

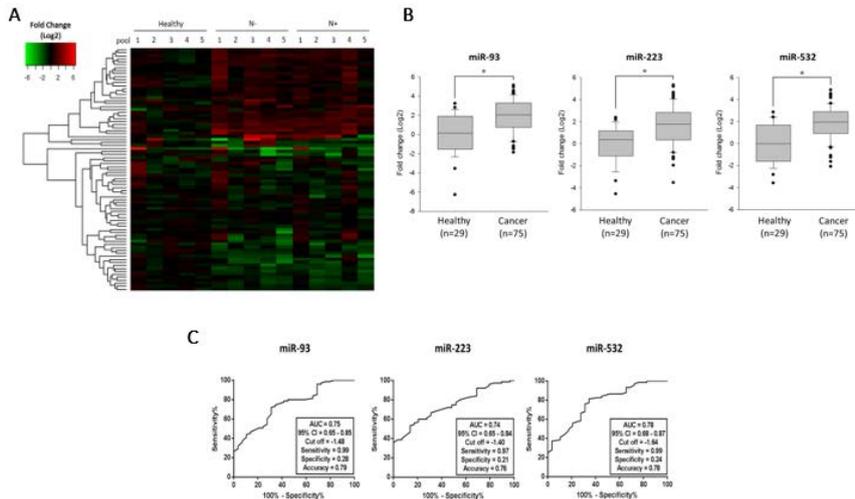
## INTRODUZIONE

Il Carcinoma a Cellule Squamose della Laringe (LSCC), rappresenta il 90% di tutti i casi di cancro laringeo, ed è la sesta neoplasia più comune al mondo (Piotrowski I, 2021). Il carcinoma squamocellulare può colpire diversi distretti della laringe, con differenti sintomi ed opzioni di trattamento. Il tasso di sopravvivenza relativa a 5 anni per i pazienti con diagnosi di LSCC è del 60,7%, ed uno dei principali fattori che incidono su tale indice è rappresentato dall'elevata percentuale di diagnosi in fase avanzata, un dato che influisce negativamente sulla prognosi e sulla mortalità (National Cancer Institute: Surveillance s.d.). Consumo di alcol e tabacco ed infezioni da HPV, in particolare del sierotipo HPV16, rappresentano i principali fattori di rischio (Kreimer AR, 2005). Lo screening e la diagnosi precoci garantirebbero la scelta tra un'ampia gamma di potenziali strategie terapeutiche di successo, ma restano ad oggi una sfida a causa dell'assenza di sintomi, di biomarcatori specifici e delle limitazioni insite nelle convenzionali strumentazioni di imaging. Per facilitare quindi la diagnosi e/o l'individuazione di pazienti ad alto rischio di recidiva e migliorare la qualità di vita del paziente affetto da LSCC, si è sempre più indirizzati verso la ricerca di marcatori molecolari affidabili e non invasivi, dotati di alta specificità e sensibilità che permettano di identificare lesioni precoci attraverso lo studio di processi molecolari indicativi di aggressività tumorale, quale ad esempio la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), evento cruciale nella progressione delle neoplasie (Yilmaz M, 2009). Idealmente un buon fattore diagnostico e/o prognostico dovrebbe fornire informazioni affidabili sull'evoluzione della malattia, nonché sulla sua possibile risposta alle varie opzioni terapeutiche al fine di pianificare la migliore strategia di trattamento. Inoltre, dovrebbe essere facilmente individuato, a basso costo e con tecniche non invasive. In questo contesto, di particolare rilevanza sono i marcatori rilasciati nel sangue, nella saliva o nelle urine che eviterebbero l'uso di metodiche invasive per il paziente. Tra questi, i microRNA (miRNA) circolanti nei diversi fluidi biologici (Tie Y, 2009) che, grazie alla stabilità conferitagli dall'inclusione in microvescicole, esosomi, cellule tumorali circolanti (CTCs) o dal legame a proteine argonata o lipoproteine ad alta densità, rappresentano una nuova e promettente classe di biomarcatori diagnostici e prognostici. Inoltre, i miRNA agiscono come regolatori del microambiente tumorale, anch'esso implicato nella progressione del tumore (Redis RS, 2012). I microRNA (miRNA) sono una classe di RNA a filamento singolo non codificanti di 18-22 nucleotidi, coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica tramite l'accoppiamento a sequenze complementari nella regione 3' non tradotta (3'UTR) dei loro RNA messaggeri target (mRNA). Inibiscono l'espressione genica promuovendo la repressione traslazionale, la scissione del bersaglio dell'mRNA o la deadenilazione (Grimaldi A, 2018). Attualmente, è noto che un gran numero di miRNA è coinvolto in una varietà di normali funzioni biologiche ma anche in eventi tumorigenici. Un ampio corpus di prove ha mostrato una regolazione aberrante dei miRNA nei tessuti e/o nel plasma di pazienti LSCC (Ricciardiello F, 2017) (Cao P, 2013) (Ayaz L, 2013), sottolineando una forte relazione tra i loro livelli di espressione e i principali processi alla base dell'insorgenza e della progressione del tumore, come proliferazione, migrazione, invasione, metastatizzazione, infiltrazione tumorale e recidiva della malattia. Sulla base del trend di modulazione e dell'analisi bioinformatica dei presunti bersagli, diversi studi hanno delineato un possibile ruolo oncogenico o oncosoppressore per diversi miRNA nella patogenesi del LSCC, tuttavia il meccanismo molecolare non è ancora chiaro e sono necessari ulteriori approfondimenti per il loro impiego come strumenti diagnostici, prognostici e terapeutici. Pertanto, la necessità di identificare specifici biomarcatori diagnostici e/o prognostici, nonché di riconoscerne la specifica funzione biologica, magari sfruttando il potenziale antitumorale e antimetastatico a scopo terapeutico, ha spinto a portare avanti il presente studio.

