

Araştırma Makalesi

Mersin İlinde Sağlıklı Bireylerde MikroRNA Ekspresyon Profili

MicroRNA Expression Profiling in Healthy Subjects in Mersin

Hatice YILDIRIM YAROĞLU¹, Ayşegül GÖRÜR¹, Lokman AYAZ², Şenay BALCI FİDANCI¹,
Serin AKBAYIR¹, Nil DOĞRUER ÜNAL¹, Engin KAPLAN³ Mehmet Sami SERİN⁴,
Resul BUĞDAYCI⁵, Nurcan ARAS ATEŞ⁶, Lülüfer TAMER GÜMÜŞ¹

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin,

²Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne,

³Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin,

⁴Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin,

⁵Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Mersin

⁶Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: MikroRNA'lar yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda, tek iplikli, küçük, kodlanmayan RNA'ların bir sınıfıdır. MikroRNA'lar hedef mesajcı RNA'nın yıkımını yada translasyonunun baskılanmasını gerçekleştirerek posttranskripsiyonal düzeyde gen ekspresyonunu düzenler. miRNA'lar kardiyovasküler, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, musküler bozukluklar ve kanserde rol alırlar. Bu çalışmada sağlıklı bireylerde dolaşımda eksprese olan miRNA profilinin belirlenmesi amaçlandı.

Yöntem: miRNA ekspresyonu yaşları 16 ile 80 arasında değişen, 98 kadın ve 194 erkekten oluşan 292 sağlıklı bireyde değerlendirildi. EDTA içeren tüplere alınan periferik kan örnekleri, 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmadan izole edilen miRNA'lardan Reverse Transcription kitiyle cDNA'lar elde edildi ve 96.96 Dynamic Array IFCs kullanılarak Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR(qRT-PCR) cihazı (Fluidigm, Biomark, USA) ile 740 farklı miRNA analiz edildi.

Bulgular: Çalışmamızda 740 miRNA'dan 182'si eksprese olurken, 558'inde ekspresyon görülmedi.

Sonuç: Sağlıklı bireylerde miRNA profilinin belirlenmesi ile başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta immünoterapik veya farmakolojik tedavi amaçlı kullanımı gerçekleştirilebilir.

Anahtar Sözcükler: miRNA; sağlıklı birey; profil

Abstract

Aim: MicroRNAs are a class of about 18-24 nucleotid, non-coding single-stranded small RNA molecules that regulate gene expression at the posttranscriptional level by either degrading or blocking translation of messenger RNA targets. They have roles in cardiovascular, neurodegenerative and inflammatory diseases, infections, developmental disorders, muscular disorders and cancer. The levels and types of miRNA expression in normal tissues are significantly different from in tumor tissues. The aim of this study was to investigate the profiling of circulating miRNAs expression in volunteer healthy subjects.

Method: The miRNAs expression was evaluated in 292 healthy volunteers (98 women and 194 men) whose ages're ranging from 16 to 80. EDTA-anticoagulated peripheral blood samples were centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes to separate plasma. cDNA's were obtained from the isolated plasma miRNAs by employing Reverse Transcription Kits and subsequently, 740 different miRNAs were analyzed with High Throughput Real-Time PCR (qRT-PCR) device (Fluidigm, Biomark, USA) by using 96.96 Dynamic Array IFCs.

Results: In our study, 182 of 740 miRNAs were expressed while an expression was not observed in 558 miRNAs.

Conclusion: The determination of miRNA profiles in healthy volunteers may lead to their immunotherapeutic or pharmacotherapeutic use in treatment of many diseases such as cancer in particular.

Keywords: miRNA; healthy subjects; profiling

*Bu çalışma, Çukurova Kalkınma Ajansı tarafından "Kanserin Erken Tanısında Moleküler Altyapı Laboratuvarının Oluşturulması (Proje No:TR62-09-03)" adlı proje kapsamında desteklenmiştir.

