

Research Paper

Examining the miR-93-5p and miR-17-5p Expression in Plasma and Breast Cancer Tissue as Possible Markers in Breast Cancer Prognosis



Andia Seyedi Moghaddam¹ , *Mahdieh Salimi² , Najmeh Ranji¹ , Hossein Mozdarani³ 

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2. Department of Medical Genetics, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

3. Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.



Citation Seyedi Moghaddam A, Salimi M, Ranji N, Mozdarani H. [Examining the miR-93-5p and miR-17-5p Expression in Plasma and Breast Cancer Tissue as Possible Markers in Breast Cancer Prognosis (Persian)]. *Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS)*. 2023; 25(6):104-119. <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.1.6680.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.1.6680.1>



Article Info:

Received: 16 Oct 2021

Accepted: 08 Jan 2022

Available Online: 01 Apr 2022

ABSTRACT

Background and Aim MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs (17-25 nucleotides) that have been studied in many diseases. miRNAs studies in different cancers have shown that miRNAs may be considered oncogene or tumor suppressor. So far, many studies have shown that miR-17-5p and miR-93-5p are important regulatory molecules in some biological processes, such as cell proliferation, associated with cancer formation. This study aimed to investigate and compare the tissue and plasma expression levels of miR-17-5p and miR-93-5p in patients with ductal carcinoma breast cancer with the normal control group.

Methods & Materials The total RNA (including miRNA) was extracted from breast and plasma tissue samples of cancerous and normal samples. The RNA concentration and purity were confirmed using optical absorbance measurements. cDNA was synthesized, and the expression levels of miR-17-5p and miR-93-5p were assessed semi-quantitatively by SYBR Green-based real-time RT-PCR assay in plasma and breast tissues of ductal carcinoma breast cancer compared with the control normal samples with SNORD47 as internal normalizer. Data were statistically evaluated using GraphPad Prism 8.0.2.

Ethical Considerations This study was approved by the Ethics Committee of the institute (IRAN 52d/4922, 6.10.2016). All study individuals signed a consent form to use their clinical samples and personal data under the physician's supervision.

Results The expression level of miR-17-5p showed significantly higher expression in tissues and plasma of the cancer group compared with the control group ($P < 0.0001$). It was also significantly associated with tumor stage and lymph node, and ER (estrogen receptor) and PR (progesterone receptor) status ($P < 0.0001$). While decreased expression of miR-93-5p in plasma and tumor tissues was shown to be significantly associated with tumor stage and lymph node involvement ($P < 0.0001$).

Conclusion The data revealed that high expression of miR-17-5p and low expression of miR-93-5p in both plasma and breast tumor might be associated with poor prognosis in breast cancer. However, miR-17-5p, due to the greater change in expression and ease of plasma detection, may serve as a possible non-invasive biomarker for breast cancer's poor prognosis. Further follow-up studies are required to confirm this finding.

Key words:

Prognosis, Cancer, Biomarker, MiR-17-5p, MiR-93-5p

* Corresponding Author:

Mahdieh Salimi, PhD.

Address: Department of Medical Genetics, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Tel: +98 (21) 44787382

E-mail: salimi@nigeb.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) can function as post-transcriptional regulators. It has been reported that the tissue-specific deregulation of miRNAs is correlated with several human diseases, such as cancer [1, 19]. Numerous studies have investigated the potential of miRNA expression profiles as biomarkers of cancer response to treatment, diagnosis, and prognosis [6]. Many studies have shown that miR-17-5p and miR-93-5p are important regulatory molecules for some biological behaviors, including cell proliferation processes that are important in cancer development [2, 12].

Nowadays, researchers investigate the change in the expression of miRNAs in the tissues and fluids of cancer patients compared to the control group.

In this research, we focus on evaluating miR-17-5p and miR-93-5p expression levels in tissues and plasma of patients with breast ductal carcinoma compared with the control group.

Materials and Methods

In total, 180 samples consisting of 80 plasma and 100 breast tissues were examined in this project. The samples were taken from the patients referred to Asia Hospital, Tehran City, Iran (2017-2018). The expression levels of miR-17-5p and miR-93-5p were measured by SYBR Green-based real-time RT-PCR assay in plasma and breast tissues of cancerous patients compared with control.

The total RNA (including miRNA) was extracted from breast tumor tissue samples and plasma. BON-miR cDNA kits were used for microRNA's reverse transcription. The expression levels of miRNAs were quantified using SYBR Green-based real-time RT-PCR.

The expression level was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The data were presented as the fold change in gene expression normalized to an endogenous reference gene relative to the controls.

Results

As shown in [Figure 1](#), the expression of miR-17-5p increased in breast tumors and plasma of breast cancer patients compared to the normal control group. In contrast, the expression of miR-93-5p in breast cancer tumors and plasma decreased ([Figure 2](#)). A positive correlation between the expression levels of miR-17-5p and miR-93-5p in plasma and tumor samples was confirmed by the Spearman test.

As summarized in [Table 1](#), the data revealed a statistically significant association between the expression level of miR-17-5p in the tissue and plasma of breast cancer patients with lymph node metastasis, advanced stages of the tumor, and the status of ER (estrogen receptor) and PR (progesterone receptor). Also, the expression level of miR-93-5p in the tissue and plasma of breast cancer patients was significantly reduced in lymph nodal involvement and advanced stages of breast cancer ($P < 0.001$).

Discussion

Breast cancer is the leading cause of cancer mortality in women worldwide [20, 21]. In recent years, many studies have reported that miRNAs have key roles in providing sensitive mechanisms for precise regulation of gene expression [22-24].

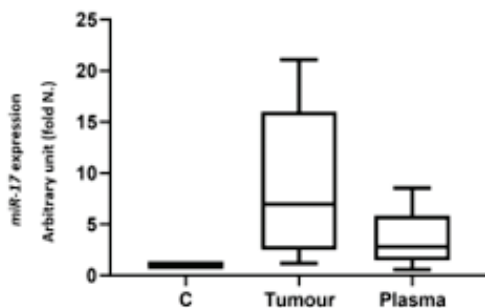


Figure 1. Expression level miR-17-5p in tissue and plasma of breast cancer patients compared to the control group ($P < 0.001$)

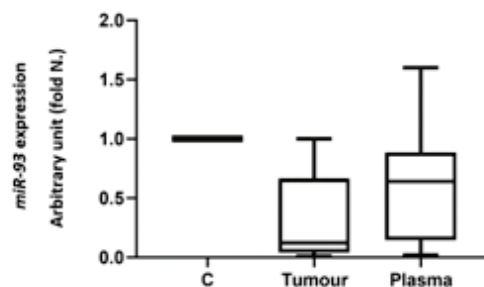


Figure 2. Expression level miR-93-5p in tissue and plasma of breast cancer patients compared to the control group ($P < 0.001$)

