

## 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 کرمی<sup>۳</sup>، امیر مجلسی<sup>۴</sup>، نوشین شباب<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 آپلیکیشن‌های پزشکی، 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

sjam110@yahoo.com

### چکیده

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

**روش بررسی:** این مطالعه یک مطالعه موردی - شاهدی بود که بر روی تعداد ۳۲ نمونه از بافت سرطانی معده و بافت مجاور آن انجام شد. نمونه‌ها از بیماران مراجعه کننده به انتیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) در فاصله سال‌های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۱ جمع آوری گردید. RNA تام با استفاده از محلول ترایزول و بر اساس دستورالعمل شرکت استخراج شد. mRNA و cDNA برای آنچه در این مطالعه دو microRNA ساخته شد و سطوح بیان این ژن‌ها با PCR-TPCR آندازه گیری شد. ۱۸s rRNA و ۵s rRNA به عنوان کنترل paired t-test استفاده شد. برای تحلیل میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های سالم از آزمون استفاده گردید و برای تعیین ارتباط بین سطح بیان miR-21 و miR-221 و کاهش بیان RECK و کاهش بیان CDKN1B (Pearson) بکار گرفته شد.

**یافته‌ها:** در میزان بیان miR-221 و miR-21 به صورت معنی داری در بافت سرطانی معده مقایسه با بافت سالم مجاور افزایش مشاهده شد. در نمونه سرطانی میانگین بیان miR-21 برابر با  $4/18 \pm 1/07$  ( $P < 0.001$ ) و میانگین بیان miR-221 برابر با  $5/75 \pm 2/07$  ( $P < 0.001$ ) نتایج نشان داد که ارتباط معنی داری بین افزایش بیان miR-21 و کاهش بیان RECK وجود دارد ( $p = 0.008$ ) و  $r = -0.42$  ( $P = 0.046$ ) و همچنین افزایش بیان miR-221 و کاهش بیان CDKN1B وجود دارد ( $p = 0.001$ ) و  $r = -0.42$  ( $P = 0.001$ ).

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

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

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

**RECK** مهار کننده کلیدی چندین ما تریکس متألوپروتینازی باشد و مقادیر پایین آن اغلب با افزایش تهاجم پیش آگهی بد ارتباط دارد (۱۲). به علاوه مشخص شده است که مهار ۲۱- miR RECK از طریق کاهش بیان CDKN1B باعث تهاجم و حرکت سلولی می شود (۱۵). 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, 221) انتخاب شده است تا ارتباط سطوح بیان این microRNA و زن 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 زن 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 انتستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) در فاصله سالهای ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۱ جمع آوری گردیده بود. این نمونه ها از بیمارانی به دست امده بود که در ایستیتو کانسر ایران تحت عمل جراحی

### 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 محایایان 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 ۵۰-۲۵٪ و در ایران به دلیل تأخیر در تشخیص به موقع ۱۲/۸٪ می باشد (۴). برای بیمارانی که در مراحل ابتدایی سرطان معده قرار دارند، مؤثر ترین درمان برداشتمن کامل معده است که البته این کار در بیماران در مراحل پیشرفتی بیماری، با میزان بقاء کمتری همراه است، لذا تشخیص در مراحل ابتدایی سرطان معده اهمیت بسیار دارد. RNA های غیر کد کننده با طول ۱۹-۲۴ نوکلئوتید هستند که بیان mRNA های هدف را تنظیم می کنند. این ملکول ها در مراحل زیستی مهمی مانند تمايز سلولی مرگ و تکثیر سلولی دخالت دارد (۶). 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 21- miR در انواع تومورها انجام شده است. نتایج این مطالعات نشان می دهد که 21 miR- تهاجم تو موری و تکثیر سلولی را در چندین سرطان تنظیم می کند (۱۵ و ۱۰ و ۹). بر اساس مطالعات در بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان معده با تنظیم تکثیر سلولی در پیشرفت تومور دخالت دارد (۱۶ و ۱۷). با وجود نقش شناخته شده این دو microRNA در سرطان معده، مسیر های مرتبط در سرطان زایی آنها نا شناخته است.

### 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 ۲۱ و ۲۲۱ miR در حجم  $20\text{ }\mu\text{l}$  شامل  $0.5\text{ }\mu\text{l F}\text{/}0.5\text{ }\mu\text{l sybr green Nuclease}\text{, }1\text{ }\mu\text{l cDNA}\text{, }1\text{ }\mu\text{l Primery R}\text{, }1\text{ }\mu\text{l Primery F}\text{Ree}$  در دماهای زیر انجام شد.  $45^{\circ}\text{C}$  denaturation برای ۵ دقیقه،  $95^{\circ}\text{C}$  denaturation 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 rRNA ۵S 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  $20\text{ }\mu\text{l}$  شامل  $1\text{ }\mu\text{l nuclease free water}\text{, }1\text{ }\mu\text{l sybr green}\text{, }1\text{ }\mu\text{l cDNA}\text{, }1\text{ }\mu\text{l F}\text{, }1\text{ }\mu\text{l R}$  و براساس پروتکل شرکت انجام شد. برای ژن RECK پرایمرها شد و پرایمرهای F و R برای ژن CDKN1B ترتیب شد. ترتیب پرایمرها:

RECK: ۳' CTGGATACTATTGCTAAGGT  
CDKN1B: ۳' TCTTCTCTGCTTCTTATTGC  
CDKN1B: ۳' GCAACCGACGATTCTTCTACT  
CDKN1B: ۳' CCATTCCATGAAGTCAGCGATAT

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

برداشت 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 ایستیتو کانسر این مطالعه را تایید کرده است.

### استخراج RNA

Tam با استفاده از محلول تراپیزول (TrizoI RNA ( invitrogen carlsbad USA) و بر اساس دستورالعمل شرکت استخراج شد. خلوص و غلظت RNA با استفاده از Nanodrop Spectrophotometr (Bio-TeK-USA آگارز الکتروفورز ۱٪ RNA در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  تا مرحله سنتز cDNA نگهداری شدند.

### cDNA سنتز

برای cDNA microRNA با استفاده از کیت شرکت pars genom (Iran) ساخته شد. دستور العمل این شرکت شامل دو مرحله است. مرحله اول شامل اضافه کردن polyA و مرحله دوم Reverse transcription می باشد. واکنش مرحله اول در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ 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.

برای mRNA cDNA با استفاده کیت شرکت فرمتاز (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 انداز گیری شد. تمام cDNA ها در دمای  $80^{\circ}\text{C}$ -نگهداری شدند.

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

18s rRNA	RECK	CDKN1B	خصوصیات
X03205	NMO21111	NM_004064	NCBI accession number
GTAACCCGTTGAACCCCATT	CTGGATACTATTGCTAAGGT	GCAACCGACGATTCTTCTACT	پرایمر F
۲۰	۲۰	۲۱	طول پرایمر
۱۰ پیکو مول	۱۰ پیکو مول	۱۰ پیکو مول	مقدار مورد استفاده
CCATCCAATCGGTAGTAGCG	TCTTCTCTGCTTCTTTATTGC	CCATTCCATGAAGTCAGCGAT	پرایمر R
۲۰	۲۱	۲۳	طول پرایمر
۱۰ پیکو مول	۱۰ پیکو مول	۱۰ پیکو مول	مقدار مورد استفاده
۱۵۲	۲۰۵	۲۴۶	طول محصول PCR
۰°C۵۳/۵	۰°C۴۸/۸	۰°C۵۵	دماهی Annealing

ییان miR-21، miR-21 و RECK و spearman Rank Test از آزمون CDKN1B استفاده شد.

ΔCt سیکلی از واکنش تعريف شده که سیگنال فلور سانس از ThreShold عبور می کند و تفاوت Ct بین ژن مورد نظر و ژن رفرانس بعنوان ΔCt تعريف شد و ΔΔ Ct تفاوت ΔCt بین نمونه های سرطانی و سالم است. ΔΔ Ct 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.

آنالیز های آماری جهت آنالیز آماری و انتخاب آزمون مناسب جهت تجزیه و تحلیل داده ها نیاز است ابتدا متغیر های 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-221 و miR-21 آزمون ضریب همبستگی پیرسون (Pearson) به کار گرفته شد. برای تعیین ارتباط بین سطح

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.

### یافته ها

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 PCR تنها یک محصول PCR است. در ضمن محصول PCR

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

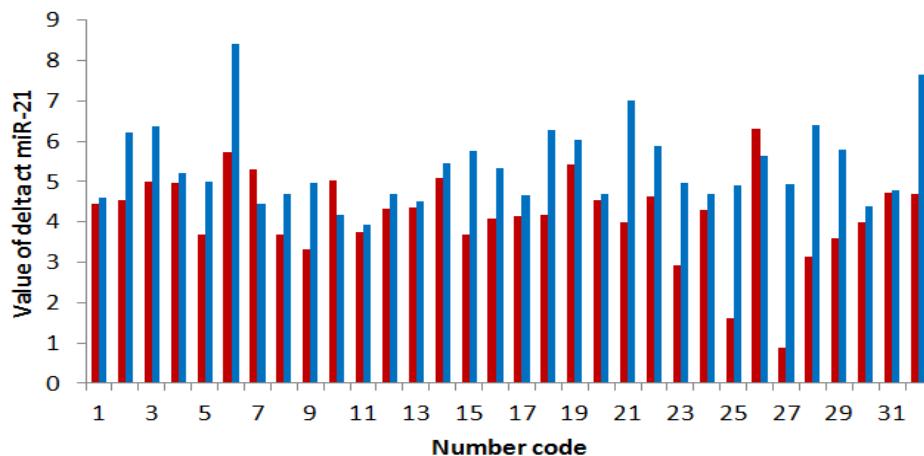
RECK	CDKN1B	miR221 (Fold change)	miR21 (Fold change)	تعداد(درصد)	
سن					
.۱۸±۰/۷۹	۲/۳۸±۲/۶۲	۸/۱۲±۱/۲۸	۱/۴۷±۱/۸۷	(۲۵)۸	کمتر از ۵۹ سال
۱/۱۱±۱/۴۸	۲/۶۵±۲/۳۰	۷/۳۷±۲/۷۶	۲/۷۰±۲/۷۲	(۷۵)۲۴	۵۹ سال و بیشتر
جنس					
.۶۲±۱/۴۲	۲/۶۷±۲/۳۳	۷/۷۹۴±۱/۷۷	۲/۳۷±۲/۵۵	(۸۱)۲۶	مرد
۱/۵۲±۱/۴۴	۲/۲۲±۲/۶۱	۵/۸۹±۴/۲۷	۲/۴۹±۲/۵۶	(۱۹)۶	زن
مرحله تومور					
.۹۹±۱/۹۰	۲/۱۷±۲/۵۶	۷/۷۷±۲/۱۲	۲/۹۴±۲/۸۹	(۳۱)۱۰	مرحله ۱
.۶۹±۱/۲۲	۲/۷۷±۲/۲۸	۷/۴۶±۲/۶۶	۲/۱۴±۲/۴۳	(۶۹)۲۲	مرحله ۲
اندازه تومور					
.۶۰±۱/۲۸	۲/۰.۳±۲/۵۳	۷/۲۷±۳/۰۱	۲/۳۰±۲/۵۲	(۱۹)۶	۵ سانتی متر و کمتر
.۸۶±۱/۵۲	۲/۸۰±۲/۲۹	۷/۶۷±۲/۴۰	۲/۴۳±۲/۶۴	(۸۱)۲۶	بیشتر از ۵ سانتی متر