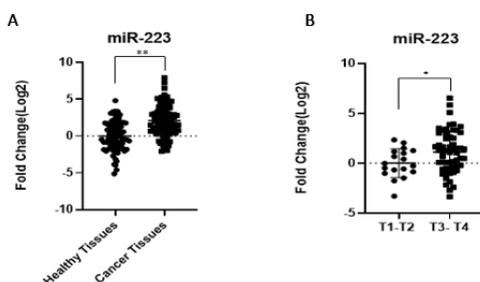
## RISULTATI

L'analisi in microarray del profilo di espressione di 377 miRNA sierici – condotta su 45 pazienti, di cui 22 con metastasi linfonodali, N+, e 23 senza coinvolgimento linfonodale, N-, raffrontati con 23 volontari sani - ha mostrato, tra gli 81 miRNA rilevati (**Figura 1A**), l'up-regolazione di 11 di essi (miR-532, miR-93, miR-451, miR-140, miR-223, miR-16, miR-20b, miR-29a, miR-132, miR-25, miR-20a) e la down-regolazione di altri 5 (miR-95, miR-150, miR-891a, miR-331 e miR-374). Basandoci sui valori di "fold-change" e sulla relativa significatività statistica, abbiamo focalizzato lo studio sulla validazione dei livelli di espressione, mediante qRT-PCR, di 3 dei miRNA up-regolati (miR-93, miR-223, e miR-532) che sono stati selezionati come possibili biomarcatori. Confermata la significativa up-regolazione su una coorte più ampia di pazienti affetti da LSCC

(75 pazienti, divisi in 32 N+ e 43 N-) (**Figura 1B**), il valore diagnostico di miR-93, miR-223 e miR-532 è stato definito mediante analisi della curva ROC (**Figura 1C**). In particolare, l'area sotto la curva (AUC), ne ha evidenziato un moderato potenziale diagnostico che sarà ulteriormente approfondito durante il progressivo ampliamento della casistica dei pazienti arruolati. Oggetto di studio è stata inoltre l'analisi di correlazione tra i livelli di espressione dei miRNA in oggetto ed alcuni parametri clinico-patologici a nostra disposizione. I risultati, ottenuti calcolando il coefficiente di correlazione  $r$ , hanno mostrato una debole relazione negativa tra i livelli di espressione di miR-93 e miR-532 e lo stadio del tumore, suggerendone un potenziale diagnostico per gli stadi più precoci della malattia.