Table 1. Comparing Mean Expression Levels of miR-93 and miR-17-5p in Tumor and Plasma Samples of Patients in Different Clinical Conditions

Parameter	Mean±SD		Mean±SD		Mean±SD		Mean±SD	
	Expression Level of miR-17-5p in Breast Tumor Tissues	P	Expression Level of miR-17-5p in Plasma Samples	P	Expression of miR-93-5p in Breast Tumor Tissues	P	Expression Level of miR-93-5p in Plasma Samples	P
ER+	12.94±5.08	<0.0001	5.29±2.22	<0.0001	0.34±0.3	0.9040	0.48±0.41	0.4042
ER-	2.81±1.52		1.36±0.59		0.35±0.29		0.47±0.34	
PR+	14.09±4.26	<0.0001	5.82±1.83	<0.0001	0.31±0.27	0.7143	0.53±0.4	0.9955
PR-	3.05±1.72		1.40±0.63		0.33±0.37		0.53±0.38	
HER2+	8.81±6.65	0.6249	3.68±2.60	0.8621	0.33±0.27	0.9509	0.61±0.38	0.7286
HER2-	9.38±6.72		3.92±2.79		0.32±0.27		0.56±0.40	
Triple-negative	4.88±1.2	0.4921	1.9±0.23	0.34	0.48±0.35	0.2731	0.54±0.4	0.9388
Non-triple negative	9.33±6.59		3.92±2.67		0.33±0.3		0.57±0.41	
Lymph node+	13.65±4.64	<0.0001	56.4±1.95	<0.0001	0.13±0.8	<0.0001	0.37±0.36	<0.0001
Lymph node-	2.98±1.74		1.37±0.63		0.65±0.26		0.84±0.32	
Stage	1	0.0011	1.16±0.23	0.0428	0.98±0.01	<0.0001	0.91±0.24	<0.0001
	2		2.76±1.51		0.53±0.26		0.84±0.32	
	3		4.47±3.14		0.16±0.09		0.35±0.35	
	4		5.96±1.91		0.01±0.008		0.26±0.24	

Abbreviations: ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

In many studies, abnormal expression of the miR-17-92 family, especially miR-17-5p, has been reported to be associated with the spread of tumor growth in many cancers, including colorectal cancer, esophageal squamous cell carcinoma, hepatocellular carcinoma, hematopoietic malignancies, breast cancer, lung cancer, glioblastoma, and neuroblastoma by targeting cell cycle control [9, 25].

It was reported that miR-93-5p (miR-93) significantly inhibited cell proliferation and induced G1/S cell cycle arrest. Moreover, two well-established oncogenes, E2F1 and CCND1 were identified as dual targets of miR-93 [34].

In the present study, miR-17-5p showed significantly higher expression in tissues and plasma of the cancer group compared with the control group ($P<0.0001$), which was significantly associated with tumor stage and lymph node, ER, and PR status ($P<0.0001$). In contrast, de-

creased expression of miR-93-5p in plasma and tumor tissues was shown to be significantly associated with tumor stage and lymph node involvement ($P<0.0001$).

Our data revealed that upregulation of miR-17-5p and down-regulation of miR-93-5p in both plasma and breast tumor might be associated with poor prognosis in breast cancer. However, miR-17-5p, due to the greater difference in expression and ease of plasma detection, may serve as a possible non-invasive biomarker for breast cancer's poor prognosis. Further follow-up studies are required to confirm this finding.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the ethics committee of institute, (IRAN 52d/4922, 6.10.2016). All individuals

included in the study signed a consent form to use their clinical samples and personal data under the supervision of their physician.

Funding

This project was supported by the [National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology \(NIGEB\)](#).

Authors' contributions

Implementation and collection of data and writing the draft of the article: Andia Sidi Moghadam; Designing the idea of the project, supervising the implementation, analyzing the results and finalizing the article: Mahdiah Salimi; Scientific advice: Najmeh Ranji and Hossein Mazdarani; Assistance in providing clinical samples: Hossein Mazdarani; Design, sample collection and research writing: all authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We sincerely thank Dr. Parisa Aziminejadan for her kind support and all the individuals who participated in this study.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

بررسی بیان miR-17-5p و miR-93-5p در پلاسما و بافت سرطان پستان به‌عنوان نشانگرهای احتمالی در پیش‌آگهی سرطان پستان

آندیا سیدی مقدم^۱، مهديه سلیمی^۲، نجمه رنجی^۱، حسین مزدارانی^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۲. گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران.
۳. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

مینه و هدف: miRNAها دسته‌ای از RNAهای کوچک غیررمزگذار (۱۷-۲۵ نوکلئوتید) هستند که در بسیاری از بیماری‌ها محققان به آن‌ها توجه کردند. مطالعات miRNAها در سرطان‌های مختلف نشان داده است که برخی از آن‌ها به‌عنوان آنکوژن و برخی مهارکننده تومور عمل می‌کنند. تا به امروز، بسیاری از مطالعات نشان دادند miR-17-5p و miR-93-5p مولکول‌های تنظیم‌کننده مهمی برای برخی رفتارهای بیولوژیکی، از جمله فرایندهای تکثیر سلولی هستند که در تشکیل سرطان مهم هستند. هدف از این مطالعه بررسی سطح بیان miR-17-5p و miR-93-5p در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان مجاری پستان در مقایسه با گروه کنترل بود.

مواد و روش‌ها: استخراج RNA (مشمول بر miRNA) از نمونه‌های بافت پستان و پلاسمای متشکل از نمونه‌های سرطانی و نرمال انجام شد. درصد خلوص و غلظت آن‌ها با سنجش میزان جذب نوری تأیید شد. cDNA ساخته شد و سطح بیان miR-17-5p و miR-93-5p به‌صورت نیمه کمی با روش واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از رنگ سایبر گرین در نمونه‌های بافت تومور و پلاسما در قیاس با گروه کنترل نرمال و در حضور نرمال‌کننده SNORD47 بررسی شد. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه ۸/۰/۲ تجزیه و تحلیل شد.

ملاحظات اخلاقی: ملاحظات اخلاقی این مطالعه را کمیته اخلاق مؤسسه پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری با کد (IRAN/52d/4922, 6-10-2016) تأیید کرد. کلیه افراد شرکت‌کننده در مطالعه، فرم رضایت‌نامه جهت استفاده از نمونه‌های بالینی و داده‌های شخصی تحت نظارت پزشک را امضا کردند.