شامل سن ( $P < 0.05$ ، جنسیت ( $P < 0.05$ ) ارتباط معنی داری وجود نداشت. همچنین با استفاده از ازمون 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.

miR-21 در ( $n=۲۹$ ) ۹۰/۶۲٪ 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 ( $P = 0.59$ ) دربرابر بود، جنس، مرحله TNM و یا اندازه تومور (۵ سانتی متر در مقابل ۵ کسانتی متر) وجود نداشت. بر اساس آزمون Independent t-test مشخص شد که بین بیان چهار ژن مورد بررسی و مشخصات دموگرافیکی

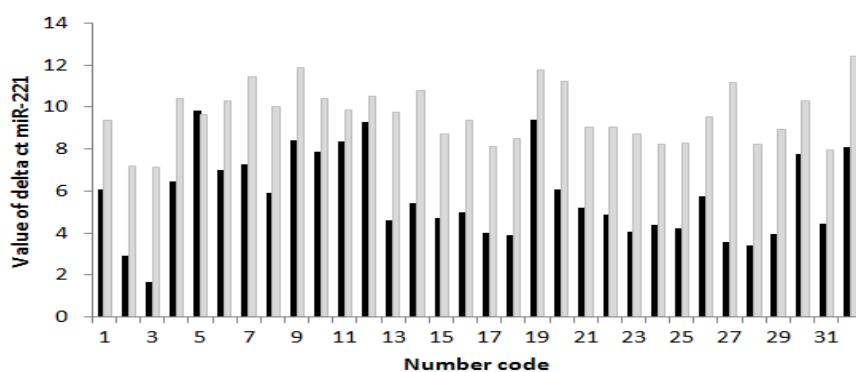
± انحراف معیار برابر  $1/07 \pm 0/18$  بود، در حالیکه برای نمونه سالم برابر  $1/01 \pm 0/28$  به دست آمد ( $P < 0/01$ ).



تصویر ۱: مقادیر  $\Delta Ct$  برای miR-21 در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن. حدود این مقادیر برای بافت سرطانی از ۸۸ تا ۶۳ بوده است در حالیکه برای بافت سالم از ۳۹ تا ۸۴ بوده است. خطوط قرمز سطوح بیان miR-21 را در بافت سرطانی و خطوط آبی سطوح بیان miR-21 را در بافت سالم نشان می‌دهند. Number code نشان دهنده شماره بیماران است.

است. در نمونه سرطانی میانگین  $\pm$  انحراف معیار برابر با  $5/75 \pm 2/07$  بود، در حالیکه برای نمونه سالم برابر است با  $1/35 \pm 0/63$  به دست آمد ( $P < 0/01$ ).

همچنین بر پایه نتایج در ( $n=31$ ) ۶۶٪ 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



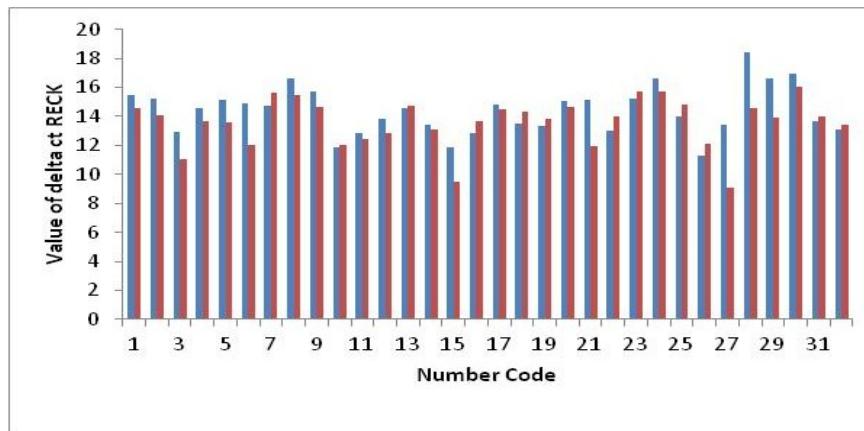
تصویر ۲: مقادیر  $\Delta Ct$  برای miR-221 در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن. حدود این مقادیر برای بافت سرطانی از ۹/۸۱ تا ۱۰/۶۷ بوده است در حالیکه برای بافت سالم از ۷/۱۶ تا ۱۲/۴۰ بوده است. خطوط سیاه سطوح بیان miR-221 را در بافت سرطانی و خطوط روشن سطوح بیان miR-221 را در بافت سالم نشان می‌دهند. Number 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

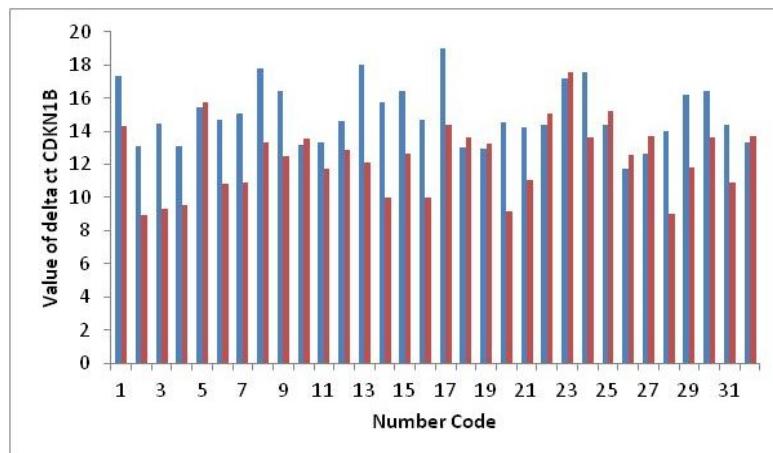
میانگین بیان RECK در بافت سالم ۱۳/۶۱ و در بافت سرطانی ۱۴/۴۰ بود. متوسط folding change  $0/79$  به دست آمد که نشان دهنده کاهش بیان RECK در بافت

*paired t-* آنالیز بافت سالم مجاور است (تصویر ۴). بافت سالم نیز نشان داد که تفاوت سطح بیان *CDKN1B* در دو بافت سالم و سرطانی دارای تفاوت معنی دار می باشد ( $P=0.12$ ).

دار می باشد ( $P=0.12$ ). میانگین بیان *CDKN1B* در بافت سالم  $12/39$  و دریافت سرطانی  $14/48$  بود. متوسط  $folding change$  برابر به دست آمد که نشان دهنده کاهش بیان *CDKN1B* دریافت سرطانی نسبت به

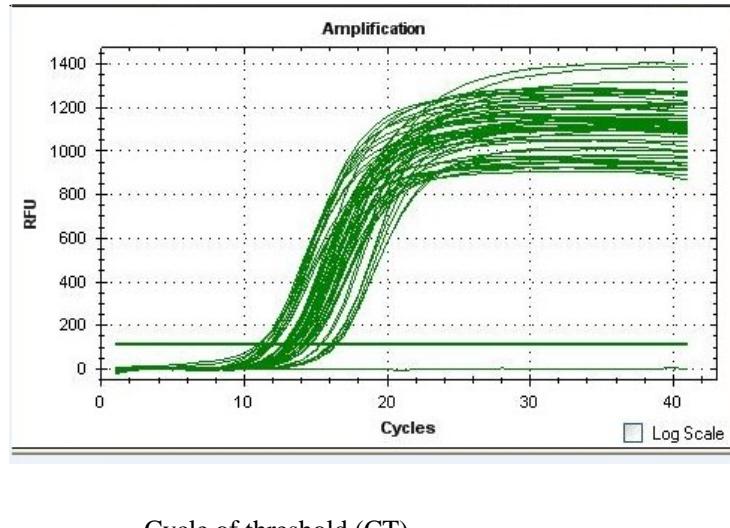


تصویر ۳. مقادیر  $\Delta Ct$  برای RECK در بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن. خطوط قرمز سطوح بیان RECK را در بافت سرطانی و خطوط آبی سطوح بیان RECK را در بافت سالم نشان می دهند. Number code نشان دهنده شماره بیماران است.



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 سیکل‌ها و محور عمودی میزان فلورسانس نسبی را نشان می‌دهد.

درمانی برای آن‌ها کارایی چندانی ندارد این امر باعث شده تا میزان بقای ۵ ساله در ایران (۲۸٪) در مقایسه با متوسط جهانی (۲۵٪) کمتر باشد (۵۰). بنابراین استفاده از روش‌های تشخیصی جدید برای تشخیص زودهنگام سرطان معده دارای اهمیت بسیار می‌باشد. در سال‌های اخیر، با توجه به پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه علوم ملکولی و یافتن تست‌ها و تکنیک‌های ساده و کم هزینه‌ای از قبیل PCR، محققان به دنبال یافتن بیومارکرهای ملکولی بوده‌اند که با بررسی آن‌ها بتوان در زمان کمتر و بر پایه آزمون‌های حساس‌تر و اختصاصی‌تر، احتمال ابتلا به سرطان معده را مشخص نمود.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان miR-21 در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های طبیعی بیشتر است (۳٪). لذا این بررسی miR-21 را به عنوان یک بیومارکر احتمالی تشخیصی در سرطان معده معرفی نمود. در ارتباط با این یافته، دریک مطالعه که توسط ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد نشان داد که بیان miR-21 در بافت تومور معده افزایش می‌یابد و با ناک داؤن کردن (Knock

مقادیر  $\Delta CT$  برای miR-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 ژن‌های هدف آنها در سرطان معده مورد توجه قرار گرفته است (۱۹ و ۲۰). قدرت تشخیص زودهنگام سرطان معده توسط تکنیک‌های رایج پایین است و بنابراین روش کارآمدی به حساب نمی‌آیند. از آنجا که مبتلایان به سرطان معده، در مراحل پیشرفت‌های شناسایی می‌شوند، گزینه‌های

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

CDKN<sub>1B</sub> و RECK از فاکتورهای تنظیمی هستند که طور ژنتیکی یا اپی ژنتیکی در تومور زایی سرطان معده تغییر می کند (۱۱). در این مطالعه ما یک تغییر بالقوه را در *miR-221* و *miR-21* با بیان *CDKN<sub>1B</sub>* مشاهده کردیم. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان این دو ژن در بافت سرطانی کاهش *CDKN<sub>1B</sub>* و RECK را مشاهده کردیم. *miR-221* و *miR-21* رابطه معکوس می یابد و با بیان *CDKN<sub>1B</sub>* و RECK مطالعه نشان داد که 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 *CDKN<sub>1B</sub>* و RECK و ۱۶ نمونه سرطانی در مورد *CDKN<sub>1B</sub>* 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 (۹ و ۲۴).

### 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 *CDKN<sub>1B</sub>* رابطه معنی دار وجود دارد. *miR-21* و *miR-221* می توانند به عنوان یک مارکر در سرطان معده مورد استفاده قرار گیرند. همچنین بر پایه این نتایج به نظر می رسد مهار این دو *microRNA*

*miR-21* (down) کاهش قابل توجه در تکثیر، مهاجرت، هجوم سلول سرطانی و افزایش در آپوپتوز مشاهده می شود. آنها نتیجه گرفته اند که عفونت هلیکو باکتریلوری با افزایش *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 کارسینومای 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 برخلاف 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 ( $P=0.12$ ). 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 میدهد که از این بیومار کم می توان به عنوان فاکتور پیشرفت بیماری و نیز تشخیص استفاده نمود. در

**تشکر و قدردانی**

و برهم کنش بین miR-21, REC و miR-221

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

DKN<sub>1</sub>B در درمان سرطان معده مفید باشد.**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, Nasrmoaddeli 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-β Variants and miR-21 In Bladder Cancer. 2013.
10. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek 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’Oglia 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.