بررسی سطح بیان miR-195 به‌عنوان یک بیومارکر احتمالی در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده در استان گیلان

فاطمه اسدی رحمانی[1]، نجمه رنجی[2*]، حمید سعیدی ساعدی[3و4]

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۴/۰۲ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۶/۰۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان معده یکی از پنج سرطان شایع ایران، ششمین سرطان رایج در دنیا و دومین علت مرگ مرتبط با سرطان در دنیا است. فقدان تشخیص مراحل اولیه سرطان معده، نیاز به یافتن بیومارکرهای احتمالی را پیشنهاد می‌کند. هدف از این مطالعه ارزیابی بیان miR-195 به‌عنوان یک بیومارکر احتمالی در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده در استان گیلان بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه مورد شاهدی، روش Q-RT-PCR جهت ارزیابی سطح بیان miR-195 در پلاسمای ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده و ۲۵ فرد سالم استفاده شد. ارتباط بین بیان miR-195 و تظاهرات کلینیکوپاتولوژی با استفاده از آزمونANOVA ارزیابی شد. بررسی احتمال قدرت بیومارکری (ROC) و سطح زیر منحنی (AUC) این miRNA در دو گروه سرطانی و غیر سرطانی استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که miR-195 در افراد مبتلا به سرطان معده در مقایسه با افراد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش داشت ($P<0.05$). مقدار سطح زیر منحنی (AUC) آنالیز راک ۰/۰۰۸ ± ۰/۷۳۲۵ ($P=0.0119$) با حساسیت ۵۱/۷درصد و اختصاصیت ۷۱/۸درصد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: کاهش بیان miR-195 در بیماران سرطان معده و آنالیز راک پیشنهاد می‌کند که miR-195 می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر احتمالی در تشخیص سرطان معده در استان گیلان معرفی شود.

کلیدواژه‌ها: بیومارکر، سرطان معده، miR-195، پلاسما، آنالیز راک

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره پنجم، ص ۳۷۵-۳۶۵ ، مرداد ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی تلفن: ۱۳۳۳۴۲۴۰۸۰

Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

مقدمه

سرطان معده ششمین سرطان شایع در دنیا و یکی از پنج سرطان شایع در ایران و دومین علت مرگ در کل دنیا محسوب می‌شود(۱). از عوامل خطر سرطان معده می‌توان به جنسیت (مردان به زنان: نسبت ۲ به ۱)، عوامل محیطی (عفونت هلیکوباکتر، تغذیه، سیگار و چاقی)، گروه خونی A، عوامل ژنتیکی (جهش در ژن‌هایی چون P53، MCC Regulator Of WNT Signaling Pathway (MCC)و adenomatous polyposis coli (APC)) و عوامل اپی ژنتیکی (تغییر بیان ژن‌ها در سرطان معده) اشاره نمود (۲). فقدان بیومارکرهای تشخیصی اختصاصی در مراحل اولیه سرطان معده، یکی از مشکلات در تشخیص و درمان این بیماری محسوب می‌شود(۳). تشخیص این سرطان اغلب در مراحل پیشرفته آن با تهاجمی شدن و متاستاز لنفاتیک همراه است و متأسفانه سرطان پیشرفته معده در بیماران، از نوع عودکننده و با نرخ بقای کم خواهد بود(۴). بنابراین، تشخیص زودهنگام سرطان معده در هر کشور و منطقه می‌تواند نرخ مرگ‌ومیر در اثر این عامل شایع مرگ سرطانی را کاهش دهد. مارکرهای سرطانی شامل carcinoembryonic antigen (CEA)، Cancer Antigen 19-9 (CA19-9)، Cancer Antigen 125 (CA125)و Cancer Antigen 72-4 (CA72-4)جزء رایج‌ترین مارکرهای تشخیص

[1] دانشجوی دکتری، زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ای‌ران

[2] استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (نویسنده مسئول)

[3] دانشیار، انکولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

[4] دانشیار، انکولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

سرطان معده هستند. اما در تشخیص زودهنگام سرطان معده، دارای حساسیت کم و اختصاصیت پایینی هستند (۲).

