

اثر میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین بر بیان ژن‌های miR-21 و miR-29 در رده‌های سلولی سرطان معده

الهام سیاسی^{۱*}، الهه منیری^۱ و سهیلا عبدی^۲

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک.

^۲ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد صفا دشت، گروه فیزیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

مطالعات بیوالکترومغناطیس و نقش تابش‌های میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین از عوامل محیطی مهم در بروز و درمان سرطان‌ها می‌باشد. در این مطالعه تغییرات بیان *miR-21* و *miR-29* در رده سلولی سرطان معده تحت تأثیر تابش میدان‌های الکترومغناطیس با شدت‌های ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی‌تسلا در دو نوع تابش پیوسته و ناپیوسته بررسی شد. رده سلولی سرطانی معده، تحت تابش میدان الکترومغناطیسی در دو شدت میدان ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی‌تسلا و دو نوع تابش پیوسته و ناپیوسته قرار گرفتند و با یک گروه کنترل که تحت تابش قرار نداشت، مقایسه شدند. پس از استخراج RNA از سلول‌ها، سنتز cDNA انجام شد و با استفاده از روش Real Time PCR تغییرات بیان دو microRNA بررسی و نتایج آنالیز آماری شدند. بر اساس نتایج میزان بقای سلول‌ها در تابش میدان‌های الکترومغناطیسی نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. افزایش میزان بیان *miR-21* و *miR-29* در هر دو میدان الکترومغناطیسی با افزایش شدت میدان معنی‌دار بود. همچنین با افزایش بیان *miR-21* و *miR-29* در هر دو نوع تابش میزان زنده ماندن سلول‌ها کاهش معناداری نشان داد. نتایج مشخص نمود تابش میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین در رده سلولی سرطان معده سبب افزایش بیان *miR-21* و *miR-29* شده که تایید تحقیقات بیشتر می‌تواند آن را بعنوان بیومارکر مولکولی برای سرطان معده مطرح نماید.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، تابش میدان‌های الکترومغناطیس، *miR-21*، *miR-29*، رده سلولی سرطان معده.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶، پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca

مقدمه

از جمله: مواد غذایی، نیترا‌تها، غذاهای مانده به همراه سیگار، الکل، دیابت، سن و جنس، چاقی و بیماری‌های زمینه‌ای دستگاه گوارش همچون ابتلا به باکتری هلیکوباکتر پیلوری که یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های باکتریال در انسان است (۱ و ۱۸ و ۲۶ و ۳۶). فاکتورهای ژنتیکی نیز در ابتلا به بیماری نقش دارند، همچون افراد دارای گروه خونی A، کم‌خونی، سابقه‌ی خانوادگی سرطان معده، افراد مبتلا به سرطان کولون و سندروم لی فرامنی و سندروم پوتزجرگر (Peutz-Jeghers syndrome) و افرادی که

آدنوکارسینوم معده (Gastric adenocarcinoma) یکی از مهم‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان می‌باشد. بر اساس حالات مورفولوژی به دو نوع روده‌ای و نفوذی تقسیم بندی شده است و مطالعات نشان داده است که شیوع آن در مردان با فرم روده‌ای و در زنان با فرم نفوذی همراه است (۱۲ و ۳۶ و ۴۴). دلایل بیماری سرطان معده تاکنون به طور روشن مشخص نشده است. با این‌وجود یک سری از فاکتورهای محیطی بعنوان عامل خطر برای ابتلا به این سرطان مورد بررسی قرار گرفته اند،

مختلف از جمله روده، پستان، پانکراس و پروستات و همین‌طور سرطان معده شاهد تغییرات تنظیمی و اغلب به‌صورت افزایش بیان می‌باشد (۲ و ۶ و ۱۱ و ۳۱). ژن هدف miR-21، تومور ساپرسورهایی از جمله ژن *PTEN* و پروتئین *PDCD4* می‌باشد. در نتیجه با مهار این دو تومور ساپرسور توسط miR-21 تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی معده افزایش یافته و آپوپتوز سلول‌های سرطانی معده مهار می‌گردد (۱۷ و ۳۰ و ۴۹). یکی دیگر از microRNAها در تشخیص سرطان معده، miR-29 است که در سرطان‌های مختلف نقش انکوژنی یا تومورساپرسوری دارد و بر اساس تحقیقات در رده سلولی سرطان معده میزان آن کاهش می‌یابد (۱۳ و ۱۶ و ۲۳ و ۴۰). MiR-29 از طریق هدف قرار دادن ژن *CCND2* و ژن‌های *متالوپروتئیناز ۲* نقش تومور ساپرسوری داشته و با کاهش بیان این microRNA بیان این دو ژن هدف کاهش می‌یابد، در نتیجه سبب افزایش مهاجرت و متاستاز در سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۶ و ۳۴ و ۴۸).

مطالعات نشان داده است تابش میدان‌های الکترومغناطیس می‌تواند با تأثیر بر غشای سلول و تغییر در کانال‌های غشای سلولی از جمله کانال کلسیم، تغییرات قابل توجهی در پتاسیل‌الکتریکی غشا ایجاد نماید و واکنش‌های سلولی را در پی داشته باشد. تأثیر بر مسیرهای پیام‌رسانی سلولی از طریق تغییرات یون کلسیم از دیگر مکانیسم‌های اعمال اثر میدان‌های الکترومغناطیس می‌باشد. همچنین میدان الکترومغناطیس می‌تواند با تأثیر بر فاکتورهای رونویسی و یا تغییر در هر یک از فاکتورها یا سایر عوامل مؤثر مثل آنزیم‌های دخیل در روند رونویسی، منجر به تغییر بیان ژن‌ها گردد. همچنین تابش میدان الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین، در صورتی که ناپایداری مولکول‌ها کاهش یابد می‌تواند با ایجاد تغییرات در سطح اسپین‌های اتم‌های مولکول‌ها و تغییر آن‌ها منجر به ایجاد رادیکال‌های آزاد مختلف در سلول‌ها با نقش اکسیداتیو استرس گردد. تولید رادیکال‌های آزاد تحت تابش

دارای جهش و پلی‌مورفیسم در ژن *CDHI* می‌باشند (۲۲ و ۳۶ و ۳۸). علاوه بر این موارد تغییرات دیواره معده و نقص در اسید معده، گاستریت آتروفی اتوایمون مزمن (تیپ A) که یک التهاب طولانی مدت معده توسط حمله‌ی اشتباه سیستم ایمنی بدن بر علیه خود بدن است، انمی‌بدخیم پرنشیوز (Pernicious anemia) که نوعی کم‌خونی و کمبود ویتامین B12 می‌باشد، پولیپ‌های معده‌ای آدنوماتوز (Adenomatous) و التهابات شیارهای بزرگ معده از ریسک فاکتورهای سرطان معده می‌باشند (۱۲ و ۳۸).

در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در زمینه microRNAها و نقش آن‌ها در فرآیندهای طبیعی سلولی و مولکولی موجودات زنده صورت گرفته است (۳ و ۴۱). دلایلی متعددی وجود دارند که ثابت می‌کند miRNA می‌تواند بیومارکرهای مناسبی در تشخیص و پیش‌آگهی سرطان‌ها باشند، زیرا microRNAها نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای حیاتی نظیر، کنترل چرخه‌ی سلولی، تکثیر سلول، مهاجرت، تمایز، آپوپتوز، التهاب و متاستاز دارند و تغییرات آنها می‌تواند در پیشبرد یا مهار سلول‌های سرطان دخالت داشته باشد (۵ و ۶ و ۲۳ و ۲۸). حضور miRNAها در گردش خون می‌تواند به علت مرگ و لیز سلول‌ها باشد و یا توسط سلول‌های توموری به محیط خونی آزاد شوند. بنابراین، حضور آنها در گردش خون نه تنها مارکر مولکولی برای تشخیص سرطان معده هستند، بلکه با تنظیم ژن‌های هدف مختلف در مسیرهای سیگنالینگ می‌توانند در تکثیر، تومورزایی و متاستاز سرطان معده نقش داشته باشند (۳۹ و ۴۶). دسته‌ای از microRNAها در سرطان معده با تنظیم مثبت دارای افزایش بیان شده و نقش انکوژنیک دارند و دسته دیگر با تنظیم منفی دچار کاهش بیان می‌شوند و سرکوبگر تومور هستند (۱۴ و ۳۷ و ۴۰ و ۴۲ و ۴۵). در این بین، miR-21 یکی از با سابقه‌ترین microRNAها با نقش بیومارکر مولکولی در امر تشخیص سرطان معده می‌باشد (۴ و ۱۷ و ۳۰ و ۴۰ و ۴۷ و ۵۰). این مولکول، یک microRNA چند منظوره می‌باشد که در سرطان‌های

داخل سیم لوله به وسیله تسلا متردیجیتالی (Holladay three-D sensor، ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. در میدان ۲/۵ میلی تسلا افزایش شدت جریان باعث افزایش دما در داخل سیم لوله می‌شد. از آن جایی که سلول‌ها در دمای بالاتر ۳۹ درجه سانتی‌گراد آسیب می‌بینند، برای کنترل دمای داخل سیم لوله علاوه بر این که سیم لوله به داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد، یک هواکش کوچک در پایین آن قرار گرفت. همچنین پایه چوبی به ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر برای سیم لوله طراحی شد تا با سطوح فلزی انکوباتور تماس نداشته باشد و در فضای مرکزی انکوباتور به صورت ثابت قرار گیرد.

تهیه رده‌های سلولی سرطان معده - رده سلولی سرطان معده (AGS) با مشخصه (IBRC-C10071)، از مرکز ذخایر ژنتیک ایران، تهیه گردید. برای کشت سلول‌های سرطان معده، از محیط کشت حاوی ترکیبات: DMEM high glucose ۸۵ درصد (از شرکت biowest)، پنی سیلین و استرپتومایسین به میزان ۱ درصد (تهیه شده از شرکت amgIS)، اسیدهای آمینه غیر ضروری به میزان ۱ درصد (تهیه شده از شرکت Gibco)، L-گلوتامین به میزان ۱ درصد (تهیه شده از شرکت Gibco)، سرم استریل گاوی FBS به میزان ۱۰ درصد (تهیه شده از شرکت Gibco) و تریپسین همراه با EDTA به میزان ۲۵ درصد (تهیه شده از شرکت Invitrogen) استفاده گردید. سپس به صورت وابسته به بستر (Anchorage dependent) یا چسبنده (Adherent) و بر طبق دستورالعمل‌های موجود در منابع معتبر کشت سلولی در زیر هود کلاس II و با رعایت نکات استریل انجام شد. به منظور نگهداری سلول‌ها در حین کشت سلولی و افزایش تعداد آن‌ها از انکوباتور ۹۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۳۲ درصد و غلظت ۵ درصد گاز CO₂ استفاده شد.

انتقال فلاسک‌های حاوی رده سلولی به سیستم میدان الکترومغناطیس داخل انکوباتور جهت پرتودهی - بعد از

میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین می‌تواند منجر به تغییر در چرخه‌های موثر در تمایز و اپیتوز، ترمیم DNA و تغییر بیان مولکولی microRNA ها گردد (۸ و ۹ و ۱۵ و ۳۳). با توجه به مطالب فوق و بنابر مطالعات انجام شده در این خصوص، میدان‌های الکترومغناطیسی با تاثیر بر عملکرد microRNA ها می‌توانند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی در سرطان‌ها مطرح باشند (۷ و ۱۹ و ۲۰ و ۲۴ و ۲۷ و ۳۲ و ۴۳). بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تغییرات سطح بیان miR-21 و miR-29 در رده سلولی سرطان معده که تحت تابش میدان‌های مغناطیسی با فرکانس بسیار پایین قرار گرفته‌اند، بود تا بتواند بعنوان روش تشخیصی، پیش‌آگهی و درمانی برای بیماران مبتلا به سرطان معده مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

نمونه‌ها - این تحقیق به روش بنیادی کاربردی و در بازه زمانی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۸، در محل انستیتو کنسر بیمارستان امام خمینی تهران انجام شد. با توجه به اهداف پژوهشی در ۵ گروه شامل یک گروه کنترل که تحت تابش میدان الکترومغناطیس نبوده است و ۴ گروه آزمایش که تحت تابش با دو شدت میدان (۲/۵ میلی تسلا) و دو نوع تابش پیوسته و نا پیوسته قرار گرفتند، انجام شد. برای گروه‌های مورد آزمون از رده سلولی سرطان معده استفاده شد.

میدان الکترومغناطیسی و تنظیم سیستم تابش میدان الکترومغناطیس - سیستم مورد استفاده برای القای میدان مغناطیسی شامل استوانه‌ای از جنس P.V.C به قطر ۱۲ سانتی‌متر و طول ۳۰ سانتی‌متر بود که بر روی آن ۱۲۰۰ دور سیم مسی به قطر ۱ میلی‌متر در ۴ ردیف پیچیده شده بود. برای تولید میدان‌های مغناطیسی پیوسته از منبع تغذیه DC (سنجش، ساخت ایران) استفاده شد و برای ایجاد میدان‌های الکترومغناطیسی نا پیوسته از منبع تغذیه AC (delta، ساخت چین) استفاده شد. میدان‌های مغناطیسی

زنده، حلقه تترازولیوم را شکسته و با تولید NADH و NADPH منجر به تشکیل رسوب نامحلول ارغوانی رنگ به نام فورمازان می‌شوند. این رسوب می‌تواند توسط ایزوپروپانول یا دی‌متیل سولفواکسید حل شود. از سوی دیگر، سلول‌های مرده، چنین توانایی را نداشته و بنابراین سیگنالی را نشان نمی‌دهند. در این روش، تشکیل رنگ به‌عنوان نشانگر سلول‌های زنده است. شدت رنگ تولید شده، با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه ایی که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از ۴ گروه محیط‌های آزمایش در معرض تابش میدان‌ها و گروه کنترل بدون تابش، به همراه ۱۰ میکرو لیتر رنگ MTT، می‌باشند با دستگاه microplate reader، و طول موج ۵۴۰ تا ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب بود.

استخراج RNA - پس از ترپسینه نمودن، سلول‌ها از کف فلاسک در تمام گروه‌های مورد آزمون، جدا شدند و با روش تریزول (محلول تریزول تهیه شده از شرکت Invitrogen)، استخراج RNA انجام شد.

سنجش غلظت، خلوص و کیفیت RNA - برای تعیین غلظت و سنجش خلوص RNA هر نمونه، از دستگاه نانودراپ استفاده شد و جهت سنجش کیفیت RNA استخراج شده، میزان ۳ میکرولیتر از نمونه بر روی ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد بارگذاری شد. با مشاهده باندهای RNA های ریبوزومی 18 S و 28 S کیفیت و صحت استخراج RNA تأیید شد.

تکثیر microRNA و انجام واکنش Real Time PCR برای بررسی بیان miR-21 و miR-29 - تکثیر miR-21 و miR-29 و سنتز cDNA با استفاده از کیت تکثیر microRNA پارس ژنوم ساخت ایران و انجام واکنش Reverse Transcription PCR (RT-PCR) صورت گرفت. سپس سنجش بیان دو microRNA مورد مطالعه، با واکنش Real Time PCR در نمونه‌های سلولی شامل ۴ گروه آزمایشی تحت تابش با مشخصات شدت تابش ۰/۲۵ و

کشت و پاساژ سلولی، فلاسک‌ها در روز سوم، زمانی که هر فلاسک حدود یک میلیون سلول داشت برای پرتودهی میدان مغناطیسی به انکوباتور، منتقل شدند. یک نگه‌دارنده فلاسک در قسمت میانی سیم لوله از جنس فوم که مانعی برای جریان میدان و سلول‌ها در معرض میدان الکترومغناطیسی نباشد، طراحی و ساخته شد. رده‌های سلولی در پنج گروه که شامل یک گروه کنترل، که داخل انکوباتوری مجزا به صورت شرایط عادی و تحت تابش میدان الکترومغناطیس نبود و ۴ گروه آزمایش که شامل ۴ عدد فلاسک بودند که تحت تابش میدان الکترومغناطیس حاصل از سیم لوله داخل انکوباتور با مشخصه‌های متفاوت از نظر شدت میدان و نوع جریان تابش، در بازه زمانی ۱۸ ساعت قرار گرفتند. شرایط قرارگیری سلول‌ها در معرض میدان‌های الکترومغناطیسی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- شرایط قرارگیری سلول‌ها در معرض میدان

الکترومغناطیسی ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی‌تسلا

گروه	شدت میدان	نوع تابش	ولتاژ دستگاه (V)
۱	۲/۵ میلی‌تسلا	پیوسته	۲۵
۲	۰/۲۵ میلی‌تسلا	پیوسته	۲/۴
۳	۲/۵ میلی‌تسلا	ناپیوسته	۲۵
۴	۰/۲۵ میلی‌تسلا	ناپیوسته	۲/۴
۵	بدون تابش	بدون تابش	۰

سنجش بقای سلولی به روش MTT Assay - پس از پرتوگیری هر گروه، میزان زنده ماندن سلول‌های آن گروه با روش MTT Assay اندازه‌گیری شد. این روش، یک روش رنگ‌سنجی برای بررسی تکثیر و بقای سلول‌ها است که بر اساس فعالیت میتوکندری‌های سلول زنده می‌باشد. فعالیت میتوکندریایی در سلول‌های زنده به‌صورت پایدار است و بنابراین افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده به‌صورت خطی با فعالیت میتوکندری در ارتباط می‌باشد. رنگ تترازولیوم MTT در سلول‌های فعال (به لحاظ متابولیکی)، احیا می‌شود. دهیدروژنازهای میتوکندریایی در سلول‌های

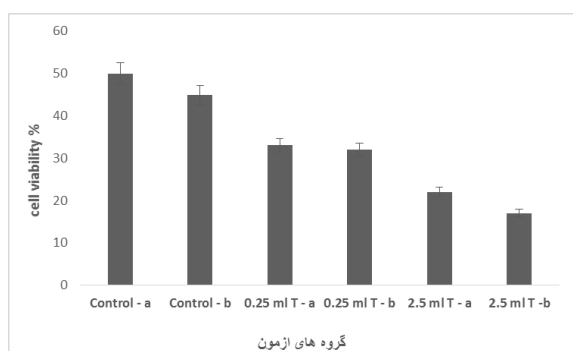
ترمو سایکلر عبارت بود از: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، که واکنش در تعداد ۴۰ چرخه تکرار شد و دمای Melt curve از ۶۶ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد بود.

۲/۵ میلی‌تسلا و در دو نوع تابش پیوسته و ناپیوسته و یک گروه فلاسک کنترل که تحت هیچ‌گونه تابشی قرار نداشتند و ژن رفرنس داخلی U6 با دو بار تکرار انجام شد. مواد و توالی پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش Real Time PCR در جدول ۲ آورده شده است. برنامه دستگاه

جدول ۲- مواد و پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام واکنش Real time PCR

ماده	مقدار مورد نیاز
پرایمرهای چپ و راست	غلظت ۱۰ پیکومول، هر یک ۱ میکرولیتر
cDNA اختصاصی	۱۰۰ نانوگرم، ۱ میکرولیتر
مواد واکنش PCR همراه رنگ سایبرگرین (از شرکت تاکارا ژاپن)	۱۰ میکرولیتر
آب دو بار تقطیر شده	۷ میکرو لیتر
حجم کل	۲۰ میکرو لیتر
توالی پرایمرهای چپ و راست برای miR-21 (۱۷)	F- GGGGTAGCTTATCAGACTGATGTT R- GCGAGCACAGAATTAATACGACTC
توالی پرایمرهای چپ و راست برای miR-29 (۴۸)	F- GGTA CCGGTTGTCTTGGGTTTATTG R- GAAT TCAAATACTTCAGAGCTG
توالی پرایمرهای چپ و راست برای U6 (۴۸)	F- CGCAAGGATGACACGCAAATTC R- GCGAGCACAGAATTAATACGACTC

تابش پیوسته و هم در شرایط تابش ناپیوسته وابسته به شدت میدان مغناطیسی مشاهده شد و در گروه تابش ناپیوسته میزان بقا به میزان بیشتر کاهش یافت.



شکل ۱- بررسی زنده ماندن گروه‌های آزمون تحت تابش پیوسته و ناپیوسته (a- تابش پیوسته و b- تابش ناپیوسته)

نتایج میزان بیان miR-21 و miR-29 با روش Real Time PCR- نتایج اندازه‌گیری میزان تغییرات بیان miR-21 و

آنالیز آماری - نتایج بدست آمده طی واکنش Real Time PCR، با محاسبه ΔCT و سپس $\Delta\Delta CT$ ، و در نهایت محاسبه عدد $FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$ و میانگین محاسبه شده دو تکرار از هر فلاسک، مورد آنالیز آماری، با استفاده از برنامه SPSS، قرار گرفت. آزمون Independent-samples t-test، جهت بررسی داده‌ها و تعیین میزان معنی‌داری آن‌ها استفاده شد. تمامی داده‌های حاصل در این بررسی با ۲ بار تکرار و در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شدند.

نتایج

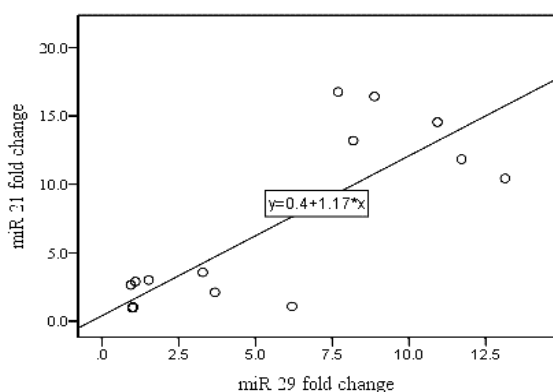
نتایج بقای سلولی با MTT Assay - نتایج تست MTT Assay که نشان‌دهنده‌ی بقا و زنده ماندن سلول‌ها بود، در شکل ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج، میزان بقای سلولی در میدان‌های الکترومغناطیسی ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی‌تسلا، نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($p \text{ value} < 0.05$). این کاهش زنده ماندن هم در شرایط

الکترومغناطیسی (۰/۲۵ و ۲/۵ میلی تسلا) افزایش داشت و با افزایش شدت میدان میزان بیان این دو microRNA افزایش یافت و این افزایش بیان برای miR-29 و miR-21 در میدان الکترومغناطیسی ۲/۵ میلی تسلا معنی‌دار بود (p value <0.05).

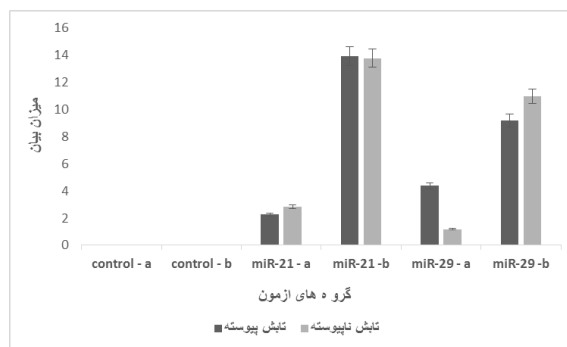
miR-29 در رده سلولی سرطان معده پس از تابش دهی در میدان‌های الکترومغناطیسی ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی تسلا، بصورت پیوسته و ناپیوسته به مدت ۱۸ ساعت در جدول ۳ و شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، میزان بیان miR-29 و miR-21 در هر دو میدان

جدول ۳- تغییرات بیان miR-29 و miR-21 تحت تابش میدان‌های الکترومغناطیسی ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی تسلا، بصورت پیوسته و ناپیوسته

میزان بیان	نوع تابش	۰/۲۵ میلی تسلا	P value	۲/۵ میلی تسلا	P value
miR-21	پیوسته	۲/۲۵±۰/۷	p > ۰/۰۵	۱۳/۹۲±۱/۴	۰/۰۰۱
miR-21	ناپیوسته	۲/۸۴±۰/۱	p > ۰/۰۵	۱۳/۷۹±۱/۷	۰/۰۰۱
miR-29	پیوسته	۴/۳۸±۰/۹	p > ۰/۰۵	۹/۱۹±۱/۲	۰/۰۰۱
miR-29	نا پیوسته	۱/۱۸±۰/۱	p > ۰/۰۵	۱۰/۹۷±۱/۲	۰/۰۰۱



شکل ۳- همبستگی بین بیان miR-29 و miR-21 در رده سلولی سرطان معده تحت تابش میدان‌های الکترومغناطیسی



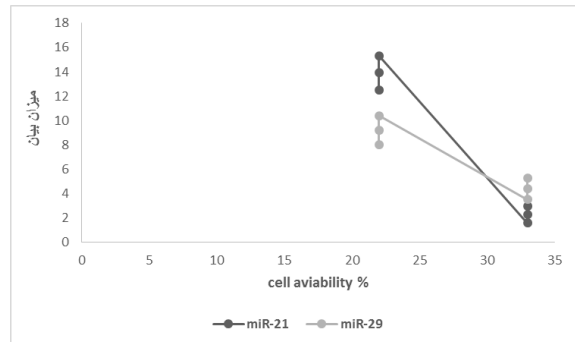
شکل ۲- تغییرات بیان miR-29 و miR-21 تحت تابش پیوسته و ناپیوسته میدان‌های الکترومغناطیسی
a - شدت ۰/۲۵ میلی تسلا و b - شدت ۲/۵ میلی تسلا

ارتباط بین تغییرات بیان miR-29 و miR-21 و میزان بقا سلولی - ارتباط بین تغییرات بیان miR-29 و miR-21 و میزان بقای سلولی در رده سلولی سرطان معده تحت تابش میدان‌های الکترومغناطیسی در شکل‌های ۴ و ۵ آورده شده است. بر اساس آنالیز آماری میزان بقای سلولی با افزایش بیان miR-21 نسبت معکوس دارد و با افزایش بیان این microRNA چه در شرایط تابش پیوسته (R = -0.918, p < 0.001) و چه در شرایط تابش ناپیوسته

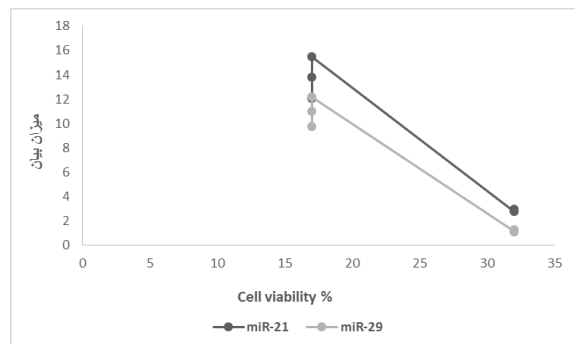
نتایج همبستگی میزان بیان miR-29 و miR-21 - همبستگی بین تغییرات بیان miR-29 و miR-21 در رده سلولی سرطان معده تحت تابش میدان‌های الکترومغناطیسی ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی تسلا، در شکل ۳ نشان داده شده است. این نتایج مشخص نمود بین تغییرات بیان miR-29 و miR-21 همبستگی مثبت وجود دارد. یعنی با افزایش بیان هر کدام میزان بیان دیگری نیز افزایش می‌یابد (R=0.807, p value <0.001).

دو جنبه ژنتیک و اپی ژنتیک بررسی می‌گردد (۱ و ۲) و ۲۶ و ۳۶ و ۳۸). تغییراتی نظیر متیلاسیون، استیلایون و داستیلایون هیستون‌ها و یا نقش microRNA از جمله تغییرات مهم اپی ژنتیک می‌باشد. در فرایند‌های مهمی در سلول‌ها microRNA نقش دارند و می‌توانند به‌عنوان انکو microRNA یا تومورسپرسور microRNA در سرطان ایفای نقش نمایند (۲ و ۳۷ و ۳۹ و ۴۶). بنابراین تحقیقات اخیر نشان داده است از این کوچک مولکول‌های زیستی می‌توان به‌عنوان نوعی بیو مارکرهای مهم در فرایند تشخیص، پیش‌آگهی و یا درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده نمود (۱۶ و ۲۸ و ۳۱ و ۴۰). از آنجایی که تشخیص زود هنگام سرطان معده توسط تکنیک‌های رایج بسیار پایین است بنابراین نیاز به روش‌های کارآمدتری نسبت به روش‌های موجود نیاز است. در سال‌های اخیر نقش عوامل محیطی و تاثیرات آن بر عوامل ژنتیکی سرطان به خوبی شناخته شده است، از جمله سبک زندگی افراد، نوع تغذیه، مواد شیمیایی و یا اشعه‌های مضر و سایر عوامل محیطی که با اثر بر فاکتورهای ژنتیک و اپی ژنتیکی می‌توانند نقش موثری در بروز سرطان ایفا نمایند (۲۲ و ۲۶ و ۳۸). نقش تابش میدان‌های الکترومغناطیس که به صورت امواج مختلف و با شکل‌های گوناگون انسان‌ها را در زندگی روزمره تحت تاثیر قرار داده است، اهمیت این موضوع را بر سلامتی و حوزه بیولوژی بیش از پیش با اهمیت نموده است (۷ و ۹ و ۲۷ و ۳۳ و ۴۳). با توجه به نقش miR-29 و miR-21 که بترتیب جز microRNA های ایجادکننده سرطان و مهارکننده و یا تومور انکوژن و ساپرسورژن توموری هستند و اهمیت اثرات تابش میدان‌های الکترومغناطیس به‌عنوان عامل محیطی مهم بر روی انواع سرطان بویژه سرطان معده، هدف از این تحقیق را که بررسی اثر میدان‌های مغناطیسی با فرکانس ۲/۵ و ۰/۲۵ میلی‌تسلا بر بیان miR-29 و miR-21 در رده سلولی سرطان معده بود، مشخص نمود و نتایج حاصل از آن نشان داد که بیان هر دو microRNA در اثر این میدان‌های

میزان بقای سلولی کاهش نشان داده است. میزان زنده مانده سلول‌ها (R= -0.889, p value <0.001) کاهش یافته است. زنده مانده سلول‌ها با افزایش بیان miR-29 نیز نسبت عکس دارد و با افزایش بیان این microRNA در شرایط تابش پیوسته (R= -0.828, p value <0.001) و هم در شرایط تابش ناپیوسته (R= -0.800, p value <0.001) میزان بقای سلولی کاهش نشان داده است.



شکل ۴- همبستگی بین تغییرات بیان *miR-21* و *miR-29* و میزان بقای سلولی در سلول‌های سرطان معده تحت تابش میدان‌های الکترومغناطیسی به‌صورت پیوسته.



شکل ۵- همبستگی بین تغییرات بیان *miR-21* و *miR-29* و میزان بقای سلولی در سلول‌های سرطان معده تحت تابش میدان‌های الکترومغناطیسی به‌صورت ناپیوسته.

بحث

سرطان معده یکی از انواع سرطان‌های ناهمگون و با نرخ مرگ میر بالا و نیز از نظر نرخ بقا پایین می‌باشد بطوریکه پنجمین سرطان شایع در دنیا و سومین سرطان عامل مرگ انسانی است (۱ و ۳۶ و ۴۳). سرطان معده با دو علت ژنتیک و محیط به‌عنوان یک بیماری چند عاملی تعریف می‌گردد. این بیماری از دیدگاه پاتوفیزیولوژی مولکولی از

سرطان‌ها از جمله سرطان معده دارد و نتایج این تحقیقات نشان داده است کاهش بیان این microRNA بطور طور معناداری بر روند این مسیرهای تمایزی و ایجاد سرطان معده تاثیر دارد (۱۳ و ۱۶ و ۳۴ و ۴۰ و ۴۸). به دلیل اهمیت ویژه‌ی این microRNA در مسیر های پیشرفت سرطان مطالعات مختلفی بر روی آن صورت گرفته است. با توجه به مطالعه‌ای که در ارتباط با miR-29 با سرطان پروستات صورت گرفته است کاهش بیان miR-29 در رده‌ی سلولی سرطان پروستات نشان داده شده است (۲۳). همچنین در مطالعه‌ای که به روش سیستماتیک برای ارزیابی وضعیت miR-29 در سرطان پستان صورت گرفته است، این microRNA مهارگر تومور گزارش شده است (۶) با توجه به اهمیت نقش miR-29 در سرطان‌های دستگاه گوارش بویژه سرطان کبد مطالعات متعددی انجام شده است و نتایج آنها نشان داده که miR-29 دارای یک عملکرد سرکوبگر تومور می‌باشد و این microRNA در سرکوب مهاجرت، تهاجم و رشد سلول‌های سرطانی نقش بسزایی ایفا می‌کند (۲ و ۱۰ و ۲۵ و ۳۵). همچنین در مطالعه استیل و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان داده شده است، بیان miR-29 در سلول‌های رده سرطان پروستات، با نقش تنظیمی که در هدف‌گیری مولکول‌های آغازگر متاستاز و انتی‌آپتوزی دارد، می‌تواند در تهاجم و تکثیر سلولی دخالت داشته باشد. بنابراین می‌توان از این microRNA بعنوان فاکتور موثر در درمان سرطان پروستات همراه با روش‌های شیمی‌درمانی استفاده نمود (۳۴).

در مطالعات متعدد اخیر نقش و تاثیرات شدت میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روی بافت‌ها و ارگان‌های بدن نشان داده شده است. این تاثیرات، ارتباط میدان‌های مغناطیسی را با افزایش سنتز DNA، کاهش در باز جذب استخوان و نگهداری تراکم استخوان، سنتز پروتئین، اتصالات سلولی، کمپلکس ارتباط داخل سلولی و تحریک و ترمیم اعصاب مطرح نموده اند. همچنین نشان داده شده است که در بررسی‌های سلولی و مولکولی یا در

مغناطیسی افزایش یافته و این افزایش بیان در میدان ۲/۵ میلی‌تسلا نسبت به ۰/۲۵ میلی‌تسلا بطور معنی‌دار بیشتر بود ($p < 0.05$).

یکی از روندهای تنظیمی ژن‌ها اثرات تنظیم‌گر microRNA می‌باشد. توانایی تمایز microRNAها برای کنترل ژن‌های مختلف و مسیرهای سیگنالینگ مختلف به طور همزمان این microRNAها را کاندید مهمی برای هدف تشخیص زود هنگام و درمان بیماری‌ها بخصوص در زمینه سرطان نموده است (۱۴ و ۴۰ و ۴۶). miR-29 و MiR-21 چندین ژن دخیل در بیماری‌های سرطانی را هدف‌یابی می‌کنند (۱۱ و ۱۶ و ۳۱ و ۳۴). microRNA ، MiR-21 شناخته شده‌ای است که مطالعات بسیار زیادی در مورد آن صورت گرفته است و ثابت شده که در سرطان‌های مختلف نقش اساسی را ایفا می‌کند. این microRNA دارای نقش انکوژنی بوده و با اثر تنظیمی بر ژن‌های مهم در مسیرهای سیگنالینگ، سلول را به سمت سرطانی شدن پیش می‌برد (۱۰ و ۱۱ و ۱۷ و ۳۰ و ۴۰). در مطالعه ژانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مشخص شد بیان miR-21 در بافت توموری معده افزایش می‌یابد و با حذف آن کاهش قابل توجهی در تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی و افزایش آپاپتوز مشاهده شد (۴۷). ژانگ و همکارانش افزایش بیان miR-21 را در سلول‌های توموری بیماران سرطان معده نشان دادند. همچنین مشخص نمودند بین افزایش بیان با مرحله‌ی بیماری، متاستاز و اندازه تومور ارتباط معناداری وجود دارد (۵۰). بر اساس مطالعه‌ای که بر روی ۳۷ بیمار سرطان معده توسط چان و همکارانش در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت miR-21 در ۹۲٪ بیماران افزایش بیان داشت (۴). در مطالعه‌ای که روان و همکارانش بر روی ۴۰ فرد بیمار مبتلا به سرطان معده و ۴۰ فرد سالم انجام دادند افزایش بیان miR-21 و ارتباط معنادار آن با این سرطان و مراحل آن گزارش شد (۲۸). از سوی دیگر مطالعات بسیاری نشان می‌دهد که miR-29 نقش اساسی در مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با پیشرفت

اتوفازی در سلول‌های گلیوبلاستوما ایفا نماید و بر بیان ژن‌های microRNA‌هایی که در پیشرفت تومر در سلول‌های انسان موثر هستند، تاثیر گذارند. همچنین پژوهش آنان اثر میدان‌های مغناطیسی را در اثربخشی داروی ضد سرطان و نقش اپی ژنتیکی این میدان‌ها بر فاکتورهای رونویسی ژن‌های موثر در تشکیل تومر و جهش در ژن‌های دخیل در روند ترمیم DNA را، گزارش نمود (۲۴). مطالعه سلول‌های مورگان و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص نموده است که تابش میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین سبب افزایش سلول‌های مغز استخوان می‌گردد که تاثیر پذیر از بیان ژن‌هایی است که بر تنظیم چرخه‌های سلولی، ساختار سلول و گیرنده‌های آن و مسیرهای تنظیم‌کننده کینازها موثر هستند. در نتیجه بیان داشتند که میدان مغناطیسی بر بیان ژن‌های تولیدکننده استئوبلاست‌های اولیه و مسیر سیگنالینگ فاکتور رشد بتا و بیان microRNA‌هایی همچون miR-21 اثربخش است که این تغییرات بیان ژنی می‌تواند با تمایز سلول‌های استئوبلاست و در نتیجه متابولیسم استخوان مرتبط باشد (۳۲). رن و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین بر سرطان ریه اثربخش است. آنان در مدل موش سرطانی که در معرض تابش میدان مغناطیسی ۰/۴ تسلا در مدت ۳۵ روز قرار گرفته بود، مشخص نمودند میزان رشد سلول‌های سرطانی با مهار متابولیسم آهن کاهش یافته است که مهار آهن اثر مهاری در چرخه تکثیر سلولی داشته است و با پایداری پروتئین P53 و افزایش بیان miR-34 توانسته است بر مسیر سیگنالینگ E2F1/E2F3 اثر گذار باشد و در نتیجه سبب مهار سرطان ریه در موش تومری گردد (۲۷). همچنین زو و همکارانش در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای در همین راستا در مدل سرطان ریه در موش انجام دادند. نتایج تحقیق آنان نشان داد تابش میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین می‌تواند از رشد تومر در موش جلوگیری نموده و سبب مرگ اتوفازی سلول‌های سرطانی گردد که این فعال شدن

سطوح حیوانی، تابش میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین، منجر به ایجاد سرطان یا تشدید آن شده و یا بدون تأثیرات خاص بوده و گاهی اثر درمانی، داشته است (۷ و ۹ و ۲۱ و ۲۷ و ۲۹ و ۳۳ و ۴۳). در این زمینه می‌توان به مطالعات زیر اشاره نمود. صدوقی در سال ۲۰۱۳ به بررسی اثرات میدان مغناطیسی با فرکانس پایین بر رده سلولی سرطان کولون پرداخت. نتایج تحقیق او مشخص نمود درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی در مجاورت میدان با شدت ۲۰۰ و ۴۰۰ گاوس نسبت به گروه شاهد بطور معناداری کاهش یافته است و مشخص نمود که تابش با این میدان‌های مغناطیسی می‌تواند اثر مهاری بر رشد و تکثیر رده سلولی سرطان کولون داشته باشد و سبب کشته شدن این سلول‌ها گردد (۲۹). لیو و همکاران در دو مطالعه مختلف در سال‌های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ مشخص نمودند میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین بر عملکرد تولید مثل مردان تاثیرگذار است. آنان بیان microRNA‌هایی را که بر روی مسیرهای تنظیمی تشکیل سلول جنسی موش مذکر و رده سلولی GC-2 موثر بودند، را پس از تابش با میدان‌های مغناطیسی بررسی نمودند و تأثیرات اپی ژنتیکی این اثرات را مورد مطالعه قرار دادند. آنالیز تفاوت پروفایل بیان microRNA‌های مورد مطالعه مشخص نمود که تابش میدان‌های مغناطیسی می‌تواند در تنظیم چرخه‌های سلولی و بیان mRNA و پروتئین‌های سیکلین D2 مرتبط با آن، میانکشن سیتوکینین‌ها و رسپتورهای آن و مسیر سیگنالینگ P53 اثرگذار باشد. در نتیجه این میدان‌ها را می‌توان بعنوان بیومارکری با پتانسیل بالا که در مسیرهای سیگنالینگ موثر در فعالیت‌های بیولوژیکی هستند، مطرح نمود (۱۹ و ۲۰). نتایج تحقیق پاسی و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشخص نمود که میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین می‌تواند اثر درمانی برای بیماران سرطانی داشته باشد و با نقش اپی ژنتیکی بر بیان ژن‌های موثر در سرطان اثربخش است. آنان نشان دادند میدان‌های مغناطیسی با شدت ۲ میلی تسلا می‌تواند نقش

پژوهشی و تایید نتایج حاصل از تحقیق حاضر، می‌تواند راهکاری در کنار سایر روش‌های تشخیصی و درمانی به ویژه همراه با داروهای شیمی‌درمانی برای بهبود سرطان معده در کشور ارایه نماید. البته برای برآورد این مهم نیاز به پژوهش‌های بیشتر و با انواع نمونه‌های آزمایشگاهی گسترده‌تر، جهت تعیین دقیق تأثیرات تابش میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین بر روی بیان microRNA ها (به‌خصوص miR-21 و miR-29) می‌باشد تا بتوان از تایید نتایج این تحقیقات بطور کلینیکی استفاده کاربردی نمود.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که بیشتر سرطان‌ها در افراد مسن بروز می‌کند و کشور ایران جمعیت به نسبت جوانی دارد، انتظار می‌رود که در آینده‌ی نزدیک میزان بروز مرگ و میر با این بیماری در کشور به سرعت افزایش یابد؛ بنابراین با توجه به اهمیت مبارزه با این بیماری وجود برنامه کنترل سرطان در کشور ضرورت دارد و با توجه به ضرورت موضوع، روش‌های تشخیص زود هنگام و پیش‌آگهی بخصوص برای سرطان معده که دومین سرطان شایع در کشور ما می‌باشد، مورد کلینیکی مهمی است. از آنجایی که تنوع بیان ژن‌ها و تنظیم‌کننده‌های آنان مانند microRNA ها می‌تواند نقش مهمی در بروز سرطان معده داشته باشد، امید است ادامه تحقیقات در راستای نتایج این مطالعه که افزایش بیان miR-21 و miR-29 را در رده سلولی سرطان معده و ارتباط آن با میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین، را نشان داده است، انجام پذیرد تا بتواند راهگشایی برای دستیابی به بیومارکرهای مناسب جهت تشخیص و درمان سرطان‌ها بویژه سرطان معده در جمعیت کشور ایران گردد.

تشکر و قدردانی

از کلیه اعضای محترم هیئت علمی و پرسنل گرامی انستیتو کنسر بیمارستان امام خمینی تهران که در اجرای این

توفازی با افزایش بیان miR-486 در ارتباط بوده است. این افزایش بیان miR-486 می‌تواند سبب مهار مسیر سیگنالینگ AKT/mTOR و مهار سرطان ریه در موش‌ها گردد. در نتیجه پژوهش آنان، کاربرد کلینیکی این میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین، بر علیه تومورها و درمان سرطان‌ها گزارش شد (۴۳). اردال و همکاران نیز که در سال ۲۰۱۸ بر روی تأثیر میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین بر بیان microRNAها تحقیقی را انجام داده بودند، گزارش نمودند که تابش با میدان‌های مغناطیسی با فرکانس ۱ میلی‌تسلا به مدت ۶۰ روز در موش‌های آزمایشگاهی می‌تواند بر بیان microRNA هایی همچون miR-29 که مرتبط با بیماری‌های نورولوژیکی انسان (مانند آلزایمر و پارکینسون) می‌باشند تأثیر گذار باشد. آنان نشان دادند بیان اکثر microRNA های مورد مطالعه در نمونه خون حیوانات در مقایسه با نمونه مغز آنان کاهش معنادار داشته است. در نتیجه عنوان نمودند این تفاوت سطح بیان ایجاد شده در اثر تابش با میدان‌های مغناطیسی می‌تواند راهگشایی برای دستیابی به علل ایجاد و درمان بیماری‌های نورولوژیکی انسان باشد (۷).

در پایان، بنابر گزارشات موجود در خصوص ارتباط miR-21 و miR-29 با سرطان‌های مختلف، مشخص است که این microRNA ها می‌توانند نقش بسزایی در تومورزایی ایفا نمایند و بر این اساس پژوهش حاضر در راستای تحقیقات دانشمندان گذشته که به بررسی اثر میدان‌های مغناطیسی بر روی بیان این microRNA ها در سایر سلول‌های سرطانی (غیر از سرطان معده) پرداخته بودند، به منظور ارزیابی اثر میدان‌های مغناطیسی بر بیان این دو microRNA (miR-21 و miR-29) برای اول بار در رده سلولی سرطان معده، صورت پذیرفت. نتایج این تحقیق افزایش بیان دو microRNA مورد مطالعه را در اثر میدان‌های مغناطیسی ۰/۲۵ و ۲/۵ میلی‌تسلا نشان داد و مشخص شد که این افزایش بیان با افزایش شدت میدان ارتباط معنادار دارد. بنابراین ادامه مطالعات در این حوزه

کمال سپاسگزاری می‌نماید.

پروژه تحقیقاتی همکاری‌های فراوانی را مبذول فرموده‌اند

منابع

1. Ang TL, Fock KM. 2014. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med Journal*. 55(12): 621-628.
2. Anwar SL, Lehmann U. 2014. DNA methylation, microRNAs, and their crosstalk as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterology*. 20(24): 7894-913.
3. Calin GA, Croce CM. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer*. 6: 857-866.
4. Chan SH, Wu CW, Li AF, Chi CW, Lin WC. 2008. MiR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association. *Anticancer Res*. 28(2A): 907-911.
5. Chen Z, Zhang L, Xia L, Jin Y, Wu Q, Guo H, Shang X, Dou J, Wu K, Nie Y, Fan D. 2014. Genomic analysis of drug resistant gastric cancer cell lines by combining mRNA and microRNA expression profiling. *Cancer Lett*. 350(1-2): 43-51.
6. Cochrane D.R., Jacobsen B.M., Connaghan K.D., Howe E.N., Bain D.L., Richer J.K. 2012. Progesterone regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 355(1): 15-24.
7. Erdal ME, Yılmaz SG, Gürgül S, Uzun C, Derici D, Erdal N. 2018. MiRNA expression profile is altered differentially in the rat brain compared to blood after experimental exposure to 50 Hz and 1 mT electromagnetic field. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 132: 35-42.
8. Falone S, Santini SJ, Cordone V, Emidio GD, Tatone C, Cacchio M, Amicarelli F. 2018. Extremely low-frequency magnetic fields and Redox Responsive Pathways linked to Cancer Drug Resistance: Insight from Co-exposure Based in Vitro Studies. *Frontiers in Public Health*. 6(33): 1-16.
9. Geesink JH, Meijer DKF. 2017. Cancer is promoted by cellular states of electromagnetic decoherence and can be corrected by exposure to coherent non-ionizing electromagnetic fields. *Research Gate*. 1-45.
10. Giordano S, Columbano A. 2013. MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? *Hepatology*. 57: 840-847.
11. Guan C, Zhang L, Wang S, Long L, Zhou H, Qian S, Ma M, Bai F, Meng QH, Lyu J. 2019. Upregulation of MicroRNA-21 promotes tumorigenesis of prostate cancer cells by targeting KLF5. *Cancer Biol Ther*. 20(8): 1149-1161.
12. Cutsem EV, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. 2016. Gastric cancer. *Lancet*. 388(10060): 2654-2664.
13. Han TS, Hur K, Xu G, Choi B, Okugawa Y, Toiyama Y, Oshima H, Oshima M, Lee HJ, Kim VN, Chang AN, Goel A, Yang HK. 2015. MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1. *Gut*. 64(2): 203-214.
14. Hwang J, Min BH, Jang J, Kang SY, Bae H, Jang SS, Kim JI, Kim KM. 2018. MicroRNA Expression Profiles in Gastric Carcinogenesis. *Scientific Reports*. 8: 14393.
15. Karipidis KK, Benke G, Sim MR, Kauppinen T, Giles G. 2007. Occupational exposure to ionizing and non-ionizing radiation and risk of glioma. *Occup Med (Lond)*. 57(7): 518-524.
16. Kwon JJ, Factor TD, Dey S, Kota J. 2019. A Systematic Review of miR-29 in Cancer. *Oncolytics*. 173-194.
17. Larki P, Ahadi AR, Zare A, Tarighi S, Zaheri M, Souri M, Zali MR, Ghaedi H, Omrani MD. 2018. Up-Regulation of miR-21, miR-25, miR-93, and miR-106b in Gastric Cancer. *Iranian Biomedical Journal*. 22 (6): 367-373.
18. Libânio D, Dinis-Ribeiro M, Pimentel-Nunes P. 2015. Helicobacter pylori and microRNAs: Relation with innate immunity and progression of preneoplastic conditions. *World J Clin Oncol*. 6(5): 111-132.
19. Liu Y, Liu W-b, Liu K-j, Ao L, Cao J, Zhong JL, Liu JY. 2015. Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields affect the miRNA-Mediated Regulation of Signaling Pathways in the GC-2 Cell Line. *Plos One*. 10(10): e0139949.
20. Liu Y, Liu W-b, Liu K-j, Ao L, Cao J, Zhong JL, Liu JY. 2016. Overexpression of miR-26b-5p regulates the cell cycle by targeting CCND2 in GC-2 cells under exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Cell Cycle*. 15(3): 357-367.

21. Mansourian M, Firoozabadi SM, Shankayi Z, Hassan ZM. 2013. Magnetic fields with frequency of 217 Hz can reduce cell apoptosis caused by electrochemotherapy. *Electromagn Biol Med.* 32(1): 70-78.
22. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. 2015. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol.* 16(2): e60-70.
23. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. 2008. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene.* 27(12): 1788-1793.
24. Pasi F, Fassina L, Mognaschi ME, Lupo G, Corbelia F, Nano R, Capelli E. 2016. Pulsed Electromagnetic Field with Temozolomide Can Elicit an Epigenetic Pro-apoptotic Effect on Glioblastoma T98G Cells. *Anti Cancer Research.* 36: 5821-5826.
25. Pogribny IP, Rusyn I. 2014. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 342: 223-230.
26. Rawla P, Barsouk A. 2019. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol.* 14(1): 26-38.
27. Ren J, Ding L, Xu Q, Shi G, Li X, Li X, Ji J, Zhang D, Wang Y, Wang T, Hou Y. 2017. LF-MF inhibits iron metabolism and suppresses lung cancer through activation of P53-miR-34a-E2F1/E2F3 pathway. *Scientific Reports.* 7(749): 1-12.
28. Ruan K, Fang X, Ouyang G. 2009. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* 285(2): 116-126.
29. Sadooghi SD. 2013. Investigating the effects of low-frequency electromagnetic field on HT-29 cancer cell line. *Journal of Kashan University of Medical Sciences.* 17(5): 413-421.
30. Sarmasti Emami S, Nekouian R, Akbari A, Faraji A, Abbasi V, Shahram Agah S. 2019. Evaluation of circulating miR-21 and miR-222 as diagnostic biomarkers for gastric cancer. *J Can Res Ther.* 15: 115-119.
31. Sekar D, Krishnan R, Thirugnanasambantham K, Rajasekaran B, HairullIslam VI, Sekar P. 2016. Significance of microRNA 21 in gastric cancer. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology.* 40(5): 538-545.
32. Selvamurugan N, He Z, Rifkin D, Dabovic B, Partridge NC. 2017. Pulsed Electromagnetic Field Regulates MicroRNA-21 Expression to Activate TGF- β Signaling in Human Bone Marrow Stromal Cells to Enhance Osteoblast Differentiation. *Hindawi Stem Cells International.* 2017: e 2450327.
33. Sengupta S, Balla VK. 2018. A review on the use of magnetic fields and ultrasound for non-invasive cancer treatment. *Journal of Advanced Research.* 14: 97-111.
34. Steele R, Mott JL, Ray RB. 2010. MBP-1 Upregulates miR-29b, Which Represses Mcl-1, Collagens, and Matrix Metalloproteinase-2 in Prostate Cancer Cells. *Genes and Cancer.* 1(4): 381-387.
35. Szabo G, Bala S. 2013. MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 10: 542-552.
36. Tafrihi M, Sogand Kalantari S, Shokrzadeh M. 2019. Association of the -160 C>A Polymorphism in the CDH1 Promoter with Gastric Cancer: A Case-control Study. *J Genet Resour.* 5(1): 1-8.
37. Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH, Chan WC, Lin WC. 2011. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *Int J Cancer.* 129(11): 2600-2610.
38. Waldum HL, Sagatun L, Mjølness P. 2017. Gastrin and Gastric Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 8: 1.
39. Wan X, Ding X, Chen S, Song H, Jiang H, Fang Y, Li P, Guo J. 2015. The functional sites of miRNAs and lncRNAs in gastric carcinogenesis. *Tumour Biol.* 36(2): 521-532.
40. Wang D, Fan Z, Liu F, Zuo J. 2015. Hsa-miR-21 and Hsa-miR-29 in Tissue as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 37: 1454-1462.
41. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 11(3): 228-234.
42. Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, Hong L, Liu J, Fan D. 2008. MiR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer.* 123(2): 372-379.
43. Xu Y, Wang Y, Yao A, Xu Z, Dou H, Shen S, Hou Y, Wang T. 2017. Low Frequency Magnetic Fields Induce Autophagy-associated Cell Death in Lung Cancer through miR-486-mediated

- Inhibition of Akt/mTOR Signaling Pathway. *Scientific Reports*. 7 (11776): 1-14.
44. Zarea K, Beiranvand S, Ghanbari S, Tuvesson H. 2017. Incidence of Gastrointestinal Cancers in Iran: A Systematic Review. *Jundishapur J Chronic Dis Care*. 6(1): e37224.
45. Zhang C, Zhang CD, Ma MH, Dai DG. 2018. Three-microRNA signature identified by bioinformatics analysis predicts prognosis of gastric cancer patients. *World J Gastroenterology*. 24(11): 1206-1215.
46. Zhang Q, Chen C, Guan H, Kang W, Yu C. 2017. Prognostic role of microRNAs in human gastrointestinal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Onco target*. 8(28): 46611-46623.
47. Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, Xiao S, Lu H. 2008. MiR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest*. 88(12): 1358-66.
48. Zhao X, Hou Y, Tuo Z, Wei F. 2018. Application values of miR-194 and miR-29 in the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 15: 4179-4184.
49. Zeng Z, Wang J, Zhao L, Hu P, Zhang H, Tang X, He D, Tang S, Zeng Z. 2013. Potential Role of microRNA-21 in the Diagnosis of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Plos One*. 8(9): e73278.
50. Zheng Y, Cui L, Sun W, Zhou H, Yuan X, Huo M, Chen J, Lou Y, Guo J. 2012. MicroRNA-21 is a new marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Cancer Biomark*. 10(2): 71-77.

Effect of Electromagnetic Fields with 0.25 and 2.5 ml Tesla strength, in two type of continuous and discontinues radiation on *miR-21* and *miR-29* Genes Expression in Gastric Cancer Cell Line

Siasi E.*¹, Moniri E.¹ and Abdi S.²

¹ Dept. of Genetics, Faculty of Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

² Dept. of Physics, Safadasht Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Bio electromagnetic studies, and the role of electromagnetic field radiation with very low frequency is the important environmental factors associated with the beginning and treatment of cancers. In this study, the variation of *miR-21* and *miR-29* expression in the gastric cancer cell line was investigated when was exposed under the influence of electromagnetic fields with 0.25 and 2.5 ml Tesla strength, in two type of continuous and discontinues radiation. Gastric cancer cell line culture, was exposed to the electromagnetic radiation system including 0.25 and 2.5 ml Tesla field strength and in continuous and discontinues radiation, and was compared with a non-radiation control group. After RNA extraction from cells, using the cDNA synthesis and by Real Time PCR variations of two microRNAs expression was explored and results was statistical analyzed. According the results, cell viability percent in electromagnetic field radiation compare to the control group, was showed significant decrease. Eexpression of *miR-21* and *miR-29* was showed significant increase due to increase the electromagnetic field radiation strength. As also, nearby over expression of *miR-21* and *miR-29* in two type radiation, cell viability percent was shown significant decline. Finding demonstrated radiation with very low frequency electromagnetic field in the gastric cancer cell line has led to over expression of the *miR-21* and *miR-29*, which confirmation beside future studies, it's could be proposed as molecular biomarker for gastric cancer.

Key words: Gastric cancer, Electromagnetic field radiation, miR-21, miR-29, Gastric Cancer cell line.