یافته‌ها: میزان بیان miR-17-5p در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به داکتال کارسینوما در مقایسه با گروه کنترل افزایش بیان معناداری را نشان داد به‌طور قابل‌توجهی با مرحله تومور و غدد لنفاوی، وضعیت گیرنده پروژسترون و استروژن ارتباط داشت ($P < 0.001$). این در حالی است که کاهش بیان miR-93-5p در بافت‌های پلاسما و تومور به‌طور قابل‌توجهی با مرحله تومور و درگیری غدد لنفاوی مرتبط است ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش مبین این امر است که بیان بالای miR-17-5p و کاهش بیان miR-93-5p احتمالاً با پیش‌آگهی ضعیف سرطان پستان مرتبط است. با وجود این miR-17-5p به دلیل اختلاف بیان بیشتر و سهولت ردیابی در پلاسما، به‌عنوان یک کاندیدای احتمالی زیست، نشانگر پیش‌آگهی ضعیف بیماری تلقی می‌شود. مطالعات فرجام‌یابی بالینی بیشتر برای تأیید این موضوع لازم است.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۴ مهر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۸ دی ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۱

کلیدواژه‌ها:

پیش‌آگهی، سرطان، نشانگر، miR-17-5p، miR-93-5p

* نویسنده مسئول:

دکتر مهديه سلیمی

نشانی: گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده زیست‌فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

تلفن: +۹۸ (۲۱) ۴۴۷۸۷۳۸۲

پست الکترونیکی: salimi@nigeb.ac.ir

مقدمه

miR-93-5p، عضو خوشه miR-106b-25 است [۱۵]. در مطالعات متعددی، بیان غیرطبیعی miR-93-5p در بسیاری از سرطان‌ها، مثل سرطان‌های معده، روده بزرگ، کبد، کارسینوم هیپاتوسلولار و سرطان ریه گزارش شده است [۱۶، ۱۷] که این امر با کوتاه شدن زمان بقای بیماران ارتباط نزدیکی داشته است [۱۸]. برخی مطالعات نشان دادند افزایش بیان miR-93-5p در سرطان تخمدان با هدف قرار دادن ژن‌های سرکوبگر تومور همچون PTEN در سرطان تخمدان [۱۶] و BRMS1L در کارسینوم آدنوئید غدد اشکی [۱۷] و RB1 و LKB1 در سرطان ریه [۱۹] در افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی و تهاجم نقش دارد [۱۹].

امروزه، تفاوت بیان miRNA در نمونه‌های بافت و مایعات بدن افراد مبتلا به سرطان در مقایسه با افراد سالم تا حد زیادی مورد تأیید دانشمندان قرار گرفته است. miRNAهای در حال گردش (موجود در مایعات)، در واقع از سلول‌های توموری آزاد شدند که در زیست‌کول‌های اگزوزومی و آپوپتوزیس حمل می‌شوند [۱۹].

در مطالعه حاضر، با توجه به اینکه ژن PTEN که یک مهارکننده توموری مؤثر است، هدف مشترک miR-17-5p و miR-93-5p است. از سوی دیگر با عنایت به پیش‌بینی رفتارهای بیولوژیکی مشابه برای این دو miRNA در فرایند گسترش و پیشرفت تومور، برای اولین بار میزان بیان miR-17-5p و miR-93-5p در دو بافت تومور پستان و همچنین پلاسمای افراد مبتلا به سرطان پستان با گروه کنترل منفی آن‌ها مقایسه شد. علاوه بر این، ارتباط سطح بیان این microRNAها و خصوصیات هیستوپاتولوژی تومور، استیج یا مرحله بیماری و وضعیت گیرنده‌های هورمونی به‌منظور بررسی نقش احتمالی مرتبط با سرطان پستان جهت ردیابی سریع‌تر و آسان‌تر بیماری تجزیه و تحلیل شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و گروه‌بندی نمونه‌های مورد آزمایش

به منظور انجام این پژوهش، تمام اصول اخلاقی براساس ضوابط هلسینکی رعایت شده است. رضایت‌نامه کتبی آگاهانه را بیماران و گروه‌های کنترل قبل از نمونه‌گیری امضا کردند. مشخصات بالینی و آسیب‌شناسی بیماران پس از جراحی به دست آمد و یک آسیب‌شناس آن را تأیید شد.

تعداد ۸۰ نمونه پلاسمای (۴۰ مورد از بیماران مبتلا به سرطان پستان و ۴۰ مورد از افرادی که خود و خانواده درجه یک آنان سابقه‌ای از بیماری‌های پستان یا سرطان را گزارش نکردند به‌عنوان گروه کنترل) و ۱۰۰ نمونه بافت پستان (۴۰ بافت توموری پستان و ۴۰ بافت مجاور طبیعی و ۲۰ بافت پستانی بدون ضایعه بافتی از زنانی که تحت عمل جراحی ماموپلاستی قرار گرفتند) از بیمارستان آسیا واقع در تهران در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷

microRNAs، گروهی از RNAهای غیرکدکننده هستند که به‌طور مستقیم عمدتاً ناحیه 3'UTR و به‌ندرت از ناحیه 5'UTR mRNA، ژن‌ها را هدف قرار داده و با سرکوب ترجمه موجب مهار بیان ژن‌ها در سطح پس از رونویسی می‌شوند. از این‌رو به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی ژنوم انسان به آن‌ها توجه شده است [۱]. بسیاری از مطالعات در سراسر جهان نقش عمده‌ای در برخی عملکردهای بیولوژیکی از جمله تکثیر سلولی، آپوپتوز، تهاجم و مهاجرت سلولی را برای miRNAها تأیید کردند [۲]. نقش miRNA در سرطان اولین بار در سال ۲۰۰۲ برای لوسمی شناسایی شد [۳]. مطالعات نشان دادند miRNAها می‌توانند به‌عنوان ژن‌های انکوژن یا سرکوبگر تومور عمل کنند [۴]. OncomiRها گروهی از miRNAها هستند که بیان بیش‌ازحد آن‌ها در بسیاری از تومورها گزارش شده است [۵]. از این‌رو احتمالاً می‌توان از miRNAها به‌عنوان مارکرهای تشخیصی و پیش‌آگهی و همچنین اهداف بالقوه درمانی در سرطان نام برد.

سرطان پستان به‌عنوان یکی از شایع‌ترین سرطان‌هایی است که زنان را در سراسر جهان درگیر می‌کند. به‌طوری‌که میزان شیوع این بیماری در سال ۲۰۱۵ برابر با ۲/۴ میلیون در سطح جهان شناخته شده است [۶]. براساس بررسی‌های سیستماتیک آمار سرطان پستان در ایران، میزان بروز این بیماری حدود ۲۲ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ زن ایرانی است و بیشتر در گروه سنی ۴۰ تا ۴۹ سال گزارش شده است که این عدد یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه‌یافته است [۶]. در بسیاری از مطالعات تغییرات بیان برخی miRNAها، مانند miR-215، miR-195 و Let-7 در miR-299-5p، در نمونه‌های دریافت‌شده قبل و بعد از جراحی در بیماران مبتلا به سرطان پستان مشاهده شده است [۷].

