ارتباط بین پلی مورفیسم rs2910164 ژن miR146a با سرطان سینه در زنان ایرانی به روش Tetra-Arms PCR

الهام سیاسی، مهکامه سلیمان میگونی و صدیقه مهرابیان

ایران.، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

چکیده

بیان ژنها را miRNA ها، که RNA های کوچک غیر کد کننده هستند، تنظیم می کنند و تغییرات ژنتیکی مانند پلی مورفیسمهای ژنهای miRNAها، در پیش بینی استعداد ابتلا به سرطانها به عنوان نشانگرهای زیستی مولکولی، هستند. یکی از miRNA هایی که با ژنهای *BRCA1/BRCA2* در ارتباط می باشد، miR146a است و در سرطانهای زیادی از جمله سرطان سینه دخالت دارد. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین حضور پلی مورفیسم rs2910164 در ژن *miR146a* و سرطان سینه در جمعیتی از زنان ایرانی بود.. این پژوهش بر روی ۵۰ نمونه خون بیمار و ۵۰ نمونه خون افراد کنترل انجام شد. از نمونه ها استخراج DNA انجام شد. سپس برای ژنوتایپینگ از روش Tetra Arms PCR استفاده گردید و نتایج آنالیز آماری شدند. درصد فراوانی ژنوتیپهای GG، GC و CC به ترتیب در افراد سالم ۳۳۰، ۶۶ و ۴ درصد و در بیماران ۴۶، ۵۲ و ۲ درصد به دست آمد. بین فراوانی حضور آللهای غالب و مغلوب این پلی مورفیسم بین افراد سالم و بیماران اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P>0.05$). در نتایج تحقیق حاضر بین فراوانی آللهای G و C در گروه بیمار و کنترل , تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که می تواند بیانگر عدم وجود ارتباط بین حضور پلی مورفیسم rs2910164 در ژن *miR146a* و سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی مورد مطالعه، باشد. البته برای تأیید نتایج این تحقیق به مطالعات بیشتر با افزایش حجم نمونه نیاز است.

واژه های کلیدی: سرطان سینه، ژن *miR-146* ، پلی مورفیسم، rs2910164، Tetra-Arms PCR .

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۲۲۰۴۰۹ ، پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca

مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطانها در دنیا می باشد. این سرطان معضل بهداشتی در کل دنیا بوده و عامل اصلی مرگ و میر در بین زنان به حساب می‌آید. فاکتورهای متعددی نظیر سن، طول مدت دوره تولید مثل، نازایی، چاقی و غیره در این ارتباط شناخته شده اند (۳۳). این سرطان از لحاظ بالینی یک بیماری هتروژنوس بوده که طیف وسیعی از تغییرات ژنتیکی و فاکتورهای ارثی و محیطی به عنوان عوامل مستعد کننده در ابتلا به سرطان سینه تأیید شده است (۶ و ۱۶) سرطان سینه شایع‌ترین علت مرگ زنان در محدوده سنی ۳۵ تا ۵۵ سالگی می‌باشد و بعد از سرطان ریه شایع‌ترین سرطان در افراد است. (۳۲)

گروهی از RNA های غیر کد کننده، miRNA (microRNA) هستند که حدود ۲۵-۱۸ نوکلئوتید طول دارند و پس از رونویسی روی بیان ژن اثر می گذارند. آنها این عمل را از طریق اتصال به توالی مکمل که اغلب در ناحیه 3′-UTR مربوط به mRNA هدف واقع شده انجام می دهند. مطالعات نشان داده اند که miRNA ها می توانند هر دو نقش انکوژنی و سرکوبگر توموری را داشته باشند که در این صورت به ترتیب Oncogen- Onco-mir)

(Tumor suppressor - Ts-mir وmicroRNA) (microRNA خوانده می شوند (۲۲). با توجه حفاظت شدگی زیاد توالیهای miRNA ها در طول تکامل، نقش اهمیت آنها در فرآیندهای اساسی حیات همچون تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز، متابولیسم، پاسخ به استرسها و همچنین دخالت در تنظیم بسیاری از مکانیسمهای پاتولوژیک که سبب بیماریهای مختلف از جمله اختلالات تکوینی، سرطانها، بیماریهای سیستم قلبی عروقی و عصبی، برهم خوردگیهای متابولیسمی و بیماریهای ویروسی در انسان می گردند، مشخص شده است (۱۵، ۲۷ و ۲۸). نقش microRNA ها و تغییرات سطح بیان آنها به عنوان نشانگر زیستی حساس در پیشرفت و گسترش سرطانها از جمله سرطان سینه مطرح می باشند و به عنوان ابزاری حساس و ارزشمند در پیش آگهی و تشخیصهای کلینیکی کاربرد دارند (۳ و ۹). یکی از miRNA ها، miR146a می باشد که جایگاه آن بر روی کروموزوم ۵ انسانی در لوکوس 5q34 بوده و با فعالیت ژنهای *BRCA1/BRCA2* در ارتباط می باشد. این microRNA توسط ژن *MIR146a* کد می شود و اولین بار به عنوان یک تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن کشف شد که پاسخ پستانداران را به عفونتهای میکروبی تحت تأثیر قرار می داد (۳۴) و همچنین در سرطانهای زیادی از جمله سرطان سینه، تخمدان، رحم، کولون، ریه، کبد، مغز، پروستات، پانکراس، تیروئید و مری دیده می شود (۵). پلی مورفیسم rs2910164 در وسط ساقه–حلقه miRNA قرار دارد و جفت شدن اشتباه G با U را به جای C با U در ساختار miR146a سبب می شود (۱۷ و ۱۹). همچنین مشخص شده است حضور پلی مورفیسم G>C (rs2910164) در توالی ژن *miR-146a* با افزایش ریسک ابتلا به سرطان سینه ارتباط دارد (۱۹). بنابراین هدف این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs2910164 در ژن *miR-146a* با ایجاد سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی بود که برای این منظور از روش با دقت بالا و اقتصادی تر Tetra-ARMS PCR به جای سایر روشها از جمله PCR-RFLP استفاده شد.

مواد و روشها

نمونه گیری: این مطالعه از نوع مطالعات پژوهشی بود. برای نمونه گیری میزان ۵ سی سی از خون افراد گروه بیمار و افراد سالم استفاده شد. تعداد ۵۰ فرد بیمار مبتلا به ضایعات بدخیم سرطان سینه و ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. رضایت آگاهانه و کسب اجازه از افراد مورد مطالعه قبل از جمع آوری نمونه خون گرفته شد. حجم نمونه بر اساس فرمول محاسبه حجم نمونه فرمول کوکران محاسبه شد. در این محاسبه با سطح خطای ۵ درصد، ۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه گروه کنترل، تخمین زده شد.

$$n=\frac{\frac{z^2pq}{d^2}}{1+\frac{1}{N}\left(\frac{z^2pq}{d^2}-1\right)}$$

استخراج DNA : برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سینا کلون با نام CAT NO: PR881612 CinnaPure-DNA CinnaPure-DNA (whole blood, serum and plasma) ,50 Preps استفاده شد.

کیفیت و کمیت سنجی DNA استخراج شده: برای اطمینان از کیفیت سنجی DNA خالص شده، ۳ میکرولیتر از DNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد (به دلیل حرکت مناسب DNA ژنومی بر روی ژل و با توجه به طول قطعه و رویت بهتر آن با ولتاژ مناسب از ژل ۲ درصد استفاده شد). همچنین درجه خلوص DNA با دستگاه نانو درآپ کنترل شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Tetra Arms PCR : برای انجام واکنشTetra Arms PCR از پرایمرهای اختصاصی شامل ۱ جفت پرایمر خارجی و ۲ پرایمر داخلی برای هر یک از آللهای غالب و مغلوب پلی مورفیسم rs2910164

در *miR-146a* استفاده شد که از نظر اختصاصی بودن برای تکثیر قطعه مورد نظر با سایت پرایمر بلاست NCBI کنترل شده است و مشخصات آنها در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین مواد مورد نیاز برای واکنش PCR و برنامه دستگاه به ترتیب در جدول های ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱- توالیهای نوکلئوتیدی و ویژگی آغازگرهای استفاده شده جهت بررسی SNP 2910164 در *miR-146a* (۱)

پرایمر	توالی '3 - '5	سایز محصول PCR
پرایمر داخلی چپ (Allele-C)	*5'- tccatgggttgtgtcagtgtcagagctc-3'*	۲۹۰ bp
پرایمر خارجی راست	*5'- gagtagcagcagcagcaagagagactt-3'*	
پرایمر داخلی راست (Allele-G)	*5'- atatcccagctgaagaactgaattacac-3'*	۲۰۳ bp
پرایمر خارجی چپ	*5'- tagacctggtactaggaagcagctgcat-3'*	
پرایمر خارجی چپ	*5'- tagacctggtactaggaagcagctgcat-3'*	۴۴۵ bp
پرایمر خارجی راست	*5'- gagtagcagcagcagcaagagagactt-3'*	

جدول۲- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

مواد	**حجم مورد نیاز (µl)**
Master mix 2X	۱۰
پرایمر چپ	۱ (دو مورد)
پرایمر راست	۱ (دو مورد)
DNA نمونه	۴
اب دو بار تقطیر شده	۲
مقدار کل	۲۰

جدول۳- برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR

مرحله واکنش	درجه حرارت (سانتیگراد)	زمان	تعداد تکرار
دناتوراسیون اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵	۳۰ ثانیه	
اتصال	۵۹	۳۰ ثانیه	۳۵
پلیمریزاسیون	۷۲	۹۰ ثانیه	
پلیمریزاسون نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

بررسی محصولات PCR : پس از انجام واکنش زنجیره ایی پلیمراز برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز برروی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده گردید. پس از پایان مرحله الکتروفورز، در دستگاهUV Transilluminator تصویربرداری انجام شد.

تعیین توالی نمونه ها: به منظور توالی یابی نمونه ها جهت تأیید صحت PCR تعداد از نمونه ها به صورت تصادفی انتخاب شدند و پس از خالص سازی برای سکانس به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. نتایج تعیین توالی نمونه ها توسط نرم افزار Sequencher v5.4.6 آنالیز شد و سپس با سایت بلاست NCBI کنترل گردید.

آنالیزهای آماری: به منظور آنالیز آماری داده ها از نسخه ۲۴ نرم آفزار SPSS و آزمونهای T- test مستقل، آنوا استفاده شد. همچنین برای بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه از تست کای اسکوئر استفاده شد.

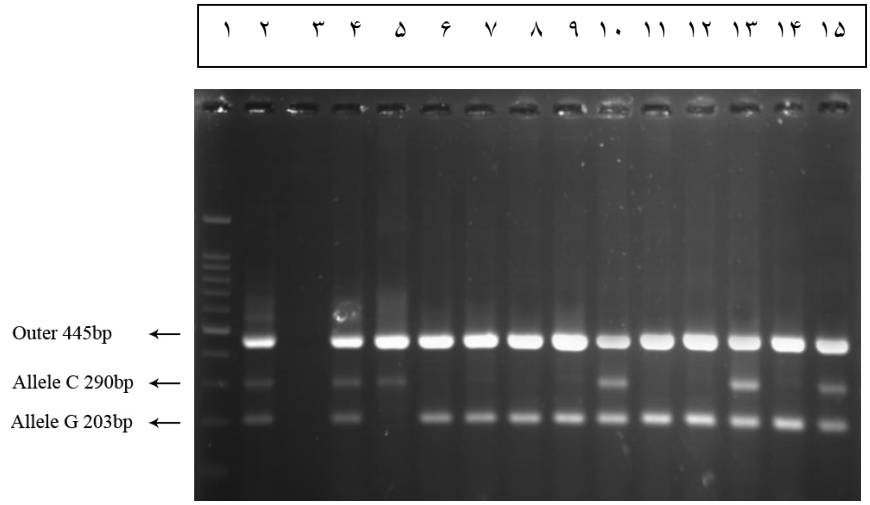
P value کمتر از ۰/۰۵ در نتایج، معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نمونه گیری و اطلاعات بیماران: در این پژوهش، ۱۰۰ نمونه خون از بیماران و افراد سالم جمع آوری شد و استخراج DNA از تمامی نمونه ها انجام شد. رده سنی افراد مورد مطالعه بین ۳۰ تا ۶۰ سال بود. میانگین سنی برای گروه بیمار ۰,۲ ± ۴۴ و برای گروه نرمال ۰,۲ ± ۴۰ محاسبه شد که در دو گروه تقریباً یکسان بود. (از رده سنی مشابه و دارا بودن ضایعات پاتولوژیک مربوط به سرطان سینه که به وسیله معاینه پزشک متخصص زنان و زایمان و انجام آزمایشات، سونوگرافی و ماموگرافی بیمار تشخیص داده شدند و زنان سالمی که با سن و وضعیت اجتماعی-اقتصادی و موقعیت جغرافیایی مشابه افراد گروه بیمار بودند به عنوان معیار انتخاب گروه بیمار و کنترل استفاده شد).

نتایج استخراج DNA : صحت نتایج استخراج DNA از نمونه ها با مشاهده باند نمونه روی ژل الکتروفورز و جذب نوری DNA در دستگاه نانودرآپ تأیید شد.

نتایج Tetra Arms PCR : ژنوتایپ پلی مورفیسم rs2910164 در miR-146a ، در دو گروه بیمار و کنترل توسط تکنیک Tetra Primer Arms PCR انجام شد و سپس با الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد نوع ژنوتایپها مشخص شد. مطابق توالی پرایمرها که در جدول ۱ آورده شده است پرایمر داخلی چپ با پرایمر خارجی راست قطعه ۲۹۰ bp اختصاصی برای آلل C را تکثیر نموده و پرایمر خارجی چپ و پرایمر داخلی راست قطعه اختصاصی برای آلل G را به طول ۲۰۳ bp تکثیر نموده و جفت پرایمر خارجی چپ و راست قطعه عمومی ۴۴۵ bp را تکثیر نموده است (شکل ۱). نتایج آزمون Tetra Arms PCR فراوانی ژنوتایپهای هتروزیگوت GC را با قطعات به طول (203bp, 290bp, 445bp)، هموزیگوت آلل مغلوب C را با قطعات به طول (290bp, 445bpو هموزیگوت آلل غالب G را با قطعات به طول (203 bp, 445bp)، در دو گروه کنترل و بیمار مشخص نموده است که این نتایج در جدول ۴ آورده شده اند.



شکل ۱- نتایج Tetra Arms PCR برای پلی مورفیسم rs2910164 در ژن miR-146a - خانه شماره ۱: مارکر مولکولی(100 bp)، خانه شماره ۲: نمونه کنترل مثبت ، خانه شماره ۳: نمونه کنترل منفی، خانه های شماره ۴ و ۱۰ و ۱۳ و ۱۵: نمونه های هتروزیگوت GC

(203bp, 290bp, 445bp)، خانه شماره ۵: نمونه هموزیگوت برای آلل مغلوب C (290bp, 445bp) ۰، خانه های شماره ۶ و۷ و ۸ و ۹ و ۱۱ و ۱۲ و۱۴: نمونه های هموزیگوت برای آلل غالب G (203 bp, 445bp).

جدول۴- فراوانی ژنوتایپهای بررسی شده برای پلی مورفیسم rs2910164

ژنوتایپ	فراوانی در گروه کنترل	فراوانی در گروه بیمار	تعداد کل نمونه ها
هموزیگوت غالب GG	۱۵ (٪۳۰)	۲۳ (٪۴۶)	۳۸
هتروزیگوت GC	۳۳ (٪۶۶)	۲۶ (٪۵۲)	۵۹
هموزیگوت مغلوب CC	۲ (٪۴)	۱ (٪۲)	۳

تعیین توالی یابی به جهت تأیید محصول حاصل از Tetra Arms PCR : تأیید نتایج ژنوتایپینگ نمونه های هموزیگوت غالب و مغلوب و هتروزیگوت حاصل از روش Tetra Arms PCR با روش تعیین توالی این نمونه ها انجام شد.

نتایج آنالیز آماری: پس از آنالیز آماری داده ها مشخص شد که رابطه معنا داری بین حضور این SNP و سرطان سینه وجود ندارد. فراوانی آللهای غالب و مغلوب در دو گروه بیمار و افراد سالم در جدول ۵ آورده شده است.

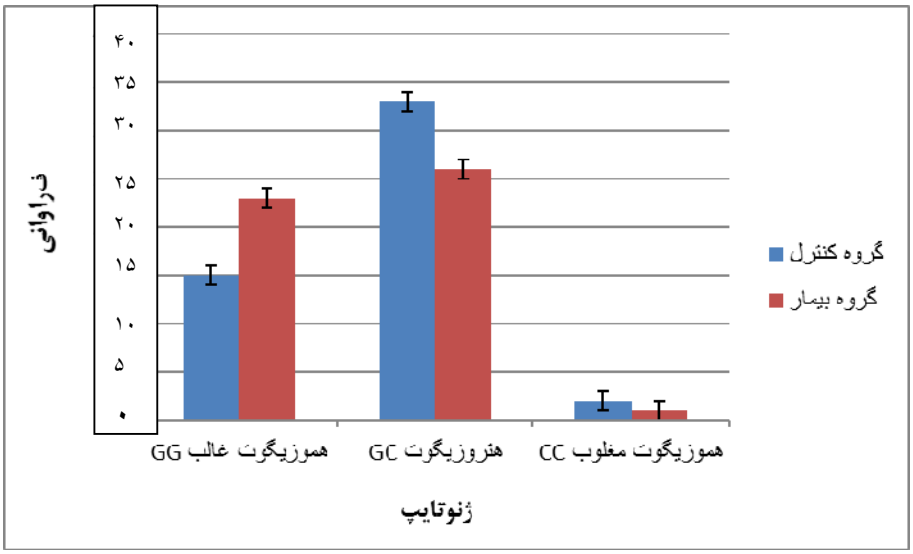
نتایج نشان داد فراوانی آلل G و آلل C در در گروه بیمار به ترتیب ۳۶ درصد و ۲۸ درصد و در گروه کنترل به ترتیب ۶۴ درصد و ۳۶ درصد بود و از نظر آماری تفاوت معنا داری بین فراوانی آللهای غالب و مغلوب (G و C) در گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد (P>0.05) (جدول ۵ و شکل ۲). نتایج تست کای اسکوئر نشان داد هم جمعیت گروه بیمار و هم جمعیت گروه کنترل در تعادل هاردی- واینبرگ قرار دارند (P<0.05) (جدول ۶).

جدول ۵- آنالیز آماری داده های Tetra Arms PCR برای پلی مورفیسم مورد مطالعه

آلل ها	فراوانی گروه کنترل	فراوانی گروه بیمار	فراوانی کل	Pvalue
غالب G	۳۲ (٪۶۴)	۳۶ (٪۷۲)	۶۸	
مغلوب C	۱۸ (٪۳۶)	۱۴ (٪۲۸)	۳۲	۰/۳۹۱
تعداد کل	۵۰ (٪۱۰۰)	۵۰ (٪۱۰۰)	۱۰۰	

جدول ۶- آنالیز آماری برای بررسی وجود تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت گروه بیمار و کنترل

فراوانیها	هموزیگوت غالب GG	هتروزیگوت GC	هموزیگوت مغلوب CC	الل غالب G	الل مغلوب C	Pvalue
فراوانی در گروه کنترل	۱۵ (٪۳۰)	۳۳ (٪۶۶)	۲ (٪۴)	۳۲ (٪۶۴)	۱۸ (٪۳۶)	۰/۰۰۱
فراوانی در گروه بیمار	۲۳ (٪۴۶)	۲۶ (٪۵۲)	۱ (٪۲)	۳۶ (٪۷۲)	۱۴ (٪۲۸)	۰
فراوانی کل	۳۸ (٪۳۸)	۵۹ (٪۵۹)	۳ (٪۳)	۶۸ (٪۶۸)	۳۲ (٪۳۲)	۰



شکل ۲- مقایسه فراوانی ژنوتایپهای پلی مورفیسم rs2910164 در گروه بیمار و کنترل

بحث

سرطان سینه به عنوان سومین عامل مرگ و میر در ایران در نظر گرفته می شود (۲۵). نرخ شیوع آن در زنان ایرانی ۱۷/۸ درصد است (۷). این سرطان علت اصلی مرگ در زنان گزارش شده است و یک بیماری چند عاملی محسوب می شود، به طوری که هم فاکتورهای محیطی و هم فاکتورهای ژنتیکی و اپی ژنتیکی در ایجاد آن دخالت دارند (۱۲ و ۲۹). بیان ژن با miRNAها، که RNA های کوچک غیر کد کننده هستند، تنظیم می شود و در بسیاری از مسیرهای مهم از جمله سرطانی شدن و گسترش آن دخالت دارند. بیان متفاوت miRNA ها در برخی از حالات پاتولوژیک از جمله سرطانها، استفاده بالقوه از این مولکولها را به عنوان نشانگر زیستی مناسب در تشخیص بیماری مطرح ساخته است (۲۰ و ۳۱). همچنین آنها پتانسیل قابل توجهی جهت شناسایی، تشخیص، طبقه بندی و درمان سرطان دارند، زیرا علاوه بر دارا بودن حساسیت لازم، می توانند مرحله تومور، وضعیت گیرنده های سطح سلولی (که در گسترش تومور می توانند مؤثر باشند) و بقای بیمار را نشان دهند. از دیگر مزایای miRNA می توان به پایدار بودن آن تا ۱۰ سال در بافتهای ثابت شده در فرمالین و جای گرفته در پارافین اشاره نمود (۱۱). این مولکولها علاوه بر تعیین نوع بیماری، حساست و پاسخ به یک درمان خاص را نیز می توانند تعیین کنند. برای مثال miR-326 بر حساسیت سلولهای سرطانی سینه نسبت به شیمی درمانی مؤثر است به طوری که کاهش آن منجر به مقاومت به درمان می شود. هم چنین ممانعت از بیان ژن miR-451 منجر به افزایش مقاومت دارویی توسط حساسیت سلولها نسبت به دوکسوروبیسین می شود. بیان miRNA ها می تواند توسط مکانیسمهای مختلفی تغییر کند که از آن جمله می توان به ناهنجاریهای کروموزومی، اپی ژنتیک، نقص در ماشین بیوژنز miRNA و حضور پلی مورفیسمها در ژنهای miRNA اشاره نمود (۹ و ۱۰). این مولکولها به طور معمول بیان انکوژنها را کنترل می کنند و در صورتی که عملکرد خود را از دست دهند سلول را به سمت توموری شدن پیش می برند. آنهایی که بیان ژنهای سرکوب کننده تومور را کنترل می کنند، با افزایش بیان، سلول را به سمت توموری شدن هدایت می کنند. در این دو حالت miRNA نقش انکوژنی خواهد داشت (۱۳). یکی از عواملی که می تواند سبب این تغییرات (از دست رفتن عملکرد یا کسب عملکرد) در ژن miRNA شود، تغییر در توالی آن و از جمله حضور پلی مورفیسم در

ژنهای miRNA است. بنابراین ارتباط پلی مورفیسم با برخی از حالات پاتولوژی از جمله سرطانها با شواهدی در این خصوص تأیید شده است (۱۸). پلی مورفیسمها رایج ترین تغییرات ژنتیکی در ژنوم انسان هستند که می توانند بر روی انواع سرطان در جمعیتهای مختلف تأثیر گذار باشند و از انها می توان به عنوان عوامل مهمی که در پیش بینی استعداد ابتلا به سرطانها از جمله سرطان سینه مطرح هستند، استفاده نمود (۲۱). تنظیم بیان بسیاری از ژنها همچون *IRAK1, ST7L, BCORL1, CARD10, MMP16* و *BRCA1/2* توسط miRNA-146a انجام می پذیرد. ژن این miRNA روی بازوی بلند کروموزوم ۵ قرار گرفته است و با فعالیت ژن *BRCA* در ارتباط است، به طوری که miRNA-146a به نوکلئوتید ۳۹ ناحیه غیر ترجمه شونده انتهای رشته` ۳ (3`-UTR) ژن *BRCA1* متصل شده و بر روند رونویسی آن تأثیر می گذارد. با حضور پلی مورفیسم rs2910164 که در وسط ساختار حلقه ساقه miRNA-146a قرار گرفته است و سبب تغییر جفت نوکلئوتید G:U به C:U در ساقه این ساختار می شود خطر ابتلا به سرطان سینه افزایش می یابد. زیرا این تغییر بر روند پردازش مولکول پیش بالغ (اولیه) miRNA-146a تأثیر گذاشته و در نتیجه سبب تغییر بیان مولکول miRNA-146a بالغ می شود. این تغییر بیان با تأثیری که این miRNA روی رونویسی و تنظیم ژنهای مختلف دارد سبب افزایش درصد ابتلا به بسیاری از سرطانها از جمله سرطان ریه، سرطان کولون، سرطان پروستات، سرطان معده، سرطان کلیه، سرطان تخمدان، سرطان کبد، سرطان پانکراس و سرطان سینه می شود. به طوری که مطالعات نشان داده اند در بیماران سرطان سینه افزایش بیان ژن *miRNA-146a* ملاحظه می شود و افزایش بیان این ژن با اثر تنظیمی منفی که بر روی بیان ژن *BCRA1* دارد، در افزایش شانس ابتلا به سرطان سینه مؤثر است (۴ و ۱۹ و ۲۴ و ۲۶ و ۳۶).

بنابراین هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs2910164 در ژن *miR-146a* با سرطان سینه در جمعیتی از زنان ایرانی بود تا بتوان ان را به عنوان نشانگر ژنتیکی جهت تشخیص و پیش آگهی در بیماران به کار گرفت. این تحقیق به این جهت حائز اهمیت است که با آگاهی از این تغییرات می توان به پیشگیری، تشخیص سریع و درمان به موقع این بیماری کمک کرد و همچنین استفاده از روش مقرون به صرفه Tetra Arms PCR در مقایسه با سایر روشها آن را از نظر اقتصادی با سایر تحقیقات در این زمینه متمایز می سازد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پلی مورفیسم rs2910164 از نظر آماری رابطه معنا داری با سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی مورد مطالعه نداشت و مقایسه این تحقیق با سایر پژوهشها در کشور های دیگر نشان داد که ارتباط این پلی مورفیسم با سرطان سینه در جمعیتهای مختلف متفاوت است و این تفاوت می تواند با عوامل مختلفی از قبیل تفاوت جغرافیایی در منطقه مورد مطالعه، متفاوت بودن افراد جامعه، مرحله بیماری در بیماران سرطانی و یا به دلیل عوامل اپی ژنتیک و عادات زندگی در جوامع مختلف ارتباط داشته باشد. در ادامه به مقایسه نتایج تعدادی از تحقیقات گذشته در این زمینه با تحقیق حاضر، پرداخته شده است.

در مطالعه ای که توسط شن و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام گرفته نشان داده شد این پلی مورفیسم با سن بیمارانی که در آنها سرطان سینه و تخمدان تشخیص داده شده است ارتباط معنی دار داشت و اولین تحقیقی بود که در ارتباط با *miR146a* و سرطان سینه انجام شده است. در این مطالعه گزارش شده که با حضور حداقل یک آلل C در ژنوتایپ افراد، سطح بیان *miR146a* بالغ تا ۶۰ درصد نسبت به افراد دارای ژنوتایپ با آلل G افزایش می یابد و حضور این پلی مورفیسم می تواند سطح بیان *miR146a* بالغ را به طور معنی داری تغییر دهد (۳۰). مطالعه دیگری توسط الشاتوی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ برای بررسی ارتباط این پلی مورفیسم و سطح بیان ان با بیماران سرطان

سینه انجام گرفته است و نتایج ان نشان داده است که در جمعیت مورد مطالعه انان بین پلی مورفیسم rs2910164 و استعداد ابتلا به سرطان سینه ارتباط معنی داری وجود نداشته ولی بیان *miR146a* در بیماران سرطان سینه در مقایسه با گروه کنترلها تغییر معناداری را داشتند و آنان بیان داشتند که حضور پلی مورفیسمها در ژن *miR146a* می توانند در تنظیم ژنهای مرتبط با سرطان سینه نقش داشته باشند و بنابراین می توان از انها برای پیش آگهی در افراد دارای استعداد خطر ابتلای بالا استفاده نمود و برای جلوگیری از گسترش سرطان سینه به ویژه در سنین پایین تر نشانگر مناسبی هستند (۲). وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تحقیقی با روش متا آنالیز به بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs2910164 در ژن *miR-146a* و درصد ابتلا به سرطان سینه پرداختند و نتایج تحقیق آنها ارتباط معنی داری را بین حضور این پلی مورفیسم و سرطان سینه نشان نداد (۳۶). محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در اصفهان در پژوهشی مروری تحت عنوان مروری بر ساختار و عملکرد microRNA ها و نقش آن در سرطان اظهار کردند که میکرو ریبونوکلئیک اسیدها (microRNA) ریبونوکلئیک اسیدهای کوچک غیرکدکننده ای هستند که از نظر تکاملی محافظت شده هستند و دارای طولی برابر ۲۵-۱۸ نوکلئوتید می باشند و می توانند بیان ژنها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آنها، کنترل نمایند (۲۳). بسیاری این ساختارهای مولکولی در کنترل فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک سلولی شرکت نموده و می توانند به عنوان انکوژن و یا مهارکننده های توموری عمل نمایند. لذا بروز موتاسیون در این قابهای روخوانی باز می تواند منجر به سرطان شود. شناسایی microRNA و مولکولهای هدف آنها، افق روشنی را برای شناخت مسیرهایی که منجر به سرطان می شوند، فراهم کرده است. از این رو می توان از این ترکیبات به عنوان نشا نگرهای زیستی بالقوه در تشخیص، پیش بینی و درمان سرطان استفاده کرد (۲۳). مطالعات متعددی نشان داده اند که بین میزان تغییرات بیان microRNA ها و سرطان سینه نیز ارتباط وجود دارد و از انها می توان به عنوان نشانگر زیستی کلینیکی استفاده نمود (۳ و ۹). قاضی زاده و همکاران نشان دادند که بین سطح بیان miR-16, mir-145 و miR-223 در سرم بیماران دارای سرطان سینه در مقایسه با گروه کنترل ارتباط معنی داری وجود دارد (۹). در تحقیق دیگر که توسط امینی سپهر و همکارانش انجام شده است مشخص شد که اندازه گیری سطح بیان microRNA های پلاسمایی از جمله miR-4270 می تواند به عنوان ابزاری ارزشمند و حساس در پیش آگهی و تشخیص سرطان سینه مطرح باشد و همچنین این تغییرات سطح بیان با مراحل مختلف بیماری نیز به طور معنی داری ارتباط داشتند (۳). شیرین فریور و لیلی خاکپور در مقاله ای مروری تحت عنوان microRNA ها و سرطان سینه بیان داشتند که microRNA ها می توانند به عنوان القاء کننده و یا سرکوبگر تومور عمل کنند و اکنون دانشمندان سعی دارند بتوانند از miRNA علاوه بر تشخیص و طبقه بندی سرطانها، در درمان آنها نیز استفاده کنند که در این زمینه به موفقیتهایی نیز دست یافته اند (۸). اپادهیایا و همکاران در سال ۲۰۱۶ یک مطالعه در مورد ارتباط پلی مورفیسم rs2910164 در ژن *miR-146a* و سرطان سینه در جمعیت زنان مبتلای استرالیایی شامل ۱۶۰ نمونه بیمار اولیه و ۴۰۳ نمونه بیمار ثانویه و ۸۹ نمونه کنترل سالم انجام دادند و نتایج حاصله را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند و متوجه ارتباط معنی دار بین حضور این پلی مورفیسم با بیماری سرطان سینه شدند (۳۵). هورست و همکاران در سال ۲۰۰۹ طی مطالعه ای روی miR- 146a و miR- 146b نشان دادند که وجود این miRNA ها در رده های سلولی MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-436, و T47D در سرطان سینه متاستاتیک باعث افزایش بیان پروتئین cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) Breast و در نتیجه سرکوب متاستاز سلول سرطان می شود که در آن مطالعه از روشهای Quantitative real-time

reverse transcription-PCR وmicroarray استفاده شده بود (۱۴). به منظور تأیید نتایج این تحقیق و در جهت ارتقای پژوهش در این خصوص، انجام آزمایشها در نقاط جغرافیایی مختلف و با حجم نمونه های بیشتر و همچنین در نظر گرفتن ارتباط عوامل محیطی همچون وزن، سن، قومیت، عادات زندگی، ساعات کار روزانه، تعداد فرزندان، اعتیاد به سیگار و الکل در انتخاب گروه بیمار و کنترل و مورد مطالعه قرار دادن جمعیتهای مختلف و مشاهده تأثیر پلی مورفیسم rs2910164 در خزانه های ژنی متفاوت و ارتباطی که با شرایط محیطی و جغرافیایی متنوع می تواند داشته باشد و همچنین بررسی بیان این پلی مورفیسم و مقایسه تفاوت بیان آن در بیماران و افراد سالم و در نتیجه ارتباطی که با سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی می تواند داشته باشد می بایست در نظر گرفته شوند و تمامی این ارتباطات با بروز بیماری در زنان سایر جمعیتها نیز مقایسه گردند. اینچنین تحقیقاتی می تواند افق روشنی برای تهیه یک پایگاه اطلاعاتی بومی در جمعیت کشور در کنار پایگاههای بین المللی برای تشخیص، کنترل و درمان بیماریهای ژنتیکی به خصوص سرطانها ارائه نماید.

نتیجه گیری

در این تحقیق برای اولین بار به بررسی ارتباط خطر ابتلا به سرطان سینه و حضور پلی مورفیسم rs2910164 از ژن *miR-146a* در جامعه زنان ایرانی پرداخته شده است و به دلیل جامعه آماری کوچک و یا تفاوت در منطقه جغرافیایی مورد مطالعه نسبت به سایر جمعیتها در کشور های دیگر نتایج متفاوتی به دست آمده است که می تواند به دلایل مختلفی از قبیل تفاوت نژادی و قومی در منطقه جغرافیایی مورد مطالعه و یا کوچک بودن جامعه مورد مطالعه باشد، زیرا بین جمعیت انسانها تفاوتهای گوناگونی است، بنابراین یک پلی مورفیسم که در یک منطقه جغرافیایی یا گروه نژادی مشترک است، ممکن است بین دیگر گونه‌ها کمتر باشد. از این جهت بررسی پلی مورفیسمهای مختلف و ژنهای پلی مورف در مناطق جغرافیایی متنوع حائز اهمیت است زیرا با به دست آوردن اطلاعات انحصاری راجع به تغییرات یک ژن در یک منطقه خاص می توان رویکرد های دقیق تر و تصمیمات مؤثرتری را با توجه به عوامل تأثیرگذار مختص آن منطقه اتخاذ نمود، به عنوان مثال تأثیرگذار بودن پلی مورفیسم rs2910164 در احتمال القای سرطان در نقاط دیگر مشاهده شده بنابراین اقدام برای شناخت و درمان، مواجهه متفاوتی را در مقایسه با جمعیتی که این پلی مورفیسم در آن مؤثر نیست می طلبد. بنابراین با گسترش این پژوهش و در نظر گرفتن گستردگی جمعیت قابل مطالعه می توان نتایج این پژوهش را مورد آزمون قرار داده و از تجمیع نتایج حاصل به نتیجه گیری روشن، دقیق و کاربردی در جمعیت زنان کشور دست یافت. همچنین در مورد وجه تمایز این مطالعه با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه این نکته را می توان عنوان نمود که به جهت تأثیری که نوع نمونه ها می توانند بر نتایج تحقیق داشته باشند و هم کنترل نمودن نتایج در سایر قومیتها و مناطق جغرافیایی (هم درداخل و هم در خارج کشور)، در نوع نمونه گیری و انتخاب پارامترهای ورود و خروج افراد مورد مطالعه موارد خاصی در نظر گرفته شده است. مثلا سن افراد و دارا بودن فرزند در افراد مورد مطالعه، انتخاب نمونه ها تحت نظر پاتولوژیست و همچنین زمان تهیه نمونه خون از بیماران با نظر متخصص انکولوژیست و در نظر گرفتن پارامترهای استاندارد در تشخیص بیماران و خصوصاً ارثی بودن بیماری، مورد توجه قرار گرفته است. زیرا این miRNA می تواند بر روی نسخه برداری و بیان ژنهای BRCA1 و BRCA2 تأثیر داشته باشد و مطالعات نشان داده است که تغییرات در این دو ژن با ابتلا به سرطان سینه ارثی در بیماران می تواند مرتبط باشد. همچنین این تحقیق به منظور مقایسه نتایج ژنوتایپینگ با روش Tetra Arms PCR با سایر روشهای مولکولی از جمله روش PCR-RFLP و روش Sequencing انجام شد، تا کارآیی این روش که ساده تر و

مقرون به صرفه تر است تأیید شود و در نهایت اینکه در صورت امکان بتوان از نتایج تحقیق در درمان سرطانهای ارثی و جلوگیری از بروز متاستاز کلی و ابتلای سایر بافتها به تومور در بیماران، استفاده نمود (جهت غنی سازی ذخایر ژنتیکی کشور).

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولین محترم در دانشکده علوم زیستی دانشگاه ازاد اسلامی واحد تهران شمال و مسئولان محترم آزمایشگاه پاسارگارد که در انجام کارهای آزمایشگاهی این پایان نامه کمال همکاری را مبذول فرموده اند، تشکر و قدردانی می نماید. لازم به ذکر است که این پژوهش در کمیته تخصصی دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با شماره ۱۵۷۳۰۵۰۳۹۶۱۰۰۴ در زمستان ۱۳۹۶ مورد تصویب قرار گرفته است.

منابع

1- Afzal M, Rahim A, Naveed AK, Ahmed S, Kiyani MM. 2018. Development of Cost-effective Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System (T-ARMS) PCR for the Detection of miR-146a gene rs2910164 C/G Polymorphism in Breast Cancer. Biochem Mol Biol J. 4(1):1-4.

2- Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Al-Hazzani AA, Alsaif MA. 2012. Differential Expression Profile and Genetic Variants of MicroRNAs Sequences in Breast Cancer Patients. Zhang B, editor. PLoS One. 7(2):e30049.

3- Aminisepehr F, Babaei E, Hosseinpour Feizi MA. 2018. Study of the Expression of miR-4270 in Plasma of Patients with Breast Invasive Ductal Carcinoma. J Genet Resour. 4(2):85-89.

4- Bansal C, Sharma KL, Misra S, Srivastava A N, Balraj Mittal B, Singh US. 2014. Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of breast cancer in the North Indian population. ecancer medical science. 8(473): 1-9.

5- Chen Z, Saad R, Jia P, Peng D, Zhu S, Washington MK. 2013. Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma. Cancer. 119(11):1985- 1993.

6- Eisemann N, Waldmann A, Katalinic A. 2013. Epidemiology of Breast Cancer - Current Figures and Trends. Geburtshilfe Frauenheilkd. 73(2):130–135.

7- Enayatrad M, Amoori N, Salehiniya H. 2015. Epidemiology and trends in breast cancer mortality in Iran. Iran J Public Health. 44(3):430–431.

8- Farivar S, Khakpour L. 2012. MicroRNA and Breast Cancer. Genet 3rd Millenn. 10(4):2913-2921.

9- Ghazizadeh E, Hadi F, Zare M. 2016. Direct Assay of miR-16, miR-145 and miR-223 by a Novel Method of Mimic PCR in Serum of Breast Cancer Patients. J Genet Resour. 2 (2):98-108.

10- Ghorai A, Ghosh U. 2014. miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. Front Genet. 5:100.

11- Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ. 2010. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. J Oncol. 2010:1–7.

12- Heydarieh N, Faraji M. 2015. Ginger Ethanolic effects on body weight and breast cancer tumor growth in mice, female *BALB /C*. J Mol Cell Res. 27(4): 487-497.

13- Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F. 2009. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. Cancer Res. 69(14):5970–5977.

14- Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. 2009. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. Cancer Res. 69(4):1279–1283.

15- Jackson RJ, Standart N. 2007. How do microRNAs regulate gene expression? Sci STKE. (367):re1.

16- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 61(2):69–90.

17- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A,

Iovino N, Aravin A. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell. 129(7):1401–1414.

18- Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L. 2008. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. Carcinogenesis. 29(3):579–584.

19- Lian H, Wang L, Zhang J. 2012. Increased Risk of Breast Cancer Associated with CC Genotype of Has-miR-146a Rs2910164 Polymorphism in Europeans. Adamovic T, editor. PLoS One. 7(2):e31615.

20- Lin P-Y, Yang P-C. 2011. Circulating miRNA signature for early diagnosis of lung cancer. EMBO Mol Med. 3(8):436–437.

21- Liu F, Li B, Wei Y, Chen X, Ma Y, Yan L. 2011. P21 codon 31 polymorphism associated with cancer among white people: evidence from a meta-analysis involving 78,074 subjects. Mutagenesis. 26(4):513–521.

22- MacFarlane L-A, R. Murphy P. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Curr Genomics. 11(7):537–561.

23- Mohammadi E, Rahgozar S, Ghayedi K. 2011. Review of the structure and function of microRNA and its role in cancer. Genet 3rd Millenn. 9(3):2389-2398.

24- Morales S, DeMayo T, Gulppi FA, Gonzalez-Hormazabal P, Carrasco V, Reyes J, Gómez F, Waugh E, Jara L. 2018. Genetic Variants in pre-miR-146a, pre-miR-499, pre-miR-125a, pre-miR-605, and pri-miR-182 Are Associated with Breast Cancer Susceptibility in a South American Population. Genes. 9(427): 1-18.

25- Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. 2009. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 20(3):556–563.

26- Mu K, Wu Z, Yu J, Guo W, Wu N, Wei L, Zhang H, Zhao J**,** Liu J. 2017. Meta-analysis of the association between three microRNA polymorphisms and breast cancer susceptibility. Oncotarget. 8(40): 68809-68824.

27- Nilsen TW. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. Trends Genet. 23(5):243–249.

28- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? Trends Cell Biol. 17(3):118–126.

29- Shah R. 2014. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. World J Clin Oncol. 5(3):283.

30- Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. 2008. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. Carcinogenesis. 29(10):1963–1966.

31- Valaee Sh, Yaghoobi MM, Jamshidizad A, Shamsara M. 2019. Glucose dependent effect of metformin on expression of two microRNAs-related to epithelial to mesenchymal transition in a gastric cancer cell line. J Mol Cell Res. 32(2): 225-235.

32- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2012. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 62(1):10–29.

33- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. 2011. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin. 61(4):212–236.

34- Sonkoly E, Ståhle M, Pivarcsi A. 2008. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. Semin Cancer Biol. 18(2):131–140.

35- Upadhyaya A, Smith RA, Chacon-Cortes D, Revêchon G, Bellis C, Lea RA. 2016. Association of the microRNA-Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 in miR146a with sporadic breast cancer susceptibility: A case control study. Gene. 576(1):256–260.

36- Wang P-Y, Gao Z-H, Jiang Z-H, Li X-X, Jiang B-F, Xie S-Y. 2013. The associations of single nucleotide polymorphisms in miR-146a, miR-196a and miR-499 with breast cancer susceptibility. PLoS One. 8(9):e70656.

Association between miR146a gene rs2910164 polymorphism with breast cancer in Irainian female by Tetra-Arms PCR

Siasi E., Soleimani M. and Mehrabian S.

Dept. of Genetics, Faculity of Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Gene expression is regulated with miRNAs, that are non-coding small RNA molecules and genetic variations such as *miRNA* genes SNPs, which are molecular biomarkers in the prediction of cancers risk. One of miRNAs that is associated with *BRCA1 / BRCA2* genes, is miR146a and related with many cancers, including breast cancer. This research aim was association study between prevalence of rs2910164 SNP in *miR146a* gene with breast cancer in Iranian female population. This study was performed on 50 patient and 50 control blood samples. DNA was extracted of samples. Then for genotyping was used Tetra Aarms PCR and results was statistically analyzed. Frequency of genotypes for GG, GC and CC in control groups were 30%, 66% and 4%, and for patient groups was 46% , 52% and 2%, respectively. No significant difference was observed between frequency of dominant and recessive allels in control and patients gorups ($P > 0.05$). In this study results, there was not significant difference between G and C alleles in the control and case groups. Therefore, could be indicated that there was not association between of *miR146a* gene rs2910164 polymorphism and breast cancer in the studied Iranian females population. So, further studies with larger sample size are required to support finding of this research.

Key words: Breast cancer, *miR-146* gene, SNP, rs2010164, Tetra-Arms PCR..