

مقاله تحقیقی

بررسی میزان بیان Mir-96 در سلول های سرطانی دهان انسان

مهتاب یازگی^۱، مریم عیدی^{۲*}، فهیمه باغبانی آرانی^۱

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: maryameidi@gmail.com

محل انجام تحقیق: انستیتو کانسر، بیمارستان امام خمینی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۵/۲

تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۲۹

چکیده

سرطان دهان یکی از انواع سرطان های سر و گردن می باشد. سرطان های سر و گردن، پنج درصد همه سرطان ها را شامل می شوند که تقریباً نیمی از آن ها در محدوده حفره دهان رخ می دهند. فاکتورهای زیادی در شروع و پیشرفت سرطان دهان دخیل هستند. یکی از مهمترین این فاکتورها، miRNAs و مکانیسم های وابسته به آن هستند. Mir-96 به صورت مستقیم و غیرمستقیم در آپاپتوز، تکثیر و تهاجم سلولی دخیل می باشد. بنابراین، تحقیقات در رابطه با نقش و ارتباط آن با سرطان دهان می تواند سبب بهبود و پیشرفت در تشخیص و درمان این گروه از بیماران شود. در این مطالعه ۳۰ نمونه توموری و مجاور توموری سرطان دهان پس از مطالعات هیستوپاتولوژیک جمع آوری شدند. پس از استخراج RNA و طراحی پرایمر اختصاصی Mir-96 و U6، میزان بیان Mir-96 با روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیان Mir-96 در نمونه های توموری ۳.۴۴ برابر بالاتر از نمونه های نرمال بود ($p < 0.001$). همچنین میزان بیان Mir-96 در نمونه های افراد الکلی بالاتر از افراد غیرالکلی بود ($p < 0.01$). همچنین میزان بیان Mir-96 در نمونه های افرادی که دچار متاستاز شده بودند، بالاتر از افرادی بود که دچار متاستاز نشده بودند ($p < 0.01$). از سوی دیگر، میزان بیان Mir-96 در نمونه های افرادی که سابقه سرطان پوست داشتند، بالاتر از افراد بدون سابقه سرطان بود ($p < 0.05$). Mir-96 پتانسیل خوبی به عنوان مارکر تشخیصی و درمانی برای سرطان دهان دارد.

واژه های کلیدی: Mir-96، سرطان دهان، بیومارکر، RT-PCR.

مقدمه

باشد (۲). بر اساس نوع بافت و نوع سلول سرطانی، سازمان بهداشت جهانی سرطان دهان را به پنج نوع تقسیم بندی می کند، شامل: کارسینوم سلول سنگفرشی، کارسینوم verrucous، کارسینومای غدد بزاقی، لنفوما و تومورهای خوش خیم بافت دهان (۳). نرخ مرگ و میر ناشی از سرطان دهان در کشورهای مختلف جهان متنوع است، و میزان بقای

سرطان دهان یکی از سرطان های شایع در سراسر جهان می باشد و یکی از ۱۰ سرطان کشنده در بین همه سرطان ها است (۱). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می دهد که میزان وقوع این سرطان در نقاط مختلف جهان، متغیر است که نرخ رخداد آن از یک درصد تا ۴۰ درصد، متغیر می

مواد و روش ها

نمونه های انسانی

تعداد ۳۰ نمونه بافت سرطان دهان انسان و بافت مجاور توموری از انستیتو سرطان بیمارستان امام خمینی جمع آوری شد (تهران، ایران). معیارهای خروج بیماران از مطالعه شامل سرطان های همزمان دیگر، بیماری های التهابی، شیمی درمانی و رادیوتراپی بودند. معیار ورود بیماران به مطالعه نیز، تایید پاتولوژیک سرطان دهان بود. این رویه مطابق با استانداردهای کمیته مسئول آزمایش های انسانی و بیانیه Helsinki سال ۱۹۷۵ بود که در سال ۲۰۰۰ اصلاح شد. رضایت شخصی از هر کدام از بیماران قبل از جمع آوری نمونه گرفته شد. سرطان دهان و نوع آن توسط پاتولوژیست تشخیص داده شد. به علاوه، بیماران هنوز تحت هیچگونه درمانی قرار نگرفته بودند. اطلاعات دموگرافیک و کلینوپاتولوژیکی بیماران در جدول ۱ خلاصه شده است.

استخراج RNA و سنتز cDNA

از هر کدام از نمونه های توموری و مجاور توموری (به عنوان کنترل)، RNA کلی با استفاده از کیت RiboEX (GeneAil, Korea, Cat. NO 301.001) با توجه به پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ ND-1000 مورد بررسی قرار گرفت (Wilmington, DE, USA) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱.۸ تا ۲ کنترل شد. سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای ساقه حلقه اختصاصی توسط کیت Takara, Japan, Cat. NO) Prime Script RT reagent kit (RR037A) بر طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. نمونه ها تا زمان استفاده در درمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند. توالی پرایمرهای ساقه حلقه اختصاصی جهت سنتز cDNA در جدول ۲ ارایه شده است.

پنج ساله این بیماران در ایران بین ۳۰ تا ۶۳ درصد گزارش شده است (۴). شایع ترین علائم سرطان دهان عبارتند از: وجود زخم های دهانی که بهبود نمی یابند، درد فک و دندان، تغییر صدا، تنگی نفس، بی حسی زبان و حفره دهان، یک وصله سفید یا قرمز در دهان، تحریک پذیری، درد، یا توده هایی در هر قسمت دهان یا روی لب ها و کاهش وزن بی دلیل (۵). متأسفانه اغلب سرطان های دهان در مراحل پیشرفته بیماری و زمانی که علائم بیماری ظهور می کند، شناسایی می شوند. سرطان دهان پیش آگهی ضعیفتری نسبت به سایر بدخیمی های بدن دارند و نرخ بقای افراد مبتلا به آن، به تشخیص زودرس و تغییر شیوه زندگی دارد (۶). اخیراً معلوم شده است که microRNAها یک گروه از RNAهای کوچک کد کننده هستند که ارتباط نزدیکی با بیماری های مختلف از جمله سرطان دهان دارند. همچنین microRNAها می توانند به عنوان شاخص های تشخیصی یا پیش آگهی در چندین سرطان عمل کنند (۷). یکی از میکرو RNAهایی که تاکنون نقش آن در بسیاری از سرطان ها مورد بررسی قرار گرفته و اثبات شده است، mir-96 می باشد (۷). توالی کد کننده mir-96 در موقعیت کروموزومی q32.2۷ و روی کلاستر mir183-mir96-mir182 قرار دارد (۸). بر اساس مطالعات، mir-96 با خانواده FOXO مرتبط است. به طور کلی، خانواده ژنی FOXO، در تنظیم آپاپتوز و ترمیم DNA نقش دارند. معمولاً در اغلب سرطان ها اثر آنکوژنی از خود نشان می دهد و به این طریق نقش خود را در سرطان ایفا می کند، به عنوان مثال در سرطان پروستات دچار افزایش بیان شده و این افزایش سبب مهار ژن های FOXO1 و FOXO3a می شود (۹). مهار این دو ژن نیز سبب افزایش تکثیر سلول های سرطانی می شود. لذا mir-96 پتانسیل خوبی به عنوان مارکر تشخیصی و درمانی در سرطان های مختلف دارد. نقش mir-96 در سرطان های معده، مثانه، سینه، کبد، ریه و... ثابت شده است (۱۰) و در این پژوهش به بررسی نقش و بیان آن در سرطان دهان پرداخته شد.

جدول ۱ - مشخصات دموگرافیک و کلینوپاتولوژیک بیماران سرطان دهان.

متغیرها	مقدار (n = 30)
جنسیت	
مرد	73.3%
زن	26.7%
سن	
۲۰-۳۰	6.6%
۳۱-۴۰	6.6%
۴۱-۵۰	6.6%
۵۱-۶۰	13.4%
۶۰-۷۰	26.8%
۷۰-۸۰	33.4%
۸۰-۹۰	6.6%
نوع سلول	
موکو-اپیدرموئید کارسینوما	3.3%
کارسینوم سلول سنگفرشی	96.7%
مرحله بیماری	
I	10%
II	10%
III	53.4%
IV-A	23.3%
IV-B	3.3%
الکل	
الکی	3.3%
غیرالکی	96.7%
سیگار	
غیرسیگاری	73.7%
سیگاری	23.4%
سابقاً سیگاری	3.3%

جدول ۲ - پرایمرهای ساقه-حلقه طراحی شده جهت سنتز cDNA.

ژن	توالی (۵' → ۳')
MiR-96	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACTCCATC
RNU6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGACCGGTATTCGCACTGGA TA CGACAGTCAG

واکنش Real-time PCR

واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (ABI Applied Bio-systems, USA) در حجم 15µL شامل: RealQ Plus 2x Master Mix Green High از 7.5µl از (Ampliqon, Denmark) ROX™، یک میکرولیتر cDNA (۵۰ نانوگرم)، 5.5 میکرولیتر آب و یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از مخلوط پرایمر رفت و برگشت صورت گرفت. برنامه دمایی و زمانی شامل: دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۵ دقیقه، سپس به مدت ۴۰ سیکل: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه به مدت یک دقیقه، همه‌ی نمونه‌ها به صورت duplicate و از RNU6 به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش فوق در جدول ۳ ارایه شده است.

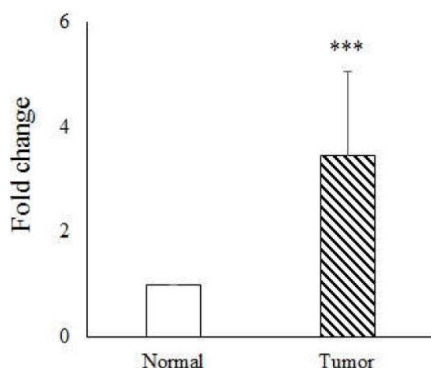
آنالیز آماری

جهت آنالیز بیان Mir-96 از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ و از آزمون T-test جهت مقایسه دو گروه توموری و نرمال استفاده شد.

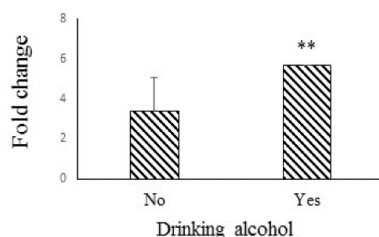
میزان بیان Mir-96 با پارامترهای کلینوپاتولوژیک با تست ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت (SPSS Software, v24). همچنین برای همه‌ی آزمون‌ها میزان $P < 0.05$ به عنوان معناداری تست در نظر گرفته شد.

نتایج

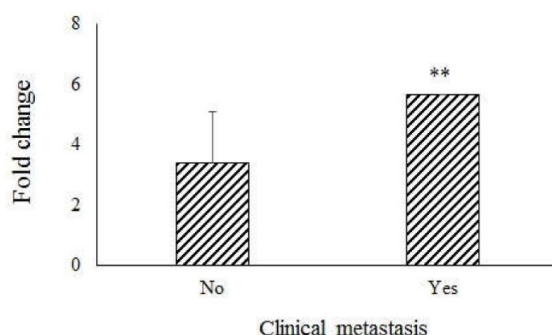
نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان Mir-96 در نمونه‌های توموری به میزان قابل توجهی بالاتر از نمونه‌های نرمال بود ($P < 0.001$). میزان بیان Mir-96 در نمونه‌های توموری ۳.۴۴ برابر بالاتر از نمونه‌های نرمال بود (شکل ۱). میزان بیان Mir-96 در نمونه‌های توموری افراد الکلی به میزان قابل توجهی بالاتر افراد غیرالکلی بود ($P < 0.01$) (شکل ۲). همچنین، میزان بیان Mir-96 در نمونه‌های توموری افرادی که دچار متاستاز شده اند، به میزان قابل توجهی بالاتر از نمونه‌های افرادی بود که متاستاز نداده اند (شکل ۳) ($P < 0.01$).



شکل ۱ - میزان ضریب تغییر mir-96 در نمونه‌های توموری و نرمال ($P < 0.001$).



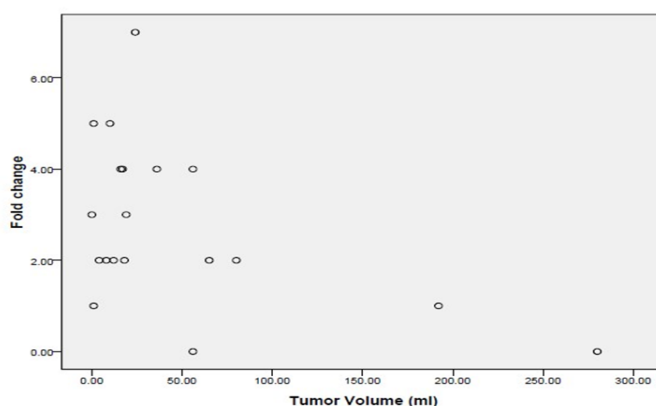
شکل ۲. مقایسه میزان بیان mir-96 بین بیماران الکلی و غیرالکلی ($P < 0.01$).



شکل ۳ - مقایسه میزان بیان mir-96 بین نمونه‌های متاستازی و غیرمتاستازی ($P < 0.01$).

میزان بیان Mir-96 با سایر پارامترهای دیگر از جمله سن، جنسیت، سابقه سیگار کشیدن، مرحله تومور، محل تومور در محدوده دهان، تهاجم عروقی، تهاجم لنفاوی، تهاجم پری نورال، نکروز و سابقه خانوادگی سرطان وجود نداشت.

همچنین یک ارتباط منفی بین حجم تومور و میزان بیان Mir-96 در نمونه‌های توموری وجود دارد. میزان بیان Mir-96 در نمونه‌های توموری با حجم کمتر، به مراتب بیشتر بود ($P < 0.05$) (شکل ۴). هیچ ارتباط معناداری میان



شکل ۴ - همبستگی بین حجم تومور و میزان بیان mir-96 در نمونه‌های توموری.

شناسایی به موقع و تشخیص زودهنگام آن توسط پزشکان و آنکولوژیست‌ها برمی‌گردد. تشخیص زودرس و شناسایی افراد در معرض خطر ابتلا به سرطان، پیش از ایجاد تومور و متاستاز آن یکی از اهداف مهم تحقیقات سرطان دهان در سراسر دنیا به شمار می‌آید (۱۱). در طی دهه اخیر، روش‌های ژنتیک مولکولی بر پایه آنالیز پروتئین‌ها، DNA و RNA در حال توسعه بوده و یکی از جدیدترین آنها، تحقیقات در زمینه miRNA می‌باشد. یکی از

بحث

سرطان دهان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جهان و یکی از ۱۰ علت شایع مرگ و میر در میان همه انواع سرطان‌ها محسوب می‌گردد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که شیوع سرطان دهان در قسمت‌های مختلف جهان متفاوت است. متأسفانه اکثریت سرطان‌های دهان در مراحل پیشرفته و پس از بروز علائم مربوطه تشخیص داده می‌شوند. دلیل مرگ و میر بالا در این نوع سرطان به عدم

های مختلفی مانند تکثیر و مهاجرت سلولی نقش دارد. مطالعات نشان داده که افزایش بیان غیرطبیعی mir-96 سبب مهار فعالیت ژن PTPN9 شده و سبب افزایش تکثیر و متاستاز می شود (۱۵) (Katoh 2004). در پژوهش حاضر پس از بررسی این ژن در بیماران مبتلا به سرطان دهان مشخص گردید که بیان mir-96، در نمونه بافت توموری سلول های دهان در مقایسه با بافت سالم مجاور، ۳/۴۴ افزایش بیان معناداری پیدا کرده است. این نتیجه نشان می دهد که این افزایش بیان می تواند شروع و پیشرفت سرطان دهان را رقم بزند. لذا mir-96 می تواند پتانسیل خوبی به عنوان مارکر تشخیصی و درمانی در سرطان های مختلف از جمله سرطان دهان از خود نشان دهد.

همچنین، نتایج نشان داد که میزان بیان mir-96 در نمونه توموری افرادی که مصرف الکل داشتند، نسبت به افرادی که الکل مصرف نمی کردند بطور معنی داری بالاتر بود ($p < 0.01$). اثرات الکل روی میزان بیان Mir-96 گزارش نشده است، اما همواره یک همبستگی منفی بین مصرف الکل و بیان miRNAs گزارش شده است.

Xu و همکاران، نشان داده اند که میزان بیان Mir-96 در نمونه های سرطانی کلورکتال بالاتر از نمونه های نرمال بود ($p < 0.05$) و Mir-96 با متاستاز کبد مرتبط بود. آن ها عنوان کردند، Mir-96 ممکن است در شروع و پیشرفت سرطان کلورکتال نقش داشته باشد.

به هر حال، نقش Mir-96، در تکثیر سلول های سرطانی دهان همچنان نامشخص باقی مانده است، اما مشاهده شده است که Mir-182-5p که عضوی از کلاستر Mir-183-96-182 است، در سلول های سرطانی بافت سنگفرشی دهان سبب افزایش سطوح بیانی با هدف قرار دادن CAMK2N1 می شود. همچنین، Mir-183، یک miRNA دیگر در کلاستر Mir-183-96-182، به میزان قابل توجهی دچار افزایش بیان در کارسینوم سلول سنگفرشی از طریق PDCCD4 می شود.

نتیجه گیری

در این پژوهش میزان بیان miR-96، در ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان دهان با روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار

میکروRNAهایی که تاکنون نقش آن در بسیاری از سرطان ها مورد بررسی قرار گرفته و اثبات شده است، mir-96 می باشد. نقش mir-96 در سرطان های معده، مثانه، سینه، کبد، ریه و... ثابت شده است.

Xi و همکاران بیان mir-96 را در ۱۲۲ نمونه بافت سرطان معده و اثر تنظیمی آن را روی تهاجم و مهاجرت سلول های سرطانی معده بررسی کردند. نتایج تحقیق نشان داد بیان mir-96 در بافت توموری سرطان معده نسبت به بافت معده سالم انسان افزایش می یابد. کاهش بیان mir-96 به طور موثری تهاجم و مهاجرت سلول های سرطان معده را کاهش می دهد (۱۲).

در یک مطالعه دیگر، Kozinn و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مطالعه بر روی پیش بینی مقاومت جمسیتایین در سلول های سرطان مثانه و ارتباط آن با mir-96 از طریق روش PCR و وسترن بلات با هدف شناسایی میکروRNAهای اختصاصی به این نتیجه رسیدند که میزان mir-96 در سلول های توموری سرطان مثانه افزایش یافته است (۱۳).

همچنین، بیان بیش از حد mir-96 به طور قابل توجهی باعث افزایش تکثیر سلولی و تومور سلول های گردن رحم می شود (۱۴).

مطالعاتی که پیش تر روی ژن mir-96 انجام شده اند بر افزایش بیان ژن آن در اغلب سرطان ها توافق نظر دارند. مهمترین مسیر سیگنالیتهی که ژن mir-96 در آن شرکت می کند، ارتباط آن با خانواده ژنی Foxo می باشد. به طور کلی، خانواده ژنی FOXO، در تنظیم آپاپتوز و ترمیم DNA نقش دارند و طبق مطالعات، افزایش بیان mir-96 سبب مهار ژن های FOXO1 و FOXO3a می شود، در حالی که کاهش بیان mir-96 سبب افزایش رونویسی این دو ژن می شود. از آنجایی که mir-96 نقشی کلیدی در پیشرفت این مسیر بازی می کند، هرگونه تغییر نابه جا در الگوی بیان آن می تواند در نظم طبیعی این مسیر اختلال ایجاد کرده و در نتیجه سلول را به سمت سرطانی شدن سوق دهد. همچنین، mir-96 از طریق تاثیر بر هدف های ژنی دیگر نیز می تواند سلول را به سمت سرطانی شدن سوق دهد. ژن PTPN9 یک پروتئین تیروزین فسفاتازی را کد می کند که در فعالیت

خوبی به عنوان مارکر تشخیصی و درمانی در سرطان های مختلف از جمله سرطان دهان از خود نشان دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا برای مهیا کردن امکانات ضروری تشکر می کنند.

گرفت و پس از آنالیز نتایج حاصل از qRT-PCR مشخص گردید که بیان miR-96 در نمونه بافت توموری سلول های دهان در مقایسه با بافت سالم مجاور، ۳/۴۴ افزایش بیان پیدا کرده است. همچنین یک رابطه معنادار میان مصرف الکل، متاستاز در نمونه تومور و سابقه سرطان پوست در بیماران با تغییر بیان miR-96 در نمونه های تومور مورد بررسی وجود دارد. لذا miR-96 می تواند پتانسیل

منابع مورد استفاده

1. Kittipong, D., Somsri, R., Watcharaporn, T., Sompid, K., Ajiravudh, K., Mark, D., 2018. Oral cancer: A multicenter study. *Medicina Oral, Patologia Oral Cirugia Bucal* 23 (1): e23.
2. Montero, H., Snehal, G., 2015. Cancer of the oral cavity. *Surgical Oncology Clinics* 24 (3): 491-508.
3. Nicoleta, S., O'sullivan, J., 2016. Oral cancer: de-regulated molecular events and their use as biomarkers. *Oral Oncology* 61: 12-18.
4. Rezapour, A., Jahangiri, R., Olyaeemanesh, A., Kalaghchi, B., Nouhi, M., Nahvijou, A., 2018. The economic burden of oral cancer in Iran. *PloS one* 13 (9): e0203059.
5. Inverso, G., Mahal, B., Aizer, A., Donoff, R. B., Chau, N. G., Haddad, R. I., 2015. Marital status and head and neck cancer outcomes. *Cancer* 121 (8): 1273-1278.
6. Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., Dobariya, C., 2016. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 12 (2): 458.
7. Huang, S. F., Fang, K. H., Chang, K. P., Ho, O. A., 2018. Epidemiology, and Etiology. *Resection and Reconstruction of Head & Neck Cancers* 18: 1.
8. Yu, J. J., Wu, Y. X., Zhao, F. J., Xia, S. J., 2014. miR-96 promotes cell proliferation and clonogenicity by down-regulating of FOXO1 in prostate cancer cells. *Medical Oncology* 31 (4): 910.
9. Hong, Y., Liang, H., Wang, Y., Zhang, W., Zhou, Y., Yu, M., 2016. miR-96 promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PTPN9 in breast cancer. *Scientific reports* 6: 37421.
10. Haflidadóttir, B. S., Larne, O., Martin, M., Persson, M., Edsjö, A., Bjartell, A., Ceder, Y., 2013. Upregulation of miR-96 enhances cellular proliferation of prostate cancer cells through FOXO1. *PloS one* 8 (8): e72400.
11. Stefanuto, P., Doucet, J. C., Robertson, C., 2014. Delays in treatment of oral cancer: a review of the current literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 117 (4): 424-429.
12. Xi, C., Yi, B., Lijia, M., Xing, C., Yuan, Y., Kehui, W., 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18 (10): 997.
13. Kozinn, S. I., Harty, N. J., DeLong, J. M., Deliyannis, C., Logvinenko, T., Summerhayes, I. C., 2013. MicroRNA profile to predict gemcitabine resistance in bladder carcinoma cell lines. *Genes & Cancer* 4 (1-2): 61-69.
14. Ma, X., Shi, W., Peng, L., Qin, X., Hui, Y., 2018. MiR-96 enhances cellular proliferation and tumorigenicity of human cervical carcinoma cells through PTPN9. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25 (5): 863-867.
15. Katoh, M., Katoh, M., 2004. Human FOX gene family. *International Journal of Oncology* 25 (5): 1495-1500.