خانواده miR-17-92 یکی از شناخته‌شده‌ترین اعضای miRNA است که به‌عنوان OncomiR شناخته شده است [۸]. miR-18a، miR-19a، miR-19b، miR-20a، miR-92a و miR-17-5p از اعضا خانواده miR-17-92 هستند [۹]. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است miR-17-5p با هدف قرار دادن برخی مولکول‌ها، از جمله p21 [۱۰]، WNT/PTEN، β -catenin [۱۱] و SOCS1 در تنظیم فرایندهای اصلی چرخه سلولی مانند تکثیر، اتوفژی، آپوپتوز و متاستاز در پیشرفت انواع تومورها ایفای نقش می‌کند [۱۲]. از طرفی دیگر، تنظیم نامتعادل miR-17-5p در بسیاری از سرطان‌ها مانند کارسینوم سلول‌های کبدی، سرطان معده، سرطان ریه، سرطان پانکراس و سرطان پروستات [۱۳، ۱۴] گزارش شده است.

1. miRNAs

بررسی آماری

میزان بیان با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. میزان بیان هدف بر مبنای تغییر نسبت به گروه کنترل و نرمالایز شده بر اساس بیان SNORD47، به عنوان کنترل داخلی یا نرمالایزر محاسبه شد. بیان RNA، ۲ برابر و بیشتر افزایش بیان، بین ۰/۵ و ۲ برابر به عنوان نرمال (بدون تغییر بیان) و ۰/۵ برابر و کمتر به عنوان کاهش بیان در نظر گرفته شد.

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸/۰/۲ تجزیه و تحلیل شد. آزمون یو من ویتنی^۸ و کروسکال والیس^۹ برای داده‌های عددی استفاده شد. همبستگی و سازگاری با استفاده از تحلیل همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل شد. داده‌های عددی به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شد. اختلاف آماری در صورت $P < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه توسط کمیته اخلاق مؤسسه پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری^{۱۰} تأیید شد (IRAN 52d/4922, 6.10.2016). کلیه افراد شرکت کننده در مطالعه، فرم رضایت نامه جهت استفاده از نمونه‌های بالینی و داده‌های شخصی تحت نظارت پزشک را امضا کردند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۸۰ نمونه پلاسما (۴۰ بیمار و ۴۰ کنترل نرمال) و ۱۰۰ نمونه بافت پستان (۴۰ بافت توموری، ۴۰ نرمال مجاور تومور و ۲۰ بافت طبیعی پستان حاصل از جراحی ماموپلاستی) بررسی شد. میانگین سنی افراد برای گروه بیمار ۴۵/۹ سال و برای گروه کنترل ۴۸/۵ سال بود و هیچ‌یک از افراد با یکدیگر نسبت خویشاوندی نداشتند. اطلاعات بالینی موجود در پرونده بیماران به صورت طبقه‌بندی شده استفاده شد (جدول شماره ۱).

یافته‌ها مؤید آن است که میانگین بیان miR-17-5p در بافت توموری پستان ($1/89 \pm 6/4$) و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان ($3/27 \pm 2/61$) به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل نرمال افزایش یافته است ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۱). همچنین میانگین بیان miR-93-5p در بافت توموری پستان ($0/34 \pm 0/33$) و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان ($0/57 \pm 0/41$) محاسبه شد که به طور معناداری نسبت به گروه کنترل نرمال کاهش یافته است ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۲). داده‌های آزمون اسپیرمن مؤید وجود همبستگی مثبت بین سطح

جمع‌آوری شدند. نمونه‌های بافتی به لوله‌های کرایو استریل و نمونه‌های خون جهت جداسازی پلاسما به لوله‌های استریل حاوی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید^۲ منتقل شد. نمونه‌های بافت با تانک ازلت مایع و نمونه‌های خون از طریق محفظه‌های یخی به آزمایشگاه انتقال یافت.

استخراج RNA از بافت و پلاسما

پلاسما با استفاده از سانتریفیوژ ۲ مرحله‌ای از خون جدا شد (مرحله اول، ۳۰۰۰ دور در دقیقه^۳، ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه). سپس RNA کامل حاوی miR-NA با توجه به دستورالعمل کیت Sigma-Aldrich Total RNA Purification (کشور آلمان) استخراج شد. غلظت و درصد خلوص RNA از طریق اندازه‌گیری‌های جذب نوری با دستگاه نانودراپ^۴ ۲۰۰۰^۲ تأیید شد.

ساخت cDNA و بررسی بیان با استفاده از روش معکوس-واکنش زنجیرهای پلیمرز در زمان واقعی^۵

از کیت onmiR cDNA kits (شرکت بن یاخته تهران، ایران) برای رونویسی معکوس میکرو RNA استفاده شد. تمام مراحل طبق دستورالعمل‌های کیت انجام شده است و از SNORD47 به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. پس از مرحله ریورس ترانسکریپتاز یا رونوشت معکوس^۶، میزان بیان miRNAها با استفاده از Re-al-time RT-PCR و رنگ سایبرگرین و به صورت مقایسه‌ای و در قیاس با گروه کنترل و در حضور نرمال کننده SNORD47 اندازه‌گیری شد. مجموعه پرایمرها برای تجزیه و تحلیل بیان miRNAها را شرکت فناوری بن یاخته (تهران، ایران) طراحی کرد و ساخت. مجموعه سفارش شده شامل پرایمرهای اختصاصی For-ward برای SNORD47، miR-93-5p، miR-17-5p و پرایمر Reverse مشترک برای تمام miRNAها بود. شرایط دمایی شامل یک مرحله واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه و ۴۰ چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه است. بازده تکثیر برای هر جفت پرایمر با مطالعه منحنی استاندارد خطی حاصل از cDNA تجمیع شده چند نمونه ارزیابی شد. اختصاصیت و دقت پرایمرها مورد تأیید قرار گرفت (۱۰۰ درصد).

7. (California Corporation, USA)

8. Mann-Whitney

9. Kruskal-Wallis

10. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)

2. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

3. Revolutions Per Minute (g = (rpm)²)

4. (NanoDrop 2000) Thermo Scientific, USA

5. RT PCR Real-time

6. Reverse transcriptase (RT)

جدول ۱. اطلاعات بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل (تعداد=۴۰)

میانگین \pm انحراف معیار / تعداد (درصد)		وضعیت کلینیکوپاتولوژی	
کنترل	بیمار		
۴۸/۵۱۶/۴	۴۵/۹۱۱/۶	سن (سال)	
۸۲-۲۵	۸۴-۲۷	محدوده	
۳(۷/۵)		اول	مرحله بیماری در زمان تشخیص
۱۷(۴۲/۵)		دوم	
۱۴(۳۵)		سوم	
۶(۱۵)		چهارم	
۱۸(۴۵)		No	وضعیت درگیری غدد لنفاوی
۲۲(۵۵)		+N	
۵(۱۲/۵)		Yes (۱ استخوان، ۴ ریه)	Distance metastasis
۳۵(۸۷/۵)		No	
۲۴(۶۰)		استروژن مثبت	وضعیت گیرنده‌های هورمونی (IHC)
۱۶(۴۰)		استروژن منفی	
۲۱(۵۲/۵)		پروژسترون مثبت	
۱۹(۴۷/۵)		پروژسترون منفی	
۱۲(۳۰)		+++	HER-۲ وضعیت گیرنده (IHC)
۲۴(۶۰)		منفی	
۴(۱۰)		سرطان سینه سه گانه منفی	

