مقاله پژوهشی

Investigating the expression of miR-509-3-5p and miR-596 in tumor tissue and tumor peripheral tissue in breast cancer patients

Fatemeh Zeinali Sehrig[1], Mohammad Zaefizadeh*[2], Changiz Ahmadizadeh[3], Mohammad Reza Alivand[4], Saeid Ghorbian[1]

1. Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2. Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
3. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
4. Department of Medical Genetics, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract

Aim and Background: Breast cancer is the most common type of cancer among women, which occurs in the epithelial tissue of the mammary gland. Various environmental, genetic and epigenetic factors play a role in the occurrence of breast cancer. According to the previous studies, one of the most important epigenetic changes involved in the occurrence of breast cancer is the dysregulationof the expression level of microRNAs. Therefore, the aim of this study was to investigate the expression level of miR-509-3-5p and miR-596 in breast cancer tumor tissue.

Material and methods: In the bioinformatics analysis, the datasets related to miRNAs (GSE40525 and GSE45666) were prepared from the GEO database. Data analysis was performed using the Affy package in R software. Sampling was done from 100 women with breast cancer and 100 control. Tissue RNA was extracted using Trizol solution. Then, using the cDNA synthesis kit, DNA was synthesized from the extracted RNAs, and the expression level of miR-509-3-5p and miR-596 was investigated using Realtime PCR method.

Results: According to the bioinformatics results, the expression level of miR-509-3-5p and miR-596 in breast cancer tissue reduced compared to healthy tissue. The expression level of miR-509-3-5p and miR-596 in tumor tissue was significantly lower than normal tissue ($p<0.05$).So these results confirmed the results of bioinformatics studies.

Conclusion: According to the results of the present study, which showed a decrease in the expression of miR-509-3-5p and miR-596 in breast cancer, it can be said that these miRNAs can be used as important diagnostic and therapeutic biomarkers in breast cancer.

Keywords: microarray dataset, breast cancer, miR-509-3-5p, miR-596, Iau Science.

Corresponding author:
Department Of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
Email: mzaefi@gmail.com

مقایسه بیان miR-509-3-5pو miR-596در بافت توموری و بافت حاشیه تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان

فاطمه زینالی سهریق[۱]، محمد ضعیفی زاده*[۲]، چنگیز احمدی زاده[۳]، محمد رضا علیوند[۴]، سعید قربیان[۱]

۱. گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۴. گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان رایج ترین نوع سرطان در زنانمی‌باشد که در بافت اپیتلیال غده پستان ایجاد می‌شود. عوامل مختلف محیطی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی دربروز سرطان پستان نقش دارند. طبق مطالعات انجام شده یکی از مهمترین تغییرات اپی‌ژنتیکی درگیر در بروز سرطان پستان، تغییر در میزان بیان microRNAها می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی بیوانفوماتیکی و آزمایشگاهی میزان بیان miR-509-3-5pو miR-596در بافت توموری سرطان پستان می‌باشد.
مواد و روش‌ها: در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی مجموعه داده‌های مربوط به miRNAها (GSE40525 و GSE45666) از پایگاه داده GEOتهیه شده‌اند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده ازپکیج Affy در نرم‌افزار Rانجام شد.در مطالعات آزمایشگاهی از ۱۰۰نمونه بافت تومور مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ نمونه بافت حاشیه تومور با اخذ رضایت نامه کتبی نمونه برداری انجام شد. استخراج RNA بافتی با استفاده از محلول ترایزول انجام شد. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA از روی RNAهای استخراج شده DNA سنتز شد، و با استفاده از روش Real-time PCR میزان بیان miR-509-3-5p و miR-596 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با توجه به نتایج بیوانفورماتیکی میزان بیان miR-509-3-5p و miR-596 در بافت سرطان پستان نسبت به بافت سالم کاهش پیدا می‌کند. نتایج مربوط به بررسی بیان miR-509-3-5p و miR-596 در نمونه‌های توموری و سالم نیز نشان داد که سطح بیان miR-509-3-5p و miR-596 در بافت توموری نسبت به بافت سالم کاهش معنی داری را نشان می‌دهد ($p<۰,۰۵$)که این نتایج تایید کننده نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی بود.

نتیجه‌گیری:با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر که نشان دهنده‌ی کاهش بیان miR-509-3-5p و miR-596 در سرطان پستان بود. می‌توان گفت که از این miRNAها می‌توان به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی و درمانی مهمی در تشخیص، پیش آگهی و درمان سرطان پستان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مجموعه داده میکرواری، سرطان پستان، miR-509-3-5p، miR-596، .Iau Science

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان (۱،۲) و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان است (۱،۳)، که ۱۱/۹ درصد از کل موارد سرطان را در جهان شامل می‌شود (۴). سالانه ۱/۷ میلیون زن مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده می‌شوند (۴)، که مرگ‌های ناشی از آن حدود ۱۴ درصد از کل مرگ و میرهای مربوط به سرطان را در جهان شامل می‌شود (۵). با توجه به میزان شیوع و کشندگی بالای سرطان پستان مطالعات گسترده‌ای جهت بررسی مکانیسم‌های دخیل در تومورزایی سرطان پستان و همچنین توسعه روش‌های جدید تشخیص، پیش‌آگهی و شناسایی اهداف درمانی جدید برای سرطان پستان انجام

نویسنده مسئول:
واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران
پست الکترونیکی: mzaefi@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲

شده است (۶). این بدخیمی یک بیماری نئوپلاستیک بسیار پیچیده است که شامل فرآیندهای مختلف، رشد تومور (۷)، رگزایی (۸) و متاستاز (۹) است. بروز این تغییرات بدخیم به علت ایجاد اختلال در مسیرهای پیام رسانی در سلول-های پستان است (۱۰). با توجه به اینکه تشخیص زود هنگام سرطان پستان در کاهش مرگ و میر ناشی از این بیماری موثر بوده است، ولی نیازمند یافتن روش‌های جدید تشخیصی و درمانی برای تشخیص سریعتر و درمان بهتر جهت افزایش بقا بیماران مبتلا به سرطان پستان است (۱۱). miRNAها از نظر هدف قرار دادن ژن های مختلف به دو گروه بازدارنده‌های تومور یا انکوژن‌ها تقسیم می‌شوند. در صورتی‌که میکروارناها بیان انکوژن ها را تنظیم کنند، تاثیر مهاری بر پیشرفت چرخه سلولی داشته و در نتیجه نقش تومور ساپرسوری ایفا می کنندکه اصطلاحاً tumor suppressor-miRیا ts-miR نام می‌گیرند،گروه دیگر که oncomiRNA یا oncomiR نام دارند با تنظیم بیان ژن-های تومور ساپرسور باعث پیشرفت چرخه سلولی می‌گردند miRNAهای مهارکننده تومور معمولا در تومورها دچار کاهش بیان می‌شوند و در مقابل miRNA های انکوژن دچار افزایش بیان می‌شوند بنابراین تعدیل کننده‌های بیان ژن در سرطان پستان هستند، از آنها به عنوان مارکرهای مولکولی در پیش آگهی، تشخیص و همچنین درمان سرطان پستان بهره برد. علاوه بر این، قابلیت منحصر به فرد این مولکول‌ها برای حفظ پایداری خود در طولانی مدت، آنها را به پارامترهای بیولوژیکی مهمی تبدیل می‌کند (۱۲). miRNAها خانواده‌ای از RNA های کوتاه غیر کد کننده ۱۹ تا ۲۵ نوکلئوتیدی هستند (۳،۱۳) که با اتصال به ناحیه 3'UTR، mRNA باعث مهار ترجمه و تخریب mRNA می‌شود (۱۴).miRNAها نقش مهمی در تنظیم فرایندهای مختلف مولکولی و مسیرهای پیام رسانی دارند (۱۴،۱۵). miRNAدر سرطان‌های مختلف دچار اختلال شده و همچنین در تمام مراحل سرطان زایی نقش دارند (۱۶). این مولکول‌ها دارای عملکرد دو گانه انکوژنی و سرکوبگر توموری هستند که در رشد تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلولی نقش دارند (۱۷،۱۸). بنابراین miRNAها اهداف مهمی در مطالعات سرطان‌ها از جمله سرطان پستان هستند (۱۹،۲۰). در میان miRNAها، miR-509-3-5p و miR-596 از مهمترین miRNAهای دخیل در بروز سرطان هستند (۲۱،۲۲). miR-509-3-5p در سلول‌های سرطانی مختلف بیان شده و در مطالعات آزمایشگاهی مانع از مهاجرت سلول‌ها می‌شود، بنابراین miR-509-3-5pبه عنوان یک سرکوبگر تومور عمل می‌کند (۲۱). miR-509-3-5p با هدف قرار دادن ناحیه‌ی 3'UTR ژن *PLK1* باعث سرکوب بیان این ژن و در نتیجه انحراف میتوزی و توقف سلول در G2/M می‌شود (۲۱). miR-596 نیز در سرطان-های مختلف مثل سرطان دهانه رحم، معده و کبد دچار اختلال می‌شود (۲۶-۲۳)، به‌طوری که افزایش بیان miR-596 در سرطان دهانه‌ی رحم منجر به سرکوب مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۶). بیان بالای این مولکول باعث افزایش میزان بقا بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم می‌شود (۲۵).

بنابراین miR-596 نیز نقش سرکوبگر توموری دارد (۲۲). بنابراین ما در این مطالعه بر آن شدیم تا سطح بیان miR-596 و miR-509-3-5p را در نمونه‌های توموری سرطان پستان در مقایسه با نمونه‌های سالم مجاور تومور بررسی کنیم و نقش آنها را به عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی در سرطان پستان مورد ارزیابی قرار دهیم.

روش‌کار

مطالعات بیوانفورماتیکی

مجموعه داده میکرواری (GEO) یک پایگاه داده ژنومی با توان عملیاتی بالا برای پروفایل‌های بیان miRNAها در سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. کلمه کلیدی عبارت بود از ((”سرطان پستان“) یا تومور) و [(سالم) یا کنترل یا ”غیر تومور“) یا مجاور)] و فیلترهای ”Homo sapiens“: پروفایل RNA غیر کدکننده براساس آرایه]. معیارهای انتخاب مجموعه داده‌های واجد شرایط شامل مجموعه داده‌هایی با پلت‌فرم‌های miRNA بود که هر کدام به طور همزمان شامل بافت‌های سرطان پستان و نمونه‌های سالم (یا نمونه‌های غیر توموری مجاور) می‌شوند. با توجه به کیفیت داده های خام، مجموعه داده‌های GSE40525 و GSE45666 برای بقیه مطالعه انتخاب شدند.مجموعه داده‌های GSE40525 شامل ۵۶ نمونه‌ی توموری سرطان پستان و ۸ نمونه سالم بود. مجموعه داده‌های GSE45666نیز شامل ۱۰۱ نمونه سرطان پستان و ۱۵ نمونه بافت سالم بود. از میان miRNAهای مورد بررسی miR-509-3-5p وmiR-596 انتخاب شدند، زیرا این دو miRNA در مطالعات اخیر تأیید شده ومشخص شده است

که نقش بسیار مهمی در ایجاد و پیشرفت انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان دارند.