miRNA (microRNA) ها گروهی از RNA های غیر رمزشونده با طولی حدود ۱۷ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها در سطح پس از رونویسی اغلب از طریق اتصال به 3'-UTR ی mRNA ی هدف نقش دارند(۵). این تنظیم‌کننده‌های منفی یا با تجزیه mRNA هدف و یا با توقف ترجمه، نقش خود را در سلول ایفا می‌کنند(۶). و به نظر می‌رسد بیش از ۱۴۰۰ نوع miRNA ، بیان بیش از یک‌سوم ژن‌ها را در انسان تحت کنترل داشته باشند. miRNA ها در تنظیم فرآیندهای مختلفی در سلول ازجمله تکثیر، تمایز، مهاجرت، اپوپتوز، مهار و سرکوب تومورزایی و پاسخ‌های ایمنی نقش دارند. بنابراین، تنظیم و بیان نادرست این گروه از ماکرو مولکول‌ها ممکن است در بدن منجر به بروز ناهنجاری‌های مختلفی ازجمله بروز و پیشرفت سرطان شود. در انواع سرطان‌ها بیان نادرست انواعی از miRNA ها گزارش شده که بر اساس نقش آن‌ها در سرطانی شدن به دو گروه انکومیر ۱ و تومور ساپرسیو-میر ۲ دسته‌بندی می‌شوند (۷). انکومیر ها، گروهی از miRNA ها هستند که در سرطان‌ها افزایش بیان داشته و باعث مهار بیان ژن‌های سرکوبگر تومور می‌شوند. در مقابل تومور ساپرسیو-میرها گروه دیگری از miRNA ها هستند که در سرطان‌ها کاهش بیان داشته و باعث مهار بیان انکوژن‌ها می‌شوند(۸) miR-195 یک کلاس جدید از miRNA ها (۹) از خانواده miR-15/107 است (۱۰) که در چندین سرطان ازجمله سرطان معده، روده و اوستئوسارکوما (۹) ، سینه ، پروستات و مثانه با تغییر بیان همراه بوده است (۱۰) . در مطالعه‌ای مشخص شد که miR-195 با مهار CDK6 و VEGF در سلول‌های سرطانی معده، نقش سرکوبگر تومور داشته است (۱۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر این اثر سرکوبگری تومور در سلول‌های سرطانی معده به مهار AKT3 (۱۲) یکی از پروتئین‌های کیناز مسیر پیام‌رسانی Phosphatidyl Inositol 3-Kinase A/AKT (PI3K/AKT) نسبت داده شد (۱۳). افزایش بیان اکتوپیک miR-195 باعث مهار تکثیر، مهاجرت و تهاجمی شدن رده‌های سلولی سرطانی معده می‌گردد. همچنین افزایش بیان miR-195 در رده‌های سلولی سرطانی معده باعث حساسیت به شیمی‌درمانی با سیس پلاتین گردید (۱۲). در مطالعه Shen و همکاران در سال ۲۰۱۶ کاهش بیان آن هم در سرم و هم در بافت معده افراد مبتلا به سرطان معده گزارش شد (۹). miRNAی سیار[3]، miRNA ی آزاد در مایعات بدن شامل خون، بزاق و ادرار است که هم در افراد سالم و هم در افراد بیمار قابل‌بررسی می‌باشد. هرچند ریبونوکلئازها هم در سرم و هم در پلاسما حضور دارند، اما اغلب miRNA های سیار در پوشش‌های لیپیدی ازجمله اجسام اپوپتوزی، میکروویزیکول‌ها و اگزوزوم‌ها قرار دارند و به‌این‌ترتیب از هضم نوکلئازی در امان می‌مانند. حضور miRNA ها در مایعات بدن می‌تواند آن‌ها را به‌عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی برای تشخیص سرطان معرفی نماید. انواع مختلف miRNAها ی سیار در سرطان‌های مختلف شناسایی شده‌اند. با اینکه برای تعداد معدودی از سرطان‌ها تشخیص از طریق بیومارکرهای خون امکان‌پذیر نیست، اما در اغلب موارد می‌توان از miRNA های سیار در مایعات بدن جهت تشخیص سرطان بهره برد(۱۴).

اغلب افراد مبتلا به سرطان معده در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند و در مراحل اولیه قابل‌شناسایی نیستند. مطالعات مختلف در ایران شیوع بالای این سرطان را گزارش می‌دهد بخصوص اینکه استان‌های شمالی مناطق با ریسک بالا گزارش شده‌اند (۱۵). در این مطالعه تلاش شد بیان miR-195 به‌عنوان بیومارکر احتمالی در پلاسمای ۲۵ فرد سالم و ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده در استان گیلان بررسی و ارتباط آن با علائم کلینیکوپاتولوژی بیماران مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

در این مطالعه مورد شاهدی، ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده (قبل از شروع هر نوع درمان) و ۲۵ فرد سالم از مهر ۱۳۹۷ تا دی ۱۳۹۸ شرکت داده شدند. معیارهای ورود افراد موردمطالعه، اطلاعات ثبت‌شده این بیماران در بایگانی سرطان معده بیمارستان رازی رشت بود، که اطلاعات کلینیکوپاتولوژی آن‌ها به تأیید متخصص مربوطه رسید. معیارهای خروج نیز شامل بیماران با اطلاعات کلینیکوپاتولوژی ناقص و یا بیماران در فاز شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی بود. اطلاعات به‌دست‌آمده از بیماران در این مطالعه شامل سن، جنسیت، مصرف یا عدم مصرف سیگار، مکان قرارگیری تومور، اندازه تومور، درجه تومور، مرحله پاتولوژیکی تومور و متاستاز به لنف یا عدم متاستاز به لنف بود. تومور ازنظر مکان قرارگیری در یکی از بخش‌های ابتدایی، میانی و یا پایینی معده قرار می‌گیرد (۱۶). مراحل توموری شدن با نظر اتحادیه بین‌المللی مبارزه با سرطان[4] (UICC) و کمیسیون مشترک سرطان امریکا[5] (AJCC) مراحل سرطان معده طبق سیستم TNM دسته‌بندی می‌شود.

[1] Onco-miR
[2] Tomour suppressive-miR
[3] Circulating miRNA
[4] International Union Against Cancer
[5] American Joint Commission on Cancer

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

بطوریکه مراحل تومور به سه شاخه T (عمق تومور)، شاخه N (وضعیت غدد لنفاوی) و شاخه M (متاساتاز به دور) تقسیم‌بندی می‌شود. در شاخه T چهار دسته اصلی T1 (تومور در موکوس تا ساب موکوس)، T2 (تومور در پروپریا تا ساب سروز)، T3 (نفوذپذیری سروز بدون تهاجم به بافت‌های نزدیک) و T4 (تهاجم تومور به بافت‌های نزدیک) وجود دارد. بر اساس نتایج آندوسکوپی و بیوپسی، محل قرارگیری تومور و تظاهرات ماکروسکوپی سرطان معده اولیه (انواع protruded:I ، superficial :II و III: exulcerated) و سرطان معده پیشرفته (انواع Borrmann ی I، II، III و IV) تقسیم‌بندی می‌شود (۱۷).

خون‌گیری از تمامی داوطلبان با رضایت شخصی و تکمیل فرم رضایت‌نامه همراه بود. پس از اخذ مجوز کد اخلاق از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (IR.IAU.RASHT.REC.1399.010)اطلاعات کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران اخذ گردید. سپس از بیماران و افراد سالم (کنترل) نمونه خون (۴ میلی‌لیتر) تهیه شد. نمونه‌های خونی در لوله‌های حاوی EDTA قرار داده شد و سپس به میکروتیوب‌های حاوی RNase/DNase free منتقل گردید. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور 3000 rpm سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف رویی (پلاسما) به میکروتیوب جدید منتقل در دمای 70ºC- نگهداری شد.

بررسی سطح بیان miR-195:

استخراج RNA از نمونه‌های پلاسما به کمک کیت BON-miR RNA extraction (مرکز تحقیقاتی بن یاخته، تهران) صورت گرفت. کمیت RNA با نانودراپ ۱۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific) بررسی شد. سپس سنتز cDNA از miRNA ها به کمک کیت BON-miR miRNA 1st-strand cDNA synthesis (مرکز تحقیقاتی بن یاخته، تهران) انجام شد. بر طبق دستورالعمل، ابتدا با استفاده از آنزیم polyA polymerase به انتهای '3 همه miRNA ها در لوله آزمایش دم پلی A اضافه شد. به این منظور RNA ی توتال سلولی (۵> µg)،rATP، آنزیم polyA polymerase و بافر مخصوص آنزیم با آب RNase free به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. برای اضافه شدن دم پلی A به miRNA ها، این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس برای غیرفعال سازی آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط با پرایمر عمومی (BON-RT adaptor)(۰/۵µM) و آب به حجم ۱۳ میکرولیتر رسید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس در ظرف یخ قرار گرفت. در ادامه آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (RT)، مخلوط dNTP ها (۱۰ mM) و بافر مخصوص به مخلوط miRNA ها اضافه شد و سنتز complementary DNA (cDNA) از miRNA ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در این مرحله نیز، برای غیرفعال سازی آنزیم RT، اجزای واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

برای بررسی سطح بیان miR-195 در افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم از واکنش Q-)quantitative real-time PCR RT-PCR) به کمک کیت BON-miR High specificity miRNA QPCR (مرکز تحقیقاتی بن یاخته، تهران) در دستگاه Applied Biosystems Step-One Plus™استفاده شد. بر طبق دستورالعمل، اجزای واکنش با حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۶/۳ میکرولیتر مستر میکس حاوی سایبر گرین (2X miRNA QPCR master mix)، ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۴۰nM) و ۴/۷ میکرولیتر آب دیونیزه بود. توالی پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است. از miR-93-5p به‌عنوان ژن کنترل داخلی و برای نرمال‌سازی واکنش استفاده شد (۱۸). برنامه دمایی واکنش شامل این موارد بود: واسرشت شدن اولیه ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۰ سیکل شامل ۱) واسرشت شدن ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها (Annealing) و تکثیر (Extension) تواماً ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد. تغییرات بیان با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (۱۲).

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورداستفاده در واکنش Q-RT-PCR

توالی پرایمر	نام پرایمر
5′-TTGGTAGCAGCACAGAAATA-3′	miR-195-F
5′-GAGCAGGGTCCGAGGT -3′	miR-195-R
5′-TAAAGTGCTGTTCGTG-3′	miR-93-5p-F
5′- GAGCAGGGTCCGAGGT -3′	miR-93-5p -R

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

آنالیز منحنی راک[1] و آنالیز مسیر بیولوژیکی:

از منحنی راک و نمایش سطح زیر نمودار آن جهت بررسی میزان احتمال نقش بیومارکری miR-195 در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان گیلان، استفاده شد. همچنین از آنالیز بیوانفورماتیکی (*In silico* analysis) جهت بررسی احتمال تداخلات ژنی بین miR-195 و ژن‌های هدفش در سرطان معده بهره برده شد. آنالیز *in silico* به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی ازجمله نرم افزارهای آنلاین (الگوریتم‌های) Target scan و miRWalk و سایت Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome(KEGG) جهت بررسی واکنش بیولوژیکی بین miR-195 و ژن‌های هدف مربوط به آن صورت گرفت. این الگوریتم‌ها، اهداف احتمالی miRNA ها را بر اساس حضور سایت مکمل miRNA اغلب در انتهای 3′UTR ی mRNA هدف (و یا در قسمت کدینگ) تعیین می‌کنند. در این الگوریتم‌ها وجود سایت اتصال بین mRNA و miRNA(۱۹)، تعداد بازهای مکمل mRNA با ناحیه seed در miRNA (۲۰)، میزان پایداری ترمودینامیکی اتصال در ناحیه مکمل بین دو RNA و ... در تعیین هدف احتمالی miRNA مؤثر است (۱۹). بعد از تعیین اهداف احتمالی با نرم افزارهای آنلاین، از سایت KEGG برای غنی سازی نتایج هدف و شناسایی مسیرهای بیولوژیک این اهداف احتمالی استفاده شد(۲۱).

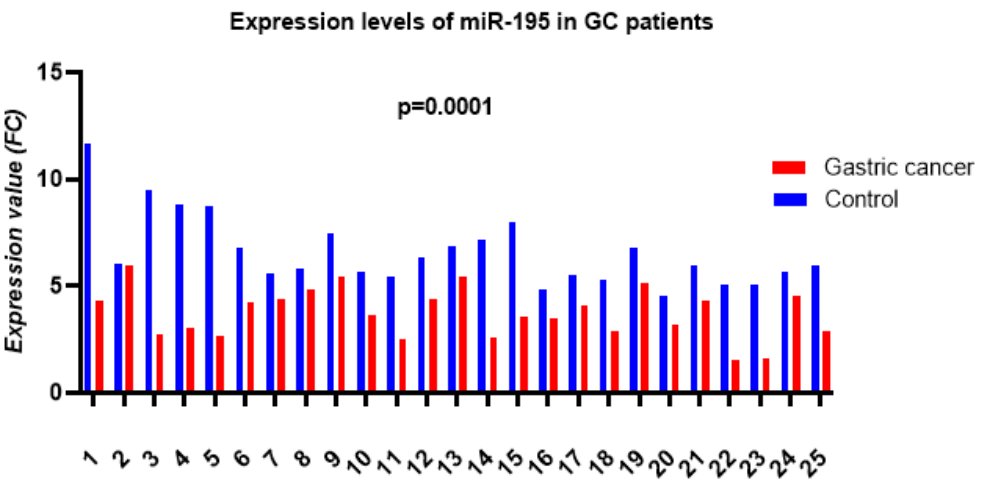
آنالیزهای آماری:

اختلاف بین نتایج در افراد سالم و مبتلا به سرطان با استفاده از تست انالیز واریانس (ANOVA(Analysis of variance)) و t-test با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ (P<0.05) و به کمک نسخه ۲۰ برنامه software platform offers advanced statistical analysis(SPSS) ارزیابی شد و نمودارها با استفاده از نسخه ۸ برنامه GraphPad Prism رسم شد.

یافته‌ها

کاهش بیان ژن miR-195 در بیماران مبتلا به سرطان معده:

با مقایسه بیان miR-195 در پلاسمای ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده و ۲۵ فرد سالم در استان گیلان مشخص شد که بیان miR-195 در افراد مبتلا به سرطان معده نسبت به افراد سالم به‌طور معنی‌داری (*P*=0.0001) کاهش یافته است (نمودار ۱).



نمودار (۱): میزان بیان miR-195 (Fold change=FC) در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده در مقایسه با افراد سالم (*P*=0.0001).

ارتباط بین بیان miR-195 و درجه پیشرفت تومور در افراد مبتلا به سرطان معده:

با بررسی ارتباط بیان miR-195 و نتایج دموگرافیکی و پاتولوژیکی بیماران مشخص شد که کاهش بیان miR-195 با درجه پیشرفت تومور (III و IV) ارتباط معنی‌داری (*P*=0.037) دارد (شکل ۱) و در سایر داده‌ها این ارتباط مشهود نبود (جدول ۲).

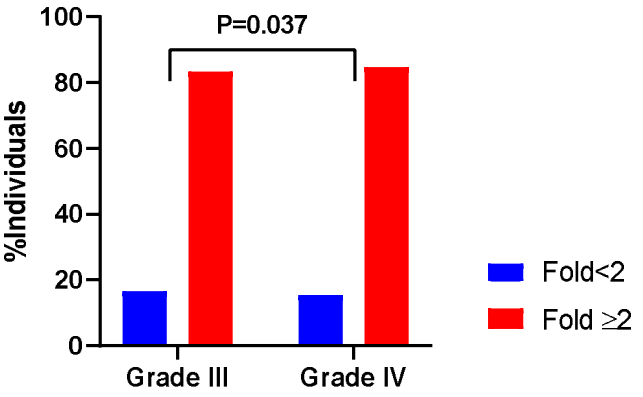
[1] receiver operating characteristic curve (ROC)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

جدول (۲): ارتباط بین بیان miR-195 و داده‌های دموگرافیک و پاتولوژیک افراد مبتلا به سرطان معده

داده‌های دموگرافیک و پاتولوژیک		میزان بیان miR-195		*P*-Value
		≥2-Fold تعداد (درصد)	<2-Fold تعداد (درصد)	
سن (سال)	≥۶۵	۶ (٪۲۴)	۴ (٪۱۶)	۰/۲۰۴
	<۶۵	۸ (٪۳۲)	۷ (٪۲۸)	
جنسیت	مرد	۶ (٪۲۴)	۴ (٪۱۶)	۰/۷۹
	زن	۷ (٪۲۸)	۸ (٪۳۲)	
مصرف سیگار	سیگاری	۹ (٪۳۶)	۹ (٪۳۶)	۰/۵
	غیر سیگاری	۵ (٪۲۰)	۲ (٪۸)	
مکان قرارگیری تومور	بخش ابتدایی(Cardia)	۹ (٪۳۶)	۶ (٪۲۴)	۰/۴۲
	بخش میانی یا اصلی (Body)	۳ (٪۱۲)	۳ (٪۱۲)	
	بخش پایینی(Antrum)	۲ (٪۸)	۲ (٪۸)	
اندازه تومور	< 4cm	۸ (٪۳۲)	۷ (٪۲۸)	۰/۲۰۴
	4-8 cm	۶ (٪۲۴)	۴ (٪۱۶)	
درجه تومور	III	۱۰ (٪۴۰)	۲ (٪۸)	۰/۰۳۷
	IV	۱۱ (٪۴۴)	۲ (٪۸)	
مرحله پاتولوژیکی تومور	Superficial type	۷ (٪۲۸)	۳ (٪۱۲)	۰/۶۲
	Borrmann I,II type	۳ (٪۱۲)	۵ (٪۲۰)	
	Bormann III,IV type	۴ (٪۱۶)	۳ (٪۱۲)	
متاستاز لنفی تومور	مثبت	۱۳ (٪۵۲)	۳ (٪۱۲)	۰/۴۳
	منفی	۵ (٪۲۰)	۴ (٪۱۶)	

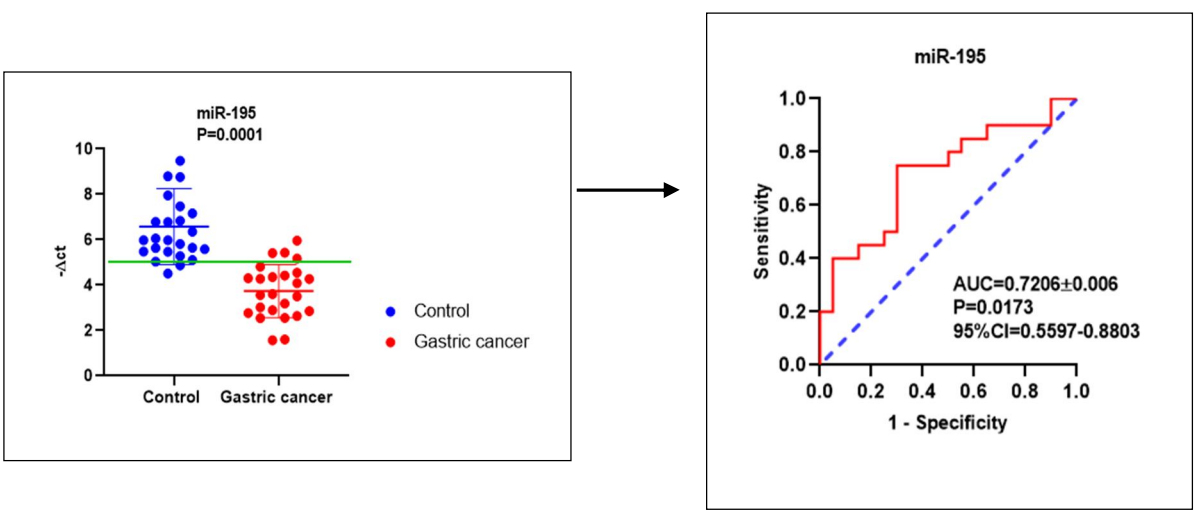
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]



شکل (۱): ارتباط بین درجه تومور و بیان miR-195 در افراد مبتلا به سرطان معده. نتایج آماری اختلاف معنی دار بین کاهش بیان این miRNA و درجه تومور نشان داد.

آنالیز منحنی راک:

سطح زیر نمودار در منحنی راک AUC=0.7206±0.006 با سطح معنی‌داری معادل P=0.0173 مبین پتانسیل کاندیداتوری این miRNA به‌عنوان بیومارکر در پیش آگهی سرطان معده در جمعیت ایرانی ساکن در استان گیلان می‌باشد. نتایج این آنالیز نشان می دهدکه ازنظر آماری کاهش بیان miR-195 به‌عنوان بیومارکر سرطان معده در استان گیلان توان تشخیص ۷۲ درصد از افراد بیمار را دارد. حساسیت و اختصاصیت miR-195 در تشخیص سرطان معده به کمک آنالیز راک ۵۱/۷درصد و ۷۱/۸درصد به ترتیب تعیین شد (شکل ۲).

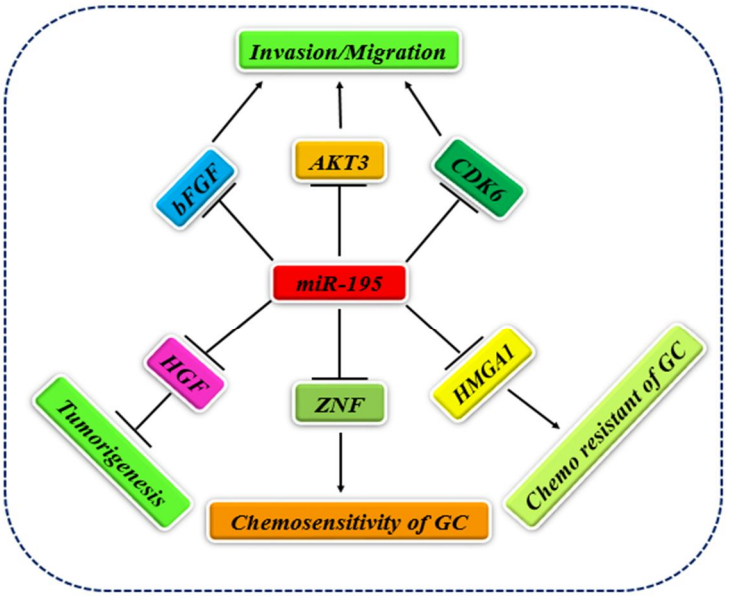


شکل (۲): منحنی راک (نمودار سمت راست). آنالیز دیتا مبین سطح زیر نموداری معادل AUC=0.7206±0.006 با سطح معنی‌داری معادل P=0.0173 می‌باشد. این منحنی بر اساس پراکندکی تغییرات منفی دلتا سی تی (-ΔCt) (نمودار سمت چپ) رسم شده است.

آنالیز بیوانفورماتیکی مسیرهای بیولوژیکی وابسته به miR-195:

آنالیز *in silico* به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی ازجمله نرم افزارهای آنلاین (الگوریتم‌های) Target scan و miRWalk و سایت Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome(KEGG) جهت بررسی واکنش بیولوژیکی بین miR-195 و ژن‌های هدف مربوط به آن صورت گرفت. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که miR-195 با هدف قرار دادن ژن‌های مهم نظیر HGF، AKT3، CDK6،bFGF،HMGA1 و ZNF در فرآیندهایی چون تومورزایی، مهاجرت سلولی و بدخیمی، مقاومت به دارو و همچنین حساسیت به داروهای شیمی‌درمانی در سرطان معده نقش مهمی ایفا می‌کند. شکل ۳ مسیر بیولوژیکی واکنش بین miR-195 و بعضی از ژن‌های هدف آن را نشان می‌دهد.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]



شکل (۳): مسیر بیولوژیکی miR-195 و ژن‌های هدف آن در پیشرفت سرطان معده

بحث

اگرچه امروزه شیوع سرطان معده در دنیا کاهش چشمگیری داشته است که ایران هم از این مهم مستثنی نبوده، اما همواره مطالعات اپیدمیولوژیکی که در شمال کشور انجام شده وجود موارد جدید سرطان معده را گزارش می‌دهد، به طوریکه هنوز در زمره علل و فاکتورهای مرگ‌ومیردر ایران به شمار می‌رود (۲۲). فقدان علائم واضح بالینی و فقدان بیومارکرهای دقیق در مرحله اولیه کارسینوم، تشخیص اولیه سرطان‌ها را با محدودیت مواجه می‌کند. مارکرهای تشخیصی رایج سرطان دارای دقت و حساسیت کمی بوده، لذا شناسایی بیومارکرهای جدید با حساسیت بالا و سهولت در تشخیص جهت پیش آگهی و تشخیص سرطان الزامی است (۲۳). در این مطالعه بیان miR-195 در افراد سالم و مبتلا به سرطان معده در استان گیلان به روش Q-RT-PCR بررسی شد و با بررسی ارتباط آن با نتایج کلینیکوپاتولوژیک و همچنین آنالیز بیوانفورماتیکی به‌عنوان یک بیومارکر سرطان معده در این جمعیت پیشنهاد گردید.