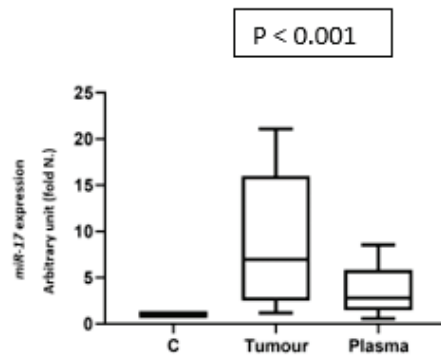


اپیدرال انسانی) مشاهده نشد ($P > 0/05$) (جدول شماره ۲). نتایج حاصل از بررسی miR-93-5p نشان دادند که از نظر آماری ارتباط معناداری بین سطح بیان miR-93-5p در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان با متاستاز غدد لنفاوی و افزایش مرحله تومور وجود دارد. چنانکه با پیشرفت بیماری کاهش سطح بیان miR-93-5p مشاهده شد ($P < 0/001$) (جدول شماره ۲). این در حالی است که ارتباط معنادار آماری بین سایر اطلاعات بالینی بیماران از جمله PR، HER2، TNBC و سطح بیان miR-93-5p در پلاسمای و بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان مشاهده نشد ($P > 0/05$) (جدول شماره ۲).

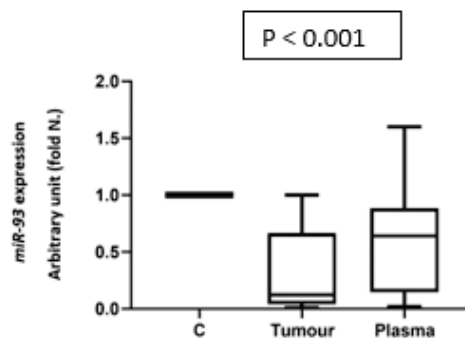
بیان miR-17-5p (تصویر شماره ۳) و miR-93-5p (تصویر شماره ۴) در نمونه‌های پلاسمای و تومور است.

همان‌طور که در جدول شماره ۲ خلاصه شده است، نتایج نشان داد بین سطح بیان miR-17-5p در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان با متاستاز غدد لنفاوی، افزایش مرحله تومور و وضعیت گیرنده‌های استروژن^{۱۱} و پروژسترون^{۱۲} و از لحاظ آماری ارتباط معناداری وجود دارد ($P < 0/001$) (جدول شماره ۲). در صورتی که ارتباط معناداری با وضعیت سرطان سینه سه گانه منفی^{۱۳} و گیرنده فاکتور رشد اپیدرال انسانی^{۱۴} (فقدان هر سه گیرنده استروژن، پروژسترون و گیرنده فاکتور رشد

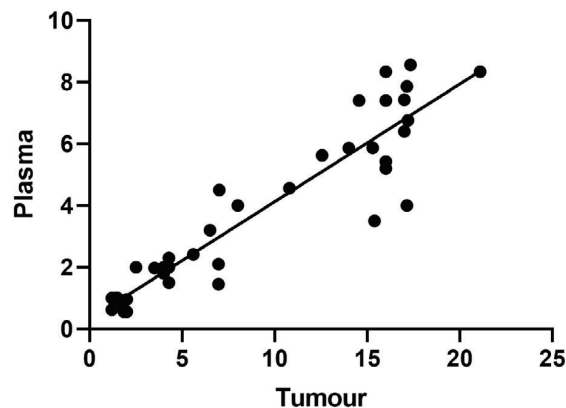
11. Estrogen Receptor (ER)
12. progesterone receptor (PR)
13. Triple-negative Breast Cancer (TNBC)
14. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)



تصویر ۱. سطح بیان miR-17-5p در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل میانگین بیان miR-17-5p در بافت توموری پستان برابر $8/±۸۹۶/۴$ و در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان برابر $۲/۷۲±۲/۶۱$ است. $P < ۰/۰۰۱$ (کالوالیس)

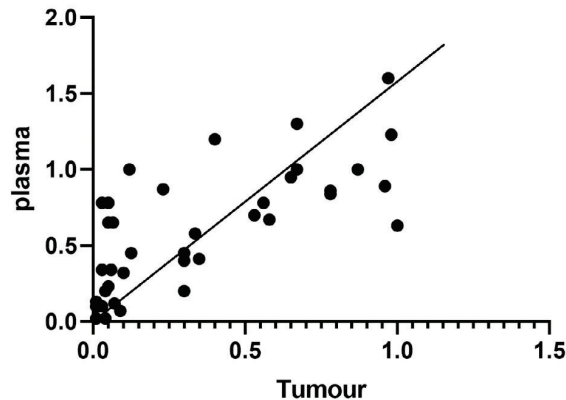


تصویر ۲. سطح بیان miR-93-5p در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل میانگین بیان miR-93-5p در بافت توموری پستان برابر $۰/۳۳±۰/۳۴$ و در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان برابر با $۰/±۵۷۰/۴۱$ است. $P < ۰/۰۰۱$ (کالوالیس)



تصویر ۳. ارتباط همبستگی بیان miR-17-5p در نمونه‌های بافت تومور و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان $R=۰/۹۲$ (اسپیرمن)





تصویر ۴. ارتباط همبستگی بیان miR-93-5p در نمونه‌های بافت تومور و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان (اسپیرمن) $R=0.77$



هدف قرار دادن mRNA p21 میزان تکثیر سلول‌های کارسینوم نازوفارنکس^{۱۵} را افزایش می‌دهد و بیان بالای miR-17-5p یا میزان بیان پایین p21 با پیش‌آگهی ضعیف بیماران کارسینوم نازوفارنکس همراه است [۱۰]. وانگ و همکارانش افزایش سطح miR-17-5p در بافت‌های LSCC و رده‌های سلولی را گزارش کردند. ناک داون شدن miR-17-5p با سرکوب فعال‌سازی مسیر PI3K / AKT باعث کاهش تکثیر سلول LSCC و القای آپوپتوز در شرایط موجود زنده^{۱۶} و شیشه^{۱۷} شد. همچنین آن‌ها مشاهده کردند که سطح بیان miR-17-5p با مرحله درجه‌بندی سرطان سینه^{۱۸} در ارتباط بود. بنابراین میزان بیان بالاتر ممکن است با پیشرفت مرحله تومور مرتبط باشد [۲۶]. لی و همکاران سطح miR-17-5p، miR-93، miR-373، TBP-2 را در بافت‌های سرطانی ریه و بافت‌های طبیعی ریه مجاور آن‌ها بررسی و افزایش بیان miR-17-5p، miR-93، miR-373 را گزارش کردند، در حالی که میزان بیان mRNA TBP-2 در بافت‌های سرطانی ریه در مقایسه با بافت‌های طبیعی ریه مجاور به‌طور قابل توجهی کاهش داشت [۱۳]. چن و همکاران خانواده miR-17-92 جهت تشخیص رتینوبلاستوما^{۱۹} یا گلیومای شبکیه‌ای^{۲۰} در سرم کودکان مبتلا به رتینوبلاستوما را بررسی و گزارش کردند که miR-17-20a، miR-18a، miR-17-5p، miR-3P در سرم کودکان مبتلا به رتینوبلاستوما نسبت به کودکان سالم به‌شدت افزایش بیان داشته است [۲۷]. فو و همکاران میزان همبستگی سطح بیان miRNAهای آگزوزومی را با پیشرفت سرطان کلورکتال یا روده