نمونه‌های مورد مطالعه

نمونه‌های مورد مطالعه در این آزمایش از بیمارستان نور نجات تبریز جمع‌آوری شد که شامل ۱۰۰ بافت توموری سرطان پستان و ۱۰۰ بافت حاشیه تومور بود، که با اخذ رضایت نامه کتبی از شرکت کنندگان تهیه شد. (این مطالعه با کد اخلاقی IR.IAU.TABRIZ.REC.1401.063 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تصویب شده است). جدول ۱ ویژگی های اساسی بیماران مبتلا به سرطان پستان دراین مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول ۱ :ویژگی های اساسی بیماران مبتلا به سرطان پستان

ویژگی های اساسی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مطالعه	
پارامتر	درصد
درجه تومور	درجه ۳=۵٪ درجه ۲ =۸۷,۵٪ درجه ۱ = ۷,۵٪
گره لنفاوی	بله = ۸۷,۵٪ خیر =۱۲,۵ ٪
سابقه خانوادگی	بله = ۴۷,۵٪ خیر =۴۱,۳ ٪ ناشناخته=۱۱,۲ ٪
سابقه سقط جنین	بله = ۳۶,۲٪ خیر =۵۱,۳ ٪ ناشناخته=۱۲,۵ ٪
سن	۵۰≥ ٪ ۳۸,۸ ۵۰ ٪ > ۴۰ ناشناخته=۲۱,۲٪

مطالعات آزمایشگاهی

استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول (Invitrogen, USA) انجام شد، و کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده با استفاده از طیف سنج NanoDrop(Thermo Scientific, USA) بررسی شد. سنتز cDNA برای miR-509-3-5p، miR-596 و RNU6 با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، dNTP(KIAGENE, FANAVAR) و پرایمرهای ساقه-حلقه (Stem-loop)اختصاصی آنها، در شرایط آزمایشگاهی(۲۵ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، ۴۷ دقیقه در دمای ۶۰ درجه و ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلسیوس) انجام شد. برای این منظور سه پرایمر ساقه-حلقه (Stem-loop) اختصاصی برای miR-509-3-5p، miR-596 و RNU6 (برای نرمال سازی) طراحی شد. برای انجام واکنش Real-time PCR از پرایمرهای اختصاصی miR-509-3-5p و miR-596 و SYBR Green Master Mix (SMOB IO, Taiwan) استفاده شد. بررسی بیان ژن‌ها در دستگاه Real-time PCR (Corbett RG6000 R010756) به شرح زیر انجام شد: برای miR-509-3-5p، ۱۰دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۵ سیکل ۱۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس. برای miR-596، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۰ چرخه ۱۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و برای RNU6، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس ، ۴۰ چرخه ۱۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز cDNA و انجام Real-time PCR

	میکروارناها	توالی
cDNA synthesis reaction	miR-596 MIMAT0003264	5’-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCCGAG-3’
	hsa-miR-509-3-5p MIMAT0004975	5’-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCATGATT-3’
	RNU6(STL)	5′-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATAT-3′
Real-time PCR reaction	F(miR-596)	5’-AAGCCTGCCCGGCTCCT-3’
	Common(R)	5’-GTGCAGGGTCCGAGGT-3’
	F(miR- miR-509-3-5p)	5'-TACTGCAGACGTGGCAATCATG-3'
	Common(R)	5’-GTGCAGGGTCCGAGGT-3’
	RNU6 (F):	5’-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3’

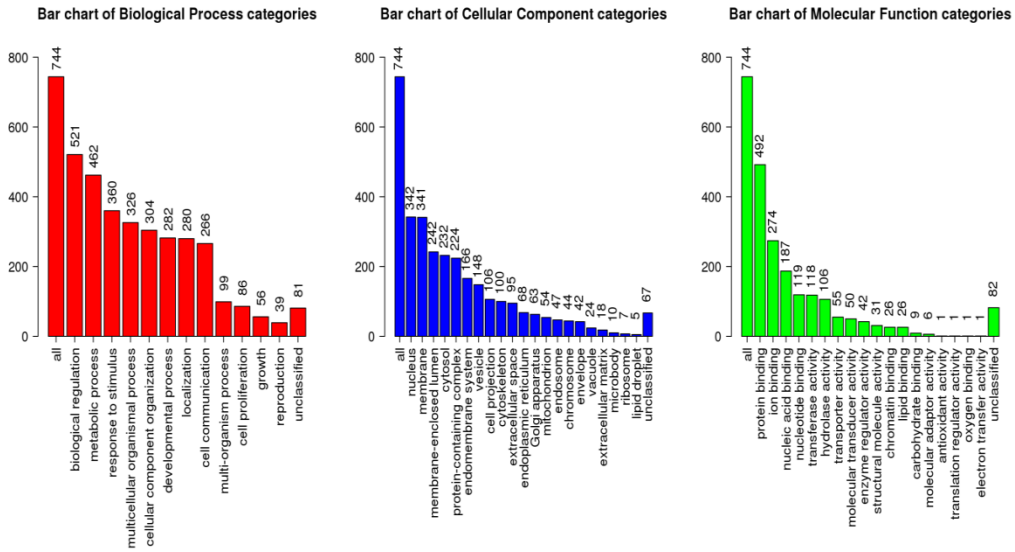
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی که در بالا ذکر شد انجام شد. مقادیر آستانه برای miRNAهای بیان شده روی |logFC|>۰،۰۵ و p.value>۰،۰۵ تنظیم شد. معیارهای برش بین نمونه‌های طبیعی و تومور و نمودارهای آتشفشانی (Volcano plot)برای نتایج تحلیل بیان با استفاده از پکیج نرم‌افزاری R ggplot2 بود. تجزیه و تحلیل تجربی برای نتایج بیان نسبی miRNA توسط نرم افزار REST (نرم‌افزار بیان نسبی) مورد بررسی قرار داده شد و مقدار کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مطالعات بیوانفورماتیکی

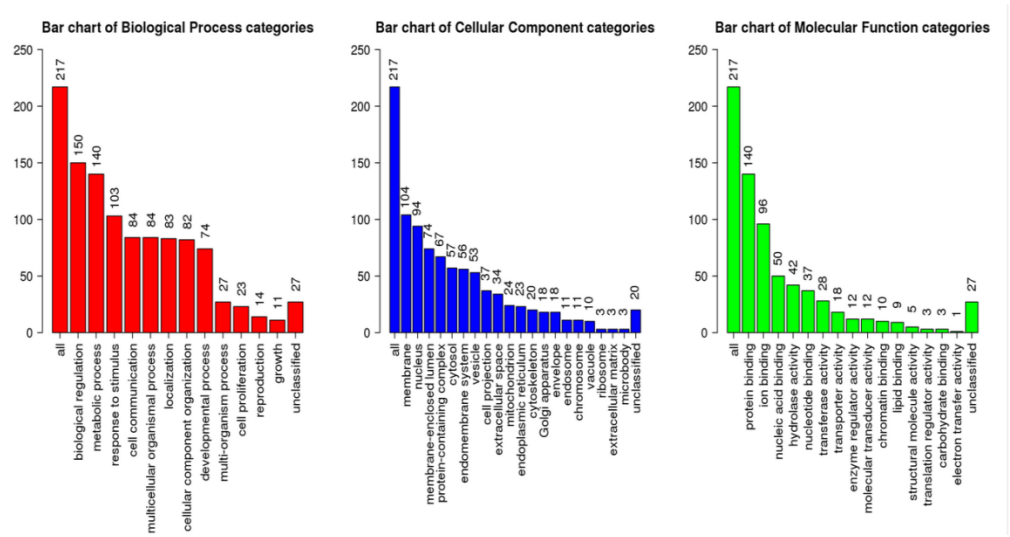
براساس پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط با miRNAها که شامل miRTarBase ،miRDB بود، miR-509-3-5p و miR-596 به‌عنوان miRNAهای بالقوه در بروز سرطان پستان انتخاب شدند. برای تعیین نقش miR-509-3-5p و miR-596، میزان بیان نسبی هر دو miRNA در بافت‌های توموری و بافت‌های حاشیه تومور مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج حاصل از بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای hsa-miR-509-3-5p، ۷۴۴ ژن هدف (شکل ۱ و جدول 3) و برای hsa-miR-596، ۲۱۷ ژن هدف (شکل ۲ و جدول 4) از پایگاه داده miRDB, miRTarBase پیش بینی شد.



شکل ۱: ۷۴۴ ژن هدف پیش بینی شده برای miR-509-3 -5p

جدول ۳:ارتباط بین miR-509-3-5pو ژن‌های هدف آن

ژن	توصیف	اندازه	قابل انتظار	نسبت	مقدار احتمال
HP:0007370	Aplasia/Hypoplasia of the corpus callosum	468	18.455	2.1132	6.77E-06
HP:0001273	Abnormal corpus callosum morphology	490	19.323	2.0183	1.98E-05
HP:0008050	Abnormality of the palpebral fissures	525	20.703	1.9321	4.2E-05
HP:0200006	Slanting of the palpebral fissure	441	17.391	2.0126	5.72E-05
HP:0001249	Intellectual disability	1482	58.442	1.4715	8.36E-05
HP:0002438	Cerebellar malformation	260	10.253	2.3408	9.02E-05
HP:0002500	Abnormality of the cerebral white matter	569	22.438	1.8272	0.000117
HP:0001212	Prominent fingertip pads	8	0.31548	12.679	0.000147
HP:0011298	Prominent digit pad	8	0.31548	12.679	0.000147
HP:0001263	Global developmental delay	1253	49.412	1.4976	0.000174



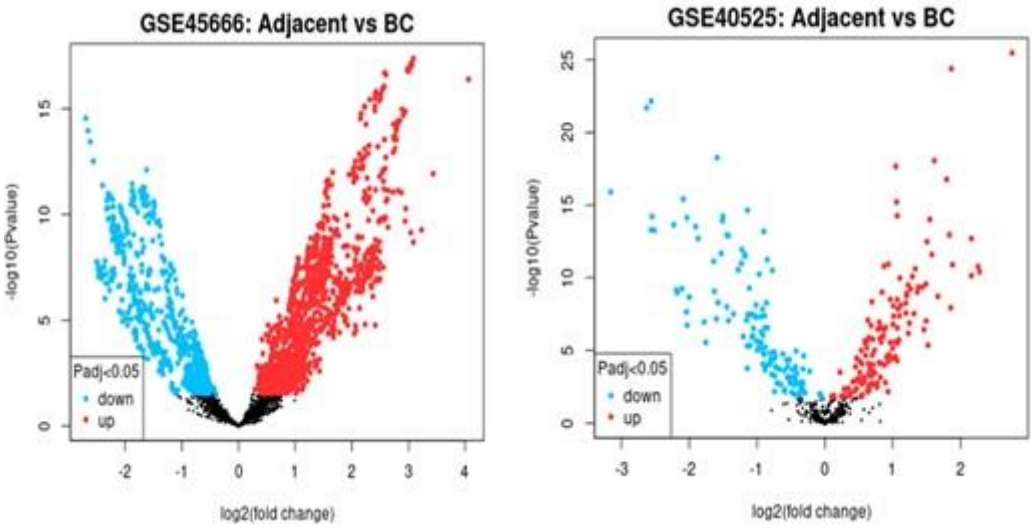
شکل ۲: ۲۱۷ ژن هدف پیش بینی شده برای miR-596

جدول ۴: ارتباط بین miR-596و ژن‌های هدف آن

ژن	توصیف	اندازه	قابل انتظار	نسبت	مقدار احتمال
HP:0000273	Facial grimacing	8	0.081499	36.81	5.52E-05
HP:0001266	Choreoathetosis	61	0.62143	6.4368	0.003382
HP:0001844	Abnormality of the hallux	117	1.1919	4.1949	0.006735
HP:0002072	Chorea	112	1.141	4.3822	0.00561
HP:0005324	Disturbance of facial expression	10	0.10187	29.448	0.000117
HP:0007166	Paroxysmal dyskinesia	5	0.050937	39.265	0.001006
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	163	1.6605	3.6133	0.006273
hsa04218	Cellular senescence	160	1.63	3.681	0.005739
hsa05161	Hepatitis B	144	1.467	4.7717	0.000642
hsa05166	Human T-cell leukemia virus 1 infection	255	2.5978	3.0796	0.004367

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

با در نظر گرفتن |log2FC| 5 0.0< و 0.05>p.value ، تشخیص داده شد که miR-509-3-5p در GSE45666 ((logFC=(-0.2))، GSE40525 (logFC=(-0.4))، کاهش یافته استو همچنین miR-596 در GSE45666 ((logFC=(-0.13))، ((logFC=(-0.15))، کاهش یافته است که مطابق با نتایج تجربی ما در شکل ۳ بود.

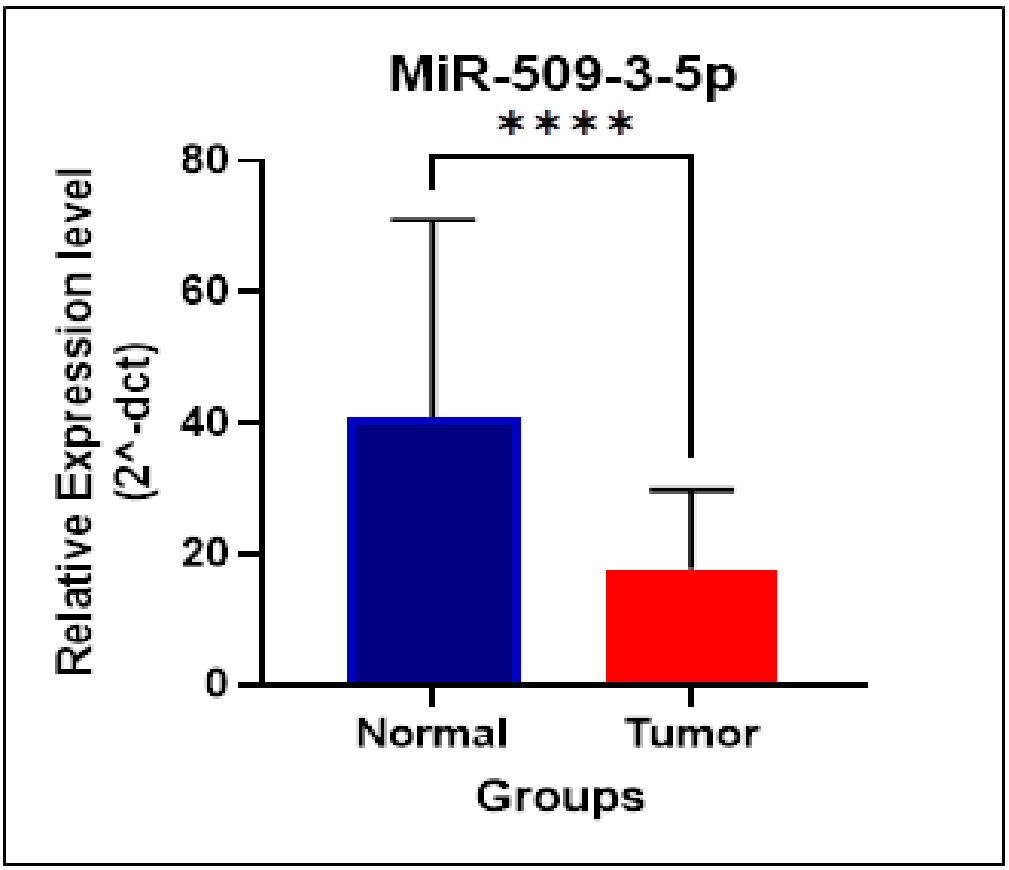


شکل ۳: طرح آتشفشانGSE40525(Volcano plot)(و GSE45666)miR-596 , miR-509-3-5p

مطالعات آزمایشگاهی

بررسی میزان بیانmiR-509-3-5p

نتایج حاصل از آزمون Rest نشان داد که سطح بیان نسبی miR-509-3-5p در بافت‌های توموری سرطان پستان در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور تومور مقدار p.value=0.000است که این میزان کمتر از 0.05 است بنابراین معنی دار و کاهش بیان را نشان میدهد (شکل۴ و جدول5).



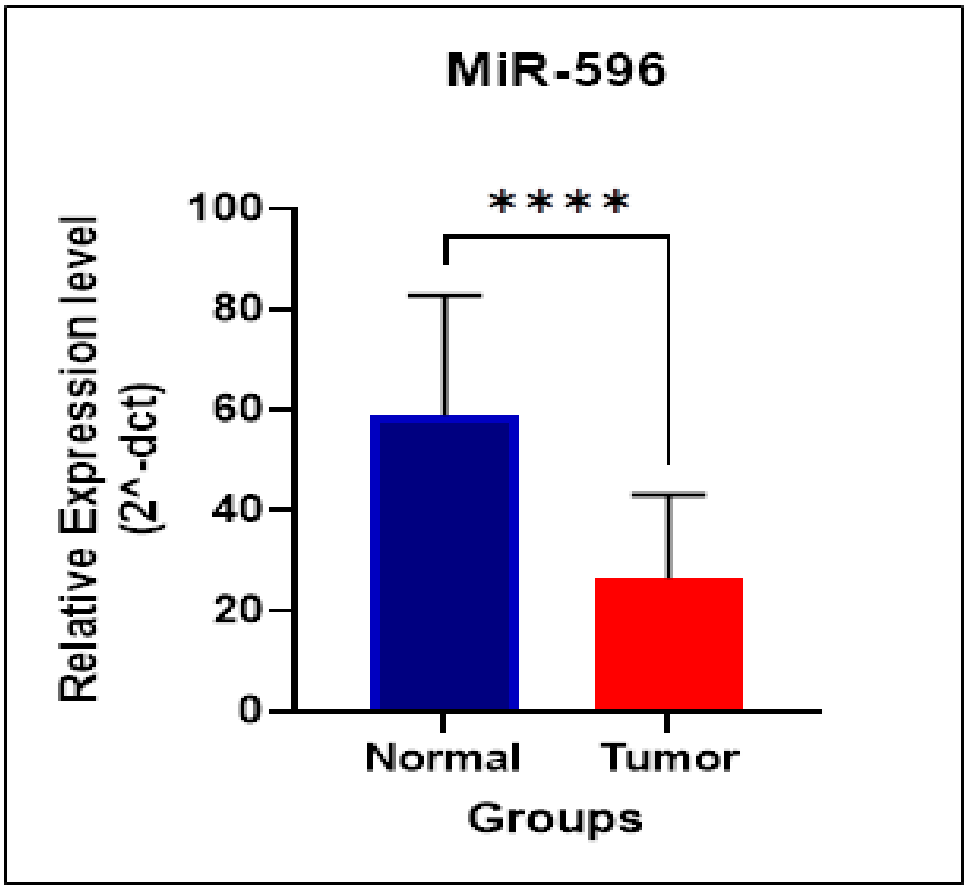
شکل ۴: بررسی میزان بیان miR-509-3-5P در بافت توموری سرطان پستان در مقایسه با بافت سالم مجاور تومور