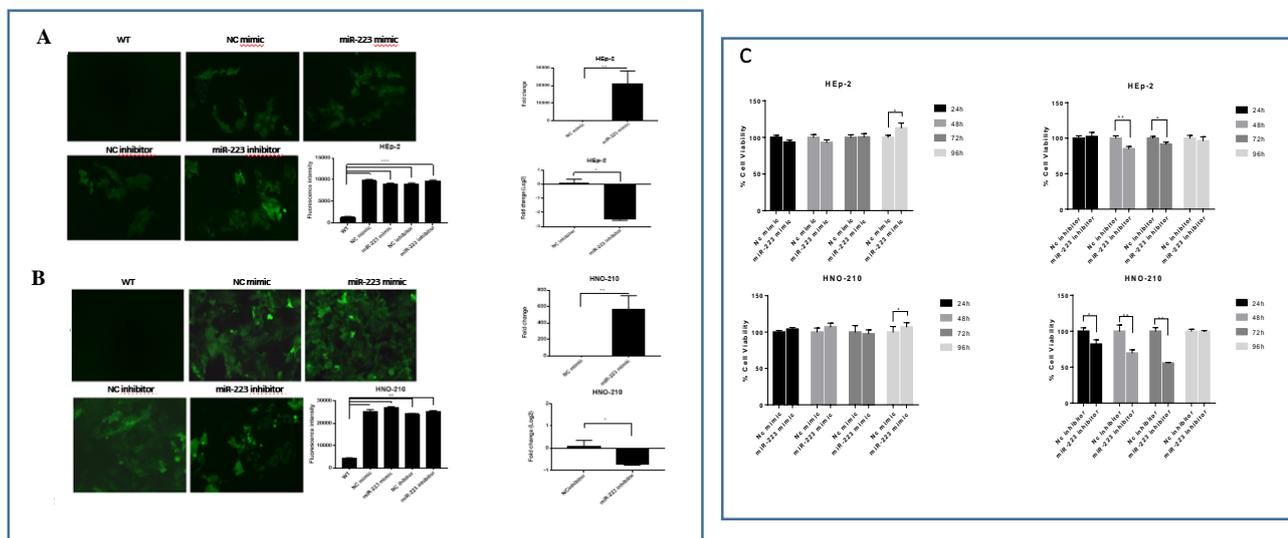
Abbiamo a questo punto deciso di investigare, *in vitro*, il ruolo del miR-223 in un modello cellulare di carcinoma laringeo, analizzando gli effetti molecolari della sua deregolazione. La selezione di tale miRNA è stata incoraggiata dal fatto che, tra i miRNA sierici individuati, fosse l'unico a risultare up-regolato anche a livello tissutale nei pazienti affetti da LSCC (**Figura 2A**), come riportato in un recente studio condotto dal nostro gruppo di ricerca (Ricciardiello F, 2017). In particolare, i dati di espressione tissutale di miR-223 sono stati ripresi al fine di analizzarne la correlazione con l'estensione del tumore, evidenziando una significativa up-regolazione nei pazienti con neoplasia in stadio avanzato (T3-T4) rispetto ai pazienti in stadi più precoci di malattia (T1-T2), un dato che ha suggerito una possibile correlazione tra miR-223 e il volume del tumore (**Figura 2B**). L'analisi bioinformatica dei target predetti del miR-223, condotta mediante l'ausilio di tools di predizione disponibili online, ha permesso di analizzare *in silico* una serie di possibili geni target, tra cui spicca, con uno score di predizione pari a 79, il gene MTSS1 (Metastasis suppressor protein 1) codificante per una proteina oncosoppressiva implicata nel processo metastatico.