شواهد و دلایل ازمایشگاهی وجود miRNA ها را در پیدایش و گسترش سرطان‌های معده را به اثبات رسانده‌اند. بر اساس یافته‌های بالینی و مطالعات اپیدمیولوژیکی، به نظر می رسد که تشخیص این نوع سرطان عموماً در مراحل پیشرفته سرطان صورت گیرد بنابراین شناسایی بیومارکرهای مناسب و جدید می‌تواند در تشخیص زودهنگام و متعاقب آن درمان سریعتر بیماری مؤثر باشد. مطالعات مختلف تغییر بیان miR-195 را در سرطان معده و دیگر سرطان‌ها گزارش کرده‌اند. در مطالعه Zhao و همکاران کاهش معنی‌داری در بیان miR-195 در سرم افراد مبتلا به سرطان سینه نسبت به افراد سالم مشخص شد. در این مطالعه حساسیت و اختصاصیت miR-195 در تشخیص سرطان سینه به ترتیب ۶۹درصد و ۸۹/۲درصد تعیین شد. در حالیکه حساسیت مارکرهای سرطانی CEA و CA153 حدود ۱۵/۰۸درصد و ۲۱/۱درصد به ترتیب بودند(۲۴). در مطالعه Sohn و همکاران کاهش بیان معنی دار miR-195 در اگزوزوم های سرمی در افراد مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوما نسبت به افراد مبتلا به هپاتیت B مزمن، این miRNA را به‌عنوان یک بیومارکر سرولوژیک جدید پیشنهاد کرد(۲۵). در تشخیص سرطان معده بیومارکرهای مختلفی از جنس پروتئین، DNA و RNA معرفی شده که اختصاصیت و حساسیت‌های مختلفی دارند؛ ازجمله مارکرهای پروتئینی می‌توان به CA19-9 با ۵۶ درصدی و اختصاصیت ۷۴ درصدی اشاره نمود. در مطالعه Matsuoka و همکاران مشخص شد که این حساسیت با استفاده همزمان از دو مارکر CEA و CA19-9 به ۸۷درصد می‌رسد (۲۶). در مطالعه Wu و همکاران کاهش بیان miR-195 در بافت معده افراد مبتلا به سرطان معده مشاهده شد. در این مطالعه حساسیت و اختصاصیت این miRNA به ترتیب

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

۶۹/۲درصد و ۱۰۰درصد گزارش شد(۲۷). در مطالعه حاضر میزان حساسیت و اختصاصیت miR-195 در تشخیص سرطان معده با آنالیزراک ۵۱/۷درصد و ۷۱/۸درصد گزارش شد که نسبت به مارکر پروتئینی سرطانی CA19-9 دارای اختصاصیت و حساسیت تقریباً نزدیکی در تشخیص سرطان معده بود. در مطالعه حاضر مشابه با مطالعه Zhao و همکاران و مطالعه Sohn و همکاران و مطالعه Wu و همکاران، حساسیت و اختصاصیت بالای miR-195 گزارش شد. در حالیکه طبق گزارش مطالعه Zhao و همکاران حساسیت دو مارکر پروتئینی پایینتر از این miRNA بود و در مطالعه Matsuokaاستفاده همزمان دو مارکر پروتئینی باعث افزایش حساسیت در تشخیص سرطان شد. بنابراین استفاده از مارکرهای از جنس miRNA ممکن است با وجود چنین نتایجی، نسان دهنده ارجحیت استفاده از آن‌ها در آینده بجای مارکرهای پروتئینی باشد. همچنین در مطالعه Wu و همکاران حساسیت و اختصاسیت miR-195 در افراد مبتلا به سرطان معدهه بالاتر بود که علت این امر بررسی بیان این miRNA در بافت سرطانی بود در حالیکه در مطالعه حاضر از پلاسمای خون استفاده شده و بی شک در بافت سرطانی میزان بیان miRNA ها در سطح بالاتری از نمونه‌هایی است که در خون در گردش هستند. با این وجود برای تشخیص زودهنگام ترجیحاً خون‌گیری، از جداسازی بیوپسی ارجحیت بیشتر و تکرار پذیری بیشتری در سالهای مختلف (جهت غربالگری در افراد در ریسک این سرطان) دارد. همچنین در مطالعه Qiu و همکاران بر روی نمونه‌های پلاسما و بافت بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با کنترل به روش qRT-PCR کاهش بیان معنی‌داری در miR-195 در نمونه‌های پلاسما و بافت بیماران مشاهده شد وآنالیز منحنی راک AUC معادل ۰/۷۶۵ برای miR-195 بود که با میزان محاسبه شده در مطالعه حاضر (۰/۷۲) مشابه بود(۷۸). یکی از محدودیت‌های این مطالعه بررسی بیماران در یک استان بود که به طبع با وجود محدودیت زمانی مطالعه، تعداد نمونه نیز در این جمیعت کوچک نسبت به جمعیت‌های بزرگتر کم خواهد بود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی یا بازه زمانی مطالعه افزایش یابد تا بیماران بیشتری در مطالعه شرکت داده شوند یا جمعیت بزرگتری بررسی شوند تا شناسایی بیومارکر با دقت و حساسیت بالاتری بررسی و miR-195 را به‌عنوان بیومارکر احتمالی سرطان معده معرفی نمود.

همچنین در مطالعات مختلف کاهش بیان پایین miR-195 در سرطان معده گزارش شده است در مطالعه Shen و همکاران بیان miR-195 در بافت سرطانی و پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده در مقایسه با بافت مجاور سرطان و در پلاسمای افراد سالم کاهش شدید نشان داد. در این مطالعه کاهش بیان miR-195 ارتباط معکوس با عمق تومور، میزان تمایز، درجه تومور و متاستاز غدد لنفی داشت (۹). در مطالعه Deng و همکاران مشخص شد که بیان miR-195 هم در بافت‌های سرطانی معده و هم در رده‌های سلولی سرطانی معده کاهش نشان داد. در این مطالعه کاهش بیان miR-195 ارتباط نزدیکی با متیله شدن پروموتر CpG داشت (۱۱). همچنین در مطالعه Nie و همکاران مشخص شد که بیان miR-195 در شش بافت توموری معده با تمایز بالا، کمتر از شش بافت توموری معده با تمایز کم بود. در این مطالعه افزایش بیان miR-195 با افزایش حساسیت به شیمی‌درمانی در سلول‌های سرطانی معده همراه بود (۲۸). با توجه به نقش این miRNA در مهارکنندگی تومور طبق مطالعات Shen و همکاران، Deng و همکاران و Nie و همکاران به نظر می‌رسد این miRNA بتواند در پلاسمای خون افراد مبتلا به سرطان معده نیز الگویی مشابه با بافت سرطانی داشته باشد. لذا در تأیید این مسئله در مطالعه حاضر کاهش بیان miR-195 در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده نسبت به افراد سالم گزارش شد. در این مطالعه کاهش بیان miR-195 با درجه III و IV سرطان معده در بیماران ارتباط معنی دار نشان داد. این مسئله در مطالعات Shen و همکاران، و Nie و همکاران نیز نشان داده شده بود. بطوریکه کاهش بیان miR-195 با درجه بالاتر سرطان و متاستاز به لنف و کاهش تمایز همراه بود. از آنجایی که miRNA های سیار، گزینه مناسبی در تشخیص زودهنگام افراد در خطر سرطان به حساب می‌آیند، با توجه به مطالعات ذکر شده و مطالعه حاضر، miR-195 می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر احتمالی مناسب در خون در شناسایی زودهنگام سرطان معده معرفی شود.