بحث

علی‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته در تشخیص و درمان سرطان، سرطان پستان همچنان از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان شناخته می‌شود [۲۱،۲۰]. با توجه به پیشرفت تکنیک‌های مولکولی در حوزه تحقیقات تشخیصی زود هنگام بیماری سرطان، miRNAs به‌عنوان فراهم‌کنندگان مکانیسم‌های حساس برای تنظیم بیان دقیق ژن به‌شدت مورد توجه دانشمندان قرار گرفتند [۲۲-۲۴].

در مطالعه حاضر میزان بیان miR-17-5p و miR-93-5p در نمونه‌های بافت توموری پستان و پلاسمای افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل نرمال و همچنین ارتباط میزان بیان miRNAهای مذکور با خصوصیات بالینی و آسیب‌شناسی بیماری بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد میزان بیان miR-17-5p در بافت توموری پستان و همچنین پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با بافت طبیعی و پلاسمای افراد سالم افزایش داشته است. این در حالی است که میزان بیان miR-93-5p در بافت توموری پستان و همچنین پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با بافت طبیعی و پلاسمای افراد سالم کاهش داشته است، اما تغییرات بیان در هر دو miRNA مورد مطالعه به‌طور قابل توجهی با متاستاز به غدد لنفاوی و مرحله تومور در ارتباط است.

در بسیاری از مطالعات، بیان غیر طبیعی خانواده miR-17-92 به‌خصوص miR-17-5p گزارش شده است که با گسترش رشد تومور در بسیاری از سرطان‌ها از جمله HCC، ESCC، CRC، بدخیمی‌های خون‌ساز، سرطان‌های پستان، ریه، گلیوبلاستوما و نوروبلاستوما با هدف قرار دادن کنترل چرخه سلولی همراه بوده است [۲۵،۹]. چن و همکاران نشان دادند miR-17-5p با

15. Nasopharyngeal Carcinoma (NPC)
16. In vitro
17. In vivo
18. Tumor Lymph node Metastasis (TNM)
19. Retinoblastoma (RB)
20. Glioma Retinae

جدول ۲. مقایسه میانگین بیان miR-17-5p و miR-93 در نمونه‌های تومور و پلاسمای بیماران در شرایط مختلف بالینی

پارامتر	میانگین سطح بیان miR-17-5p در نمونه‌های تومور پستان	P	میانگین سطح بیان miR-17-5p در نمونه‌های پلازما	P	میانگین میزان بیان miR-93-5p در بافت‌های تومور پستان	P	میانگین سطح بیان miR-93-5p در نمونه‌های پلازما	P
استروژن مثبت	۱۲/۹۴±۵/۰۸	<۰/۰۰۰۱	۵/۲۹±۲/۲۲	>۰/۰۰۰۱	۰/۳۴±۰/۰۳	۰/۹۰۴۰	۰/۴۸±۰/۴۱	۰/۴۰۴۲
استروژن منفی	۲/۸۱±۱/۵۲		۱/۳۶±۰/۵۹		۰/۳۵±۰/۲۹		۰/۴۷±۰/۳۴	
پروژسترون مثبت	۱۴/۰۹±۴/۲۶	<۰/۰۰۰۱	۵/۸۲±۱/۸۳	>۰/۰۰۰۱	۰/۳۱±۰/۲۷	۰/۷۱۴۳	۰/۵۲±۰/۰۴	۰/۹۹۵۵
پروژسترون منفی	۳/۰۵±۱/۷۲		۱/۴۰±۰/۶۳		۰/۳۷±۰/۳۳		۰/۵۳±۰/۳۸	
گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ +	۸/۸۱ ± ۶/۶۵	۰/۶۲۴۹	۳/۶۸±۲/۶۰	۰/۸۶۲۱	۰/۳۳±۰/۲۷	۰/۹۵۰۹	۰/۶۱±۰/۳۸	۰/۷۲۸۶
گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ -	۹/۲۸±۶/۷۲		۳/۹۲±۲/۷۹		۰/۳۲±۰/۲۷		۰/۵۶±۰/۴۰	
سرطان سینه سه گانه منفی	۴/۸۸±۱/۲	۰/۴۹۲۱	۱/۹±۰/۲۳	۰/۳۴	۰/۴۸±۰/۳۵	۰/۲۷۳۱	۰/۵۴±۰/۰۴	۰/۹۳۸۸
سرطان سینه غیر سه گانه منفی	۹/۳۳±۶/۵۹		۳/۹۲±۲/۶۷		۰/۳۳±۰/۰۳		۰/۵۷±۰/۴۱	
غدد لنفاوی +	۱۳/۶۵±۴/۶۴	<۰/۰۰۰۱	۵/۶۴±۱/۹۵	>۰/۰۰۰۱	۰/۱۳±۰/۰۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۳۷±۰/۳۶	<۰/۰۰۰۱
غدد لنفاوی -	۲/۹۸±۱/۷۴		۱/۳۷±۰/۶۳		۰/۶۵±۰/۲۶		۰/۸۳±۰/۳۲	
مرحله اول	۱/۳۷±۰/۱۲	۰/۰۰۱۱	۱/۱۶±۰/۲۳	۰/۴۲۸	۰/۹۸±۰/۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۹۱±۰/۲۴	<۰/۰۰۰۱
مرحله دوم	۶/۲۱±۳/۹۸		۲/۷۶±۱/۵۱		۰/۵۳±۰/۲۶		۰/۸۴±۰/۳۲	
مرحله سوم	۱۰/۱۱±۶/۷۹		۴/۴۷±۳/۱۴		۰/۱۶±۰/۰۹		۰/۳۵±۰/۳۵	
مرحله چهارم	۱۷/۱±۱/۸۸		۵/۹۶±۱/۹۱		۰/۰۱±۰/۰۰۸		۰/۲۴±۰/۲۶	



انسان^{۲۲} را بررسی و گزارش کردند که بافت‌های سرطانی پستان سه گانه منفی با سطح بالاتری از miR-93-5p، تراکم عروق خونی بیشتری را نشان می‌دهند و بیان بیش‌ازحد miR-93-5p، تکثیر سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان را تسریع کرده و باعث تشکیل لومن و جوانه زدن آن‌ها در موجود زنده شده است [۳۰]. فانگ و همکاران با بررسی miR-93 در سرم بیماران مبتلا به سرطان رحم، افزایش سطح بیان miRNA-93 را مشاهده کردند که با مرحله‌بندی تومور و رفتارهای کلینیکوپاتولوژیک و متاستاز غدد لنفاوی ارتباط داشت [۳۱]. از سوی دیگر فانگ و همکاران گزارش کردند miR-93-5p با سرکوب بیان LATS2 در آستروسیتوما می‌تواند باعث رگ‌زایی و متاستاز در تومور شود [۳۲]. فابری و همکاران گزارش کردند miR-93 با ترشح پنبلی

بزرگ^{۲۱} در سرم افراد کنترل و بیماران مبتلا به CRC بررسی کردند و گزارش کردند که در بین miRNAهای موردبررسی، تنظیم دو miRNA (miR-17-5p, miR-92a-3p) به‌طور قابل توجهی در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ مختل شده است. همچنین افزایش بیان miR-17-5p در بیماران سرطان روده بزرگ با متاستاز دور و مراحل بالینی بالاتر در ارتباط بود [۲۸].

در مطالعات متعددی مانند مطالعه جیانگ و همکاران، گزارش شد که افزایش بیان miR-93 با مرحله تومور و متاستاز غدد لنفاوی در ارتباط بوده است [۲۹]. لیانگ و همکاران نقش miR-93-5p در تنظیم عملکرد سلول‌های اندوتلیال ورید ناف

22. HUVECs

21. Colorectal Cancer (CRC)

حامی مالی

این پروژه را پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی پشتیبانی کرد.

مشارکت نویسندگان

اجرا و جمع‌آوری داده‌ها و نگارش پیش‌نویس مقاله: آندیا سیدی مقدم؛ طراحی ایده پروژه، نظارت بر اجرا، آنالیز نتایج و نهایی کردن مقاله: مهدیه سلیمی؛ مشاوره علمی: نجمه رنجی و حسین مزارانی؛ کمک به تأمین نمونه‌های بالینی: حسین مزارانی؛ طراحی، جمع‌آوری نمونه و نگارش پژوهش: تمامی نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری دکتر پریسا عظیم نژادان تقدیر و تشکر می‌کنند.

از سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و فاکتورهای رشد را که در آنژیوژنز در گلیوم‌ها از طریق سرکوب IL-8 و VEGF نقش دارند، تنظیم می‌کند [۳۳]. گزارش شده است miR-93-5p به‌طور قابل توجهی از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند و باعث توقف چرخه سلولی G1S می‌شود. علاوه بر این، ۲ انکوژن به‌خوبی تثبیت شدند، E2F1 و CCND1، به‌عنوان اهداف دوگانه miR-93 شناسایی شدند [۳۴]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد افزایش بیان miR-17-5p در بافت توموری پستان و پلاسمای بیماران با گیرنده استروژن مثبت و پروژسترون مثبت نسبت به بیماران گیرنده استروژن منفی و پروژسترون منفی و همچنین مرحله‌بندی تومور و متاستاز به غدد لنفاوی به‌طور قابل توجهی ارتباط معناداری دارد.

میزان بیان miR-17-5p در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به داکتال کارسینوما در مقایسه با گروه کنترل افزایش بیان معناداری را نشان داد، به‌طور قابل توجهی با مرحله تومور و غدد لنفاوی، وضعیت گیرنده استروژن و پروژسترون ارتباط داشت ($P < 0.001$). این در حالی است که کاهش بیان miR-93-5p در بافت‌های پلازما و تومور به‌طور قابل توجهی با مرحله تومور و درگیری غدد لنفاوی مرتبط است ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش مبین این امر است که بیان بالای miR-17-5p و کاهش بیان miR-93-5p احتمالاً با پیش‌آگهی ضعیف سرطان پستان مرتبط است. با این حال، miR-17-5p به‌دلیل اختلاف بیان بیشتر و سهولت ردیابی در پلازما، به‌عنوان یک کاندیدای احتمالی زیست، نشانگر پیش‌آگهی ضعیف بیماری تلقی می‌شود.

با عنایت به محدودیت تعداد نمونه‌ها، افزایش حجم نمونه و انجام مطالعات فرجام‌یابی بالینی یا پیگیری^{۳۳} وضعیت بالینی بیماران جهت تأیید نقش پیش‌آگهی ضعیف miRNA‌های موردبررسی پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

ملاحظات اخلاقی این مطالعه را کمیته اخلاق پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی^{۳۴} تأیید کرده است (IRAN 52d/4922, 6.10.2016). کلیه افراد شرکت‌کننده در مطالعه، فرم رضایت‌نامه جهت استفاده از نمونه‌های بالینی و داده‌های شخصی تحت نظارت پزشک را امضا کردند.

23. Follow up

24. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)