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2011;4(3):25-29

Geliş Tarihi : 05.07.2012

Kabul Tarihi : 24.09.2012

Yazışma Adresi: Dr. Hatice YILDIRIM YAROĞLU, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

Tel : 0324 3374300/1530

Faks : 0324 3374305

E-posta : haticeyldrm@yahoo.com

Giriş

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda, tek iplikli, küçük, kodlanmayan RNA'ların bir sınıfıdır (1,2). miRNA'lar mRNA'nın 3'UTR bölgesinde hedef transkripti ile baz eşleşmesi yaparak, bu transkriptlerin translasyonunu değişik mekanizmalar ile baskılar (3).

miRNA ilk kez 1993 yılında Lee ve ark. (4) tarafından yuvarlak bir solucan olan *Caenorhabditis elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda olan ama protein kodlamayan *lin-4* geninde keşfedilmiştir. 2000 yılında *C.elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda başka bir miRNA olan *let-7* tanımlanmıştır (5). 2003 yılında *let-7'nin* insanları da içine alan türler arasında korunmuş olduğu bulunmuş ve daha sonraki yıllarda *lin-4* ve *let-7*'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (6,7).

Günümüzde 4000'den fazla bilinen miRNA geni vardır. Bunların 1048'i insanda tanımlanmıştır. miRNA genlerinin %70'den fazlası intronlarda veya ekzonlarda bulunur. Yaklaşık olarak %30'u da intergenik bölgelerde bulunmaktadır (8,9).

miRNA'lar dokular arasında farklı şekilde eksprese olurlar ve kan dolaşımında saptanabilmektedirler. Tek bir miRNA, farklı fonksiyonları olan yaklaşık 200 hedef gene bağlanmaktadır ve tek bir hücredeki yüzlerce fonksiyonu düzenleyebilmektedir (10).

miRNA'ların fonksiyonları arasında; gen ekspresyonunun post-transkripsiyonal düzenlenmesi, metabolik regülasyon, hafıza ve sinaptik gelişim, organizmanın gelişimi için embriyogenez, organogenez, farklılaşma ve büyümenin kontrolü gibi kritik rollere sahip olmaları, anjiyogenez, tümörögenез, apoptozis ve onkogenlerle ilişkili olmaları yer almaktadır (10,11).

miRNA'lar hücrelerin normal birçok işlevinde görevli bir molekül olduğu için; miRNA'lardaki kusurlar (mutasyon, delesyon, amplifikasyon) çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. miRNA'ların rol aldığı hastalıklar arasında; kardiyovasküler, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, musküler bozukluklar ve kanser yer almaktadır (11,12).

Günümüze kadar birçok çalışmada çeşitli hastalıklar ve kanser türlerinde miRNA ekspresyonu belirlenmiştir. Ancak sağlıklı bireylerde miRNA ekspresyonu ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda dolaşımında eksprese olan miRNA'lar saptanarak sağlıklı bireylerde miRNA profilinin oluşturulması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya Mersin ilinin farklı yerlerinden Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran, yaşları

16 ile 80 arasında değişen, 98 kadın ve 194 erkekten oluşan 292 gönüllü birey dahil edildi. Bu çalışma için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 2011/70 sayılı ve 07.04.2011 tarihli onay alındıktan sonra, çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onamları alındı. Kronik böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı olan, ağır anemili, immün sistem hastalığı olan, gebeler ve emziren kadınlar ile maling hastalık tanısı almış olan bireyler çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya dahil edilen bireylere ait yaş, cinsiyet, sigara kullanımı ve alkol tüketimi verileri kaydedildi.

Bireylere ait kan örnekleri EDTA içeren tüplere alındı ve 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmadan izole edilen miRNA'lardan Reverse Transcription kitiyle cDNA'lar elde edildi ve 96.96 Dynamic Array IFCs kullanılarak Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR(qRT-PCR) cihazı (Fluidigm, Biomark, USA) ile 740 farklı miRNA 2 tane internal kontrol (RNU44, RNU48) kullanılarak analiz edildi. Çalışmada miRNA'lar saptanabilir düzeyde eksprese olan miRNA'lar olarak verildi.

İstatistiksel Analiz

Yapılan power analizi çalışmasına göre, en az %80 güç düzeyinde, değişkenlere ait beklenen frekanslarda gözlemlenen farklılıkların anlamlı bulunabilmesi için en az 292 bireye ihtiyaç olduğu saptanmıştır. Power analizi için MedCalc 10.4 istatistik paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences Versiyon 17.0) paket programı kullanıldı. Çalışma grubunun yaş değerleri, student t testi uygulanarak ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak verildi. Cinsiyet, sigara, alkol, hipertansiyon, DM bilgileri yüzde olarak verildi.