در مطالعات مختلف نقش miR-195 به‌عنوان تومورساپرسیو میر (miRNA با اثر مهارکنندگی تومور) شناسایی شده و بیان نادرست آن می‌تواند سلول را در مسیر بیولوژیکی AKT فعال سازد (۱۰). در مطالعه Deng و همکاران مشخص شد که بیان نامتعارف miR-195 هم در بافت سرطانی معده و هم در رده‌های سلولی سرطانی معده، باعث مهار Cyclin Dependent Kinase 6 (CDK6) و Vascular endothelial growth factor (VEGF) می‌شود(۱۱). در مطالعه Wang مشخص شد که miR-195 باعث مهار High Mobility Group AT-Hook 1 (HMGA1) در رده‌های سلولی سرطانی معده می‌شود(۲۹). در مطالعه Wang و همکاران مشخص شد که miR-195 با هدف قرار دادن fibroblast growth factor (bFGF)باعث مهار سرطان معده می‌شود(۳۰). در این مطالعه اهداف احتمالی miR-195 ، در مسیرهای مرتبط با تکثیر سلولی با استفاده از نرم افزارهایی نظیر Diana mt، miRWalk، Targetscan، miRDB و miRanda

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ژن‌هایی نظیر AKT3 ,CDK6,HMGA1, ZNFو HGF جزء اهداف احتمالی این miRNA هستند. به نظر می‌رسد که کاهش بیانmiR-195 در افراد مبتلا به سرطان معده در استان گیلان مشابه با مطالعه Deng و همکاران، مطالعه Wang و مطالعه Wang و همکاران ، با افزایش بیان ژن‌های مؤثر در تکثیر و در نتیجه سرطانی شدن بافت معده در افراد مبتلا به این سرطان نقش داشته باشد. از سوی دیگر، در مطالعه حاضر کاهش بیان miR-195 در افراد مبتلا به سرطان معده در درجات شدید بیماری (III و IV) گزارش شد که بی شک با افزایش بیان انکوژن‌های مهم در سلول در بروز شدت بیماری نقش داشته است. از محدودیت‌های این مطالعه عدم شناسایی بیماران در درجات Iو II بیماری بود که علت آن، عدم وجود نشانه‌های تشخیص زودرس این سرطان در بیماران است و متأسفانه تمامی بیماران با درجات شدید (III وIV) شناسایی و مورد درمان قرار گرفتند. پیشنهاد می‌شود با مطالعات وسیع‌تر با شناسایی بیومارکرهای سرطانی مناسب، موفق به شناسایی سریعتر این سرطان در درجات پایین‌تر بیماری شد.

در مجموع، یافته‌های این مطالعه مشابه با مطالعات پیشین، معید نقش احتمالی miR-195 در گسترش سرطان معده در استان گیلان بوده و نتایج حاصل از آنالیز منحنی راک می‌تواند کمک شایانی به نقش تومورمارکری آن در تشخیص زودرس و درمان سریعتر در جمعیت گیلان داشته باشد. اما از آنجایی که مقدار حجم نمونه در این مطالعه کم بوده بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات وسیع‌تری در جمعیت ایرانی با تعداد نمونه‌های بیشتر جهت شناسایی بیومارکرهای احتمالی این سرطان در سطح miRNA های سیار در خون صورت پذیرد.

References:

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin 2021;71(1):7-33.
2. Larki P, Ahadi A, Zare A, Tarighi S, Zaheri M, Souri M, et al. Up-Regulation of miR-21, miR-25, miR-93, and miR-106b in Gastric Cancer. Iran Biomed J 2018;22(6):367-73.
3. Cooke CL, Torres J, Solnick JV. Biomarkers of Helicobacter pylori-associated gastric cancer. Gut Microbes 2013;4(6):532-40.
4. Zheng Q, Chen C, Guan H, Kang W, Yu C. Prognostic role of microRNAs in human gastrointestinal cancer: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget 2017;8(28):46611-23.
5. Khakinezhad Tehrani F, Ranji N, Kouhkan F, Hosseinzadeh S. Apoptosis induction and proliferation inhibition by silibinin encapsulated in nanoparticles in MIA PaCa-2 cancer cells and deregulation of some miRNAs. Iran J Basic Med Sci 2020;23(4):469-82.
6. Pakizehkar S, Ranji N, Naderi Sohi A, Sadeghizadeh M. Curcumin loaded PEG400-OA nanoparticles: A suitable system to increase apoptosis, decrease migration, and deregulate miR-125b/miR182 in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Polymers for Advanced Technologies 2020;31(8):1793-804.
7. Hossainzadeh S, Ranji N, Naderi Sohi A, Najafi F. Silibinin encapsulation in polymersome: A promising anticancer nanoparticle for inducing apoptosis and decreasing the expression level of miR-125b/miR-182 in human breast cancer cells. J Cell Physiol 2019;234(12):22285-98.
8. Pakizehkar S, Ranji N, Sohi AN, Sadeghizadeh M. Polymersome-assisted delivery of curcumin: A suitable approach to decrease cancer stemness markers and regulate miRNAs expression in HT29 colorectal cancer cells. Polymers for Advanced Technologies 2020;31(1):160-77.
9. Shen YH, Xie ZB, Yue AM, Wei QD, Zhao HF ,Yin HD, et al. Expression level of microRNA-195 in the serum of patients with gastric cancer and its relationship with the clinicopathological staging of the cancer. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2016;20(7):1283-7.
10. Yu W, Liang X, Li X, Zhang Y, Sun Z, Liu Y, et al. MicroRNA-195: a review of its role in cancers. Onco Targets Ther 2018;11:7109-23.
11. Deng H, Guo Y, Song H, Xiao B, Sun W, Liu Z, et al. MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer. Gene 2013;518(2):351-9.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