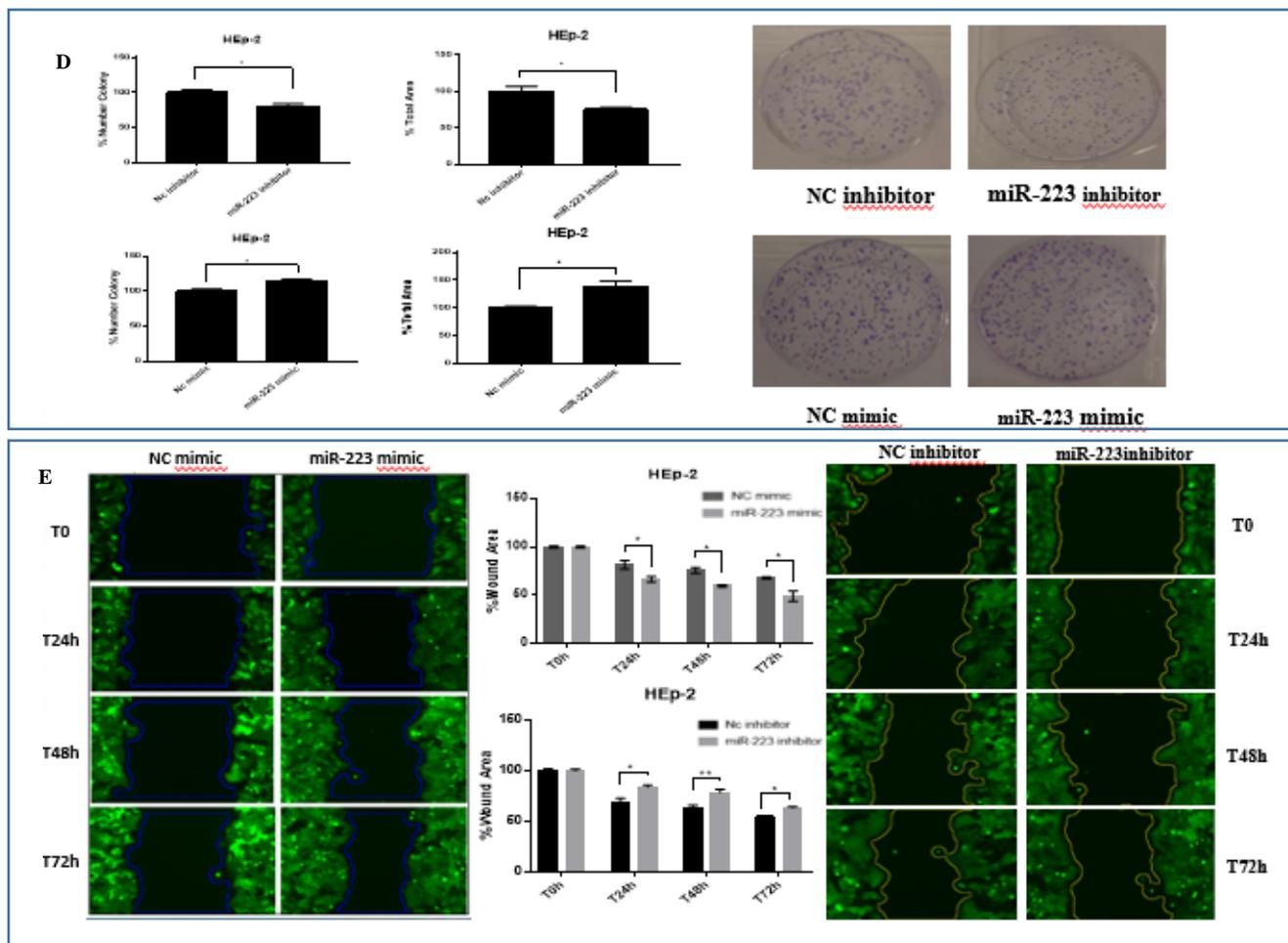


Per intraprendere lo studio sugli effetti biologici indotti dal miR-223, due linee cellulari di LSCC (HEp-2 e HNO210) sono state trasdotte con vettori lentivirali di terza generazione contenenti i costrutti codificanti per il miR-223 mimic, il miR-223 inhibitor e due sequenze random specifiche che fungessero da controlli negativi. I vettori lentivirali utilizzati contenevano anche un gene codificante per l'antibiotico-resistenza verso la puomicina, indispensabile per la selezione delle cellule infettate, ed un gene reporter GFP utile al monitoraggio dell'efficienza di trasduzione. Quest'ultima è stata valutata sia mediante quantizzazione relativa dell'intensità di fluorescenza delle cellule trasdotte rispetto a quelle wild type, sia mediante qRT-PCR. I risultati hanno mostrato una marcata sovraespressione di miR-223 nelle cellule HEp-2 e HNO-210 trasdotte con miR-223 mimic rispetto a NC miR-223 (corrispettivo controllo negativo). Al contrario, l'inibitore del miR-

223 ha indotto un decremento meno significativo dei livelli di espressione del miR-223 rispetto al corrispondente NC. Questi dati, insieme all'elevata intensità di fluorescenza di tutte le cellule trasdotte rispetto alle linee cellulari LSCC wild type, suggeriscono l'utilizzo di HEP-2 e HNO-210 così trasdotte, come buon modello preclinico per la valutazione *in vitro* degli effetti biologici risultanti dalla modulazione del miR-223 (**Figura 3A - 3B**).

