Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Investigating the Expression Level of Mir-361 in Patients with Breast Cancer

S. Igder (PhD)[1], M. Sharifat (BSc)[2], S. Iranparast (PhD)[2], A. Tallaeizade (MD)[3], M. Ghasemi Deh Cheshmeh (MSc)[2], M. Rashno (PhD)[2], A. Ghadiri (PhD)[2], A. Amari (PhD)[2], A. Saeedi Boroujeni (PhD)[2], A. Khodadadi (PhD)[*3]

1.Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran.
2.Department of Immunology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran.
3.Cancer, Petroleum and Environmental Pollutants Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran.

*Corresponding Author: A. Khodadadi (PhD)
Address: Department of Immunology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran.
Tel: +98 (61) 33367543. **E-mail:** akhodadadi2@gmail.com

Article Type
Research Paper

Received:
Nov 10th 2023
Revised:
Jan 8th 2024
Accepted:
Mar 2nd 2024

ABSTRACT

Background and Objective: MicroRNAs are a new group of small regulatory RNAs, some of which are expressed differently in normal and tumor tissue. The aim of this study was to investigate the expression of miR-361 in breast tumor tissue of patients with breast cancer.

Methods: In this cross-sectional study conducted from January 2012 to February 2021 in Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, 30 breast cancer samples were grouped based on clinicopathological characteristics including tumor size, cancer stage, lymphovascular invasion, molecular subtypes, etc. Then, expression analysis was performed using Real-Time PCR, and the expression level of miR-361 gene in tumor and healthy samples and its relationship with clinicopathological characteristics were investigated.

Findings: The expression of miR-361 was significantly reduced by 1.5-fold in cancerous tissue compared to adjacent normal tissue, and this reduction in expression was only significantly associated with triple-negative breast cancer (TNBC) (p=0.02). The expression level was also significantly reduced in tumors larger than or equal to 3 cm (0.93±0.79) compared to smaller tumors (0.17±0.18) (p=0.031). The ratio of reduction in miR-361 expression in stages (I & II) compared to (III & IV) was 0.29±0.44 and 0.91±1.31, respectively (p=0.308). On the other hand, the ratio of decreased expression in the two groups with and without lymphovascular invasion was determined to be 0.39±0.33 (p=0.682) and 0.15±0.16 (p=0.547), respectively, but this difference was not statistically significant. The AUC for miR-361 for breast cancer diagnosis was 0.71 (p=0.031).

Conclusion: Based on the results of this study, and considering the role of miR-361 in breast cancer progression and its relationship with clinicopathological factors, it may be possible to introduce it as a new diagnostic marker in breast cancer.

Keywords: *Breast Cancer, miR-361, Real-Time PCR.*

Cite this article: Igder S, Sharifat M, Iranparast S, Tallaeizade A, Ghasemi Deh Cheshmeh M, Rashno M, et al. Investigating the Expression Level of Mir-361 in Patients with Breast Cancer. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2025; 27: e3.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

بررسی سطح بیان miR-361 در بیماران مبتلا به سرطان سینه

سمیه ایگدر (PhD)[1]، موسی شریفات (BSc)[2]، سارا ایرانپرست (PhD)[2]،
عبدالحسن طلایی زاده (MD)[3]، محمد قاسمی ده چشمه (MSc)[2]، محمد رشنو (PhD)[2]،
عطاالله غدیری (PhD)[2]، افشین آماری (PhD)[2]، علی سعیدی بروجنی (PhD)[2]، علی خدادادی (PhD)[3]*

۱. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. مرکز تحقیقات سرطان، نفت و آلاینده‌های محیطی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۹
اصلاح: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸
پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: microRNAها گروه جدیدی از RNAهای کوچک تنظیمی هستند که بیان بعضی از آن‌ها در بافت نرمال و توموری متفاوت است. هدف از این مطالعه بررسی بیان miR-361 در بافت تومورال پستان بیماران مبتلا به سرطان سینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی که از بهمن۱۳۹۰ تا اسفند ۱۳۹۹ در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام گردید، ۳۰ نمونه سرطان پستان بر مبنای ویژگی‌های کلینیکی پاتولوژیکی شامل اندازه تومور، stage سرطان، تهاجم لنفووسکولار و ساب تایپ‌های مولکولی و... گروه بندی شدند. سپس بررسی بیان با Real-Time PCR انجام شد و میزان بیان ژن miR-361 در نمونه‌های توموری و سالم و چگونگی ارتباط آن با ویژگی‌های کلینیکی- پاتولوژیکی بررسی گردید.

یافته‌ها: بیان miR-361 به طور معنی‌داری در بافت سرطانی در مقایسه با بافت نرمال مجاورش به میزان ۱/۵ برابر کاهش داشت و این کاهش بیان تنها با وضعیت سرطان پستان سه گانه منفی (TNBC) ارتباط معنی‌داری داشت (p=۰/۰۲). همچنین میزان بیان در تومورهایی با سایز بزرگتر و مساوی ۳ cm (۰/۷۹±۰/۹۳) در مقایسه با تومورهای کوچکتر (۰/۱۸±۰/۱۷) کاهش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۳۱). نسبت کاهش بیان miR-361 در Stageهای (I+II) در مقایسه با (III+IV) به ترتیب ۰/۴۴±۰/۲۹ و ۱/۳۱±۰/۹۱ به دست آمد (p=۰/۳۰۸). از طرف دیگر نسبت کاهش بیان در دو گروه با و بدون تهاجم لنفووسکولار به ترتیب ۰/۳۳±۰/۳۹ (p=۰/۶۸۲) و ۰/۱۶±۰/۱۵ (p=۰/۵۴۷) مشخص گردید اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. میزان AUC برای miR-361 جهت تشخیص سرطان پستان ۰/۷۱ به دست آمد (p=۰/۰۳۱).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه و با توجه به نقش miR-361 در پیشرفت سرطان پستان و با توجه به ارتباط آن با فاکتورهای کلینیکی پاتولوژیکی، شاید بتوان آن را به عنوان مارکر تشخیصی جدید در سرطان پستان معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، miR-361، Real-Time PCR.

استناد: سمیه ایگدر، موسی شریفات، سارا ایرانپرست، عبدالحسن طلایی زاده، محمد قاسمی ده چشمه، محمد رشنو و همکاران. بررسی سطح بیان miR-361 در بیماران مبتلا به سرطان سینه. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۴؛ ۲۷: e۳.

▣ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره CRC-9806 دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر علی خدادادی
آدرس: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی. تلفن: ۳۳۳۶۷۵۴۳-۰۶۱
رایانامه: akhodadadi2@gmail.com

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان با ۲۹٪ سرطان‌های تشخیص داده شده و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است. بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک ۲/۳ میلیون مورد سرطان پستان در سال ۲۰۲۰ تشخیص داده شده است (۱). از نظر بالینی، سرطان پستان یک بیماری هتروژن با زیر گروه‌هایی است که از لحاظ هیستوپاتولوژیک شامل گیرنده استروژن، پرژسترون مثبت/ منفی و گیرنده عامل رشد اپیدرمال انسانی مثبت/ منفی بر اساس فهرست بندی با استفاده از بیان ژن می‌باشد (۲).

microRNAها، RNAهای تک رشته‌ای غیر کد کننده کوچکی هستند (۲۴–۱۸نوکلئوتیدی) که با اتصال به ناحیه ترجمه نشده انتهای ´3 mRNAهای هدف بر میزان بیان آن‌ها تأثیر می‌گذارند. نقش و عملکرد microRNAها در بعضی سرطان‌ها به ویژه سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته است (۳). microRNAها در سرطان پستان، می‌توانند به عنوان یک انکوژن یا تومور ساپرسور عمل کنند. ارتباط گسترده microRNAها و mRNAهای هدف آن‌ها، فرآیندهای سلولی مهمی را در ارتباط با زیست شناسی سرطان پستان و بقای آن نشان داده است. سرطان پستان، یکی از اولین سرطان‌هایی می‌باشد که پروفایل بیانی microRNAها آن توصیف شده است. پروفایل بیانی microRNAها می‌تواند برای تمایز بین سلول‌های بافت سرطانی و نرمال در سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد (۴). افزایش بیان miR-21 از طریق هدف قرار دادن تومور ساپرسور ژن‌های TPM1، TIMP3 و RECK بقا و تکثیر سلولی در سرطان پستان ارتباط دارد. همچنین، افزایش بیان miR-21 با پیشرفت مراحل بالینی، پیش آگهی ضعیف و متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط است (۵). از طرف دیگر، microRNAهای کاهش بیان یافته miR-296 وmiR-31 تنظیم کننده ژن‌های آنکوژن‌های تیروزین کیناز گیرنده‌های HER2 و HER3 می‌باشند (۷و۶). بعضی ازmicroRNAها نقش دوگانه‌ای به عنوان آنکوژن و تومور ساپرسور بازی می‌کنند که به خاطر پیچیدگی شبکه‌های ژنی هدف microRNAها و سطح بیان رونوشت‌ها ژن‌ها می‌باشد. این نقش، می‌تواند به عنوان مراکز زیستی کلیدی کمک کننده به پیامد بیماری عمل کند (۸).

miR-361، یکی از miRNAهایی می‌باشد که دارای نقش دوگانه است و در منطقه ژنی Xq21.2 کروموزوم X انسان قرار گرفته است (۹). miR-361 در سرطان پستان کاهش بیان دارد و ویژگی‌های تومورساپرسوری آن در کارسینوم تیروئید پاپیلاری و سرطان‌های ریه و کولورکتال گزارش شده است (۱۲–۱۰). در مطالعه‌ای بر روی بیان miR-361 در ادنوکارسینوما بدخیم پروستات نشان داده شد که بیان miR-361 در بافت توموری نسبت به بافت سالم کاهش بیان بالایی دارد (۱۳). miR-361 باعث مهار رشد، تکثیر سلولی و متاستاز هپاتوسلولار کارسینوما و جلوگیری از بیان Twist1 می‌شود (۱۰). ارتباط بین افزایش بیان miR-361 و مهار سرطان پروستات در مطالعات نشان داده شده است. القا بیان miR-361، با تنظیم مهاری مسیر انتقال پیام signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) / B-cell lymphoma 2 (BCL-2)، تکثیر سلولی را کاهش می‌دهد و باعث القا آپوپتوز و مهار مهاجرت سلولی در سلول‌های سرطانی بدخیم پروستات می‌شود (۱۳). با این حال، نتایج متناقضی در مورد نقش miR-361 به عنوان یک انکوژن در تکامل سرطان دهانه رحم، تکثیر سلولی و تهاجم نیز اخیراً مشاهده شده است (۱۴).

تا آنجا که می‌دانیم، تغییرات بیانی miR-361 در سرطان پستان هنوز به طور کامل بررسی نشده است و برخی از مطالعات انسانی باید بر ویژگی‌های اپیدمیولوژیک این بیماری در جوامع آسیایی تمرکز کنند. علاوه بر این، با بررسی‌های ما تاکنون برای ارزیابی ارتباط تغییرات بیانی miR-361 در تمام زیر گروه‌های مولکولی و مراحل تکامل سرطان پستان مطالعه‌ای در جمعیت ایرانی انجام نشده است. بنابراین در این مطالعه اهمیت عملکردی و تشخیصی ارزشمند miR-361 در بیماران مبتلا به سرطان پستان در اهواز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد IR.AJUMS.REC.1398.354 بر روی ۳۰ نمونه بافت سرطانی پستان و بافت مجاور آن انجام شد. در مجموع ۶۰ نمونه از بیماران مراجعه کننده به مرکز جراحی بیمارستان تخصصی آپادانا در فاصله سال‌های ۹۹–۱۳۹۰جمع آوری گردید. نمونه‌های به دست آمده بلافاصله در نیتروژن مایع نگهداری شدند.کلیه بیماران مبتلا به سرطان پستان تأیید شده با پاتولوژی از نوع کارسینوم داکتال (IDC) و کارسینوم مجرای درجا (DCIS) بودند. بیماران مبتلا به هیستوپاتولوژی‌های دیگر سرطان پستان، بیمارانی که اطلاعات موجود در پرونده آن‌ها ناقص بود و بیمارانی که تحت درمان رادیوتراپی و شیمی درمانی قرار گرفته بودند، از مطالعه خارج شدند. قبل از شروع کار از تمامی بیماران رضایت نامه کتبی دریافت شد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

استخراج میکروRNA و سنتز cDNAهای کوچک: برای استخراج RNAهای کوچک (کمتر از صد نوکلئوتید) از کیت (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) miRNeasy استفاده شد. سپس اندازه‌گیری غلظت RNAهای کوچک توسط NanoDrop, Thermo Fisher Delaware Scientific, Wilmington, USA انجام و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای ساخت cDNA از (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) QuantiTect Kit استفاده شد. بر طبق پروتکل ابتدا با استفاده از آنزیم Poly A Polymerase به انتهای ´3 تمام میکرو RNAها دم poly A اضافه شد. سپس از پرایمر Oligo dT-VN استفاده شد. وقتی قطعه پرایمر مورد نظر به RNA هیبرید شد، آنزیم Revers-Transcriptase از انتهای پرایمر رشته مکمل را ساخت. با کمک این cDNA از تمامی RNAهای کوچک ساخته شد.

پلیمراز با زمان واقعی (Real Time PCR (RT-PCR: RT-PCR باکمک دو پرایمر انجام شد. پرایمر مستقیم مشابه سکانس miR-361 و پرایمر معکوس نیز مکمل ناحیه منحصر به فرد ´5پرایم Oligo dT VN است. در هر واکنش از ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر cDNA برای هر نمونه به صورت دوتایی (Duplicate) برای Real Time در دستگاه (Qiagen, USA) Applied Biosystems Step One استفاده شد. در ضمن برای نرمالیزه کردن بیان، از ژن خانه دار (House Keeping Gene) RNU6B استفاده شد. در نهایت میزان بیان نسبی ژن‌های هدف در نمونه‌های توموری نسبت به بافت نرمال کنار تومور بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای miR-361 و U6 برای Real-Time PCR

پرایمرها	توالی
حلقه ساقه-miR-361	3-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC……-5
فوروارد	3-CGCTAGTCCCGAAAGGTA-5
ریورس	3-CCAGTGCAGGTCCGAGGTA-5
حلقه ساقه-U6	3′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GA TAC GAC aaaata-5′
فوروارد	3′-CTC GCT TCG GCA GCACA-5′
ریورس	3-CCAGTGCAGGTCCGAGGTA-5

تکنیک ایمونوهیستوشیمی: برای ارزیابی وضعیت گیرنده استروژن، پروژسترون و میزان تکثیر سلول در تومورهای بافتی پستان از روش ایمینوهیستوشیمی استفاده شد. در این روش، تومورهای سرطانی پستان بعد از جراحی در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شدند. پس از ۳ ساعت فرمالین تعویض گردید و بعد از ۲۴ ساعت برای انجام پاساژ بافتی، نمونه‌ها در دستگاه Tissue processor قرار گرفتند. سپس عمل بلوک گیری انجام شد و بلوک‌های بافتی به ضخامت ۴ میکرومتر برش زده شدند و بر روی لام‌های پلی الایزین‌دار قرار گرفتند. بعد از پارافین زدایی، عملیات آب گیری و شفاف سازی انجام گرفت. بازیابی آنتی ژن‌ها با محلول سیترات بافر و دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد انجام به منظور مهار واکنش PBS شد. لام‌ها بعد از شستشو با زمینه در محلول پراکسید هیدروژن ۳٪ در متانول قرار گرفتند. بعد از شستشو، از آنتی بادی‌های ثانویه کونژوگه با آنزیم پراکسیداز استفاده شد. بعد از شستشو و قرار گرفتن با محلول سوبسترای پراکسیداز دی آمینو بنزیدین، عمل آب گیری، شفاف سازی و چسباندن لامل انجام شد و لام‌ها زیر میکروسکوپ به بزرگنمایی ۱۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفتند.

داده‌های این پژوهش پس از ورود به رایانه با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت آماری مقادیر miR-361 در نمونه‌های توموری نسبت به بافت نرمال در مقایسه با فاکتورهای مختلف کلینیکی پاتولوژیکی از طریق آزمون دو طرفه من-ویتنی و کروسکال والیس تجزیه و تحلیل گردید. آنالیز منحنی ROC (Receiver-operating characteristic) نیز انجام گردید تا ارزش تشخیصی میزان miR-361 در تمایز مولکولی نمونه‌های توموری و غیر توموری مشخص گردد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در بررسی ارتباط بین پارامترهای بالینی- آسیب شناسی با میزان بیان miR-361 نتایج نشان داد که از نظر اندازه تومور و TNBC، تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲). منحنی ذوب miR-361 وRNU6B به صورت تک قله‌ای به دست آمد که این خود بیانگر تنها یک محصول اختصاصی در PCR است (شکل ۱). miR-361 در نمونه‌های توموری Ct بیشتری نسبت به نمونه سالم کنار آن دارد (در مقایسه با Ct کنترل داخلی در نمونه

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

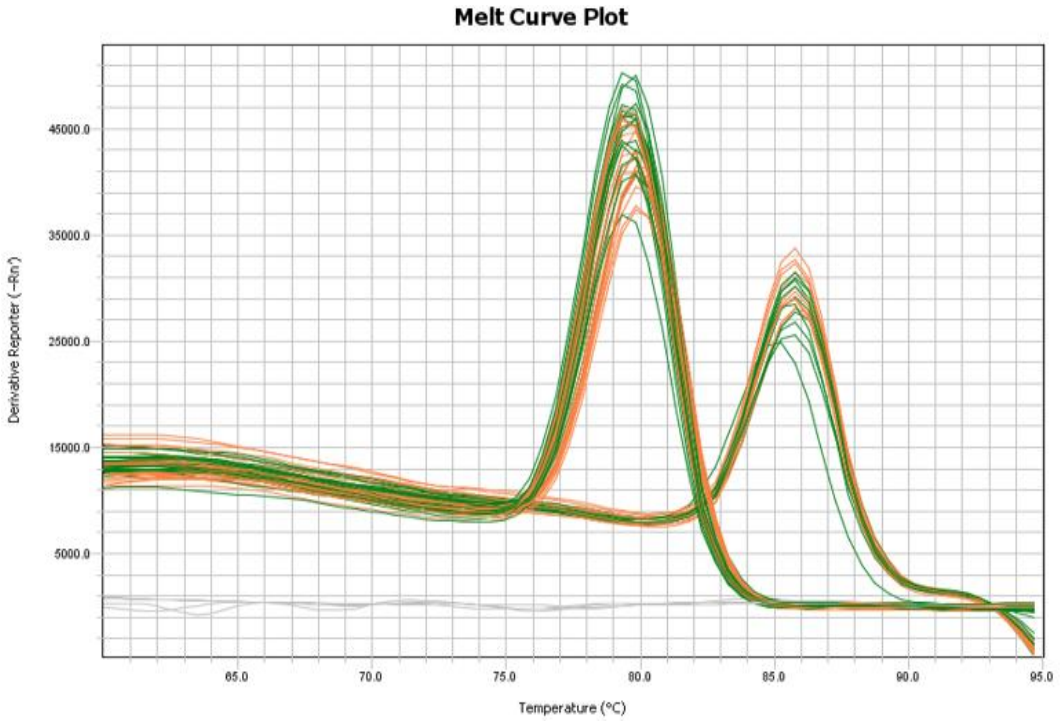
توموری نسبت به نمونه سالم کنار آن). آنالیز Real-Time PCR کاهش بیان معنی‌دار miR-361 را در بافت‌های توموری پستان در مقایسه با بافت‌های غیر توموری نشان داد (p<۰/۰۵) (شکل ۲). ارتباط بین بیان ژن miR-361-5p و ویژگی‌های آسیب‌شناسی بالینی، از جمله اندازه تومور، سن، وضعیت بافت‌شناسی، درجه‌ها، مراحل، تهاجم عروقی یا لنفاوی و زیر گروه‌های مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها نشان داد که بیان ژن miR-361 در بافت‌های سرطان پستان TNBC به طور قابل توجهی کمتر از بافت‌های غیر TNBC است (p<۰/۰۵).

جدول ۲. ارتباط بین پارامترهای بالینی- آسیب شناسی و میزان بیان miR-361 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

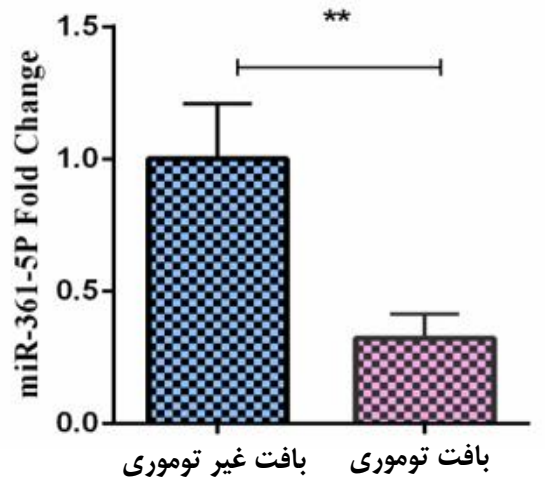
پارامترهای بالینی- آسیب شناسی	تعداد	میزان بیان miR-361 Mean±SD	p-value
اندازه تومور			
۳ سانتی‌متر≤	۱۳	۰/۷۹±۰/۹۳	۰/۰۳۲*
۳ سانتی‌متر<	۱۷	۰/۱۷±۰/۱۸	
رده سنی			
≤۵۰	۱۶	۰/۵۹±۱/۰۴	۰/۶۳۸
>۵۰	۱۴	۰/۴۷±۰/۸۰	
وضعیت بافت شناسی			
DCIS	۱۰	۰/۵۹±۰/۲۴	۰/۷۱۸
IDC	۱۴	۱/۰۵±۰/۲۸	
درجه بافت شناسی			
I	۸	۰/۳۰±۰/۱۹	۰/۶۷۷
II	۶	۰/۲۶±۰/۳۱	
III	۱۲	۰/۷۲±۱/۱۵	
مرحله بالینی			
اولیه ((I+II)	۹	۰/۲۹±۰/۴۴	۰/۳۰۸
پیشرفته (III+IV)	۱۹	۰/۹۱±۱/۳۱	
تهاجم لنفاوی			
مثبت	۱۳	۰/۳۹±۰/۳۳	۰/۶۸۲
منفی	۱۶	۰/۵۸±۱/۰۲	
تهاجمی عروقی			
مثبت	۱۴	۰/۱۵±۰/۱۶	۰/۵۴۷
منفی	۱۵	۰/۷۱±۱/۰۶	
HER2			
کم	۷	۰/۰۵۸±۰/۰۱۱	۰/۱۳۳
متوسط	۶	۱/۷۵±۲/۴۱	
بالا	۹	۰/۸۹±۱/۱۸	
منفی	۸	۰/۲۶±۰/۵۱	
ER			
کم	۶	۱/۶۰±۱/۰۶	۰/۱۹۲
متوسط	۱۲	۰/۹۶±۱/۲۸	
بالا	۴	۰/۳۵±۰/۳۲	
منفی	۸	۰/۲۴±۰/۵۵	
PR			
کم	۵	۰/۹۳±۱/۴۴	۰/۲۰۴
متوسط	۱۱	۰/۶۹±۱/۰۵	
بالا	۷	۱/۲۷±۱/۵۴	
منفی	۷	۰/۲۴±۰/۵۳	
TNBC			
مثبت	۷	۰/۲۴±۰/۲۵	۰/۰۲*
منفی	۲۳	۰/۸۷±۰/۹۳	

*p<۰/۰۵

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]



شکل ۱. منحنی ذوب miR-361 در مقایسه با ژن مرجع (RNU6B) در Real-Time PCR



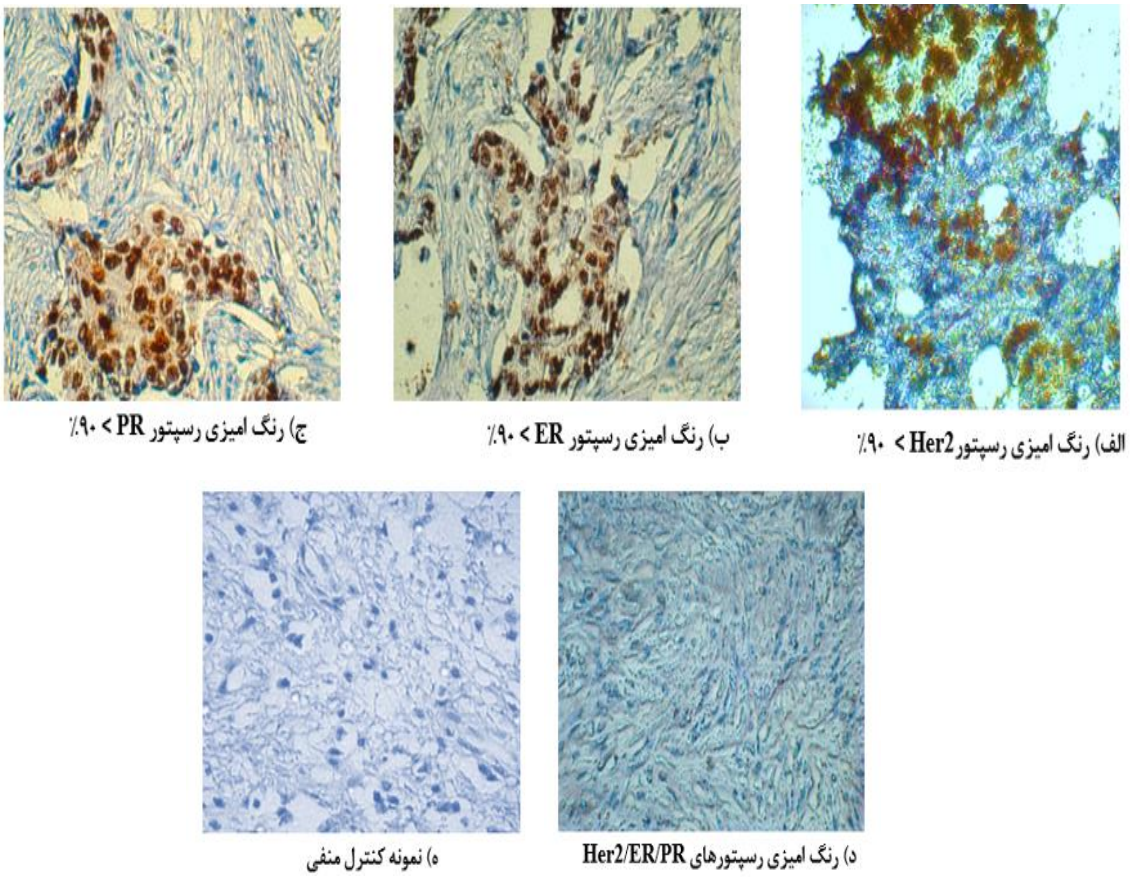
شکل ۲. بیان miR-361 در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های غیرتوموری بیماران مبتلا به سرطان پستان

زمانی که نمونه‌ها بر اساس اندازه به دو گروه تقسیم بندی شدند، گروه تومورهای کوچک‌تر از ۳ cm و گروه تومورهای ۳ cm و بزرگ‌تر، هر دو گروه کاهش بیان را نشان دادند به طوری که این نسبت در گروه تومورهای کوچک‌تر از ۳ cm معادل ۰/۷۹و در تومورهای بزرگ‌تر از ۳ cm معادل ۰/۱۷ به دست آمد. اختلاف کاهش بیان بین این دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار شد ($p<۰/۰۵$). علاوه بر اندازه تومور، تمام نمونه‌ها از نظر تهاجم لنفووسکولار در دو گروه مثبت و منفی قرار گرفتند که نسبت بیان نسبت به بافت نرمال کنار آن به ترتیب ۰/۵۴ و ۱/۲۹ به دست آمد که علی رغم کاهش بیان، این کاهش معنی‌دار

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

نبود. با در نظر گرفتن مرحله بالینی تومور، نمونه‌هایی که در مراحل بالینی یک و دو (با نسبت بیان ۰/۲۹) قرار داشتند، کاهش بیان بیشتری را در مقایسه با تومورهایی که در مراحل بالینی سه و چهار (۰/۹۱) بودند، نشان دادند. با این حال اختلاف کاهش بیان بین این دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۳۰۸). هیچ ارتباط معنی‌داری بین بیان miR-361 و دیگر ویژگی‌های آسیب شناسی بالینی مشاهده نشد.

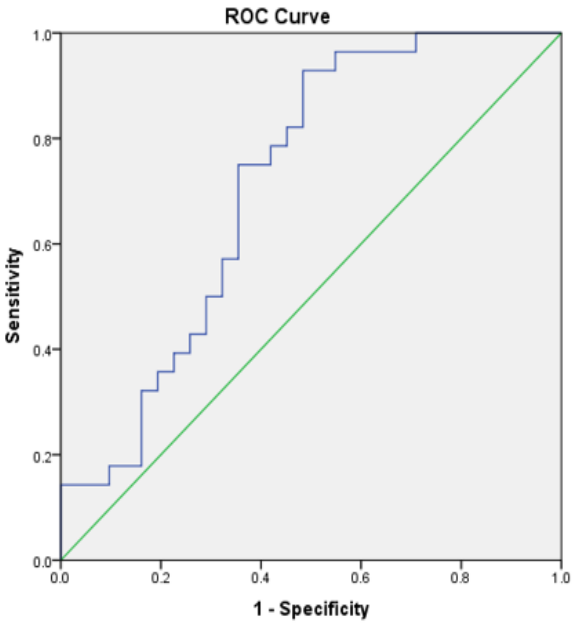
در این مطالعه وضعیت گیرنده‌های HER2، ER و PR با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شده بود (شکل ۳). حدود ۳۰٪ و ۲۰٪ از بافت‌های توموری به ترتیب بیان بالا و متوسط HER2 را نشان دادند. بیان ER در ۴۰٪ موارد متوسط و در ۱۳/۳٪ بالا به دست آمد. علاوه براین، حدود ۱۱ مورد (۳۶/۶٪) به همراه ۷ مورد (۲۳/۴٪) از مجموع ۳۰ نمونه توموری به ترتیب بیان PR متوسط و بالا را نشان دادند. میزان نمونه‌های TNBC مثبت نیز تقریباً ۲۵/۴٪ بود. نتایج آزمون کروسکال والیس نشان داد که ارتباط معکوسی بین کاهش بیان miR-361 با میزان شدت بیان کم تا زیاد HER2، ER و PR وجود دارد.



شکل ۳. رنگ آمیزی تومورها

آنالیز منحنی راک نشان داد که مقدار miR-361 بافت می‌تواند بین گروه‌های سرطان پستان توموری و غیر توموری به خوبی افتراق قائل شود. با آنالیز منحنی و تهیه مقدار cut-off (۰/۶) برای این نشانگر زیستی، مشخص گردید که مقدار miR-361 بافتی درحد بالاتر از ۰/۳ برابر افراد سالم (کالیبراتور) می‌تواند بیماران را با اختصاصیت ۶۵٪ و حساسیت ۷۳٪ از افراد سالم تشخیص دهد (شکل ۴ و جدول ۳).

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]



شکل ٤. منحنی راک مربوط به میزان miR-361 بافتی برای افتراق دادن تمایز مولکولی نمونه‌های توموری از غیر توموری
سطح زیر منحنی راک برای این آنالیز ۰/۷۱ بود (۰/۸٤-۰/۵۸ :CI ٪۹۵)

جدول ۳. نتایج آنالیز منحنی راک مربوط به miR-361

متغیر	سطح زیر منحنی	حساسیت	اختصاصیت	CI ٪۹۵
miR-361	۰/۷۱	٪۷۳	٪۶۵	۰/۵۸-۰/۸۴

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه به روشنی نشان داد که miR-361 این پتانسیل را دارد که بتوان آن را یک نشانگر زیستی احتمالی جهت تشخیص سرطان پستان و همچنین یک هدف درمانی بالقوه برای سرطان پستان در نظر گرفت. در مطالعات مختلفی ارتباط میان کاهش بیان miR-361 با سایز تومور و تهاجم لنفووسکولار آن گزارش شد (۱۷-۱۵). در مطالعه حاضر رابطه معنی‌داری میان کاهش بیان miR-361 و وضعیت تومور و تهاجم لنفووسکولار مشاهده نشد که به احتمال زیاد ناشی از محدودیت حجم نمونه بود، ولی در نمونه‌هایی که در مراحل بالینی یک و دو قرار داشتند کاهش بیانmiR-361 در مقایسه با مراحل بالینی سه و چهار بیشتر بود. از آنجایی که تشخیص سرطان در مراحل بالینی پایین اهمیت بالینی زیادی دارد، به نظر می‌رسد miR-361 به عنوان یک بیومارکر تشخیصی در سرطان پستان ارزش بالینی مهمی داشته باشد. در ارتباط با این یافته، در یک مطالعه که توسط Xu و همکاران انجام شد، مشخص گردید که کاهش میزان بیان miR-361 به طور معکوس و معنی‌داری با مرحله بیماری در سرطان پستان ارتباط دارد (۱۸).

بر اساس تفاوت میزان بیان miR-361 ، مطالعه حاضر نشان داد که بیان miR-361 در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های طبیعی کاهش قابل توجه و معنی‌داری دارد. در این رابطه مطالعه‌ای که توسط Cao و همکارانش انجام شد نشان داد که این miRNA در بافت توموری در مقایسه با بافت طبیعی بیان کمتری دارد و با متاستاز گره‌های لنفاوی، تهاجم موضعی و پیش آگهی خوب بیماری مرتبط است (۱۹). این یافته نشان می‌دهد که از این نشانگر زیستی می‌توان به عنوان فاکتور پیشرفت بیماری و نیز تشخیص استفاده کرد (۱۹). در مطالعه Ma و همکاران نتیجه گیری شده که کاهش میزان بیان miR-361 با کاهش گلیکولیز، مهار آنزیم ماتریکس متالوپپتیداز ۱ (MMP-1) و گیرنده ۱ فاکتور رشد فیبروبلاست (FGFR1) در سلول‌های سرطانی پستان در ارتباط است، به طوری که القا افزایش بیان miR-361 سبب کاهش میزان تکثیر، مهاجرت، هجوم سلول‌های سرطانی و افزایش آپوپتوز در رده سلولی سرطانی پستان می‌شود (۲۰).

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

پیش آگهی سرطان پستان با فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژیکی متعددی ارتباط دارد و در مطالعات مختلف بیان شده است که رسپتورهای هورمونی HER2، ER وPR مهمترین فاکتورهای قابل قبول برای پیش بینی پاسخ یا مقاومت به درمان سرطان پستان می‌باشند (۲۱). بر اساس نتایج این مطالعه، ارتباط معنی‌دار آماری بین گیرنده‌های HER2، ER وPR، اندازه تومور و کاهش بیان miR-361 مشاهده نشد. در مطالعات مشابه دیگری که در این زمینه انجام شده نیز ارتباط بین این پارامترها با کاهش بیان miR-361 معنی‌دار نبود. ولی در مطالعه Cao و همکارانش با کاهش بیان miR-361 شیوع تومورهای دارای گیرنده‌های HER2، ER و PR افزایش یافته و با افزایش گرید تومور و اندازه تومور شیوع گیرنده‌های HER2، ER وPR کاهش نشان می‌داد (۱۹). علاوه بر این، نتایج کاهش بیان miR-361 در بافت‌های توموری TNBC با اندازه بزرگتر از cm ۳ در این مطالعه با نتایج مطالعه Han و همکاران، نشان دهنده بیان کمتر miR-361 در بافت‌های توموری TNBC بزرگتر از cm ۳، گرید بالا و مهاجم، مطابقت داشت (۲۲).

در این تحقیق بین کاهش بیان miR-361 با گرید تومور ارتباطی وجود نداشت، ولی Yerukala Sathipati و همکارانش در مطالعه خود مشاهده کردند که با افزایش گرید تومور میزان بیان miR-361 کاهش پیدا کرد (۲۳). اگر چه Hua و همکارانش در تحقیق خود ارتباط معنی‌دار آماری بین میزان بیان miR-361 و گرید تومور مشاهده نکردند (۲۴). همچنین در مطالعه Ma و همکارانش میزان کاهش بیان miR-361 در تومورهای گرید یک و دو ۰/۶۳ و در تومورهای گرید سه ۰/۳۶ بود و ارتباط بین miR-361 و گرید هیستولوژیک تومور معنی‌دار بود (۲۰). Wu و همکارانش نیز ثابت کردند که miR-361و تومورهای با گرید سه هیستولوژیک به شدت با طول عمر بیماران ارتباط دارد (۲۵).

در تحقیق حاضر بررسی کاهش بیان miR-361 در بافت در سرم به خوبی به افتراق مولکولی نمونه‌های توموری و غیر توموری کمک می‌کند که این یافته با نتایج به دست آمده توسط Chang و همکاران که به ارتباط این miRNA با پیشرفت سرطان و کاهش بیان آن در سرم اشاره دارد (۲۶)، همخوانی دارد. البته تفاوت کار مطالعه حاضر با این روش در بررسی سنجش miR-361 در بافت توسط ما و بررسی کاهش بیان miR-361 در سرم توسط این محقق بوده است. miR-361 در ارتباط مستقیم است با اندازه تومور، مرحله بندی تومور (staging) و پیشرفت سرطان، اما قادر به پیش بینی پیش آگهی بیماری نیست. با توجه به این مدارک و شواهد می‌توان نتیجه گرفت که miR-361 توسط بافت توموری سرطان پستان تولید می‌شود، همچنین میزان بافتی آن در بافت توموری نسبت به بافت سالم به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد در نتیجه به افتراق این دو گروه با هم کمک شایانی می‌نماید و همچنین هرچه میزان بیان miR-361 در بافت کمتر باشد با اندازه تومور و staging و قدرت تهاجم بیماری ارتباط بیشتری نشان می‌دهد.

چنین به نظر می‌رسد سنجش میزان miR-361 در بافت می‌تواند به عنوان یک روش مناسب در تشخیص زود هنگام بیماران سرطان پستان به کار رود. در واقع بیان این miRNA را در بافت به عنوان نشانگر تشخیصی در نظر گرفت.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به جهت تامین هزینه اجرایی این مطالعه و از مسئولین محترم بیمارستان تخصصی آپادانا اهواز که امکان استفاده از نمونه‌های بافتی بایگانی شده بیماران مراجعه کننده به مرکز رادیولوژی و انکولوژی را فراهم نمودند، قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

References

1.Łukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. Cancers (Basel). 2021;13(17):4287.

2.Hu X, Chen W, Li F, Ren P, Wu H, Zhang C, et al. Expression changes of ER, PR, HER2, and Ki-67 in primary and metastatic breast cancer and its clinical significance. Front Oncol. 2023;13:1053125.

3.Hussen BM, Abdullah ST, Rasul MF, Salihi A, Ghafouri-Fard S, Hidayat HJ, et al. MicroRNAs: Important Players in Breast Cancer Angiogenesis and Therapeutic Targets. Front Mol Biosci. 2021;8:764025.

4.Muñoz JP, Pérez-Moreno P, Pérez Y, Calaf GM. The Role of MicroRNAs in Breast Cancer and the Challenges of Their Clinical Application. Diagnostics (Basel). 2023;13(19):3072.

5.Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Contreras-Espinosa L, et al. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. Mol Ther Nucleic Acids. 2020;20:409-20.

6.Fogazzi V, Kapahnke M, Cataldo A, Plantamura I, Tagliabue E, Di Cosimo S, et al. The Role of MicroRNAs in HER2-Positive Breast Cancer: Where We Are and Future Prospective. Cancers (Basel). 2022;14(21):5326.

7.Yan G, Yan S, Wang J, Lei S, Tian W, Yue X, et al. MicroRNA-296-5p inhibits cell proliferation by targeting HMGA1 in colorectal cancer. Exp Ther Med. 2021;22(2):793.

8.Gupta J, Suliman M, Ali R, Margiana R, Hjazi A, Alsaab HO, et al. Double-edged sword role of miRNA-633 and miRNA-181 in human cancers. Pathol Res Pract. 2023;248:154701.

9.Zamarbide Losada JN, Sulpice E, Combe S, Almeida GS, Leach DA, Choo J, et al. Apoptosis-modulatory miR-361-3p as a novel treatment target in endocrine-responsive and endocrine-resistant breast cancer. J Endocrinol. 2023;256(3):e220229.

10.Yin LC, Xiao G, Zhou R, Huang XP, Li NL, Tan CL, et al. MicroRNA-361-5p Inhibits Tumorigenesis and the EMT of HCC by Targeting Twist1. Biomed Res Int. 2020;2020:8891876.

11.Ma F, Song H, Guo B, Zhang Y, Zheng Y, Lin C, et al. MiR-361-5p inhibits colorectal and gastric cancer growth and metastasis by targeting staphylococcal nuclease domain containing-1. Oncotarget. 2015;6(19):17404-16.

12.Hou XW, Sun X, Yu Y, Zhao HM, Yang ZJ, Wang X, et al. Mir-361-5p suppresses lung cancer cell lines progression by targeting FOXM1. Neoplasma. 2017;64(4):526-34.

13.Liu D, Tao T, Xu B, Chen S, Liu C, Zhang L, et al. MiR-361-5p acts as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting signal transducer and activator of transcription-6(STAT6). Biochem Biophys Res Commun. 2014;445(1):151-6.

14.Wu X, Xi X, Yan Q, Zhang Z, Cai B, Lu W, et al. MicroRNA-361-5p facilitates cervical cancer progression through mediation of epithelial-to-mesenchymal transition. Med Oncol. 2013;30(4):751.

15.Chen W, Wang J, Liu S, Wang S, Cheng Y, Zhou W, et al. MicroRNA-361-3p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting SH2B1 in NSCLC. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35:76.

16.Liu S, Song L, Yao H, Zhang L, Xu D, Li Q, et al. Preserved miR-361-3p Expression Is an Independent Prognostic Indicator of Favorable Survival in Cervical Cancer. Dis Markers. 2018;2018:8949606.

17.Xu D, Dong P, Xiong Y, Yue J, Konno Y, Ihira K, et al. MicroRNA-361-Mediated Inhibition of HSP90 Expression and EMT in Cervical Cancer Is Counteracted by Oncogenic lncRNA NEAT1. Cells. 2020;9(3):632.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]

18.Xu D, Dong P, Xiong Y, Yue J, Ihira K, Konno Y, et al. MicroRNA-361: A Multifaceted Player Regulating Tumor Aggressiveness and Tumor Microenvironment Formation. Cancers (Basel). 2019;11(8):1130.
19.Cao ZG, Huang YN, Yao L, Liu YR, Hu X, Hou YF, et al. Positive expression of miR-361-5p indicates better prognosis for breast cancer patients. J Thorac Dis. 2016;8(7):1772-9.
20.Ma F, Zhang L, Ma L, Zhang Y, Zhang J, Guo B. MiR-361-5p inhibits glycolytic metabolism, proliferation and invasion of breast cancer by targeting FGFR1 and MMP-1. J Exp Clin Cancer Res. 2017;36(1):158.
21.Wei S. Hormone receptors in breast cancer: An update on the uncommon subtypes. Pathol Res Pract. 2023;250:154791.
22.Han J, Yu J, Dai Y, Li J, Guo M, Song J, et al. Overexpression of miR-361-5p in triple-negative breast cancer (TNBC) inhibits migration and invasion by targeting RQCD1 and inhibiting the EGFR/PI3K/Akt pathway. Bosn J Basic Med Sci. 2019;19(1):52-9.
23.Yerukala Sathipati S, Tsai MJ, Shukla SK, Ho SY. Artificial intelligence-driven pan-cancer analysis reveals miRNA signatures for cancer stage prediction. HGG Adv. 2023;4(3):100190.
24.Hua B, Li Y, Yang X, Niu X, Zhao Y, Zhu X. MicroRNA-361-3p promotes human breast cancer cell viability by inhibiting the E2F1/P73 signalling pathway. Biomed Pharmacother. 2020;125:109994.
25.Wu H, Wang Q, Zhong H, Li L, Zhang Q, Huang Q, et al. Differentially expressed microRNAs in exosomes of patients with breast cancer revealed by next-generation sequencing. Oncol Rep. 2020;43(1):240-50.
26.Chang JT, Wang F, Chapin W, Huang RS. Identification of MicroRNAs as Breast Cancer Prognosis Markers through the Cancer Genome Atlas. PLoS One. 2016;11(12):e0168284.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.3]