References

- [1] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:402. [DOI:10.3389/fendo.2018.00402] [PMID] [PMCID]
- [2] Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016; 1:15004. [DOI:10.1038/sigtrans.2015.4] [PMID] [PMCID]
- [3] Shamsizadeh S, Goliaei S, Razaghi Moghadam Z. CAMIRADA: Cancer microRNA association discovery algorithm, a case study on breast cancer. *J Biomed Inform*. 2019; 94:103180. [DOI:10.1016/j.jbi.2019.103180] [PMID]
- [4] Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007; 302(1):1-12. [DOI:10.1016/j.ydbio.2006.08.028] [PMID]
- [5] Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Res*. 2016; 76(13):3666-70. [DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-0359] [PMID] [PMCID]
- [6] Mohammadi E, Aminorroaya A, Fattahi N, Azadnajafabad S, Rezaei N, Farzi N, et al. Epidemiologic pattern of cancers in Iran; current knowledge and future perspective. *J Diabetes Metab Disord*. 2020; 20(1):825-9. [DOI:10.1007/s40200-020-00654-6] [PMID] [PMCID]
- [7] Filipów S, Łączmański Ł. Blood circulating miRNAs as cancer biomarkers for diagnosis and surgical treatment response. *Front Genet*. 2019; 10:169. [DOI:10.3389/fgene.2019.00169] [PMID] [PMCID]
- [8] Bai X, Hua S, Zhang J, Xu S. The microRNA family both in normal development and in different diseases: The miR-17-92 Cluster. *Biomed Res Int*. 2019; 2019:9450240. [DOI:10.1155/2019/9450240] [PMID] [PMCID]
- [9] Liu F, Zhang F, Li X, Liu Q, Liu W, Song P, et al. Prognostic role of miR-17-92 family in human cancers: Evaluation of multiple prognostic outcomes. *Oncotarget*. 2017; 8(40):69125-38. [DOI:10.18632/oncotarget.19096] [PMID] [PMCID]
- [10] Chen Ch, Lu Z, Yang J, Hao W, Qin Y, Wang H, et al. MiR-17-5p promotes cancer cell proliferation and tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma by targeting p21. *Cancer Med*. 2016; 5(12):3489-99. [DOI:10.1002/cam4.863] [PMID] [PMCID]
- [11] Li Zh, Peng Zh, Gu S, Zheng J, Feng D, Qin Q, et al. Global analysis of miRNA-mRNA interaction network in breast cancer with brain metastasis. *Anticancer Res*. 2017; 37(8):4455-68. [DOI:10.21873/anticancer.11841]
- [12] Bobbili MR, Mader RM, Grillari J, Dellago H. OncomiR-17-5p: Alarm signal in cancer? *Oncotarget*. 2017; 8(41):71206-22. [DOI:10.18632/oncotarget.19331] [PMID] [PMCID]
- [13] Li Y, Liang M, Zhang Y, Yuan B, Gao W, Shi Zh, et al. miR-93, miR-373, and miR-17-5p negatively regulate the expression of TBP2 in lung cancer. *Front Oncol*. 2020; 10:526. [DOI:10.3389/fonc.2020.00526] [PMID] [PMCID]
- [14] Cloonan N, Brown M K, Steptoe A L, Wani Sh, Chan Ling, Forrest A RR, et al. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol*. 2008; 9(8):R127. [PMCID] [DOI:10.1186/gb-2008-9-8-r127] [PMID] [PMCID]
- [15] Fang L, Wang X, Sun B, Zhang X, Zhu X, Yu Z, et al. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). *Int J Mol Med*. 2017; 40(6):1624-30. [DOI:10.3892/ijmm.2017.3164]
- [16] Liu MX, Liao J, Xie M, Gao ZK, Wang XH, Zhang Y, et al. miR-93-5p transferred by exosomes promotes the proliferation of esophageal cancer cells via intercellular communication by targeting PTEN. *Biomed Environ Sci*. 2018; 31(3):171-85. [DOI:10.3967/bes2018.023] [PMID]
- [17] Hao J, Jin X, Shi Y, Zhang H. miR-93-5p enhance lacrimal gland adenoid cystic carcinoma cell tumorigenesis by targeting BRMS1L. *Cancer Cell Int*. 2018; 18:72. [DOI:10.1186/s12935-018-0552-9] [PMID] [PMCID]
- [18] Yang W, Bai J, Liu D, Wang Sh, Zhao N, Che R, et al. MiR-93-5p up-regulation is involved in non-small cell lung cancer cells proliferation and migration and poor prognosis. *Gene*. 2018; 647:13-20. [DOI:10.1016/j.gene.2018.01.024] [PMID]
- [19] Shan X, Zhang H, Zhang L, Zhou X, Wang T, Zhang J, et al. Identification of four plasma microRNAs as potential biomarkers in the diagnosis of male lung squamous cell carcinoma patients in China. *Cancer Med*. 2018; 7(6):2370-81. [DOI:10.1002/cam4.1490] [PMID] [PMCID]
- [20] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnani M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5(1):66. [DOI:10.1038/s41572-019-0111-2] [PMID]
- [21] Sun Y, Zhao Z, Yang Z, Xu F, Lu H, Zhu Z, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*. 2017; 13(11):1387-97. [DOI:10.7150/ijbs.21635] [PMID] [PMCID]
- [22] 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(1):15-20. [DOI:10.1016/j.cell.2004.12.035] [PMID]
- [23] Xu W, Yang M, Gao M. MiR-21-3p and miR-21-5p in tumor tissue as diagnostic biomarkers for gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016; 9(7):7195-201. [Link]
- [24] Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scot G K, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer*. 2006; 5:24. [DOI:10.1186/1476-4598-5-24] [PMID] [PMCID]
- [25] Lu S, Wang S, Geng S, Ma S, Liang Z, Jiao B. Increased expression of microRNA-17 predicts poor prognosis in human glioma. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:970761. [DOI:10.1155/2012/970761] [PMID] [PMCID]
- [26] Wang J X, Jia X J, Liu Y, Dong J H, Ren X M, Xu O, et al. Silencing of miR-17-5p suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis by directly targeting PIK3R1 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2020; 20:14. [DOI:10.1186/s12935-020-1096-3] [PMID] [PMCID]
- [27] Chen YZ, Liu ZP, Zhou KY, Li B. [Value of serum miR-17-92 cluster in diagnosis of retinoblastoma (Chinese)]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2017; 19(7):776-80. [PMID] [PMCID]
- [28] Fu F, Jiang W, Zhou L, Chen Z. Circulating exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p predict pathologic stage and grade of colorectal cancer. *Transl Oncol*. 2018; 11(2):221-32. [DOI:10.1016/j.tranon.2017.12.012] [PMID] [PMCID]
- [29] Jiang H, Bu Q, Zeng M, Xia D, Wu A. MicroRNA-93 promotes bladder cancer proliferation and invasion by targeting PEDF. *Urol Oncol*. 2019; 37(2):150-7. [DOI:10.1016/j.urolonc.2018.08.001] [PMID]

- [30] Liang L, Zhao L, Zan Y, Zhu Q, Ren J, Zhao X. MiR-93-5p enhances growth and angiogenesis capacity of HUVECs by down-regulating EPLIN. *Oncotarget*. 2017; 8(63):107033-43. [DOI:10.18632/oncotarget.22300] [PMID] [PMCID]
- [31] Fang S, Gao M, Xiong S, Chen Q, Zhang H. Expression of serum Hsa-miR-93 in uterine cancer and its clinical significance. *Oncol Lett*. 2018; 15(6):9896-900. [DOI:10.3892/ol.2018.8553] [PMID] [PMCID]
- [32] Fang L, Du WW, Yang W, Rutnam ZJ, Peng C, Li H, et al. MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle*. 2012; 11:4352-65. [DOI:10.4161/cc.22670] [PMID] [PMCID]
- [33] Fabbri E, Brognara E, Montagner G, Ghimenton C, Eccher A, Cantùet CM et al. Regulation of IL-8 gene expression in gliomas by microRNA miR-93. *BMC Cancer*. 2015; 15:661. [DOI:10.1186/s12885-015-1659-1] [PMID] [PMCID]
- [34] Bao C, Chen J, Chen D, Lu Y, Lou W, Ding B, et al. MiR-93 suppresses tumorigenesis and enhances chemosensitivity of breast cancer via dual targeting E2F1 and CCND1. *Cell Death Dis*. 2020; 11(8):618. [DOI:10.1038/s41419-020-02855-6] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank