

ارزیابی میزان بیان has-miR-492 به عنوان یک مارکر مولکولی در بافت‌های پارافینه سرطان سینه و تخمدان و همراهی آن با فاکتورهای بالینی: یک مطالعه مورد-شاهدی

سیده مرضیه نوربخش رضائی^۱، سمیه رئیسی^۲، شهره حیدری^۳، هادی عبدالرضائی^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۸/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان سینه و تخمدان شایع‌ترین بدخیمی و علت مرگ‌ومیر در زنان در سراسر جهان هستند. بروز این سرطان‌ها در سال‌های اخیر به‌طور قابل‌توجهی در حال افزایش است. شواهد بسیاری نشان داد که بعضی از miRNA ها به‌عنوان مهارکننده تومور یا انکوژن در توسعه سرطان‌های مختلف عمل می‌کنند. با این حال، رابطه بین سرطان سینه و تخمدان و بیان miR-492 هنوز مشخص نشده است. در این مطالعه، ما نقش miR-492 در سرطان سینه و تخمدان را بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر برای بررسی بیان ژن ۴۰ بافت توموری و ۴۰ بافت غیرتوموری پارافینه سرطان سینه و تخمدان انتخاب شدند. بعد از تکمیل رضایت‌نامه، اطلاعات بالینی مربوط به تمام نمونه‌ها گرفته شد. پس از استخراج RNA تام و سنتز DNA مکمل، بیان نسبی ژن با استفاده از روش کمی Real time PCR سنجیده و به‌وسیله روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ارزیابی شد. نهایتاً الگوی بیانی توسط آنالیزهای آماری بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی تغییرات بیان miR-492 نشان داد که، در نمونه‌های توموری سینه/تخمدان بیان این miRNA به‌صورت معناداری افزایش یافت ($P=0/0001$). از طرفی، بین بیان ژن و درجه توموری ارتباط معناداری وجود نداشت ($p>0/05$). همچنین افزایش واضح بیان ژن در تومورهای متاستازدهنده سینه/تخمدان مشاهده شد. در سرطان سینه برخلاف سرطان تخمدان از نظر آماری اختلاف معناداری میان دو گروه سنی مشاهده نشد. در سرطان تخمدان جایگاه توموری نیز تأثیری در میزان بیان miR-492 نداشته است.

بحث: در مجموع، داده‌ها نشان می‌دهد که miR-492 تنظیم‌کننده مهمی در فرآیندهای زیستی سلول سرطانی است. علاوه بر این، ما نشان دادیم که miR-492 با توانایی تشخیص و پیش‌آگهی می‌تواند یک هدف درمانی جدید امیدوارکننده و احتمالاً می‌تواند بیومارکری برای سرطان سینه و تخمدان باشد.

کلمات کلیدی: miR-492، سرطان سینه، سرطان تخمدان، بیومارکر

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره نهم، ص ۶۹۵-۶۸۵، آذر ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، تلفن: ۳۸۳۲۳۲۴۴۰

Email: s.reisi@sku.ac.ir, s.reisi@yahoo.com

مقدمه

مرحله‌ی متاستاتیک نرسیده است. غربالگری سرطان سینه به کمک ماموگرافی، سونوگرافی و تصویربرداری رزونانس مغناطیسی میسر می‌شود (۳). تحقیقات زیادی برای یافتن بهترین ترکیب تست‌های غربالگری سرطان تخمدان در حال انجام است. آزمایش‌هایی که برای خانم‌هایی با ریسک بالا انجام می‌شود، آزمایش خون برای بررسی نشانگر تومور CA 125 و سونوگرافی یا هردو باهم است (۴). پس از آن مشخص شدن اساس مولکولی فرآیندهای درگیر در شروع

سرطان سینه و تخمدان به ترتیب دومین و چهارمین عامل بدخیمی‌های کشنده در میان زنان در کشورهای توسعه‌یافته می‌باشند. این سرطان‌ها هر ساله باعث مرگ تعداد زیادی از زنان می‌شوند (۱، ۲). علیرغم شیوع بالای سرطان سینه و تخمدان، اگر بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، درمان‌پذیر است. بنابر این هدف از غربالگری، تشخیص بیماری در زمانی است که هنوز به

^۱ کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۲ استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

^۴ کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

با فاکتورهای بالینی در سرطان سینه و تخمدان به طور عمده ناشناخته است. بنابر این هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان miR-492 در بافت توموری سرطان سینه و تخمدان و ارتباط آن با شرایط مختلف بالینی به منظور یافتن یک بیومارکر جدید برای تشخیص و پیش‌آگاهی و همچنین یک هدف درمانی جدید برای درمان این سرطان‌ها بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر که به صورت تحلیلی (مورد-شاهدی) صورت گرفته است، برای بررسی بیان ژنی از بافت‌های پارافینه سرطان سینه و تخمدان استفاده شد. مطالعه به صورت مورد-شاهدی انجام پذیرفت. به طوری که برای بررسی بیان ژن 40 بافت توموری و 40 بافت غیرتوموری سرطان سینه و به همین تعداد هم بافت سرطانی و بافت غیرسرطانی تخمدان انتخاب شدند (نمونه‌ها به صورت تصادفی و از آزمایشگاه پاتولوژی الزهرا اصفهان تهیه گردیدند). نمونه‌ها از بلوک‌های پارافینه به دست آمدند و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از تمام بیماران در دسترس فرم رضایت‌نامه دریافت گردید و علاوه بر سن، اطلاعات پاتولوژی و بالینی بیماران مانند اندازه تومور، متاستاز و درجه توموری نیز برای هر نمونه مشخص شد. شرایط ورود به مطالعه شامل تأیید سرطانی بودن نمونه‌ها توسط پاتولوژیست و داشتن اطلاعات بالینی می‌باشد. همچنین بیماران سابقه عود تومور و یا شیمی‌درمانی نداشتند. در صورت داشتن تومورهای خوش‌خیم و یا عدم تشخیص نوع تومور نمونه‌ها از مطالعه خارج می‌شدند. این مطالعه در کمیته پژوهشی و اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با کد ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۶۰۹۱۵ مورد تصویب قرار گرفت.

