



2014년 2월 박사학위논문

사람 구강암세포 KB에서 microRNA 발현 분석

조선대학교 대학원

치의생명공학과

모 신 엽

2 0 1 4 년 2 월 박사학위논문 사람 구강암세포 KB에서 microRNA 발현 분 석

모 신

엽

사람 구강암세포 KB에서 microRNA 발현 분석

Analysis of microRNA expression in KB human oral cancer cells

2014년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

모 신 엽

사람 구강암세포 KB에서 microRNA 발현 분석

지도교수 김 도 경

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2013년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

모 신 엽

모신엽의 박사학위 논문을 인준함

위욱	신장	조선대학교	교	수	김	00	중	인
위	원	조선대학교	교	수	전	제	열	인
위	원	조선대학교	교	수	김	진	수	인
위	원	조선대학교	교	수	힘	성	하고	શે
위	원	조선대학교	교	수	김	도	경	인

2013년 12월

조선대학교 대학원

	7
,	

I. 서론 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	······ 1
---	----------

Π	. 실험재료 및 방법	3
	1. 실험재료	3
	2. 세포배양	3
	3. MicroRNA(miRNA) 추출 ······	4
	4. miRNA microarray 및 결과분석 ······	4
	5. 정량 PCR 분석	5
	6. Vector 제작	6
	7. MTT 분석	9
	8. 유전자 array 및 결과분석	9
	9. 실험자료의 통계학적 검정	10

11		실험결과	Ш.
11	rray 분석 ·····	NHOK와 KB세포의 miRNA microarray	1
11	의한 miRNA 발현 분석	NHOK와 KB세포에서 정량 PCR에 의한	2
16	고	KB 세포성장에 미치는 miRNA의 효과	3
16		유전자 array 분석 ······	4

IV.	총괄	및 그	고안	 24
v.	결론	•••••		 28
VI.	참고	문헌		 29

표 목 차

Table 1.	miRNA primer sequences for quantitative real-time PCR analysis
Table 2.	The full sequences and primer sequences of miRNAs for vector construction
Table 3.	miRNAs up-regulated in KB cells in comparison to NHOK
Table 4.	miRNAs down-regulated in KB cells in comparison to NHOK
Table 5.	Genes up-regulated in KB cells treated with miR-205 in comparison to non-treated KB cells
Table 6.	Genes down-regulated in KB cells treated with miR-205 in comparison to non-treated KB cells
Table 7.	Genes up-regulated in KB cells treated with miR-203 in comparison to non-treated KB cells
Table 8.	Genes down-regulated in KB cells treated with miR-203 in comparison to non-treated KB cells

도목차

Fig. 1. The map of pSUPER basic vector (Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA)

Fig. 5. The effect of miR-203 on the cell viability in KB cells19

ABSTRACT

Analysis of microRNA expression in KB human oral cancer cells

Mo, Shin-Yeob

Advisor: Prof. Kim, Do Kyung, Ph.D. Department of Biodental Engineering, Graduate School of Chosun University

MicroRNAs (miRNAs) are form of small noncoding RNAs that regulate the expression of genes either by inhibiting mRNA translation or by inducing its degradation. Small microRNAs play important roles in regulating a large number of cellular processes, including development, proliferation and apoptosis. Moreover, miRNAs function as oncogenes or tumor suppressors to modulate multiple oncogenic cellular processes in cancer development, cell proliferation, apoptosis, invasion and metastasis of human cancers. In this study, the expression profiles of miRNAs were compared and analyzed for establishment of miRNAs related cancer cell growth inhibition in normal human oral keratinocytes (NHOK) and KB human oral cancer cells.

To determine the expression profiles of miRNAs in NHOK and KB cells, it was examined by miRNA microarray analysis, quantitative real-time PCR analysis (qRT-PCR), MTT assay and gene array analysis.

In miRNA microarray analysis, 164 miRNAs and 149 miRNAs were found upand down-regulated in KB cells compared to NHOK among the 1,769 miRNAs examined, respectively. miR-30a, miR-99a and miR-155 were up-regulated in KB cells compared to NHOK more than 10 times, in contrast miR-205, miR-203 and miR-200c were down-regulated more than 10 times. In qRT-PCR analysis, the expression levels of miR-30a, miR-99a and miR-155 were increased in KB cells compared to NHOK more than 15 times, and miR-205, miR-203 and miR-200c were decreased more than 10 times. Importantly, the overexpression of miR-205 and miR-203 significantly inhibited the growth of KB cells. In gene array analysis, 3,154 genes and 2,709 genes were found up- and down-regulated more than 2 times in the miR-205 overexpressed-KB cells compared to control KB cells, respectively. The overexpressed miR-203 in KB cells induced the increase of 2,707 gene expressions and decrease of 2,352 gene expressions.

These results show that the miR-205 and miR-203 decrease in KB cells compared to NHOK, and inhibit proliferation of KB human oral cancer cells. Moreover, these *in vitro* results indicate miR-205 and miR-203 have significant therapeutic potential as the molecular medicine for the treatment of oral cancer by turning on silenced tumor suppressor genes by targeting with miRNA.

KEY WORDS: MicroRNA (miRNA), NHOK, KB human oral cancer cells,

Cell death, Anti-cancer therapy

– vi –

I. 서 론

마이크로 RNA(microRNA, miRNA, miR)는 종 사이에 진화적으로 잘 보존되어 있 고, 그 크기가 21-25개의 염기에 불과한 극히 작은 noncoding RNA 분자이다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009). 주로 표적 유전자의 3'-UTR 결합부위에 상보적인 염기서열을 가지고 있으며, RNA 간섭 방식으로 그 표적유전자의 단백 합성을 억제하 거나 촉진시키는 기능을 갖는다(Majid et al., 2010; Li et al., 2011; Nishida et al., 2011). 또한 miRNA는 진핵세포 내에서 많은 유전자를 조절함으로써 세포분화, 성장, 증식 등 다양한 생명현상에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 여러 악성종양에서 특이적 발현양상을 보여 종양유전자 혹은 종양억제 유전자의 활성을 조절함으로서 발 암과정에 관여하는 것으로 알려져 있다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009; Majid et al., 2010; Li et al., 2011; Nishida et al., 2011).

