

بررسی سطح بیان miR-34a و miR-375 در گردش در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم در استان گیلان

طلوع بابایی همتی^۱، نجمه رنجی^۲، فاطمه صفری^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. نویسنده مسئول: n_ranji@iaurasht.ac.ir

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: سرطان معده ششمین بدخیمی شایع و چهارمین علت مرگ سرطانی در دنیا با نرخ بقای پایین است. تشخیص زود ممکن است بقای بیماران را افزایش و مرگ و میر را کاهش دهد. miRNA ها یک گروه از RNA های کوچک غیرکدکننده هستند که به عنوان تنظیم کننده منفی بیان ژنها در سطح پس از رونویسی عمل می کنند. هدف از این مطالعه ارزیابی بیان miR-34a و miR-375 در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده در استان گیلان بود.

مواد و روشها: در این مطالعه، ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده و ۲۵ فرد سالم در استان گیلان در طول ۱۳۹۷-۱۳۹۸ عضو شدند. بیان miR-34a و miR-375 در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم به روش Q-RT-PCR ارزیابی شد. ارتباط بین بیان و خصوصیات کلینیکوپاتولوژی بیماران بررسی شد. آنالیزمنحنی راک این miRNA ها انجام شد.

نتایج: اختلاف معنی داری بین سطح پلاسمایی miR-34a و miR-375 در افراد مبتلا به سرطان معده در مقایسه با کنترل وجود نداشت. اختلاف معناداری بین سطح پلاسمایی miR-34a و miR-375 و نتایج کلینیکوپاتولوژی بیماران وجود نداشت. سطح زیر منحنی (AUC) آنالیز راک miR-34a 0.56 ± 0.08 ($P=0.42$) بود. سطح زیر منحنی (AUC) آنالیز راک miR-375 0.62 ± 0.08 ($P=0.14$) بود.

نتیجه گیری: نتایج ما پیشنهاد می کند که miR-34a و miR-375 احتمالاً بیومارکرهای مناسبی برای تشخیص سرطان معده در استان گیلان نباشند.

کلمات کلیدی: سرطان معده، miR-34a، miR-375، پلازما، آنالیز راک

مقدمه

در سال ۲۰۲۰ حدود ۱۹ میلیون و سیصد هزار مورد سرطانی جدید و ۱۰ میلیون مرگ سرطانی در جهان شناسایی شد. سرطان معده به عنوان ششمین سرطان شایع در موارد جدید (۵/۶٪) و چهارمین علت مرگ سرطانی (۷/۷٪) در دنیا می باشد. نرخ بروز این سرطان در مردان دو برابر زنان است. در مردان، شایعترین سرطان شناخته شده منجر به مرگ در چندین کشور آسیای مرکزی و جنوبی شامل ایران، افغانستان، ترکمنستان و قرقیزستان است. شیوع سرطان معده در میان افراد زیر ۵۰ سال هم در کشورهای با خطر بالا و هم با خطر پایین در دنیا در حال افزایش است (۱). شیوع سرطان معده در اغلب مناطق ایران بالا بوده: بطوریکه نواحی شمالی و شمال غربی ایران به عنوان مناطق با خطر بالا و مناطق جنوب غربی ایران مناطق با خطر متوسط شناسایی شده اند. در مردان شیوع این سرطان بیشتر از زنان می باشد. در سال ۲۰۱۲، نرخ مرگ در اثر سرطان معده حدود ۱۱/۴٪، به عنوان دومین علت مرگ سرطانی در ایران گزارش شد (۲). فقدان علائم اولیه باعث می شود اغلب مبتلایان به کارسینومای معده، در مراحل پیشرفته بیماری با متاستاز به غدد لنفاوی و یا متاستاز به بافت‌های دور و یا هر دو تشخیص داده شوند. با این وجود هیچ روش مؤثری برای درمان مبتلایان به سرطان معده متاستاتیک وجود ندارد (۳). شناسایی روش‌های تشخیصی جدید می تواند به تشخیص سریعتر و درمان مؤثرتر بیماری کمک نماید.

در کشورهای با شیوع بالای سرطان معده همچون کره و ژاپن، غربالگری با روش‌هایی چون فتوفلوئوروگرافی و یا اخیراً با اندوسکوپی انجام می شود. در این روش حدود ۵۰ درصد از مبتلایان به سرطان معده در مراحل اولیه تشخیص داده می شوند که این امر باعث افزایش بقای

بیماران می شود. با این حال در اغلب کشورها، استفاده این نوع غربالگری‌ها به دلیل تهاجمی بودن و هزینه بالا امکان پذیر نیست. بیومارکرهای پروتئینی خون (۴) از جمله آنتی ژن کارسینو امبریونیک (CEA) و آنتی ژن سرطانی CA19-9 (۵) به دلیل حساسیت کم در تشخیص، چندان در غربالگری سرطان معده مناسب نیستند (۵).

MicroRNA ها (miRNA ها) یک گروه از RNA های غیر کدکننده با طول تقریبی ۱۷ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند که در تنظیم بیان ژنها در سطح پس از رونویسی (۶) از طریق تجزیه mRNA و یا مهار ترجمه نقش دارند (۷). بیان نادرست miRNA ها در بیماری‌های بیماری‌ها مختلف از جمله سرطانها از اهمیت بالایی برخوردار هستند. در مطالعات مختلف، مشخص شده که miRNA های خارج از سلول^۱ در سرم و پلاسما پایدار بوده و تغییر در بیان آنها با بروز و پیشرفت سرطان ارتباط دارد. در نتیجه این miRNA ها می توانند به عنوان بیومارکرهای بالقوه در روشهای تشخیصی مورد استفاده قرار گیرند (۵). از سوی دیگر از آنجایی که miRNA ها دارای اطلاعات مربوط به وضعیت پاتو-فیزیولوژیک یک فرد هستند می توانند به عنوان بیومارکر شخصی مورد استفاده قرار گیرند. miRNA ها در مایعات بدن خارج از سلولها در سرم، پلاسما، ادرار، بزاق و ... وجود دارند و با نام miRNA های در گردش^۲ به عنوان بیومارکر در بسیاری از بیماریها مورد استفاده قرار می گیرند (۴). miRNA های در گردش به دلیل غیر تهاجمی بودن، دسترسی آسان و پایداری قابل ملاحظه پتانسیل بالایی برای بیومارکر بودن دارند. از آنجایی که miRNA ها به پروتئین‌هایی همچون

¹ Cell-free miRNAs

² circulating miRNAs

JAK2، باعث مهار تکثیر سلولهای سرطانی معده شد (۱۲). شناسایی بیومارکرهای سرطانی از نوع miRNA های در گردش به عنوان یکی از استراتژی های تشخیص به موقع و یا زودهنگام برای تشخیص سرطانهای مختلف از جمله سرطان معده (با تشخیص دیرهنگام و بقای کم بعد از تشخیص) ضروری به نظر می رسد. به دلیل شیوع بالای این سرطان در ایران لازم است در هر منطقه بیومارکرهای کاندیدا انتخاب و سپس میزان آنها در نمونه های پلازما یا سرم افراد مبتلا به این سرطان نسبت به افراد سالم بررسی شود. هدف از این مطالعه بررسی بیان miR-34a و miR-375 (به عنوان دو بیومارکر بالقوه در بافت های سرطانی معده) در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده نسبت به افراد سالم در استان گیلان بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه توصیفی تحلیلی طی سالهای ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸، خونگیری از ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده (قبل یا بعد از جراحی) درمان (مراجعه کننده به بیمارستانها و مراکز درمانی استان گیلان و ۲۵ فرد سالم (بدون هیچ گونه سابقه یا علامت بیماریهای گوارشی) صورت گرفت. در بیماران نمونه گیری قبل از هر نوع درمان دارویی یا رادیوتراپی انجام پذیرفت. جهت تهیه نمونه از افراد سالم و مبتلا به سرطان، کد اخلاق از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (IR. IAU. RASHT. REC. 1399. 027) اخذ گردید. در این مطالعه نمونه گیری از افراد سالم و بیمار با رضایت افراد صورت گرفت. سپس ۴ سی سی خون از افراد بیمار و افراد سالم (کنترل) تهیه شد. نمونه های خونی در لوله های درب دار حاوی EDTA تهیه شدند و سپس در میکروتیوب های حاوی RNase/DNase free نگه داری شدند. جهت تهیه پلازما، نمونه های خونی در دمای

آرگونات (AGO³) و یا HDL⁴ متصل می شوند، به میزان زیادی به RNase ها مقاومند (۸). همچنین استفاده از روش Q-PCR برای تعیین مقدار miRNA ها، به دلیل هزینه نسبتاً کم این روش و حساسیت بالا به مقادیر کم miRNA ی مورد نظر (بواسطه تکثیر مقادیر کم در این روش) به عنوان یک مزیت نسبت به بیومارکرهای پروتئینی محسوب می شود. همچنین استفاده همزمان از چندین miRNA به عنوان بیومارکر سرطانی می تواند در تشخیص بهتر مراحل سرطان کمک نماید (۴).

در بیماری های مختلف از جمله سرطان و بیماری های قلبی، مقدار زیادی miRNA به گردش خون وارد می شود. miRNA ها بواسطه آگزوزوم ها، میکرووزیکولها و یا کمپلکس های پروتئینی از سلولهای مختلفی نظیر نورون ها، سلولهای اندوتلیال، سلولهای B، سلولهای دندریتیک و سلولهای سرطانی وارد گردش خون می شود (۹). کاهش بیان miR-34a به عنوان یک بیومارکر سرطانی با نقش مهار کنندگی تومور در سرطان معده گزارش شده است. این miRNA با هدف قرار دادن ژنهایی نظیر *Bcl-2* و *survivin*، *Notch1-4* و *JGF2BP3* در مهار کارسینوژنز و تکثیر و القاء اپوپتوز نقش ایفا می کند (۱۰). miR-375 نیز به عنوان دیگر بیومارکر سرطان معده، نقش مهار کنندگی تومور دارد، بطوریکه در مهار کارسینوژنز معده (القاء شده با هلیکوباکتر پیلوری) نقش دارد. همچنین با هدف قرار دادن ژن *SLC7A11* باعث کاهش ویژگی بنیادی شدن (stemness) سلولهای سرطانی معده می شود (۱۱). همچنین با افزایش بیان miR-375 در سلولهای سرطانی معده می توان از طریق مهار ژن

³ Argonaute

⁴ High Density Lipoprotein

پرایمر عمومی و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس، سنتز cDNA از miRNA ها صورت گرفت.

جهت بررسی سطح بیان miR-34a و miR-375 در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم از واکنش Q-RT-PCR به کمک کیت BON-miR High (مرکز تحقیقاتی بن یاخته، تهران) و دستگاه ABI Step One Plus real-time PCR استفاده شد. واکنش Q-RT-PCR با حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر شامل ۶/۳ میکرولیتر مستر میکس - سایر گرین (2X miRNA QPCR master mix)، ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۴/۷ میکرولیتر آب استریل تهیه شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. از miR-93-5p به عنوان کنترل داخلی (ژن رفرنس) استفاده شد (۱۳). برنامه دمایی واکنش شامل واسرشت شدن اولیه ۲ دقیقه در دمای ۹۵ °C، سپس ۴۰ سیکل شامل ۱) واسرشت شدن ۵ ثانیه در دمای ۹۵ °C، اتصال پرایمرها (Annealing) و تکثیر (Extension) تماماً ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ °C بود. تغییر بیان miRNA ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بدست آمد (۱۲).

۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور 3000 rpm سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف رویی (پلاسم) در میکروتیوب تمیز قرار گرفت و جهت حفظ RNA در دمای 70°C- نگهداری شد.

بررسی سطح بیان miR-34a و miR-375 در

پلاسم

جهت بررسی بیان miRNA ها، ابتدا تخلیص RNA ی تام از نمونه های پلاسمایی با استفاده از کیت BON-miR RNA extraction (مرکز تحقیقاتی بن یاخته، تهران) صورت گرفت. کمیت RNA ی تخلیص شده، با دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific) بررسی گردید. RNA ی تام تا زمان استفاده، در دمای 70°C- نگهداری شد. جهت سنتز cDNA از miRNA ها از کیت BON-miR miRNA 1st-strand cDNA synthesis (مرکز تحقیقاتی بن یاخته، تهران) استفاده شد. در این کیت ابتدا دم پلی A به کمک آنزیم پلی A پلیمراز به انتهای 3' همه miRNA های در گردش اضافه شد، سپس به کمک یک

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Q-RT-PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر
miR-34a-F	5'- ATGGTGGCAGTGTCTT -3'
miR-34a-R	5'-GAGCAGGGTCCGAGGT -3'
miR-375-F	5'- AAGCGTTTGTTCGTT-3'
miR-375-R	5'-GAGCAGGGTCCGAGGT -3'
Ref: miR-93-5p-F	5'-TAAAGTGCTGTTCGTG-3'
Ref: miR-93-5p -R	5'- GAGCAGGGTCCGAGGT -3'

جدول ۲- گروه بندی نسبت بیان miR-34a و miR-375 با توجه به داده های کلینیکوپاتولوژی بیماران

P-Value (Mean)	نسبت بیان		تعداد(درصد)	متغیر های دموگرافیک و پاتولوژیک	داده های دموگرافیک و پاتولوژیکی
	miR-375	miR-34a			
۰/۸۶	۳/۸۷±۱/۷۶	۴/۲±۱/۳۴	(/۶۰)۱۵	≤۶۵	سن
	۳/۵۶±۲/۱۷	۴/۱±۱/۱۳	(/۴۰)۱۰	>۶۵	
۰/۶۶	۳/۹۷±۱/۹	۳/۸۷±۲/۹	(/۵۶)۱۴	مرد	جنسیت
	۳/۸±۰/۱۷	۴/۱±۱/۹۷	(/۴۴)۱۱	زن	
۰/۳۳	۳/۲±۰/۰۱	۶/۰۱±۲/۱	(/۳۲)۸	سیگاری	مصرف سیگار
	۲/۸±۰/۱۷	۲/۶±۲/۱۶	(/۶۸)۱۷	غیر سیگاری	
	-	-	(/۶۰)۱۵	بخش ابتدایی (Cardia)	مکان قرار گیری تومور
	-	-	(/۲۴)۶	بخش میانی یا اصلی (Body)	
	-	-	(/۱۶)۴	بخش پایینی (Antrum)	
۰/۳۶	۰/۳۴±۱/۱	۰/۰۶±۲/۱	(/۶۰)۱۵	< 4cm	اندازه تومور
	۰/۷۹±۱/۴	۱/۱±۲/۱۷	(/۴۰)۱۰	4-8 cm	
۰/۱۴	۰/۱۵±۲/۱	۰/۱۴±۰/۰۲	(/۸۰)۲۰	مثبت	متاستاز لنفی تومور
۰/۶۱	۰/۱۲±۱/۱	۰/۸۹±۰/۷	(/۲۰)۵	منفی	
-	-	-	(/۵۲)۱۳	poor	درجه تمایز تومور (grade)
-	-	-	(/۴۰)۱۰	moderate	
-	-	-	(/۸)۲	unknown	
-	-	-	(/۶۰)۱۵	Intestinal	تقسیم بندی تومور (لورین)
-	-	-	(/۴۰)۱۰	Diffuse	
۰/۲۶	۰/۰۷±۰/۱۲	۰/۸۹±۰/۰۳	(/۶۴)۱۶	مثبت	عفونت هلیکوباکتر
۰/۳۵	۰/۱۳±۰/۱۴	۰/۳۶±۲/۱۸	(/۳۶)۹	منفی	
۰/۸۷	۰/۹۹±۰/۱۱	۰/۷۳±۰/۰۵	(/۶۰)۱۵	سروز	درجه متاستاز
۰/۲	۰/۱۴±۰/۰۷	۰/۱۱±۰/۲۳	(/۴۰)۱۰	غیر سرروز	