Analizzando l'effetto pro-tumorigeno di miR-223 su entrambe le linee cellulari HEP-2 e HNO-210, abbiamo chiaramente dimostrato il ruolo promotore dell'espressione ectopica di miR-223 sulla crescita cellulare, principalmente a 96 ore. D'altra parte, l'efficacia anti-proliferativa dell'inibitore del miR-223 è risultata significativa a 48 ore e 72 ore per le cellule HEP-2, mentre nelle HNO-210 la trasduzione con miR-223 inhibitor ha ridotto significativamente la vitalità cellulare già dopo 24 ore e in modo più marcato a 48 ore e 72 ore (**Figura 3C**). Per confermare questi risultati, abbiamo anche valutato gli effetti di sopravvivenza a lungo termine indotti da miR-223 mimic e inhibitor, mediante test clonogenico. Come previsto, l'espressione ectopica di miR-223 ha migliorato la capacità di auto-rinnovamento delle cellule HEP-2, al contrario, l'inibitore del miR-223 ha limitato significativamente il numero e l'area delle colonie cellulari (**Figura 3D**). Infine, per ampliare la nostra indagine *in vitro* sul ruolo funzionale del miR-223 nei processi pro-metastatici, abbiamo eseguito un test di wound healing su cellule HEP-2 trasdotte. È interessante notare l'attività anti-migratoria dell'inibitore del miR-223, principalmente a 72 ore, e al contrario l'aumento della migrazione cellulare a 24, 48 e 72 ore per le HEP-2 trasdotte con miR-223 mimic (**Figura 3E**).





## DISCUSSIONE

Tra tutti i trattamenti disponibili per LSCC, le opzioni per gli stadi avanzati di solito includono una combinazione di chemioterapia e radioterapia, mentre la resezione chirurgica e la radioterapia sono attualmente utilizzate per i tumori allo stadio iniziale. Rispetto al passato, la chirurgia LSCC è meno invasiva, tendente alla conservazione degli organi e utilizzata solo per trattamenti di salvataggio o per lesioni con estensione extralaringea o distruzione della cartilagine. Tuttavia, a causa dell'assenza di sintomi specifici e di marcatori affidabili, l'LSCC viene solitamente diagnosticato in stadi avanzati, con conseguente ritardo del trattamento, alta frequenza di recidiva del tumore, metastasi e prognosi infausta. L'identificazione di miRNA nel flusso sanguigno o in altri fluidi biologici ha generato grande interesse per il potenziale utilizzo come biomarcatori. In questo scenario, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare una firma di miRNA per la definizione della diagnosi e della prognosi di LSCC, nonché di caratterizzare *in vitro* il ruolo funzionale del miR-223, che è uno dei microRNA più interessanti selezionati come candidato biomarcatore.

Sulla base dei risultati ottenuti, gli alti livelli di espressione di miR-93, miR-223 e miR-532 rappresentano un importante punto di partenza per studiare meglio il loro ruolo nella carcinogenesi e il loro potenziale per la diagnosi e/o la prognosi minimamente invasiva di LSCC.

miR-93, miR-223 e miR-532 sono coinvolti nella cancerogenesi, progressione e metastasi di diverse neoplasie e, in particolare, molti studi hanno analizzato il ruolo di miR-223 e miR-93 nel carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNCCS), mentre non sono ad oggi riportate evidenze relative alla funzione di miR-532 in HNCCS. La sovraespressione di miR-93 è stata rilevata sia nei tessuti (Cao P, 2013) che nel plasma (Ayaz L, 2013) di pazienti LSCC ed è stata dimostrata la sua funzione oncogenica nelle cellule LSCC (Xiao X, 2015). L'elevata espressione di miR-93 è stata osservata anche nei tessuti HNSCC, dove risulta correlata a progressione del cancro, metastasi e prognosi infausta (Li G, 2015). Per quanto riguarda miR-223, la sua iperespressione nei tessuti e nelle linee cellulari di carcinoma orale a cellule squamose (OSCC), si è visto aumentare la crescita e la migrazione cellulare e sopprimere l'apoptosi attraverso l'azione sull'oncosoppressore FBXW7 (Jiang L, 2019). Nei tessuti HNSCC, è stata segnalata una correlazione significativa tra l'alta espressione di miR-223 e l'infiltrazione di neutrofili. Inoltre, nelle cellule HNSCC, l'espressione ectopica di

miR-223 è stato dimostrato aumentare la proliferazione, l'apoptosi e la resistenza al Cetuximab, con induzione dell'espressione di pERK2, pAKT e AKT ed inibizione dell'angiogenesi (Bozec A, 2017).

È stato recentemente scoperto che il miR-223 è anche in grado di promuovere lo sviluppo del comportamento invasivo di diversi tumori solidi attraverso l'EMT, in particolare nelle neoplasie gastrointestinali. A tal proposito, i nostri dati di caratterizzazione della funzione del miR-223, *in vitro*, sembrano andare proprio in questa direzione e infatti i risultati emersi dai saggi di vitalità, clonogenicità e wound-healing che abbiamo condotto sulle linee LSCC stabilmente trasdotte, hanno confermato l'effetto pro-tumorigenico e pro-metastatico del miR-223 mimic rispetto al proprio controllo negativo. Un effetto opposto invece è stato evidenziato nelle cellule esprimenti l'oligonucleotide antisense, dove la capacità di sopravvivenza e migrazione cellulare era limitata significativamente. Per comprendere meglio le basi molecolari dell'effetto pro-tumorigeno e pro-metastatico del miR-223, ci siamo concentrati sulla modulazione dei principali bersagli oncosoppressori. A questo scopo, abbiamo interrogato quattro diversi algoritmi di predizione di miRNA targets (TargetScan (versione 7.1), DIANA-microT-CDS, (versione 5.0), miRANDA-mirSVR (rilasciato nel 2010) e miRmap). Tutte le piattaforme bioinformatiche hanno mostrato il targeting diretto di MTSS1 (Metastasis suppressor protein 1), un soppressore della metastasi down-regolato in molti tipi di cancro (Xie F, 2011). Inoltre, abbiamo utilizzato l'algoritmo DIANA-mirPath per l'analisi di arricchimento dei pathway in cui miR-223 risulta coinvolto. Attraverso una ricerca incrociata di tre diversi database, quest'ultimo ha rivelato la possibile regolazione miR-223-dipendente sia dei fattori trascrizionali correlati al cancro che dei mediatori di interazione citochine/recettore di citochine. Tra i geni più significativi, spiccano IL6ST, ACVR2A, PAX5, BMP2K, RELA, FOXO1 e HHEX, che svolgono ruoli ben noti nell'infiammazione, proliferazione, migrazione, apoptosi e angiogenesi in diversi tipi di tumori solidi. ACVR2A e IL6ST partecipano alle vie infiammatorie. Si ritiene che ACVR2A sia un oncosoppressore che inibisce la crescita e la differenziazione cellulare e la sua inattivazione è stata proposta come un fattore chiave nello sviluppo del cancro del colon-retto (Ballikaya S, 2014). Allo stesso modo, l'IL6ST è stato trovato down-regolato nel carcinoma mammario triplo negativo (Jia R, 2021). PAX5, BMP2K, RELA, FOXO1 e HHEX sono fattori trascrizionali che regolano i processi correlati al cancro. Nelle cellule di carcinoma mammario, PAX-5 sopprime la proliferazione cellulare e modula la transizione epitelio-mesenchimale/mesenchimo-epiteliale (EMT/MET) (Benzina S, 2017). I ridotti livelli di espressione di BMP2K (Song X, 2020), RELA (Ricca A, 2001) e HHEX (Li X, 2021), sono anch'essi associati alle caratteristiche di aggressività di vari tipi di cancro, influenzando la migrazione, l'invasione e l'apoptosi. FOXO1 è un regolatore chiave di un'ampia gamma di funzioni correlate al cancro, tra cui la differenziazione cellulare, l'apoptosi, l'arresto del ciclo cellulare e il danno al DNA. Il suo ruolo oncosoppressivo è stato riportato in diversi tipi di neoplasie, in particolare per il suo coinvolgimento nel pathway PI3K/AKT (Gheghiani L, 2020) (Zhang X, 2011).

Collettivamente, i nostri risultati suggeriscono che miR-223 potrebbe regolare più fattori che svolgono un ruolo cruciale nei pathway pro-metastatici; al contrario, l'inibitore del miR-223, in grado di ridurre la capacità migratoria delle cellule LSCC, potrebbe rappresentare un nuovo strumento terapeutico contro LSCC primari, avanzati e metastatici.

## CONCLUSIONI

LSCC è caratterizzato da crescita locale e diffusione nei linfonodi vicini, sebbene sviluppi frequentemente metastasi a distanza attraverso il flusso sanguigno. Il processo diagnostico e la corretta pianificazione terapeutica rappresentano la sfida principale per massimizzare le possibilità di completa risoluzione della malattia e di miglioramento della qualità di vita dei pazienti, cercando di preservare la funzione laringea. Pertanto, la gestione clinica di successo dei pazienti con LSCC è strettamente legata all'identificazione di biomarcatori diagnostici e prognostici affidabili. Questo obiettivo potrebbe essere raggiunto più facilmente attraverso la caratterizzazione dei fattori sia biologici che molecolari alla base di questa malattia.

Attualmente, i progressi nelle tecnologie molecolari e genetiche hanno consentito l'identificazione di una pletora di fattori molecolari dotati di ruolo diagnostico e/o prognostico, mostrando il loro potenziale biomedico per l'applicazione nella medicina personalizzata e nel monitoraggio del trattamento dei pazienti con LSCC. All'interno dell'ampia varietà di queste molecole, un ruolo centrale sembra essere svolto dagli RNA non codificanti. Nel presente studio, abbiamo delineato, per i pazienti affetti da cancro LSCC, una possibile firma di miRNA per la diagnosi precoce della malattia. Inoltre, abbiamo dimostrato il potenziale oncogenico *in vitro* di miR-223, mostrando i suoi effetti pro-tumorigeni e pro-metastatici sulle linee cellulari LSCC. Analizzando i presunti bersagli di miR-223, abbiamo ipotizzato che potesse orchestrare la regolazione di molteplici processi correlati al cancro, come infiammazione, angiogenesi, apoptosi, proliferazione, EMT, migrazione e invasione, confermando l'osservazione *in vitro* e suggerendo la sua promettente funzione prognostica. Inoltre, l'effetto del

miR-223 inibithor *in vitro* sulle capacità sia proliferative che migratorie delle linee cellulari LSCC, incoraggia la possibilità di approfondire i meccanismi molecolari per il futuro sviluppo di nuove opportunità terapeutiche basate sull'utilizzo di oligonucleotidi a singolo filamento che agiscono come nc-RNA antagonisti nel cancro. Questi risultati, insieme alle prove in letteratura, forniscono il razionale per ulteriori esperimenti volti a comprendere meglio le basi molecolari del ruolo oncogenico del miR-223, valutandone il coinvolgimento nell'EMT e nei processi metastatici, nonché l'effetto antitumorale del suo inibitore. Inoltre, sono attualmente in corso studi *in vitro* sull'analisi metabolomica in NMR e sulla profilazione genica diretta di oltre 700 geni correlati al cancro mediante la tecnologia digitale NanoString.