암과 관련된 miRNA를 oncogenic miRNA라 하며 최근 여러 종양에서의 oncogenic miRNA 발현 분석 정보들은 다양한 암의 조기진단, 예후측정에 있어 임상 응용가능성 을 시사하고 있다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009). miRNA의 발현 변화가 종양의 초기와 진행단계에서 매우 중요하다는 실험결과가 최근 발표되고 있으며, 종양 에서 miRNA의 비정상적인 발현은 염색체 결손, 증폭, point mutation과 같은 유전적 인 원인 또는 비정상적인 DNA 메틸화 등과 같은 후생유전에 의한 것으로 알려져 있 다(Chen and Lodish, 2005; Cimmino et al., 2005; Calin and Croce, 2006). miRNA는 유전자 조절 기전들 중 비교적 최근에 알려졌고, 그 작용기전과 표적하는 유전자가 최 근 들어 많이 밝혀지고 있으며, 그 기능에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다 (Cho, 2007; Nervi et al., 2007; Hermeking, 2009; Tili et al., 2009; Albinsson and Sessa, 2010; Chen et al., 2011; Osada and Takahashi, 2011; Pan et al., 2011). 따라서 향후 miRNA 제어에 의한 종양 관련 유전자 발현조절은 매우 중요한 종양 조기진단, 치료 및 예후측정 방법으로 자리매김할 것으로 예상하고 있다(Urbich et al., 2008; Meister and Schmidt, 2010).

Microarray란 하나의 칩 안에 서로 다른 많은 유전자를 고밀도로 집적시켜, 수많은 유전자들의 발현양을 동시에 계측하여 유전자 발현 정보를 수집하는 연구방법이다. 이 방법은 기존의 서던 블롯이나 노던 블롯과 비슷하지만, 하나의 칩 안에 많은 유전자가 부착되어 있어 많은 종류의 유전자를 동시에 분석할 수 있고 소량의 시료로 실험이 가 능하다는 장점이 있어, 최근에 유전자 발현 분석에 널리 이용되고 있다.

보건복지부의 우리나라 암 등록 조사자료 분석보고서에 의하면, 우리나라에서 1년 에 약 1200 -1500명의 구강암 환자가 발생하는 것으로 추정된다. 구강암은 인체에 발 생되는 암의 약 4-5%를 차지하고 있으며 95% 이상이 편평세포암종으로, 흡연, 음주, 만성적 자극, HPV 바이러스 감염 등을 원인으로 생각하고 있다(Todd et al., 1997; Notani, 2000). 특히 구강암은 예후가 좋지 않고, 환자의 평균 5년 생존율이 약 40-60%로 알려져 있으다(Todd et al., 1997; Notani, 2000). 구강암은 쉽게 생검할 수 있고 치료효과의 모니터링이 다른 부분의 암과 달리 간편하여 화학방사선요법 혹은 유 전자 치료법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있음에도 불구하고, 구강암은 다른 암에 비해 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 되어있지 않은 암 중의 하나이다(Kim et al., 2013). 또한 miRNA는 컴퓨터 데이터베이스 상으로 다양한 표적유전자가 예측되어 있으며 최근 들어 그 기능이나 표적유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 구 강암에서 miRNA 관련 연구는 그 연구가 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 정상 사람 구강각화세포와 구강암세포주 KB에서 miRNA들 의 발현을 비교.분석하여 구강암 특이 miRNA를 확립하고, miRNA 제어에 따른 구 강암세포의 성장과 증식에 관련된 기초자료를 제시하고자 하였다.

- 2 -

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

MiRNeasy mini kit, Miscript reverse transcription kit, Miscript SYBR green PCR kit 및 Attractene transfection reagent는 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서 구입 하여 사용하였고, pSUPER basic vector는 Oligoengine Inc.(Seattle, Washington, USA)에서 구입하여 사용하였다. Gene array를 위한 Agilent's low RNA input linear amplification kit plus, Agilent's gene expression hybridization kit, Agilent's gene expression wash buffer kit 및 Agilent human gene expression kit는 Affymetrix(Fremont, CA, USA)에서 구입하였다. N-methylthiotetrazole(MTT)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

사람 구강암 세포주 KB와 사람의 정상 구강각화세포(normal human oral keratinocytes, NHOK)는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)과 ScienCell Research Laboratories(Carlsbad, CA, USA)에서 각각 분양받아 실 험에 이용하였다.

2. 세포배양

사람의 정상 구강각화세포 NHOK는 supplementary growth factor bullet kit (Clonetics Corp., San Diego, CA, USA) 및 항생제(100u/ml penicillinm, 100µg/ml streptomysin)가 함유된 37° C의 성장배지(KGM) 하에서 배양하면서 실험에 이용하였으 며, 사람 구강암세포 KB는 5% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 및 항생제(100u/ml penicillinm, 100µg/ml streptomysin)가 함유된 37° C의 성장배 지(MEM + 1% non-essential amino acids) 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다.

3. MicroRNA(miRNA) 추출

NHOK와 KB 세포에서 miRNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하 여 제조사의 지시에 따라 miRNA를 분리하고 정제하였다. 요약하면, 각 세포가 들어있 는 1.5ml tube에 700µl의 lysis reagent를 넣어 충분히 균질화 시키고 상온에서 5분 동 안 반응시킨 후, 140µl의 chloroform을 첨가하여 15초간 혼합하였다. 상온에서 3분 동 안 반응시킨 후, 4℃에서 15분간 12,000 x g로 원심분리 하였다. 상층액을 mini column으로 이동시켜 8,000 x g로 15초간 원심분리한 후, RWT buffer와 RPE buffer 를 각각 처리하고 8,000 x g로 원심분리하여 miRNA 시료를 세척하였다. 시료가 들어 있는 mini column을 RNA용 수집 tube로 이동시킨 후, 8,000 x g에서 1분간 원심분리 하여 miRNA를 추출하였다. 추출한 miRNA를 Biophotometer(Eppendorf, Hamburg, Germany)로 정량한 후 실험에 이용하였다.

4. miRNA microarray 및 결과분석

NHOK와 KB 세포에서 miRNA 발현양상을 microarray 분석으로 확인하였다. NHOK와 KB 세포에서 miRNA를 추출하여 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 각 세포별 miRNA microarray 영상 을 스캔하였으며, 신호강도는 20-100 사이, 노이즈 강도는 5 이하인 조건을 만족하는 범위에서 실험을 진행하였다. Affymetrix GCOS software(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 microarray 결과를 분석하였으며, 각 세포별 microarray 결과를 plot 으로 나타내어 전체 데이터의 신호강도 분포를 확인하였다.

5. 정량 PCR 분석

miRNA microarray 결과 중, NHOK와 KB 세포와 비교하였을 때 그 발현의 차가 큰 miRNA들(miR-30a, miR-99a, miR-155, miR-205, miR-203, miR-200c)을 정량 PCR 분석으로 재확인하였다. miScript Reverse Transcription kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 miRNA 1µg, RTase mix 0.5µℓ 및 RT buffer 2µℓ를 혼합한 후, 전체 부피가 10µℓ가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였으 며, 37℃에서 60분간 반응시키고 95℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성 한 cDNA를 miScript SYBR Green PCR kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 cDNA 3ng, SYBR Green master mix 10µℓ, universal primer 1µℓ 및 각 miRNA primer 1µℓ를 혼합한 후, 전체 부피가 20µℓ가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였 다. ExicyclerTM 96(Bioneer co., Daejeon, Korea)을 이용하여 95℃에서 15분간 반응시 킨 후, 94℃에서 15초, 55℃에서 30초, 70℃에서 30초를 45회 반복하여 반응시켰다. 정 량 PCR 결과를 qcalculator 1.0 program(Institut of Pharmacology & Toxicology, University of Bonn, Bonn, Germany)을 이용하여 Ct 값에 따른 miRNA양을 정량적으 로 계산하여 분석하였다. 정량을 위한 내부 대조군(internal control)으로는 u6를 이용 하였으며, PCR 분석에 사용된 각 miRNA primer는 Table 1에 나타내었다.

miRNAs	Primer sequences
miR-30a	TGTAAACATCCTCGACTGGAA
miR-99a	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG
miR-155	TAATGCTAATCGTGATAGGGG
miR-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCT
miR-203	GTGAAATGTTTAGGACCACTA
miRr-200c	AATACTGCCGGGTAATGATGG
u6	CGCAAGGATGACACGCAAATT

Table 1. miRNA primer sequences for quantitative real-time PCR analysis

6. Vector 제작

각 miRNA가 삽입된 클론을 위해, pSUPER basic vector(Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA)(Fig. 1)를 이용하여 miRNA 염기서열을 포함하는 vector를 제작하였다. 선 별된 miRNA를 클로닝하기 위해, 각 miRNA를 제조할 수 있는 primer(Table 2)를 제 작하여 non-template PCR을 수행하였다. PCR 생산물(insert oligo)과 pSUPER basic vector를 제한효소 Bgl II(AGATCT)와 Xho I(GAGCTC)으로 각각 절단한 후, T4 DNA ligase를 이용하여 miRNA 염기서열을 vector에 접합시켰다. 재조합 된 vector를 competent cell(DH-5a)에 transformation 시킨 후, 항생제 ampicillin이 포함된 LB agar plate에 콜로니를 배양하여 플라스미드(vector)를 분리하고 그 염기서열을 확인하 였으며, 정확한 miRNA 염기서열을 보유한 재조합 vector를 선별하여 실험에 이용하였 다.



Fig. 1. The map of pSUPER basic vector (Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA)

miRNAs	Full sequence of miRNAs	Primer sequences of miRNAs
		Forward : AGCAGATCTAAAGATCCT
	AAAGATCCTCAGACAAT CCATGTGCTTCTCTTGTC CTTCATTCCACCGGAGTC TGTCTCATACCCAACCAG ATTTCAGTGGAGTGAAG TTCAGGAGGCATGGAGCT GACA	CAGACAATCCATGTGCTT CTCTTGTCCTTCATTCCAC CGGAGTCTGTC
miR-205		Reverse : GACCTCGAGTGTCAGCTCC ATGCCTCCTGAACTTCACT CCACTGAAATCTGGTTGG GTATGAGACAGACTCCGG TGG
miR-203	GTGTTGGGGACTCGCGCG CTGGGTCCAGTGGTTCTT AACAGTTCAACAGTTCT GTAGCGCAATTGTGAAA TGTTTAGGACCACTAGAC CCGGCGGGGCGCGGCGACA GCGA	Forward : AGCAGATCTGTGTTGGGG ACTCGCGCGCTGGGTCCAG TGGTTCTTAACAGTTCAA CAGTTCTGTAGCGCAA Reverse : GACCTCGAGTCGCTGTCGC CGCGCCCGCCGGGTCTAGT GGTCCTAAACATTTCACA ATTGCGCTACAGAACTG

Table 2. The full sequences and primer sequences of miRNAs for vector construction

7. MTT 분석

miRNA에 의한 구강암세포 성장 억제효과를 관찰하기 위해, 24well plate에 4 x 10⁴ cells/well의 KB 세포를 접종하였으며, 24시간 배양한 후 새로운 배양배지로 교환 하였다. Attractene Transfection reagent(Qiagen, Valencia, CA, USA) 1.5µl와 miRNA 염기서열이 삽입된 재조합 vector(2ng/ml, 20ng/ml, 200ng/ml)를 혼합하여 상 온에서 15분간 반응 시킨 후, KB 세포에 처리하여 24, 48 및 72시간 동안 배양하였으 며, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT는 KB 세포에 MTT 용액 (MTT 최종농도 0.5µg/µl)을 37℃에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

8. 유전자 array 및 결과분석

KB 세포에서 miR-205와 miR-203 처리에 의한 유전자들의 발현양상을 유전자 array 분석으로 확인하였다. 요약하면, 세포배양 24well plate에 4 x 104 cells/well의 KB 세포를 접종하였으며, 24시간 배양한 후 새로운 배양배지로 교환하였다. Attractene Transfection reagent(Qiagen, Valencia, CA, USA) 1.5µℓ와 miRNA 염기서 열이 삽입된 재조합 vector(200ng/ml)를 혼합하여 상온에서 15분간 반응 시켰으며, KB 세포에 처리하여 72시간 동안 배양한 후 mRNA를 추출하였다. Agilent's low RNA input linear amplification kit PLUS(Affymetrix, Fremont, CA, USA)와 Agilent's gene expression hybridization kit(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 제조 사의 지시에 따라 각 시료를 증폭하고 표지한 후 융합반응 하였다. 융합반응 한 시료 를 Agilent's DNA microarray scanner(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 각 시료별 유전자 array 영상을 스캔하였으며, 신호강도는 20-100 사이, 노이즈 강도는 5 이하인 조건을 만족하는 범위에서 실험을 진행하였다. Feature Extraction software(Affymetrix, Fremont, CA, USA)와 GeneSpring software(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 유전자 array 영상을 분석하였으며, 각 시료별 결과를 plot으로 나타내어 전체 데이터의 신호강도 분포를 확인하였다.

9. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만(p<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 실 험 결 과

1. NHOK와 KB 세포의 miRNA microarray 분석

NHOK와 KB 세포에서 miRNA 발현양상을 microarray 분석으로 확인하였다. NHOK와 KB 세포에서 총 1,769개의 miRNA를 비교.분석한 결과, 정상 구강각화세포 인 NHOK와 비교하여 구강암 세포주인 KB에서 164개의 miRNA가 그 발현이 증가하 였으며 149개의 miRNA가 발현이 감소하였다. KB에서 발현이 3배 이상 증가된 miRNA는 19개였으며, 3배 이상 감소된 miRNA는 11개였다(Table 3과 4). 그 중 특이 적으로 10배 이상 증가한 miRNA는 miR-30a, miR-99a 및 miR-155였으며, 10배 이상 감 소한 miRNA는 miR-205, miR-203 및 miR-200c였다(Fig. 2).

2. NHOK와 KB 세포에서 정량 PCR에 의한 miRNA 발현 분석

miRNA microarray 결과 중, NHOK와 KB 세포를 비교하였을 때 그 발현의 차가 큰 miRNA(miR-30a, miR-99a, miR-155, miR-205, miR-203, miR-200c)를 miScript Reverse Transcription kit를 이용하여 정량 PCR 분석으로 재확인하였다. 정량 PCR 결과, miR-30a는 정상 구강각화세포인 NHOK에 비해 구강암 세포주인 KB에서 그 발 현이 약 19배 증가하였고, miR-99a는 약 16배 증가하였으며 miR-155는 약 15배 증가 하였다(Fig. 3). miR-205는 NHOK에 비해 KB에서 그 발현이 약 56배 감소하였고 miR-203과 miR-200c는 각각 약 18배와 10배 감소하였으며(Fig. 3), 정량 PCR에 의한 miRNA 발현분석 결과는 miRNA microarray 분석결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

miRNAs	NHOK (signal)	KB cells (signal)	Absolute fold change
miR-30a	5.16	66.56	12.90
miR-99a	4.95	62.77	12.68
miR-155	4.99	50.80	10.18
miR-25	5.56	39.64	7.13
miR-93	6.61	46.60	7.05
miR-191	7.10	45.80	6.45
miR-224	4.67	26.85	5.75
miR-132	4.47	24.63	5.51
miR-106b	6.21	34.09	5.49
miR-886-5p	5.23	24.27	4.64
miR-425	6.02	22.58	3.75
miR-18a	6.08	21.64	3.56
miR-324-5p	4.57	16.09	3.52
miR-886-3p	4.92	16.88	3.43
miR-452	4.53	15.54	3.43
miR-27b	7.41	24.53	3.31
miR-151-5p	6.34	20.80	3.28
miR-28-5p	4.34	14.19	3.27
miR-301a	4.21	13.01	3.09

Table 3. miRNAs up-regulated in KB cells in comparison to NHOK

Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than \pm 17%.

miRNAs	NHOK (signal)	KB cells (signal)	Absolute fold change
miR-205	600.46	3.97	-151.25
miR-203	257.76	5.08	-50.74
miR-200c	177.43	4.84	-36.66
miR-UL70-3p	42.17	4.50	-9.37
miR-1228	51.74	5.80	-8.92
miR-638	62.60	7.33	-8.54
miR-663	44.24	5.93	-7.46
miR-149	40.15	7.02	-5.72
miR-923	39.90	8.21	-4.86
miR-1308	24.24	7.48	-3.24
miR-31	28.02	9.31	-3.01

Table 4. miRNAs down-regulated in KB cells in comparison to NHOK

Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than $\pm~14\%.$



Fig. 2. miRNAs up- or down-regulated in KB cells in comparison to NHOK by miRNA microarray analysis. Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than \pm 17%.



Fig. 3. miRNAs up- or down-regulated in KB cells in comparison to NHOK by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The qRT-PCR was performed as described in "MATERIALS AND METHODS". The expression level of miRNA was calculated by using qcalculator 1.0 program after internal control u6 normalization. Each relative copy number value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than \pm 16%.

