



بررسی تغییر میزان بیان پلاسمایی miRNA-34a و miRNA-18a در نمونه‌های بالینی افراد مبتلابه سرطان روده بزرگ

سارا اسلامی‌زاده^۱، منصور حیدری^۲، حسین قاضی^۳، ابراهیم فقیه‌لو^۴، ابوالفضل اکبری^{۵*}

۱- گروه ژنتیک مولکولی - واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی - مرودشت - ایران.

۲- گروه ژنتیک مولکولی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات فارس - فارس - ایران.

۳- گروه ژنتیک مولکولی - دانشکده زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک - دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر - بوشهر - ایران.

۴- مرکز تحقیقات چشم پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران.

۵- گروه میکروبیولوژی - دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران.

۶- مرکز تحقیقات کولورکتال - دانشگاه علوم پزشکی ایران - تهران - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲

چکیده

مقدمه: تشخیص زودهنگام تومورهای سرطان روده بزرگ یکی از مهمترین چالش‌های مدیریت سرطان است. miRNAs گروهی از RNAهای غیرکدکننده هستند که بیان ژن‌های هدف را در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌کنند. عدم تنظیم miRNAs در ارتباط با انواع سرطان‌ها از جمله سرطان روده بزرگ گزارش شده است. هدف از این مطالعه بررسی میزان تغییر بیان miRNAs در نمونه‌های پلاسمای بیماران سرطان روده بزرگ و ارزیابی قدرت تشخیصی آنها بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موردی-شاهدی ۷۴ نمونه پلازما از بیماران مبتلابه سرطان روده بزرگ (stage II-IV) و ۳۶ نمونه سالم به‌عنوان کنترل جمع‌آوری شدند. miR-18a, miR-146b, miR-181b, miR-34a انتخاب و میزان بیان آنها با تکنیک qRT-PCR ارزیابی شد. سپس تجزیه و تحلیل‌های آماری برای بررسی ارتباط میزان بیان miRNAs با ویژگی‌های کلینیکیوپاتولوژیک بیمار انجام شد.

نتایج: میزان بیان miR-34a و miR-18a در نمونه‌های پلاسمای بیماران سرطانی (stage II-IV) نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش معناداری را نشان داد (P < ۰/۰۰۱). سطح زیر نمودار ROC (AUC) برای miR-18a با AUC (0.85) و P < ۰/۰۰۱ و برای miR-34a با AUC (0.74) و P < ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود. miR-181b و miR-146b تغییر بیان چشمگیری را بین نمونه‌های بیمار و کنترل نشان ندادند (P > ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که سطوح بیان miR-34a و miR-18a پلاسمایی بیماران سرطان روده بزرگ به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به کنترل افزایش می‌یابند که ممکن است بتوانند برای روشن کردن مکانیزم‌های مولکولی مسیر سرطان‌زایی روده بزرگ کمک کنند و نیز به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی تومور مطرح باشند.

واژه‌های کلیدی: پلازما، سرطان روده بزرگ، miR-34a، miR-18a

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، مرکز تحقیقات کولورکتال، تلفن: ۰۲۱۶۶۵۵۴۷۹۰، نمابر: ۰۲۱۶۶۵۵۴۷۹۰، Email: akbari.ab@iums.ac.ir

ارجاع: اسلامی‌زاده سارا، حیدری منصور، اکبری ابوالفضل، قاضی حسین، فقیه‌لو ابراهیم. بررسی تغییر میزان بیان پلاسمایی miRNA-34a و miRNA-18a در نمونه‌های بالینی افراد مبتلابه سرطان روده بزرگ. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳(۳): ۲۲-۳۲.

مقدمه

سرطان روده بزرگ (CRC) یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین سرطان‌های تشخیصی در سراسر جهان محسوب می‌شود و امروزه در میان جمعیت‌های آسیایی، میزان بروز و مرگ و میر CRC به سرعت در حال افزایش است (۱). از آنجایی که این بدخیمی به‌طور عمده بدون علامت است و اغلب در مرحله آخر با پیش‌آگهی ضعیف تشخیص داده می‌شود، لذا یافتن روش‌های تشخیص زودهنگام و درمان به موقع می‌تواند به‌طور قابل توجهی وقوع بیماری و مرگ و میر را کاهش دهد. متأسفانه همه روش‌های کنونی غربالگری معمول برای شناسایی بیماری نظیر تست خون مخفی در مدفوع (FOBT)، سیگموئیدوسکوپی و حتی کولونوسکوپی به‌عنوان روش استاندارد طلایی محدودیت‌های متعددی دارند. از جمله اینکه این روش‌ها تهاجمی و گران هستند، به راحتی در دسترس نیستند و برای برخی افراد خوشایند نمی‌باشند. از این رو امروزه تمرکز جوامع علمی در جستجوی بیومارکرهای غیرتهاجمی از جمله بیومارکرهای سهل الوصول و قابل اعتماد مبتنی بر خون برای شناسایی زودهنگام و درمان مؤثر سرطان روده بزرگ است (۲ و ۳).

امروزه بحث ریبونوکلیئیک اسیدهای کوچک یا micro RNA (miRNA)ها و الگوی بیان آنها در سرطان‌ها مبحث جدید و گسترده‌ای را در آنکولوژی به خود اختصاص داده است. miRNA کلاسی از RNAهای کوچک غیر کدکننده می‌باشند که اخیراً به‌عنوان تنظیم‌گرهای بیان ژن در ارگانیسم‌های یوکاریوتیک شناخته شده‌اند. miRNAها در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک نقش دارند و بیان نامنظم آنها در بسیاری از بیماری‌ها و سرطان‌ها از جمله سرطان‌های روده بزرگ مشاهده شده است (۴). بسیاری از پروتئین‌های دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی کلیدی سرطان روده بزرگ نظیر مسیرهای PI3 کیناز، Wnt-کاتنین، KRAS، P53 و TGF تحت تنظیم miRNAها هستند و نقش برخی از miRNAها در سرطان‌های روده بزرگ به‌عنوان آنکوژن و یا سرکوبگر تومور در مطالعات اخیر مورد تأیید واقع شده است (۵ و ۶). جریان خون و سایر مایعات بدن در بیماران سرطان روده بزرگ حاوی مقادیری از این miRNAهای تغییر بیان‌یافته بوده و تغییرات سطح پلاسمايي miRNAها می‌تواند شاخصی برای تغییرات پاتولوژیک باشد (۷). این miRNAها بسیاری از ویژگی‌های یک بیومارکر ایده‌آل را دارند. به‌عنوان مثال این مولکول‌ها در برابر آگزونوکلئازها، دمای بسیار بالا، PH بالا، مدت زمان بالای نگهداری و یا در برابر یخ زدن‌های مکرر، مقاوم هستند. بنابراین miRNAهای در گردش و پروفایل بیان آنها در پلاسما پتانسیل بالایی برای تبدیل شدن به‌عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی نوین دارند (۸ و ۹).