استخراج RNA تام و انجام qPCR:

استخراج RNA بر اساس دستورالعمل کیت MN آلمان (Nucleo Spintotal RNA FFPE-Germany) صورت گرفت. مطابق با این روش، ابتدا پارافین زدایی از برش‌های بافتی انجام شده و سپس سایر مراحل استخراج بر روی بافت بدون پارافین صورت گرفت. RNA های به دست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای 70- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس در کیت سنتز cDNA (Takara, Clontech) و پرایمرهای اختصاصی برای miRNA و ژن کنترل داخلی U6 انجام شد. طراحی پرایمرها با روش ساقه حلقه (stem loop) صورت گرفت. پرایمرهای مورد نظر با کمک سایت mirbase طراحی شد و به صورت توالی زیر می‌باشد:

و پیشرفت تومورهای سینه و تخمدان در درمان مؤثر آن‌ها، ضروری است (۵، ۶). از طرف دیگر علاوه بر شناسایی مکانیسم بیماری، شناسایی مارکرهایی که بتواند در تشخیص سریع بیماری کمک کند، بسیار مفید خواهد بود (۷). عوامل گوناگونی در ایجاد سرطان دخالت دارند. زمینه ژنتیکی یکی از عوامل ایجادکننده سرطان‌ها در انسان است. تغییر در ژن‌های انکوژن، مهارکننده تومور و عملکرد miRNA از جمله عوامل ایجادکننده سرطان هستند (۸-۱۰).

برهمکنش miRNA با ژن‌های هدف، نقش آن‌ها را در رشد، مرگ برنامه‌ریزی‌شده، تمایز و تکثیر سلولی مشخص کرده و عملکرد مستقیم miRNA ها را در سرطان تأیید می‌کند (۱۱). miRNA ها زیرگروه بزرگی از RNA های غیرکدکننده 25-18 نوکلئوتیدی هستند که از نظر تکاملی حفاظت شده می‌باشند. این مولکول‌ها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه mRNA یا القا تجزیه آن کنترل می‌کنند و این کار را از طریق اتصال به ناحیه ترجمه نشدنی انتهای mRNA ها انجام می‌دهند (۱۲، ۱۳). miRNA ها می‌توانند به عنوان انکوژن یا مهارکننده تومور از طریق مهار بیان ژن‌های هدف وابسته به سرطان عمل کنند. مکانیسم عمده تغییرات miRNome (تمام miRNA های موجود در ژنوم) در سلول سرطانی بیان نابجای ژن می‌باشد (۱۴-۱۶). تفاوت در بیان miRNA در سرطان‌های مختلف می‌تواند به علت تفاوت‌های موجود بین منشأ سلول سرطانی و بافت استرومایی اطراف آن باشد.

miRNA با تنظیم بیان ژن تولیدکننده پروتئین‌هایی که با دارو برهم‌کنش می‌دهند عملکرد دارو را تحت تأثیر قرار می‌دهند و از آنجایی که هر نوع سرطان پروفایل بیان ویژه‌ای از miRNA دارد با شناخت انواع miRNA های مرتبط با سرطان‌های مختلف و بررسی اثر دارو روی آن‌ها می‌توان تغییرات مؤثر در زمینه درمان سرطان برداشت (۱۷). در حال حاضر مشخص شده است که پروفایل بیان miRNA در بین بافت طبیعی و توموری متفاوت است و با بعضی از آن‌ها می‌توان بافت توموری را از بافت نرمال تشخیص داد (۱۸).

افزایش یا کاهش بیان برخی miRNA ها باعث تداخل در تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی و رشد سلولی و در نهایت منجر به روند سرطانی می‌شود. شواهد نشان می‌دهد بیش از نیمی از ژن‌های کدکننده پروتئین توسط miRNA ها کنترل می‌شود. در واقع یک miRNA می‌تواند چندین ژن را کنترل نموده و یک ژن نیز به وسیله چندین miRNA تنظیم می‌شود بنابر این یک miRNA منفرد در کنترل فرایندهای سلولی متنوعی مثل آپوپتوز، رشد، تکثیر سلولی و تمایز سلولی نقش دارد (۱۹). یکی از این miRNA ها که نقش مهمی در تومورزایی چندین نوع مختلف سرطان‌های انسان دارد، miRNA-492 است که مطالعات بسیاری هم در این مورد صورت پذیرفته است، با این وجود مکانیسم اصلی این miRNA و ارتباط آن

آنالیز داده‌ها:

جهت بررسی آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS v.22 Inc., Chicago, IL) استفاده شد. آزمون آماری t-test برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های توموری و غیرتوموری و بررسی گروه‌های سنی، اندازه تومور و متاستاز استفاده شد. سطح معنی‌داری برای محاسبات آماری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Graph Pad Prism 7 استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۴۰ بافت توموری سرطان سینه به همراه بافت سالم مجاور آن وارد شدند. همچنین تعداد ۴۰ بافت توموری سرطان تخمدان و تعداد ۴۰ بافت سالم تخمدان نیز برای بررسی تهیه شدند. جدول ۱ خلاصه‌ای از اطلاعات کلینوپاتولوژی مربوط به نمونه‌های مورد بررسی را ارائه می‌دهد. نمونه‌های بافت سینه از افراد با محدود سنی ۳۵ الی ۷۰ سال و نمونه‌های بافت تخمدانی از افراد با محدوده سنی ۲۸ الی ۶۷ سال گرفته شد. نمونه‌های بافتی اغلب دارای درجه توموری بالا بوده و حدوداً ۵۵ درصد آن‌ها متاستاز به گره لنفی و یا سایر اندام‌ها را نشان دادند. برای بررسی بیان ژن از روش qRT-PCR استفاده شد که منحنی ذوب ژن رفرنس داخلی (U6) و ژن اختصاصی (*miR-492*) به صورت اختصاصی به دست آمد. سپس بررسی بیان ژن برای تمامی نمونه‌ها انجام و بیان نسبی برای هر نمونه تعیین شد.

5'-
U6: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGACTG
GATACGACAAAATATGGAAC-3'
miR-492: 5'-
GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGC
ACCAGAGCCAAC GAAAAA-3'

سپس انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد. در این مرحله cDNA که به صورت کاملاً اختصاصی برای miR-492 و U6 می‌باشند به فریزر منتقل شده تا در زمان مناسب، از cDNA ساخته شده برای انجام Real time PCR استفاده شد.

بررسی بیان ژن با روش qRT-PCR به وسیله دستگاه Rotor-gene 6000 (Qiagen, Hildn, Germany) برای ژن *miR-492* و ژن رفرنس *U6* در حجم ۲۰ میکرولیتر به صورت SYBR premix Ex taqII (YTA) به مقدار ۱۰ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و معکوس (۱۰ پیکومولار) هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر از cDNA رقیق شده که در نهایت با آب عاری از نوکلئاز به حجم مورد نظر رسید. دمای انجام واکنش در دستگاه به صورت زیر تنظیم شد: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل واکنش تکثیر شامل ۱۵ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه دمای اتصال پرایمرها در ۶۱ درجه سانتی‌گراد و دمای طویل سازی قطعات ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. مرحله ذوب برای محصولات در دمای ۶۵-۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

جدول (۱): اطلاعات دموگرافیک و بالینی مربوط به بیماران مورد مطالعه

اطلاعات بالینی بیماران	بافت تخمدان	بافت سینه
میانگین سنی در افراد دارای تومور	۴۸/۵۵±۰/۲۵	۴۵/۹۵±۱/۴۲
میانگین اندازه تومور	۵/۵±۰/۱۵	۳/۴±۰/۸
متاستاز	۲۳ (۵۷/۵)	۲۲ (۵۵)
درجه ^۱ توموری	۱۷ (۴۲/۵)	۱۸ (۴۵)
۱	۹ (۲۲/۵)	۱۱ (۲۷/۵)
۲	۱۲ (۳۰)	۲۱ (۵۲/۵)
۳	۱۹ (۴۷/۵)	۸ (۲۰)
انواع سرطان×	۲۹ (۷۲/۵)	-
سرزوی		

^۱Grade

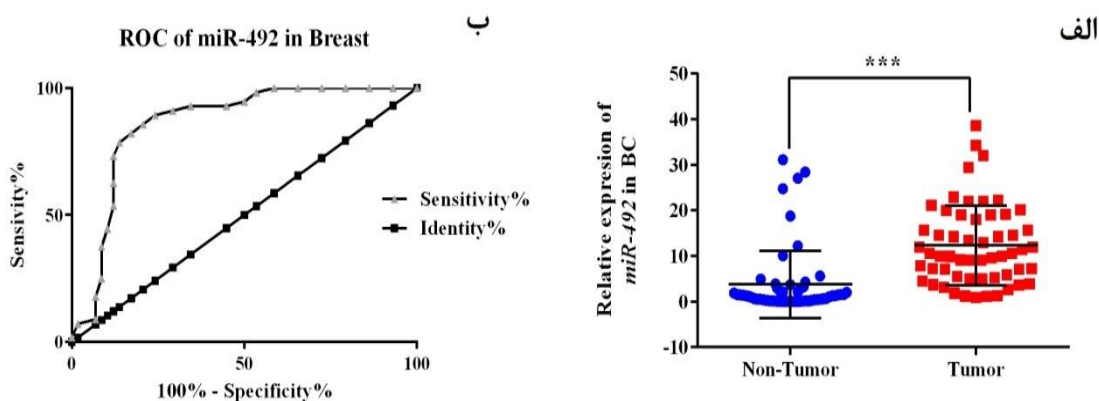
-	۶ (۰/۱۵)	اندومتروید
-	۵ (۰/۱۲/۵)	موسینوس

* انواع مربوط به بافت‌های تخمدانی می‌باشد.

بررسی بیان miR-492 در سرطان سینه:

در مقایسه میانگین بیان نسبی miR-492 در بافت‌های توموری نسبت به بافت غیرتوموری، توسط آزمون t مشخص شد که میانگین بیان نسبی miRNA در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور دارای افزایش مشخصی می‌باشد و اختلاف بسیار معناداری بین آنها وجود دارد ($P=0/0001$) (شکل ۱-الف). برای ارزیابی اختصاصیت و حساسیت بیان miR-492 به منظور تمایز میان نمونه‌های توموری و غیرتوموری آنالیز منحنی عملیاتی گیرنده (ROC) انجام شد. منحنی ROC یکی از مشهورترین روش‌های ارزیابی مدل است. این منحنی یک معیار سنجش میزان کارایی در مسائل دسته‌بندی به

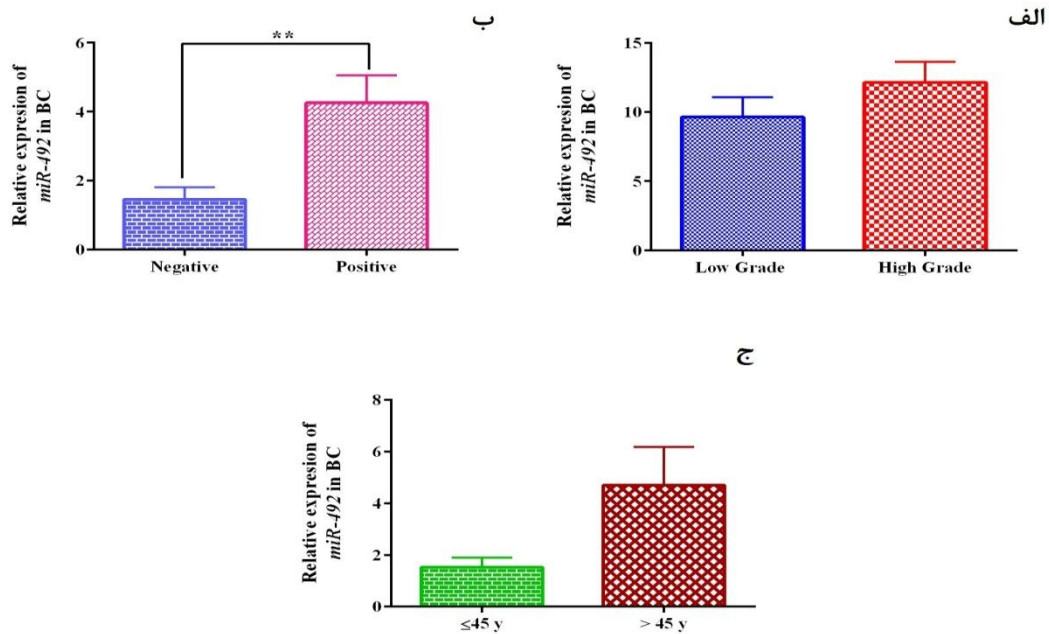
شمار می‌رود و به صورتی یک نمایش گرافیکی از میزان حساسیت یا پیش‌بینی درست در مقابل پیش‌بینی غلط در یک سیستم طبقه بندی است. این منحنی به صورت رسم موارد درست پیش‌بینی شده در مقابل موارد غلط (مثبت کاذب) پیش‌بینی شده، نشان داده می‌شود. سطح زیر منحنی عددی است که یک جنبه از کارایی را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. که مقدار نیم برابر با پیش‌بینی تصادفی و مقدار ۱ برابر با پیش‌بینی عالی است. در این مطالعه سطح زیر منحنی (AUC) برای miR-492 برابر با ۸۶ درصد ($P < 0.001$) می‌باشد، و پیشنهاد داده می‌شود که این miRNA می‌تواند به عنوان یک بیومارکر مناسب برای ارزیابی سرطان سینه باشد (شکل ۱-ب).



شکل ۱ الف: نمودار مقایسه میانگین بیان ژن miR-492 در بافت‌های توموری (رنگ قرمز) و غیر توموری (رنگ آبی) سینه. ب- منحنی عملیاتی گیرنده (ROC)، سطح زیر منحنی امتیاز ۸۶ درصد را نشان می‌دهد.

یافته بود و این تفاوت بیان در دو گروه مورد بررسی، از نظر آماری ارتباط بسیار معناداری را نشان داد ($P=0/008$) (شکل ۲-ب). در بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان miR-492 در افراد بزرگ‌تر از ۴۵ سال افزایش بیان قابل مشاهده بود، ولی از نظر آماری اختلاف معناداری میان دو گروه سنی زیر ۴۵ سال و بالای ۴۵ سال مشاهده نشد ($P=0/06$) (شکل ۲-ج).

در بررسی ارتباط میان بیان نسبی miR-492 و فاکتورهای بالینی مشخص شد که بین بیان ژن و درجه توموری ارتباط معناداری وجود ندارد. اگر چه در درجه‌های توموری بالا بیان ژن بالاتر بوده اما ارتباط بسیار معناداری بین میزان بیان ژن و درجه توموری بالا نشان داده نشد ($P=0/29$) (شکل ۲-الف). در بررسی میزان متاستاز به گره‌های لنفی مشخص شد که بیان ژن در تومورهای متاستاز دهنده نسبت به عدم متاستاز افزایش واضحی

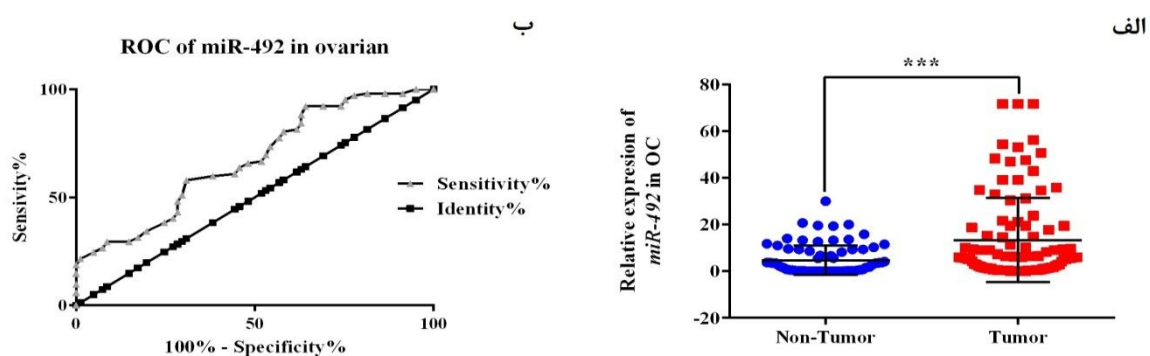


شکل (۲): مقایسه میزان بیان نسبی ژن miR-492 در سرطان سینه (BC) (الف) بافت‌های با درجه توموری بالا و پایین، (ب) متاستاز منفی و مثبت (ج) گروه‌های سنی زیر یا برابر ۴۵ سال و بالای آن

ارزیابی اختصاصیت و حساسیت بیان miR-492 به منظور تمایز میان نمونه‌های بیمار و سالم آنالیز منحنی عملیاتی گیرنده (ROC) انجام شد. سطح زیر منحنی (AUC) برای miR-492 برابر با ۰٫۶۷ درصد ($P < 0.001$) می‌باشد، و پیشنهاد داده می‌شود که این miRNA می‌تواند به عنوان یک بیومارکر مناسب برای ارزیابی سرطان تخمدان باشد (شکل ۳-ب).

بررسی بیان miR-492 در سرطان تخمدان:

در مقایسه میانگین بیان نسبی miR-492 در بافت‌های توموری نسبت به بافت غیر توموری، مشخص شد که میانگین بیان نسبی miRNA در بافت توموری نسبت به بافت سالم دارای افزایش بیان مشخصی می‌باشد و تفاوت بیان در دو گروه مورد بررسی اختلاف بسیار معناداری را نشان داد ($P = 0.001$) (شکل ۳-الف). برای



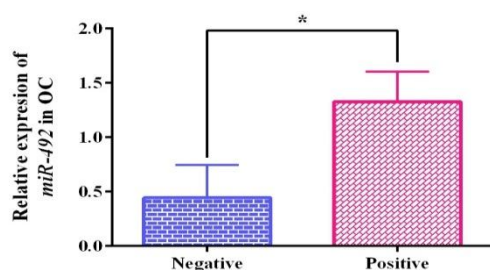
شکل (۳) الف: نمودار مقایسه میانگین بیان نسبی miR-492 در بافت‌های توموری (رنگ قرمز) و غیر توموری (رنگ آبی) تخمدان. ب- منحنی عملیاتی گیرنده (ROC)، سطح زیر منحنی امتیاز ۰٫۶۷ درصد را نشان می‌دهد.

دموگرافی و کلینوپاتولوژی نیز مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی-های کلینوپاتولوژی ارتباط میان درجه توموری بالا و پایین و میزان

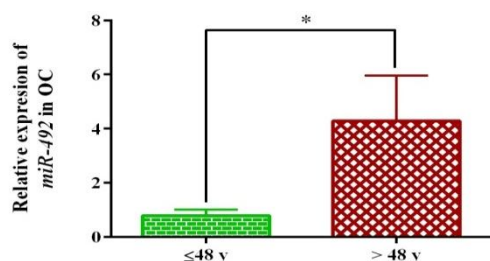
علاوه بر بررسی میزان بیان miR-492 در بافت‌های سرطانی تخمدان و بافت‌های سالم، میزان بیان miRNA در گروه‌های

و محل درگیری تومور (بافت اندومتروئیدی، موسینی و مخاطی) نیز سنجیده شد (شکل ۴-ج). مطابق با بررسی انجام شده، افزایش بیان ژن در بافت توموری سروزی و سپس اندومتروئیدی وجود داشته، اما باین وجود این تغییر به صورت معنادار نبود. بنابر این می‌توان بیان کرد که جایگاه توموری تأثیری در میزان بیان miRNA مورد نظر نداشته است. در بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان miR-492 در افراد بزرگ‌تر و برابر ۴۸ سال، افزایش بیان miRNA مشاهده شد (شکل ۴-د) و تغییر بیان در مقایسه این دو گروه از نظر آماری به صورت معنادار بود ($P=0/04$).

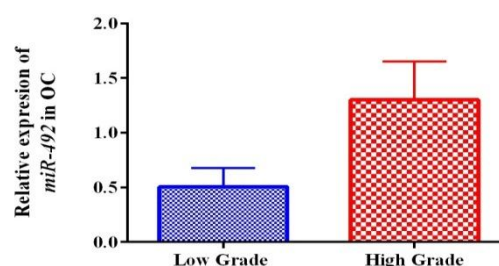
ب



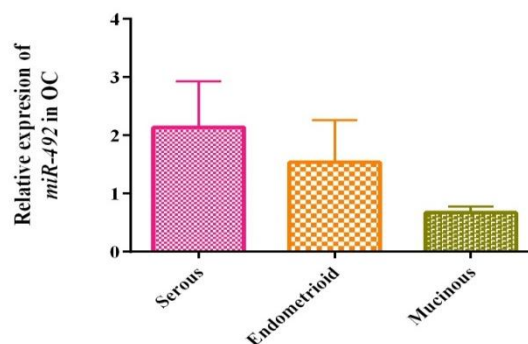
د



الف



ج



شکل (۴): مقایسه میزان بیان نسبی ژن miR-492 در سرطان تخمدان (OC) بافت‌های با درجه توموری بالا و پایین، (ب) متاستاز منفی و مثبت (ج) محل درگیری تومور (د) گروه‌های سنی زیر یا برابر ۴۸ سال و بالای آن

بحث

بررسی می‌گردد، که Oncotype DX نام دارد. روش دیگر، آزمون MammaPrint نام دارد که از ۱۶ ژن استفاده می‌شود (۲۰). پیش‌بینی می‌شود که به زودی ژن‌های دیگری در تشخیص سرطان‌های متفاوت به مرحله بالین برسند miRNA ها سال‌های زیادی نیست که مورد مطالعه وسیع قرار گرفته‌اند (۲۰، ۲۱). اما مطالعات اخیر خبر از نقش‌های بسیار مهم آنها در فرایندهای گوناگون زیستی از جمله سرطان می‌دهد. miRNA ها می‌توانند

از مارکرهای زیستی‌ای که در سرطان اهمیت دارد مارکر بیان ژن است. امروزه بر اساس مارکرهای زیستی بیان ژن، روش‌هایی ابداع شده است که الگوی بیان ژن را در سلول‌های سرطانی بررسی می‌کند. از جمله می‌توان به روشی که هم اکنون در سطح بالینی برای تشخیص سرطان سینه به کار می‌رود، اشاره کرد. در این روش، ۷۰ ژن که بیان آنها در سرطان سینه می‌تواند دچار تغییر شود،

miR-492 به عنوان یک مارکر تشخیصی در سرطان سینه و تخمدان هستند (۲۳، ۲۴).

در سال ۲۰۱۱ محققان دریافتند که در نمونه‌های توموری متاستاتیک هیپاتوبلاستوما^۲ (HB) بیان miR-492 و ژن نشانگر توموربدخیم کبد (KRT19) بطور همزمان افزایش یافته است و رابطه عملکردی نزدیکی بین این دو وجود دارد که ممکن است در پیشرفت تومورهای کبدی بدخیم نقش مهمی داشته باشند. علاوه بر این miR-492 و هدف‌های آن ممکن است یک بیومارکر جدید در تشخیص بالینی HB باشند و برای رسیدن به درمان‌های هدفمند بویژه سرطان کبد متاستاز داده با پیش‌آگاهی ضعیف کمک کنند (۲۵). همچنین در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که miRNA-492 قادر است به mRNA های درگیر در رونویسی، تکثیر سلولی، مهاجرت و همچنین mRNA های تنظیم‌کننده فعالیت eNOS متصل شود و از طرفی بیان VEGF^۳ را در سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف انسانی^۴ (HUVECs) کاهش دهد و رگزایی را در تومور مختل کند بنابر این یک ابزار امیدوارکننده برای درمان ضد رگ زایی است (۲۳). اما در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت مشخص شد که miR-492 با اتصال به RNA پیام‌رسان SOX7، که یک بازدارنده تومور معروف است، بیان در هر دو سطح رونویسی و ترجمه را سرکوب می‌کند و به تکثیر سلول‌های سرطان سینه از طریق مهار SOX7 کمک می‌کند (۲۶). مطالعاتی که توسط Sun و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بر روی سرطان کبد صورت پذیرفت نشان داد که در نمونه‌های کارسینومای هیپاتوسلولار^۵ (HCC) بیماران مبتلا به سرطان کبد بیان miR-492 افزایش یافته است و این افزایش بیان بیش از حد باعث کاهش بیان PTEN و افزایش فعال شدن AKT و افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود، بنابر این با خاموشی miR-492 می‌توان تکثیر سلول‌های سرطانی را در تومور اولیه تضعیف کرد. در مقایسه این نتایج با داده‌های حاصل از مطالعه حاضر می‌توان به این نتیجه رسید که نقش miR-492 در سرطان‌های مختلف متفاوت است و گاهی به عنوان مهارکننده تومور عمل می‌کند و گاهی نقش انکوژن را بازی می‌کند (۲۶).

در سال ۲۰۱۷ مطالعه دیگری نشان داد که افزایش بیان miR-492 اثرات مهارکننده‌ای بر پیشرفت استئوسارکوما^۶ (OS) از طریق هدف قرار دادن PAK7 اعمال می‌کند و نقش جدید miR-492 را در این سرطان نشان می‌دهد و ممکن است در ایجاد راهکارهای

مارکرهای زیستی خوبی برای شناسایی و حتی در آینده‌ای نزدیک درمان مناسب برای سرطان باشند. سطح بیان برخی از آنها مانند miR-492 در سرطان تغییر می‌کند، که این مطلب می‌تواند کاربرد تشخیصی داشته باشد (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر تغییرات بیان ژن miR-492 در بیماران مبتلا به سرطان سینه و تخمدان و ارتباط بیان آن با فاکتورهای سن، متاستاز، درجه تومور در نمونه‌های سرطانی بررسی شده است. نتایج بررسی تغییرات بیان ژن miR-492 در نمونه‌های توموری و غیر توموری نشان دادند که، در نمونه‌های توموری بیان ژن miR-492 به صورت معناداری افزایش دارد. اما این وجود، بین بیان ژن و درجه توموری ارتباط معناداری وجود نداشت. درجه بندی تومور، برای توصیف وسعت و شدت سرطان در یک شخص به کار می‌رود، به طوری که شناخت درجه بیماری به طرح درمان و تخمین پیش‌بینی درمان فردی، کمک می‌کند. سیستم‌های درجه بندی تومور بر اساس نوع سرطان متفاوت است. سلول و بافت‌های توموری با درجه ۳ مانند سلول و بافت‌های طبیعی به نظر نمی‌رسند و سرعت رشد و گسترش آنها نسبت به درجه‌های پایین‌تر، بیشتر است (۲۲).

در بررسی میزان متاستاز به گره‌های لنفی، افزایش واضح بیان ژن در تومورهای متاستاز دهنده نسبت به عدم متاستاز مشاهده شد و این تفاوت بیان در دو گروه مورد بررسی، از نظر آماری ارتباط بسیار معناداری را نشان داد. در بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان miR-492 در سرطان سینه برخلاف سرطان تخمدان از نظر آماری اختلاف معناداری میان دو گروه سنی زیر ۴۵ سال و بالای ۴۵ سال مشاهده نشد.

علاوه بر این ارتباط میزان بیان ژن با متاستاز تومورهای تخمدان به سایر نواحی نیز بررسی شد و افزایش مشخص بیان ژن در حالت متاستازی نسبت به غیر متاستازی مشاهده شد. ارتباط بیان ژن با نوع سرطان تخمدان و تأثیر محل درگیری تومور (بافت اندومتروئیدی، موسینی و مخاطی) بر روی میزان بیان miR-492 نیز بررسی شد و مشخص شد که جایگاه توموری تأثیری در میزان بیان miRNA مورد نظر نداشته است.

بررسی مطالعات گذشته بر روی تغییرات بیان ژن miR-492 در انواع مختلف سرطان نشان می‌دهد که نتایج مطالعات حاضر در توافق با نتایج به دست آمده از سایر پژوهش‌های بالینی می‌باشد به طوری که مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققان مؤید نقش

⁵ Hepatocellular Carcinoma

⁶ Osteosarcoma

² Hepatoblastoma

³ Vascular Endothelial Growth Factor

⁴ Human Umbilical Vein Endothelial Cells

به عنوان یک بیومارکر بالقوه برای درمان سرطان گردن رحم و پیش- آگهی عمل کند (۳۰).

مطالعه حاضر به صورت مقایسه ای میزان بیان miR-492 را در سرطان سینه و تخمدان نشان می دهد. با توجه به اطلاعات به دست آمده و بررسی منحنی ROC این فاکتور برای سرطان سینه فاکتور آگهی دهنده مناسب تری است. در این مطالعه به دلیل استفاده از بافت های پارافینه، محدودیت مقدار RNA و پارافین زدایی از بافت ها وجود داشت. نمونه های وارد شده در مطالعه تعداد ۵۵ نمونه توموری و ۵۵ نمونه غیر توموری بودند که تعدادی از نمونه ها به دلیل شرایط نامناسب قبل از بلوکه کردن در پارافین، RNA مطلوبی نداشته و از مطالعه حذف شدند. با این وجود، به طور کلی miRNA ها می توانند ابزار مهمی در تشخیص زود هنگام بیماری و پیش آگهی آن و هم چنین اهداف مهمی در جهت طراحی و گسترش درمان های جدید باشند. غربالگری در سرطان سینه و تخمدان برای یافتن ژن ها و پروتئین هایی که به عنوان مارکرهای بیولوژیکی معرفی شده اند و نقش مهمی در شناسایی مکانیسم مولکولی تومور نیز بازی می کنند، در حال پیشرفت است. می توان از miRNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص، پیش بینی و حتی درمان استفاده کرد و بررسی miR-492 در این مطالعه نشان داد که miR-492 دارای پتانسیل کاربرد در آزمایشگاه های بالینی جهت تشخیص سرطان سینه و تخمدان است، همچنین یافته های حاصل از این بررسی می توانند در پژوهش های بالینی و درمان احتمالی مربوط به سرطان سینه و تخمدان به کار گرفته شوند.

قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در به انجام رساندن این مطالعه، حمایت و کمکشان را دریغ نکردند به خصوص بیماران سرطانی و کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ابراز می دارند.

درمانی مؤثر برای درمان OS از طریق تنظیم miR-492 کمک کند (۲۷).

مطالعاتی که در مورد مقاومت به داروهای شیمی درمانی در سال ۲۰۱۵ انجام شده است نشان می دهد که CD147 در پیشرفت مقاومت شیمی درمانی در سلول های سرطان روده بزرگ دخیل است و بیان آن در رده های سلولی سرطان کولون در اثر کاهش بیان miR-492 افزایش می یابد و باعث مقاومت این سلول ها به آگزالی پلاتین می شود. بنابر این بیان miR-492 می تواند باعث اثر دارو شده که همراه با کاهش مستقیم بیان CD147 است و گروه نشانه miR-492/CD147 می تواند به عنوان یک هدف درمانی جدید برای درمان سرطان روده بزرگ مقاوم به شیمی درمانی به خدمت گرفته شود (۲۸).

در سال ۲۰۱۸ محققان بیان بیش از حد miR-492 را در رده های سلولی تومور کبد مشاهده کردند. این miR-492 تأثیر مستقیم قوی ای بر روی دو ایزو فرم CD44 (استاندارد و v10) داشت و بطور قابل توجهی تکثیر سلولی، رشد مستقل از لنگرگاه، مهاجرت و تهاجم سلول های هپاتوبلاستوما را افزایش داد (۲۹).

در سال ۲۰۱۸ Liu و همکارانش با بررسی بیان miR-492 در نمونه های توموری مرحله پیشرفته کارسینوما سلول های سنگفرشی گردن رحم بیماران مبتلا، قبل از شیمی درمانی و پرتو درمانی همزمان مشخص کردند که، بیان miR-492 در نمونه های حساس به شیمی درمانی و پرتو درمانی همزمان بطور معنی داری بالاتر از نمونه های سرطانی غیر حساس ($P < 0.05$) است. علاوه بر آن در سلول های SiHa بیان بیش از حد نابه جای miR-492 باعث القای تکثیر سلولی و مهاجرت و افزایش حساسیت سلول های سرطانی گردن رحم به پرتو درمانی از طریق افزایش مرگ سلولی برنامه ریزی شده با هدف قرار دادن TIMP2 می شود، که نقش مهمی در تعدیل مهاجرت و تهاجم سلول های سرطانی دارد. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که miR-492 ممکن است

References:

- Enayatrads M, Amoori N, Salehiniya H. Epidemiology and trends in breast cancer mortality in Iran. *Iran J Public Health* 2015;44(3):430.
- Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009;374(9698):1371-82.
- Mainiero MB, Moy L, Baron P, Didwania AD, Green ED, Heller SL, et al. ACR Appropriateness Criteria® breast cancer screening. *J Am Coll Radiol* 2017;14(11):S383-S90.
- Mathieu KB, Bedi DG, Thrower SL, Qayyum A, Bast JR. Screening for ovarian cancer: imaging challenges and opportunities for improvement. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018;51(3):293-303.
- Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 2014;465(1):1-14.
- Leong HS, Galletta L, Etemadmoghadam D, George J, Study AOC, Köbel M, et al. Efficient molecular

- subtype classification of high-grade serous ovarian cancer. *J Pathol* 2015;236(3):272-7.
7. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):210.
 8. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *Breast* 2011;20:S63-S70.
 9. Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J* 2012;18(3):215.
 10. Si M, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26(19):2799.
 11. Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinog* 2007;28(1):2-12.
 12. Behbahani GD, Ghahhari NM, Javidi MA, Molan AF, Feizi N, Babashah S. MicroRNA-mediated post-transcriptional regulation of epithelial to mesenchymal transition in cancer. *Pathol Oncol Res* 2017;23(1):1-12.
 13. Javidi MA, Ahmadi AH, Bakhshinejad B, Nouraei N, Babashah S, Sadeghizadeh M. Cell-free microRNAs as cancer biomarkers: the odyssey of miRNAs through body fluids. *Med Oncol* 2014;31(12):295.
 14. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857.
 15. Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays Biochem* 2013;54:29-38.
 16. Van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11(9):644.
 17. Hummel R, Hussey DJ, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo-and radiotherapy in different tumour types. *Eur J Cancer* 2010;46(2):298-311.
 18. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65(14):6029-33.
 19. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10(10):704.
 20. Noori-Dalooi MR, Nejatizadeh A. MicroRNA in disease and health: Diagnostic and therapeutic potentials. *Gene Ther* 2011:93-120.
 21. Valastyan S, Weinberg RA. MicroRNAs: Crucial multi-tasking components in the complex circuitry of tumor metastasis. *Cell Cycle* 2009;8(21):3506-12.
 22. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *NE J Med* 2001;344(8):539-48.
 23. Shen F, Cai W-S, Feng Z, Li J-L, Chen J-W, Cao J, et al. MiR-492 contributes to cell proliferation and cell cycle of human breast cancer cells by suppressing SOX7 expression. *Tumor Bio* 2015;36(3):1913-21.
 24. Peng L, Zhu H, Wang J, Sui H, Zhang H, Jin C, et al. MiR-492 is functionally involved in Oxaliplatin resistance in colon cancer cells LS174T via its regulating the expression of CD147. *Mol Cell Biochem* 2015;405(1-2):73-9.
 25. Patella F, Leucci E, Evangelista M, Parker B, Wen J, Mercatanti A, et al. MiR-492 impairs the angiogenic potential of endothelial cells. *J Cell Mol Med* 2013;17(8):1006-15.
 26. Jiang J, Zhang Y, Yu C, Li Z, Pan Y, Sun C. MicroRNA-492 expression promotes the progression of hepatic cancer by targeting PTEN. *Cancer Cell Int* 2014;14(1):95.
 27. Song X, Xie Y, Liu Y, Shao M, Yang W. MicroRNA-492 overexpression exerts suppressive effects on the progression of osteosarcoma by targeting PAK7. *Int J Mol Med* 2017;40(3):891-7.

28. Peng L, Zhu H, Wang J, Sui H, Zhang H, Jin C, et al. MiR-492 is functionally involved in Oxaliplatin resistance in colon cancer cells LS174T via its regulating the expression of CD147. *Mol Cell Biochem* 2015;405(1-2):73-9.
29. von Frowein J, Hauck SM, Kappler R, Pagel P, Fleischmann KK, Magg T, et al. MiR-492 regulates metastatic properties of hepatoblastoma via CD 44. *Liver Int* 2018;38(7):1280-91.
30. Liu M, An J, Huang M, Wang L, Tu B, Song Y, et al. MicroRNA-492 overexpression involves in cell proliferation, migration, and radiotherapy response of cervical squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog* 2018;57(1):32-43.

EVALUATION OF -MIR-492 EXPRESSION AS A BIOMARKER IN FORMALIN FIXED PARAFFIN EMBEDDED TISSUES OF BREAST AND OVARIAN CANCER AND ITS ASSOCIATION WITH CLINICAL FACTORS: A CASE-CONTROL STUDY

Sayedeh Marzieh Nourbakhsh Rezaei¹, Somayeh Reisi^{2*}, Shohreh Heidari³, Hadi Abdolrezaei⁴

Received: 05 Aug, 2019; Accepted: 23 Oct, 2019

Abstract

Background & Aims: Breast and ovarian cancer are the most common types of malignancy and the leading cause of death in females around the world. The incidence of these cancers has been experiencing a significant rise in recent years. Increasing evidence indicated that some miRNAs act as either tumor suppressors or promoters in the development of various cancers. However, the relationship between breast and ovarian cancer and the expression of miR-492 has not yet been elucidated. In this study, we explored the role of miR-492 in breast and ovarian cancer.

Materials & Methods: In the present study, 40 formalin-fixed paraffin-embedded tumoral tissues and 40 non-tumoral tissues of breast and ovarian cancers were selected to evaluate gene expression. Then, the informed consent letters were collected and clinical information for all samples were completed. Total RNA was extracted and complementary DNA was synthesized, afterward, the relative gene expression was determined using a quantitative real-time RT PCR method and evaluated by the 2- $\Delta\Delta$ ct method. Finally, the expression pattern was analyzed by statistical analysis.

Results: The results of the changes in the expression of miR-492 showed that in tumoral samples, the expression of miR-492 increased significantly ($P=0.0001$). On the other hand, there was no significant relationship between gene expression and tumor grade ($p>0.05$). There was also a clear increase in the gene expression in the metastatic tumors. In breast cancer, unlike ovarian cancer, there was no statistically significant difference between the two age groups. In addition, a specific increase was observed in the gene expression in the metastatic state in ovarian tumors. The tumor position did not affect the level of miR-492 expression in ovarian cancer.

Conclusion: Taken together, the data indicate that miR-492 is an important regulator in cancer cell biological processes. Furthermore, we showed that miR-492 with diagnostic and prognostic ability can be a promising novel therapeutic target and biomarker for breast and ovarian cancer.

Keywords: miR-492, Breast Cancer, ovarian cancer, biomarker

Address: Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Tel: (+98)383232440 (2075)

E-mail: s.reisi@sku.ac.ir, s.reisi@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2019; 30(9): 695 ISSN: 1027-3727

¹ M.Sc. in Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

² Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran (Corresponding Author)

³ M.Sc. in Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

⁴ M.Sc. in Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran