فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۹ ص. ۴۹-۵۷

مقاله پژوهشی

بررسی میزان بیان miR-21 در ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات

علیرضا اماموبردی‌زاده[۱]، مهرداد هاشمی[۲]*، فرانک جمشیدیان[۳]

[۱] گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۳] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق (قیامدشت)، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۱

چکیده

سرطان پروستات شایع ترین سرطان در مردان است و درصد مرگ و میر قابل توجهی را به خود اختصاص داده است. در این سرطان، تشخیص بیشتر متکی بر روش‌های تهاجمی مانند نمونه برداری از بافت (بیوپسی) می باشد و به علت درد و آسیبی که وارد می کند اکثر بیماران تا مراحل پیشرفته تمایلی به انجام آن ندارند. همچنین روش های آزمایشگاهی دیگر، مانند اندازه‌گیری سطح آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) در خون، از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار نیستند. دسته ای از بیومارکرهای تشخیصی، microRNA ها هستند که می توان از آن ها در تشخیص انواعی از بیماری‌ها به خصوص سرطان‌ها استفاده کرد. microRNA ها گروهی از RNA های تک رشته ای کوچک غیر کد شونده هستند که ۲۳-۲۱ نوکلئوتید طول دارند و در فرآیندهای زیستی مانند تمایز، تکثیر و سرطان نقش دارند. در صورت ردیابی این بیومارکرهای تشخیصی در نمونه‌های بیولوژیکی بیماران مبتلا به سرطان پروستات، می توان امیدوار بود که تشخیص سریع، آسان، با حساسیت و اختصاصیت بالا این سرطان صورت گیرد و با تشخیص زود هنگام قبل از تهاجم، طول عمر بیماران را افزایش دهد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات سطح بیان miR-21 در ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات (متاستاتیک و غیر متاستاتیک) و افراد سالم است. این پژوهش روی ۷۰ نمونه ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات (۳۲ نفر متاستاتیک و ۳۸ نفر غیر متاستاتیک) و ۳۰ نمونه ادرار افراد سالم که نتیجه بیوپسی آن ها منفی بود (گروه کنترل)، انجام شد. پس از استخراج RNA با استفاده از ترایزول، سنتز cDNA صورت گرفت و سپس تغییرات سطح بیان miR-21 در ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات و افراد سالم به روش Real-time PCR بررسی شد. آنالیز نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار REST 2009 انجام شد. یافته‌ها حضور miR-21 را در ادرار بیماران مبتلا به سرطان پروستات نشان داد و در نتایج حاصل، miR-21 افزایش بیان معنی‌داری (P=0.003) را نسبت به افراد سالم نشان داد. miR-21 در گروه متاستاتیک (P=0.042) میزان بیان بیشتری نسبت به گروه غیر متاستاتیک (P=0.036) در مقایسه با افراد سالم داشت. با توجه به بررسی نتایج مطالعه‌ی حاضر، miR-21 در افراد مبتلا به سرطان پروستات نسبت به افراد سالم دارای افزایش بیان معنی داری بود که می‌توان برای تشخیص افراد مبتلا به سرطان پروستات و حتی تفکیک متاستاتیک و غیر متاستاتیک از این بیومارکر استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: سرطان پروستات، ادرار، بیومارکر، miR-21.

مقدمه

سرطان پروستات شایع ترین سرطانی است که مردان به آن مبتلا می‌شوند و این سرطان معمولا در مردان بالای ۵۰ سال اتفاق می‌افتد [۱]. مردان در طول زندگی ۱۰% خطر ابتلا به این بیماری را داشته و حدود ۳% احتمال دارد در اثر این بیماری فوت کنند [۲]. علایم اصلی آن عبارت اند از: ادرار کردن مکرر، جریان منقطع و ضعیف ادرار، بی‌اختیاری ادراری، وجود خون در ادرار، خروج منی با درد، درد مداوم در پایین کمر و ناتوانی جنسی [۳]. در حال حاضر بیشتر از روش‌های آزمایش اندازه‌گیری میزان آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) در خون، معاینه انگشتی رکتوم (DRE) و بیوپسی برای تشخیص سرطان پروستات استفاده می‌شود. آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) گلیکوپروتئینی است که هم در سلول‌های اپیتلیال سرطانی و هم سالم تولید می‌شود و به تجزیه شدن کلاژن در مایع منی و در نتیجه از حالت لخته درآمدن آن کمک می‌کند ولی در حالتی که پروستات مشکل داشته باشد مقدار بیشتری به جریان خون نشت می‌کند که میزان آن به طور معمول تا ۴ng/ml در نظر گرفته می‌شود. آزمایش PSA برای تشخیص سرطان پروستات حساسیت و اختصاصیت زیادی ندارد و ممکن است در بیماری‌های دیگر پروستات مانند التهاب پروستات (پروستاتیت) و هایپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH) نیز میزان PSA خون بالا رود و حتی در صورت ابتلا به سرطان پروستات ممکن است مقدار آن طبیعی باشد [۱, ۴]. تست معاینه انگشتی رکتوم (DRE) تغییرات شکل و اندازه پروستات را نشان می‌دهد که این تست خیلی دقیق نیست و از حساسیت کمی برخوردار است [۵]. اگر نتایج PSA و DRE طبیعی نباشد برای تایید سرطان پروستات بیوپسی انجام می‌شود و روش گلد استاندارد برای تشخیص سرطان پروستات است که یک روش کاملا تهاجمی، پر هزینه و دارای درد و رنج فراوان است [۶, ۷]. یکی از موثرترین عوامل که در افزایش طول عمر بیمار، بهبود روند درمان و کاهش هزینه‌های مالی و روانی بیمار نقش به سزایی دارد، تشخیص سریع و زودهنگام سرطان است. به همین دلیل همواره محققان به دنبال روش‌های سریع، آسان و غیرتهاجمی برای تشخیص سرطان‌ها هستند. با توجه به تلاش های انجام شده محققان بیومارکرهای متعددی را برای تشخیص و ردیابی سرطان شناسایی کرده اند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به microRNA ها اشاره کرد.

microRNA ها گروهی از RNA های تک رشته ای کوچک غیر کد شونده هستند که ۲۳-۲۱ نوکلئوتید طول دارند و در تنظیم بیان پس از رونویسی تقریبا ۶۰% ژن‌های انسان نقش دارند. همچنین آن‌ها در تنظیم فرآیندهای مختلف از جمله تکثیر، آپوپتوز، تکوین و تمایز نقش دارند و در سرطان‌های مختلف افزایش و کاهش بیان نشان می‌دهند و بدین صورت می‌توانند به عنوان بیومارکر در پیش آگهی و تشخیص انواع بیماری‌ها و سرطان ها در نمونه هایی مانند خون، ادرار و بافت به کار روند (۸). همچنین آن‌ها در گیاهان، جانوران، آغازیان و ویروس ها یافت می شوند ولی در باکتری ها وجود ندارند (۹). microRNA ها می‌توانند به طور مستقیم انکوژن ها و تومورساپرسورژن ها را تنظیم کنند، بنابراین بر اساس نوع کارکرد mRNA هدف خود، می توانند نقش انکوژنی یا تومورساپرسورژنی داشته باشند. برای مثال microRNA هایی که با هدف قرار دادن و سرکوب mRNA مربوط به تومورساپرسورژن ها و ژن هایی که آپوپتوز یا تمایز سلولی را کنترل کرده و سبب ایجاد و پیشرفت سرطان می‌شوند به عنوان انکوژن در نظر گرفته می‌شوند. امروزه به این نوع microRNA ها، انکومیر اطلاق می‌شود. به همین ترتیب microRNA هایی که باعث سرکوب mRNA مربوط به انکوژن‌ها، ژن‌های مربوط به تکثیر سلولی و یا ژن‌های مربوط به کنترل آپوپتوز می‌شوند تومورساپرسور microRNA ها نامیده می‌شوند و از پیشرفت سلول به سمت سرطانی شدن جلوگیری می‌کنند. علاوه بر این microRNA ها با تاثیر مستقیم بر دیگر ژن ها می وانند به طور غیر مستقیم بیان انکوژن‌ها و تومورساپرسورژن‌ها را تحت تاثیر قرار دهند(۱۰). شواهد اولیه از ارتباط microRNA ها با سرطان در سال ۲۰۰۲ توسط Calin ارائه شد. وی نشان داد در بسیاری از مبتلایان به لوسمی لنفوئیدی مزمن (CLL) حذف قطعه ای از ژنوم شامل خوشه ژنی مربوط به miR-15a و miR-16 دیده می‌شود (۱۱). همچنین پروفایل بیان

microRNA هایی که در سرطان پروستات نقش دارند اولین بار در سال ۲۰۰۷ منتشر شد [۱۲].

miR-21 یکی از microRNA هایی است که در سرطان پروستات نقش زیادی ایفا می کند. این microRNA می تواند بیان تومور ساپرسور ژن *PTEN* را مهار کند و باعث افزایش تکثیر سلول های سرطانی و باعث تهاجمی شدن شود [۱۳]. همچنین این microRNA جز انکومیرها طبقه بندی می شود و مهم ترین mRNA های هدف آن *PDCD4*, *TPM1*, *TIMP3*, *MARCK* و *PTEN* می باشد [۱۴, ۱۵]. این microRNA درمتاستاز دادن به استخوان درمراحل پیشرفته سرطان پروستات نقش به سزایی دارد [۱۶]. miR-21 روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد [۱۷].

هدف از این مطالعه بررسی میزان تغییرات سطح بیان miR-21 در ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات نسبت به افراد سالم و در نهایت تفکیک افراد مبتلا به سرطان پروستات از افراد سالم و همچنین تفکیک گروه متاستاتیک از غیر متاستاتیک با استفاده از این microRNA است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

نمونه‌های ادرار از بیماران مشکوک به سرطان پروستات که برای بیوپسی به بیمارستان هاشمی نژاد تهران مراجعه کردند، در فاصله زمانی اردیبهشت تا اسفند سال ۱۳۹۶ جمع آوری شدند. قبل از انجام بیوپسی با رضایت کامل بیماران و با تکمیل پرسشنامه، نمونه ادرار به حجم ۱۵ میلی لیتر در لوله فالکون از بیماران گرفته و با رعایت زنجیره ی سرد در دمای ۴ درجه سانتی گراد و حداکثر ظرف مدت ۳ ساعت به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی تهران منتقل شدند. نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه ی هر بیمار داخل کرایوتیوب ریخته و مشخصات آن ها ثبت گردید. نمونه ها تا تکمیل جمع آوری، در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. بر اساس نتایج پاتولوژی ۷۰ نمونه ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات (۳۲ متاستاتیک و ۳۸ غیر متاستاتیک) و ۳۰ نمونه ادرار افراد سالم که نتیجه بیوپسی آن ها منفی بود، وارد مطالعه گردید.

استخراج RNA از نمونه های ادرار

اولین مرحله در اکثر بررسی‌های مولکولی دسترسی به ماده ژنتیکی است که در این مطالعه ماده ژنتیکی مورد نظر RNA است. روش‌های مختلفی برای استخراج RNA وجود دارد که همه‌ی آن‌ها از اصول یکسانی تبعیت می‌کنند. استخراج RNA نمونه‌های ادرار با استفاده از ۵۰۰ μl Trizol (Invitrogen, USA) روی ۲ml از هر یک از نمونه‌های ادرار با استفاده از پروتکل مربوطه انجام شد. با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo scientific, USA) کمیت RNA های استخراج شده بر اساس ng/μl و کیفیت آن ها بر اساس نسب جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. RNAهای استخراج شده تا سنتز cDNA در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سنتز cDNA از RNA های استخراج شده

سنتز cDNA توسط کیت (PARSGENOME, PARSGENOME MiR-Amp Kit Iran) طبق پروتکل کیت مربوطه از RNA های استخراج شده انجام شد و تا زمان انجام Real-time PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند.

Real-time PCR

در این پژوهش به‌منظور تکثیر و ارزیابی کمی بیان miR-21 واکنش Real-time PCR به روش سایبرگرین با استفاده از SYBR Green Master mix (Takara, Japan) طبق پروتکل و شرایط دمایی و زمانی مشخص انجام شد. دقت، حساسیت بالا و هزینه کمتر دلیل انتخاب این روش برای بررسی بود. پرایمرهای Forward و Reverse برای miR-21 به ترتیب 5′-GTGCAGGGTCCGAGGT-3′ و 5′-GCCGCTAGCTTATCAGACTGATGT-3′ طراحی شدند. واکنش در حجم ۱۴μl انجام شد که شامل۷μl SYBR Green Master mix Takara، ۱μl

پرایمر (۱۰pmol)، ۳μl cDNA رقیق شده به نسبت ۱ به ۴ و ۳μl آب دوبار تقطیر بود. Polymerase activation 95 ℃ - 12 min, Denaturation95 ℃ - 15 sec, Annealing60 ℃- 30 sec,Extension 72 ℃- 15sec و تعداد سیکل‌ها ۴۲ تنظیم شد. از U6-snRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای هر کدام از نمونه‌ها به صورت دو بار (دابل) PCR Real-time گذاشته شد. همچنین برای microRNA و U6-snRNA، یک کنترل منفی (NTC) گذاشته شد که فاقد رشته الگو (cDNA) جهت تکثیر است که در نتیجه هیچ نموداری رویت نشد. کارایی PCR با استفاده از منحنی استاندارد و سریال رقت‌ها ۱۰۷% محاسبه شد.

در نهایت برای اطمینان از انجام تکثیر و میزان اختصاصی بودن قطعات حاصل از الکتروفورز ژل آگارز ۲% استفاده شد.

آنالیزهای آماری داده‌ها

در این پژوهش تجزیه و تحلیل داده های حاصل از انجام Real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 و محاسبات آماری با استفاده از SPSS22 انجام گردید و P<0.05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اطلاعات بالینی بیماران مبتلا به سرطان پروستات و افراد سالم که نتیجه بیوپسی آن‌ها منفی بود، بر اساس نتایج پاتولوژی در جدول [۱] آورده شده است.

نتایج حاصل از بررسی های پاتولوژیکی نشان داد در بعضی موارد افراد مبتلا به سرطان پروستات دارای PSA نرمال بودند و همچنین افراد سالم نیز در بعضی موارد دارای PSA بالا بودند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده های miR-21 نشان داد که این microRNA در ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات نسبت به افراد سالم افزایش بیان معنی‌داری (P=0.003) دارد که مقدار بیان آن (Foldchange) برابر با ۳/۴۹۳ می‌باشد. همچنین میزان بیان miR-21 به طور مجزا در گروه افراد مبتلا به سرطان پروستات متاستاتیک و غیر متاستاتیک بررسی شد که میزان بیان بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان داد به نحوی که در گروه متاستاتیک افزایش بیان معنی‌دار (P=0.042) بیشتری را نسبت به گروه غیر متاستاتیک (P=0.036) نشان داد. میزان بیان miR-21 (Fold change) در گروه متاستاتیک برابر با ۳/۹۱۱ و در گروه غیر متاستاتیک ۳/۱۷۶ به دست آمد (شکل ۱).

میزان بیان miR-21 در افراد مبتلا به سرطان پروستات و افراد سالم به صورت جدابا استفاده از فرمول $2^{-\Delta ct}$ محاسبه و نمودار باکس پلات آن رسم شد (شکل ۲).

شکل (۳) منحنی تکثیر (Amplification Cycle) miR-21 و شکل (۴) منحنی ذوب (Melt Curve) miR-21 را نشان می‌دهد.

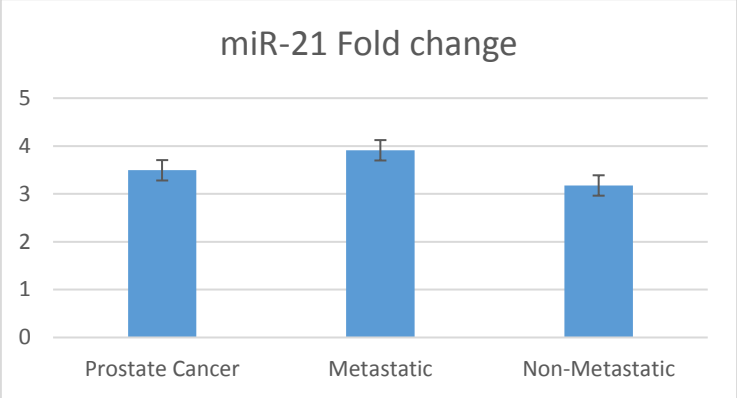
بحث

امروزه به علت تغییرات سبک زندگی و عادت های غذایی، مصرف الکل و دخانیات، گسترش پرتوهای الکترومغناطیسی، آلودگی محیط زیست و ... احتمال بروز سرطان افزایش پیدا کرده است به طوری که آمار ابتلا به سرطان سال به سال در حال افزایش است.

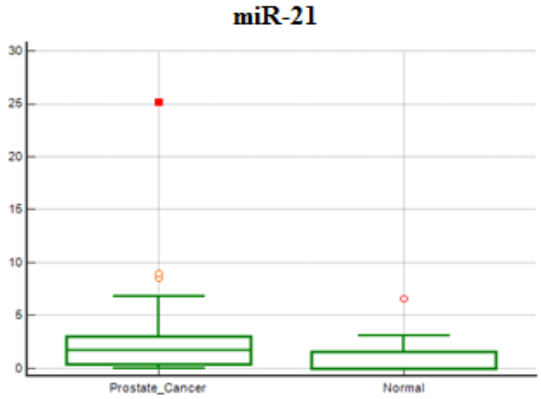
جدول ۱ - اطلاعات کلینیکی و پاتولوژی افراد مبتلا به سرطان پروستات و افراد سالم

	افراد مبتلا به سرطان پروستات	گروه متاستاتیک	گروه غیر متاستاتیک	افراد سالم (نتیجه بیوپسی منفی)
تعداد	۷۰	۳۲	۳۸	۳۰
میانگین سن (سال)± SEM Range	۶۹/۱±۸۳/۰۳۷ ۸۷-۴۵	۷۰/۱±۶۲/۶۸۰ ۸۷-۴۵	۶۹/۱±۱۶/۲۹۵ ۸۶-۴۸	۶۵/۱±۹۷/۳۲۴ ۸۴-۵۲
میانگینPSA سرم (ng/ml)± SEM	۱۸/۳±۰۳۰/۷۷۴	۳۱/۷±۳۹۴/۶۴۰	۶/۰±۷۷۶/۵۱۳	۷/۰±۰۸۳/۵۳۶

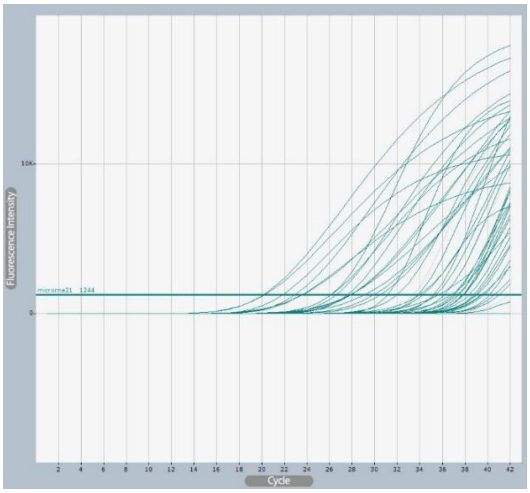
Range	۱۷۰-۱/۶	۴/۱۷۰-۷/۶	۲۱-۱	۱۳-۲/۲



شکل ۱. میزان بیان miR-21 در افراد مبتلا به سرطان پروستات، گروه متاستاتیک و غیر متاستاتیک. افراد مبتلا به سرطان پروستات نسبت به افراد سالم و همچنین گروه متاستاتیک نسبت به غیر متاستاتیک افزایش بیان معنی داری را نشان می دهند.

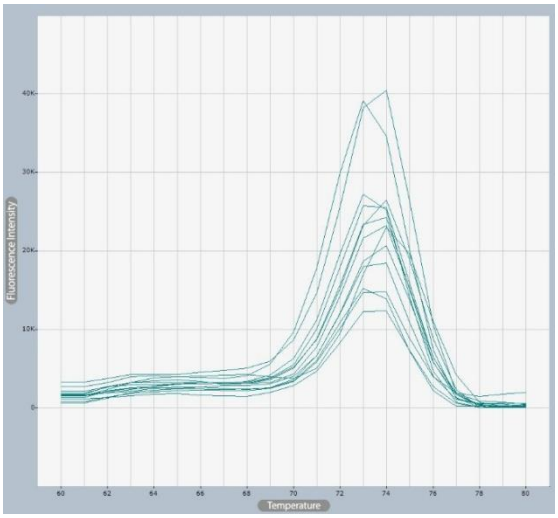


شکل ۲. نمودار باکس پلات. این نمودار میزان بیان miR-21 در ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات و افراد سالم را نشان می دهد.



شکل ۳. منحنی تکثیر (Amplification Cycle) miR-21. منحنی تکثیر شامل سه فاز Linear، Exponential و Plateau است. در Linear phase میزان تکثیر محصولات به قدری نیست که سبب افزایش نور فلوئورسنت گردد و به صورت خطی می‌باشد. در Exponential phase واکنش وارد یک فاز افزایشی می گردد که میزان محصول دو رشته ای در هر چرخه دو برابر می شود و خط نمودار رو به بالا در حرکت

است. در Plateau phase ترکیبات واکنش از بین می روند و دیگر محصولی تکثیر نمی‌شود، بنابراین میزان فلوئورسنت افزایشی ندارد و نمودار به صورت خطی می شود.



شکل۴. منحنی ذوب (Melt Curve) miR-21. منحنی ذوب بیان کننده ی باز شدن محصولات در دماهای واسرشته شدن می باشد که تمام نمودارها در Tm مشابه باز شدند و تک قله بودن نمودار حاکی از درست بودن آن و چسبیدن پرایمر به مکان صحیح می باشد.

سرطان‌ها از جمله سرطان پروستات اگر به موقع تشخیص داده شوند قابل درمان بوده و باعث افزایش طول عمر و کاهش هزینه‌های درمانی می‌شود. اغلب روش‌های تشخیصی تهاجمی بوده و یا از اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار نیستند. در تشخیص سرطان پروستات استفاده از روش تشخیصی نمونه برداری از بافت (بیوپسی) که گلد استاندارد روش های تشخیصی در سرطان است، کاملا تهاجمی بوده و به دلیل درد و آسیبی که به بیمار وارد می کند اکثر بیماران تا مراحل پیشرفته سرطان که دیگر قابل درمان نیست، تمایلی به انجام آن ندارند. روش تشخیصی اندازه گیری میزان آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) در خون نیز از اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار نیست زیرا در بیماری های دیگر مانند التهاب پروستات (پروستاتیت) و هایپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH) نیز میزان PSA بالا می رود و یا در صورت ابتلا به سرطان پروستات ممکن است مقدار آن طبیعی باشد. روش تشخیصی دیگر که معاینه انگشتی رکتوم (DRE) است خیلی دقیق نیست و فقط می‌توان به تغییر شکل و اندازه پروستات پی برد.

در سال های اخیر انواع زیادی از بیومارکرهای تشخیصی برای تشخیص سرطان با استفاده از نمونه‌های بیولوژیکی بیماران معرفی شد که این بیومارکرها اغلب از جنس پروتئین یا اسید نوکلئیک هستند اما به دلیل مشکلاتی از جمله اختصاصیت و حساسیت پایین، ناپایداری، هزینه‌های بالا و سایر مشکلات در روند بررسی آزمایشگاهی اغلب این بیومارکرها مورد استفاده قرار نگرفت و یا مورد تایید سازمان-های بهداشت جهانی قرار نگرفت.

microRNA ها به دلیل این که می‌توانند به صورت گردشی در خون و دیگر مایعات زیستی بدن به صورت پایدارتر و با نیمه عمر طولانی‌تر از پروتئین‌ها حضور پیدا کنند و بررسی پروفایل آن ها می تواند سرطان را از بیماری های دیگر متمایز کند امروزه بیشتر از بیومارکرهای پروتئینی مورد توجه محققان است [۱۸].

استفاده از مایعات بیولوژیکی مانند خون و ادرار به دلت سهولت و غیر تهاجمی بودن روش جمع آوری، نمونه‌های مناسبی برای بررسی‌های آزمایشگاهی و تشخیصی هستند. به همین دلیل یافتن بیومارکرهای miRNA در این مایعات که بتوانند سرطان را با دقت و حساسیت ردیابی کنند از اهداف بزرگ محققان در سال‌های اخیر بوده است.

Sapre و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور استرالیا تحقیقی در مورد سطح بیان مجموعه‌ای از miRNA ها به

صورت پنل روی ۷۰ نمونه پلاسما افراد مبتلا به سرطان پروستات (۳۷ نمونه با ریسک بالا و ۳۳ نمونه با ریسک پایین) و ۳۳ نمونه ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات (۱۶ نمونه با ریسک بالا و ۱۷ نمونه با ریسک پایین) با استفاده از روش Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) قبل از پروستاتکتومی انجام دادند. نتایجی که از این مطالعه به دست آمد نشان داد که همه ی miRNA های مورد مطالعه در افراد دارای ریسک بالای سرطان پروستات دارای افزایش بیان هستند و miR-16، miR-21 و miR-225 بهترین پنل انتخابی برای ادرار بود (۱۹). Foj Laura و همکاران در سال ۲۰۱۶ در کشور اسپانیا تحقیقی در مورد سطح بیان پنج miRNAs، یعنی miR-21، miR-141، miR-214، miR-375 و let-7c روی ۶۰ نمونه رسوب ادرار افراد مبتلا به سرطان پروستات و ۱۰ نمونه رسوب ادرار افراد سالم توسط روش qRT-PCR انجام دادند. نتایجی که از این مطالعه حاصل شد نشان داد که miR-21(P=0.001)، miR-141(P=0.033) و miR-375 (P=0.038) سطح بیان بالا دارند و miR-214 (P=0.049) سطح بیان پایین دارد. برای let-7c (P=0.185) تفاوت قابل توجهی در رسوب ادراری پیدا نشد. پنل ترکیبی miR-21 و miR-375 برای تمایز بین بیماران سرطانی از سالم (P<0.0001) پیشنهاد شد (۲۰). koppers-LalicDanijela و همکاران در سال ۲۰۱۶ در کشور هلند تحقیقی در مورد سطح بیان miR-21، miR-204 و miR-375 روی ۴۸ نمونه ادرار مربوط به افراد مبتلا به سرطان پروستات و ۲۶ نمونه ادرار مربوط به افراد سالم به عنوان کنترل توسط روش qRT-PCR انجام دادند. همچنین ۹ نمونه مربوط به افراد مبتلا و ۴ نمونه مربوط به افراد سالم را توسط تکنیک Next Generation Sequencing (NGS) تعیین توالی کردند. نتایجی که از این مطالعه به دست آمد نشان داد که هر سه این miRNA ها در افراد مبتلا به سرطان پروستات افزایش بیان دارند (۲۱). در داخل کشور جمع بندی‌هایی به صورت مقالات مروری در مورد نقش تشخیصی microRNA ها در سرطان پروستات انجام شده است ولی به صورت اختصاصی تحقیقاتی در مورد آن انجام نشده است (۲۲).

در مطالعه ای که انجام شد، نتایج حاصل از بررسی‌ها نشان داد که miR-21 در افراد مبتلا به سرطان پروستات نسبت به افراد سالم افزایش بیان معنی‌داری (P=0.003) داشته است و همچنین بررسی که بین گروه متاستاتیک و غیر متاستاتیک انجام شد نشان داد که تغییر بیان این miRNAبین دو گروه اختلاف معنی داری دارد و در گروه متاستاتیک (P=0.036) نسبت به غیرمتاستاتیک (P=0.042) افزایش بیان بیشتری داشت. نتایجی که از این مطالعه به دست آمد همسو با نتایج مطالعات دیگر محققان بود.

امید است با تحقیقات بیشتر در حوزه miRNA و سرطان، استفاده از miRNAها به عنوان یک روش تشخیصی غیر تهاجمی و دقیق جایگزین تست های تشخیصی فعلی در آزمایشگاه‌ها شود، که با تشخیص به موقع سرطان، قبل از رسیدن به درجات بالاتر و متاستاز به دیگر بخش‌های بدن بتوان زودتر درمان را شروع کرد و طول عمر بیماران مبتلا را افزایش داد و همینطور افرادی که به دلایل دیگر مانند التهاب پروستات، PSA آن ها بالا می رود بتوانند از روش های تشخیصی جدید بر پایه ی miRNA ها استفاده کنند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از بخش رادیولوژی بیمارستان هاشمی نژاد، بخش ژنتیک مولکولی انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی تهران که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

[1] Huang Y, Li Z-Z, Huang Y-L, Song H-J, Wang Y-J. Value of free/total prostate-specific antigen (F/T PSA) ratios for prostate cancer detection in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/mL: A meta-analysis. Medicine. 2018; 97(13).

[2] Turnpenny P, Ellard S. Emerys Elements Of Medical Genetics. Fifteenth ed: Elsevier; 2017.

[3] Carter H. partin AW. Diagnosis and staging of prostate cancer. Campbell-Walsh Urology 8th ed Sydney: Elsevier Health Sciences. 2002.

[4] Guo T, Wang X, Fu H, Tang Y, Meng B, Chen C. Early diagnostic role of PSA combined miR-155 detection in prostate cancer. European review for medical and pharmacological sciences. 2018; 22: 1615-21.

[5] Steggall MJ. Digital rectal examination. Nursing Standard (through 2013). 2008; 22(47): 46.

[6] Kachakova D, Mitkova A, Popov E, Popov I, Vlahova A, Dikov T, et al. Combinations of serum prostate-specific antigen and plasma expression levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as potential better diagnostic biomarkers for prostate cancer. DNA and cell biology. 2015; 34(3): 189-200.

[7] Arriaga-Canon C, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Montiel-Manríquez R, Oliva-Rico D, Jiménez-Trejo F, et al. The use of long non-coding RNAs as prognostic biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. 2018.

[8] Song CJ, Chen H, Chen LZ, Ru GM, Guo JJ, Ding QN. The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies. Journal of cellular biochemistry. 2018; 119 (3): 2763-86.

[9] Wang H, Peng R, Wang J, Qin Z, Xue L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. Clinical epigenetics. 2018; 10 (1): 59.

[10] Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. Nature reviews genetics. 2009; 10(10): 704.

[11] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002; 99(24): 15524-9.

[12] Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. Cancer research. 2007; 67(13): 6130-5.

[13] Yang Y, Guo J-X, Shao Z-Q. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2017; 10(1): 87-91.

[14] Sandiford OA, Moore CA, Du J, Boulad M, Gergues M, Eltouky H, et al. Human Aging and Cancer: Role of miRNA in Tumor Microenvironment. Exosomes, Stem Cells and MicroRNA: Springer; 2018. p. 137-52.

[15] Pang Y, Young CY, Yuan H. MicroRNAs and prostate cancer. ActaBiochimBiophys Sin. 2010; 42(6): 363-9.

[16] Massillo C, Dalton GN, Farré PL, De Luca P, De Siervi A. Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer. Reproduction. 2017; 154 (4): R81-R97.

[17] www.ncbi.nlm.nih.gov [Internet].

[18] D'Souza AL, Chevillet JR, Ghanouni P, Yan X, Tewari M, Gambhir SS. Tumor characterization by ultrasound-release of multiple protein and microRNA biomarkers, preclinical and clinical evidence. PloS one. 2018; 13 (3): e0194268.

[19] Sapre N, Hong MK, Macintyre G, Lewis H, Kowalczyk A, Costello AJ, et al. Curated microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer. PLoS One. 2014; 9(4): e91729.

[20] Foj L, Ferrer F, Serra M, Aré valo A, Gavagnach M, Gimé nez N, et al. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. The Prostate. 2017; 77(6): 573-83.

[21] Koppers-Lalic D, Hackenberg M, De Menezes R, Misovic B, Wachalska M, Geldof A, et al. Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. Oncotarget. 2016; 7(16): 22566.

[22] Khorasani M, Mahdian R, Peymani A. The role of microRNAs in the pathogenesis, diagnosis and treatment of prostate. JQUMS, Vol. 20, No. 3, 2016, pp. 65-74.

Journal of Developmental Biology
Vol. 12, No. 2, Spring 2020

Investigation of miR-21 expression level in urine samples of people with prostate cancer

Emamvirdizadeh A.[1], Hashemi M.[2*], Jamshidian F.[3]

[1] Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch (Ghiamdasht), Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[*] Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

Received: 17 April 2019 Accepted: 2 December 2019

Abstract

Prostate cancer is the most common cancer in men. The diagnosis in this cancer, is more base on aggressive methods, such as biopsy, and because of hurt, most of the patients avoid to biopsy until the advanced stages of cancer. Also, other laboratory methods, such as measurement of prostate specific antigen (PSA) in the blood, do not have high sensitivity and specify. A group of diagnostic biomarkers is MicroRNA, they can be used to diagnose variable diseases, especially cancers. MicroRNAs are small, non-coding and single-stranded RNAs that they length are 21-23 nucleotides and play role in biological mechanisms such as differentiation, proliferation and cancer. While detecting these diagnostic biomarkers in the biological samples of patients with prostate cancer, can be hopeful that rapid, easy, high sensitivity and specificity detection of this cancer helps to decrease pain and costs of cancer, and with the early detection before the invasion to other parts of the body (Metastasis), can help patients to live longer. In this study, we investigate changes in the expression level of miR-21 in urine, in people with prostate cancer (Metastatic and Non-metastatic) and healthy group. This research was done on 70 urine samples of prostate cancer patients (32 Metastatic and 38 Non-metastatic) and 30 control samples with negative biopsy report. First RNA was extracted with Trizol, after the cDNA synthesis, changes in the expression of miR-21 and miR-214 in the urine of people with prostate cancer and healthy group were investigated by using Real-time PCR. Statistical analysis of data was calculated with REST 2009. The results revealed the presence of miR-21 in urine samples in patients with prostate cancer, and it was found that miR-21 showed a significant increase in expression (P=0.003) than healthy group. miR-21 in metastatic group (P=0.042) demonstrate over expression than non-metastatic group (P=0.036). The results show that, miR-21 has significant change in expression level in patients with prostate cancer in compare of healthy group, and can be a non-invasive method to detect prostatic patients and also use this biomarker to determine metastatic and non-metastatic group.

Keywords: Prostate Cancer, Urine, Biomarker, miR-21.