

## بررسی بیان miR-21 و miR-221 در سرطان معده و ارتباط آن با ژنهای RECK و CDKN1B

حسین عفت پناه<sup>۱</sup>، رضا یادگار آذری<sup>۲</sup>، منوچهر کریمی<sup>۳</sup>، امیر مجلسی<sup>۴</sup>، نوشین شهاب<sup>۵</sup>، مسعود سعیدی جم<sup>۶</sup>

۱. مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
  ۲. استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
  ۳. استادیار، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
  ۴. استادیار، گروه بیماریهای گوارشی، بیمارستان شهید بهشتی دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
  ۵. کارشناس، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
  ۶. استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (مؤلف مسؤل)، تلفن ثابت: ۰۸۱-۳۲۸۸۰۴۶۴
- sjam110@yahoo.com

### چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعات اخیر بیانگر نقش کلیدی miR-21 و miR-221 در سرطان معده می باشند. هر چند دانش ما در مورد مکانیسم مولکولی عملکرد miR-21 و miR-221 در سرطان بطور کلی و در سرطان معده بطور خاص محدود است. در این مطالعه دو microRNA بالقوه انکوژن (miR-21 و miR-221) انتخاب شده تا ارتباط سطوح بیان این microRNA ها و ژن های هدف آنها در بافت سالم و سرطانی معده مقایسه شوند. هدف این مطالعه بررسی ارتباط بیان این دو microRNA و ژن های هدف آنها در جمعیت ایرانی بود.

**روش بررسی:** این مطالعه یک مطالعه موردی - شاهدهی بود که بر روی تعداد ۳۲ نمونه از بافت سرطانی معده و بافت مجاور آن انجام شد. نمونه ها از بیماران مراجعه کننده به انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) در فاصله سال های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۱ جمع آوری گردید. RNA تام با استفاده از محلول ترایزول و بر اساس دستورالعمل شرکت استخراج شد. cDNA برای mRNA و microRNA ساخته شد و سطوح بیان این ژن ها با qr-TPCR اندازه گیری شد. 18s rRNA و 5s rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای تحلیل میزان بیان ژن ها در نمونه های توموری نسبت به نمونه های سالم از آزمون *paired t-test* استفاده گردید و برای تعیین ارتباط بین سطح بیان miR-21 و miR-221، آزمون ضریب همبستگی پیرسون (*Pearson*) بکار گرفته شد.

**یافته ها:** در میزان بیان miR-21 و miR-221 به صورت معنی داری در بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم مجاورش افزایش مشاهده شد. در نمونه سرطانی میانگین بیان miR-21 برابر با  $1/07 \pm 4/18$  ( $P < 0/001$ ) و میانگین بیان miR-221 برابر با  $2/07 \pm 5/75$  بود ( $P < 0/001$ ) نتایج نشان داد که ارتباط معنی داری بین افزایش بیان miR-21 و کاهش بیان RECK ( $r = -0/42$  و  $p = 0/01$ ) و همچنین افزایش بیان miR-221 و کاهش بیان CDKN1B وجود دارد ( $p = 0/008$  و  $p = 0/46$ ). ( $r =$

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که بیان miR-21 و miR-221 در بافت سرطانی معده افزایش می یابد و بین افزایش miR-21 و کاهش بیان RECK و همچنین افزایش بیان miR-221 و کاهش بیان CDKN1B رابطه معنی دار وجود دارد. احتمالاً این دو microRNA می توانند به عنوان بیو مارکر در سرطان معده استفاده شوند.

**کلمات کلیدی:** miR-21، miR-221، Realtime PCR، SYBERGreen، سرطان معده

وصول مقاله: ۹۳/۹/۲ اصلاحیه نهایی: ۹۳/۱۱/۱۱ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۴

## مقدمه

سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان است (۱). در طول ۵۰ سال گذشته بروز سرطان معده در کشورهای غربی بطور چشمگیری کاهش یافته است. برخلاف این روند در ایران، در طول دو دهه گذشته بروز سرطان معده افزایش یافته است (۲). براساس گزارش محرابیان و همکاران، بروز سرطان معده در ایران ۷۳۰۰ مورد در سال است که شایع ترین سرطان در مردان ایرانی به شمار می رود (۳). بطور کلی، میزان بقاء ۵ ساله این بیماری در جهان ۲۵-۴۰٪ و در ایران به دلیل تاخیر در تشخیص به موقع ۱۲/۸٪ می باشد (۴و۵). برای بیمارانی که در مراحل ابتدایی سرطان معده قرار دارند، مؤثر ترین درمان برداشتن کامل معده است که البته این کار در بیماران در مراحل پیشرفته بیماری، با میزان بقاء کمتری همراه است، لذا تشخیص در مراحل ابتدایی سرطان معده اهمیت بسیار دارد. microRNA ها، RNA های غیرکد کننده با طول ۱۹-۲۴ نوکلئوتید هستند که بیان mRNA های هدف را تنظیم می کنند. این ملکول ها در مراحل زیستی مهمی مانند تمایز سلولی مرگ و تکثیر سلولی دخالت دارد (۶و۷). تغییرات در بیان microRNA ها در انواع بدخیمی ها انسانی از جمله سرطان کولورکتال، پروستات، کبد، مثانه و تیروئید گزارش شده است (۸-۱۲). بر اساس مطالعات اخیر، بین بیان microRNA ها و پیشرفت سرطان معده ارتباط وجود دارد (۱۳-۱۵).

مطالعات متعددی در رابطه با نقش miR-21 در انواع تومورها انجام شده است. نتایج این مطالعات نشان می دهد که miR-21 مهاجم تو موری و تکثیر سلولی را در چندین سرطان تنظیم می کند (۹و۱۰ و ۱۵). miR-221 نیز در بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان معده با تنظیم تکثیر سلولی در پیشرفت تومور دخالت دارد (۱۶و۱۷). با وجود نقش شناخته شده این دو microRNA در سرطان معده، مسیرهای مرتبط در سرطان زایی آنها نا شناخته است.

RECK مهار کننده کلیدی چندین ما تریکس متا لوپروتینازمی باشد و مقادیر پایین آن اغلب با افزایش مهاجم و پیش آگهی بد ارتباط دارد (۱۲). به علاوه مشخص شده است که مهار miR-21 از طریق کاهش بیان RECK باعث مهاجم و حرکت سلولی می شود (۱۵). CDKN1B یک تنظیم کننده مهم پیشرفت چرخه سلولی است که می تواند چرخه سلولی را در مرحله G0/G1 متوقف کند. بر پایه مطالعات miR-221 به عنوان تنظیم کننده منفی در چرخه سلولی بر روی CDKN1B موثر است (۸). هرچند دانش ما در مورد مکانیسم ملکولی عملکرد RECK و CDKN1B در سرطان بطور کلی و در سرطان معده بطور خاص محدود است.

در این مطالعه دو microRNA بالقوه انکوژن (miR-21، miR-221) انتخاب شده است تا ارتباط سطوح بیان این microRNA و ژن های هدف آنها در بافت سالم و سرطانی معده مقایسه شوند. این سوال که آیا بیان miRNA ها در جمعیت های مختلف، متفاوت است، بصورت جامع و سیستماتیک ارزیابی نشده است. در حالی که برخی از شواهد بر رابطه بین miRNA ها و سرطان معده تاکید می کنند، هیچ مطالعه قبلی در مورد این موضوع در ایران وجود ندارد و این مطالعه برای اولین بار در یک جمعیت ایرانی انجام شده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بیان این دو microRNA و ژن های هدف آنها در جمعیت ایرانی بود.

## روش بررسی

مطالعه حاضر یک مطالعه موردی -شاهدی بود که بر روی ۳۲ نمونه از بافت سرطانی معده و بافت مجاور آن انجام شد. در مجموع ۶۴ نمونه از بیماران مراجعه کننده به انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) در فاصله سالهای ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۱ جمع آوری گردیده بود. این نمونه ها از بیمارانی به دست آمده بود که در انستیتو کانسر ایران تحت عمل جراحی

**Quantitative Real Time RT-PCR**

سطوح بیان این ژن ها با qrt-PCR و به وسیله دستگاه ترمو سایکلر (BIO-RAD, USA) اندازه گیری شد. واکنش ها برای ۲۲۱ و ۲۱ - miR در حجم  $20 \mu\text{l}$  شامل  $0.5 \mu\text{l}$  sybr green،  $10 \mu\text{l}$ ،  $0.5 \mu\text{l}$  پرایمر F،  $0.5 \mu\text{l}$  Nuclease،  $1 \mu\text{l}$  cDNA و  $8 \mu\text{l}$  آب. Primery Free و در دماهای زیر انجام شد. denaturation  $95^{\circ}\text{C}$  برای ۵ دقیقه، ۴۵ سیکل، denaturation  $95^{\circ}\text{C}$  برای مدت ۵ ثانیه در دمای  $95^{\circ}\text{C}$ ، annealing در دمای  $92^{\circ}\text{C}$  درجه به مدت ۲۰ ثانیه و Elongation در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. از 5s rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

واکنش ها برای دو ژن RECK و CDKN1B با روش Sybr green و با استفاده از کیت تا کارا (TAKARA, japan) انجام شد. واکنش ها در حجم  $20 \mu\text{l}$  شامل  $1 \mu\text{l}$  cDNA،  $1 \mu\text{l}$  پرایمر F،  $1 \mu\text{l}$  پرایمر R و بر اساس پروتکل شرکت انجام شد. 18 sRNA به عنوان ژن رفرانس استفاده شد و پرایمرهای F و R برای RECK ترتیب CTGGATACTATTGCTAAGGT 3' و برای CDKN1B ترتیب TCTTCTCTGCTTCTTTATTGC 3' و GCAACCGACGATTCTTCTACT 3' و CCATTCCATGAAGTCAGCGATAT 3' بودند.