3. KB 세포성장에 미치는 miRNA의 효과

miRNA에 의한 구강암세포 성장 억제효과를 조사하기 위해, miRNA 염기서열이 삽입된 재조합 vector(2ng/ml, 20ng/ml, 200ng/ml)를 KB 세포에 24, 48 및 72시간 동 안 처리한 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다.

KB 세포에 miR-205를 0에서 200ng/ml까지의 다양한 농도와 다양한 시간 동안 투 여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, miR-205 처리 24시간과 48시간에서는 vector 만 처리한 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제의 차이를 볼 수 없었다. 그러나 miR-205 처리 72시간에서는 대조군과 비교하여 처리한 miR-205의 농도에 의존적인 세포성장 억제경향을 확인할 수 있었으며, 특히 200ng/ml에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 KB 세포성장 억제효과를 볼 수 있었다(Fig. 4). miR-203의 경우에서도 200ng/ml 처리 72시간에서 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 KB 세포성장 억제효과를 볼 수 있었다(Fig. 5).

4. 유전자 array 분석

KB 세포에서 miR-205와 miR-203 처리에 의한 유전자들의 발현양상을 유전자 array 분석으로 확인하였다. miR-205를 처리한 KB 세포에서 약 35,000개 이상의 유전 자를 비교·분석한 결과, 처리하지 않은 대조군과 비교하여 200ng/ml의 miR-205를 72 시간 처리한 KB에서 3,154개의 유전자 발현이 2배 이상 증가하였으며, 2,709개의 유전 자 발현이 2배 이상 감소하였다. 그 중 miR-205를 처리한 KB 세포에서 특이적으로 20배 이상 증가한 유전자를 Table 5에, 5배 이상 감소한 유전자를 Table 6에 나타내었 다. miR-203의 경우, 처리하지 않은 대조군과 비교하여 200ng/ml의 miR-203을 72시간 처리한 KB에서 2,707개의 유전자 발현이 2배 이상 증가하였으며, 2,352개의 유전자 발 현이 2배 이상 감소하였다. 그 중 miR-203 처리한 KB 세포에서 특이적으로 20배 이 상 증가한 유전자를 Table 7에, 5배 이상 감소한 유전자를 Table 8에 나타내었다.



Fig. 4. The effect of miR-205 on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with various concentrations of miR-205 or without miR-205 24, 48 72 hours. The cell viabilities for and were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of A570_{nms} of miR-205 treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. *P<0.05 vs. control (the control cells measured in the absence of miR-205).



Fig. 5. The effect of miR-203 on the cell viability in KB cells. The KB cells with various concentrations of miR-203 or were treated without miR-203 for 24, 48 and 72 hours. The cell viabilities were determined by the MTT assays. Other legends are the same as in Fig. 4.

Gene symbols	Gene names	Absolute fold induction
C1orf210	chromosome 1 open reading frame 210	489.07
BEX2	brain expressed X-linked 2	109.45
LCN2	lipocalin 2	66.00
BEST1	bestrophin 1	48.01
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	42.21
DMGDH	dimethylglycine dehydrogenase	41.21
HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	35.32
stereocilin	STRC	34.92
KLHDC7B	kelch domain containing 7B	34.55
SPOCK1	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	31.44
DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	29.17
NPHS1	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)	27.65
IL24	interleukin 24	27.18
WDR78	WD repeat domain 78	25.39
IL8	interleukin 8	25.12
APLF	aprataxin and PNKP like factor	24.79
KLHDC7B	kelch domain containing 7B	24.57
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	23.32
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	23.01
CSTA	cystatin A (stefin A)	22.82

Table 5. Genes up-regulated in KB cells treated with miR-205 in comparison to non-treated KB cells

Each absolute fold induction value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than $\pm~21\%.$

Gene symbols	Gene names	Absolute fold induction
SLCO1C1	solute carrier organic anion transporter family, member 1C1	21.83
HSPB3	heat shock 27 kDa protein 3	19.90
BRI3BP	BRI3 binding protein	13.03
SLC12A3	solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters), member 3	11.15
HIST1H1B	histone cluster 1, H1b	10.48
SEMA6A	sema domain, transmembrane domain	10.47
SERPINB4	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	9.74
RRM2	ribonucleotide reductase M2	9.45
SERPINB3	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	9.43
ATXN7	ataxin 7	9.20
HIST1H1A	histone cluster 1, H1a	9.09
C3orf58	chromosome 3 open reading frame 58	8.90
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	8.88
C9orf80	chromosome 9 open reading frame 80	8.69
KBTBD10	kelch repeat and BTB (POZ) domain	8.59
ZNF431	zinc finger protein 431	8.34
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus	8.11
UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	7.98
ACTR3C	ARP3 actin-related protein 3 homolog C	7.77
SRRM1	serine/arginine repetitive matrix 1	7.70

Table 6. Genes down-regulated in KB cells treated with miR-205 in comparison to non-treated KB cells

Each absolute fold induction value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than \pm 18%.

Gene symbols	Gene names	Absolute fold induction
BEX2	brain expressed X-linked 2	90.46
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	44.76
KLHDC7B	kelch domain containing 7B	41.77
LCN2	lipocalin 2	39.24
CPAMD8	C3 and PZP-like, alpha-2-macroglobulin domain containing 8	33.31
LOC100289109	hypothetical protein LOC100289109	29.54
DMGDH	dimethylglycine dehydrogenase	27.85
KLHDC7B	kelch domain containing 7B	26.67
STRC	stereocilin	26.66
DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	25.93
BEST1	bestrophin 1	25.24
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	24.08
UNC5B	unc-5 homolog B	23.90
NPHS1	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)	22.58
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	21.41

Table 7. Genes up-regulated in KB cells treated with miR-203 in comparison to non-treated KB cells

Each absolute fold induction value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than \pm 24%.

