

Association Analysis of miR423 (rs6505162) and miR608 (rs4919510) Polymorphisms with Lung Cancer Risk

Javad Salehi¹
Morteza Sadeghi²

¹ MSc Student in Human Genetics, Student Research Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received December 30, 2023; Accepted June 1, 2024)

Abstract

Background and purpose: Lung cancer is one of the deadliest cancers in the world, early detection of lung cancer is one of the biggest challenges in treating this disease and can be very effective in saving patients. Considering the role of microRNAs in the development and progression of lung cancer, the effective factors in the expression and function of microRNAs, including the polymorphisms in the genes of microRNAs, can be used as biomarkers for the early diagnosis of lung cancer. This study aims to investigate the relationship between single nucleotide polymorphisms (rs4919510) of miR608 and (rs6505162) of miR-423 with the risk of lung cancer.

Materials and methods: In this case-control study, genotypic analysis of rs6505162 miR-423 and rs4919510 miR-608 polymorphisms was performed on two groups including 110 lung cancer patients and 120 healthy individuals by PCR-RFLP method. After receiving the consent form from the patients, 5 ml of venous blood was collected from each of the study subjects, and the genomic DNA of each person was extracted using the salt precipitation method, the quality of the DNA was measured by absorption spectroscopy, and then all the samples were PCR And by using restriction enzyme digestion by Rsa I and PVUII enzymes, the genotype was determined for both polymorphisms. In the last step, the results of enzyme digestion were checked by electrophoresis on 2% agarose gel, to confirm the RFLP results from sequencing. Random samples were used. Statistical analysis of data was done with SPSS software.

Results: In the investigation of mrs6505162 polymorphism in miR-423, the frequency distribution of CC, CA, and AA genotypes in lung cancer patients was 42.7, 34.5, and 22.7, respectively, and in the control group, 30.8, 54.2, 15, respectively which did not have a significant difference. The genotype CA compared to CC and also CA compared to CC+AA was related to the reduction of lung cancer ($P=0.009$, 95% CI: 0.256-0.829,

OR=0.460; $P=0.003$, 95% CI: 0.262-0.760, OR=0.447) which can indicate the protective role of this genotype. In the investigation of rs4919510 polymorphism in miR608, the frequency of allele G was 16.4% in the patient group and 20.4% in the control group, and the frequency of allele C was 83.6% in the patient group and 79.6% in the control group. This allele frequency was not statistically significant with a probability ratio of 0.763 and a confidence interval of 1.227-0.474 ($P=0.263$). No significant difference was observed between the group of cancer patients and control subjects. Codominant, Dominant, Over dominant, and Recessive, statistically no significant difference was observed.

Conclusion: According to our findings in miR-423, the CA genotype in rs6505162 polymorphism can have a protective role in lung cancer, but rs4919510 polymorphism in miR-608 was not significantly associated with lung cancer, further studies with more samples are suggested to confirm these findings.

Keywords: MicroRNA, lung cancer, polymorphism, PCR-RFLP, restriction enzyme

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (234): 74-83 (Persian).

Corresponding Author: Morteza Sadeghi - Human genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: Ms.sadeghi@yahoo.com)

بررسی ارتباط پلی مورفیسم های (rs6505162) miR423 و (rs4919510) miR608 با خطر ابتلا به سرطان ریه

جواد صالحی^۱

مرتضی صادقی^۲

چکیده

سابقه و هدف: سرطان ریه یکی از کشنده ترین سرطان ها در سطح جهان است، تشخیص زود هنگام سرطان ریه از چالش های بزرگ درمان این بیماری است و می تواند در نجات جان بیماران بسیار موثر باشد. با توجه به نقش میکرو RNA ها در ایجاد و پیشرفت سرطان ریه، از عوامل موثر در بیان و عملکرد میکرو RNA ها از جمله پلی مورفیسم های موجود در ژن های میکرو RNA ها می توان به عنوان بیومارکر جهت تشخیص زودرس سرطان ریه استفاده کرد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (rs ۴۹۱۹۵۱۰) miR-۶۰۸ و (rs ۶۵۰۵۱۶۲) miR-۴۲۳ با خطر ابتلا به سرطان ریه است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، بررسی ژنوتیپی پلی مورفیسم های ۶۵۰۵۱۶۲ rs miR-۴۲۳ و ۴۹۱۹۵۱۰ rs miR-۶۰۸ بر روی دو گروه شامل ۱۱۰ نفر بیمار سرطان ریه و ۱۲۰ فرد سالم به روش PCR-RFLP انجام شد. پس از دریافت فرم رضایت نامه از بیماران از هر کدام از افراد مورد مطالعه ۵ میلی لیتر خون وریدی دریافت شد و DNA ژنومی هر فرد با استفاده از روش رسوب نمکی استخراج شد، کیفیت DNA توسط طیف سنجی جذبی سنجیده شد و سپس تمامی نمونه ها PCR شد و با استفاده از هضم آنزیم محدود کننده توسط آنزیم های Rsa I و PvuII تعیین ژنوتیپ برای هر دو پلی مورفیسم انجام شد، در مرحله آخر نتایج هضم آنزیمی به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شد، جهت تایید نتایج RFLP از تعیین توالی تصادفی نمونه ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل های آماری داده ها با نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته ها: در بررسی پلی مورفیسم ۶۵۰۵۱۶۲ rs در miR-۴۲۳ توزیع فراوانی ژنوتیپ های CC، CA، AA در بیماران سرطان ریه به ترتیب ۴۲/۷، ۳۴/۵، ۲۲/۷ و در گروه کنترل به ترتیب ۳۰/۸، ۵۴/۲، ۱۵ بود که دارای اختلاف معنی داری نبود. ژنوتیپ CA نسبت به CC و هم چنین CA نسبت به CC+AA با کاهش ابتلا به سرطان ریه ارتباط داشت ($P=0/009$)، $OR=0/460$ ؛ $CI: 0/256-0/829$ ؛ $P=0/003$ ؛ $OR=0/447$ ؛ $CI: 0/262-0/760$ ، که می تواند حاکی از نقش محافظتی این ژنوتیپ باشد. در بررسی پلی مورفیسم ۴۹۱۹۵۴۰ rs در miR-۶۰۸ فراوانی ال G در گروه بیماران ۱۶/۴ درصد و در گروه کنترل ۲۰/۴ درصد بود و فراوانی ال C در گروه بیماران ۸۳/۶ درصد و در گروه کنترل ۷۹/۶ درصد بود. این فراوانی ال با نسبت احتمالات ۰/۷۶۳ و فاصله اطمینان ۱/۲۲۷-۰/۴۷۴ از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/263$) و تفاوت معنی داری بین گروه بیماران سرطانی و افراد کنترل مشاهده نشد. در بررسی ژنوتایپ های افراد سرطانی و افراد سالم به صورت Dominant، Codominant، Over dominant و Recessiv از نظر آماری هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

استنتاج: طبق یافته های مطالعه حاضر، در بررسی miR-۴۲۳ ژنوتیپ CA در پلی مورفیسم ۶۵۰۵۱۶۲ rs می تواند نقش محافظتی در سرطان ریه داشته باشد ولی پلی مورفیسم ۴۹۱۹۵۱۰ rs در miR-۶۰۸ ارتباط معنی داری با سرطان ریه مشاهده نشد. مطالعات بعدی با تعداد نمونه بیش تر برای تایید این یافته ها پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: میکرو RNA، سرطان ریه، پلی مورفیسم، PCR-RFLP، آنزیم محدود کننده

E-mail: ms.sadeghi@yahoo.com

مؤلف مسئول: مرتضی صادقی - تهران: ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، پژوهشگاه ژنتیک انسانی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۱/۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۳/۱۲

مقدمه

سرطان ریه نوعی سرطان است که از ریه شروع شده و ناشی از رشد بی‌رویه و کنترل نشده سلول‌ها در بافت ریه است. سرطان ریه عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است، بالاترین میزان ابتلا را در بین همه سرطان‌ها دارد و هر سال حدود ۱/۸ میلیون مرگ و میر در آن رخ می‌دهد (۱). سرطان‌های ریه به دو نوع بافت‌شناسی اصلی، کارسینومای سلول‌های کوچک ریه (Small Cell Lung Cancer: SCLC) و کارسینومای سلول‌های غیر کوچک ریه (Non Small Cell Lung Cancer: NSCLC) طبقه‌بندی می‌شوند. بیش از ۸۵ درصد تومورهای ریه از نوع NSCLC می‌باشد. سرفه شایع‌ترین علامت است که در ۵۰ تا ۷۵ درصد بیماران رخ می‌دهد (۲). MicroRNAs (miRNA) مولکول‌های RNA کوچک غیر کدکننده هستند که در حدود ۱۸-۲۵ نوکلئوتید طول دارند و می‌توانند به عنوان ژن‌های سرکوب‌کننده تومور (T Smir) یا انکوژن‌ها (Oncomir) رفتار کنند. بیش از ۲۰۰۰ ژن miRNA در انسان کشف شده است که ترجمه یا تخریب mRNA انسانی را تنظیم می‌کند MiRNAها در انواع فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی از جمله تکثیر سلولی، تمایز سلولی، مرگ سلولی و سرطان‌زایی نقش دارند، زیرا بر اساس تحقیقات، miRNAها فعالیت ۵۰ درصد از ژن‌های کدکننده پروتئین را در پستانداران کنترل می‌کنند (۳). به عنوان رایج‌ترین نوع تنوع ژنتیکی در ژنوم انسان، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) که در ژن‌های miRNA رخ می‌دهند، قادرند با تداخل برهمکنش بین miRNAها و mRNAهای هدف مربوطه، بر بیان و عملکرد آن تأثیر بگذارند. تعداد زیادی از مطالعات نشان داده‌اند که SNPها در ژن‌های miRNA با بروز بیماری‌های مختلف مانند سرطان مرتبط هستند، بنابراین پلی‌مورفیسم‌های microRNA به عنوان یک مکانیسم بالقوه مهم در کسب استعداد ابتلا به سرطان در نظر گرفته می‌شوند (۴). miR-608 (rs4919510) و miR423 (rs6505162) با فطر ابتلا به سرطان ریه

miR-608 یکی از مهم‌ترین SNPهای مرتبط با miRNA است که تا به امروز گزارش شده است؛ پیشنهاد شده است که rs4919510 SNO در miR-608 می‌تواند اتصال آن را به ژن‌های هدف تغییر دهد (۵). چندین مطالعه تأثیر rs4919510 miR-608 را در خطر ابتلا به انواع سرطان بررسی کردند. گزارش شده است که rs4919510 miR-608 با خطر تغییر یافته ابتلا به سرطان کولورکتال، سرطان سینه، سرطان تیروئید پاپیلاری، سرطان نازوفارنکس و سرطان ریه مرتبط است (۱۱-۶). با این حال، نتایج متناقضی برای ارتباط بین وجود rs4919510 miR-608 و حساسیت به تومورها وجود دارد. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که rs4919510 SNP با بروز سرطان پستان و سرطان روده بزرگ مرتبط نیست (۱۲، ۱۳). بنابراین، تحقیقات بیش‌تری برای روشن شدن رابطه بین rs4919510 miR-608 و حساسیت به سرطان ریه مورد نیاز است. از طرفی rs6505162 miR-423 در pre-miR-423 و در کروموزوم انسانی ۱۱/۲ q قرار دارد. بیان نابجای هر دو شکل بالغ miR-423 به نام (miR-423-3p) و (miR-423-5p) در انواع سرطان‌های متعدد مشاهده شده است (۱۴). وجود پلی‌مورفیسم rs6505162 miR-423 با اتصال این میکرو RNA به اهداف خود در ارتباط است (۱۵). ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها تاکنون با چندین سرطان مختلف گزارش شده است (۱۱-۱۵). ولی تاکنون مطالعه‌ای در مورد ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها و سرطان ریه در جمعیت ایران گزارش نشده است. با توجه به نقش miR-423 و miR-608 در ایجاد سرطان‌ها در این مساله، هدف بررسی پلی‌مورفیسم‌های ذکر شده در بروز سرطان ریه در بخشی از جمعیت ایران است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی با شناسه اخلاق IR.BMSU.BLC.1402.042، تعداد ۱۱۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه که سرطان ریه در آن‌ها توسط متخصص

آنکولوژی و متخصص ریه تایید شده بود، انتخاب شدند. نمونه‌های خون افراد سرطانی از بیمارستان‌های تهران و اصفهان تهیه شد. گروه کنترل نیز شامل ۱۲۰ نفر از افراد سالم که داوطلبانه و برای چکاپ آزمایش‌های روزمره به بیمارستان مراجعه کرده بودند و هیچ‌گونه علائم سرطان ریه در آن‌ها مشاهده نشده بود، انتخاب شدند. افراد از لحاظ سن و جنسیت مورد پرسش قرار گرفته و یکسان سازی شدند و هم‌چنین فرم رضایت‌نامه آگاهانه با آگاهی کامل از اهداف مطالعه توسط افراد بیمار و گروه شاهد تکمیل شد. در جدول شماره ۱، اطلاعات دموگرافیک افراد مورد مطالعه آورده شده است.

جدول شماره ۱: اطلاعات دموگرافی افراد مورد مطالعه

متغیرها	بیماران تعداد(درصد)	کنترل تعداد(درصد)	سطح معنی داری
سن (متوسط ± انحراف معیار)	65/2 ± 12/1	64/8 ± 11/7	0/21
جنسیت			0/99
مرد	66	72	
زن	44	48	
سابقه سیگار			0/001
هرگز سیگار نکشیده اند	20 (18/2)	56 (46/7)	
قبلاً سیگار کشیده اند	80 (72/7)	44 (36/7)	
سیگاری فعلی	10 (9/1)	20 (16/7)	
سابقه خانوادگی سرطان			0/02
بدون سابقه سرطان ریه	68 (61/8)	84 (70)	
سابقه خانوادگی سرطان ریه	24 (21/8)	18 (15)	
سابقه خانوادگی سایر انواع سرطان	18 (16/4)	18 (15)	
وضعیت اشتغال			0/12
شاغل	55 (50)	66 (55)	
بازنشسته	38 (34/5)	33 (27/5)	
یکبار	17 (15/5)	21 (17/5)	

انتخاب snp و استخراج DNA ژنومی

بر اساس مطالعات پیشین در مورد پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی و خطر سرطان C>A rs 6505162 و miR-423 واقع در کروموزوم ۱۷ با فراوانی آلل مینور (MAF) معادل ۰/۴۸ برای بررسی انتخاب شد و هم‌چنین C>G rs 491951 miR-608 واقع در کروموزوم ۱۰ با فراوانی آلل مینور (MAF) معادل ۰/۲۱ برای بررسی انتخاب شد (۲۱). از تمامی افراد ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد و با استفاده از روش Salting out (روش استخراج DNA به روش رسوب‌دهی نمک) استخراج DNA انجام شد. کمیّت و درجه تخریب DNA را به وسیله الکتروفورز

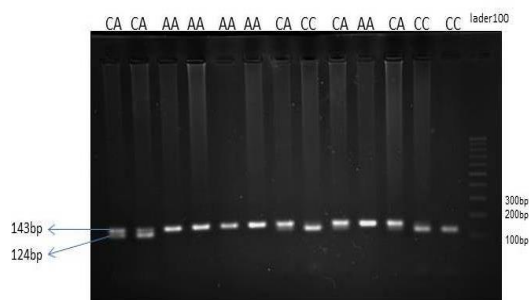
DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد و خوانش جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد.

تجزیه تحلیلی آماری

مقایسه بین گروه‌ها به وسیله آزمون‌های آماری Pearson chi squar، کای مربع (خی دو) و محاسبه ریسک خطر (odd ratio) به همراه CI ۹۵ درصد انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. P کم‌تر از ۰/۰۵ در تمامی محاسبات معنی‌دار در نظر گرفته شد. افزون بر الگو توارثی هم بارزی، فراوانی ژنوتیپی در مدل‌های غالب، مغلوب و بیش بارزی نیز محاسبه شد.

تعیین ژنوتیپ

برای تعیین ژنوتیپ جایگاه ۶۵۰۵۱۶۲ rs 423-miR و ۴۹۱۹۵۱۰ rs 608-miR از روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم Rsa I برای 423-miR و PVUII برای 608-miR استفاده شد. برای طراحی پرایمر پس از جستجو در پایگاه NCBI، توالی ژن رفرنس 423-miR و 608-miR استخراج شد. سپس با استفاده از سایت primer3 پرایمر اختصاصی طراحی شد. توالی پرایمرهای مستقیم و معکوس برای 423-miR به ترتیب به صورت 5'-CCCCTCAGTCTTGCTTCGTA-3' و 3'-AAGGGCGGGAATCAGGAC-5' برای 608-miR به صورت 5'-TCTGGCTAGGTAATGGCTCC-3' و 3'-GCATCTGTGGCCTTCCATGA-5' می‌باشد. واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۶/۴ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر DNA و ۰/۸ از هر پرایمر انجام شد. چرخه حرارتی جهت تکثیر به صورت واسرشته سازی نخستین در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه به صورت ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی در

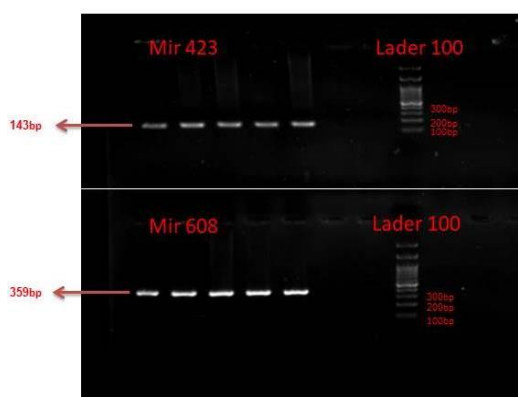


تصویر شماره ۳: نتایج مربوط به پلی مورفیسم rs ۶۵۰۵۱۶۲ miR-۴۲۳ در ژل آگارز

پلی مورفیسم ۴۹۱۹۵۱۰ rs، در اثر تغییر نوکلئوتیدی C به G ایجاد می شود که ژنوتیپ های ژنوتیپ های مختلف آن را می توان با آنزیم PVUII شناسایی کرد. آلل G توسط آنزیم PVUII برش خورده و دو توالی ۲۴۲ و ۱۱۷ جفت بازی ایجاد می شود؛ در حالی که آلل C توسط آنزیم PVUII برش نمی خورد و در نتیجه یک توالی به طول ۳۵۹ جفت بازی ایجاد می شود. پس در صورت وجود ژنوتیپ CC تنها یک باند بر روی ژل ظاهر می شود و در صورتی که ژنوتیپ GG باشد؛ دو باند به طول ۲۴۲ و ۱۱۷ جفت بازی تشکیل می شود و در صورت وجود ژنوتیپ هتروزیگوت GC آنزیم یک آلل را برش داده و دیگری برش نمی دهد و در نتیجه ۳ باند به طول ۳۵۹، ۲۴۲، ۱۱۷ بر روی ژل تشکیل می گردد (تصویر شماره ۲).

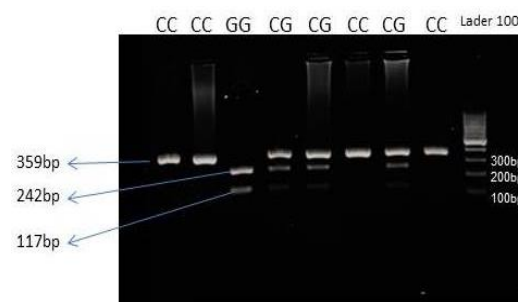
پلی مورفیسم ۶۵۰۵۱۶۲ rs در اثر تغییر نوکلئوتیدی C به A ایجاد می شود که ژنوتیپ های مختلف آن را می توان با آنزیم RsaI شناسایی کرد. C آلل توسط آنزیم برش خورده و دو توالی ۱۲۴ و ۱۹ جفت بازی ایجاد می شود، در حالی که آلل A توسط آنزیم برش نمی خورد و یک قطعه ۱۴۳ جفت بازی ایجاد می شود. پس در صورت وجود ژنوتیپ CC دو قطعه به طول ۱۲۴ و ۱۹ جفت بازی روی ژل تشکیل می شود و در صورتی که ژنوتیپ AA باشد تنها یک قطعه ۱۴۳ جفت بازی تشکیل می شود و در صورت وجود ژنوتیپ CA آنزیم یک آلل را برش داده و دیگری برش نمی دهد؛

دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه بود. برای درستی انجام PCR فراورده ها در ژل ۲ درصد الکتروفورز شدند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: تصویر ژل آگارز محصولات PCR، تصویر بالا مربوط به ۴۲۳-MIR که پس از PCR قطعه ای معادل ۱۴۳ جفت باز تکثیر شده است تصویر پایین مربوط به ۶۰۸-miR که پس از PCR قطعه ای معادل ۳۵۹ جفت باز تکثیر شده است

در گام پسی،k برای واکنش هضم آنزیمی، محلولی حاوی ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با مقدار ۱/۵ میکرو لیتر بافر تانگو، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم Rsa I برای ۴۲۳-miR و PVUII برای ۶۰۸-miR و مقدار ۳ میکرو لیتر آب مقطر استریل شده به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و محصول هضم شده برای تعیین ژنوتیپ با Self-stain رنگ آمیزی و بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و در نهایت شناسایی محصولات هضم DNA انجام شد (تصویر شماره ۲و۳).



تصویر شماره ۲: نتایج مربوط به پلی مورفیسم ۴۹۱۹۵۱۰ rs ۶۰۸-miR در ژل آگارز

در نتیجه سه قطعه ۱۴۳، ۱۲۴ و ۱۹ جفت بازی تشکیل می شود (تصویر شماره ۳). قطعه ۱۹ جفت بازی را به علت اندازه کوچک نمی توان در ژل شناسایی کرد. برای تایید صحت ژنوتایپی ۲۰ درصد نمونه ها به صورت تصادفی انتخاب و دوباره تعیین ژنوتایپ شدند و هم چنین بر روی تعداد ۱۰ نمونه به صورت تصادفی توالی یابی سکانس انجام شد.

یافته ها

در بررسی rs ۴۹۱۹۵۱۰ که در آن الل C به عنوان الل وحشی و الل G به عنوان الل عامل موتانت است. فراوانی الل G در افراد دارای تومور ۱۶/۴ درصد و در افراد کنترل ۲۰/۴ درصد است و فراوانی الل C در افراد دارای تومور ۸۳/۶ درصد و در افراد کنترل ۷۹/۶ درصد است. این فراوانی الل با نسبت احتمالات ۰،۷۶۳ و فاصله اطمینان ۰/۴۷۴-۱/۲۲۷ از نظر آماری با $P=0/263$ معنی دار نمی باشد. در بررسی ژنوتایپ های افراد سرطانی و افراد سالم به صورت Dominant، Codominant، Recessiv و Over dominant از نظر آماری هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نشده است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: مقایسه افراد گروه سالم و بیمار بر اساس ژنوتیپ miR-608 rs4919510

سطح معنی داری	95% Confidence Interval		OR	CO Dominant
	Upper	Lower		
۰/۶۲۰	۳/۳۲۴	۰/۰۳۳	۰/۳۲۹	GG vs CC
۰/۳۷۸	۱/۳۵۶	۰/۴۴۹	۰/۸۸۰	CG vs CC
۰/۶۲۳	۳/۴۹۲	۰/۰۲۷	۰/۳۵۸	GG VS CC+CG Recessive
۰/۳۰۱	۱/۲۹۴	۰/۴۳۶	۰/۷۵۱	CG+GG VS CC Dominant
۰/۴۲۹	۱/۳۸۹	۰/۴۶۲	۰/۸۰۱	CG VS CC+GG Over dominant
۰/۲۶۳	۱/۲۲۷	۰/۴۷۴	۰/۷۶۳	G VS C Allele

در بررسی rs ۴۲۳-۶۵۰۵۱۶۲ miR با استفاده از نرم افزار SPSS که در آن آلل C به عنوان آلل وحشی و آلل A به عنوان آلل موتانت می باشد. توزیع فراوانی ژنوتیپ های CC، CA، AA در بیماران دچار سرطان به ترتیب ۴۲/۷، ۳۴/۵، ۲۲/۷ و در گروه کنترل به ترتیب ۳۰/۸، ۵۴/۲، ۱۵ بود. ژنوتیپ CA نسبت به CC و

هم چنین CA نسبت به CC+AA در rs ۶۵۰۵۱۶۲ کاهش میزان سرطان ریه را داشت (جدول شماره ۳) ($OR=0/460$ ، درصد، $CI: 0/256-0/829$ ، $P=0/009$) ($OR=0/447$ ، درصد، $CI: 0/262-0/760$ ، $P=0/003$).

جدول شماره ۲: مقایسه افراد گروه سالم و بیمار بر اساس ژنوتیپ های miR-423 rs6505162

سطح معنی داری	95% Confidence Interval		OR	CO Dominant
	Upper	Lower		
۰/۸۱۳	۲/۲۹۹	۰/۵۲۰	۱/۰۹۳	AA vs CC
۰/۰۰۹	۰/۸۲۹	۰/۲۵۶	۰/۴۶۰	CA vs CC
۰/۱۳۳	۳/۲۶۰	۰/۸۵۲	۱/۶۶۷	AA VS CC+CA Recessive
۰/۰۶۱	۱/۰۲۷	۰/۳۴۸	۰/۵۹۸	CA+AA VS CC Dominant
۰/۰۰۳	۰/۷۶۰	۰/۲۶۲	۰/۴۴۷	CA VS CC+AA Over dominant
۰/۶۵۰	۱/۳۳۱	۰/۶۲۲	۰/۹۱۷	A VS C Allele

بحث

به روشنی ثابت شده است پیشرفت بیماری ها در افراد با وقوع چندین تغییر ژنتیکی همراه است. پلی مورفسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) ایجاد شده توسط تغییرات در توالی های DNA ژن های کد کننده miRNA یا در یک محل اتصال به miRNA در mRNA ها، می توانند بر بیوژنز و عملکرد miRNA تأثیر بگذارند. نشان داده شده است که بسیاری از پلی مورفسم های miRNA با بیماری ها مرتبط هستند، زیرا افزایش عملکرد یک پلی مورفسم miRNA ممکن است ترکیب miRNA را به اهداف جذب یا تقویت کند، در نتیجه اثرات تنظیمی مانند ژن های سرکوبگر تومور را تقویت کند.

در مقابل، از دست دادن عملکرد ممکن است منجر به از دست دادن کنترل mRNA ها به خصوص آنکوژن ها و اهداف دارویی شود. علاوه بر این SNP ها در مکان های هدف mRNA ها نیز ممکن است منجر به فرار از مهار یا تخریب توسط miRNA شوند (۱۶). به همین منظور در راستای درک بهتر مکانیسم اثر پلی مورفسم ها در سرطان ریه این مطالعه را طراحی گردید که در آن بررسی ژنوتیپی پلی مورفسم rs ۶۵۰۵۱۶۲-۴۲۳ miR و rs ۴۹۱۹۵۱۰-۶۰۸ miR به روش PCR-RFLP بر روی

تعداد ۱۱۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه و ۱۲۰ نفر از افراد سالم انجام شد.

در بررسی miR-۶۰۸ rs ۴۹۱۹۵۱۰ از نظر آماری هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نشده است. در بررسی miR-۴۲۳ rs ۶۵۰۵۱۶۲ در گروه کنترل بیش تر از از بیماران بود؛ به عبارتی دیگر ژنوتیپ CA کاهش میزان سرطان ریه را داشت و همچنین CA نسبت به CC+AA در rs ۶۵۰۵۱۶۲ کاهش میزان سرطان ریه را داشت.

در یک مطالعه مورد-شاهدی که یینگ زو همکاران در سال ۲۰۱۵ با عنوان بررسی بیان microRNA سرم برای تشخیص سرطان ریه، شامل miR-۴۲۳-۳p انجام دادند و به طور خلاصه گزارش کردند که miR-۴۲۳ می تواند به عنوان نشانگر زیستی برای تشخیص سرطان ریه از افراد غیر سرطانی استفاده شود. همچنین پیشنهاد گردید که مطالعات بیش تری برای تایید نتایج مورد نیاز است (۱۷).

در مطالعه ای دیگری که روکون وانگ و همکاران در یک مطالعه مورد شاهدی در بیمارستان سرطان ویفانگ با عنوان بیان بیش از حد microRNA-۴۲۳-۳p نشان دهنده پیش آگهی ضعیف است و تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم به سرطان ریه را افزایش می دهد، انجام دادند. نتایج آنالیزهای عملکردی نشان داد که بیان بیش از حد miR-۴۲۳-۳p باعث افزایش تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم به سلول های سرطان ریه می شود. این نتایج نشان داد که miR-۴۲۳-۳p به عنوان یک انکوژن عمل می کند و مهاجرت تکثیر سلولی و تهاجم سرطان ریه را افزایش می دهد. miR-۴۲۳-۳p ممکن است به عنوان نشانگر بیولوژیکی پیش آگهی بالقوه و هدف درمانی برای درمان سرطان ریه عمل کند (۱۸).

در مطالعه ای دیگری -فی وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ مطالعه ای در بیمارستان وابسته دانشگاه چینگدائو با عنوان microRNA-۶۰۸ از طریق مهار

TFAP4، آپوپتوز را در سلول های سرطانی سلول غیر کوچک ریه که با دو کسورویسین درمان می شوند، ارتقا می دهد. با هدف شناسایی این که آیا چند شکلی miRNA(miR)-۶۰۸ rs ۴۹۱۹۵۱۰ بر بروز سرطان ریه تأثیر می گذارد، و مکانیسم های اساسی miR-۶۰۸ را در پاتوژن بیماری بررسی می کند انجام دادند. هم چنین گزارش کردند که وجود چند شکلی miR-۶۰۸ rs ۴۹۱۹۵۱۰ با بروز NSCLC مرتبط نیست و rs ۴۹۱۹۵۱۰ بر بلوغ miR-۶۰۸ تأثیر نمی گذارد (۱۹).

در مطالعه ای دیگر که توسط هنگ ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ با عنوان بررسی ارتباط پلی مورفیسم miR-۴۲۳ rs ۶۵۰۵۱۶۲ با خطر ابتلا به سرطان انجام شد، گزارش کردند که پلی مورفیسم rs ۶۵۰۵۱۶۲ به طور قابل توجهی با کاهش خطر سرطان در سرطان ریه مرتبط می باشد. به طور خلاصه، rs ۶۵۰۵۱۶۲ یک عامل محافظتی برای سرطان ریه بود (۲۰).

در مطالعه ای دیگر که مینگ چن و همکاران در سال ۲۰۲۱ جهت بررسی ارتباط miR-۴۲۳ rs ۶۵۰۵۱۶۲ با سرطان ریه انجام دادند؛ بعد از تجزیه و تحلیل داده ها به این نتیجه رسیده است که miR-۴۲۳ rs ۶۵۰۵۱۶۲ با خطر سرطان ریه مرتبط نیست (۲۱).

در مطالعه ای دیگر که شوانگ شوانگ وو و همکاران در سال ۲۰۱۷ با عنوان چند شکلی miR-۶۰۸ rs ۴۹۱۹۵۱۰ ممکن است حساسیت سرطان را بر اساس نوع تغییر دهد؛ انجام دادند. در مجموع با تجزیه و تحلیل ۱۸ مطالعه مورد-شاهدی، شامل ۱۲۵۱۷ مورد و ۱۵۶۲۴ کنترل ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم rs ۴۹۱۹۵۱۰ خطر سرطان در بین افراد چینی مشاهده شد. در تجزیه و تحلیل های طبقه بندی شده بیش تر براساس نوع سرطان، گزارش کردند پلی مورفیسم rs ۴۹۱۹۵۱۰ به طور قابل توجهی با افزایش خطر سرطان تیروئید پاپیلاری، سرطان معده و ریه مرتبط می باشد اما خطر ابتلا به سرطان کولورکتال کاهش می یابد. این یافته ها شواهدی را ارائه می دهند که نشان می دهد

پلی مورفیسم $\text{miR-608 rs 4919510}$ ممکن است حساسیت سرطان را به شیوه‌ای خاص تغییر دهد و هم‌چنین پیشنهاد گردید که مطالعات بیش‌تر با ارزیابی‌های تجربی ضروری است (۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر که چو هوانگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ در بیمارستان بیمارستان کیلو با عنوان بررسی بیان miR-608 در سرطان ریه سلول غیر کوچک انجام دادند. بعد از تعیین ژنوتیپ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و هم‌چنین توالی‌یابی DNA و هم‌چنین بعد از تشخیص تغییرات در سطح پروتئین با استفاده از روش وسترن بلات این نتیجه را گزارش کردند که $\text{miR-608 rs 4919510}$ بر بروز بیماران NSCLC تأثیری ندارد. علاوه بر این، بیان miR-608 در بافت تومور بیماران NSCLC کاهش یافت (۲۳).

در مطالعه‌ای دیگر که دنگروی لی و همکاران در سال ۲۰۱۶ با عنوان بررسی ارتباط بین انواع واریانت‌های ژنتیکی واقع در microRNA های بالغ و خطر سرطان ریه انجام دادند. بعد از نمونه‌گیری خون کامل و استخراج DNA و انجام تجزیه و تحلیل آماری گزارش کردند که rs 4919510 در miR-608 به‌طور قابل توجهی با افزایش خطر سرطان ریه مرتبط می‌باشد و نتیجه گرفتند که $\text{miR-608 rs 4919510}$ ممکن است نقش مهمی در استعداد ابتلا به سرطان ریه داشته باشد (۲۴).

از علل تفاوت در نتایج مطالعات پلی مورفیسم ژنتیکی می‌توان به اختلاف در اندازه مورد جمعیت مورد بررسی، قومیت، روش بررسی، هتروژنی بیماری و هم‌چنین نقش عوامل محیطی اشاره کرد. از آن‌جا که سرطان ریه

بیماری چند عاملی است که عوامل محیطی و ژنتیکی در ایجاد آن دخیلند بنابراین بررسی نقش عوامل محیطی افزون بر عوامل ژنتیکی در این بیماری مهم است (۲۳). از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان گفت که در این مطالعه به بررسی یک جایگاه پلی مورفیک از هر کدام میکرو RNA ها پرداخته شد. با توجه به اهمیت میکرو RNA ها در سرطان ریه لازم است سایر جایگاه‌های پلی مورفیک در miR-608 و miR-423 ارزیابی شوند و با توجه به این که عوامل محیطی هم در ایجاد سرطان ریه نقش دارند، بنابراین لازم است افزون بر عوامل ژنتیکی، نقش عوامل محیطی هم بررسی شوند. به طور کلی با توجه نتیجه این مطالعه مورد-شاهدی همراهی پلی مورفیسم rs 6505162 miR-423 با سرطان ریه پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، مرکز ژنتیک پزشکی نور دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، بیمارستان حضرت بقیه‌الله (عج)، بیمارستان امام خمینی تهران، بیمارستان سیدالشهدا اصفهان، آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و برادر محمدرضا پور رضا، دکتر جواد قره چاهی کمال تشکر را داریم. این مقاله بخشی از نتایج پایان‌نامه آقای جواد صالحی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) بود. نویسندگان مقاله از تمامی شرکت‌کنندگان این طرح سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Tinè M, Biondini D, Damin M, Semenzato U, Bazzan E, Turato G. Extracellular Vesicles in Lung Cancer: Bystanders or Main Characters? *Biology (Basel)* 2023; 12(2): 246.
2. Alduais Y, Zhang H, Fan F, Chen J, Chen B. Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine (Baltimore)* 2023; 102(8): e32899.
3. Li Y, Gu F, He Y, Xiang J, Huang X, Wang Y, et al. MicroRNA in adenoid cystic carcinoma (Review). *Int J Oncol* 2023; 62(1): 17.