طراحی پرایمر به وسیله نرم افزار ID-7 allel انجام شد. خواص پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. کار آرایسی پرایمر به وسیله کنترل مثبت و منفی تایید شد.

برداشتن معده بوده اند. نمونه های به دست آمده بلا فاصله در نیتروژن مایع نگهداری شدند. از نمونه بیمارانی که تحت درمان رادیوتراپی، شیمی درمانی و یا ایمنی تراپی بودند در این مطالعه استفاده نشده است. یک فرم رضایتنامه رسمی از تمام بیماران گرفته شده است و کمیته اخلاق انیستیتو کانسر این مطالعه را تایید کرده است.

**استخراج RNA**

RNA تام با استفاده از محلول ترایزول (TrizoI، invitrogen carlsbad USA) و بر اساس دستورالعمل شرکت استخراج شد. خلوص و غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop Spectrophotometr، Bio-TeK-USA) اندازه گیری شد و اینتگریتی با ژل آگارز الکتروفورز ۱٪ بررسی شد. RNA در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  تا مرحله سنتز cDNA نگهداری شدند.

**سنتز cDNA**

cDNA برای microRNA با استفاده از کیت شرکت پارس ژنوم (parsgenom، Iran) ساخته شد. دستورالعمل این شرکت شامل دو مرحله است. مرحله اول شامل اضافه کردن polyA و مرحله دوم Reverse transcription می باشد. واکنش مرحله اول در دمای  $42^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۷ دقیقه و واکنش مرحله دوم در  $42^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶۰ دقیقه و  $85^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه انکوبه شد.

cDNA برای mRNA با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز (Fermentas, USA) و بر اساس پروتکل شرکت و در دماهای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه،  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد.

غلظت و خلوص cDNA به وسیله چگالی نوری بر اساس توضیحات ذکر شده اندازه گیری شد. تمام cDNA ها در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در Real-time RT-PCR

| خصوصیات               | <i>CDKN1B</i>               | <i>RECK</i>           | 18s rRNA                 |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| NCBI accession number | NM_004064                   | NMO21111              | X03205                   |
| F پرایمر              | GCAACCGACGATTCTTCTACT       | CTGGATACTATTGCTAAGGT  | GTAACCCGTTGAACCCCAT      |
| طول پرایمر            | ۲۱                          | ۲۰                    | ۲۰                       |
| مقدار مورد استفاده    | ۱۰ پیکو مول                 | ۱۰ پیکو مول           | ۱۰ پیکو مول              |
| R پرایمر              | CCATTCCATGAAGTCAGCGAT<br>AT | TCTTCTCTGCTTCTTTATTGC | CCATCCAATCGGTAGTAGC<br>G |
| طول پرایمر            | ۲۳                          | ۲۱                    | ۲۰                       |
| مقدار مورد استفاده    | ۱۰ پیکو مول                 | ۱۰ پیکو مول           | ۱۰ پیکو مول              |
| طول محصول PCR         | ۲۴۶                         | ۲۰۵                   | ۱۵۲                      |
| دمای Annealing        | °C۵۵                        | °C۴۸/۸                | °C۵۳/۵                   |

بیان *miR-21*، *miR-221* و دو ژن *RECK* و *CDKN1B* از آزمون Spearman Rank Test استفاده شد.

$\Delta Ct$  سیکلی از واکنش تعریف شده که سیگنال فلور سانس از *Threshold* عبور می کند و تفاوت *Ct* بین ژن مورد نظر و ژن رفرانس بعنوان  $\Delta Ct$  تعریف شد و  $\Delta\Delta Ct$  تفاوت  $\Delta Ct$  بین نمونه های سرطانی و سالم است *Folding Chang* هم برابر با  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  است (۱۸).

تعیین توالی DNA: به منظور تایید هویت قطعات حاصل از PCR، منطقه حاوی هر باند از ژل بریده شد و هر باند توسط شرکت کره جنوبی *Bioneer* تعیین توالی شد و با توالی موجود در *Gene Bank* مقایسه شد.

#### آنالیزهای آماری

جهت آنالیز آماری و انتخاب آزمون مناسب جهت تجزیه و تحلیل داده ها نیاز است ابتدا متغیرهای کمی مورد مطالعه از لحاظ توزیع نرمال و برابری واریانس ها مورد بررسی قرار گیرند. برای بررسی توزیع نرمال داده های کمی از آزمون *one-sample Kolmogorov-Smirnov test* جهت ارزیابی برابری واریانس ها از تست *Leven* استفاده شد. برای تعیین معنی دار بودن میزان بیان ژن ها در نمونه های توموری نسبت به نمونه های نرمال، از آزمون *paired t-test* استفاده گردید. برای تعیین ارتباط بین سطح بیان *miR-21* و *miR-221* آزمون ضریب همبستگی پیرسون (*Pearson*) به کار گرفته شد. برای تعیین ارتباط بین سطح

**یافته ها**

بر روی ژل قرار گرفت و مشاهده شد که در هر کدام از واکنش های انجام شده با پرایمرهای اختصاصی تنها یک باند اختصاصی وجود دارد و این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه های مورد بررسی را تایید کرد.

خلاصه ای از مشخصات این بیماران در جدول ۲ آمده است. منحنی ذوب (melting peak) هر چهار ژن به صورت تک قله به دست آمد که این خود بیانگر وجود تنها یک محصول PCR است. در ضمن محصول PCR

جدول ۲: خلاصه ای از مشخصات نمونه ها و بیان miR-21 / miR-221 و RECK / CDKN1B در بیماران با سرطان معده اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است

| RECK      | CDKN1B    | miR221<br>(Fold change) | miR21<br>(Fold change) | تعداد (درصد) | سن                   |
|-----------|-----------|-------------------------|------------------------|--------------|----------------------|
|           |           |                         |                        |              | کمتر از ۵۹ سال       |
| ۰/۱۸±۰/۷۹ | ۲/۳۸±۲/۶۲ | ۸/۱۲±۱/۲۸               | ۱/۴۷±۱/۸۷              | ۸ (۲۵)       |                      |
| ۱/۱۱±۱/۴۸ | ۲/۶۵±۲/۳۰ | ۷/۳۷±۲/۷۶               | ۲/۷۰±۲/۷۲              | ۲۴ (۷۵)      | ۵۹ سال و بیشتر       |
|           |           |                         |                        |              | جنس                  |
|           |           |                         |                        |              | مرد                  |
| ۰/۶۲±۱/۴۲ | ۲/۶۷±۲/۳۳ | ۷/۷۹±۱/۷۷               | ۲/۳۷±۲/۵۵              | ۲۶ (۸۱)      |                      |
| ۱/۵۲±۱/۴۴ | ۲/۲۲±۲/۶۱ | ۵/۸۹±۴/۲۷               | ۲/۴۹±۲/۵۶              | ۶ (۱۹)       | زن                   |
|           |           |                         |                        |              | مرحله تومور          |
|           |           |                         |                        |              | مرحله ۱              |
| ۰/۹۹±۱/۹۰ | ۲/۱۷±۲/۵۶ | ۷/۷۷±۲/۱۲               | ۲/۹۴±۲/۸۹              | ۱۰ (۳۱)      |                      |
| ۰/۶۹±۱/۲۲ | ۲/۷۷±۲/۲۸ | ۷/۴۶±۲/۶۶               | ۲/۱۴±۲/۴۳              | ۲۲ (۶۹)      | مرحله ۲              |
|           |           |                         |                        |              | اندازه تومور         |
|           |           |                         |                        |              | ۵ سانتی متر و کمتر   |
| ۰/۶۰±۱/۲۸ | ۲/۰۳±۲/۵۳ | ۷/۲۷±۳/۰۱               | ۲/۳۰±۲/۵۲              | ۶ (۱۹)       |                      |
| ۰/۸۶±۱/۵۲ | ۲/۸۰±۲/۲۹ | ۷/۶۷±۲/۳۰               | ۲/۴۳±۲/۶۴              | ۲۶ (۸۱)      | بیشتر از ۵ سانتی متر |

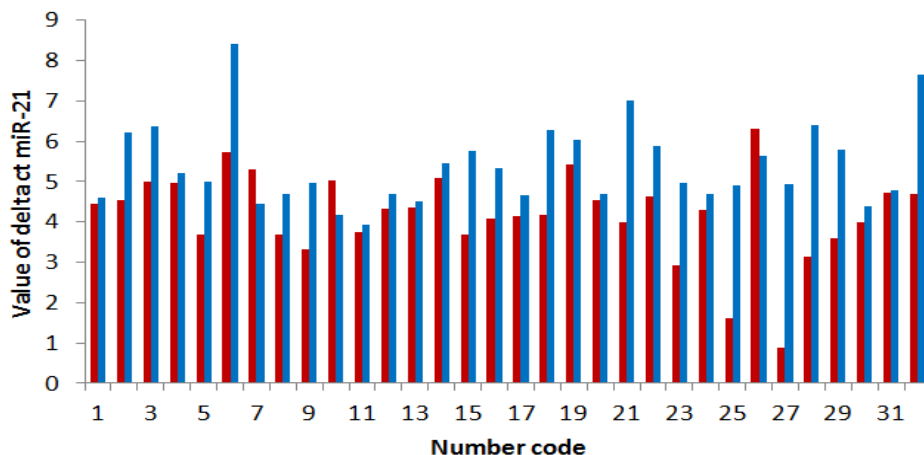
شامل سن ( $P > 0.05$ )، جنسیت ( $P > 0.05$ ) ارتباط معنی داری وجود نداشت. همچنین با استفاده از آزمون one-way ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی داری از لحاظ بیان این ژن ها در بین قومیت ها ( $P > 0.05$ ) یا مرحله بیماری ( $P > 0.05$ ) وجود نداشت.

در  $n=29$  ( $90/62\%$ ) از نمونه ها میزان بیان miR-21 بیشتر از بافت سالم مجاور آن بود. سطوح بیان miR-21 در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن در ۳۲ نمونه بیمار در تصویر ۱ نشان داده شده است. در نمونه سرطانی میانگین

متوسط سن بیماران ۶۴/۴ سال (محدوده سنی ۳۱-۸۳ سال) بود. ۸۱٪ از بیماران مرد بودند. ۳۱٪ از بیماران از نظر مرحله TNM در مرحله I و ۶۹٪ در مرحله II بودند. میانگین اندازه تومور ۷/۱ سانتی متر بود. هیچ ارتباطی بین بیان miR-21/221 و RECK/CDKN1B با سن ( $59 < \text{در برابر } > 59$ )، جنس، مرحله TNM و یا اندازه تومور ( $5 > \text{سانتی متر در مقابل } 5 \leq \text{سانتی متر}$ ) وجود نداشت.

بر اساس آزمون Independent t-test مشخص شد که بین بیان چهار ژن مورد بررسی و مشخصات دموگرافیکی

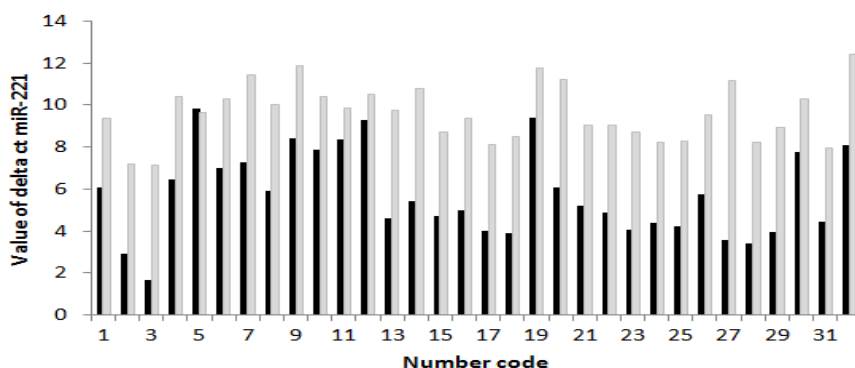
± انحراف معیار برابر ۱/۰۷ ± ۴/۰۱۸ بود، در حالیکه برای نمونه سالم برابر ۱/۰۱ ± ۵/۳۸ به دست آمد (P < ۰/۰۱).



تصویر ۱: مقادیر ΔCt برای miR-21 در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن. حدود این مقادیر برای بافت سرطانی از ۸۸ تا ۶,۳۰ بوده است در حالیکه برای بافت سالم از ۳,۹۳ تا ۸,۴۲ بوده است. خطوط قرمز سطوح بیان miR-21 را در بافت سرطانی و خطوط آبی سطوح بیان miR-21 را در بافت سالم نشان می دهند. Number code نشان دهنده شماره بیماران است.

است. در نمونه سرطانی میانگین ± انحراف معیار برابر با ۲/۰۷ ± ۵/۷۵ بود، در حالیکه برای نمونه سالم برابر است با ۱/۳۵ ± ۹/۶۳ به دست آمد (P < ۰/۰۱).

همچنین بر پایه نتایج در ۶/۸۷% (n=۳۱) از نمونه ها میزان بیان miR-221 بیشتر از بافت سالم مجاور آن بود. سطوح بیان miR-221 در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن در ۳۲ نمونه بیمار در تصویر ۲ نشان داده شده



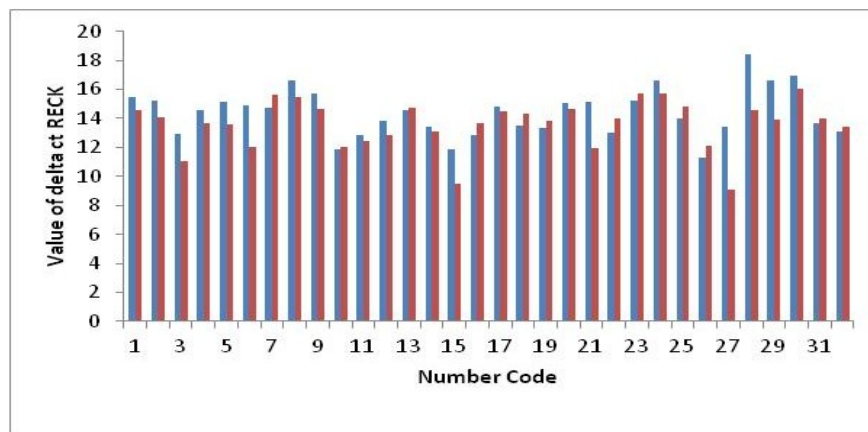
تصویر ۲: مقادیر ΔCt برای miR-221 در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن. حدود این مقادیر برای بافت سرطانی از ۱,۶۷ تا ۹,۸۱ بوده است در حالیکه برای بافت سالم از ۷,۱۶ تا ۱۲,۴۰ بوده است. خطوط سیاه سطوح بیان miR-221 را در بافت سرطانی و خطوط روشن سطوح بیان miR-221 را در بافت سالم نشان می دهند. Number code نشان دهنده شماره بیماران است.

سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور آن است (تصویر ۳). آنالیز paired t-test نیز نشان داد که تفاوت سطح بیان RECK در دو بافت سالم و سرطانی دارای تفاوت معنی

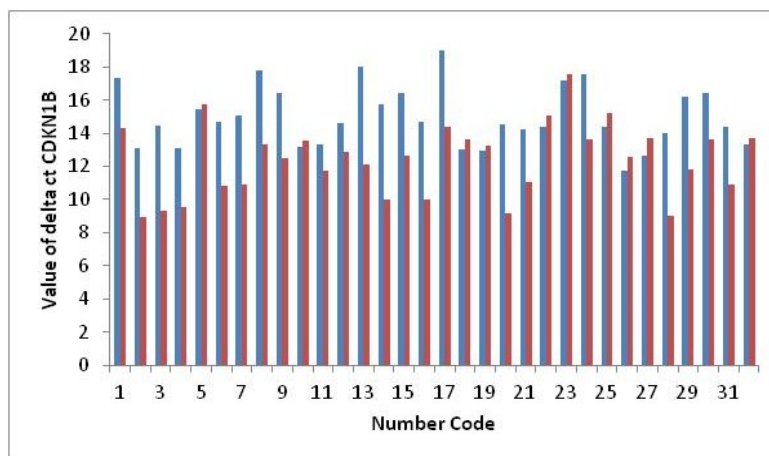
میانگین بیان RECK در بافت سالم ۱۳/۶۱ و در بافت سرطانی ۱۴/۴۰ بود. متوسط ۰/۷۹ folding change به دست آمد که نشان دهنده کاهش بیان RECK در بافت

بافت سالم مجاور است ( تصویر ۴). آنالیز *t*-paired *test* نیز نشان داد که تفاوت سطح بیان CDKN1B در دو بافت سالم و سرطانی دارای تفاوت معنی دار می باشد (P=۰/۰۱۲).

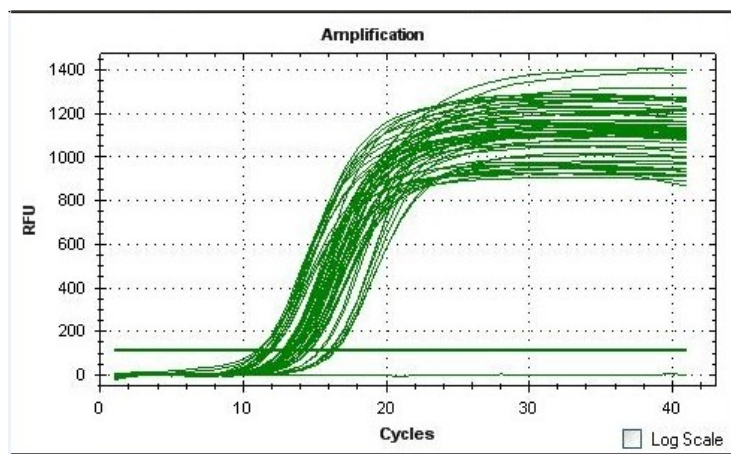
دار می باشد (P=۰/۰۱۲). میانگین بیان CDKN1B در بافت سالم ۱۲/۳۹ و دریافت سرطانی ۱۴/۴۸ بود. متوسط *folding change*، ۲/۸۵ برابر به دست آمد که نشان دهنده کاهش بیان CDKN1B دریافت سرطانی نسبت به



تصویر ۳. مقادیر  $\Delta Ct$  برای RECK در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن. خطوط قرمز سطوح بیان RECK را در بافت سرطانی و خطوط آبی سطوح بیان RECK را در بافت سالم نشان می دهند. Number code نشان دهنده شماره بیماران است.



تصویر ۴. مقادیر  $\Delta Ct$  برای CDKN1B در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن. خطوط قرمز سطوح بیان CDKN1B را در بافت سرطانی و خطوط آبی سطوح بیان CDKN1B را در بافت سالم نشان می دهند. Number code نشان دهنده شماره بیماران است. همچنین نمودار تکثیر miR-21 در نمونه های مورد مطالعه در تصویر ۵ نشان داده شده است.



Cycle of threshold (CT)

تصویر ۵: نمودار تکثیر **miR-21** در نمونه توموری: محور افقی تعداد سیکل ها و محور عمودی میزان فلورسانت نسبی را نشان می دهد.

درمانی برای آن ها کارایی چندانی ندارد این امر باعث شده تا میزان بقای ۵ ساله در ایران (۲/۸٪) در مقایسه با متوسط جهانی (۲۵-۴۰٪) کمتر باشد (۴۰۵). بنابراین استفاده از روش های تشخیصی جدید برای تشخیص زود هنگام سرطان معده دارای اهمیت بسیار می باشد. در سال های اخیر، با توجه به پیشرفتهای چشمگیر در زمینه علوم ملکولی و یافتن تست ها و تکنیک های ساده و کم هزینه ای از قبیل *PCR*، محققان به دنبال یافتن بیومارکرهای ملکولی بوده اند که با بررسی آن ها بتوان در زمان کمتر و بر پایه آزمون های حساس تر و اختصاصی تر، احتمال ابتلا به سرطان معده را مشخص نمود.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان *miR-21* در نمونه های سرطانی نسبت به نمونه های طبیعی بیشتر است ( $P=0/03$ ). لذا این بررسی *miR-21* را به عنوان یک بیومارکر احتمالی تشخیصی در سرطان معده معرفی نمود. در ارتباط با این یافته، در یک مطالعه که توسط ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد نشان داد که بیان *miR-21* در بافت تومور معده افزایش می یابد و با ناک داون کردن (*Knock*

مقادیر  $\Delta CT$  برای *miR* و *RECK* به وسیله آزمون *spearman Rank Test* در بافت سالم و بافت سرطانی مقایسه شد. نتایج نشان داد که ارتباط معنی داری بین افزایش بیان *miR-21* و کاهش بیان *RECK* وجود دارد ( $r=-0/42$  و  $p=0/01$ ).

همچنین مقادیر  $\Delta CT$  برای *miR-221* و *CDKN1B* با آزمون *spearman Rank test* در بافت سالم و بافت سرطانی مقایسه شد. بر پایه نتایج بین افزایش بیان *miR-221* و کاهش بیان *CDKN1B* ارتباط معنی داری مشاهده شد ( $r=-0/46$  و  $p=0/008$ ).

### بحث

در سالهای اخیر ارتباط بین بیان *miRNA* و ژن های هدف آنها در سرطان معده مورد توجه قرار گرفته است (۲۰۱۹ و ۱۴). قدرت تشخیص زود هنگام سرطان معده توسط تکنیک های رایج پایین است و بنابراین روش کارآمدی به حساب نمی آیند. از آنجا که مبتلایان به سرطان معده، در مراحل پیشرفته شناسایی می شوند، گزینه های

*miR-21* (down) کاهش قابل توجه در تکثیر، مهاجرت، هجوم سلول سرطانی و افزایش در آپوپتوز مشاهده می شود. آنها نتیجه گرفتند که عفونت هلیکو باکتر پیلوری با افزایش بیان *miR-21* و با اثر بر تومور ساپرسور *REC* باعث گسترش سرطان می شود (۱۵).

علیرغم گزارشاتی مبنی بر وجود ارتباط معنی دار بین بیان *miR-21* و مشخصات کلینیکی بیمار، نتایج متفاوتی در این مورد منتشر شده است. در اکثر آنها بر نقش انکوژنی *miR-21* تاکید شده است. برای مثال در مطالعه ای که بر روی نمونه های ۳۷ بیمار توسط چان و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مورد بیان *miR-21* در سرطان کارسینوما می معده انجام شد، بیان ژن در ۹۲٪ از بیماران مشاهده شد و بین بیان *miR-21* و مشخصات کلینیکی رابطه معنی داری مشاهده نشد (۲۰). در مطالعه دیگری که توسط ژنگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد، گزارش شد که می توان از مقدار بیان *miR-21* برای تشخیص سلولهای توموری در جریان خون (CTCs) استفاده کرد. در این مطالعه بر خلاف مطالعه چان و همکاران مشخص شد که مقدار بیان *miR-21* با مرحله بیماری، متاستاز گره های لنفی و اندازه تومور ارتباط وجود دارد (۲۱). در مطالعه حاضر بین مرحله بیماری و نیز سن و جنسیت نمونه های مورد مطالعه و بیان *miR-21* ارتباطی دیده نشد که می تواند به دلیل محدودیت حجم نمونه باشد.

در رابطه با تفاوت میزان بیان *miR-221*، مطالعه حاضر نشان داد که بیان *miR-221* در نمونه های سرطانی نسبت به نمونه های طبیعی، افزایش قابل توجه و معنی داری را دارد ( $P=0/012$ ). در این رابطه، مطالعه ای که توسط *liu* و همکاران انجام شد نشان داد که این *miRNA* در بافت توموری در مقایسه با بافت طبیعی بیان بیشتری دارد و با متاستاز گره های لنفی و تهاجم موضعی مرتبط است (۲۲). این یافته نشان می دهد که از این بیومارکر می توان به عنوان فاکتور پیشرفت بیماری و نیز تشخیص استفاده نمود. در

مطالعه *Chun-zhi* و همکاران در سال ۲۰۱۰ نتیجه گیری شده است که *miR-221*، *miRNA-222* از طریق تنظیم تومور ساپرسور *PTEN* باعث تنظیم تکثیر سلولی و *radiosensitivity* در رده سلولی سرطانی معده می شوند (۲۳).

*RECK* و *CDKN1B* از فاکتورهای تنظیمی هستند که بطور ژنتیکی یا اپی ژنتیکی در تومور زایی سرطان معده تغییر می کند (۱۱). در این مطالعه ما یک تغییر بالقوه را در بیان *RECK* و *CDKN1B* مشاهده کردیم. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان این دو ژن در بافت سرطانی کاهش می یابد و با بیان *miR-21* و *miR-221* رابطه معکوس دارد. این موضوع مطابق با شواهد موجود در زمینه عملکرد این دو ژن به عنوان مهار کننده های بالقوه پیشرفت تومور می باشد. هرچند در مطالعه ما ۱۳ نمونه بافت سرطانی در مورد *RECK* و ۱۶ نمونه سرطانی در مورد *CDKN1B* کاهش بیان را نشان ندادند. یک دلیل بالقوه برای این مسئله این است که این دو ژن در پیشرفت تومور نقش دارند و نمونه های ما از بیمارانی به دست آمده بود که در مرحله یک و دو سرطان معده یعنی در شروع تومور زایی بودند. بر پایه شواهد موجود، این دو ژن در شروع تومور زایی نقش کمتری دارند، اما در فرآیند پیشرفت تومور نقش مهم تری ایفا می کنند (۲۴ و ۹).

### نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که در سرطان معده، بیان *miR-21* و *miR-221* افزایش می یابد. همچنین بین افزایش *miR-21* و کاهش بیان *RECK* و نیز افزایش بیان *miR-221* و کاهش بیان *CDKN1B* رابطه معنی دار وجود دارد. *miR-21* و *miR-221* می توانند به عنوان بیومارکر در سرطان معده مورد استفاده قرار گیرند. همچنین بر پایه این نتایج به نظر می رسد مهار این دو *microRNA*

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع دکترا می باشد و هزینه آن توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان تامین شده است.

و برهم کنش بین miR-21, REC و miR-221 در درمان سرطان معده مفید باشد. DKN<sub>1</sub>B

## References

1. Society AC. Cancer facts & figures: The Society; 2008.
2. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Arch Iran Med 2009;12:576-83.
3. Mehrabian A, Esna-Ashari F, Zham H, Hadizadeh M, Bohlooli M, Khayamzadeh M, et al. Gastric cancer prevalence, according to survival data in iran (national study-2007). Iran J Public Health. 2010;39:27-31.
4. Varadhachary G, Ajani J. Gastric cancer. Clin Adv Hematol Oncol 2005;3:118-24.
5. Movahedi M, Afsharfard A, Moradi A, Nasermoaddeli A, Khoshnevis J, Fattahi F, et al. Survival rate of gastric cancer in Iran. J Res Med Sc 2009;14:367-73.
6. Krutzfeldt J, Poy M, Stoffel M. Strategies to determine the biological function of microRNAs. Nat Genet 2006;38:S14-S9
7. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116:281-97.
8. Sun K, Wang W, Zeng J-j, Wu C-t, Lei S-t, Li G-x. MicroRNA-221 inhibits CDKN1C/p57 expression in human colorectal carcinoma. Acta pharmacologica Sinica 2011;32:375-84.
9. Center AJU, Mowla SJ. Co-Regulated Expression of TGF- $\beta$  Variants and miR-21 In Bladder Cancer. 2013.
10. Meng F, Henson R, Wehbe-Janeck H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology 2007;133:647-58.
11. Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, 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.
12. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'Oglio MF, Dip N, Passerotti CC, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. BMC Urology 2012;12:14.
13. Zeng Z, Wang J, Zhao L, Hu P, Zhang H, Tang X, et al. Potential Role of microRNA-21 in the Diagnosis of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. PLoS ONE. 2013;8:e73278.
14. Yao Y, Suo AL, Li ZF, Liu LY, Tian T, Ni L, et al. MicroRNA profiling of human gastric cancer. Mol Med Report 2009;2:963-70.
15. Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. Laboratory investigation 2008;88:1358-66.
16. Liu K, Li G, Fan C, Diao Y, Wu B, Li J. Increased Expression of MicroRNA-221 in gastric cancer and its clinical significance. The Journal of International Medical Research. 2012;40:467-74.

17. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin G, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2008;27:5651-61.
18. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method. Methods* 2001;25:402-8.
19. Liu, Chen Q, Lai R, Wu X, Wu X, Liu F, et al. Elevated expression of mature miR-21 and miR-155 in cancerous gastric tissues from Chinese patients with gastric cancer. *J Biomed Res* 2010;24:187-97.
20. Chan SH, Wu CW, Li AF, Chi CW, Lin WC. miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association. *Anticancer Res* 2008 ;28:907-11.
21. Zheng Y, Cui L, Sun W, Zhou H, Yuan X, Huo M, et al. MicroRNA-21 is a new marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Cancer Biomark* 2011;10:71-7.
22. Liu K, Li G, Fan C, Diao Y, Wu. B, Li J. Increased Expression of MicroRNA-221 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance. *The Journal of International Medical Research* 2012;40:467-74.
23. Chun-zhi Z, Lei H, An-ling Z, Yan-chao F, Xiao Y, Guang-xiu W, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC Cancer* 2010;10:367.
24. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, et al. Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *The EMBO journal* 2007;26:3699-708.