

Association Between Genetic Variant in the pre-miR-27a Oncogene and Risk of Breast Cancer and Metastasis

Bentolhoda Shekari¹,
Somayeh Reiisi²

¹ MSc Student in Genetics, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

² Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

(Received November 19, 2016 Accepted May 29, 2017)

Abstract

Background and purpose: Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within miRNA genes may be related with risk of cancer. A main SNP in the pre-miR-27a (rs895819) with an A to G variation was earlier identified. In this study, we aimed to explore any association between SNP rs895819 in the miR-27a gene and breast cancer susceptibility.

Materials and methods: This case-control study included 120 breast cancer patients and 120 health controls. Genotyping was done by PCR-RFLP method and then verified using direct sequencing. Allele and genotype frequencies for SNP were examined by statistical analysis.

Results: Compared with AA homozygote, samples carrying AG/GG genotypes had a statistically significant reduced predisposition to breast cancer (OR = 0.504, 95% CI = 0.3- 0.846). Frequency of G alleles for rs895819 variation was 20.8% in patients and 30% in controls, indicating a reduced sporadic breast cancer risk ([G] vs. [A]: OR = 0.614, 95% CI 0.405–0.931, P =0.021). Moreover, age investigation showed that the protective influence was mostly detected in women aged ≥ 45 years ([AG+GG] vs. [AA]: OR = 0.205, 95% CI 0.093–0.452, P = 0.001).

Conclusion: Our study demonstrated that rs895819 in hsa-miR-27a is associated with reduced risk of breast cancer, particularly in younger individuals. Therefore, it might be potentially a useful genetic biomarker for breast cancer screening.

Keywords: breast neoplasms, SNP, miR-27a, oncogene

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (152): 12- 22 (Persian).

بررسی تغییر ژنتیکی در انکوژن pre-miR-27a و همراهی آن با ریسک سرطان سینه و متاستاز

بنت الهدی شکاری¹

سمیه رئیس²

چکیده

سابقه و هدف: MicroRNA (miRNAs) ها یک دسته از RNA های غیر کد کننده می باشند که در تنظیمات ژنی انکوژن ها و مهار کننده های تومور نقش دارند. پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن های miRNA می تواند با ریسک سرطان همراه باشد. یک SNP مهم در pre-miR-27a (rs895819) با تغییر A به G در لوپ انتهایی آن شناسایی شده است. مطالعات مختلف نقش این SNP را در ریسک سرطان نشان داده اند، با این وجود نتایج این مطالعات متناقض می باشد. هدف از این مطالعه بررسی همراهی rs895819 در miR-27a با استعداد به سرطان سینه بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، 120 بیمار با سرطان سینه و 120 فرد سالم که از نظر سنی و منطقه جغرافیایی با هم مطابقت داشتند وارد شدند. برای تعیین ژنوتیپ، از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز و پلی مورفیسم طولی قطعات محدود شونده (PCR-RFLP) استفاده شد و سپس نتایج با روش تعیین توالی مستقیم تایید شد. به دنبال آن فرکانس آللی و ژنوتیپی برای SNP بوسیله آنالیز آماری مورد بررسی قرار گرفت (SPSS V.20).

یافته ها: در مقایسه با هموزیگوت AA، نمونه های دارای ژنوتیپ AG/GG به صورت معناداری استعداد ابتلا به سرطان سینه را کاهش می دهد (OR = 0/504، CI = 0/3-0/84، 95%). فراوانی آلل G برای تغییر rs895819 برابر با 20/8 درصد در بیماران با سرطان سینه و 30 درصد برای افراد کنترل می باشد، که ریسک کاهش یافته برای سرطان سینه را نشان می دهد: (OR = 0/614 [G] vs [A]، 95% CI 0/405-0/931، P = 0/021، به علاوه بررسی سن نشان داد که اثر حفاظتی عمدتاً در گروه سنی زیر 45 سال آشکار می شود) (OR = 0/205، 95% CI 0/093-0/452، P = 0/001، [AG+GG] vs. [AA])، در حالی که هیچ اثر معنی داری در گروه سنی بالاتر از 45 سال مشاهده نشد. هیچ گونه همراهی بین پلی مورفیسم و متاستاز و فاکتور HER2 مشاهده نشد.

استنتاج: مطالعه حاضر اثبات کرد که rs895819 در hsa-miR-27a با کاهش ریسک در سرطان سینه، بویژه در افراد جوانتر همراه می باشد. بنابراین ممکن این فاکتور به صورت بالقوه به عنوان یک بیومارکر ژنتیکی برای غربالگری بیماری مفید باشد.

واژه های کلیدی: سرطان سینه، SNP، miR-27a، انکوژن

مقدمه

MicroRNA (miRNA) ها یک دسته بزرگ از RNA های غیر کد کننده درون سلولی می باشند که در حدود 20 تا 22 نوکلئوتید طول دارند. این مولکول ها بیان ژن های هدف را با هیبرید شدن در ناحیه غیر ترجمه ای 3' (UTR') رونوشت ژن هدف، به طور منفی تنظیم می کنند. این عملکرد سبب می شود رونوشت ژن هدف تجزیه شده و یا ترجمه آن مهار شود (1). MicroRNA ها در ابتدا به صورت یک رونوشت طولانی و اولیه از ژنوم

MicroRNA ها یک دسته بزرگ از RNA های غیر کد کننده درون سلولی می باشند که در حدود 20 تا 22 نوکلئوتید طول دارند. این مولکول ها بیان ژن های هدف را با هیبرید شدن در ناحیه غیر ترجمه ای 3'

Email: s.reiisi@sci.sku.ac.ir, s.reiisi@yahoo.com

مؤلف مسئول: سیمیه رئیس - دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

1. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

2. استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: 1395/8/29 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/9/1 تاریخ تصویب: 1396/3/8

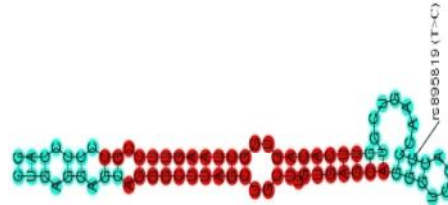
رونویسی می‌شوند (pri-MiRNA) و بعد از آن توسط آنزیم هسته‌ای دروشا به یک پیش‌ساز با ساختار سنجاق سری برش می‌خورند، که این ساختار 60 تا 70 نوکلئوتید طول دارد (pre-miRNA) (2). ساختارهای ایجاد شده توسط اکسپورتین 5 به سیتوپلاسم منتقل شده و بعد از آن با برش توسط آنزیم دایسر به یک MicroRNA بالغ دورشته‌ای با تقریباً 22 نوکلئوتید پردازش می‌شوند (3). در همراهی با کمپلکس القا کننده خاموشی (RNA Inducing Silencing Complex) (RNA Complex)، یک رشته از این miRNA های بالغ به توالی mRNA ژن هدف در ناحیه 3' UTR متصل می‌شود. این اتصال نهایتاً منجر به تجزیه رونوشت ژن هدف یا مهار ترجمه آن شده و سبب کاهش بیان پروتئین هدف می‌شود (4، 5). نکته‌ای که در اینجا وجود دارد این است که miRNA ها می‌توانند چندین ژن هدف را با هم تنظیم کنند و به این صورت در فرایندهای مهمی مانند تنظیم سیستم ایمنی، هومئوستازی، رگ زایی، تکوین سلولی، تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز دخیل هستند (6، 9). کاهش یا افزایش در بیان miRNA ها در تومورهای مختلف سرطانی گزارش شده است. بعضی miRNA ها با توجه به این حالت به عنوان انکوژن و یا مهار کننده تومور مورد توجه قرار می‌گیرند (10، 11). این مولکول‌ها در شروع سرطان و پیشرفت آن با مهار و بیان ژن‌های وابسته به سرطان درگیر هستند (12). به علاوه پروفایل بیانی miRNA می‌تواند مارکرهای مولکولی برای تشخیص و درمان سرطان باشد (13).

سرطان سینه شایع‌ترین نوع بدخیمی در زنان تقریباً در اکثر کشورهای جهان و با فراوانی 73 درصد در کشورهای توسعه یافته می‌باشد و 23 درصد تمام انواع سرطان‌ها را شامل می‌شود. مطابق با گزارشات سازمان بهداشت جهانی فراوانی این سرطان به میزان 2 درصد در هر سال افزایش می‌یابد (14). درحقیقت سرطان سینه علت اصلی مرگ در زنان سرتاسر جهان می‌باشد (15). نوع اصلی سرطان سینه به صورت تک‌گیر (اسپورادیک

) بوده که با محدوده فراوانی از 90 تا 95 درصد ارزیابی شده است، 5 تا 10 درصد باقی‌مانده شامل نوع خانوادگی می‌باشد (16). مطابق با ارزیابی‌ها، مشخص شده است که بیماران با سرطان سینه در ایران معمولاً نسبت به این بیماران در اروپا یا آمریکا جوان‌تر بوده و نوع سرطان در آنها به صورت خانوادگی و توارثی بوده و این ریسک فاکتور در آنها بیش‌تر بوده است (17). فراوان‌ترین ژن‌هایی که برای سرطان سینه پیشنهاد شده‌اند و استعداد ابتلا به بیماری را افزایش می‌دهند شامل BRCA1 and BRCA2, p53, PTEN, STK11/LKB1, and CDH1 می‌باشند (15). به علاوه در سال‌های اخیر، با توجه به تحقیقات زیادی که بر روی miRNA های مختلف در این سرطان انجام شده است، این مولکول‌ها به عنوان یکی از عوامل درگیر در سرطان در نظر گرفته می‌شوند.

به نظر می‌رسد، موتاسیون‌ها و یا بیان نامناسب miRNA ها با خطر ابتلا به انواع سرطان‌ها همراه باشد (13). با وجود اینکه پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در جایگاه‌های هدف miRNA ها به میزان زیادی مورد بررسی قرار گرفته است (18، 19)، اما اثر این تغییرات تک نوکلئوتیدی در miRNA ها تا حدود زیادی به صورت ناشناخته باقی‌مانده است. گزارش‌های مختلفی بیان کرده‌اند که تغییرات ژنتیکی در pre-miRNA می‌تواند سبب تغییر در بیان یا عملکرد بیولوژیکی miRNA بالغ شود و بدین وسیله بر روی استعداد ابتلا به سرطان تاثیر داشته باشد (20، 21). مطالعات اخیر در حدود 323 واریانت را در توالی miRNA 227 بالغ و نواحی اطراف آن شناسایی کرده‌اند و 12 واریانت در درون پیش‌سازهای مربوط به miRNA قرار دارند (22). پلی‌مورفیسم rs895819 سبب تغییر نوکلئوتید (A>G) و یا (T>C) می‌شود و در ناحیه لوپ مربوط به pre-miR-27a قرار دارد (شکل 1). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که تغییرات تک نوکلئوتیدی در has-miR-27a می‌تواند به احتمال زیاد در استعداد ابتلا به سرطان نقش داشته باشد،

با این وجود نتایج در این مطالعات تا حدودی متناقض هستند به صورتی که نقش همراهی در بعضی مطالعات دیده شده و در برخی دیگر عدم همراهی بین پلی مورفیسم و ریسک بیماری مشاهده شده است؛ البته این مورد را می توان به نوع توارث بیماری (اسپورادیک یا خانوادگی) نیز نسبت داد (23، 26). بنابراین هدف از این مطالعه تعیین نقش این پلی مورفیسم در همراهی با ریسک سرطان سینه اسپورادیک می باشد. به علاوه در این مطالعه همراهی بین پلی مورفیسم rs895819 و خصوصیات بالینی-پاتولوژیکی و پیشرفت بیماری مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از این بررسی می توان تغییر ژنتیکی در miR-27a را به عنوان بیومارکر استفاده کرد تا از این طریق به عنوان مارکری برای تشخیص زودهنگام سرطان سینه به کار رود و هم چنین از طرف دیگر امکان شناسایی افراد مستعد و دارای ریسک تا حدودی فراهم شود.



شکل شماره 1: ساختار پلی مورفیسم miR-27a همراه با ناحیه پلی مورفیسم، نواحی قرمز رنگ توالی miR بالغ را نشان می دهند.

مواد و روش ها

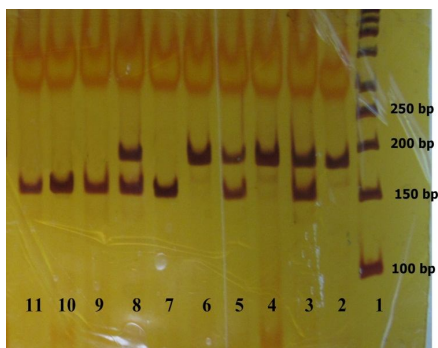
جمعیت مورد مطالعه

این مطالعه توصیفی - تحلیلی به روش مورد-شاهد انجام گرفت. نمونه های خونی پس از کسب رضایت نامه کتبی از افراد و ثبت اطلاعات دموگرافیک و بالینی آنها از طریق پرسش نامه، زیر نظر پزشک از بیمارستان هاجر شهرکرد جمع آوری شد. نمونه گیری به صورت تصادفی ساده از میان 120 فرد مراجعه کننده به بخش سرطان بیمارستان با تایید پاتولوژیست بیماری توسط

پزشک متخصص انجام شد. بیماران مورد بررسی بدون تاریخچه خانوادگی مثبت برای بیماری بودند و موارد با بدخیمی های ثانویه و یا عودکننده از مطالعه حذف شدند. 120 نمونه کنترل از زنان سالمی که به پزشک مراجعه کرده بودند و هیچ گونه سابقه بیماری سرطان در آنها یا خانواده شان نبود گرفته شد. نمونه های کنترل و بیمار از نظر سن (± 5 سال) و منطقه جغرافیایی سکونت با افراد بیمار مطابقت داشتند. افراد کنترل با داشتن تاریخچه خانوادگی مثبت از نظر سرطان و یا علائم مشکوک از مطالعه حذف شدند. هم چنین تمامی افراد بیمار و سالم رابطه خویشاوندی با یکدیگر نداشتند.

