

بررسی کمی بیان تومور مارکر miRNA-196a-2 در افراد مبتلا به سرطان تخمدان به روش Real-Time PCR

فهیمة عزتی زاده^۱، سویار ساری^۱، اردشیر حسام پور^{۲*}

۱- گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مطالعه‌های اخیر بر نقش کلیدی برخی از RNAهای غیر رمزگذاری شده در شدت بیماری و حتی تشخیص زودهنگام سرطان تأکید دارند. هدف تحقیق حاضر بررسی ارتباط سرطان اپیتلیال تخمدان با miR-196a-2 است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش میزان کمی بیان مولکول miR-196a-2 در نمونه بافت ۵۰ نفر از افراد بیمار و ۵۰ فرد سالم بررسی شد. مطالعه در حضور ژن GAPDH به عنوان کنترل با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد.

یافته‌ها: بررسی کمی بیان miR-196a-2 نشان داد که میزان بیان آن در سلول‌های سرطانی تخمدان در مقایسه با بافت نرمال افزایش یافته است. این مسأله ارتباط معناداری بین سن، grade و stage با بیان miR-196a-2 را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده با بررسی کمی بیان miR-196a-2 به عنوان فاکتور احتمالی مؤثر در سرطان تخمدان، می‌توان از آن به عنوان یک بیومارکر در تشخیص زودهنگام و غربالگری سرطان تخمدان با استفاده از نمونه‌های خونی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سرطان اپیتلیال تخمدان، miR-196a-2، Real time-PCR.

مقدمه

درصد از کل سرطان‌های مربوط به جامعه زنان را تشکیل می‌دهد، ولی هم‌چنان یکی از علل شایع مرگ و میر ناشی از بدخیمی در این افراد است. در آمریکا، کمابیش ۲۲۲۸۰ مورد جدید و ۱۵۵۰ مرگ ناشی از سرطان تخمدان در سال ۲۰۱۲ گزارش شده است (۲۴). یکی از علل کشنده بودن سرطان تخمدان این است که در بیش از ۷۰ درصد موارد، بیماری در مرحله پیشرفته تشخیص داده می‌شود. گزارش‌ها گویای ارتباط نزدیک بین زمان تشخیص بیماری و میزان طول عمر افراد بیمار است. بنابراین تشخیص زودهنگام سرطان بهترین روش برای کاهش مرگ و میر و هم‌چنین کنترل بیماری در دراز مدت است (۱۹). میکرو RNAها که به نام miRNA نیز معروف هستند در سال‌های اخیر به عنوان نشانگرهای زیستی جدید با مفاهیم تشخیصی در نظر گرفته می‌شوند. این مولکول‌ها در حال حاضر به عنوان یکی از جالب‌ترین تنظیم کننده‌های کوچک در بیولوژی مولکولی شناخته می‌شوند. میکرو RNAها مولکول کوچک تک رشته‌ای از RNA به طول ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند که کدکننده پروتئین نیستند و به خوبی از نظر تکاملی حفظ شده‌اند. این RNA تنظیم طیف

در حال حاضر، سرطان تخمدان از میان کلیه سرطان‌های وابسته به زنان یکی از بیش‌ترین مطالعه‌های تحقیقاتی و بالینی را متوجه خود ساخته است. این سرطان در مراحل اولیه خود علائم قابل توجه‌ای را نشان نمی‌دهد و تشخیص آن در مراحل پیشرفته‌تر تومور امکان‌پذیر است؛ امری که سبب افزایش میزان مرگ و میر این طیف بیماران می‌گردد (۱۲). آمارها گویای این حقیقت است که سرطان تخمدان در زنان بالای ۵۵ سال بیش‌تر مشاهده می‌شود. در زنانی با سابقه فامیلی سرطان‌های سینه و یا رحم احتمال ابتلا به این بیماری ۳ برابر افراد سالم است (۴). سرطان تخمدان با این‌که تنها ۴

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: a.hesampour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

در سه دوره متوالی معاینه ۱ ساله منفی اعلام گردیده است جدا گردید. نمونه‌ها همراه با رضایت‌نامه افراد و نیز رعایت قوانین اخلاق در مطالعه‌های تجربی-پزشکی مطابق پروتکل Helsinki و تبعیت از دستورالعمل‌های مربوطه به شماره کمیته اخلاق ۲۰۸/۴۱ طی سال ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با رعایت اصول انتقال و نگهداری به تانک ازت و فریزر ۸۰- درجه منتقل شدند. تمامی دستورالعمل‌های اخلاقی برای نگهداری و استفاده از نمونه‌های انسانی رعایت گردید.