Gene symbols	Gene names	Absolute fold induction
HSPB3	heat shock 27 kDa protein 3	13.06
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	11.94
SEMA6A	sema domain, transmembrane domain	11.03
LOC100130171	similar to hematological and neurological expressed 1	10.29
BRI3BP	BRI3 binding protein	9.31
ATOH8	atonal homolog 8	9.11
ITSN1	intersectin 1 (SH3 domain protein)	8.79
PCGF3	polycomb group ring finger 3	7.18
ND6	NADH dehydrogenase, subunit 6 (complex I)	7.14
SLC12A3	solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters), member 3	7.00
GRIK2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	6.85
RPS26	ribosomal protein S26	6.81
KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3	6.57
ACTR3C	ARP3 actin-related protein 3 homolog C	6.42
EDN2	endothelin 2	6.31
RAB1B	RAB1B, member RAS oncogene family	6.29
BCCIP	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	6.25
MALL	mal, T-cell differentiation protein-like	6.05
LOC100130288	hypothetical LOC100130288	5.92
KBTBD10	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10	5.88

Table 8. Genes down-regulated in KB cells treated with miR-203 in comparison to non-treated KB cells

Each absolute fold induction value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than \pm 26%.

Ⅳ. 총괄 및 고안

생체에 내인성으로 존재하는 miRNA는 RNA 간섭 경로(RNA interference pathway)를 통하여 그 기능을 수행하며, 인위적으로 합성된 small interfering RNA(siRNA) 또한 같은 RNA 간섭 경로를 통한다고 알려져 있다(Callinan and Feinberg, 2006; Esteller, 2006). 이 siRNA는 표적유전자에 상보성을 갖는 20여개의 이 중나선염기를 이용하여 표적유전자를 제어하며, 이는 유전자 전사나 전사 후의 두 단 계 중 어느 한 단계에서 일어난다. 그러나 생체 내 내인성으로 존재하는 miRNA는 mRNA의 전사후 단백질 발현만을 조절한다고 알려져 있다(Majid et al., 2010; Li et al., 2011; Nishida et al., 2011).

miR-15/-16은 암과 관련되어 보고된 최초의 miRNA이었으며, 이들은 B-cell chronic lymphocytic leukemia에서 그 발현이 억제되어 암 억제인자로서 기능을 수행 한다고 보고되었다(Chen and Lodish, 2005; Cimmino et al., 2005; Calin and Croce, 2006). 또한 miR-148이 DNA hypermethylation을 억제함으로서 암세포 성장과 전이를 억제한다고 보고되었다(Urbich et al., 2008; Meister and Schmidt, 2010). 이 외 miR-126, miR-17, miR-21, miR-155, miR-221/-222, miR-34a, miR-223 및 miR-107 등 다수의 miRNA들이 암의 발생 및 전이에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다 (Cho, 2007; Nervi et al., 2007; Hermeking, 2009; Tili et al., 2009; Albinsson and Sessa, 2010; Chen et al., 2011; Osada and Takahashi, 2011; Pan et al., 2011). 암과 관련된 이러한 miRNA 연구결과들은, miRNA가 암의 형성, 진행 및 전이에 매우 중요 한 역할을 할 뿐만 아니라, 암의 진단이나 예후를 예측하는 중요한 생물학적 마커로 사용될 수 있다는 것을 시사하고 있다(Hardy and Tollefsbol, 2011; Lorincz, 2011). 따 라서 본 연구에서는 구강암세포에서 특이 miRNA를 확립하고 그 miRNA의 제어에 따 른 구강암세포의 성장과 증식 및 관련 유전자들에 대한 기능적 정보를 축적하여 이를 구강암세포 성장억제와 구강암 치료를 위한 적용을 위하여, 정상 사람 구강각화세포 (NHOK)와 구강암세포주 KB에서 miRNA의 발현을 비교·분석하여 구강암 특이 miRNA를 확립하고자 하였다.

NHOK와 KB 구강암세포에서 miRNA 발현양상을 비교하기 위한 microarray 분석 결과, NHOK와 비교하여 구강암세포주인 KB에서 가장 크게 증가한 miRNA는 miR-30a, miR-99a 및 miR-155이었으며, 가장 크게 감소한 miRNA는 miR-205, miR-203 및 miR-200c이었다(Fig. 2). miRNA microarray 결과를 정량 PCR 분석으로 재확인한 결과, miR-30a, miR-99a 및 miR-155는 NHOK에 비해 KB에서 그 발현이 각각 약 19배, 16배 및 15배 증가하였고, miR-205, miR-203 및 miR-200c는 그 발현이 각각 약 56배, 18배 및 10배 감소하였으며, 정량 PCR에 의한 miRNA 발현분석 결과와 miRNA microarray 분석결과가 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 정상과 구강 악안면 영역의 암에서 다양한 방법을 통해 miRNA 발현양상을 비교하여 miR-30a와 99a는 구강악안면 영역의 암에서 그 발현이 증가하였고, miR-205와 miR-203은 그 발 현이 감소하였다는 Liu 등(2009)의 연구결과와 일치하였으나, 본 연구에서 발현차이를 보였던 miR-155와 miR-200c는 그 발현차이가 없었으며(Liu et al., 2009), 이는 분석방 법의 차이와 세포유래의 차이에서 오는 결과라 생각된다. 본 연구의 miRNA microarray와 정량 PCR 결과는, 구강암세포에서 증가한 miRNA와 감소한 miRNA가 암세포 성장에 대한 특이적인 역할을 지닐 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 miRNA에 의한 암세포 성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 분석에 서, KB 구강암세포에서 그 발현이 감소했던 miR-205와 miR-203은 KB 세포의 성장 을 통계의존적으로 억제시켰다(Fig. 4와 5). 이는 구강암세포에서 miR-205의 발현이 감소하고 miR-205가 구강암세포의 성장을 억제시킨다는 Kim 등(2013)의 연구결과와, 대장암세포에서 miR-203의 발현이 감소하고 miR-203이 대장암세포의 성장을 억제시

-25-

킨다는 Li 등(2011)의 연구결과와 일치하였다(Li et al., 2011; Kim et al., 2013). 이러 한 결과들은 구강암세포에서 miR-205와 miR-203이 암세포 성장억제에 대한 특이적인 효과를 가지고 있다는 것을 시사하며, 또한 구강암 치료의 표적으로서 이들 miRNA의 잠재적인 가치를 시사하고 있다.

KB 구강암 세포에서 miR-205와 miR-203 처리에 의한 유전자들의 발현양상을 비 교하기 위한 유전자 array 분석결과, miR-205를 처리한 KB에서 특이적으로 20배 이 상 증가한 유전자는 20개 이었으며, 5배 이상 감소한 유전자는 20개였다(Table 5와 6). miR-203의 경우, KB 세포에서 특이적으로 20배 이상 증가한 유전자는 15개 이었으 며, 5배 이상 감소한 유전자는 20개였다(Table 7과 8). miR-205를 처리한 KB에서 특 이적으로 증가한 유전자 중 lipocalin 2(LCN2)와 interleukin 24(IL24)는 암 억제유전자 로 보고된 바 있으며, 감소한 유전자 중 ribonucleotide reductase M2(RRM2)와 serpin peptidase inhibitor-clade B3(SERPINB3)는 암 유발유전자로 알려져 있다(Fan et al., 1998; Su et al., 2003; Vidalinoa et al., 2009; Chien et al., 2012; Hadife et al., 2013). 특이적으로 miR-203을 처리한 KB에서 또한 증가한 유전자 중 DNA-damage-inducible transcript 3(DDIT3)와 lipocalin 2(LCN2)는 암 억제유전자로 보고된 바 있으며, 감소한 유전자 중 FBJ murine osteosarcoma ciral oncogene homolog(FOS)와 Intersectin 1 (ITSN1)은 암 유발유전자로 알려져 있다 (Roffler-Tarlov et al., 1996; Edward et al., 2001; Ma et al., 2010; Chien et al., 2012). 이러한 연구결과들과 본 연구의 결과를 함께 고찰하여 보면, miR-205와 miR-203의 처리가 암 억제유전자들의 발현은 증가시키고 암 유발유전자들의 발현은 감소시켜 결국 KB 구강암 세포의 성장을 억제하는 것으로 사료된다. 따라서 향후 miR-205와 miR-203 처리에 의한 구강암 세포 유전자들의 발현 및 기전연구는 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

그러나 본 연구에서 실험에 이용한 구강암 세포 등 표본들의 수에는 한계가 있었으

- 26 -

며, 이들 miRNA가 유도하는 구강암세포 성장억제에 관한 표적 유전자 분석 등 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다. 본 연구의 대상이 되는 miRNA는 다른 유전자 조절 메커니즘에 비해 최근에 밝혀지고 있지만, 그 작용기전과 표적하는 유전자가 최근 들어 많이 연구되고 그 기능 연구 또한 매우 활발히 진행되고 있다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009; Majid et al., 2010; Li et al., 2011; Nishida et al., 2011; Kim et al., 2013). 이러한 miRNA에 의한 유전자 발현조절은 향 후 매우 중요한 유전자 조절 방식의 하나로 자리매김할 것으로 여겨지고 있다. 특히 구강암에서 특이 miRNA를 확립하여 miRNA 제어에 따른 구강암세포의 성장과 증식 에 대한 기능적 정보를 규명한다면, 구강암에서 표적 miRNA를 생물학적 표지자로의 사용도 가능할 것이며, 궁극적으로 이 miRNA를 이용한 항암물질, 유전자 치료법 및 구강암 진단키트를 개발하여 구강암 치료의 새로운 전략도 제시할 수 있을 것으로 사 료된다.

결론적으로, 사람 구강암세포 KB에서 miR-205와 miR-203은 정상 사람 구강각화 세포 NHOK에서보다 그 발현이 크게 감소하였고 miR-205와 miR-203은 KB 구강암세 포의 성장을 뚜렷이 억제시켰다. 또한 본 연구의 결과로 이들 miRNA를 이용한 구강 암 세포 성장억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

V.결 론

miRNA는 진핵세포 내에서 많은 유전자를 조절함으로써 세포분화, 성장, 증식 등 다양한 생명현상에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 여러 악성종양에서 특이적 발현양상을 보여 종양유전자 혹은 종양억제 유전자의 활성을 조절함으로서 발암과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 정상 구강세포와 구강암세포에서 miRNA들의 발현을 비교·분석하여 구강암 특이 miRNA를 확립하고 그 작용기전을 규명하기 위해, 정상 사람 구강각화세포 NHOK와 구강암에서 유래한 구강암세포주 KB에서 세포배양, miRNA 추출, miRNA microarray 분석, 정량 PCR 분석, vector 제 작, 세포성장 억제실험 및 유전자 array를 시행하였다.

NHOK와 KB 구강암세포에서 microarray 분석으로 총 1,769개의 miRNA를 비교. 분석한 결과, KB에서 164개의 miRNA가 그 발현이 증가하였으며 149개의 miRNA가 발현이 감소하였다. 특이적으로 10배 이상 발현이 증가한 miRNA는 miR-30a, miR-99a 및 miR-155였으며, 10배 이상 감소한 miRNA는 miR-205, miR-203 및 miR-200c였다. 정 량 PCR 결과, miR-30a는 KB에서 그 발현이 약 19배 증가하였고, miR-99a는 약 16배 증가하였으며 miR-155는 약 15배 증가하였다. miR-205는 KB에서 그 발현이 약 56배 감소하였고 miR-203과 miR-200c는 각각 약 18배와 10배 감소하였다. KB 세포에서 miR-205와 miR-203은 세포의 성장을 뚜렷이 억제시켰다. KB 세포에서 유전자 array 분석으로 miR-205와 miR-203 처리에 의한 유전자들의 발현양상을 비교.분석한 결 과, miR-205를 처리한 KB 세포에서 3,154개의 유전자 발현이 2배 이상 증가하였으며, 2,709개가 2배 이상 감소하였다. miR-203을 처리한 KB에서는 2,707개의 유전자 발현 이 2배 이상 증가하였으며, 2,352개가 2배 이상 감소하였다.