استخراج DNA ژنومیک و تعیین ژنوتیپ

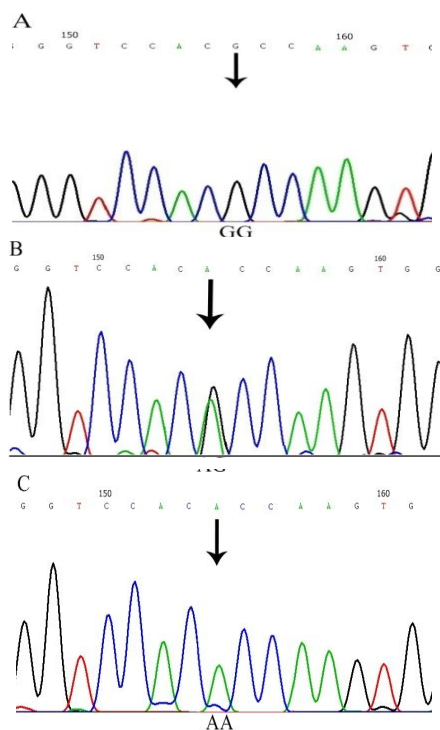
از هر فرد (کنترل و بیمار) به میزان 2 میلی لیتر خون برای آزمایشات مولکولی گرفته شد. سپس نمونه های خونی به ظرف حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (نیم مولار) منتقل شدند. نمونه ها تا زمان استخراج در فریزر -20 نگهداری شدند و سپس DNA ژنومیک با استفاده از روش فنل - کلروفرم استخراج شد و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با اسپکتروفتومتر نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین ژنوتیپ نمونه ها، ابتدا توالی ناحیه مورد نظر که شامل تغییر نوکلئوتیدی می باشد، از پایگاه داده های ژنومی گرفته شد و پرایمرهای مورد نظر برای تکثیر آن توسط نرم افزار Primer3 طراحی شد. پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه به صورت پرایمر مستقیم: 5' GAACTTAGCCACTGTGAACACCACTTGG 3' پرایمر معکوس: 5' TTGCTTCCTGTCACAAATCATTG3' می باشند. انجام واکنش PCR جهت بررسی تغییر مورد نظر بر روی نمونه های DNA با استفاده از دستگاه ترموسا یکلر طبق شرایط دمایی زیر انجام شد: مرحله واسرشت اولیه 95 (Pre denaturation) درجه به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل شامل 94 درجه (Denaturation) به مدت 40 ثانیه، دمای 61 (Annealing) درجه به مدت



شکل شماره 2: ژل پلی اکریل آمید مربوط به محصولات RFLP- شماره 1 نشانگر اندازه، نمونه های ۲،۴ و 6 نمونه دارای ژنوتیپ GG، نمونه های 3، 5 و 8 نمونه دارای ژنوتیپ GA، نمونه های 7، 9 تا 11 نمونه های دارای ژنوتیپ AA

تعیین توالی محصولات PCR-RFLP

برای تایید نتایج، در نهایت از روش تعیین توالی استفاده شد. برای این منظور، حدود 20 درصد نمونه های هموزیگوت و هتروزیگوت با حجم بیش تر توسط PCR تکثیر شده و برای تعیین توالی آماده شدند. واکنش تعیین توالی توسط دستگاه ABI (Capillary System) 3730XL انجام شد (شکل شماره 3).



شکل شماره 3: کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی - نمونه های هموزیگوت بدون واریانت A، هتروزیگوت B و هموزیگوت دارای واریانت مورد نظر C

40 ثانیه و سنتز قطعات 72 درجه (Extension) به مدت 40 ثانیه و طولی سازی نهایی (Terminal extension) در 72 درجه به مدت 5 دقیقه. مخلوط واکنش شامل: $1 \mu\text{L}$ MgCl_2 (mM)، $10 \times$ PCR buffer 2.5/2.5، $0.4 \mu\text{L}$ از 0.4mM dNTP، $2 \mu\text{L}$ پرایمرهای مستقیم (F) و ریورس (R) 10pmol ، $2 \mu\text{L}$ از DNA ژنومیک ($\sim 100 \text{ng}$ نهایتاً) نیم واحد آنزیم Taq پلیمرز ($5 \text{U}/\mu\text{L}$) با ddH₂O به حجم 25 میکرولیتر رسانده شد. کلیه محصولات برای تایید نهایی روی ژل پلی اکریل آمید 8 درصد (نسبت 29:1 بیس اکریل آمید/اکریل آمید) به مدت یک ساعت با ولتاژ 200 الکتروفورز شدند و ژل بدست آمده توسط نیترات نقره رنگ آمیزی گردید.