Bulgular

Çalışmaya gönüllü olarak 98 kadın ve 194 erkekten oluşan 292 (yaş ortalaması 32.29±11.66) sağlıklı birey dahil edildi. Çalışmaya katılan bireylere ait sigara, alkol kullanımı, HT ve DM yüzdesi ile cinsiyet bilgileri ve yaş ortalamaları Tablo 1'de verilmiştir. Bu çalışmada, 302 sağlıklı bireyde miRNA ekspresyonları araştırıldı. Çalışma grubunda 740 çeşit miRNA'dan saptanabilir düzeyde eksprese olanlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma grubunun tanımlayıcı verileri

Çalışma Grubu	n (%)
Cinsiyet	Kadın 98 (32.5)
	Erkek 194 (64.2)
Sigara	61 (20.2)
Alkol	51 (16.8)
Yaş (Ort±SS)	32.14±11.65

n:Birey sayısı, Ort±SS:ortalama±standart sapma

Tablo 2. Çalışma grubunda eksprese olan miRNA'lar

let-7g-5p	miR-30d	miR-378	miR-223	miR-10a-5p	miR-10b-5p
miR-1183	miR-1255B	miR-1274A	miR-1274B	miR-1290	miR-135b-5p
miR-141-3p	miR-147	miR-148b	miR-151-3p	miR-151-5P	miR-152
miR-17-5p	miR-150	miR-154-5p	miR183-5p	miR-184	miR-22-3p
miR-212	miR-203	miR-205	miR-193a-5p	miR-195	miR-191
miR-221	miR-204	miR-190	miR-206	miR-1180	miR-193b
miR-146a	miR-424-5p	miR-548a	miR-210	miR-136-5p	miR-34b
miR-34a-5p	miR-320B	miR-519e-3p	miR-502-3p	miR-181a-5p	miR-543
miR-425-5p	miR-532	miR-422a	miR-25-3p	miR-208	miR-494
miR-432	miR-199a-3p	miR-23a-3p	miR-218	miR-197	miR-505
miR-484	miR-324-5p	miR-302a-3p	miR-24	miR-27a-3p	miR-409-3p
miR-491-5p	miR-383	miR-497	miR-654-3p	miR-510	miR-93-5p
miR-411	miR-519b-3p	miR-645	miR-576-3p	miR-433	miR-548c
miR-431	miR-532-3p	miR-597	miR-508	miR-423-5p	miR-598
miR-660	miR-548b-5p	miR-518d	miR-599	miR-520a-3p	miR-451
miR-648	miR-515-3p	miR-9-5p	miR-574-3p	miR-628-5p	miR-548c-5p
miR-490	hsa-miR-99b	miR-590-5p	miR-652	miR-642	miR-885-5p
miR-766	miR-483-5p	miR-570	miR-624	miR-601	miR-886-5p
miR-744	miR-520d-5p	miR-603	miR-551b-3p	miR-579	miR-7
miR-875-3p	miR-720	miR-548d	miR-942	miR-99b-5p	miR-21
miR-28	miR-138	miR-125b	miR-25	miR-16	miR-20a
miR-872	miR-545	miR-93	miR-139-5p	miR-130a	miR-29c
miR-145	miR-122	miR-27b	miR-106b	miR-202	miR-769-3p
miR-20b	miR-26b	miR-92a	miR-142-3p	let-7c	miR-19b
miR-26a	miR-130b	hsa-miR-128a	miR-140-3p	miR-194	miR-19a
let-7g	miR-30c	miR-328	miR-372	miR-382	miR-18a-5p
miR-106a	miR-132	miR-339-3p	miR-185	miR-376a	miR-223-3p
miR-146b	miR-126	miR-340	miR-320	miR-381	miR-342-3p
miR-148a	miR-324-3p	miR-345	miR-361	miR-331	miR-331-5p
miR-128a	miR-335	miR-30a-5p	miR-30e-3p	miR-302b-3p	miR-25-5p
miR-375	miR-409-5p				