طبق مطالعات اخیر mir-18a به‌عنوان miRNA آنکوژنیک مطرح است. که با پیشبرد تقسیم سلولی، سرکوب آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) و القای آنژیوژنز (رگ‌زایی) در تسریع پیشرفت تومور نقش دارد و بیان بالای mir-18a در سرطان معده، هپاتوسلولار، پانکراس و روده بزرگ گزارش شده است (۱۰). اگرچه مقالات اخیر نقش سرکوبگر توموری آن را نیز با مهار Kras و CDC42 نشان داده‌اند (۱۱). mir-34a نیز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های سرکوب تومور مطرح است. بیان کاهش‌یافته این miRNA در انواع مختلفی از سرطان‌ها گزارش شده است و از طریق تنظیم تعداد زیادی از ژن‌های دخیل در مسیرهای آنکوژنیک، از رشد تومورها جلوگیری می‌کند (۱۲). اگرچه برخی مطالعات افزایش بیان آن را نیز در مراحل پیشرفته و متاستاتیک سرطان روده بزرگ مطرح کرده‌اند (۱۳). علاوه بر این طبق مطالعات جدید miR-18a در تنظیم مثبت و miR-34a در تنظیم منفی بیان پروتئین‌های Orai3 که در پیشرفت سرطان پستان، پروستات و ریه گزارش شده است، دخیل بوده‌اند (۱۴). با توجه به گزارشات متنوع و اهمیت نقش تنظیمی miR-18a، miR-34a، miR-181b و miR-146b در سرطان‌زایی، این مولکول‌ها انتخاب (۱۰ و ۱۵) و بیان پلاسمايي آنها در مراحل مختلف سرطان روده بزرگ، به‌منظور ارزیابی قدرت تشخیصی آنها به‌عنوان یکی از زیست‌نشانگرهای غیرتهاجمی بیماری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه موردی-شاهدی، گروه مورد نمونه‌های خون ۷۴ بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های حضرت رسول اکرم (ص) و امام‌خميني (ره) تهران می‌باشند که بر اساس کولونوسکوپی و علائم بالینی، به‌عنوان بیمار مورد تأیید پزشک قرار گرفتند. گروه کنترل نیز خون ۳۶ فرد کولونوسکوپی شده هستند که بر اساس علائم فاقد هرگونه بدخیمی و بیماری عفونی بودند. در واقع، مشارکت افراد داوطلبانه بود و همه شرکت‌کنندگان از هدف پروژه مطلع بودند. بیماران هیچ شیمی درمانی دریافت نکرده بودند. همچنین همه شرکت‌کنندگان اعلام کردند که دو ماه قبل از ورود به مطالعه هیچ درمان دریافت نکردند. پس از اخذ رضایت‌نامه از افراد تحت مطالعه، نمونه‌های خونی و بافتی بیماران و افراد کنترل جمع‌آوری شد. در ضمن مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد IR.IUMS.REC 1394.26649 مورد تصویب قرار گرفته است. نسبت شاهد به مورد در مطالعه به‌طور یکسان انتخاب شد. با توجه به سن و جنس، افراد سالم با بیماران سرطانی همسان شدند. متغیرهای مستقل اصلی که مورد بررسی قرار می‌گیرد miR-18a، miR-34a، miR-181b و miR-146b می‌باشند که در نمونه‌های پلاسما بیماران مورد

بررسی‌های آماری: آنالیز آماری با استفاده از SPSS22 انجام شد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{Standard Deviation}$ گزارش شد. از آزمون One sample Kolmogorov Smirnov جهت نرمال یا غیرنرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. در این آنالیز همچنین از آزمونهای T-Test جهت بررسی روابط میان متغیرها استفاده شد. سپس تجزیه و تحلیل مساحت زیر نمودار ROC و یا AUC، برای پی بردن به ارزش تشخیصی این مارکرها انجام گرفت. ارتباط معنادار آماری به صورت $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه تعداد ۷۴ نمونه خون از بیماران مبتلابه سرطان روده بزرگ شامل ۳۶ بیمار با مرحله (۵۲/۷ درصد) II، ۳۰ بیمار با مرحله (۴۰/۵ درصد) III، ۵ بیمار با مرحله (۶/۷ درصد) IV جمع‌آوری شد. بیماران شامل ۴۸ مرد (۴۶/۸۶ درصد) و ۲۶ زن (۳۵/۱۳ درصد) بودند با رده سنی بین ۲۹ تا ۸۴ سال (میانه سن: ۴۹/۶). از میان بیماران تعداد ۴۷ (۶۳/۵ درصد) تومور رکتوم و تعداد ۲۷ (۳۶/۵ درصد) تومور کولون داشتند. سایر مشخصات بالینی بیماران در (جدول ۱) خلاصه شده است.

جدول ۱- مشخصات کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران مبتلابه سرطان روده بزرگ

متغیر	مشخصات کلینیکی و پاتولوژیکی	(N=۷۴) تعداد نمونه‌ها
سن	≥ 55	۳۳
	< 55	۴۱
جنس	مرد	۴۸
	زن	۲۶
مرحله بالینی سرطان	II	۳۹
	III	۳۰
	IV	۵
محل تومور	کولون	۲۷
	رکتوم	۴۷
تهاجم عروق خونی و لنفاوی	مثبت	۴۶
	منفی	۲۸
	بالا	۱۱
تمایز	متوسط	۵۹
	ضعیف	۴

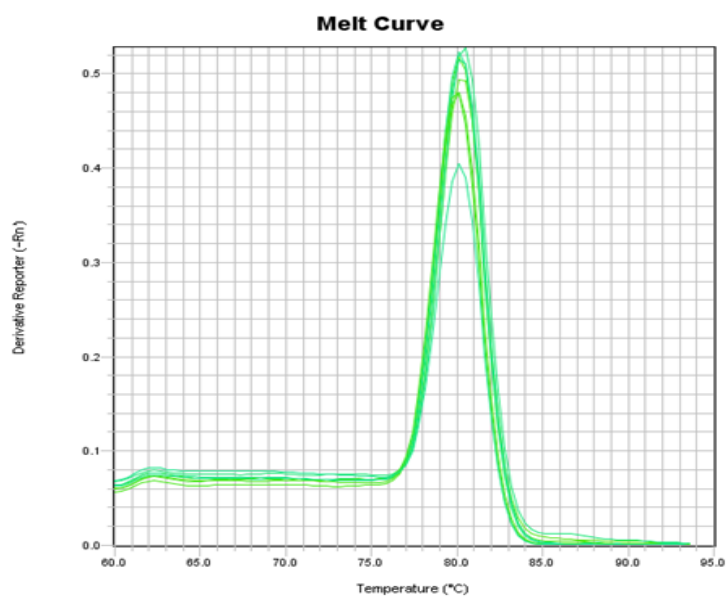
در این منحنی شدت فلورسنت در برابر دمای ذوب DNA دو رشته ای ترسیم می‌گردد و با توجه به پیک‌های ایجاد شده می‌توان تعداد آمپلیکون‌های تکثیر شده را شناسایی کرد. وجود یک پیک در منحنی ذوب miRNAs و RNU6B نشان‌دهنده‌ی صال اختصاصی پرایمرها و عدم وجود دایمر می‌باشد (شکل ۱ و ۲).

بررسی قرار گرفتند. برای هر دو گروه بیمار و شاهد فرم جمع‌آوری اطلاعات مشابهی در نظر گرفته شد و اطلاعات کاملی در مورد مشخصات فردی (نام و نام خانوادگی، سن، جنس و ..) و سایر اطلاعات پزشکی بیمار از جمله سابقه برخی بیماری‌ها که باعث خروج فرد از مطالعه می‌شد، جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌گیری با روش مقطعی، مستمر و مبتنی بر احتمال صورت پذیرفت. حجم نمونه توسط نرم‌افزار Power-G، ۷۴ نفر در گروه بیمار و ۳۶ نفر در گروه کنترل قرار گرفتند. تهیه پلاسما از بیماران: ۶ میلی‌لیتر نمونه خون در لوله‌های خون‌گیری خلاء EDTA دار انسانی از نمونه‌های بیمار و کنترل گرفته شد و پس از انتقال به پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی ایران، به منظور جداسازی پلاسمای نمونه‌ها از روش جداسازی شیب چگالی و فایکول استفاده شد (۱۶). سپس مایع بالایی حاوی پلاسما در میکروتوب‌های ۲ میلی‌لیتری عاری از نوکلئازها ذخیره و در دمای -80°C نگهداری شدند.

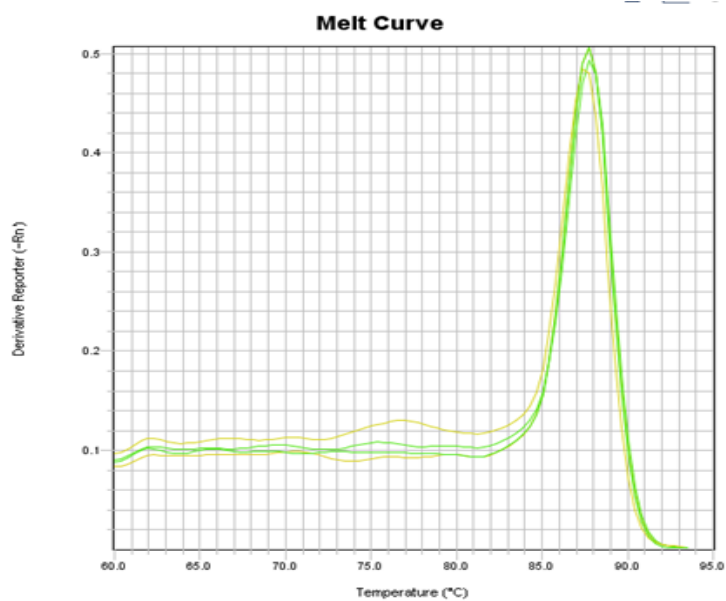
استخراج RNA توتال: برای استخراج RNA تام (توتال) از کیت استخراج RNA Plus (sinaclon) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. سپس برای ارزیابی غلظت آنها از UV اسپکتروفتومتری ($A_{260}/A_{280} > 2.0$; $A_{260}/A_{230} > 1.8$) استفاده گردید و در دمای -80°C نگهداری شدند.

سنتز cDNA: برای ساخت cDNA از روی miRNAها از کیت (Ampliqon) استفاده شد و طبق پروتوکول ابتدا به انتهای ۳ تمام miRNAs با استفاده از آنزیم Poly A Polymerase دم پلی A اضافه شد. سپس با استفاده از پرایمر Oligo dT-VN و آنزیم Revers-Transcriptase از تمام RNAهای کوچک cDNA ساخته شد.

انجام واکنش: Real time PCR بیان miRNA با استفاده از روش PCR در زمان واقعی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اندازه‌گیری شد (۳ و ۱۷). واکنش PCR در سه تکرار و با استفاده از دستگاه Rottor Gene Q (Qiagen, USA) انجام شد و برای نرمالیزه کردن بیان نسبی miRNAs در پلاسما از ژن خانه‌دار RNU6B به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و سپس داده‌های مربوطه بیان ژن با نرم افزار تحلیل و آنالیز بیان ژن REST (Relative expression software tool) در این نرم‌افزار برای هر نمونه یک CT (چرخه آستانه: شماره چرخه‌ای که در آن نور فلورسانس از حد آستانه عبور می‌کند) مشخص می‌شود. هرچه میزان الگوی اولیه بیشتر باشد، شماره این چرخه کوچکتر است و سپس با استفاده از فرمول $\Delta Ct = Ct_{\text{CRC}} - Ct_{\text{control}}$ - برای بررسی میزان تغییرات بیان ژن استفاده شد. میزان بیان ژن به روش $\log_{10} (2^{-\Delta\Delta Ct})$ تجزیه و تحلیل شد.



شکل ۱- منحنی ذوب miR-18a در نمونه‌های پلاسمایی سرطان روده بزرگ: محور افقی دما بر حسب °C و محور عمودی میزان فلورسانت است.

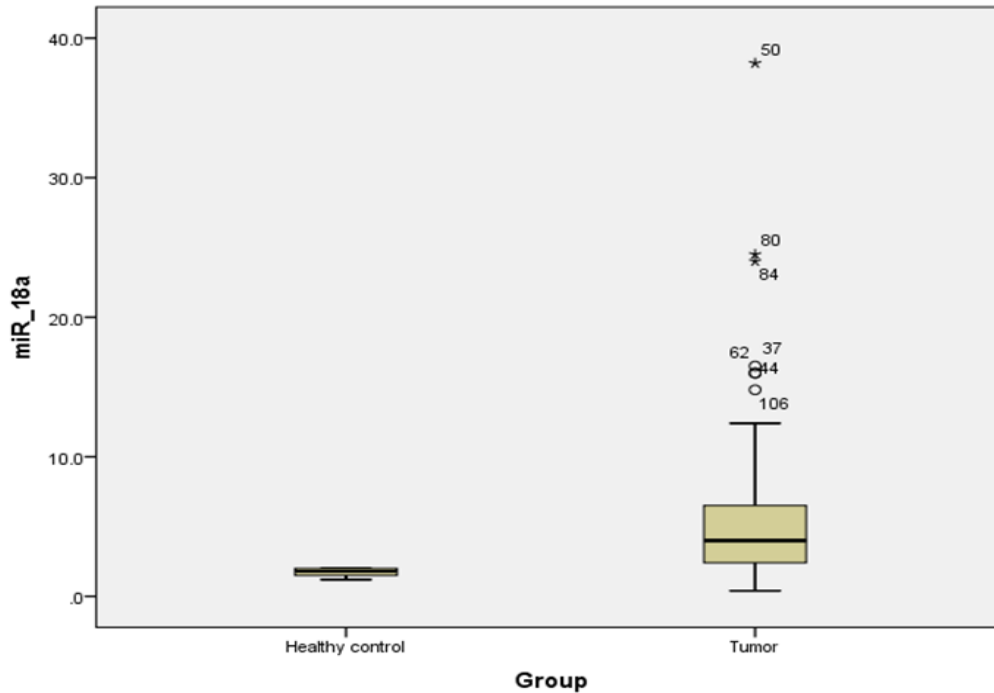


شکل ۲- منحنی ذوب miR-34a در نمونه‌های پلاسمایی سرطان روده بزرگ: محور افقی دما بر حسب °C و محور عمودی میزان فلورسانت است.

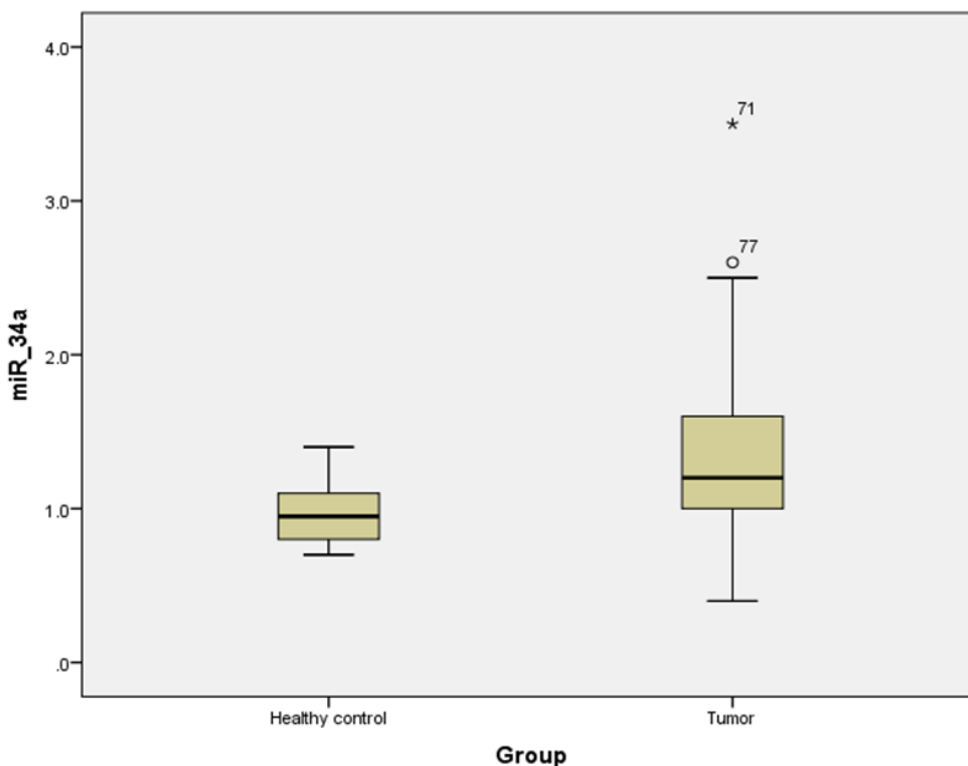
نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها برای مقایسه‌ی بیان پلاسمایی miR-34a بین افراد سالم و بیمار نشان داد که میزان بیان این microRNA در پلاسما افراد بیمار نسبت به افراد سالم افزایش می‌یابد. این افزایش بیان ژن از نظر آماری معنادار است ($P < 0/001$) (شکل ۴). miR-146b و miR-181b تغییر بیان چشمگیری را بین نمونه‌های بیمار و کنترل نشان ندادند ($P > 0/05$).

نتایج حاصل از مقایسه بیان miR-18a و miR-34a در پلاسما افراد سالم و بیمار:

نتایج تست Mann-Whitney U برای مقایسه بیان miR-18a بین افراد سالم و بیمار نشان داد که میزان بیان این microRNA در پلاسما افراد بیمار نسبت به افراد سالم افزایش می‌یابد. این افزایش بیان ژن از نظر آماری معنادار است ($P < 0/001$) (شکل ۳).



شکل ۳- نمودار مقایسه‌ای بیان نسبی miR-18a در پلاسمای افراد سالم و سرطانی



شکل ۴- نمودار مقایسه‌ای بیان نسبی miR-34a در پلاسمای افراد سالم و سرطانی

کلینیکوپاتولوژیکی مانند سن، جنس، اندازه تومور، تمایز تومور و تهاجم عروقی و لنفاوی (LVI) وجود نداشت ($P > 0.05$).

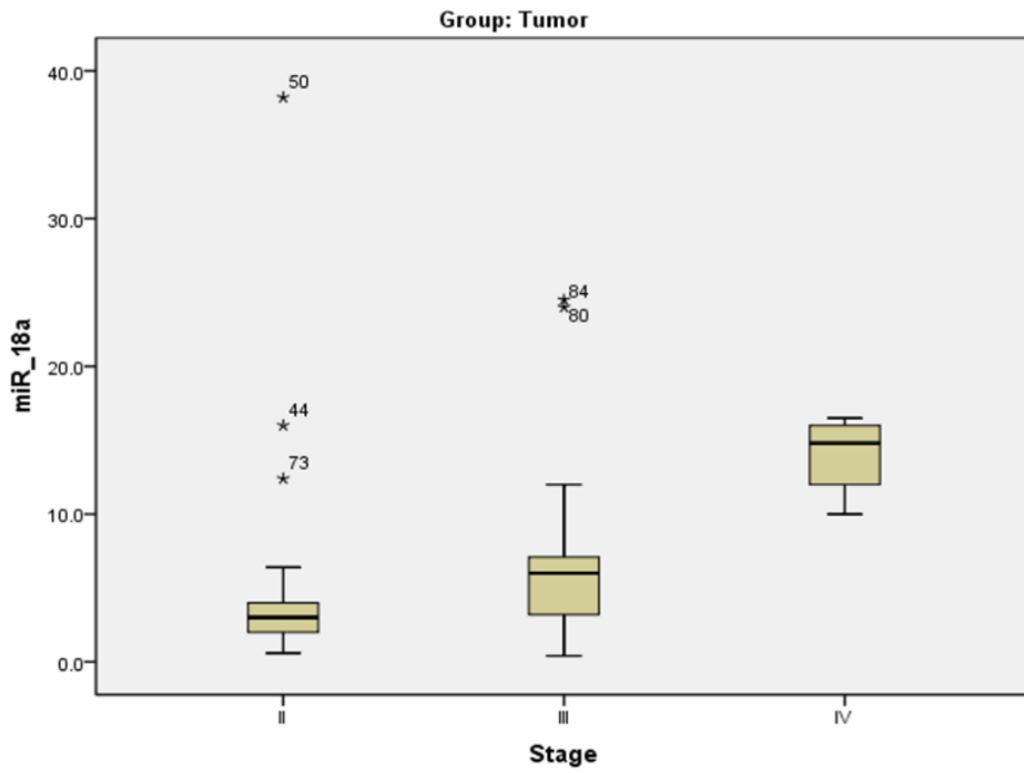
برای تأیید ارزش تشخیصی miRNAs تجزیه و تحلیل منحنی ROC انجام شد. این آزمون دقت قابل توجهی را در تشخیص بیماران CRC از افراد سالم نشان داد. ارزیابی کاربرد تشخیصی miR-18a پلاسمایی در سرطان روده بزرگ با استفاده از ROC نشان داد که سطح زیر نمودار (AUC) برای این ژن ۰/۸۵۴ می‌باشد. همچنین اختصاصیت ۷۳٪ و حساسیت ۸۴٪ در نقطه cut off برابر با ۱/۹ مشاهده شد. این نتایج نشان داد که تغییر بیان miR-18a می‌تواند برای سرطان روده بزرگ ارزش تشخیصی داشته باشد. ارزیابی کاربرد تشخیصی miR-34a پلاسمایی در سرطان روده بزرگ با استفاده از ROC نشان داد که سطح زیر نمودار (AUC) برای این ژن ۰/۷۴۲ می‌باشد. همچنین اختصاصیت ۳۱٪ و حساسیت ۶۴٪ در نقطه cut off برابر با ۱/۰۵ مشاهده شد (شکل ۷).

بررسی ارتباط بیان miR-18a و miR-34a پلاسمایی با خصوصیات کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران:

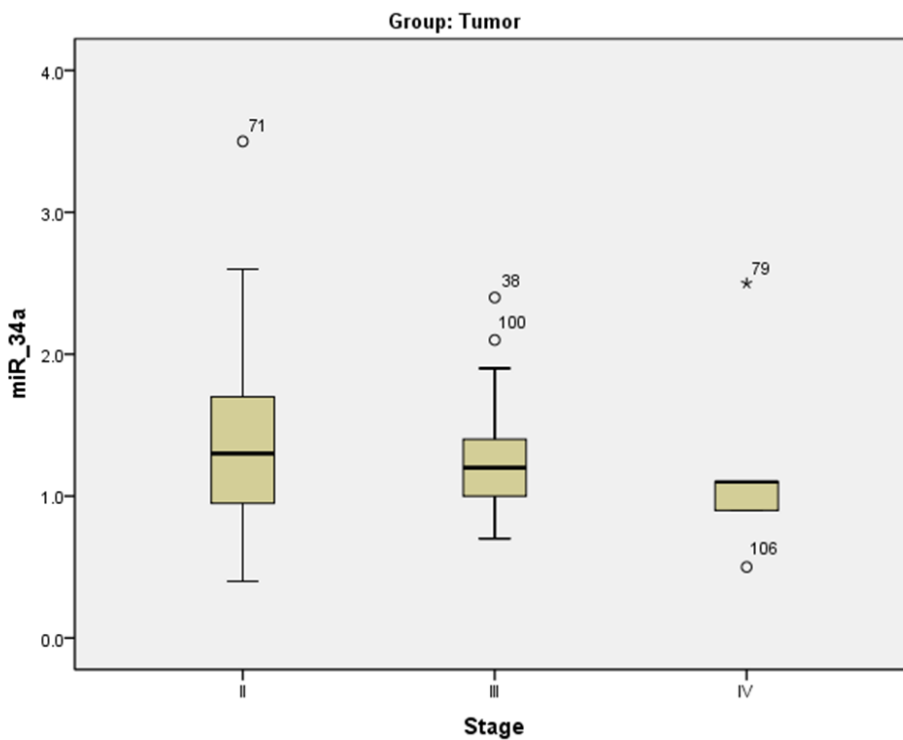
نتایج نشان دادند که افزایش بیان miR-18a در نمونه‌های پلاسمای بیماران CRC در مقایسه با نمونه‌های پلاسمای سالم به طور قابل توجهی با مراحل تومور (II,III,IV) در ارتباط است ($P < 0.05$). همچنین افزایش بیان معناداری بین بیماری با مرحله II و IV مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل ۵)

نتایج ما نشان داد که افزایش بیان miR-34a در نمونه‌های پلاسمای بیماران CRC در مقایسه با نمونه‌های پلاسمای سالم به طور قابل توجهی با مراحل تومور (II,III) در ارتباط است ($P < 0.05$). اگرچه بین مراحل مختلف بیماری و تغییر بیان miR-34a ارتباط معناداری مشاهده نشد ($P < 0.05$) (شکل ۶).

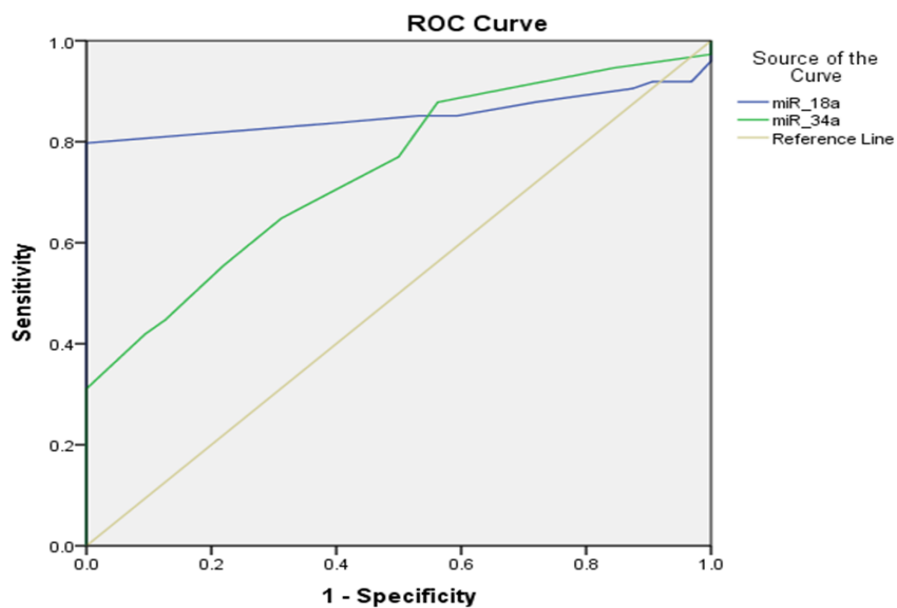
تجزیه و تحلیل‌های بیشتر نشان داد که هیچ رابطه قابل توجهی بین سطوح پلاسمایی miR-18a و miR-34a و سایر ویژگی‌های



شکل ۵- نسبت بیان miR-18a در گروه‌های توموری (II-IV) به گروه کنترل



شکل ۶- نسبت بیان miR-34a در گروه‌های توموری (II-IV) به گروه کنترل



Diagonal segments are produced by ties.

شکل ۷- منحنی ROC مربوط به میزان پلاسمایی miR-18a و miR-34a برای افتراق دادن افراد بیمار از کنترل

بحث

ممکن است در ناکارآمدی پردازشش نقش داشته باشد. بنابراین به نظر می‌رسد برخلاف سایر اعضای خانواده miR-17-92 که نقش آنکوژنیک اصلی در پیشرفت سرطان دارند، miR-18a احتمالاً نقش برعکس در کاهش تکثیر سلولی دارد و ممکن است نقش هموستاتیک در انجام عملکرد آنکوژنیک سایر اعضای این خانواده داشته باشد (۱۱). با مطالعه گسترده در سرم بیماران CRC با میکرو اری انجام شد و بیان بالای miR-18a به عنوان یکی از بیومارکرهای تشخیصی معرفی شد (۲۵). در مطالعه جدید دیگری افزایش بیان miR-18a و miR-29a در گردش، در مرحله III بیماران سرطان روده بزرگ مشاهده و به عنوان بیومارکر برای غربالگری معرفی شدند (۲۳). در مطالعه ما، سطح بیان miR-18a در نمونه‌های پلاسمایی به طور چشمگیری بالا بود ($P < 0.05$) و آنالیزهای آماری نشان داد که miR-18a پلاسمایی با اختصاصیت و حساسیت بالا و AUC (0.85) می‌تواند به عنوان بیومارکر غیر تهاجمی سرطان روده بزرگ مطرح باشد. مطالعه ما نشان داد که سطح بیان miR-18a با افزایش مرحله تومور نسبت معنی‌داری دارد و در مراحل پیشرفته (IV) نسبت به مرحله (II) به طور معنی‌داری بالاتر است ($P < 0.05$). این یافته‌ها تأیید کننده مطالعات تجربی گذشته در رابطه با افزایش سطح بیان این miRNA در سرطان روده بزرگ و معرفی آن به عنوان زیست نشانگر برای تشخیص و پیش آگهی بیماری است.

miR-34a روی کروموزوم 1p36-23 قرار گرفته است و عدم بیان این miRNA در بسیاری از سرطان‌ها گزارش شده است. miR-34a به عنوان یک miRNA مهارکننده تومور مطرح است که مستقیماً به وسیله p53 فعال می‌شود (۱۲). ژن‌های هدف miR-34a مثل E2F5 و CDK4 در مسیرهای تقسیم سلولی و آپوپتوز فعالیت دارند (۲۶). این ژن در سرطان‌هایی مثل نوروبلاستوما حذف شده و یا با متیلاسیون در ناحیه پروموتوری بیان مهار شده دارد (۲۷). miR-34a با سرکوب ژن SIRT1 می‌تواند باعث فعال شدن آپوپتوز شود (۲۸). ارتباط بین miR-34a و p53 در رده‌های سلولی سرطان‌های مختلف از جمله رده سلولی HCT116 سرطان کولون گزارش شده‌اند (۲۹). مطالعات اخیر miR-34a را در ارتباط با سرکوب متاستاز سرطان روده بزرگ مطرح می‌کند که از عود سرطان روده بزرگ به واسطه متوقف کردن تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم با واسطه p53 جلوگیری می‌کند (۲۹). مطالعات مختلف کاهش و یا افزایش بیان miR-34a را در سرطان روده بزرگ نسبت به سالم گزارش داده‌اند. اخیراً مطالعه دیگری نشان می‌دهد که بیان افزایش یافته miR-155، miR-34a و miR-200c با توسعه

سرطان روده بزرگ اغلب در مراحل پیشرفته با پیش آگهی ضعیف تشخیص داده می‌شود. لذا نیاز جدی برای پیداکردن روش‌های تشخیصی غیرتهاجمی، با اختصاصیت و حساسیت بالا برای تشخیص زود هنگام سرطان روده بزرگ احساس می‌شود (۱۸ و ۱۹). miRNAهای اختصاصی بافت ممکن است به جریان خون آزاد شود و بنابراین بیان تغییر یافته آنها می‌تواند در مسیرهای در حال گردش منعکس شود (۸ و ۲۰). امروزه miRNAهای موجود در سرم به عنوان زیست نشانگرهای غیرتهاجمی در انواع مختلفی از بدخیمی‌ها، از جمله سرطان روده بزرگ گزارش شده‌اند. برخی از اسید نوکلئیک‌ها در طی مکانیسم انعقاد از سلول‌های خونی به سرم رها می‌شوند، از طرف دیگر miRNAهای در حال گردش مشتق شده از بافت تومور نیز می‌توانند در نمونه‌های سرمی نوسان یابد (۲۱). بنابراین از آنجا که سرم ممکن است به طور بالقوه حاوی miRNAهای حاصل از سلول‌های خونی طی مکانیسم انعقادی باشد، ما نمونه‌های پلاسمای را به عنوان یک منبع قابل اعتماد از miRNAهای در حال گردش مشتق شده از بافت تومور قرار دادیم (۲۲). در این مطالعه ما پس از مطالعه گسترده مطالعات پیشین، انجام مطالعه بیوانفورماتیک و نیز تأیید نقش بیولوژیک این دو مولکول در ایجاد و پیشرفت سرطان روده بزرگ، چهار miRNA شامل miR-18a، miR-34a، miR-181b و miR-146b را انتخاب و سپس بیان آنها را در نمونه‌های پلاسمای بیماران مراحل مختلف CRC با افراد سالم مقایسه کردیم.

miR-18a یک بخش از خانواده ژنی miR-17-92 است و روی بازوی بزرگ کروموزوم ۱۳ قرار گرفته است و معمولاً به عنوان miRNA آنکوژنیک مطرح است. miR-17-92 قادر به پیشبرد تقسیم سلولی، سرکوب آپوپتوز و القای آنژیوژنز و تسریع پیشرفت تومور می‌شود (۱۱). طبق برخی مطالعات بیان بالای miR-18a در سرطان معده، هپاتوسلولار، پانکراس و روده بزرگ مطرح شده است (۱۰). در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ افزایش بیان miR-18a با پیش آگهی ضعیف بیماری (poor prognosis) در ارتباط است. مطالعات نشان داده است که سطح سرمی miR-18a هم در مرحله III و هم در مراحل پایینتر سرطان روده بزرگ نسبت به گروه کنترل افزایش بیان داشته است (۲۳). طبق مطالعات miR-18a با هدف قرار دادن Kras و CDC42 در سرطان روده بزرگ به عنوان سرکوبگر تومور عمل می‌کند (۲۴). از طرف دیگر، miR-18a تنها عضو از این خانواده است که به hnRNPA1 برای پردازش نیاز دارد همچنین ساختار سوم این میر

- Abastabar M, Akbari A, Akhtari J, Hedayati MT, Shokohi T, Mehrad-Majid H, et al. In vitro antitumor activity of patulin on cervical and colorectal cancer cell lines. *Curr Med Mycol* 2017;3:25-9. doi:10.18869/acadpub.cmm.3.1.25
- Akbari A, Ghahremani MH, Mobini GR, Abastabar M, Akhtari J, Bolhassani M, et al. Down-regulation of miR-135b in colon adenocarcinoma induced by a TGF- β receptor 1 kinase inhibitor (SD-208). *Iran J Basic Med Sci* 2015;18:856-61.
- Eslamizadeh S, Heidari M, Agah S, Faghihloo E, Ghazi H, Mirzaei A, et al. The Role of MicroRNA Signature as Diagnostic Biomarkers in Different Clinical Stages of Colorectal Cancer. *Cell J* 2018;20:220-30. doi:10.22074/cellj.2018.5366
- Emami SS, Akbari A, Zare AA, Agah S, Masoodi M, Talebi A, et al. MicroRNA Expression Levels and Histopathological Features of Colorectal Cancer. *J Gastrointest Cancer* 2018. doi:10.1007/s12029-018-0055-x
- Mobini GR, Ghahremani MH, Amanpour S, Dehpour AR, Akbari A, Hoseiniharouni SM, et al. Transforming growth factor beta-induced factor 2-linked X (TGIF2LX) regulates two morphogenesis genes, Nir1 and Nir2 in human colorectal. *Acta Med Iran* 2016;54:302-7.
- Agah S, Akbari A, Talebi A, Masoudi M, Sarveazad A, Mirzaei A, et al. Quantification of plasma cell-free circulating DNA at different stages of colorectal cancer. *Cancer Invest* 2017;35:625-32. doi:10.1080/07357907.2017.1408814
- Fadakar P, Akbari A, Ghassemi F, Mobini GR, Mohebi M, Bolhassani M, et al. Evaluation of SD-208, a TGF- β -RI kinase inhibitor, as an anticancer agent in retinoblastoma. *Acta Med Iran* 2016;54:352-8.
- Mobini GR, Ghafari A, Amanpour S, Fateh R, Ghahremani MH, Muhammadnejad S, et al. In vivo identification of novel TGIF2LX target genes in colorectal adenocarcinoma using the cDNA-AFLP method. *Arab J Gastroenterol* 2018;19:65-70. doi:10.1016/j.ajg.2018.05.001
- Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Morimura R, Hirajima S, Tsujiura M, et al. Circulating miR-18a: a sensitive cancer screening biomarker in human cancer. *In Vivo* 2014;28(3):293-7.
- Humphreys KJ, McKinnon RA, Michael MZ. miR-18a inhibits CDC42 and plays a tumour suppressor role in colorectal cancer cells. *PLoS One* 2014;9:e112288. doi:10.1371/journal.pone.0112288
- Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15472-7. doi:10.1073/pnas.0707351104
- Aherne ST, Madden SF, Hughes DJ, Pardini B, Naccarati A, Levy M, et al. Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with colorectal cancer progression. *BMC cancer* 2015;15:329. doi:10.1186/s12885-015-1327-5
- Vashisht A, Tanwar J, Motiani RK. Regulation of proto-oncogene *Orai3* by miR18a/b and miR34a. *Cell calcium* 2018;75:101-11. doi:10.1016/j.ceca.2018.08.006
- Bu P, Chen KY, Chen JH, Wang L, Walters J, Shin YJ, et al. A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets Notch in colon cancer stem cells. *Cell stem cell* 2013;12:602-15. doi:10.1016/j.stem.2013.03.002
- Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunol* 2015;16:48. doi:10.1186/s12865-015-0113-0
- Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, Yanagisawa K, Hayashita Y, Ebi H, et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene* 2007;26:6099-105. doi:10.1038/sj.onc.1210425

سرطان روده بزرگ همراه است، در عین حال miR-34a ممکن است در توسعه و پیشرفت سرطان رکتوم دخیل باشد (۳۰). مطالعه جدید دیگری افزایش بیان miR-34a در حال گردش را در ارتباط با پیشرفت سرطان روده بزرگ و بیومارکر غیرتهاجمی مطرح کرد (۱۳). نتایج مطالعه ما نیز بیان بالای miR-34a را در نمونه‌های پلاسمایی سرطان روده بزرگ نسبت به سالم نشان داد که تأییدکننده مطالعات فوق است. اگر چه بیان کاهش یافته miR-34a نیز در نمونه‌های خون محیطی سرطان روده بزرگ نسبت به سالم گزارش شده است (۳۱). افزایش بیان سرمی این miR همچنین در بیماران مبتلا به هیپاتیت C مزمن و کبد چرب غیرالکلی گزارش شده است (۳۲). Burent و همکاران نیز به طور قابل توجهی بیان افزایش یافته miR-34a را در نمونه‌های بافتی مرحله III سرطان روده بزرگ نسبت به گروه‌های سالم مشاهده کردند که با نتایج ما مطابقت دارد (۲۳). در مجموع، نتایج ما نشان داد که سطح بیان miR-18a و miR-34a به صورت سیستماتیک در نمونه‌های پلاسمای تغییر می‌کند. علاوه بر این، سطح بیان افزایش یافته این miRNAs در ارتباط با مراحل مختلف بالینسرطان روده بزرگ است. تغییرات قابل پیش‌بینی در الگوهای بیان این miRNAها ممکن است در طی تومورزایی اتفاق بیفتد که ممکن است بتوانند نمایش دهنده پیشرفت سرطان روده بزرگ باشند.

پیشنهاد می‌شود، در مطالعات آتی جهت ارزیابی دقیقتر قدرت تشخیصی miR-18a و miR-34a، نمونه‌های بیشتری مورد ارزیابی قرار گرفته و از آزمون‌های دیگری نظیر میکروآری و ... استفاده شود. نتایج ما حاکی از افزایش بیان miR-18a و miR-34a در نمونه‌های پلاسمایی سرطان روده بزرگ است. این شواهد می‌تواند برای روشن شدن مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در سرطان‌زایی روده بزرگ مفید باشد. به عبارت دیگر، ترکیبی از بیومارکرهای مبتنی بر miRNAs و سایر آزمایش‌های غربالگری موجود، به همراه هم می‌تواند برای استراتژی‌های مناسب‌تر تشخیصی، پیش‌آگهی و درمان سرطان روده بزرگ مفید باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران بابت حمایت مالی اعلام می‌دارند.

References

- Akbari A, Mobini GR, Maghsoudi R, Akhtari J, Faghihloo E, Farahnejad Z. Modulation of transforming growth factorbeta signaling transducers in colon adenocarcinoma cells induced by staphylococcal enterotoxin B. *Mol Med Rep* 2016;13:909-14. doi:10.3892/mmr.2015.4596

25. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015;113:275-81. doi:10.1038/bjc.2015.201
26. Yan LH, Chen ZN, Li L, Chen J, Mo XW, Qin YZ, et al. E2f-1 promotes DAPK2-induced anti-tumor immunity of gastric cancer cells by targeting miR-34a. *Tumour Biol* 2016. doi:10.1007/s13277-016-5446-7
27. De Antonellis P, Carotenuto M, Vandenbussche J, De Vita G, Ferrucci V, Medaglia C, et al. Early targets of miR-34a in neuroblastoma. *Mol Cell Proteomics* 2014;13:2114-31. doi:10.1074/mcp.M113.035808
28. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13421-6. doi:10.1073/pnas.0801613105
29. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007;26:745-52. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.010
30. Wang M, Zhang P, Li Y, Liu G, Zhou B, Zhan L, et al. The quantitative analysis by stem-loop real-time PCR revealed the microRNA-34a, microRNA-155 and microRNA-200c overexpression in human colorectal cancer. *Med Oncol* 2012;29:3113-8. doi:10.1007/s12032-012-0241-9
31. Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget* 2014;5:872-81. doi:10.18632/oncotarget.1825
32. Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H. The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol* 2014;6:214-30. doi:10.1093/jmcb/mju003
18. Akbari A, Agah S, Heidari M, Mobini GR, Faghihloo E, Sarveazad A, et al. Homeodomain protein transforming growth factor beta-induced factor 2 like, X-linked function in colon adenocarcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18:2101-8. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2101
19. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS one* 2014;9:e92921. doi:10.1371/journal.pone.0092921
20. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10513-8. doi:10.1073/pnas.0804549105
21. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS one* 2012;7:e41561. doi:10.1371/journal.pone.0041561
22. Mirzaei A, Madjd Z, Kadijani AA, Tavakoli-Yaraki M, Modarresi MH, Verdi J, et al. Evaluation of circulating cellular DCLK1 protein, as the most promising colorectal cancer stem cell marker, using immunoassay based methods. *Cancer Biomarkers* 2016;17:301-11. doi:10.3233/CBM-160642
23. Brunet Vega A, Pericay C, Moya I, Ferrer A, Dotor E, Pisa A, et al. microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers. *Oncol Rep* 2013;30:320-6. doi:10.3892/or.2013.2475
24. Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis* 2009;30:953-9. doi:10.1093/carcin/bgp094



Evaluation of Differential Expression of MiR-18a and MiR-34a in Plasma Samples of Colorectal Cancer Patients

Sara Eslamizadeh (Ph.D.)^{1,2}, Mansour Heidari (Ph.D.)³, Hossein Ghazi (M.D.)⁴, Ebrahim Faghihloo (Ph.D.)⁵, Abolfazl Akbari (Ph.D.)^{6*}

- 1- Dept. of Molecular Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
- 2- Dept. of Molecular Genetics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
- 3- Dept. of Molecular Biology and Genetics, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran.
- 4- Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 5- Dept. of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 6- Colorectal Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 21 October 2018, Accepted: 23 November 2018

Abstract:

Introduction: The early diagnosis of colorectal tumors is one of the most important challenges in cancer management. MiRNAs are a group of non-coding RNAs that regulate posttranscriptional expression of target genes. Dysregulation of miRNAs has been reported in associated with a variety of malignancies, including colorectal cancers. This study aimed to analyze the differential expression of miRNAs in plasma samples of colorectal cancer (CRC) patients to examine their potential value as diagnostic biomarkers.

Methods: In this case- control study, 74 plasma samples of CRC patients with stage II-IV and 36 healthy controls were collected. miR-18a, miR-34a, miR-181b and miR-146b were selected. The expression level of the miRNAs was assayed by quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR). Then, statistical analyzes were performed to determine the relationship between miRNAs expression and clinical-pathological characteristics.

Results: The significantly elevated levels of miR-18a and miR-34a were detected in plasma samples compared to the healthy groups ($P < 0.001$). ROC showed an area under the ROC curve (AUC) of 0.85 and $P < 0.001$ for miR-18a, 0.74 and $P < 0.001$ for miR-34a. There were no significant dysregulation of miR-146b and miR-181b between patients and controls ($P > 0.05$).

Conclusion: Our results indicated that the expression levels of miR-18a and miR-34a are systematically elevated in CRC plasma samples. It might be helpful to illuminate the molecular mechanisms underlying CRC carcinogenesis and served as tumor-associated biomarkers for diagnosis.

Keywords: Plasma, Colorectal cancer, miR-34a, miR-18a

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: A. Akbari, Email: akbari.ab@iums.ac.ir

Citation: Eslamizadeh S, Heidari M, Ghazi H, Faghihloo E, Akbari A. Evaluation of differential expression of (miR-18a and miR-34a) in plasma samples of colorectal cancer patients. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2018;13(3):22-32.