برای مشخص کردن ژنوتیپ نمونه های مورد نظر از روش RFLP استفاده شد. محصول PCR تحت تاثیر آنزیم DraIII (فرمتاز) برای برش قرار گرفت. برای این منظور در هر میکروتیوب $10 \mu\text{L}$ از محصولات PCR را با $0.5 \mu\text{L}$ آنزیم محدود کننده مورد نظر ($5 \text{U}/\mu\text{L}$ و $2 \mu\text{L}$ بافر و $7.5 \mu\text{L}$ آب مقطر مخلوط نموده و به مدت 16 تا 24 ساعت در 37 درجه سانتیگراد قرار دادیم، سپس محصولات بدست آمده بر روی ژل 10 درصد پلی اکریل آمید به مدت 1 ساعت و با ولتاژ 200 الکتروفورز گردیدند. در صورت تغییر نوکلئوتیدی در جایگاه SNP، جایگاه برش برای آنزیم ایجاد می شود و بر روی ژل دو قطعه 27 و 155 جفت بازی بوجود می آید، البته باند 27 جفت بازی به دلیل کوچک بودن از ژل خارج می شود. در صورت عدم تغییر در توالی جایگاه برش وجود نخواهد داشت و باند 182 جفت بازی (محصول PCR) دیده می شود. افراد هتروزیگوت بر روی ژل سه باند را ایجاد می کنند (شکل شماره 2).

آنالیز آماری

فرکانس آلی پلی مورفیسم برای تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از پایگاه آنالیز آمار عمومی و با اعتبار سنجی انجام شد (27) و نتایج با مقدار P کمتر از 0/05 به عنوان حالت تعادل در نظر گرفته شد. برای بررسی فرکانس آلی و ژنوتیپی بین افراد بیمار و سالم از آزمون کای اسکوئر استفاده شد. هم چنین برای محاسبه ریسک و سپس ارتباط بین فاکتورهای مختلف و ژنوتیپ‌های مورد بررسی از آزمون ANOVA استفاده شد. کلیه آزمون‌های انجام شده توسط نرم افزار SPPSS(v.20.0) انجام شد. میزان معناداری برای آزمون‌های استفاده شده کم تر از 0/05 در نظر گرفته شد.

بعد از تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم rs895819 در تمامی افراد، آزمون مربع کای برای بررسی اینکه آیا افراد از تعادل هاردی واینبرگ تبعیت می کنند، استفاده شد. هیچ کدام از گروه‌ها از حالت تعادل منحرف نشدند، به صورتی که مقدار 2٪ برای افراد کنترل و بیمار به ترتیب برابر 0/12 و 2/39 بود ($p > 0/05$). برای تعیین اینکه آیا پلی مورفیسم مورد مطالعه مشخص کننده استعداد ابتلا به سرطان سینه می باشد، توزیع پلی مورفیسم بین افراد کنترل و بیمار بررسی شد. نتایج مورد بررسی در جدول شماره 2 ارائه شده است.

جدول شماره 2: ارتباط همراهی بین ژنوتیپ های پلی

ژنوتیپ	افراد سالم (n=120)	سرطان سینه (n=120)	OR (95% CI)	سطح معنی داری
AA	58 (48/3)	78 (65/7)	1	-
AG	52 (43/3)	34 (28/3)	0/843-0/281) / 486	0/01
GG	10 (8/3)	78 (67/7)	1/601-0/221) / 0/595	0/3
AG+GG	62	42	0/846-0/30) / 0/504	0/009
آلل A	168 (70/2)	190 (79/2)	1	-
آلل G	72 (30/2)	50 (20/8)	0/931-0/405) / 0/614	0/021

یافته ها

در این مطالعه، DNA از نمونه‌های خون جمع آوری شده از زنان با سرطان سینه اسپورادیک و با سابقه خانوادگی (n=120) که سرطان در آنها توسط پزشک تایید شده بود جمع آوری شد. هم چنین از افراد کنترل (n=120) برای انجام مطالعه مقایسه‌ای نیز نمونه گیری انجام شد. سن بیماران در دامنه 26 تا 77 سال با میانگین $51/8 \pm 11$ سال و سن افراد شاهد در دامنه 16 تا 70 سال با میانگین $36/9 \pm 10/1$ سال بود ($P < 0/01$). هیچ ارتباط معناداری بین BMI، یائسگی و دیگر پارامترهای مربوطه بین دو گروه مشاهده نشد (جدول 1).

جدول شماره 1: اطلاعات دموگرافیک افراد کنترل سالم و

افراد با سرطان سینه

اطلاعات دموگرافیک	سرطان سینه میانگین ± انحراف معیار	کنترل سالم میانگین ± انحراف معیار	سطح معنی داری
سن	51/8 ± 11	36/9 ± 10/1	0/01
BMI	23/8 ± 3/1	24/1 ± 2/8	0/094
تعداد حاملگی	3/8 ± 2/2	3/1 ± 2/3	0/011
کل مدت شیردهی	5/7 ± 4/5	4/7 ± 4/6	0/06
سن اولین یائسگی	50/5 ± 11	50/5 ± 11	0/312
سن تشخیص بیماری	50/5 ± 11	-	-
مدت بیماری از زمان تشخیص	14/5 ± 1/5	-	-
سن متازک	13/4 ± 1/1	13/25 ± 1/2	0/427
سن یائسگی	50/7 ± 4	48/8 ± 4/4	* 0/226
درجه	< 3	82	-
تومور	> 3	38	-
متاستاز به	+	68	-
گروه نفی	-	52	-
HER2	+	76	-
	-	44	-

* بر اساس آزمون من ویتنی

فرکانس آلل G در گروه کنترل به میزان 30 درصد و این میزان در افراد کنترل به مقدار کوچکی کم تر بود (20/8). و تغییر آلی در پلی مورفیسم سبب کاهش ریسک سرطان سینه در زنان می شد. در افرادی که دارای آلل G بودند ارتباط معناداری بین بیماری و تغییر آلی مشاهده نشد (0/061). در بررسی ارتباط بین سن افراد بیمار و ریسک بیماری، اثر وابسته به سن در پلی مورفیسم در افراد 45 سال مشاهده شد. مطالعه نشان داد که در مقایسه بین ژنوتیپ AA، ژنوتیپ‌های AG/GG ارتباط معنی داری با کاهش ریسک سرطان سینه دارد (95% CI=0/846-0/3, OR=0/504)، هیچ نوع همراهی معناداری با ریسک سرطان سینه در افراد 45 سال و بیش تر مشاهده نشد. به علاوه، همراهی بین پلی مورفیسم و ویژگی های کلینیپاتولوژیکی نیز مورد بررسی قرار گرفت (جدول 3). نتایج نشان داد هیچ نوع همراهی بین

پلی مورفیسم و متاستاز به گره لنفی وجود ندارد. البته بین ژنوتیپ AG/GG و درجه تومور (grad) و HER2 ارتباط معناداری دیده شد (جدول 3).

جدول شماره 3: ارتباط بین ژنوتیپ های پلی مورفیسم

متغیر	کنترل / مورد	ژنوتیپ (کنترل، مورد) AA AG/ GG	OR(95% CI)	سطح معنی داری
کل افراد مطالعه	120/120	42/62	0/846-0/30/504	0/009
سن	≤45	14/39	0/452-0/093/0/205	0/001
	>45	28/23	0/371-0/558/1/150	0/705
متاستاز به	+	20/-	1	1
گروه لنفی	-	48/-	22/-	0/14
درجه تومور	3 و بالاتر	30/-	3/756-0/825/1/760	1
	3 و کمتر	62/-	1	1
پاینتز	3 و کمتر	19/-	6/978-1/377/3/1	0/005
	3 و بیشتر	19/-	1	1
HER2	+	42/-	1	1
	-	34/-	1/189-0/264/0/560	0/13

بحث

در مطالعه حاضر، همراهی بین پلی مورفیسم rs895819 در pre-miR-27a و سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به فرکانس پایین ژنوتیپ GG و هم چنین بررسی OR در افراد هتروزیگوت و هموزیگوت AA، این نتیجه حاصل می شود که احتمالاً در اینجا یک مدل ژنتیکی غالب وجود دارد. بنابراین در بررسی ها، ژنوتیپ AG/GG به صورت یک ژنوتیپ ترکیبی در نظر گرفته شد. در مطالعه حاضر این نتیجه حاصل شد که افراد با ژنوتیپ AG/GG در مقایسه با افراد با ژنوتیپ AA به طور قابل توجهی دارای ریسک کاهش یافته سرطان سینه می باشند. به علاوه این اثر در افراد با سن زیر 45 سال و درجه توموری زیر 3 و داشتن فاکتور HER2 نیز به خوبی قابل مشاهده بود. تا جایی که اطلاعات ما آگاهی می دهد، این مطالعه اولین مطالعه بررسی نقش پلی مورفیسم rs895819 در pre-miR-27a در زنان با سرطان سینه در ایران می باشد.

در مطالعات اخیر، گزارشات متعددی ارائه شده اند که miRNA ها فاکتورهای بسیار مهمی در پیشرفت سرطان به عنوان انکوژن یا مهار کننده تومور با تجزیه رونوشت های ژن های هدف یا مهار ترجمه آنها

می باشند (28). هم چنین miRNA ها به عنوان مارکرهای بالقوه تشخیصی و هدف های درمانی در سرطان های انسانی مورد توجه بسیار قرار گرفته اند (29). در مورد سرطان سینه نیز موارد بسیاری از miRNA ها در گیر هستند (30). بیان متغیر در میزان miRNA ها نیز می تواند در اثر واریانت های مختلف در توالی آن مانند موتاسیون و SNP رخ دهد (31). از آنجایی که rs895819 در لوپ مربوط به pre-miR-27a قرار دارد، اطلاعات مربوط به تغییر واریانت بر روی ساختار ثانویه آن با استفاده از برنامه RNAfold بررسی شد (32). مطابق با پیش بینی این برنامه مشخص شد که واریانت G در پلی مورفیسم بر روی کونفورماسیون ساختاری miRNA و نیز بر روی انرژی آزاد آن تاثیر نمی گذارد. پیش بینی می شود که موتاسیون های موجود در نواحی مهم miRNA که بر روی ساختار آن تاثیر می گذارند، می توانند در بلوغ و پردازش آن نقش بسزایی داشته باشند (33).

Yang و همکاران اولین بار اثر حفاظتی پلی مورفیسم rs895819 را در یک گروه بزرگ از افراد با سرطان سینه فامیلی در آلمان با روش تعیین توالی مستقیم نشان دادند؛ با این وجود Catucci و همکاران (23) هیچ گونه همراهی بین این پلی مورفیسم و ریسک سرطان سینه در افراد ایتالیایی با سرطان سینه خانوادگی پیدا نکردند. بعد از آن Yang و همکارانش برای این نتیجه متناقض بیان کردند که احتمالاً نوع روش بررسی در نمونه ها بر روی نتایج حاصل از مطالعه می تواند تاثیر گذار باشد. مطالعه حاضر نشان داد که افراد با G آلل کاهش قابل توجهی در ریسک سرطان سینه را نشان می دهند که به خصوص در افراد جوان (≤ 45) واضح تر است ($P=0/001$)، اما در افراد با سن بالاتر اینگونه نبود. در مطالعه Yang و همکاران (34)، آلل G همراه با کاهش ریسک سرطان سینه بوده و این اثر در گروه سنی کوچکتر از 50 سال مشاهده شده است. با این وجود، مطالعه قبلی توسط Yang گزارش داد که

فاکتور HER2 در مطالعات Zang در جمعیت چین در مورد سرطان سینه اسپورادیک نیز مشاهده شد. در همین مطالعه همراهی بین درجه تومور و ریسک سرطان سینه نیز مشاهده نشد (36). هم چنین در مطالعه Tang و همکاران (38) نیز که بر روی میزان بیان miR-27a در افراد با سرطان سینه کار شده است نیز مشخص شد که تغییرات بیان در اثر تغییرات آللی همراهی معناداری با HER2 ندارد، اما می تواند بر روی درجه تومور تاثیر داشته باشد.

در پایان می توان نتیجه گرفت که مطالعه حاضر نشان داد آلل G که عامل کاهش میزان miR-27a می باشد، سبب کاهش ریسک سرطان سینه اسپورادیک، به خصوص در افراد جوانتر می شود. اما با این وجود، نتایج با مطالعات گسترده تر و هم چنین بررسی مکانیسم های مولکولی درگیر در آن از جمله ژن های هدف می تواند این ارتباط را مشخص تر کند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه افرادی که در این مطالعه ما را یاری کردند سپاسگزاری می کنیم به خصوص عزیزانی که با دادن نمونه پیشبرد مطالعه را امکان پذیر ساختند. این مقاله حاصل پایان نامه خانم بنت الهدی شکاری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک می باشد.

References

1. Sun K, Lai EC. Adult-specific functions of animal microRNAs. *Nat Rev Genet.* 2013;14(8):535-548.
2. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-419.
3. Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(13):E1881-E1889.
4. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 2002;110(5):563-574.
5. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the

rs895819 همراه با افزایش ریسک سرطان معده در بین افراد بالاتر از 58 سال نسبت به افراد جوانتر بوده است (25، 35). در مطالعه Zhang نیز آلل G در افراد جوان کاهش ریسک سرطان را به همراه دارد (36). این نتایج مختلف البته می تواند به تومورزایی متفاوت انواع مختلف تومور نسبت داده شود. بنابراین در مورد نتایج وابسته به سن، داده های این مطالعه در مورد فراوانی آللی با نتایج دیگر مطالعات مطابقت دارد. مطالعات دیگری نیز اثبات کرده اند که نواحی مهم در توالی miRNA ها می تواند بر عملکرد بیولوژیکی و بیان آن تاثیر داشته باشد (37). Sun و همکاران (25) گزارشی از تاثیر قابل توجه ژنوتیپ rs895819 بر روی بیان miR-27a در سرطان معده ارائه دادند و اثبات کردند که بیان miR-27a در موارد با ژنوتیپ AG/GG به طور قابل توجهی در مقایسه با ژنوتیپ AA کمتر بود. در مطالعه Zhang و همکاران (36) نیز مشخص شد که بیان miR-27a در نمونه های سرطان سینه با ژنوتیپ AG/GG در مقایسه با نمونه های دارای ژنوتیپ AA بسیار کم تر بود و این نشان داد که تبدیل A به G باعث کاهش بیان این miRNA می شود. از طرف دیگر، در بررسی متاستاز به گره لنفی هیچ گونه همراهی بین متاستاز و پلی مورفیسم و هم چنین HER2 و تغییر ژنتیکی miR-27a مشاهده نشد. اما در درجه توموری بالاتر از 3 میزان ریسک با تغییر آللی به میزان زیادی معنادار بوده است. عدم همراهی با

- Drosophila and human RNAi pathways. *Mol Cell*. 2002;10(3):537-548.
6. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*. 2008;9(8):839-845.
 7. Chang T-C, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26(5):745-752.
 8. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences(PNAS)*. 2008;105(13):5166-5171.
 9. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*. 2009;136(1):26-36.
 10. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-647.
 11. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435(7043):828-833.
 12. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-269.
 13. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460-469.
 14. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29.
 15. Kuusisto KM, Bebel A, Vihinen M, Schleutker J, Sallinen S-L. Screening for BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50, and CDH1 mutations in high-risk Finnish BRCA1/2-founder mutation-negative breast and/or ovarian cancer individuals. *Breast Cancer Res*. 2011;13(1):R20.
 16. García JM, Silva J, Peña C, Garcia V, Rodríguez R, Cruz MA, et al. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;41(2):117-124.
 17. Karami F, Mehdipour P. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer. *BioMed Res Int*. 2013;2013: 928562.
 18. Tchatchou S, Jung A, Hemminki K, Sutter C, Wappenschmidt B, Bugert P, et al. A variant affecting a putative miRNA target site in estrogen receptor (ESR) 1 is associated with breast cancer risk in premenopausal women. *Carcinogenesis*. 2009;30(1):59-64.
 19. Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L, et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2008;29(3):579-584.
 20. Gao LB, Bai P, Pan XM, Jia J, Li LJ, Liang WB, et al. The association between two polymorphisms in pre-miRNAs and breast cancer risk: a

- meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(2):571-574.
21. Peng S, Kuang Z, Sheng C, Zhang Y, Xu H, Cheng Q. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci.* 2010;55(8):2288-2293.
 22. Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet.* 2007;16(9):1124-1131.
 23. Catucci I, Verderio P, Pizzamiglio S, Bernard L, Dall'olio V, Sardella D, et al. The SNP rs895819 in miR-27a is not associated with familial breast cancer risk in Italians. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133(2):805-807.
 24. Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Redova M, Vasku A, et al. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012;18(22):2827-2831.
 25. Sun Q, Gu H, Zeng Y, Xia Y, Wang Y, Jing Y, et al. Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression. *Cancer Sci.* 2010;101(10):2241-2247.
 26. Shi D, Li P, Ma L, Zhong D, Chu H, Yan F, et al. A genetic variant in pre-miR-27a is associated with a reduced renal cell cancer risk in a Chinese population. *PLoS One.* 2012;7(10):e46566.
 27. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009;169(4):505-514.
 28. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):321-333.
 29. Osaki M, Takeshita F, Ochiya T. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers.* 2008;13(7): 658-670.
 30. Verghese ET, Hanby AM, Speirs V, Hughes TA. Small is beautiful: microRNAs and breast cancer—where are we now? *J Pathol.* 2008;215(3):214-221.
 31. Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, Walstab J, Möller D, Bönisch H, et al. First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum Mol Genet.* 2008;17(19):2967-2977.
 32. Markham NR, Zuker M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(suppl 2):W577-W81.
 33. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2600-2608.
 34. Yang R, Schlehe B, Hemminki K, Sutter C, Bugert P, Wappenschmidt B, et al. A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 12(13):693-702.

35. Yang Q, Jie Z, Ye S, Li Z, Han Z, Wu J, et al. Genetic variations in miR-27a gene decrease mature miR-27a level and reduce gastric cancer susceptibility. *Oncogene*. 2014;33(2):193-202.
36. Zhang N, Huo Q, Wang X, Chen X, Long L, Jiang L, et al. A genetic variant in pre-miR-27a is associated with a reduced breast cancer risk in younger Chinese population. *Gene*. 2013;529(1):125-130.
37. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793-1801.
38. Tang W, Zhu J, Su S, Wu W, Liu Q, Su F, et al. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *PloS One*. 2012;7(12):e51702.