## BIBLIOGRAFIA

- ♦ Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Ozcan C, Tamer L. “**Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma.**” *J Cancer Res Clin Oncol.*, 2013 Sep: 139(9):1499-506.
- ♦ Ballikaya S, Lee J, Warnken U, Schnölzer M, Gebert J, Kopitz J. “**De Novo proteome analysis of genetically modified tumor cells by a metabolic labeling/azide-alkyne cycloaddition approach.**” *Mol Cell Proteomics.*, 2014 Dec: 13(12):3446-56.
- ♦ Benzina S, Beauregard AP, Guerrette R, Jean S, Faye MD, Laflamme M, Maïcas E, Crapoulet N, Ouellette RJ, Robichaud GA. “**Pax-5 is a potent regulator of E-cadherin and breast cancer malignant processes.**” *Oncotarget.*, 2017 Feb 14: 8(7):12052-12066.
- ♦ Bozec A, Zangari J, Butori-Pepino M, Ilie M, Lalvee S, Juhel T, Butori C, Brest P, Hofman P, Vouret-Craviari V. “**MiR-223-3p inhibits angiogenesis and promotes resistance to cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma.**” *Oncotarget.*, 2017 Jul 11: 8(34):57174-57186.
- ♦ Cao P, Zhou L, Zhang J, Zheng F, Wang H, Ma D, Tian J. “**Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma.**” *Head Neck*, 2013 May: 35(5):720-8.
- ♦ Gheghiani L, Shang S, Fu Z. “**Targeting the PLK1-FOXO1 pathway as a novel therapeutic approach for treating advanced prostate cancer.**” *Sci Rep.*, 2020 Jul 23: 10(1):12327.
- ♦ Grimaldi A, Zarone MR, Irace C, Zappavigna S, Lombardi A, Kawasaki H, Caraglia M, Misso G. “**Non-coding RNAs as a new dawn in tumor diagnosis.**” *Semin Cell Dev Biol.*, 2018 Jun: 78:37-50.
- ♦ Jia R, Weng Y, Li Z, Liang W, Ji Y, Liang Y, Ning P. “**Bioinformatics Analysis Identifies IL6ST as a Potential Tumor Suppressor Gene for Triple-Negative Breast Cancer.**” *Reprod Sci.*, 2021 Aug: 28(8):2331-2341.
- ♦ Jiang L, Lv L, Liu X, Jiang X, Yin Q, Hao Y, Xiao L. “**MiR-223 promotes oral squamous cell carcinoma proliferation and migration by regulating FBXW7.**” *Cancer Biomark.*, 2019: 24(3):325-334.
- ♦ Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. “**Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review.**” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2005 Feb: 14(2):467-75.
- ♦ Li X, Ma G, Guo W, Mu N, Wang Y, Liu X, Su L. “**Hhex inhibits cell migration via regulating RHOA/CDC42-CFL1 axis in human lung cancer cells.**” *Cell Commun Signal.*, 2021 Jul 28: 19(1):80.
- ♦ National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer Stat Facts:Laryngeal Cancer.* n.d. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/laryn.html> (accessed January 19, 2022).
- ♦ Piotrowski I, Zhu X, Saccon TD, Ashiqueali S, Schneider A, de Carvalho Nunes AD, Nouredine S, Sobocka A, Barczak W, Szewczyk M, Golusiński W, Masternak MM, Golusiński P. “**miRNAs as Biomarkers for Diagnosing and Predicting Survival of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients.**” *Cancers (Basel)*, 2021 Aug 6: 13(16):3980.
- ♦ Redis RS, Calin S, Yang Y, You MJ, Calin GA. “**Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy.**” *Pharmacol Ther.*, 2012 Nov: 136(2):169-74.
- ♦ Ricca A, Biroccio A, Trisciuoglio D, Cippitelli M, Zupi G, Del Bufalo D. “**relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells.**” *Br J Cancer.*, 2001 Dec 14: 85(12):1914-21.

- ◆ Ricciardiello F, Capasso R, Kawasaki H, Abate T, Oliva F, Lombardi A, Misso G, Ingrosso D, Leone CA, Iengo M, Caraglia M. “**A miRNA signature suggestive of nodal metastases from laryngeal carcinoma.**” *Acta Otorhinolaryngol Ital.*, 2017 Dec: 37(6):467-474.
- ◆ Song X, Li M, Wu W, Dang W, Gao Y, Bian R, Bao R, Hu Y, Hong D, Gu J, Liu Y. “**Regulation of BMP2K in AP2M1-mediated EGFR internalization during the development of gallbladder cancer.**” *Signal Transduct Target Ther.*, 2020 Aug 13: 5(1):154.
- ◆ Tie Y, Liu B, Fu H, Zheng X. “**Circulating miRNA and cancer diagnosis.**” *Sci China C Life Sci.*, 2009 Dec: 52(12):1117-22.
- ◆ Xiao X, Zhou L, Cao P, Gong H, Zhang Y. “**MicroRNA-93 regulates cyclin G2 expression and plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma.**” *Int J Oncol.* , 2015 Jan: 46(1):161-74.
- ◆ Xie F, Ye L, Chen J, Wu N, Zhang Z, Yang Y, Zhang L, Jiang WG. “**The impact of Metastasis Suppressor-1, MTSS1, on oesophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance.**” *J Transl Med.*, 2011 Jun 22: 9:95.
- ◆ Xie F, Ye L, Ta M, Zhang L, Jiang WG. “**MTSS1: a multifunctional protein and its role in cancer invasion and metastasis.**” *Front Biosci (Schol Ed).*, 2011 Jan 1: 3:621-31.
- ◆ Yilmaz M, Christofori G. “**EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.**” *Cancer Metastasis Rev.*, 2009 Jun: 28(1-2):15-33.
- ◆ Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. “**Akt, FoxO and regulation of apoptosis.**” *Biochim Biophys Acta.*, 2011 Nov: 1813(11):1978-86.