correlation Spearman two-tailed برای بررسی بین نتایج با توزیع غیرنرمال برای تحلیل آماری داده‌های کمی (Q-RT-PCR) استفاده شد.

نتایج

خلاصه ای از اطلاعات بیماران در جدول ۲ ذکر شده است. ۵۶٪ بیماران، مرد و ۴۴٪ بیماران، زن بودند. ۳۲٪ بیماران سیگاری بودند. بر اساس تقسیم بندی لورین ۶۰٪ موارد Intestinal و مابقی Diffuse بودند. اندازه تومور در ۶۰٪ موارد کمتر از ۴ سانتی متر بود. ۵۲٪ موارد تمایز ضعیف و ۴۰٪ تمایز متوسط داشتند. همچنین ۶۰٪ موارد متاستاز به سرور داشتند و ۶۴٪ موارد دچار عفونت هلیکوباکتر پیلوری بودند.

تغییر بیان miR-34a در پلاسمای افراد مبتلا به

سرطان معده

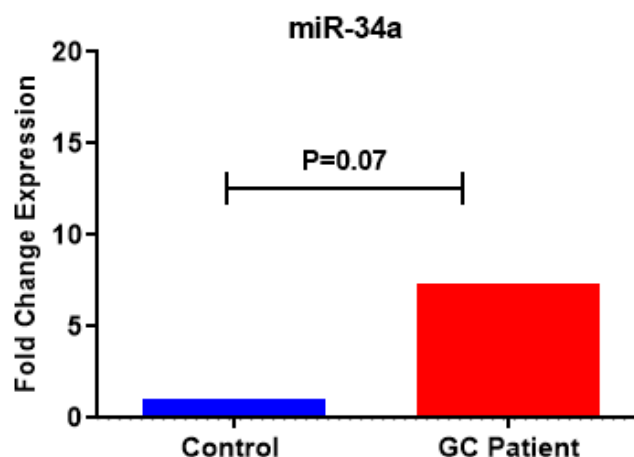
مقایسه سطح بیان miR-34a در پلاسمای ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده نسبت به پلاسمای ۲۵ فرد سالم با آزمون آماری Mann-Whitney اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. با اینحال میزان میانگین افزایش بیان در گروه سرطانی برابر با $7/330 \pm 66/11$ بود (نمودار ۱).

آنالیز منحنی راک (receiver operating characteristic curve)

از منحنی راک و نمایش سطح زیر نمودار آن جهت بررسی میزان احتمال نقش بیومارکری miR-34a و miR-375 در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان گیلان، استفاده شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل یافته‌های حاصل از سنجش‌های کمی میزان بیان ژن‌ها و اطلاعات کلینیکوپاتولوژیکی افراد مبتلا به سرطان با استفاده از نرم‌افزار SPSS و GraphPad Prism7 بر اساس تست آماری انجام شد. برای تحلیل اطلاعات کلینیکوپاتولوژیکی بیماران از آزمون آماری one way ANOVA و t-test با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0.05$) بهره برده شد. از آزمون آماری Shapiro-Wilk جهت بررسی نرمال بودن نتایج، از آزمون آماری Mann-Whitney برای مقایسه میانگین دو گروه غیر جفت با توزیع غیرنرمال، از آزمون Kruskal Wallis ANOVA برای مقایسه بیش از دو گروه با توزیع غیر نرمال و از آزمون آماری



نمودار ۱- آنالیز سطح بیان miR-34a در نمونه های پلاسمای افراد سالم (کنترل) و افراد مبتلا به سرطان معده (GC)

تغییر بیان miR-375 در پلاسمای افراد مبتلا

به سرطان معده

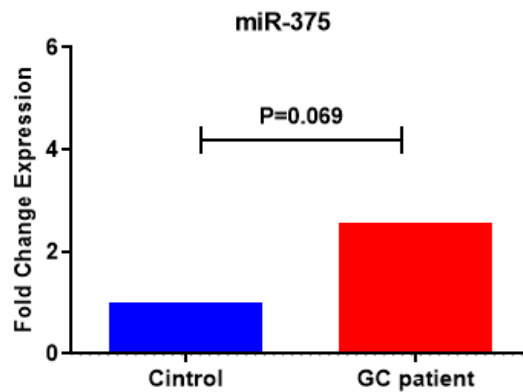
مقایسه سطح بیان miR-375 در پلاسمای ۲۵ فرد

مبتلا به سرطان معده نسبت به پلاسمای ۲۵ فرد سالم با

آزمون آماری Mann-Whitney اختلاف معنی‌داری را

نشان نداد. با اینحال میزان میانگین افزایش بیان در گروه

سرطانی برابر با $2/246 \pm 2/578$ بود (نمودار ۲).



نمودار ۲- آنالیز سطح بیان miR-375 در نمونه های پلاسمای افراد سالم (کنترل) و افراد مبتلا به سرطان معده (GC)

مقایسه همبستگی بیان miR-375 و miR-

34a در نمونه‌های سرطانی

همبستگی (Correlation) بیان miR-375 و

miR-34a در افراد مبتلا به سرطان معده بوسیله آزمون

آماري دوطرفه Spearman برای داده‌های غیرپارامتریک

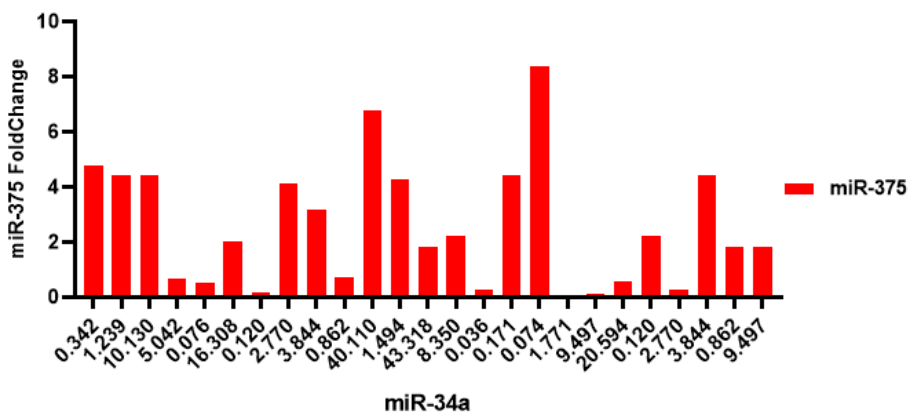
مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیان miR-

34a با miR-375 همبستگی ندارد

$P=0.9117, R=0.2336, 95\%CI= (-0.3858-)$

(0.4248) (نمودار ۳).

miR-34a-miR-375 corelation analysis



نمودار ۳- مقایسه همبستگی بیان miR-34a با miR-375 در نمونه‌های سرطانی

مقایسه نسبت بیان miR-34a و miR-375 با نتایج کلینیکوپاتولوژی بیماران

مطابق جدول ۲، با گروه بندی نسبت بیان miR-34a و miR-375 و مقایسه آنها با نتایج کلینیکوپاتولوژی بیماران مشخص شد که در دو گروه سنی ≤ 65 و >65 ، مرد و زن و مصرف سیگار افزایش بیان هر دو miRNA مشاهده شد اما تفاوت معنی دار نبود. همچنین در گروه بندی های دیگر از جمله اندازه تومور (کمتر و بیشتر ۴ سانتی متر)، متاستاز لنفی و درجه متاستاز تغییر بیان مشاهده شده برای هر دو miRNA معنی دار نبود.

برای miR-375 (AUC=0.56±0.08, P=0.42)

بدست آمد (AUC=0.62±0.08, P=0.14)

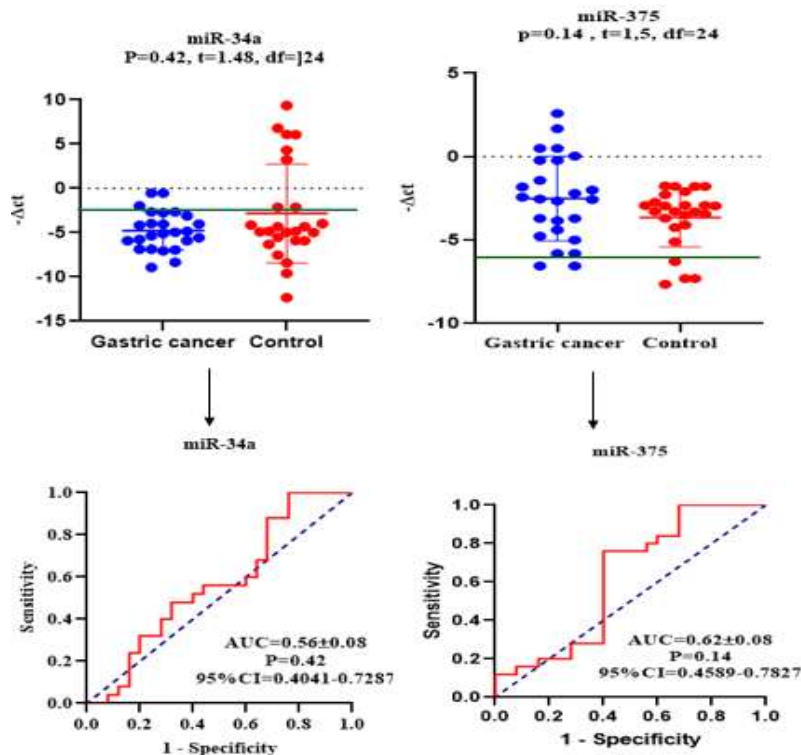
(نمودار ۴).

آنالیز منحنی راک (Receiver operating

characteristic curve: ROC curve)

آنالیز منحنی راک با درجه آزادی ۲۴ محاسبه شد.

سطح زیر نمودار آن برای miR-34a



نمودار ۴. آنالیز منحنی راک و تعیین سطح زیر نمودار miR-34a و miR-375

در این مطالعه با بررسی سطح بیان miR-34a و miR-375

در پلاسمای ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده مشخص شد که این دو miRNA در بیماران نسبت به افراد سالم افزایش بیان دارند اما تفاوت مشاهده شده معنی دار نبود.

در مطالعه متاآنالیز Li و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص شد که miR-34a در بافت توموری افراد مبتلا به سرطان

بحث

سرطان معده دومین علت مرگ سرطانی در ایران، چهارمین علت مرگ سرطانی در دنیا و از شایعترین سرطانهای استان های شمالی کشور محسوب می شود. بدلیل تشخیص دیر هنگام و بقای کم لازم است بیومارکرهایی برای تشخیص و درمان بموقع شناسایی شود.

را در سرطان معده ایفا نماید. چرا که در سرم و پلازما افزایش بیان آن و در بافت توموری کاهش بیان آن رخ می دهد. قابل ذکر است در مطالعه حاضر همه بیماران در مرحله متاستاتیک سرطان و در مراحل III و IV بیماری بودند و افزایش بیان این miRNA در این مراحل، نقش مهار کننده گی تومور آن را در این افراد مشابه با مطالعه Li و همکاران با تردید مواجه می کند. امروزه بعضی از miRNA ها با نقش دوگانه مهارکنندگی تومور و انکوژنی در سلولهای مختلف شناسایی شده اند، از جمله miR-17 از خانواده miR-17-92 در رده سلولی سرطانی سینه باعث کاهش تکثیر می شود. همچنین miR-18a در لنفوسیت های CD4⁺T باعث مهار تکثیر می شود. در حالیکه اعضای این خانواده به انکوژن بودن بیشتر شهرت دارند (۱۷). در مطالعه Jafari و همکاران بر روی ۲۴ بافت سرطانی معده و بافت همجوار مشخص شد در افراد مختلف بیان miR-34a کاهش یا افزایش داد. میانگین بیان miR-34a در ۲۴ نمونه بصورت کاهش گزارش شد ولی اختلاف مشاهده شده بین بافت های توموری و غیر توموری، معنی دار نبود (۱۸). با اینحال نقش اصلی miR-34a، مهار کنندگی تکثیر (از طریق مهار ژنهای نظیر SIRT1 و Bcl2)، القاء آپوپتوز (از طریق مهار ژنهای نظیر CDK1 و CDK4) و مهار فرآیند تبدیل اپی تلیم به مزانشیم یا EMT (از طریق مهار ژنهای نظیر SNAIL و ZEB) معرفی شده است (۱۹). لذا با توجه به اینکه در استان گیلان، بیماران بیان های متفاوتی از این miRNA نشان دادند، با توجه به معنی دار نبودن نتایج، و با توجه به اینکه در پلازما miRNA ها از سلولهای غیر از سلولهای سرطانی نیز به پلازما رها می شوند، لذا ممکن است معرفی این miRNA به عنوان بیومارکر در این استان نیاز به مطالعه تکمیلی با تعداد بیمار بیشتر نیاز داشته باشد.

معده با متاستاز یا در مراحل III و IV بیماری دچار کاهش بیان بودند. اما در بافت توموری بدون متاستاز افزایش بیان نشان دادند. همچنین در مطالعه Li و همکاران افزایش بیان miR-34a در سرم افراد مبتلا به سرطان معده نسبت به افراد سالم گزارش شد. در این مطالعه پیشنهاد شد که تغییر در بیان miR-34a می تواند یک شاخص مرجع برای پیشرفت و متاستاز تومور باشد و میزان بیان این miRNA می تواند در پیش بینی نرخ بقای بیماران بکار رود (۱۴). در مطالعه ایمانی و همکاران مشخص شد که miR-34a به عنوان یک روش غیرتهاجمی توان تشخیص بالقوه سرطان سینه را دارد (۱۵). افزایش بیان miR-34a در سرم افراد مبتلا به سرطان معده نسبت به افراد سالم در مطالعه Liu و همکاران نیز گزارش شد. در این مطالعه افزایش بیان معنی دار این miRNA در سرم افراد مبتلا آن را یکی از پنج اثر انگشت توموری معتبر برای تشخیص سرطان معده با استفاده از آنالیز منحنی راک معرفی کرد (۱۶). با توجه به اینکه در مطالعه Li و همکاران و در مطالعه Liu و همکاران، افزایش بیان معنی دار miR-34a در سرم افراد مبتلا به سرطان معده مشاهده شده و در مطالعه حاضر نیز افزایش بیان مشاهده شد اما از نظر آماری نسبت به افراد سالم معنی دار نبود، لذا به نظر می رسد این miRNA بتواند در سرم و در بافت توموری در افراد مبتلا به سرطان معده نقش متضاد و دوگانه ای ایفا نماید که به مطالعات تکمیلی نیاز دارد. با این حال شباهت بیان miR-34a در سرم و پلازما و تفاوت بیان آن با بافت توموری ممکن است آن را با مطالعات کاملتر به عنوان یک بیومارکر غیرتهاجمی مناسبی برای سرطان معده معرفی نماید. قابل ذکر است بعضی miRNA ها در شرایط مختلف سلولی یا در سلولهای مختلف نقش دوگانه داشته باشند که miR-34a نیز ممکن است هر دو نقش تومورسپرسوری و هم انکوژنی

در مطالعه حاضر آنالیز منحنی راک این miRNA را بعنوان بیومارکر مناسب در پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده معرفی نکرد و در این گروه از بیماران باید بدنبال بیومارکرهای مناسبتری جهت تشخیص زودهنگام سرطان باشیم.

نتیجه گیری

در این مطالعه افزایش بیان miR-375 و miR-34a در پلاسمای ۲۵ فرد مبتلا به سرطان معده نسبت به پلاسمای ۲۵ فرد سالم مشاهده شد اما این اختلاف بیان، معنی دار نبود. همچنین با گروه بندی میزان بیان این دو miRNA اختلاف مشاهده شده با اطلاعات کلینیکوپاتولوژی بیماران معنی دار نبود. نتایج آنالیز راک نیز این دو miRNA را بعنوان بیومارکر احتمالی سرطان معده در استان گیلان معرفی نمی کند. با توجه به اینکه مبتلایان به سرطان معده، متأسفانه در مراحل سه و یا چهار با متاستاز، شناسایی می شوند و این امر باعث مرگ تعداد بیشتری از این مبتلایان در مراحل ابتدایی درمان و یا حتی قبل از درمان می گردد، از محدودیت های این تحقیق عدم دسترسی مناسب به تعداد بیشتری از مبتلایان برای این تحقیق بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه از جناب آقای دکتر حمید سعیدی ساعدی و پرسنل آزمایشگاه جم رشت بابت تهیه و تشخیص نمونه های سرطانی، کمال تشکر و قدردانی را دارد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

در مطالعه Zhang و همکاران بیان miR-375 در افراد مبتلا به سرطان معده عود کننده^۵ و غیر عود کننده بررسی شد و مشخص شد در سرطان معده عود کننده هم به روش microarray و هم به روش real time PCR بیان این miRNA نسبت به سرطان معده غیر عود کننده افزایش داشت. در مطالعه آنها افزایش بیان miR-375 با فراوانی بالای عود کنندگی سرطان و بقای کم بیماران همراه بود (۲۰). در مطالعه Lee و همکاران به روش microarray افزایش بیان miR-375 در افراد مبتلا به سرطان معده نسبت به افراد سالم مشاهده شد. اما آنالیز با real time PCR کاهش بیان این miRNA را نشان داد که البته کاهش بیان این miRNA با مراحل اولیه تومور (T1 و T2) و درجه تمایز یافته سرطان همراه بود (۲۱). در مطالعه Juzénas و همکاران کاهش بیان miR-375 هم در پلاسمای و در بافت توموری افراد مبتلا به سرطان معده گزارش شد (۲۲). با توجه به اینکه این miRNA نیز رفتار دوگانه ای در سرطان معده نشان می دهد و در مطالعه حاضر نیز در پلاسمای بعضی افراد کاهش و در پلاسمای بعضی افزایش بیان گزارش شده، لذا به نظر می رسد بسته به شرایط کلینیکوپاتولوژی افراد افزایش یا کاهش بیان آن مشهود باشد. بطوریکه در مطالعه Lee و همکاران کاهش بیان در مراحل اولیه تومور (T1 و T2) رخ داده بود و در مطالعه Juzénas و همکاران افراد بیمار با هر چهار مرحله (stage) سرطانی حضور داشتند و تفکیک مراحل صورت نگرفته بود. اما در مطالعه حاضر بیماران در مراحل پیشرفته بوده لذا با مطالعه Zhang و همکاران به نظر می رسد بیشتر مشابهت داشته باشد چرا که در انواع متاستاتیک بقای بیماران در این نوع سرطان بشدت کاهش می یابد. با اینحال

⁵ recurrence

فهرست منابع

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-249.
2. Kalan Farmanfarma K, Mahdavifar N, Hassanipour S, Salehiniya H. Epidemiologic Study of Gastric Cancer in Iran: A Systematic Review. *Clin Exp Gastroenterol*. 2020;13:511-42.
3. Xing S, Tian Z, Zheng W, Yang W, Du N, Gu Y, et al. Hypoxia downregulated miR-4521 suppresses gastric carcinoma progression through regulation of IGF2 and FOXM1. *Molecular Cancer*. 2021;20(1):9.
4. Madhavan D, Cuk K, Burwinkel B, Yang R. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. *Front Genet*. 2013.-۴:۱۱۶;
5. So JBY, Kapoor R, Zhu F, Koh C, Zhou L, Zou R, et al. Development and validation of a serum microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer in a high-risk population. *Gut*. 2020;gutjnl-2020-322065.
6. Khakinezhad Tehrani F, Ranji N, Kouhkan F, Hosseinzadeh S. Apoptosis induction and proliferation inhibition by silibinin encapsulated in nanoparticles in MIA PaCa-2 cancer cells and deregulation of some miRNAs. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(4):469-82.
7. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.-
8. Turchinovich A, Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol*. 2012;9(8):1066-7.°
9. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences*. 2016;10(2):175-86.
10. Xiong S, Hu M, Li C, Zhou X, Chen H. Role of miR-34 in gastric cancer: From bench to bedside (Review). *Oncol Rep*. 2019;42(5):1635-46.
11. Ni H, Qin H, Sun C, Liu Y, Ruan G, Guo Q, et al. MiR-375 reduces the stemness of gastric cancer cells through triggering ferroptosis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):325.
12. Ding L, Xu Y, Zhang W, Deng Y, Si M, Du Y ,et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell Res*. 2010;20(7):784-93.
13. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci*. 2012;57(4):897-904.
14. Li Z, Liu ZM, Xu BH. A meta-analysis of the effect of microRNA-34a on the progression and prognosis of gastric cancer. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018;22(23):8281-7.
15. Imani S, Zhang X, Hosseinfard H, Fu S, Fu J. The diagnostic role of microRNA-34a in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(14):23177-87.
16. Liu R, Zhang C, Hu Z, Li G, Wang C, Yang C, et al. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *European Journal of Cancer*. 2011;47(5):784-91.

17. Ranji N, Sadeghizadeh M, Shokrgozar MA, Bakhshandeh B, Karimipour M, Amanzadeh A, et al. MiR-17-92 cluster: an apoptosis inducer or proliferation enhancer. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;380(1-2):229-38.

18. Jafari N, Abediankenari S, Hosseini-Khah Z, Valizadeh SM, Torabizadeh Z, Zaboli E, et al. Expression patterns of seven key genes, including β -catenin, Notch1, GATA6, CDX2, miR-34a, miR-181a and miR-93 in gastric cancer. *Scientific Reports*. 2020;10(1):12342.

19. Kalfert D, Ludvikova M, Pesta M, Ludvik J, Dostalova L, Kholová I. Multifunctional Roles of miR-34a in Cancer: A Review with the Emphasis on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Thyroid Cancer with Clinical

Implications. *Diagnostics* (Basel). 2020;10.([^])

20. Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2011;22(10):2257-66.

21. Lee SW, Park KC, Kim JG, Moon SJ, Kang SB, Lee DS, et al. Dysregulation of MicroRNA-196b-5p and MicroRNA-375 in Gastric Cancer. *J Gastric Cancer*. 2016;16(4):221-9.

22. Juzenas S, Salteniene V, Kupcinskas J, Link A, Kiudelis G, Jonaitis L, et al. Analysis of Deregulated microRNAs and Their Target Genes in Gastric Cancer. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132327.



Evaluation of expression level of circulating miR-34a and miR-375 in the plasma of gastric cancer patients in Guilan province

Tolou Babaei Hemmaty¹, Najmeh Ranji², Fatemeh Safari³

1-Ph.D student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Corresponding Author : : n_ranji@iaurasht.ac.ir

3-Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

Received:2022.06. 25

Accepted: 2022.01.18

Abstract

Background and aim: Gastric cancer is the sixth most frequent malignancy and the fourth leading cause of cancer death in the world with poor survival rate. Early detection may increase patient's survival and reduce mortality. miRNAs are small non-coding RNAs which function as negative regulators of genes expression in post-transcriptional level. The aim of this study was to evaluate the expression of miR-34a and miR-375 in the plasma of gastric cancer patients in Guilan province.

Materials & Methods: In this study, 25 gastric cancer patients and 25 healthy individuals in Guilan province during 2018-2019 were enrolled. The expression of miR-34a and miR-375 was evaluated in plasma of patients with Gastric cancer and healthy individuals by Q-RT-PCR method. The correlation between their expression and patient's clinicopathological characteristics was also investigated. ROC curve analysis of the miRNAs was performed.

Results: There was no significant difference in the plasma level of miR-34a and miR-375 in gastric cancer patients compared to control. There was no significant difference between the the plasma level of miR-34a and miR-375 and clinicopathological features of patients. Area under the curve (AUC) value of ROC analysis for miR-34a was 0.56 ± 0.08 ($P=0.42$). Area under the curve (AUC) value of ROC analysis for miR-375 was 0.62 ± 0.08 ($P=0.14$).

Conclusion: Our results suggested that miR-34a and miR-375 probably don't be appropriate biomarkers for diagnosis of gastric cancer in Guilan province.

Key words: Gastric cancer, miR-34a, miR-37, Plasma, ROC analysis