlerinde androjen baskılama terapisi standart tedavi olmasına karşın genellikle prostat kanserine direnç gelişir bu yüzden metastatik veya tekrarlayan tümörler için günümüzde efektif bir tedavi yöntemi yoktur (3). Prostat kanserinde nüks riskini tahmin etmek için artmış serum PSA düzeyleri ve tümör evresi yaygın olarak kullanılan prognostik faktörlerdir (4, 5), fakat bunların kullanımı birtakım limitasyonlara sahiptir (6, 7). Bu nedenle, yeni prognostik göstergelerin keşfi, kanser davranışını tahmin etmek açısından son derece önemlidir. Prognostik faktörlerde ve tedavilerde karşılaşılan bu çaresizlikler kanser hücrelerine karşı seçicilik gösteren etkili yöntemlerin ortaya konulması ve var olan yöntemler ile birlikte özgün tedavilerin geliştirilmesine yönelik araştırmaların artmasına neden olmaktadır.

İnsan genomunda yer alan DNA çoğunlukla RNA kodlamasına rağmen, küçük bir bölümü fonksiyonel proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun bu küçük bölümünün önemi küçümsenmesine karşın, small RNA moleküllerinin ortaya çıkışı ile bu ön yargı etkinliğini yitirmiştir. mikroRNA'lar (miRNA'lar), RNA'da tanımlanmayan (non-coding) protein yapıları şeklinde adlandırılmakla birlikte yaklaşık 20-22 nükleotid uzunluğundadır (8). miRNA'lar türler arasında iyi korunmuş ve gen regülasyonu üzerine kritik rollere sahip yapılarıdır (9). Protein tanımlayan ve tanımlamayan bölgelerde RNA dizisi olarak kopyalanma süreci sağlanan, fakat proteine dönüştürülmesi gerçekleşmeyen, işlevsel RNA molekülleridir (10). MiRNA söylemi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (11). MikroRNA, RISC (RNA-in-

duced silencing complex) ile kompleks oluşturur, mRNA ile etkileşime geçtikten sonra mRNA'nın nükleotit dizisinin polipeptit aminoasit dizisine çevrilmesi inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın degrades olmasına sebep olur (10). Bilim adamları, mikroRNA'ların hücreye ait pekçok fonksiyonun düzenlenmesinde önemli rol oynamasına karşın, hücre içinde miRNA miktarının değişmesinin insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olabileceğini ifade etmişlerdir (8). Hücrelerin proliferasyonu arttığında ve apoptoz yeteneklerini kaybettiklerinde genellikle kanserleşirler. MikroRNA'lar bu süreçlerde önemli rol üstlenirler. Kanserleşme sürecinde mikroRNA'ların fonksiyonları, Calin ve ekibinin Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları çalışmalarla ifade bulmuştur (12). miRNA'lar tümör formasyon ve progresyonuna neden olabilecek gen ifadelerinde ve onların düzensizliklerinde kritik bir fonksiyona sahiptir (13). Malign ve normal doku arasındaki ifade farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların tümör dokusundaki değişikliklerdeki rollerini güçlendirmiş ve miRNA'ların tümör gelişiminde onkogen veya tümör süpresörler olarak etkileştikleri ifade edilmiştir. Sonuç olarak, bu konudaki çalışmaların kanserin erken tanısı ve tedavisi için yardımcı olabilecek kriterlerin ortaya çıkarılmasında etkin rol oynayabileceği çok açıktır (8). Birçok yeni araştırma özellikle hsa-miRNA'ların da prostat kanseri oluşumunda etkili olabileceğini belirtmektedir (14, 15). Spesifik miRNA'ların farklı tümör tiplerindeki ifade artışı veya azalması onları potansiyel tedavi hedefi ve diyagnostik belirleyici haline getirmiştir (16, 17).

Biz de çalışmamızda, prostat kanser hücre hattı (DU145) ve prostat normal epitel hücre hatları (RWPE) arasında hsa-miRNA ifadesinin analizini yapmak ve kanser gelişiminde olası rolünü ortaya koymayı istedik.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD., İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER)'de gerçekleştirildi. Kullanılan hücre hattı DU 145 (ATCC® HTB-81™) insan prostat kanseri hücreleri olmakla beraber, başka bir çalışmamızda temin edildi ve laboratuvar koşullarında standardize edildi.

Hücre Kültürü

Hücre kültürü için, insan prostat epitel hücre hattı (RWPE) ve prostat kanseri hücre hatları (DU-145) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC) den temin edildi. DU-145 insan prostat kanseri hücre hattının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde RPMI 1640 besi ortamı (Biological Industries) kullanıldı, 500 ml'lik steril besi ortamının içerisine %1 oranında penisilin/streptomisin, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, %1 oranında amfoterisin B ve %1 oranında L-glutamin eklenerek çoğaltıldı. RWPE-1 insan normal prostat epitel hücre hattının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde ise keratinosit SFM besi ortamı (Invitrogen, 17005-075) kullanıldı. İçerisinde L-glutamin, epitelyal büyüme faktörü (EGF) ve bovin pitüiter ekstraktı (BPE) bulunan bir

kit ile birlikte satılan bu besi ortamına kitte bulunan bu maddeler eklenerek, 37 °C sıcaklıkta, %5 CO2 ve nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi, flasklarda %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözlemlendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

Transkriptom Analizi

2 grup hücre tipinden RNA izolasyonları, cDNA sentezi ve RT PCR ile kantitasyon yapılarak, miRNA'lar için Illumina NextSeq 500 dizileme sistemi ile sekans analizleri yapıldı, biyoinformatik değerlendirme ile sonuç analizleri gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Lot No:148050825) protokolüne göre yapıldı. Kısaca lizis ve homojenize olmuş hücreler genomik DNA'dan arındırılıp 75 ng/ul toplam RNA izole edildi. RNA kalitesi UV absorbans birimi spectra Max i3 (Molecular Devices) ile ölçüldü.

Kütüphane oluşturulması

Kütüphane hazırlığı ve sekanslama TruSeq Stranded RNA LT kit (Illumina, Ref: 15032612, Lot:10037008) ile yapıldı. Kısaca 750ng toplam RNA önce RiboZero (Illumina Lot:10035196) ile fragmanlara ayrılmıştır, iki basamakta cDNA sentezi yapıldı (Illumina, Lot:10035192), 3' terminler adenilasyon edildikten RNA fragmanları özel dizayn edilmiş adaptörler ile bağlandı. Adaptörlere bağlanan diziler kitte tavsiye edildiği üzere PCR ile çoğaltıldı. 10nM Tris-HCl ve Tween 20 ile karıştırılarak örnekler havuz haline getirilip normalize edildi.

Kütüphane kantitasyonu

Oluşturulan kütüphane Kappa library quantification (Illumina, Lot: KK4824) ile real time PCR (CFX Connect, BioRad) cihazında kantite edildi. 10 ul reaksiyon hacminde 20pM olarak real time PCR cihazına yüklendi. Ergime eğrileri (Melting curves) ve ortalama Cq skoru=7.20 kalite değerleri olarak belirlendi. Kalite kriterine aykırı değerler elendi.

Sekanslama

Grupların üçlü replikeleri Nextseq500 (Illumina) cihazı ile 18 saat süre ile sekanslandı. Kümelenme kalitesi Illumina tarafından önerilen minimum 300 bazlık fragmentlar CTE1, CTE2, CTA ve CTL kontrolleri kontrol edildi.

Biyoinformatik analiz

NextSeq 500 cihazının oluşturmuş olduğu ham veri BioSpace (Illumina) veri tabanı ile "fastq" formatına çevrildi, genetik haritalandırma, kümelenmeler, dizilemeler ve analizler Genomics WorkBench (GWB) version 8 (CLC bio, Qiagen) ile GRCh38 referans sekansı ile yapıldı. Biyoinformatik analizden sonra çıkan parametrik sonuçlarda RPKM (Reads per Kilobase of transcript per Million mapped reads) değerleri gen ifadeleri hesaplanmasında kullanıldı.

İstatistik Analiz

Örneklerimizde normal dağılım (normal distribution) görülmekteydi ve sıralamaya (rank) dayalı bir test metodu seçmek uygun değildi. Bu sebepten dolayı iki grupta üç replike çalışılmasına karşın parametrik metodlar kullanılarak istatistik yapıldı. İstatistik analizlerde SPSS v.22 (IBM) kullanıldı ve p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

Tablo 1: RWPE normal prostat epitel hücreleri ve DU-145 Prostat Kanseri Hücre Kültüründe miRNA gen ifadesi (p<0,05).

Feature ID	Fold change	P-value	Grup 1: RWPE				Grup 2: DU145			
			1A_S1	1B_S2	1C_S3	Means	2A_S4	2B_S5	2C_S6	Means
hsa-mir-150	1,6	0,44	0	0,1	0	0,04	0,08	0	0	0,03
hsa-mir-3670-2	>30	0,19	0	0	0	0	0	2,4	0	0,8
hsa-mir-6080	1,2	0,12	0,4	0,6	0,2	0,4	0,5	0,9	1	0,8
hsa-mir-6723	>30	0,06	0,01	0,01	0	0,009	0	0	0	0
hsa-mir-7515	>30	0,19	0	0	0	0	0,003	0	0	0,001
hsa-mir-8072	27	0,04	0,02	0	0	0,008	0,09	0,6	0,8	0,5

BULGULAR

Transkriptom analiz sonuçlarına göre, İnsan prostat epitel hücre hattı (RWPE) ve prostat kanseri hücre hatları (DU-145) arasında 30 farklı hsa-miRNA ifadesi tespit edilmesine karşılık, bunlardan sadece 6 miRNA gen ifadesi için p değeri mevcuttu. Bu 6 gen ifadesi arasında belirgin anlamlılık (p<0,05) ifade eden hsa-miR-8072 ifadesi Tablo 1’de gösterilmiştir. RWPE normal prostat epitel hücre kültürleri ile DU145 prostat kanser hücreleri karşılaştırıldığı zaman hsa-mir-8072 ifadesi özellikle RWPE normal prostat epitel hücrelerinde anlamlı bir azalma gösterirken, DU-145 prostat kanser hücre kültürlerinde anlamlı bir artış (p<0,05) göstermiştir.

TARTIŞMA

Malign hücrelerin heterojen yapısı ve sebep olarak gösterilebilecek değişme kapasitesindeki artışta sadece transkripsiyon düzeyinde değil, post-transkripsiyonel mekanizmalar da aktif rol oynayabilmektedir. Son 10 yılda kanser moleküler biyolojisi çalışanlarının ilgisini yoğun olarak miRNA çekmektedir (18, 19)

Michael ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada, insanlardaki sert ve sınırları belirgin tümörlerin, normal doku yapıları ile kıyaslandıklarında ifade etkileri değişmiş olan miRNA’ların varlığını kanser dokularında gözlemladiler (20). Takip eden yıllarda bu tümörlere bağlı değişikliğe uğramış miRNA ifadelerinin değişik tümör tiplerinde de (meme, lenfoma, beyin) bulunduğu gözlemlendi (13, 21-25). Prostat kanseri ile ilişkili miRNA’lar tanımlanmış olsa bile onkogeneze katkıda bulunabilecek spesifik miRNA ekspresyonları hakkındaki ortak görüşler açık değildir (26, 27). MiRNA’ler, hedefleri mRNA’nın moleküler düzeydeki özelliklerine göre onkogenik veya tümör süpresör özellik kazanabilir. Çalışmamızda DU-145 prostat kanser hücre kültürlerinde spesifik hsa-miR-8072 ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemledik ve hsa-miR-8072’nin onkogenik miRNA olarak etkin olabileceğini düşündük.

Görevleri, onkogen ifadelerini denetlemek olan miRNA’lar ‘tümör süpresör miRNA (TS-miR)’ olarak isimlendirilmekle birlikte, bu ifadenin aksi ise, ‘onko-mir’ şeklinde tanımlanan ve tümör gelişimini ve aktivasyonunu artırmakla suçlanan yapılar olarak karşımıza çıkmaktadır (28). TS-miR’lerin aksine, onkogenik miRNA’lar çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyüme-

yi artırıcı ve/veya antiapoptotik olarak görev yapar. İlk onkogenik miRNA’lardan biri miR-155’tir (29, 30). Diğer bir onkogenik miRNA, miR-21’dir. MiR-21 hematolojik tümörlerde (ALL, KLL vb) ve katı tümörlerde (Pankreas, prostat vb) ekspresyon seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur (26, 31). MiR-21, tümör invazyon ve metastazında önemli bir rol oynar ve bu etkisini tümörü aktive eden bir protein olan PTEN’i etkileyerek göstermektedir. PTEN, ekstrasellüler matriks proteinlerini etkileyerek, hücre işgalini engelleyerek tümör baskılayıcı bir etki göstermektedir (32). Bizde transkriptom analizlerimizde hsa-miR-8072’nin anlamlı olarak artmış olduğunu gözlemledik. Yine onkogenik miRNA’lar tümör süpresör proteinleri azaltarak hücre proliferasyonunu artırır ve böylelikle hücre ölümünü inhibe ederler (28).

Günümüzde, primer tümör evrelemesinde farklı parametreler; operasyon öncesi serum PSA seviyeleri, biyopside Gleason skorlaması gibi prognostik faktörler kullanılmaktadır. Ancak prostat kanserinin oldukça heterojen ve multifokal bir hastalık olmasından dolayı bu göstergeler klinik sonucu tahmin etmede çoğunlukla başarısız olmaktadır (33, 34). Bu nedenle tedaviye etkili cevabın gözlenmesi ve prostat kanserinin progresyonunun takibi için biyolojik biyomarkerların varlığı çok önemlidir. Son yıllarda prostat kanserinin progresyonu ve karsinogenezinde genetik ve epigenetik faktörlerin varlığı dikkat çekicidir (35). Prostat bezine spesifik çeşitli gen ekspresyonları, insan KLK2, PCA3, Bcl-2, Bax, prostat spesifik membran antijeni ve prostat kök hücre antijeni prostat kanserinin patolojisi ile ilişkili olarak gözlenmektedir (36). Ne yazık ki bu biyomarkerlar arasında çok azı çoklu çalışmalarla onay almıştır, bu nedenle daha güçlü biyomarkerların araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır (37). miRNA’ların dokuya özgün ekspresyon profillerinin kolay saptanması ve yüksek stabiliteleri nedeniyle, fizyolojik ve patolojik şartlardaki karakterizasyonları için ideal biyomarkerlar olarak düşünülmekte ve önerilmektedirler (38-40).

Çalışmamızda artışını gözlemlediğimiz hsa-miR-8072’nin prostat kanserinin tanımlanmasında potansiyel bir biyomarker olarak kullanılabilirliğini düşündük ama bu konuya dair çalışılması ve açıklanması gereken birçok farklı yolağın (PTEN, apoptozis vb.) olduğunu, bu süreçlerde in vivo çalışmalarının ve insan örneklerinin de değerlendirilmesi gerektiğini ve bu yolların açıklanması halinde prostat kanseri hastaları için yeni tedavi protokollerinin belirlenmesi açısından çok önemli adımların atılabileceğini fark ettik.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2015*. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29.
2. Shen MM, Abate-Shen C. *Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges*. *Genes Dev*. 2010;24(18):1967-2000.
3. Litwin MS, Tan HJ. *The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review*. *JAMA*. 2017;317(24):2532-42.
4. Barron N, Keenan J, Gammell P, Martinez VG, Freeman A, Masters JR, et al. *Biochemical relapse following radical prostatectomy and miR-200a levels in prostate cancer*. *Prostate*. 2012;72(11):1193-9.
5. Lowrance WT, Scardino PT. *Predictive models for newly diagnosed prostate cancer patients*. *Rev Urol*. 2009;11(3):117-26.
6. Yamamoto S, Kawakami S, Yonese J, Fujii Y, Urakami S, Masuda H, et al. *Long-term oncological outcome and risk stratification in men with high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy*. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42(6):541-7.
7. Eisenberger MA, Blumenstein BA, Crawford ED, Miller G, McLeod DG, Loehrer PJ, et al. *Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer*. *N Engl J Med*. 1998;339(15):1036-42.
8. Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. *MicroRNAs and cancer*. *Br J Surg*. 2007;94(1):23-30.
9. Seven M, Karatas OF, Duz MB, Ozen M. *The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications*. *Future Oncol*. 2014;10(6):1027-48.
10. Shenouda SK, Alahari SK. *MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?* *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3-4):369-78.
11. Ruvkun G. *Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world*. *Science*. 2001;294(5543):797-9.
12. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
13. Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. *The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2010;13(3):208-17.
14. Budd WT, Seashols-Williams SJ, Clark GC, Weaver D, Calvert V, Petricoin E, et al. *Dual Action of miR-125b As a Tumor Suppressor and OncomiR-22 Promotes Prostate Cancer Tumorigenesis*. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142373.
15. Leung YK, Chan QK, Ng CF, Ma FM, Tse HM, To KF, et al. *Hsa-miRNA-765 as a key mediator for inhibiting growth, migration and invasion in fulvestrant-treated prostate cancer*. *PLoS One*. 2014;9(5):e98037.
16. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. *MicroRNA expression profiling in prostate cancer*. *Cancer Res*. 2007;67(13):6130-5.
17. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer*. *Cancer Res*. 2008;68(15):6162-70.
18. Chen Y, Gao DY, Huang L. *In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;81:128-41.
19. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. *miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer*. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(11):1444-55.
20. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. *Mol Cancer Res*. 2003;1(12):882-91.
21. Le Quesne J, Caldas C. *Micro-RNAs and breast cancer*. *Mol Oncol*. 2010;4(3):230-41.
22. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39(2):167-9.
23. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. *Cancer Res*. 2005;65(14):6029-33.
24. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. *A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation*. *Cancer Res*. 2005;65(21):9628-32.
25. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues*. *Oncogene*. 2006;25(17):2537-45.
26. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257-61.
27. DeVere White RW, Vinall RL, Tepper CG, Shi XB. *MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer*. *Urol Oncol*. 2009;27(3):307-11.
28. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. *MicroRNAs and cancer*. *APMIS*. 2007;115(10):1090-106.
29. Lin PY, Yu SL, Yang PC. *MicroRNA in lung cancer*. *Br J Cancer*. 2010;103(8):1144-8.
30. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, et al. *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. *J Pathol*. 2005;207(2):243-9.
31. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793-801.
32. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-58.
33. Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. *Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer*. *J Urol*. 2003;169(2):517-23.
34. Amling CL, Blute ML, Bergstralh EJ, Seay TM, Slezak J, Zincke H. *Long-term hazard of progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: continued risk of biochemical failure after 5 years*. *J Urol*. 2000;164(1):101-5.
35. Bian X, Shen Y, Zhang G, Gu C, Cai Y, Wang C, et al. *Expression of dicer and its related miRNAs in the progression of prostate cancer*. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120159.
36. Jansen FH, Roobol M, Jenster G, Schroder FH, Bangma CH. *Screening for prostate cancer in 2008 II: the importance of molecular subforms of prostate-specific antigen and tissue kallikreins*. *Eur Urol*. 2009;55(3):563-74.
37. Cooper CS, Campbell C, Jhavar S. *Mechanisms of Disease: biomarkers and molecular targets from microarray gene expression studies in prostate cancer*. *Nat Clin Pract Urol*. 2007;4(12):677-87.
38. Omelia EJ, Uchimoto ML, Williams G. *Quantitative PCR analysis of blood- and saliva-specific microRNA markers following solid-phase DNA extraction*. *Anal Biochem*. 2013;435(2):120-2.
39. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y. *A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification*. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6(3):419-23.
40. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.