본 연구의 결과로서 miR-205와 miR-203은 사람 구강암세포 KB에서 정상 사람 구 강각화세포에서보다 그 발현이 크게 감소하였고, KB 세포의 성장을 뚜렷이 억제시킴 을 알 수 있었으며, 본 연구의 결과로 이들 miRNA를 이용한 구강암 세포 성장억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅵ. 참 고 문 헌

- Albinsson S, Sessa WC. Can microRNAs control vascular smooth muscle phenotypic modulation and the response to injury? Physiol Genomics. 2011;43:529–33.
- Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell. 2001;107:823-6.
- Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. Semin Oncol. 2006;33:167–73.
- Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. Hum Mol Genet. 2006;15:R95-101.
- Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. Semin Immunol. 2005;17:155–65.
- Chen PS, Su JL, Cha ST, Tarn WY, Wang MY, Hsu HC, Lin MT, Chu CY, Hua KT, Chen CN, Kuo TC, Chang KJ, Hsiao M, Chang YW, Chen JS, Yang PC, Kuo ML. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. J Clin Invest. 2011;121:3442–55.
- Chien MH, Ying TH, Yang SF, Yu JK, Hsu CW, Hsieh SC, Hsieh YH. Lipocalin-2 induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through activation of mitochondria pathways. Cell Biochem Biophys. 2012;64:177-86.

- Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. Mol Cancer. 2007;6:60–6.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:13944–9.
- Dostie J, Dreyfuss G. Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. Curr Biol. 2002;12:1060-7.
- Esteller M. The necessity of a human epigenome project. Carcinogenesis. 2006;27:1121-5.
- Fan H, Villegas C, Huang A, Wright JA. The mammalian ribonucleotide reductase R2 component cooperates with a variety of oncogenes in mechanisms of cellular transformation. Cancer Res. 1998;58:1650–3.
- Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer: future perspectives. Oral Oncol. 2008;44:910-4.
- Hadife N, Nemos C, Frippiat JP, Hamadé T, Perrot A, Dalloul A. Interleukin 24 mediates apoptosis in human B-cells through early activation of cell cycle arrest followed by late induction of the mitochondrial apoptosis pathway. Leuk Lymphoma. 2013;54:587–97.

- Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. Epigenomics. 2011;3:503-18.
- Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. Cell Death Differ. 2010;17:193-9.
- Hutvá gner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bá lint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science. 2001;293:834-8.
- Kataoka N, Diem MD, Kim VN, Yong J, Dreyfuss G. Magoh, a human homolog of Drosophila mago nashi protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. EMBO J. 2001;20:6424-33.
- Kim JS, Yu SK, Lee MH, Park MG, Park E, Kim SG, Lee SY, Kim CS, Kim HJ, Chun HS, Chun SW, Kim DK. MicroRNA-205 directly regulates the tumor suppressor, interleukin-24, in human KB oral cancer cells. Mol Cells. 2013;35:17-24.
- Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. Science. 2001;293:1832-6.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001;294:853-8.

- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol. 2002;12:735–9.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993;75:843-54.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science. 2001;294:862-4.
- Li J, Chen Y, Zhao J, Kong F, Zhang Y. miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression. Cancer Lett. 2011;304:52-9.
- Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. Comp Funct Genomics. 2009;837514:1–11.
- Lorincz AT. The Promise and the Problems of Epigenetics Biomarkers in Cancer. Expert Opin Med Diagn. 2011;5:375-9.
- Ma Y, Wang B, Li W, Ying G, Fu L, Niu R, Gu F. Reduction of intersectin1-s induced apoptosis of human glioblastoma cells. Brain Res. 2010;1351:222-8.

Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R.

MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. Cancer. 2010;116:5637-49.

- Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:15228-33.
- Maytina EV, Ubedab M, Linb JC, Habenerb JF. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. Exp Cell Res. 2001;267:193–204.
- Meister J, Schmidt MH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer. Scientific World Journal. 2010;10:2090-100.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. Genes Dev. 2002;16:720–8.
- Nervi C, Fazi F, Rosa A, Fatica A, Bozzoni I. Emerging role for microRNAs in acute promyelocytic leukemia. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;313:73-84.
- Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in

gastric cancer and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. Clin Cancer Res. 2011;17:2725–33.

- Notani PN. Epidemiology and prevention of head and neck cancer: A Global View. In: Saranath D, editor. Contemporary Issues in Oral Cancer. Oxford University Press 2000. pp. 1–29.
- Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. Curr Issues Mol Biol. 2002;4:111-28.
- Osada H, Takahashi T. let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. Cancer Sci. 2011;102:9-17.
- Pan X, Wang ZX, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. Cancer Biol Ther. 2011;10:1224-32.
- Roffler-Tarlov S, Brown JJ, Tarlov E, Stolarov J, Chapman DL, Alexiou M, Papaioannou VE. Programmed cell death in the absence of c-Fos and c-Jun. Development. 1996;122:1-9.
- Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V. The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in Drosophila melanogaster. Dev Biol. 2002;244:170-9.

- Su ZZ, Lebedeva IV, Sarkar D, Gopalkrishnan RV, Sauane M, Sigmon C, Yacoub A, Valerie K, Dent P, Fisher PB. Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization in malignant gliomas in a p53-independent manner. Oncogene. 2003;22:1164-80.
- Tili E, Croce CM, Michaille JJ. miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. Int Rev Immunol. 2009;28:264-84.
- Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. J Oral Maxillofac Surg. 1997;55:613-23.
- Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. Cardiovasc Res. 2008;79:581–8.
- Vidalinoa L, Doriab A, Quartaa S, Zenb M, Gattaa A, Pontissoa P. Apoptosis and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2009;9:108–12.