4. Lee A-R, Park J, Jung KJ, Jee SH, Kim-Yoon S. Genetic variation rs7930 in the miR-4273-5p target site is associated with a risk of colorectal cancer. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 6885-6895.
5. Landi D, Gemignani F, Barale R, Landi S. A catalog of polymorphisms falling in microRNA-binding regions of cancer genes. *DNA Cell Biol* 2008; 27(1): 35-43.
6. Ying HQ, Peng HX, He BS, Pan YQ, Wang F, Sun HL, et al. MiR-608, pre-miR-124-1 and pre-miR26a-1 polymorphisms modify susceptibility and recurrence-free survival in surgically resected CRC individuals. *Oncotarget* 2016; 7(46):75865-75773.
7. Huang AJ, Yu KD, Li J, Fan L, Shao ZM. Polymorphism rs4919510:C>G in mature sequence of human microRNA-608 contributes to the risk of HER2-positive breast cancer but not other subtypes. *PLoS One* 2012; 7(5): e35252.
8. Wei WJ, Wang YL, Li DS, Wang Y, Wang XF, Zhu YX, et al. Association study of single nucleotide polymorphisms in mature microRNAs and the risk of thyroid tumor in a Chinese population. *Endocrine* 2015; 49(2): 436-444.
9. Qiu F, Yang L, Zhang L, Yang X, Yang R, Fang W, et al. Polymorphism in mature microRNA-608 sequence is associated with an increased risk of nasopharyngeal carcinoma. *Gene* 2015; 565(2):180-186.
10. Wang YF, Ao X, Liu Y, Ding D, Jiao WJ, Yu Z, et al. MicroRNA-608 Promotes Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Treated With Doxorubicin Through the Inhibition of TFAP4. *Front Genet* 2019; 10: 809.
11. Yin Z, Cui Z, Ren Y, Xia L, Wang Q, Zhang Y, et al. Association between polymorphisms in pre-miRNA genes and risk of lung cancer in a Chinese non-smoking female population. *Lung Cancer* 2016; 94: 15-21.
12. Dai ZM, Kang HF, Zhang WG, Li HB, Zhang SQ, Ma XB, et al. The Associations of Single Nucleotide Polymorphisms in miR196a2, miR-499, and miR-608 With Breast Cancer Susceptibility: A STROBE-Compliant Observational Study. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(7): e2826.
13. Ranjbar R, Chaleshi V, Aghdaei HA, Morovvati S. Investigating the Association Between miR-608 rs4919510 and miR-149 rs2292832 with Colorectal Cancer in Iranian Population. *Microna* 2018; 7(2): 100-106.
14. Chen R, Zheng Y, Zhuo L, Wang S. The association between miR-423 rs6505162 polymorphism and cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(25): 40204-40213.
15. Saeidi Saedi H, Mashayekhi S, Salehi Z, Soltanipour S, Mirzajani E. The relationship between miR-423 genetic variation and women breast cancer risk in the north of Iran. *JGUMS* 2018; 26(104): 14-21 (Persian).
16. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009; 7(4): 147-154.
17. Zhu Y, Li T, Chen G, Yan G, Zhang X, Wan Y, et al. Identification of a serum microRNA expression signature for detection of lung cancer, involving miR-23b, miR-221, miR-148b and miR-423-3p. *Lung Cancer* 2017; 114: 6-11.
18. Wang R, Li G, Zhuang G, Sun S, Song Z. Overexpression of microRNA-423-3p indicates poor prognosis and promotes cell proliferation, migration, and invasion of lung cancer. *Diagn Pathol* 2019; 14(1): 53.

19. Wang Y-F, Ao X, Liu Y, Ding D, Jiao W-J, Yu Z, et al. MicroRNA-608 promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells treated with doxorubicin through the inhibition of TFAP4. *Frontiers in genetics*. 2019; 10: 809.
20. Zhang H, Zhang Y, Zhao X, Ma X, Yan W, Wang W, et al. Association of two microRNA polymorphisms miR-27 rs895819 and miR-423 rs6505162 with the risk of cancer. *Oncotarget* 2017; 8(29): 46969-46980.
21. Chen M, Cai D, Gu H, Yang J, Fan L. MALAT1 rs619586 A/G polymorphisms are associated with decreased risk of lung cancer. *Medicine (Baltimore)* 2021; 100(12): e23716.
22. Wu S, Yuan W, Shen Y, Lu X, Li Y, Tian T, et al. The miR-608 rs4919510 polymorphism may modify cancer susceptibility based on type. *Tumour Biol* 2017; 39(6): 1010428317703819.
23. Huang C, Yue W, Li L, Li S, Gao C, Si L, et al. Expression of MiR-608 in Nonsmall Cell Lung Cancer and Molecular Mechanism of Apoptosis and Migration of A549 Cells. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 8824519.
24. Li D, Zhu G, Di H, Li H, Liu X, Zhao M, et al. Associations between genetic variants located in mature microRNAs and risk of lung cancer. *Oncotarget* 2016; 7(27): 41715-41724.