جدول ۵: نتایج بررسی میزان بیان miR-509-3-5P در بافت توموری سرطان پستان در مقایسه با بافت سالم مجاور تومور

ژن	نوع	کارایی	بیان	خطای استاندارد	95% C.I.	مقدار احتمال	نتیجه
miR-509-3-5p	TRG	1	0.066	0.008-0.500	0.002-2.000	0.000	DOWN
U6	REF	1	1				
Interpretation							
miR-509-3-5p is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.066 (S.E. range is 0.008 – 0.500).							
miR-509-3-5p sample group is different to control group. P(H1)=0.000							

بررسی میزان بیانmiR-596

نتایج حاصل از آزمون Rest نشان داد که سطح بیان نسبی miR-596 در بافت‌های توموری سرطان پستان در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور تومور مقدار p.value=0.002است که این میزان کمتر از 0.05است بنابراین معنی دار و کاهش بیان را نشان میدهد (شکل۵ و جدول۶).



شکل۵: بررسی میزان بیان miR-596 در بافت توموری سرطان پستان در مقایسه با بافت سالم مجاور تومور

جدول ۶: نتایج بررسی میزان بیان miR-596در بافت توموری سرطان پستان در مقایسه با بافت سالم مجاور تومور

ژن	نوع	کارایی	بیان	خطای استاندارد	95% C.I.	مقدار احتمال	نتیجه
miR-596	TRG	1	0.020	0.002-0.125	0.000-1.000	0.002	Down
U6	REF	1	1				
Interpretation							
miR-596 is Down-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.020 (S.E. range is 0.002-0.125).							
miR-596 sample group is different to control group. P(H1)=0.002							

بحث

با توجه به بررسی‌های انجام شده روی miRNAها بروز اختلال در تنظیم این مولکول‌ها منجر به بروز اختلال در بیان ژن‌های مختلفی از جمله: ژن‌های سرکوبگر تومور، انکوژن‌ها و سایر ژن‌ها می‌شود (۲۷) با توجه به اینکه الگوی بیان miRNAها در سلول‌های توموری سرطان پستان در مقایسه با سلول‌های سالم متفاوت است (۲۸) می‌توان از آنها به عنوان بیومارکر در تشخیص و پیش آگهی سرطان پستان استفاده کرد (۲۹،۳۰). تغییرات در سطح بیان miRNAها باعث ایجاد متاستاز، تهاجم بافتی، کاهش آپاپتوز و ایجاد مقاومت دارویی در سرطان پستان می‌شود (۳۳-۳۱). با توجه به بالا بودن میزان بروز سرطان پستان (۳۴)، بسیاری از مطالعات برای شناسایی نشانگرهای مختلف زیستی متمرکز شده‌اند که می‌توانند با تشخیص زودهنگام باعث کاهش عوارض این بیماری شوند. طبق مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شده روی miR-596 و miR-509-3-5p مشخص شد که این دو miRNA در فرایندهای مختلف درون سلولی عملکرد دارند. بنابراین در مطالعه‌ی حاضر میزان بیان miR-596 و miR-509-3-5p در بافت توموری سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه حاضر در بررسی بیوانفورماتیکی سطح بیان miR-596 در سلول‌های سرطان پستان نسبت به سلول‌های سالم کاهش بیان معنی‌داری را نشان داد. همچنین در مطالعات آزمایشگاهی انجام شده که به بررسی سطح بیان miR-596 در بافت توموری سرطان پستان نسبت به بافت سالم انجام شد نیز کاهش بیان معنی‌داری در میزان بیان miR-596 در بافت توموری نسبت به بافت سالم مشاهده شد که تایید کننده نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی بود. این نتایج بیانگر آن است که miR-596 نقش سرکوبگر توموری داشته و کاهش بیان آن منجر به بروز سرطان پستان می‌شود. در سایر مطالعات نیز نقش سرکوبگری miR-596 نیز تایید شده است به طوری که Zhang و همکاران گزارش کردند که بیانmiR-596در سلول‌هایسرطان معده و بافت‌هایسرطان معده کاهش می‌یابد. همچنین نشان دادند که بیان miR-596 می‌تواند رشد، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطان معده را مهار کند. علاوه بر این، طبق گزارشات آنها بیان miR-596 توسط مکانیسم‌های اپی ژنتیکی تنظیم می‌شود، به طوری که کاهش تنظیم-miR 596 با وضعیت متیلاسیون پروموتر در رده‌های سلولیسرطان معده همراه بود (۲۴). مطالعات مختلف نشان دادند که رونویسی miRNAها می‌تواند به طور اپی ژنتیکی توسط متیلاسیون در جزایر CpG تنظیم شود (۳۵،۳۶). علاوه بر این، متیلاسیون DNA یک سیگنال برگشت پذیر است، مشابه سایر تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی (۳۷) خاموش شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور ارتباط نزدیکی با هیپرمتیلاسیونDNAدارد و می‌تواند به طور موثر توسط مهارکننده‌هایDNA متیل ترانسفراز معکوس شود و در نتیجه رشد تومور را مهار کند (۳۸). در بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده در رابطه باmiR-509-3-5p نیز سطح بیان miR-509-3-5p در سلول‌های توموری سرطان پستان نسبت به سلول‌های سالم کاهش یافته بود. که این نتایج در مطالعات آزمایشگاهی نیز تایید شد به طوری که سطح بیان miR-509-3-5p در بافت توموری سرطان پستان نسبت به بافت سالم کاهش معنی‌داری را نشان داد. این نتایج نشان دهنده‌ی آن است که miR-509-3-5p یک سرکوبگر تومور می‌باشد که کاهش در بیان آن در بروز سرطان پستان نقش دارد. Wangو همکاران نشان دادند که miR-509-3-5p با هدف قرار دادند *PLK1* به طور قابل توجهی از تکثیر رده سلولی A549 در سرطان ریه