Tartışma

MikroRNA'lar hedef mRNA'nın yıkımını ya da translasyonunun baskılanmasını gerçekleştirerek posttranskripsiyonal düzeyde gen ekspresyonunu düzenler. Hücre büyümesinde, farklılaşmasında, proliferasyonunda ve hücre ölümünde bir veya daha fazla hedef genin baskılanmasında rol oynarlar (13,14). Çeşitli miRNA ekspresyon düzey değişiklikleri birçok hücre proteinin ekspresyon düzeylerini etkilemektedir. miRNA'lar dokuya spesifik olup insanlarda bütün hücre tipinde bulunurlar ve farklı hücrelerden farklı miRNA'lar eksprese edilmektedir (15).

miRNA'lar merkezi sinir sistemi hastalıkları, (şizofreni, alzheimer), kardiyovasküler hastalıklar, İnflamatuvar ve immün kökenli hastalıklar gibi birçok hastalık ile bağlantılıdır (11,16-19).

miR-146a ve miR-155'in Alzheimer hastalığının erken tanısında marker olarak kullanılabilceği saptanmıştır (17,18). İnflamatuvar ve immün kökenli hastalıklarda rol oynadığı belirlenen miRNA örnekleri arasında miR-155, miR-146a, miR-125b, miR-203, miR-17-92 kümesi, miR-296, miR-198, miR-342, miR-383, let-7b yer alır (19,20)

Vasküler hastalıklarda anormal ekspresyon gösteren miRNA'lar miR-21, miR-31, miR-146, miR-221 ve miR-222'dir (21).

Akut miyokard infarktüsü hastalarında, miR-208'in yükseldiği ve miR-208'in ROC eğri analizi ve cTnI ile karşılaştırılması sonucunda, cTnI kadar sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu saptanmıştır (22).

Günümüzde düzinelerce miRNA'nın azalan veya artan ekspresyon özellikleri ile tümör baskılayıcı veya onkogen (onkomezir) olarak aktivite gösterdiği gösterilmiştir. Ayrıca miRNA genlerinin %50'den fazlası kanser ile ilişkili genomik bölgelerde yerleşmiştir (10,16). MikroRNA'lar meme, pankreas, akciğer, mide, tiroid, kolon ve prostat kanserlerini de içeren birçok kanserde anormal eksprese edilirler (10,23-31),

Yapılan çalışmalarda meme kanserinde miR-21, miR-27a, miR-373'ün onkogenik etkiye sahip olduğu, miR-236, miR-27b, miR-125a, miR-200c, miR-335, miR-101'in ise tümör baskılayıcı olarak etki ettiği belirlenmiştir (23,24). Pankreas kanserinde tümör baskılayıcı miR-34a düzeyinde azalma, onkogenik miRNA'lardan miR-103, miR-107, miR-196a, miR-155, miRNA-21, ve miR-16a düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (25).

Akciğer kanserinde miR-210, miR-21, miR-31 ve miR-182 düzeylerinde, mide kanserinde miR-223, miR-106b, miR-147, miR-34a düzeylerinde, tiroid tümörlerinde ise miR-187, miR-221, miR-222, miR-146b, miR-155, miR-224 ve miR-197 düzeylerinde artış saptanmıştır (26-28)

Nakajima ve ark. (29) tarafından kolorektal kanserlerde onkogenik miRNA'lardan let-7g, miR-181b ve miR-200c, miR-29, miR29a, miR-92'nin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir.

Prostat kanserinde onkogenik miRNA'lardan let-7c, miR-145, miR-16a, miR-125b, miR-141 ekspresyonunun arttığı ve ekspresyon düzeylerinin prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir (30). Mitchell ve ark. (31) tarafından serum miR-141'in prostat kanseri için yeni bir marker olabileceği önerilmiştir.

Çalışmamızda sağlıklı bireylerde miRNA profilini belirlemek için 302 gönüllü bireyde 740 farklı miRNA çalışılmıştır. Sonuçlarımıza göre 740 miRNA'dan 182'sinde ekspresyon görülürken 558'inde ekspresyon görülmedi.

Birçok çalışmada; miRNA ekspresyon profilleri incelenerek kanserlerin sınıflandırılması, kanser türünün hızlı veya yavaş gelişen türünün saptanması ve kökenlendiği dokusu bilinmeyen kanserin tanımlanması yapılmıştır. Fakat yaptığımız literatür taramasında sağlıklı bireylerle yapılan bir miRNA profili bulunmamaktadır.

Meme kanserinde tümör baskılayıcı olan miR-236, miR-27b, miR-125a, miR-335 ile pankreas kanserinde tümör baskılayıcı olan miR-34a, çalışma grubumuzda da saptanmıştır.

Çalışmamız sonucunda sağlıklı bireylerde eksprese olan 182 çeşit miRNA arasında tümör baskılanmasında rol alan miRNA'lar belirlenebilir ve bu miRNA'ların taklitlerinin üretilmesiyle terapötik etkinliği olan yeni tedavi stratejileri geliştirilebilir.

MikroRNA'ların keşfedilmesinden günümüze kadar yapısının ve fonksiyonlarının tanımlanmasıyla normal gelişimde ve birçok hastalıkta rol aldığı gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerde miRNA profilinin belirlenmesi ile başta kanser olmak üzere birçok hastalıklara olan yatkınlıklar önceden belirlenebilir ve miRNA'ların tedavi amaçlı kullanımı gerçekleştirilebilir.

Kaynaklar

1. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(3-4):369-78.
2. Wittmann J, Jäck HM, Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1806(2):200-20.
3. Pillai RS, Bhattacharyya SN and Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology* 2007;17(3):118 -26.
4. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;75(5): 843-54.

5. Reinhart, BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rauqvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403(6772): 901–6.
6. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):862–4.
7. Vella MC, Slack FJ. *C. elegans* microRNAs. *Wormbook* 2005;21(1):1-9.
8. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.
9. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 2006;342(12):129–38.
10. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem*, 2009;55(4):623-31.
11. Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Immune Netw* 2011;11(3):135-54.
12. Garofalo M, Condorelli G, Croce CM: MicroRNAs in diseases and drug response. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8(5):661-7.
13. Selbach M, Schwan haus ser B, Thier fel der N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Wide spread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455 (7209):58-63.
14. Baek D, Villen J, Shin C, Camar go FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008;455(7209):64-71.
15. Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res* 2007;101:1225-36.
16. Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther* 2007;15(12): 2070-9.
17. Lukiw WJ, Alexandrov PN, Zhao Y, Hill JM. Spreading of Alzheimer's disease inflammatory signaling through soluble micro-RNA. *Neuroreport* 2012;11;23(10):621-6.
18. Wang LL, Huang Y, Wang G, Chen SD. The potential role of microRNA-146 in Alzheimer's disease: biomarker or therapeutic target? *Med Hypotheses* 2012;78(3):398-401.
19. Tsitsiou E, Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9(4):514-20.
20. Tili E, Michaille JJ, Costinean S, Croce CM. MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(10):534-41.
21. Zhang C. MicroRNAs in Vascular Biology and Vascular Disease. *J Cardiovasc Trans Res* 2010;3(3):235–40.
22. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li, He J, Qin YM, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European Heart Journal* 2010;31(6):659–66.
23. Khoshnaw S, Green A, Powe D, Ellis I. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. *J Clin Pathol* 2009;62(5):422–8.
24. Lim WK, Micklem G. MicroRNAs dysregulated in breast cancer preferentially target key oncogenic pathways. *Mol Biosyst* 2011;7(9):2571-6.
25. Wang J, Sen S. MicroRNA functional network in pancreatic cancer: from biology to biomarkers of disease. *J Biosci*, 2011;36(3):481-91.
26. Wang QZ, Xu W, Habib N, Xu R. Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(4):572-94.
27. Yao Y, Suo AL, Li ZF, Liu LY, Tian T, Ni L, Zhang WG, Nan KJ, Song TS, Huang C: MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Mol Med Report* 2009;2(6):2963-70.
28. Nikiorova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin EndocrinolMetab* 2008;93(5):1600-8.
29. Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, Kudo K, Uchida K, Takasaki K, Yamamoto M, Ju J. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2006;3(5):317-24.
30. Nupponen NN, Porkka K, Kakkola L, Tanner M, Persson K, Borg A, Isola J, Visakorpi J. Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am J Pathol* 1999;154(6):1777–83.
31. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105(30):10513-8.