12. Ye R, Wei B, Li S, Liu W, Liu J, Qiu L, et al. Expression of miR-195 is associated with chemotherapy sensitivity of cisplatin and clinical prognosis in gastric cancer. Oncotarget 2017; 8(57): 97260–97272.
13. Ahmad A, Biersack B, Li Y, Kong D, Bao B, Schobert R, et al. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF-κB signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. Anticancer Agents Med Chem 2013;13(7):1002-13.
14. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. Cancer Sci 2010;101(10):2087-92.
15. Kalan Farmanfarma K, Mahdavifar N, Hassanipour S , Salehiniya H. Epidemiologic Study of Gastric Cancer in Iran: A Systematic Review. Clin Exp Gastroenterol 2020;13:511-42.
16. Kim SJ, Choi CW. Common Locations of Gastric Cancer: Review of Research from the Endoscopic Submucosal Dissection Era. J Korean Med Sci 2019;34(35):e231-e.
17 .Siewert JR, Sendler A. Preoperative staging for gastric cancer [Internet]. Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented. Zuckschwerdt; 2001 [cited 2021 Sep 15]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6869/
18. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. Dig Dis Sci 2012;57(4):897-904.
19. Zadeh MM, Motamed N, Ranji N, Majidi M, Falahi F. Silibinin-Induced Apoptosis and Downregulation of MicroRNA-21 and MicroRNA-155 in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. J Breast Cancer 2016;19(1):45-52.
20. Menor M, Ching T, Zhu X, Garmire D, Garmire LX. mirMark: a site-level and UTR-level classifier for miRNA target prediction. Genome Biol 2014;15(10):500.
21. Ding M, Li J, Yu Y ,Liu H, Yan Z, Wang J, et al. Integrated analysis of miRNA, gene, and pathway regulatory networks in hepatic cancer stem cells. J Transl Med 2015;13(1):259.
22. Talebi A, Mohammadnejad A, Akbari A, Pourhoseingholi MA, Doosti H, Moghimi-Dehkordi B, et al. Survival analysis in gastric cancer: a multi-center study among Iranian patients. BMC Surgery 2020;20(1):152.
23. Wang H, Peng R, Wang J, Qin Z, Xue L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. Clin Epigenetics 2018;10:59.
24. Zhao F-l, Dou Y-c, Wang X-f, Han D-c, Lv Z-g, Ge S-l, et al. Serum microRNA-195 is down-regulated in breast cancer: a potential marker for the diagnosis of breast cancer. Mol Biol Rep 2014;41(9):5913-22.25.
Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho JY, Cho HC, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. Exp Mol Med 2015;47:e184.
26. Matsuoka T, Yashiro M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. World J Gastroenterol 2018;24(26):2818-32.
27. Wu W-Y, Xue X-Y, Chen Z-J, Han S-L, Huang Y-P, Zhang L-F, et al. Potentially predictive microRNAs of gastric cancer with metastasis to lymph node. World J Gastroenterol 2011;17(31):3645-51.
28. Nie H, Mu J, Wang J, Li Y. miR‐195‐5p regulates multi‐drug resistance of gastric cancer cells via targeting ZNF139. Oncol Rep 2018;40(3):1370-8.
29. Wang CQ. MiR-195 reverses 5-FU resistance through targeting HMGA1 in gastric cancer cells. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2019;23(9):3771-8.
30. Wang J, Li L, Jiang M, Li Y. MicroRNA-195 inhibits human gastric cancer by directly targeting basic fibroblast growth factor. Clin Transl Oncol2017;19(11):1320-8.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

Original Article

INVESTIGATION OF THE EXPRESSION LEVEL OF MIR-195 AS A POTENTIAL BIOMARKER IN THE PLASMA OF GASTRIC CANCER PATIENTS IN GUILAN PROVINCE

Fatemeh Asadi Rahmani[1], Najmeh Ranji [2], Hamid Saeidi Saedi[3,4]*

Received: 23 June, 2021; Accepted: 31 August, 2021

Abstract

Background & Aims: Gastric cancer is one of the five most common cancers in Iran, the sixth most common cancer in the world, and the second cause of cancer-related death worldwide. Failure to diagnose gastric cancer in early stages suggests the need to find potential biomarkers. This study aimed to evaluate the miR-195 expression as a potential biomarker in the plasma of gastric cancer patients in Guilan province.

Materials & Methods: In this case-control study, the Q-RT-PCR method was used to evaluate the expression level of miR-195 in the plasma of 25 patients with gastric cancer and 25 normal individuals. The relationship between the expression level of miR-195 and clinicopathologic features was evaluated using the ANOVA test. The receiver operating characteristic (ROC) and area under the curve (AUC) were used to evaluate the miR-195 as a potential biomarker to discriminate cancerous from non-cancerous states of the samples.

Results: Our analysis showed that miR-195 was significantly downregulated in gastric cancer patients compared to the normal individuals ($p<0.05$). The AUC value of ROC analysis was 0.7325±0.008 ($p=0.0119$) with the sensitivity of 51.7% and specificity of 71.8%.

Conclusion: Downregulation of miR-195 in gastric cancer patients and ROC analysis suggested that miR-195 can be introduced as a potential biomarker in the diagnosis of gastric cancer in Guilan province.

Keywords: Biomarker, Gastric cancer, miR-195, Plasma, ROC analysis

***Address*:** Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. P.O. Box: 3516-41335.
Tel: +981333424080
E-mail: n_ranji@iaurasht.c.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(5): 375 ISSN: 2717-008X

[1] Ph.D student, Cell and Molecular Biology, Department Of Biology, faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2] Assistant Professor,Molecular Genetics, Department Of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (Corresponding Authour)
[3] Associate Professor, Oncology, Department Of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[4] Associate Professor,Oncology, Gasrointestinal and Liver Diseases Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]