جلوگیری می‌کند. آنها شواهدی ارائه کردند که miR-509-3-5p در سرطان‌های مختلف به عنوان یک سرکوبگر تومور عمل می‌کند که مشابه با مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. افزایش میزان بیان miR-509-3-5p و در نتیجه خاموش سازی *PLK1* منجر به ایجاد دوک غیرطبیعی و میتوز نابجا می‌گردد (۲۱). انحراف میتوزی اغلب منجر به فاجعه میتوزی می‌شود و به دنبال آن سلول‌های اینترفاز با ریزهسته‌های متعدد تشکیل می‌شود و در نهایت در اثرآپوپتوز می‌میرند(۳۹). همچنین Zhang و همکاران نیز گزارش کردند که القا بیان miR-509-3-5P توانایی‌های مهاجرت، تهاجم و تشکیل کلنی را مهار می‌کند، در حالی که خاموش سازی miR-509-3-5P منجر به اثرات معکوس می‌شود، به طوری که miR-509-3-5P می تواند منجر به افزایش رشد تومور شده و مهمتر از آن می‌تواند متاستاز لنفاوی را در داخل بدن تسهیل کند، و همچنین نشان دادند که miR-509-3-5P می‌تواند به عنوان یک سرکوب کننده تومور درسرطان معده عمل کند(۴۰). آنها همچنین ژن *PODXL* را که یک گلیکوپروتئین گذرنده و ارتولوگ CD34 است که به طور معمول بر روی سلول‌های اندوتلیال عروقی، همانژیوبلاست‌ها، پودوسیت‌ها و غیره بیان می شود (۴۱) را به عنوان یک ژن هدف برای miR-509-3-5p در سرطان معده نشان دادند(۴۰).*PODXL* به عنوان یک محرک تومور در سرطان پانکراس، کبد سلولی، سرطان پستان، سرطان مری، سرطان روده بزرگ و غیره بیان می شود. علاوه بر این، برخی از مطالعات تأیید می‌کنند که بیان بیش از حد *PODXL* به شدت با ویژگی‌های بالینی آسیب‌شناسی پیشرفته (تمایز ضعیف، مرحله پیشرفته تومور و غیره) و پیش‌آگهی ضعیف ارتباط دارد(۴۶-۴۱). بنابراین افزایش بیان miR-509-3-5P منجر به مهار بیان ژن *PODXL* می‌شود (۴۰) در نتیجه از تومورزایی جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی انجام شده روی میزان بیان miR-596 و miR-509-3-5p که نشان‌دهندی کاهش بیان این miRNAها در سرطان پستان و نقش سرکوبگر توموری آنها می‌باشد، بنابراین می‌توان عنوان کرد کاهش میزان بیان miR-596 و miR-509-3-5p در سرطان پستان می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی تشخیصی و درمانی مهم در تشخیص سرطان پستان استفاده شود.

سپاسگزاری

بدین ترتیبمراتب قدر دانی خود را از اساتید و کارمندان دانشگاه علوم پزشکی تبریز نموده و از ایشان که در انجام کلیه مراحل عملی حمایت‌مان کردند را نهایت تشکر را دارم.

منابع

1. Vahdanikia V, Maleki M, Fam RAI, Abdi A. Assessment the Effect of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Stem Cells on the Expression of Homing Genes; CXCR4 and VLA-4 in Cell Line of Breast Cancer. International Journal of Hematology-Oncology & Stem Cell Research. 2022;16(2).
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer. 2015;136(5):E359-E86.
3. Davey MG, Davies M, Lowery AJ, Miller N, Kerin MJ. The role of microRNA as clinical biomarkers for breast cancer surgery and treatment. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(15):8290.
4. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA: a cancer journal for clinicians. 2021;71(1):7-33.
5. Taheripanah R, Balash F, Anbiaee R, Mahmoodi M, Sene AA. Breast cancer and ovulation induction treatments. Clinical Breast Cancer. 2018;18(5):395-9.
6. Makki J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. Clinical medicine insights: Pathology. 2015;8:CPath. S31563.
7. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. The Journal of clinical investigation. 2007;117(11):3155-63.
8. Castañeda-Gill JM, Vishwanatha JK. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. Journal of carcinogenesis. 2016;15.
9. Karagiannis GS, Goswami S, Jones JG, Oktay MH, Condeelis JS. Signatures of breast cancer metastasis at a glance. Journal of cell science. 2016;129(9):1751-8.
10. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. American journal of cancer research. 2017;7(5):1016.
11. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. International journal of biological sciences. 2017;13(11):1387.
12. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. International journal of molecular sciences. 2016;17(10):1712.
13. Abdi A, Zafarpiran M, Farsani ZS. The computational analysis conducted on miRNA target sites in association with SNPs at 3'UTR of ADHD-implicated genes. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents). 2020;20(1):58-75.
14. Zhang M, Shi Y, Zhang Y, Wang Y, Alotaibi F, Qiu L, et al. miRNA-5119 regulates immune checkpoints in dendritic cells to enhance breast cancer immunotherapy. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2020;69(6):951-67.
15. Naseri Z, Oskuee RK, Jaafari MR, Moghadam MF. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer in vitro and in vivo. International Journal of Nanomedicine. 2018;13:7727.
16. Sabit H, Cevik E, Tombuloglu H, Abdel-Ghany S, Tombuloglu G, Esteller M. Triple negative breast cancer in the era of miRNA. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2021;157:103196.
17. Kelly A, Stephen G, Andrea M, John F, Rodney J. Decreased expression of key tumor suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer. BMC Cancer. 2014;14:51.
18. Volovat SR, Volovat C, Hordila I, Hordila D-A, Mirestean CC, Miron OT, et al. MiRNA and LncRNA as potential biomarkers in triple-negative breast cancer: a review. Frontiers in oncology. 2020;10:526850.
19. Liang C, Ding J, Yang Y, Deng L, Li X. MicroRNA-433 inhibits cervical cancer progression by directly targeting metadherin to regulate the AKT and β-catenin signalling pathways. Oncology reports. 2017;38(6):3639-49.
20. Adams BD, Wali VB, Cheng CJ, Inukai S, Booth CJ, Agarwal S, et al. miR-34a silences c-SRC to attenuate tumor growth in triple-negative breast cancer. Cancer research. 2016;76(4):927-39.
21. Wang X-H, Lu Y, Liang J-J, Cao J-X, Jin Y-Q, An G-S, et al. MiR-509-3-5p causes aberrant mitosis and anti-proliferative effect by suppression of PLK1 in human lung cancer A549 cells. Biochemical and biophysical research communications. 2016;478(2):676-82.
22. Chen Y, Gong W, Dai W, Pan Z, Xu X, Jiang H. MiR-596 down regulates SOX4 expression and is a potential novel biomarker for gastric cancer. Translational Cancer Research. 2020;9(2):1294.