پس از مراجعه بیمار به اتاق عمل و پیش از آغاز جراحی عمقی، از توده مشکوک با یکی از روش‌های برش، آسپیراسیون یا استفاده از سرنگ بیوپسی نمونه تهیه شد. در ادامه پس از قالب‌گیری و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین درجه تمایز سلول‌های سرطانی یا grade (درجه) بیماری و نوع تومور توسط پاتولوژیست تعیین شد و مرحله پیشرفت بیماری با توجه به سائز توده و گسترش آن به سایر اندام‌ها یا غدد لنفاوی توسط انکولوژیست یا پزشک مربوطه مشخص گردید. پس از بررسی شرایط بیماران و تأیید بیماری، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد و در این میان، نمونه‌های بافتی در شرایط استاندارد فریز در ازت مایع نگهداری شد. پیش از شروع آزمایش، توده سلولی به‌وسیله کوبیدن بافت فریز شده بر روی هاون چینی استریل از یکدیگر جدا گردیدند. در نهایت سلول‌ها در ویال ۲ میلی‌لیتری قرار گرفت و تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- درجه سلوسیوس نگهداری شد.

استخراج Total RNA از بافت

به‌منظور استخراج Total RNA از بافت فریز شده از کیت استخراج RNATM-Plus (شرکت Merck آلمان) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به‌طور خلاصه، یک میلی‌لیتر از این محلول به بافت‌های فریز شده اضافه شد. پس از افزودن کلروفورم، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلوسیوس انکوبه شد. نمونه‌ها سپس در دمای ۴ درجه سلوسیوس با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و فاز رویی که حاوی RNA است به ویال جدیدی منتقل شد. در ادامه به نسبت حجم مشابه فاز رویی با محلول ایزوپروپانول آغشته شد و در دمای ۲۰- درجه سلوسیوس به‌مدت یک شب نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ، رسوب RNA با اتانول ۷۵٪ سرد شستشو داده شد. در نهایت پس از سانتریفیوژ و خشک نمودن رسوب RNA، ۲۰ میکرولیتر DEPC-water درون ویال‌ها اضافه گردید. غلظت و نسبت جذب طول موج (۲۶۰/۲۸۰) نمونه‌های موردنظر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت

وسیع از فعالیت‌های بیولوژیک و پاتولوژیک از جمله آپوپتوز، تکثیر، تمایز، رگزائی و پاسخ ایمنی را بر عهده دارند. تعداد فزاینده‌ای از مطالعه‌ها، نقش حیاتی miRNA را سرطان تخمدان نشان داده است (۱۰). اولین تحقیق در مورد نقش miRNA در سرطان تخمدان نشان داد که تعداد کپی DNA حدود ۴۰٪ از آن‌ها تغییر یافته است (۲۷).

پس از آن دو تحقیق دیگر نشان داد که افزایش بیان پروتئین‌های Dicer، eIF6 و Dorsha (این سه در سنتز miRNA دخیل هستند) با پیشرفت سرطان تخمدان در ارتباط است (۶).

علاوه بر این، مطالعه‌های دیگر نشان می‌دهد که عدم تنظیم miRNA در سرطان‌های تخمدان با نوع سرطان تخمدان، درجه آن و زنده ماندن در ارتباط است (۲۷). عدم تشخیص صحیح مراحل اولیه بیماری و هم‌چنین نبود آزمایش غربالگری مناسب به‌طور عمومی منجر به تشخیص دیرنگام این بیماری می‌شود. (۲). هم‌چنین ارتباط مستقیم بیان این ریزمولکول‌های زیستی با تومورزایی و پیشروی یا مهار سرطان در برخی موارد به اثبات رسیده است (۱۱). خانواده miR-196 در سلول‌های انسانی سه ژن دارد که شامل miR-196a-1، miR-196a-2 و miR-196b هستند. همگی در دسته‌های ژنی HOX در ژنوم قرار گرفته‌اند و دو نوع miRNA بالغ a196 و b196 را تولید می‌کنند (۳).

بر این اساس، مطالعه‌های متعددی بر نقش کلیدی بیان miR-196a-2 در فرآیند تومورزایی برخی از سرطان‌ها تأکید دارند. از آنجا که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با نقش کلیدی این ریزمولکول اپی‌ژنتیکی در فرآیند تومورزایی سرطان تخمدان انجام نشده است لذا در این پژوهش نقش miR-196a-2 در مراحل مختلف سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این تحقیق بررسی افزایش یا کاهش میزان بیان miR-196a-2 در نمونه‌های بافت سرطان تخمدان و ارتباط آن با مراحل پیشرفت بیماری است، البته گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد این نوع میکرو RNA به‌عنوان سرکوب کننده تومور در سرطان‌های مختلف عمل می‌کند (۱۴).

روش کار

جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌ها: این پژوهش شامل جمع‌آوری جامعه ۱۰۰ نفری با طیف سنی ۷۸-۳۲ سال است. ۵۰ نمونه از بافت تخمدان مبتلا به سرطان تخمدان و ۵۰ نمونه دیگر نیز از بافت تخمدان افراد شاهد که جواب پاتولوژی آن‌ها

سالم و بیمار و به منظور به دست آوردن ارتباط بین دو پارامتر کمی (سن و ΔCt ژن miR-196a-2) از آزمون پیرسون استفاده گردید.

یافته‌ها

بهینه سازی فاکتورهای اساسی تکنیک Real-time PCR برای ژن GAPDH و miR-196a-2

Total RNA کلیه نمونه‌ها استخراج و پس از تأیید کیفیت به دست آمده، سنتز cDNA بر روی Total RNA نمونه‌ها صورت گرفت. سپس واکنش‌ها به صورت موازی در دستگاه ABI Real-time PCR (ABI-step1) ساخت شرکت SYBR Green ۱۰ μM آمریکا گذاشته شد. در هر واکنش از TM (2X) Premix و آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشتی در برابر cDNA الگو به غلظت ۲ μg استفاده شد. واکنش PCR شامل ۳۵ چرخه به ترتیب هر چرخه، ۹۴ درجه سلیسیوس ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلیسیوس، مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلیسیوس انجام شد. به منظور تأیید قطعه تکثیر شده و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی، آغازگر دایمر و آلودگی، منحنی تفکیک مورد بررسی قرار گرفت. پس از تکثیر، Ct نمونه‌ها شناسایی شده و بر اساس روش Relative Quantification (RQ) و فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان ریزمولکول miR-196a-2 در مقایسه با ژن داخلی به دست آمد.

نتایج بررسی نسبت جذب نوری RNAهای استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، جهت استفاده در مرحله سنتز cDNA، حکایت از نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۷-۲ داشت. به منظور بررسی اختصاصیت آغازگرها، کیفیت رنگ فلورسانت (SYBR Green)، اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیر اختصاصی در محصول PCR نمودار منحنی ذوب برای ژن GAPDH و miR-196a-2 به صورت جداگانه توسط دستگاه ترموسایکلر Real-time PCR به همراه ۳ بار تکرار پذیری مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت بالای این امر تأییدی بر اتصال صحیح آغازگرها به ژن GAPDH و ریزمولکول miR-196a-2 بود (شکل ۱).

در این پژوهش، جمعیت مورد مطالعه شامل دو گروه بیماران و افراد سالم بودند که با برآورد حجم نمونه آماری در هر گروه ۵۰ نفر قرار گرفتند (جدول ۲).

میانگین سنی بیماران در این مطالعه $10/51 \pm 55/2$ و افراد سالم $4/8 \pm 49/9$ سال بود که از نظر توزیع داده، تست

Eppendorf (انگلیس) جهت آنالیز کمی RNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنتز cDNA از روی RNA استخراج شده

ابتدا در یک ویال ۵۰۰ میکرولیتری، به ترتیب ۱ میکرولیتر آب دوبار تقطیر عاری از RNase، dNTP، oligodt (به عنوان آغازگر عمومی و جهت اتصال به دم پلی A) و در نهایت ۷ میکرولیتر از محصول RNA افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلیسیوس جهت اتصال آغازگرها نگهداری شدند. در مرحله بعد ۷ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر عاری از RNase، ۲ میکرولیتر از بافر مخصوص آنزیم MMULV و یک میکرولیتر از آنزیم MMULV به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلیسیوس انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلیسیوس نگهداری شدند (۱۷).

طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن GAPDH و miR-196a-2

توالی ژن GAPDH که به عنوان شاهد داخلی مورد استفاده قرار گرفت و همچنین ریزمولکول miR-196a-2 از بانک ژنی سایت NCBI به دست آمد و توسط برنامه Primer Express آغازگرهای اختصاصی آنها طراحی گردید. به منظور بررسی اختصاصی بودن و دقت آغازگرهای طراحی شده، توالی این آغازگرها در NCBI و Gene Runner بلاست گردید (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصه‌های آغازگر

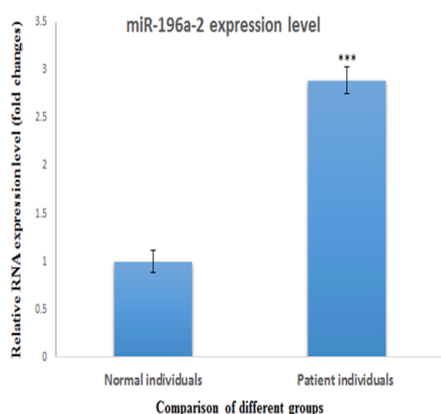
آغازگر	توالی نوکلئوتیدی
mir196-a-F	5'-CGTCAGAAGGAATGATGCACAG-3'
mir196-a-R	5'-ACCTGCGTAGGTAGTTTCATGTG-3'
GAPDH-F	5'-GAA GGTGAA GGT CGG AGTCA-3'
GAPDH-R	5'-TTGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'

در ادامه cDNA نمونه‌های ۵۰ فرد بیمار و ۵۰ فرد برای بررسی کمی مورد استفاده قرار گرفت. پس از تعیین ΔCt و رسم نمودار ذوب هر نمونه بر اساس تغییرهای فلورسانس در دماهای مختلف و محاسبه $\Delta\Delta Ct$ و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با توجه به میانگین Ct افراد سالم و بیمار مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس از آزمون‌های آنالیز آماری کولموگروف-اسمیرنوف (پارامتر سن)، آزمون تی برای بررسی میزان بیان ژن miR-196a-2 در افراد

مورد (۳۲ درصد) مرحله ۱، ۳۰ درصد مرحله ۲ (۱۵ نفر)، ۴ نفر مرحله ۳ و ۲ نفر مرحله ۴ هستند.

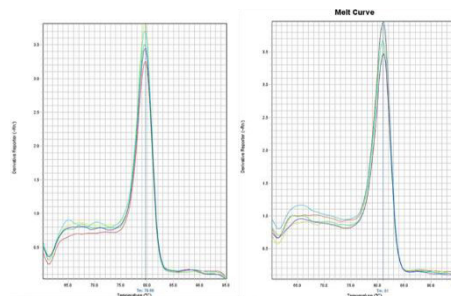
در بررسی ارتباط بین مرحله و درجه شدت بیماری در بیماران مشخص شد که بین این دو پارامتر ارتباط معنی داری وجود دارد و پراکندگی فراوانی ها در مرحله و درجه ها یکسان است. به این معنی که وقتی بیشترین فراوانی بیماران در مرحله ۱ مشاهده می شود، به همین ترتیب بیشترین فراوانی نیز در بیماران با درجه ۱ وجود دارد و با افزایش مرحله و درجه شدت بیماری نیز افزایش می یابد ($p=0.001$).

بررسی میزان بیان miR-196a-2 در افراد بیمار و سالم:
میانگین Ct مرتبط با بیان ریزمولکول mi-196a-2 در افراد سالم برابر با 29.7 ± 1.04 و در افراد بیمار 27.8 ± 0.9 گزارش شد. به موازات بررسی بیان این ریزمولکول، میزان بیان ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد میانگین Ct در افراد کنترل سالم و بیمار مشابه بوده و به ترتیب عبارت بود از 18.51 ± 0.7 و 18.24 ± 0.7 . جهت بررسی میزان بیان نسبی miR-196-2 در مقایسه با ژن داخلی GAPDH از تفاضل Ct ریزمولکول هدف و ژن کنترل داخلی استفاده می شود. بدین منظور ΔCt هر یک از افراد مورد مطالعه بررسی شد و میانگین دو گروه با استفاده از آزمون T-TEST مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که ΔCt افراد گروه کنترل سالم 11.15 ± 0.8 و افراد بیمار 9.63 ± 1.08 بود. مقایسه بین ΔCt افراد نشان داد که میزان بیان ریزمولکول miR-196a-2 به طور معنی داری در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل سالم است ($p=0.001$) (شکل ۳).



شکل ۳: بررسی میزان بیان miR-196a-2 در افراد سالم و بیمار

در ادامه با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میانگین ΔCt افراد سالم و بیمار از نظر میزان بیان مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج

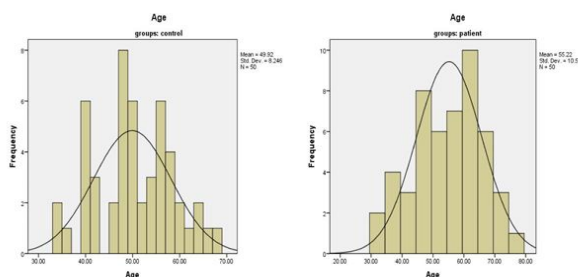


شکل ۱- منحنی ذوب قطعات تکثیر شده. شکل سمت راست منحنی ذوب ژن GAPDH و شکل سمت چپ منحنی ذوب ریزمولکول miR-196a-2 را نمایش می دهد.

جدول ۲- اطلاعات مربوط به سن افراد مورد مطالعه

گروه های اصلی	سن (سال)		
	محدوده ی سنی	میانگین	انحراف معیار
بیماران (تعداد=۵۰)	۳۲-۷۸	۵۵/۲	۱۰/۵۱
سالم (تعداد=۵۰)	۶۷-۳۴	۴۹/۹	۸/۴

کولموگروف اسمیرنوف نشان می دهد که پارامتر سن از توزیع نرمال برخوردار بوده و گروه بیمار و افراد سالم از این نظر یکسان انتخاب شده اند ($p=0.2$) (شکل ۲).



شکل ۲: نمودار توزیع سن بیماران و افراد نرمال توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف

بررسی وضعیت مرحله و درجه بیماری: در این مطالعه از ۵۰ بیمار ۵ مورد (۱۰ درصد) سلول های سرطانی در درجه ۳، ۱۷ مورد (۳۴ درصد) در درجه ۲ و ۲۸ نفر (۵۶ درصد) در درجه ۱ هستند. هم چنین Stage یا مرحله پیش روی بیماری در ۱۳ مورد (۲۶ درصد) به صورت کارسینوم درجا یا مرحله صفر، ۱۶

گوپای این بود که با افزایش درجه بیماری، میزان بیان miR-196a-2 افزایش نشان داد.

بحث

تاکنون اصلی ترین علت سرطان تخمدان یافت نشده است ولی بسیاری از محققین هورمون های تولیدمثلی را از جمله عوامل ایجاد این بیماری می دانند. Fathalla در سال ۱۹۷۱ با ارائه تئوری تخمک گذاری پی در پی به ارتباط بین تعداد تخمک گذاری و شکل گیری تومورهای بدخیم بر سطح تخمدان اشاره دارد (۷). در درمان های کلینیکی رایج، برای تشخیص سرطان بیش تر از روش بررسی تومور مارکر CA125 و سونوگرافی لگن استفاده می شود. اگرچه در ۲۰ درصد از موارد سرطان تخمدان، تومور مارکر CA125 بیان نمی شود و این بیومارکر هم چنین در بسیاری از بیماری های خوش خیم زنان بالا می رود. این امر به نوبه خود گوپای این امر است که علی رغم مزایای بالقوه، CA125 تومور مارکری غیر اختصاصی است و بهره گیری از آن ممکن است با محدودیت های زیادی همراه باشد. به علاوه، حساسیت و اختصاصیت CA125 جهت غربالگری جمعیتی مرتبط با سرطان تخمدان در مرحله اولیه به اندازه کافی بالا نیست. بنابراین تاکنون تلاش های بسیاری برای شناسایی و یا بهبود عملکرد تشخیصی بیومارکرها در راستای تکمیل اثر CA125، افزایش حساسیت و اختصاصیت در مرحله اولیه بیماری، صورت گرفته است (۱۸). به تازگی معلوم شده است که microRNAها پایدارتر از mRNAها هستند. یک microRNA می تواند صدها هدف ژنی داشته باشد، اگرچه به طور معمول اهداف یک microRNA مربوط به mRNAهایی با کارکرد مشابه است. گزارش ها نشان می دهد که در اکثر مایعات بدن microRNA یافت می شود. این نکته دانشمندان را بر آن داشت که از توان بالقوه microRNAها در روند تشخیص و یا درمان بیماری ها استفاده کنند (۱۶). mRNAهای ساخته شده از هر ژن از جمله آن هایی که از پروتئوکوژن ها و یا آن هایی که از ژن های سرکوب کننده تومور ساخته می شوند می توانند به طور بالقوه هدف miRNAها باشند بنابراین در بسیاری از مسیرهای مهم و سرطانی شدن و پیشرفت آن دخیل هستند (۲۵). به دلیل ساختمان خاص، این کوچک مولکول ها این امکان را فراهم می نمایند که از آن ها به عنوان بیومارکرها بالقوه سرطان استفاده گردد.

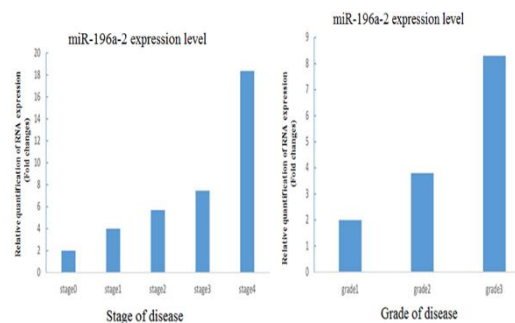
نشان داد میزان بیان به طور میانگین ۲/۸۶ برابر در افراد مبتلا به سرطان تخمدان افزایش یافته است.

بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان miR-196a-2 در

افراد بیمار و سالم: به منظور به دست آوردن ارتباط بین دو پارامتر کمی سن و میزان بیان miR-196a-2 از آزمون پیرسون استفاده شد و میانگین و انحراف معیار داده ها با هم مقایسه گردید. نتایج این بررسی نشان داد که بین پارامتر سن و ΔCt ریزمولکول miR-196a-2 ارتباط معنی داری وجود دارد ($p=0.01$).

بررسی ارتباط بین مرحله و درجه بیماری با میزان بیان

miR-196a-2: بدین منظور ابتدا داده ها به دو گروه کنترل و بیمار تفکیک (split) شد و در ادامه از آزمون پیرسون جهت بررسی هم بستگی بین مرحله بیماری و ΔCt بیان ریزمولکول بهره گرفته شد. نتایج نشان داد بین مرحله بیماری و میزان ΔCt ارتباط معنی داری وجود دارد ($p=0.001$). نتایج بررسی ارتباط بین مرحله و درجه بیماری در شکل ۴ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که درجه تمایز سلول های سرطانی یا grade بیماری با میزان بیان miR-196a-2 نیز ارتباط معنی داری دارد، $p=0.003$ (شکل ۴).



شکل ۴: بررسی ارتباط بین مرحله و درجه بیماری با میزان بیان miR-196a

به منظور بررسی بهتر این نوع ارتباط، میزان بیان ریزمولکول miR-196a-2 با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با توجه به میانگین Ct افراد سالم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بیانگر این بود که میزان بیان ریزمولکول miR-196a-2 با افزایش مرحله بیماری به طور چشم گیری افزایش یافته به طوری که در مرحله ۴ این افزایش به ۱۸/۳ برابر رسیده است. این مسأله در مورد میزان بیان miR-196a-2 در درجه های مختلف نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در این راستا نیز

miR-106b, miR-126, miR-150, miR-1720a miR-92 به شکل معنی داری کاهش می یابد (۲۳).

Feng و همکاران پیشنهاد دادند که miR-25 به طور قابل توجهی در پیشبرد تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول های سرطانی تخمدان با هدف گیری مستقیم ژن سرکوب کننده تومور نقش دارد (۵).

در مقابل Ge و همکاران پیشنهاد می کند که miR-302b به عنوان یک سرکوب کننده تومور، با هدف قرار دادن RUNX1 و تنظیم فعالیت مسیر سیگنال STAT3 در سرطان تخمدان عمل می کند (۸). این یافته ها اثرهای پیچید miRNA ها را در توسعه و پیشرفت سرطان تخمدان تأکید می کند. در مطالعه حاضر نشان داده شد که miR-196a به طور قابل توجهی در سلول های سرطان تخمدان در مقایسه با سلول های تخمدان طبیعی افزایش بیان شده است. این داده ها نشان می دهد که miR-196a نقش مهمی در پاتوژنز در سرطان تخمدان دارد.

miR-196a در مناطق بینابینی در خوشه های ژن HOX قرار دارد که تنظیم کننده های اصلی جنین زایی و انکوژن هستند (۱). طبق گزارش های موجود این میکرو RNA که در توسعه و پیشرفت چندین تومور بدخیم، از جمله سرطان پستان، لوسمی، سرطان کولورکتال و سرطان دهانه رحم دخیل هستند (۲۲).

در این مطالعه، افزایش میزان بیان miR-196a در نمونه های افراد مبتلا به سرطان تخمدان در مقایسه با افراد سالم مشاهده گردید. این نتیجه در چندین تحقیق مشابه بر روی سرطان های دیگر نیز به دست آمده است. به عنوان مثال افزایش بیان این مولکول در سرطان های ریه، کلورکتال و گلیوبلاستوما گزارش شده است (۲۲، ۲۶).

از آنجایی که افزایش بیان miR-196a در چندین تومور مشخص شده است لذا ممکن است به عنوان کاندید برای تشخیص سرطان مفید باشد.

با توجه به یافته های مشابه، به نظر می رسد افزایش بیان miR-196a با کارسیوژنز سرطان تخمدان در ارتباط باشد. نتایج تحقیق ما نشان می دهد که در سرطان تخمدان نیز مانند بسیاری دیگر از سرطان ها، miR-196 به عنوان انکوژن عمل می کند.

به نظر می رسد miR-196a در انکوژنز وابسته به نوع سرطان است؛ در برخی از سرطان ها با افزایش بیان همراه است و در مواردی دیگر با کاهش بیان همراه است.

یکی دیگر از نکات مهم در بیوشیمی تأثیر miRNA ها در سرطان های مختلف، پیدا کردن ژن های هدف آن ها است. پیدا

شواهد بسیاری نشان می دهند miRNA ها به طور جدی در تنظیم تعداد زیادی از ژن های دخیل در پیشرفت سرطان نقش دارند (۱۵).

ارتباط تنگاتنگ microRNA ها با ژن های هدف، اهمیت آن ها را در رشد، مرگ برنامه ریزی شده و تکثیر سلولی دوچندان کرده است. به نحوی که با توجه به عملکرد مستقیم microRNA ها، می توان با بهره گیری از برخی از این ریزمولکول ها به طبقه بندی سرطان ها در گروه هایی با ویژگی های متفاوت هم چون نوع سلول سرطانزا و مسبب ایجاد این بیماری پرداخت. تفاوت در بیان microRNA ها در سرطان های مختلف می تواند به علت تفاوت های موجود بین منشاء سلول های سرطانی و بافت استرومایی اطراف آن باشد (۲۱).

به تازگی مطالعه های متعددی نشان داده اند که miRNAs نقش های مختلفی را در سرطان تخمدان بر عهده دارند که به جفت شدن بین miRNA-mRNA بستگی دارد. Li و همکاران متوجه شدند که miR-17-5p پیشرفت چرخه سلولی و آپوپتوز در سرطان تخمدان انسان را با افزایش بیان YES1 سبب می گردند (۱۳).

بیان تعداد زیادی از miRNA ها در مراحل پیشرفته سرطان تخمدان به طور قابل توجهی کاهش یافته است که نشان می دهد آن ها در تحریک بدخیمی و پیشرفت تومور دخیل هستند. هم از دست دادن تعداد کپی های ژنومی و هم تغییرهای اپی ژنتیکی ممکن است برای این کاهش بیان در نظر گرفته شوند و اختلال های رونویسی ژنوم را سبب گردند. پژوهشگران مقادیر miR در ۱۸ سلول اپی تلیالی تخمدان Epithelial Ovarian Cancer (EOC) و ۴ کشت اولیه اپی - تلیوم سطحی تخمدان (IOSE) Immortalized ovarian surface epithelial را مقایسه کردند. آن ها نشان داد که سطوح بیان ۳۵ نوع miR به طور قابل توجهی بین سلول های EOC و سلول های IOSE متفاوت است. از این تعداد، ۳۱ مورد (۸۸/۶٪) در سلول های در مقایسه با کاهش یافته است؛ از جمله سرکوبگرهای تومور miR let-7d و miR-127 (۲۰).

Shapira و همکارانش در سال ۲۰۱۴ آزمایشی روی اپیتلیال سرور انجام دادند که حاوی ۴۲ نمونه پلاسمای گرفته شده از زنان مبتلا به سرطان اپیتلیال سرور و ۳۶ نمونه پلاسمای دریافت شده از زنان مبتلا به نئوپلاسم خوش خیم و ۲۳ نمونه پلاسمای تهیه شده از زنانی بدون هیچ توده لگنی بود. نتایج آن ها نشان داد که در زنان سالم و افراد با تومورهای خوش خیم هیچ یک از microRNA ها افزایش معنی داری را در افراد مبتلا به سرطان اپیتلیال سرور نشان نمی دهد. در عوض

سرطانی شده برای بررسی مسیرها و هدف‌های مورد نظر می‌تواند مناسب باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تقدیر و قدردانی به عمل می‌آید. این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد اینجانب (با کد پایانی ۲۲۵۳۰۵۵۴۹۴۱۰۰۷) که به تصویب شورای پژوهشی دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی رسیده است) است.

کردن این mRNAهای هدف گام بلندی در درمان سرطان در آینده است. به عنوان مثال، مشخص شده است که ژن‌های هدف miR-196a در چندین سرطان مختلف، پروتئین‌های وابسته به مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT است. Foxo یکی از اهداف اصلی سیگنالینگ PI3K/AKT است. فعال‌سازی مسیر PI3K باعث تسریع فسفوریلاسیون و در نتیجه حذف Foxos می‌شود که منجر به انسداد عملکرد توالی‌های رونویسی رشد آن‌ها می‌گردد (۹).

P27 می‌تواند به طور مستقیم یا غیر مستقیم توسط AKT فعال تنظیم شود. AKT به طور مستقیم فسفریلاسیون p27 را قادر می‌سازد و باعث حفظ سیتوپلاسمی و تخریب آن از طریق مسیر ubiquitin-proteasome و رونویسی آن از طریق فسفریلاسیون FOXO و حذف از هسته می‌شود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیان miRNA-196a-2 در کلیه نمونه‌های بافتی کلیه بیماران مبتلا به سرطان تخمدان به طور معناداری افزایش یافته است به طوری که بین افزایش بیان با اندازه تومور و مرحله بیماری ارتباط مستقیم دیده شد. از این رو به نظر می‌رسد که استفاده از تکنیک‌های دقیق مولکولی جهت بررسی سطح بیان miRNA-196a-2 به عنوان بیومارکری جهت پیش‌آگهی از نحوه رفتار تومور ایجاد شده در افراد مبتلا به سرطان تخمدان، در کنار سایر آزمایش‌ها مفید باشد.

هم‌چنین این یک مطالعه قطعی نیست و راه را برای مطالعه‌های بیشتر باز می‌کند. هم‌چنین ممکن است miR-196a در فرآیندهای دیگر که منجر به پیشرفت تومور شده و هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است، مشارکت داشته باشد. تحقیقات پیش‌تری برای دسترسی به عملکرد کلی miR-196a در سرطان تخمدان ضروری است

یکی از مهم‌ترین بررسی‌هایی که باید انجام شود، بررسی نقش مسیر سیگنالینگ PI3K است. با توجه به اهمیت این مسیر در بسیاری از عملکردهای miRNAها، احتمال نقش پررنگ آن در سرطان تخمدان نیز وجود دارد. استفاده از موش‌های

منابع

1. Alonso CR. Hox proteins: sculpting body parts by activating localized cell death. *Current Biology* . 2002.12:R776-R8
2. Badgwell D, Bast Jr RC. Early detection of ovarian cancer. *Disease markers*. 2007. 23:397-410
3. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011. 15:14-23
4. Clarke-Pearson DL. Screening for ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009. 361:170-7
5. Feng S, Pan W, Jin Y, Zheng J. MiR-25 promotes ovarian cancer proliferation and motility by targeting LATS2. *Tumor Biology* . 2014.35:12339-44
6. Flavin RJ, Smyth PC, Finn SP, Laios A, O'toole SA, et al. Altered eIF6 and Dicer expression is associated with clinicopathological features in ovarian serous carcinoma patients. *Modern Pathology*. 2008. 21:676-84
7. Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Molecular and cellular endocrinology* . 2006.247:4-21
8. Ge T, Yin M, Yang M, Liu T, Lou G. MicroRNA-302b suppresses human epithelial ovarian cancer cell growth by targeting RUNX1. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2014. 34:2209-20
9. Huang F, Tang J, Zhuang X, Zhuang Y, Cheng W, et al. MiR-196a promotes pancreatic cancer progression by targeting nuclear factor kappa-B-inhibitor alpha. *PloS one* . 2014.9:e87897
10. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer research* . 2007.67:8699-707
11. IZADI A, MOSLEMI E, POORHOSSEINI SM, YASSAEE VR, KHEIRI HR, ELIKAI HR. UBD identify in paraffin tissues in patients with colorectal cancer . 2014
12. Lalwani N, Prasad SR, Vikram R, Shanbhogue AK, Huettner PC, Fasih N. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics*. 2011.31:625-46
13. Li L, He L, Zhao JL, Xiao J, Liu M, et al. MiR-17-5p Up-Regulates YES1 to Modulate the Cell Cycle Progression and Apoptosis in Ovarian Cancer Cell Lines. *Journal of cellular biochemistry*. 2015. 116:1050-9
14. Liu Y, Zheng W, Song Y, Ma W, Yin H. Low expression of miR-196b enhances the expression of BCR-ABL1 and HOXA9 oncogenes in chronic myeloid leukemogenesis. *PloS one* . 2013.8:e68442
15. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature* . 2012.482:347-55
16. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006. 130:2113-29
17. Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNAs and cancer—new paradigms in molecular oncology. *Current opinion in cell biology*. 2009. 21:470-9
18. Park Y, Lee J-H, Hong DJ, Lee EY, Kim H-S. Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases. *Clinical biochemistry* . 2011. 44:884-8
19. Rauh-Hain JA, Krivak TC, del Carmen MG, Olawaiye AB. Ovarian cancer screening and early detection in the general population. *Reviews in obstetrics and gynecology*. 2011. 4:15
20. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell*. 2006.9:435-43
21. Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Schrader M, et al. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Proc. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2010*, 28:4-13: Elsevier
22. Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, et al. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World journal of gastroenterology: WJG* . 2009.15:2089
23. Shapira I, Oswald M, Lovecchio J, Khalili H, Menzin A, et al. Circulating biomarkers for detection of ovarian cancer and predicting cancer outcomes. *British journal of cancer*. 2014. 110:976
24. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. 2011. Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians, 2011* 61:212-36
25. Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocrine-related cancer*. 2007. 14:791-8
26. Wang R, Wang Z, Yang J, Pan X, De W, Chen L. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Oncogene*. 2011. 30:2644-58
27. Zhang L, Volinia S, Bonome T, Calin GA, Greshock J, et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. 105:7004-9