

مقاله پژوهشی

بررسی بیان RNAهای بلند غیرکدکننده *PICART1* و *BANCR*، *ANRIL*، *CCHE1*، *CCAT1* در سرطان ریهناهید شفقت^۱، سوده غفوری فرد^{۲*}، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: s.ghafourifard@sbmu.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2021.684785

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

چکیده

سرطان ریه شایع‌ترین بدخیمی با بالاترین میزان مرگ و میر در سراسر جهان است. RNAهای بلند غیر کدکننده (LncRNAs) نقش‌های پیچیده‌ای در شروع و پیشرفت سرطان ریه دارند و در نتیجه بر پیش‌آگهی بیماران تأثیر می‌گذارند. در پژوهش حاضر تغییرات بیان LncRNAهای *PICART1* و *BANCR*، *ANRIL*، *CCHE1*، *CCAT1* در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور تومور بررسی شدند و پتانسیل آن‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص و پیش‌آگهی سرطان ریه ارزیابی گردید. به منظور انجام این مطالعه مورد - شاهدی، ۳۰ نمونه‌ی بافت سرطانی ریه و ۳۰ نمونه‌ی بافت غیر سرطانی مجاور تومور جمع‌آوری گردید و پس از استخراج RNA تام و سنتز cDNA، سطح بیان LncRNAهای هدف و ژن مرجع $\beta 2M$ با استفاده از روش Real-time PCR SYBR Green time اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌های Real-time PCR، بین میزان بیان این LncRNAها در بافت توموری و بافت نرمال اطراف تومور، تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0/05$). همچنین ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان این LncRNAها با هیچ‌یک از ویژگی‌های جمعیت‌شناختی و پاتولوژیک بیماران مشاهده نشد ($p > 0/05$). بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت که این LncRNAها نقشی در سرطان ریه، در بیماران ایرانی ندارند. با این حال برای تأیید نتایج این پژوهش، بررسی بیان این LncRNAها در تعداد بیشتری نمونه لازم می‌باشد.

کلمات کلیدی: سرطان ریه، RNA غیر کدکننده بلند، *PICART1*، *BANCR*، *ANRIL*، *CCHE1*، *CCAT1*

مقدمه

(NSCLC) و سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) طبقه‌بندی گردیده است. متداول‌ترین نوع سرطان ریه، سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) است که ۸۵ درصد از کل موارد را تشکیل می‌دهد و بیشتر در زیر

سرطان ریه یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها است که به ترتیب اولین و سومین عامل مرگ ناشی از سرطان در مردان و زنان می‌باشد (۱). سرطان ریه بر اساس ویژگی‌های بافت‌شناسی به سرطان ریه سلول غیرکوچک

در مقایسه با بافت‌های غیر سرطانی مجاور تومور، افزایش داشته است (۹). چندین مطالعه نقش انکوژنیک RNA بلند غیر کدکننده ANRIL در سرطان ریه را نشان داده‌اند (۱۲،۱۳،۱۴). همچنین بنا بر یافته‌های مطالعه‌ای، پیشنهاد شده است که RNA بلند غیر کدکننده ANRIL با خاموش کردن بیان P21 و KLF2 سبب مهار آپاپتوز و تقویت تکثیر سلول‌های سرطانی در کارسینوم ریه سلول غیرکوچک می‌گردد (۱۶). الگوی بیان تغییر یافته‌ی RNA بلند غیر کدکننده BANCR در انواع مختلف سرطان مشخص شده است (۲۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که میزان بیان BANCR در بافت‌های توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک در مقایسه با بافت‌های غیر توموری کاهش یافته است (۲۲،۱۷). بنا بر یافته‌های مطالعات قبلی، پیشنهاد شده است که RNA بلند غیر کدکننده PICART1 به عنوان سرکوب‌کننده تومور (tumor suppressor) در سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) عمل می‌کند (۲۴،۲۵). بر مبنای این مطالعات، هدف ما در این تحقیق بررسی این نتایج در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) می‌باشد. برای این منظور، میزان بیان RNAهای بلند غیر کدکننده CCAT1، CCHE1، ANRIL، BANCR و PICART1 بین بافت توموری و بافت نرمال مجاور تومور در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان ریه مقایسه گردید و پتانسیل هر یک از این lncRNAها به عنوان بیومارکر جهت تشخیص و پیش‌آگهی سرطان ریه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه موردی-شاهدی نمونه‌های بافت تومور به همراه بافت نرمال مجاور تومور (ANCTs)، از ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه

گروه‌های آدنوکارسینوما، کارسینوما سلول سنگفرشی و کارسینوما سلول بزرگ طبقه‌بندی می‌گردد (۶). در بیشتر بیماران (تقریباً ۷۵ درصد بیماران) در زمان تشخیص، بیماری در مرحله پیشرفته است (مرحله III/IV) (۱۸). چنین تأخیری در تشخیص سرطان ریه بعلاوه‌ی عدم وجود اهداف درمانی مناسب، منجر به نتایج ناکارآمد در درمان بیماران می‌شود. در نتیجه، محققان تلاش زیادی در شناسایی بیومارکرهای تشخیصی و اهداف درمانی جدید برای این نوع از بدخیمی انجام داده‌اند. پروفایل بیان اختصاصی lncRNAها باعث شده است آنها به عنوان بیومارکر در سرطان ریه سلول غیرکوچک، مورد توجه قرار گیرند (۱۹). RNAهای بلند غیرکدکننده یا lncRNAs، رونوشت‌هایی به طول ۲۰۰ نوکلئوتید یا بلندتر هستند که به پروتئین ترجمه نمی‌شوند (۲). گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که اختلال در بیان lncRNAها از طریق مکانیسم‌های متنوع سبب ایجاد تومور، متاستاز، تهاجم و مقاومت دارویی در انواع مختلف سرطان می‌گردد (۱۰،۵).

RNAهای بلند غیر کدکننده (lncRNAs) همچنین از عوامل کنترل‌کننده‌ی مهم و پیچیده در پاتوژنز یا بیماری‌زایی سرطان ریه هستند (۲۱). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که RNA بلند غیر کدکننده‌ی Colon cancer-associated transcript-1 (CCAT1) به عنوان یک انکوژن عمل می‌کند و از طریق برهمکنش با میکرو RNAها (microRNAs) در پیشروی سرطان و مقاومت به داروهای شیمی درمانی در بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC)، نقش دارد (۳،۴،۷،۲۶،۱۱). مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC)، نشان داده است که سطح بیان CCHE1 در بافت‌های توموری سرطان ریه

استفاده از RNA به عنوان الگو نمی‌باشد. بدین منظور سنتز cDNA با استفاده از کیت ExcelRT™ Reverse Transcription Kit (کشور سازنده Smobio) تایوان انجام گردید. طبق دستور العمل، مخلوطی از ۱۰۰۰ نانوگرم RNA استخراجی پس از اضافه کردن پرایمرهای oligo dT و Random Hexamers با اضافه کردن آب RNase free به حجم تعیین شده رسانده شد و سپس جهت از بین بردن ساختارهای ثانویه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از اتمام این زمان، مخلوط واکنش بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. سپس با اضافه کردن مستر میکس سنتز cDNA (شامل RT Buffer, Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, آب RNase Free) مخلوط نهایی تحت برنامه دمایی زیر قرار گرفت: ابتدا در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه، سپس در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و مرحله نهایی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. نمونه های cDNA به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

طراحی پرایمر جهت واکنش Real time PCR: توالی lncRNAهای هدف و ژن مرجع بتا-۲ میکروگلوبولین ($\beta 2M$) از سایت NCBI بدست آمد و پرایمرها با استفاده از نرم افزار Gene Runner 5 طراحی شدند. سپس توالی پرایمرها Blast گردید تا اختصاصیت آنها مورد بررسی قرار گیرد. توالی پرایمرها و طول محصول PCR در جدول ۲ نمایش داده شده است.

انجام آزمون Real Time PCR: واکنش Real Time PCR SYBR Green با استفاده از کیت RealQ Plus 2x Master Mix Green High ROX™ شرکت AMPLIQON (کشور سازنده دانمارک) و دستگاه ABI

سلول غیرکوچک (NSCLC) که در بیمارستان مسیح دانشوری تحت جراحی قرار گرفته بودند به دست آمد. این بیماران قبل از جراحی تحت هیچ گونه رادیوتراپی یا شیمی‌درمانی قرار نگرفته بودند. رضایت نامه کتبی از تمام بیماران شرکت‌کننده در مطالعه، اخذ گردید. تمام نمونه‌های بافت تومور و بافت نرمال مجاور تومور توسط پاتولوژیست تایید شده است. نمونه‌های بافت پس از جمع آوری، در ازلت مایع به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پروتکل مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تأیید شده است. (IR.SBMU.RETECH.REC.1399.185)

مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران: در این تحقیق مردان و زنان سیگاری و غیرسیگاری با تشخیص ابتلا به کارسینوم ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) در مراحل ۱ تا ۳ سرطان با میانگین سن $58/27 \pm 8/99$ سال شرکت داشته اند و بیمارانی که تحت هرگونه درمانی شامل پرتودرمانی و شیمی‌درمانی قرار گرفته بودند از مطالعه خارج شدند. مشخصات جمعیت‌شناختی و پاتولوژیک بیماران در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج RNA: در این مطالعه، RNA تام از نمونه‌های بافت توموری و بافت نرمال مجاور تومور با استفاده از کیت استخراج RNA (YTzol Pure RNA) شرکت یکتا تجهیز آزما و کلروفورم، مطابق دستور العمل استخراج گردید. کمیته و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب بوسیله دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید.

سنتز cDNA: برای انجام واکنش Real Time PCR نیاز به DNA الگو می باشد زیرا DNA پلی‌مراز قادر به

محصولات، طول قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد و ژل آکریل امید ۶ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آنالیز داده‌های Real Time PCR: داده‌های به دست آمده از واکنش Real-time PCR با استفاده از نرم-افزار GraphPad prism 8.4.3 (686) آنالیز شدند. تفاوت در میزان بیان lncRNAها بین بافت سرطانی و بافت غیرسرطانی مجاور تومور با استفاده از آزمون‌های Wilcoxon matched pairs Test و paired t-test بررسی گردید. ارتباط بین سطح بیان lncRNAها و مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک تومور با استفاده از آزمون Chi-square (Or fisher's exact) test ارزیابی گردید. آستانه معنی داری، P-Value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. پتانسیل lncRNAهای مورد مطالعه به عنوان بیومارکر تشخیصی در سرطان ریه با رسم منحنی ROC و محاسبه سطح زیر منحنی راک (AUC) مورد ارزیابی قرار گرفت.

SteponePlus™ انجام شد. برنامه حرارتی دستگاه در سه مرحله اجرا گردید. مرحله اول که منجر به واسرشت‌سازی اولیه مولکول‌های cDNA الگو و فعال شدن آنزیم پلیمرز می‌شود در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم طی ۴۰ چرخه (Cycles) متوالی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و سپس مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب (Melting Curve) به ترتیب در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، انجام شدند. همچنین واکنش‌های Real-time PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به صورت تکرار دوتایی (Duplicate) انجام شدند. ژن بتا-۲ میکروگلوبولین ($\beta 2M$) به عنوان ژن مرجع یا کنترل داخلی استفاده گردید. برای اطمینان از صحت انجام واکنش از کنترل فاقد الگو (NTC) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از اتمام زمان واکنش Real-time PCR، جهت اطمینان از اختصاصی بودن

جدول ۱- اطلاعات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران

| مقادیر | مشخصات بیماران | |
|------------------------|--|--------------------------|
| ۵۸/۲۷ ± ۸/۹۹ (۳۰ - ۸۰) | سن (میانگین ± انحراف معیار (محدوده سنی)) | |
| ٪ ۷۳ | مرد | جنسیت |
| ٪ ۲۷ | زن | |
| ٪ ۵۵ | آدنوکارسینوما (AC) | |
| ٪ ۴۵ | کارسینوما سلول سنگفرشی (SCC) | |
| ٪ ۲۱/۷۴ | I | مرحله بیماری (TNM Stage) |
| ٪ ۳۴/۷۸ | II | |
| ٪ ۴۳/۴۸ | III | |
| ٪ ۲۳ | بله | سابقه مصرف سیگار |
| ٪ ۷۷ | خیر | |

جدول ۲- توالی پرایمرها و طول محصولات Real time PCR

| نام ژن | توالی پرایمر | طول پرایمر | طول محصول |
|---------|-----------------------------|------------|-----------|
| B2M | F: TGCTGTCTCCCTGTTTGATGTATC | ۲۴ | ۸۶ |
| | R: TCTCTGCTCCCCACCTCTAAG | ۲۱ | |
| CCAT1 | F: AGAAACACTATCACCTACGC | ۲۰ | ۱۱۳ |
| | R: CTTAACAGGGCATTGCTAATCT | ۲۲ | |
| CCHE1 | F: CACAACCCCTCACCTACATC | ۲۱ | ۲۳۱ |
| | R: GACCAAATGATAGCGTTTCTCCC | ۲۳ | |
| ANRIL | F: TGCTCTATCCGCCAATCAGG | ۲۰ | ۱۰۸ |
| | R: GCGTGCAGCGGTTTAGTTT | ۱۹ | |
| BANCR | F: GACTTTAGCAAACCTGTGATCTC | ۲۳ | ۱۴۳ |
| | R: TGTTGAAACCAAGCTGATATGTG | ۲۳ | |
| PICART1 | F: CTGGCTATAATGCTGGACTCGC | ۲۲ | ۱۶۹ |
| | R: CCTGGCTGGCTCCTCTTCTC | ۲۰ | |

نتایج

نتایج استخراج RNA: استخراج RNA از نمونه‌های بافت تومور و بافت سالم مجاور تومور انجام گردید. غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد و میزان جذب نوری محلول RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید. از نمونه‌هایی که نتایج نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر آنها، بین ۱/۸ تا ۲ بود پس از تیمار با DNase I، جهت سنتز cDNA استفاده گردید. کیفیت RNA استخراج شده، با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد، بررسی گردید. باندهای RNA ریوزومی 18s و 28s در شکل ۱ نمایش داده شده است.

تعیین کیفیت cDNA: جهت تایید کیفیت و صحت cDNA سنتز شده، طول محصول ژن بتا-۲ میکروگلوبولین (Beta-2 Microglobulin) بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید.

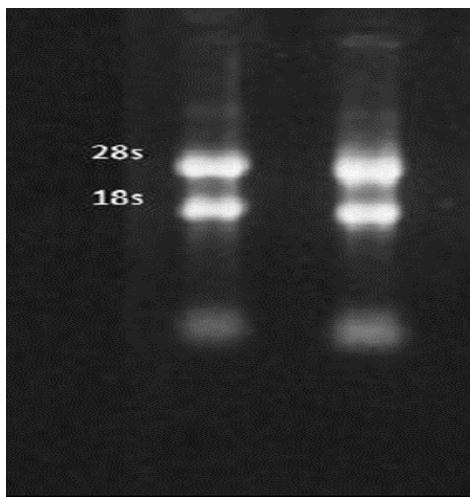
نتایج واکنش Real Time PCR: بیان نسبی lncRNAهای ANRIL، CCHE1، CCAT1، BANCR و PICART1 در بافت‌های توموری و بافت‌های نرمال مجاور تومور با استفاده از روش SYBR Green Real Time PCR اندازه‌گیری شد. در نتیجه این آزمون، تفاوت معنی‌داری در بیان lncRNAهای هدف بین بافت‌های توموری و بافت‌های نرمال مجاور تومور مشاهده نشد ($p > 0/05$). بیان نسبی این lncRNAها در

lncRNA های هدف، در شکل ۳ نمایش داده شده است.

بررسی ارتباط بین سطح بیان lncRNA ها و مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران: به منظور بررسی نقش این lncRNA ها در سرطان ریه، ارتباط بین تغییرات بیان نسبی هر lncRNA در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های نرمال مجاور تومور (ANCTs) با مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران مانند سن، جنسیت بیماران، وضعیت استعمال سیگار، مرحله و زیر گروه بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت و ارتباط معنی داری بین آنها مشاهده نشد ($p > 0/05$). نتایج آنالیز ارتباط بین سطح بیان lncRNA های مورد مطالعه و مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران در جداول ۴ و ۵ نمایش داده شده است.

بافت توموری و بافت نرمال مجاور تومور در شکل ۲ نمایش داده شده است.

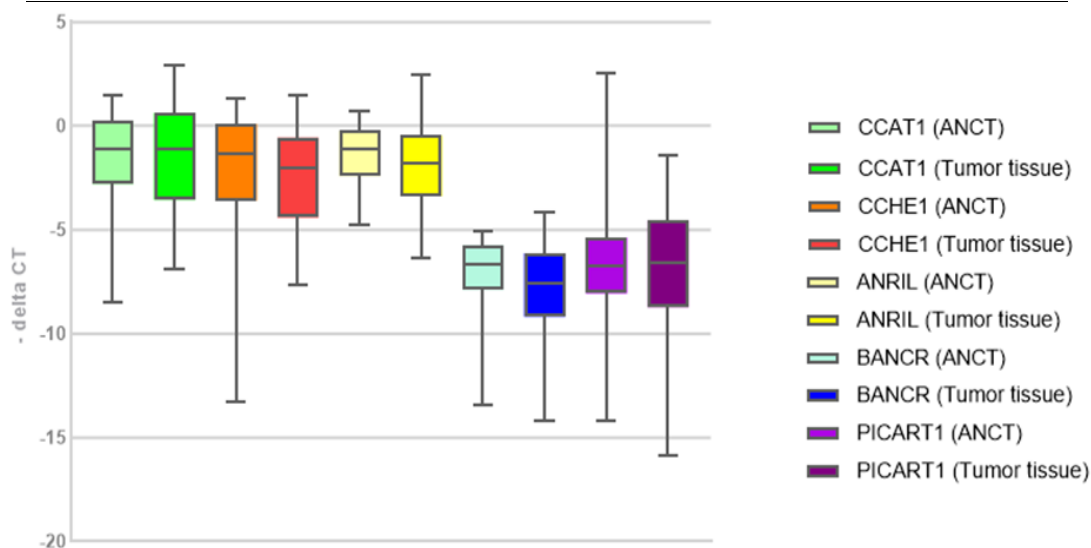
ارزیابی قدرت تشخیصی lncRNA ها و منحنی ویژگی عامل گیرنده: به منظور ارزیابی پتانسیل بیومارکری lncRNA های BANCR، ANRIL، CCHE1، CCAT1 و PICART1 جهت تشخیص سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC)، منحنی ROC برای هر یک از lncRNA ها با استفاده از نرم افزار GraphPad prism (686) 8.4.3 رسم گردید. با توجه به مقادیر سطح زیر منحنی راک (AUC)، می‌توان نتیجه گرفت که میزان بیان هیچ یک از این lncRNA ها، بیومارکر مناسبی برای تشخیص سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) در بیماران ایرانی نمی‌باشد. جزئیات آنالیز منحنی‌های ویژگی عامل گیرنده (ROC) در جدول ۳ نشان داده شده است. همچنین منحنی‌های ROC رسم شده برای



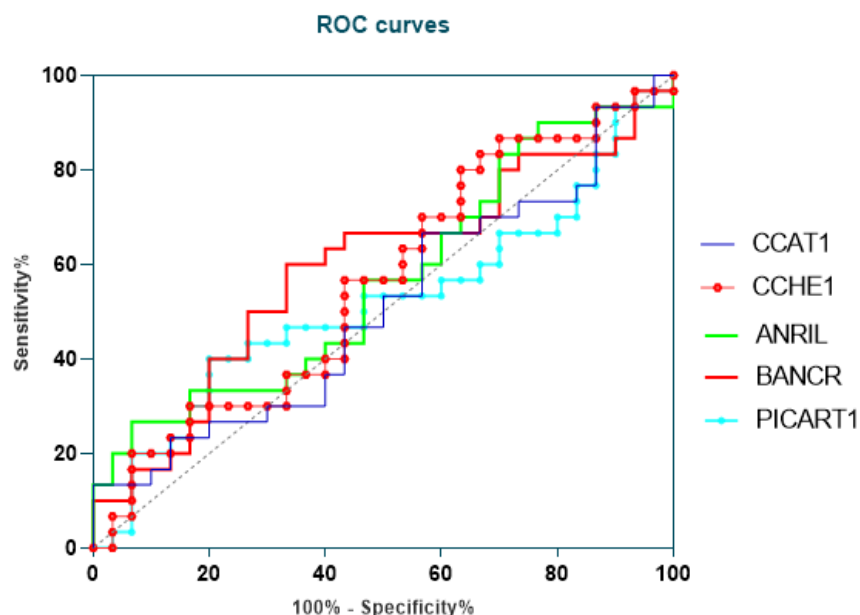
شکل ۱- ظهور باندهای 18S و 28S حاصل از الکتروفورز نمونه های RNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد، نشان دهنده کیفیت RNA استخراج شده می‌باشد.

جدول ۳- آنالیز منحنی‌های ویژگی عامل گیرنده (ROC)

| نام ژن | سطح زیر منحنی | خطای معیار | فاصله اطمینان (۹۵٪) | P value |
|---------|---------------|------------|---------------------|---------|
| CCAT1 | ۰/۵۰۸۹ | ۰/۰۷۵۷۲ | ۰/۳۶۰۵ - ۰/۶۵۷۳ | ۰/۹۰۵۸ |
| CCHE1 | ۰/۵۶۱۱ | ۰/۰۷۴۹۵ | ۰/۴۱۴۲ - ۰/۷۰۸۰ | ۰/۴۱۶۱ |
| ANRIL | ۰/۵۶۵۶ | ۰/۰۷۴۹۲ | ۰/۴۱۸۷ - ۰/۷۱۲۴ | ۰/۳۸۳۱ |
| BANCR | ۰/۵۹۲۲ | ۰/۰۷۴۸۳ | ۰/۴۴۵۶ - ۰/۷۳۸۹ | ۰/۲۱۹۸ |
| PICART1 | ۰/۵۱۷۸ | ۰/۰۷۶۶۴ | ۰/۳۶۷۶ - ۰/۶۶۸۰ | ۰/۸۱۳۰ |



شکل ۲- بیان نسبی lncRNAها در نمونه‌های بافت تومور و بافت نرمال مجاور تومور



شکل ۳- ترسیم منحنی ROC برای ارزیابی قدرت تشخیصی lncRNA های CCAT1، CCHE1، ANRIL، BANCR و PICART1 در بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC).

جدول ۴- ارتباط بین بیان lncRNA ها و مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران

| ANRIL | | p | CCHE1 | | p | CCAT1 | | نام ژن |
|------------|--------|-------|------------|--------|-------|------------|-------|--------------|
| Down | Up | | Down | Up | | Down | Up | |
| Regulation | | | Regulation | | | Regulation | | تغییرات بیان |
| | | ۰/۴۱۵ | | | ۰/۶۵۲ | | | سن |
| ۷۰٪ | ۳۰٪ | | ۷۰٪ | ۳۰٪ | | ۴۰٪ | ۶۰٪ | > ۶۰ |
| ۵۸٪/۳۳ | ۴۱٪/۶۷ | | ۵۰٪ | ۵۰٪ | | ۲۵٪ | ۷۵٪ | ≤ ۶۰ |
| | | ۰/۳۶۹ | | | ۰/۶۶۸ | | | جنسیت |
| ۶۳٪/۱۶ | ۳۶٪/۸۴ | | ۶۸٪/۴۲ | ۳۱٪/۵۸ | | ۴۲٪/۱۱ | ۵۷/۸۹ | مرد |
| ۵۷٪/۱۴ | ۴۲٪/۸۶ | | ۴۲٪/۸۶ | ۵۷٪/۱۴ | | ۲۸٪/۵۷ | ۷۱/۴۳ | زن |
| | | ۰/۳۵۲ | | | ۰/۱۶۲ | | | مصرف سیگار |
| ۵۰٪ | ۵۰٪ | | ۸۳٪/۳۳ | ۱۶٪/۶۷ | | ۶۶٪/۶۷ | ۳۳/۳۳ | بله |
| ۶۵٪ | ۳۵٪ | | ۵۵٪ | ۴۵٪ | | ۳۰٪ | ۷۰ | خیر |
| | | ۰/۲۸۳ | | | ۰/۴۷۸ | | | مرحله بیماری |
| ۴۰٪ | ۶۰٪ | | ۴۰٪ | ۶۰٪ | | ۲۰٪ | ۸۰ | I |
| ۸۷٪/۵ | ۱۲٪/۵ | | ۶۲٪/۵ | ۳۷٪/۵ | | ۳۷٪/۵ | ۶۲/۵ | II |
| ۶۰٪ | ۴۰٪ | | ۷۰٪ | ۳۰٪ | | ۴۰٪ | ۶۰ | III |
| | | ۰/۱۹۷ | | | ۱ | | | زیر گروه |

| | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| ۶۳٪/۶۴ | ۳۶٪/۳۶ | ۴۵٪/۴۵ | ۵۴٪/۵۵ | ۲۷٪/۲۷ | ۷۲٪/۷۳ | AC |
| ۶۶٪/۶۷ | ۳۳٪/۳۳ | ۷۷٪/۷۸ | ۲۲٪/۲۲ | ۳۳٪/۳۳ | ۶۶٪/۶۷ | SCC |

AC: آدنوکارسینوما، SCC: کارسینوم سلول سنگفرشی

جدول ۵- ارتباط بین بیان lncRNAها و مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران (ادامه)

| نام ژن | PICART1 | | p | BANCR | | p | ANRIL | | تغییرات بیان |
|--------------|-----------------|---------------|-------|-----------------|---------------|-------|-----------------|---------------|--------------|
| | Down Regulation | Up Regulation | | Down Regulation | Up Regulation | | Down Regulation | Up Regulation | |
| سن | | | ۰/۶۷۵ | | | ۰/۶۷۵ | | | |
| > ۶۰ | ۴۰٪ | ۶۰٪ | | ۷۰٪ | ۳۰٪ | | | | |
| ≤ ۶۰ | ۶۶٪/۶۷ | ۳۳٪/۳۳ | | ۵۸٪/۳۳ | ۴۱٪/۶۷ | | | | |
| جنسیت | | | ۰/۴۰۷ | | | ۰/۴۰۷ | | | |
| مرد | ۵۲٪/۶۳ | ۴۷٪/۳۷ | | ۶۳٪/۱۶ | ۳۶٪/۸۴ | | | | |
| زن | ۵۷٪/۱۴ | ۴۲٪/۸۶ | | ۴۲٪/۸۶ | ۵۷٪/۱۴ | | | | |
| مصرف سیگار | | | ۰/۳۴۸ | | | ۰/۳۴۸ | | | |
| بله | ۶۶٪/۶۷ | ۳۳٪/۳۳ | | ۳۳٪/۳۳ | ۶۶٪/۶۷ | | | | |
| خیر | ۵۰٪ | ۵۰٪ | | ۶۵٪ | ۳۵٪ | | | | |
| مرحله بیماری | | | ۰/۲۸۳ | | | ۰/۲۸۳ | | | |
| I | ۲۰٪ | ۸۰٪ | | ۴۰٪ | ۶۰٪ | | | | |
| II | ۸۷٪/۵ | ۱۲٪/۵ | | ۶۲٪/۵ | ۳۷٪/۵ | | | | |
| III | ۶۰٪ | ۴۰٪ | | ۷۰٪ | ۳۰٪ | | | | |
| زیر گروه | | | ۱ | | | ۱ | | | |
| AC | ۵۴٪/۵۵ | ۴۵٪/۴۵ | | ۶۳٪/۶۴ | ۳۶٪/۳۶ | | | | |
| SCC | ۵۵٪/۵۶ | ۴۴٪/۴۴ | | ۶۶٪/۶۷ | ۳۳٪/۳۳ | | | | |

AC: آدنوکارسینوما، SCC: کارسینوم سلول سنگفرشی

بحث

منجر به شناسایی بیومارکرهای تشخیصی و اهداف درمانی جدید گردد. در مطالعه حاضر تغییرات بیان RNAهای بلند غیر کدکننده CCAT1، CCHE1، ANRIL، BANCR و PICART1 در نمونه‌های بافت توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک در مقایسه با بافت‌های غیر سرطانی مجاور آنها (ANCTs)، در ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه بررسی گردید و همچنین

بیان نابه‌جای lncRNAها در بسیاری از سرطان‌ها گزارش شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که lncRNAها با تهاجم و متاستاز در سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) ارتباط مستقیم دارند و همچنین بر پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک تاثیر می‌گذارند (۱۵۸). انتظار می‌رود بررسی بیان lncRNAها در بافت‌های طبیعی و سرطانی ریه،

است که سطح بیان *lncRNA ANRIL* در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های نرمال مجاور تومور، به طور قابل توجهی افزایش یافته است و بیان افزایش یافته *ANRIL* با اندازه بزرگتر تومور و مرحله پیشرفته بیماری، ارتباط مستقیم دارد. هر چند که در این مطالعه نیز همانند نتایج تحقیق ما، بین بیان *lncRNA ANRIL* و دیگر ویژگی‌های بیماران مانند جنسیت و متاستاز غدد لنفاوی، ارتباطی مشاهده نشده است (۱۳). مطالعه دیگری در کشور چین بر روی ۸۷ بیمار نشان داده است که بیان *lncRNA ANRIL* در بافت‌های توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک نسبت به بافت‌های نرمال مجاور تومور، به طور معنی‌داری افزایش داشته است و بیان بالاتر *ANRIL* در بافت‌های *NSCLC* با مرحله *TNM* پیشرفته و متاستاز غدد لنفاوی، همراه بوده است. همچنین بنابر یافته‌های این تحقیق، *lncRNA ANRIL* به عنوان یک بیومارکر بالقوه برای پیش‌آگهی سرطان ریه سلول غیرکوچک، پیشنهاد شده است (۱۲). بعلاوه تحقیق دیگری در کشور چین بر روی بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک، نشان داده است که در ۶۷ درصد بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های نرمال مجاور تومور، بیان *ANRIL* به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($\text{fold change} > 1.5$) و بیان بالا *ANRIL* در *NSCLC* ارتباط معنی‌داری با اندازه تومور و مرحله پاتولوژیک پیشرفته دارد. بنابر یافته‌های این مطالعه همچنین پیشنهاد شده است که *lncRNA ANRIL* با خاموش کردن اپی‌ژنتیک رونویسی *KLF2* و کاهش بیان *P21* باعث تقویت تکثیر سلولی و مهار آپوپتوز در سرطان ریه سلول غیرکوچک می‌شود (۱۶). مطالعه *Ming Sun* و همکاران بر روی ۱۱۳ جفت نمونه بافت سرطان ریه سلول غیرکوچک و بافت‌های طبیعی

ارتباط بین بیان این *lncRNA*ها و خصوصیات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت تا قدرت تشخیصی بالقوه آنها را در بیماران ایرانی ارزیابی کنیم. با وجود تحقیقات قبلی که نقش این *lncRNA*ها را در سرطان ریه مشخص کرده است، یافته‌های ما تفاوت قابل توجهی را بین بیان آنها در بافت توموری و بافت طبیعی مجاور تومور بیماران نشان نمی‌دهد و همچنین ارتباط معنی‌داری بین بیان این *lncRNA*ها با ویژگی‌های پاتولوژیک و دموگرافیک بیماران مشاهده نشد.

در حالیکه مطالعه *Lijiang Zhao* و همکاران بر روی نمونه‌های بافت توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک (*NSCLC*) و بافت‌های طبیعی مجاور تومور، بیان افزایش یافته *lncRNA CCAT1* را در بافت‌های توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک، نشان داده است. همچنین بر اساس یافته‌های این تحقیق پیشنهاد شده است که بیان افزایش یافته *lncRNA CCAT1* با اندازه بزرگتر تومور همراه است (۲۶). مطالعه *Y Liao* و همکاران بر روی ۱۲۶ نمونه‌ی بافت توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک (*NSCLC*) و بافت‌های نرمال مجاور تومور، نشان داده است که بیان *CCHE1* در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های نرمال مجاور تومور، افزایش قابل توجهی داشته است و بعلاوه، آنها دریافتند که بیان *CCHE1* با رشد تومور و متاستاز غدد لنفاوی همبستگی مثبت دارد. همچنین بر طبق نتایج این مطالعه، پیشنهاد شده است که *lncRNA CCHE1* می‌تواند از طریق مسیر سیگنالینگ *ERK/MAPK* سبب افزایش تکثیر، متاستاز و تهاجم در رده‌های سلولی *NSCLC* گردد (۹). تحقیقی در کشور چین بر روی بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک، نشان داده

بافت نرمال مجاور تومور، نشان داده است که بیان PICART1 در بافت‌های توموری NSCLC در مقایسه با بافت‌های نرمال مجاور تومور، به طور قابل توجهی کاهش یافته است. بعلاوه، یافته‌های این مطالعه نشان داده است که IncRNA PICART1 با مهار مسیر سیگنالینگ JAK2/STAT3 باعث سرکوب تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه می‌شود (۲۵).

علت اختلاف بین نتایج ما با دیگر مطالعات می‌تواند به دلیل تفاوت در حجم نمونه‌ها، تفاوت در اتیولوژی سرطان ریه و یا تفاوت در نژاد و زمینه ژنتیکی بیماران باشد. همچنین عوامل محیطی مانند آلاینده‌های هوا و میزان استعمال دخانیات می‌تواند بیان IncRNAها در بافت‌های ریه را تحت تاثیر قرار دهد و منجر به ایجاد الگوهای متمایز بیان IncRNAها، در بین جمعیت‌های مختلف گردد (۲۰).

نتیجه‌گیری

بنابر یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که الگوی بیان RNAهای بلند غیر کدکننده‌ی PICART1، ANRIL، CCHE1، CCAT1 و BANCN در بافت‌های توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک و بافت‌های طبیعی مجاور تومور در این گروه از بیماران ایرانی، مشابه بوده است و بین الگوی بیان IncRNAهای مورد مطالعه و مشخصات پاتولوژیک این بیماران همبستگی‌ای مشاهده نشد. همچنین بر اساس آنالیز منحنی‌های ویژگی عامل گیرنده (ROC)، این IncRNAها فاقد ارزش تشخیصی در سرطان ریه سلول غیرکوچک در بیماران ایرانی می‌باشند. تفاوت در نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج تحقیقات صورت گرفته در دیگر کشورها، اهمیت مطالعات مبتنی بر

مجاور تومور، نشان داده است که بیان IncRNA BANCN به طور قابل توجهی در ۷۹ درصد بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های طبیعی، کاهش یافته است و سطح بیان BANCN در سرطان ریه سلول غیرکوچک به طور معنی‌داری با اندازه بزرگتر تومور، مرحله پاتولوژیک پیشرفته و متاستاز غدد لنفاوی مرتبط بوده است. هر چند در این مطالعه نیز، ارتباط معنی‌داری بین بیان BANCN و ویژگی‌های دیگر مانند سن و جنسیت بیماران مشاهده نشده است (۱۷). مطالعه Liu Yang بر روی نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک و چندین سل لاین آدنوکارسینوما ریه، نشان داده است که بیان BANCN در بافت‌ها و رده‌های سلولی NSCLC در مقایسه با بافت‌های طبیعی و سلول‌های نرمال ریه کاهش یافته است. همچنین نتایج این تحقیق نشان داده است که بیان بیش از حد BANCN در برخی رده‌های سلولی سرطان ریه NSCLC، زنده‌مانی و تهاجم را مهار کرده و همزمان آپوپتوز را در سرطان ریه سلول غیرکوچک تقویت می‌کند (۲۲). تحقیق Chunling Zhang و همکاران بر روی نمونه‌های بافت توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک و بافت‌های نرمال مجاور تومور، نشان داده است که بیان PICART1 در IncRNA در ۷۰ درصد بافت‌های توموری NSCLC در مقایسه با بافت‌های نرمال مجاور تومور، کاهش یافته است. بعلاوه، سطح بیان پایین‌تر PICART1 با مرحله پیشرفته بیماری همراه بوده است. بنابر نتایج این مطالعه، پیشنهاد شده است که بیان بیش از حد PICART1 از طریق تنظیم مسیر سیگنالینگ AKT، سبب مهار تکثیر سلولی و تهاجم در سرطان ریه سلول غیرکوچک می‌گردد (۲۴). همچنین مطالعه J. Zhao و همکاران بر نمونه‌های بافت توموری سرطان ریه سلول غیرکوچک و

Y., Ma H., Bai Y. 2016. Clinical prognostic value of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in various human cancers: An updated meta-analysis. *International Journal of Biological Markers*, 31(2): e173-e182.

9. Liao Y., Cheng S., Xiang J., Luo C. 2018. lncRNA CCHE1 increased proliferation, metastasis and invasion of non-small lung cancer cells and predicted poor survival in non-small lung cancer patients. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(6): 1686-1692.

10. Lin C., & Yang L. 2018. Long Noncoding RNA in Cancer: Wiring Signaling Circuitry. *Trends in Cell Biology*, 28(4): 287-301.

11. Lin H., Cheng W., Yan H., Zhang, X. 2018. Overexpression of the long noncoding rna ccat1 promotes metastasis via epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. *Oncology Letters*, 16(2): 1809-1814.

12. Lin L., Gu Z. T., Chen W. H., Cao, K. J. 2015. Increased expression of the long non-coding RNA ANRIL promotes lung cancer cell metastasis and correlates with poor prognosis. *Diagnostic Pathology*, 10(1): 14.

13. Lu Y., Zhou X. H., Xu L., Rong C. H., Shen C., Bian W. 2016. Long noncoding RNA ANRIL could be transactivated by c-Myc and promote tumor progression of non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy*, 9: 3077-3084.

14. Naemura M., Murasaki C., Inoue Y., Okamoto H., Kotake Y. 2015. Long noncoding RNA ANRIL regulates proliferation of non-small cell lung cancer and cervical cancer cells. *Anticancer Research*, 35(10): 5377-5382.

15. Nakagawa T., Endo H., Yokoyama M., Abe J., Tamai K., Tanaka N., Sato I., Takahashi S., Kondo T., Satoh K. 2013. Large noncoding RNA HOTAIR enhances

جمعیت را جهت کشف بیومارکرها و درمان‌های هدفمند در سرطان ریه، برجسته می‌کند.

منابع

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6): 394-424.

2. Cech T. R., Steitz J. A. 2014. The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 157(1): 77-94.

3. Chen J., Zhang K., Song H., Wang R., Chu X., & Chen, L. 2016. Long noncoding RNA CCAT1 acts as an oncogene and promotes chemoresistance in docetaxel-resistant lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget*, 7(38): 62474-62489.

4. Hu B., Zhang H., Wang Z., Zhang F., Wei H., Li L. 2017. LncRNA CCAT1/miR-130a-3p axis increases cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell line by targeting SOX4. *Cancer Biology and Therapy*, 18(12): 974-983.

5. Huarte M. 2015. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature Medicine*, 21(11): 1253-1261.

6. Inamura K. 2017. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7: 193.

7. Li N., Hao W., Yang J., Guo Y., Guo Y., Du Y. 2020. Long non-coding RNA colon cancer-associated transcript-1 regulates tumor cell proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer through suppressing miR-152. *Geriatrics and Gerontology International*, 20(6): 629-636.

8. Li Y., Yang Z., Wan X., Zhou J., Zhang

- coding RNA stabilizes the Y-box-binding protein 1 and regulates the epidermal growth factor receptor to promote lung carcinogenesis. *Oncotarget*, 7(37): 59556–59571.
21. Yang J., Lin J., Liu T., Chen T., Pan S., Huang W., Li S. 2014. Analysis of lncRNA expression profiles in non-small cell lung cancers (NSCLC) and their clinical subtypes. *Lung Cancer*.85(2): 110-115
22. Yang L., Liu G. 2019. lncRNA BANCR suppresses cell viability and invasion and promotes apoptosis in non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Management and Research*, 11: 3565–3574.
23. Yu X., Zheng H., Chan M. T., Wu W. K. K. 2017. BANCR: a cancer-related long non-coding RNA. *American Journal of Cancer Research*, 7(9): 1779–1787.
24. Zhang C., Su C., Song Q., Dong F., Yu S., Huo J. 2018. LncRNA PICART1 suppressed non-small cell lung cancer cells proliferation and invasion by targeting Akt1 signaling pathway. *American Journal of Translational Research*, 10(12): 4193–4201.
25. Zhao J. M., Cheng W., He X. G., Liu Y. L., Wang F. F., Gao, Y. F. 2018. Long non-coding RNA PICART1 suppresses proliferation and promotes apoptosis in lung cancer cells by inhibiting JAK2/STAT3 signaling. *Neoplasia*, 65(5): 779–789.
26. Zhao L., Wang L., Wang Y., Ma P. 2020. Long non-coding RNA CCAT1 enhances human non-small cell lung cancer growth through downregulation of microRNA-218. *Oncology Reports*, 43(4): 1045–1052.
- aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(2): 319–324.
16. Nie F. Q., Sun M., Yang J. S., Xie M., Xu T. P., Xia R., Liu Y. W., Liu X. H., Zhang E. B., Lu K. H., Shu Y. Q. 2015. Long noncoding RNA ANRIL promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(1): 268–277.
17. Sun M., Liu X. H., Wang K. M., Nie F. Q., Kong R., Yang J. S., Xia R., Xu T. P., Jin F. Y., Liu Z. J., Chen J. F., Zhang E. B., De W., Wang Z. X. 2014. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Cancer*, 13(1): 68.
18. Walters S., Maringe C., Coleman M. P., Peake M. D., Butler J., Young N., Bergström S., Hanna L., Jakobsen E., Kölbek K., Sundström S., Engholm G., Gavin A., Gjerstorff M. L., Hatcher J., Johannesen T. B., Linklater K. M., McGahan C. E., Steward J., Tracey E., Turner D., Richards M.A., Rachet B. 2013. Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: A population-based study, 2004-2007. *Thorax*, 68(6): 551–564.
19. Wei M. M., Zhou G. B. 2016. Long Non-coding RNAs and Their Roles in Non-small-cell Lung Cancer. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 14(5): 280-288.
20. Wei M. M., Zhou Y. C., Wen Z. S., Zhou B., Huang Y. C., Wang G. Z., Zhao X. C., Pan H. L., Qu L. W., Zhang J., Zhang C., Cheng X., Zhou G. B. 2016. Long non-