23. Fen H, Hongmin Z, Wei W, Chao Y, Yang Y, Bei L, et al. RHPN1-AS1 Drives the Progression of Hepatocellular Carcinoma via Regulating miR-596/IGF2BP2 Axis. Current pharmaceutical design. 2020;25(43):4630-40.
24. Zhang Z, Dai D-Q. MicroRNA-596 acts as a tumor suppressor in gastric cancer and is upregulated by promotor demethylation. World journal of gastroenterology. 2019;25(10):1224.
25. Huang Y-W, Kuo C-T, Chen J-H, Goodfellow PJ, Huang TH-M, Rader JS, et al. Hypermethylation of miR-203 in endometrial carcinomas. Gynecologic oncology. 2014;133(2):340-5.
26. Endo H, Muramatsu T, Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, et al. Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. Carcinogenesis. 2013;34(3):560-9.
27. Fridrichova I, Zmetakova I. MicroRNAs contribute to breast cancer invasiveness. Cells. 2019;8(11):1361.
28. Gasparri ML, Casorelli A, Bardhi E, Besharat AR, Savone D, Ruscito I, et al. Beyond circulating microRNA biomarkers: Urinary microRNAs in ovarian and breast cancer. Tumor biology. 2017;39(5):1010428317695525.
29. Zografos E, Zagouri F, Kalapanida D, Zakopoulou R, Kyriazoglou A, Apostolidou K, et al. Prognostic role of microRNAs in breast cancer: A systematic review. Oncotarget. 2019;10(67):7156.
30. Ilkhani K, Delgir S, Safi A, Seif F, Samei A, Bastami M, et al. Clinical and in silico outcomes of the expression of miR-130a-5p and miR-615-3p in tumor compared with non-tumor adjacent tissues of patients with BC. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2021;21(7):927-35.
31. Zhang L-F, Jiang S, Liu M-F. MicroRNA regulation and analytical methods in cancer cell metabolism. Cellular and Molecular Life Sciences. 2017;74(16):2929-41.
32. Zhan M-N, Yu X-T, Tang J, Zhou C-X, Wang C-L, Yin Q-Q, et al. MicroRNA-494 inhibits breast cancer progression by directly targeting PAK1. Cell death & disease. 2018;8(1):e2529-e.
33. Safi A, Bastami M, Delghir S, Ilkhani K, Seif F, Alivand MR. miRNAs modulate the dichotomy of cisplatin resistance or sensitivity in breast cancer: an update of therapeutic implications. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2021;21(9):1069-81.
34. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2021;71(3):209-49.
35. Poddar S, Kesharwani D, Datta M. Interplay between the miRNome and the epigenetic machinery: Implications in health and disease. Journal of Cellular Physiology. 2017;232(11):2938-45.
36. Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano H-o, Yoshikawa K, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. Carcinogenesis. 2010;31(12):2066-73.
37. Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M. DNA methylation is a reversible biological signal. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(11):6107-12.
38. Lyko F, Brown R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. Journal of the National Cancer Institute. 2005;97(20):1498-506.
39. Roninson IB, Broude EV, Chang B-D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. Drug Resistance Updates. 2001;4(5):303-13.
40. Zhang J, Zhu Z, Sheng J, Yu Z, Yao B, Huang K, et al. miR-509-3-5P inhibits the invasion and lymphatic metastasis by targeting PODXL and serves as a novel prognostic indicator for gastric cancer. Oncotarget. 2017;8(21):34867.
41. Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease. Journal of the American Society of Nephrology. 2009;20(8):1669-76.
42. Heby M, Elebro J, Nodin B, Jirström K, Eberhard J. Prognostic and predictive significance of podocalyxin-like protein expression in pancreatic and periampullary adenocarcinoma. BMC clinical pathology. 2015;15(1):1-13.
43. Snyder KA, Hughes MR, Hedberg B, Brandon J, Hernaez DC, Bergqvist P, et al. Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy. Breast cancer research. 2015;17(1):1-14.
44. Chijiiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, et al. Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. International journal of oncology. 2016;48(4):1688-700.

45. Flores-Tellez TN, Lopez TV, Vasquez Garzon VR, Villa-Trevino S. Co-expression of ezrin-CLIC5-podocalyxin is associated with migration and invasiveness in hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2015;10(7):e0131605.
46. Kaprio T, Fermér C, Hagström J, Mustonen H, Böckelman C, Nilsson O, et al. Podocalyxin is a marker of poor prognosis in colorectal cancer. BMC cancer. 2014;14(1):1-7.