

Investigation of Mir-210 Expression in Breast Cancer Patients

Omolbanin Amjadi¹
Fatemeh Samadi²
Reza Alizadeh-Navaei³
Reza Valadan⁴
Ehsan Zaboli³
Najmeh Ahangar⁵
Elahe Mahmoodi⁶
Akbar Hedayatizadeh-Omran³

¹ MSc in Cell and Molecular Biology, Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Medical Student, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ BSc in Laboratory Science, Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ MSc in Statistics, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 4, 2023 ; Accepted November 28, 2023)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer is one of the most common cancers among women. Abnormal expression of microRNAs is associated with cancer. Therefore, this study aimed to evaluate the expression of miRNA-210 in the serum of breast cancer patients.

Materials and methods: The studied population included 49 breast cancer patients and 55 healthy individuals, and the samples were evaluated using Real Time PCR.

Results: The data analysis of this study revealed that the expression level of miR-210 in the blood of breast cancer patients is significantly higher compared to the blood of healthy people. Also, there is a negative correlation between the age of breast cancer patients and the expression of miR-210 ($r=-0.309$, $P=0.031$) and a significant positive correlation between the increase in the expression of mir-210 and the expression of the Ki-67 marker ($r=0.412$, $P = 0.004$).

Conclusion: Evaluation of miR-210 can be used as a diagnostic marker in breast cancer.

Keywords: breast cancer, microRNA, marker

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (227): 118-125 (Persian).

Corresponding Author: Akbar Hedayatizadeh-Omran - Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: akbar_hedayati@yahoo.com)

بررسی بیان miR-210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

ام البنین امجدی^۱فاطمه صمدی^۲رضا علیزاده نوایی^۳رضا ولدان^۴احسان زابلی^۳نجمه آهنگر^۵الهه محمودی^۶اکبر هدایتی زاده عمران^۳

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان یکی از سرطان‌های شایع در میان زنان می‌باشد. بیان غیرمعمول MicroRNA ها با سرطان در ارتباط می‌باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی بیان miRNA-210 در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام پذیرفت. **مواد و روش‌ها:** جامعه مورد مطالعه شامل ۴۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۵۵ فرد سالم بوده و نمونه‌ها با استفاده از Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز داده‌های این مطالعه نشان داد که سطح بیان miR-210 در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. هم‌چنین یک ارتباط منفی بین سن بیماران مبتلا به سرطان پستان و بیان miR-210 ($P=0/031$)، و یک ارتباط مثبت بین افزایش بیان miR-210 و میزان مارکر Ki-67 وجود دارد ($P=0/004$ ، $r = -0/412$). **استنتاج:** ارزیابی miR-210، می‌تواند به عنوان یک مارکر احتمالی تشخیصی در سرطان پستان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، MicroRNA، مارکر

مقدمه

امروزه شیوع سرطان در جهان رو به افزایش بوده و سومین علت مرگ و میر محسوب می‌گردد (۱). در زنان، سرطان پستان یک مورد از هر ۴ مورد سرطان و ۱ مورد از هر ۶ مورد مرگ ناشی از سرطان را شامل می‌شود (۲). این بیماری از نظر بالینی به صورت توده در پستان، بزرگ شدن غدد لنفاوی زیر بغل و درد پستان تظاهر یافته و به دلیل علائم نامشخص و توجه کم بیماران به بیماری، مرگ و میر بالایی دارد (۳،۴). miRNA ها در تمایز، توسعه، تکثیر و آپوپتوز سلولی در انواع مختلف سلول، از جمله سلول‌های سرطانی، نقش اساسی دارند. در

امروزه شیوع سرطان در جهان رو به افزایش بوده و سومین علت مرگ و میر محسوب می‌گردد (۱). در زنان، سرطان پستان یک مورد از هر ۴ مورد سرطان و ۱ مورد از هر ۶ مورد مرگ ناشی از سرطان را شامل می‌شود (۲). این بیماری از نظر بالینی به صورت توده در پستان،

مؤلف مسئول: اکبر هدایتی زاده عمران - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، پژوهشکده بیماری‌های غیر واگیر E-mail: akbar_hedayati@yahoo.com

۱. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات سرطان گوارش، پژوهشکده بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان گوارش، پژوهشکده بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. لیسانس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات سرطان گوارش، پژوهشکده بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۶. کارشناس ارشد آمار، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۹/۴ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۹/۱۱

در فریزر قرار داده شد. بعد از شستشو با الکل و انجام سانتریفیوژ، رسوب RNA را در آب تزریقی حل و برای تعیین غلظت و کیفیت RNA های استخراجی، از دستگاه NanoDrop (WPA, Biowave II, UK) استفاده شد. ارزیابی کیفی RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز افقی روی ژل آگارز انجام شد. طراحی پرایمرها با استفاده از ساختاری بنام ساقه-حلقه (stem-loop) و توسط شرکت bonbiotech طراحی و تهیه شد. قبل از مرحله سنتز cDNA به انتهای 3' هر پرایمر چند نوکلئوتید مکمل اضافه شد تا سنتز به صورت اختصاصی تر انجام شود. مشخصات کامل پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: مشخصات کامل پرایمرها

°C دما	توالی (5' - 3')	miRNA
۶۰	TTGCGTGGAAAGACTATT	miR-210 forward primer
۶۰	ATCACTGTAAACCGTT	SNORD 47 forward primer

جهت سنتز cDNA ابتدا واکنش پلی آدنیلایسون (طبق مقادیر جدول شماره ۱) انجام و سپس RNA پلی آدنیله با cDNA مربوطه تبدیل و سپس RNA پلی آدنیله با ۱ میکرولیتر از پرایمر (10 μM) BON-RT adaptor ترکیب و RNA با استفاده از آنزیم رونوشت برداری معکوس، نوکلئوتید و بافر به cDNA تبدیل گردید. پروسه های دمایی این مرحله در دستگاه ترموسایکلر انجام که مقادیر مربوطه جهت واکنش پلی آدنیلایسون در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۲: مقادیر جهت واکنش پلی آدنیلایسون

حجم یا وزن	ماده
۱ μg	Total RNA
۱ μl	rATP
۲ μl	10x poly A polymerase buffer
۰.۲ μl	Poly A polymerase
Up to ۲۰ μl	RNase-free water

واکنش Real-Time PCR

در این مطالعه، cDNA های سنتز شده، با استفاده از ترکیبات و طبق برنامه ذیل، تحت واکنش QRT-PCR

سرطان، همه این فرآیندها از طریق تغییر بیان miRNA ها تنظیم می شود، که خود بیانگر این است که miRNA ها در سرطان زایی نقش دارند. تشخیص و درمان به موقع برای پیش آگهی سرطان پستان مهم بوده و از miRNA ها می توان به عنوان یک بیومارکر تشخیصی تومورها استفاده نمود (۵). نقش انکوژنی miR-210 به طور گسترده ای در ایجاد و پیشرفت بعضی از سرطان ها، از جمله سرطان پستان، ریه، سر و گردن، سرطان پانکراس و گلیوبلاستوما مشخص شده است (۶،۷). از آنجایی که مطالعات محدودی در این زمینه در دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده، لذا این مطالعه با هدف بررسی بیان miR-210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان تحت پوشش مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه، یک مطالعه مقطعی (Cross-sectional) است که بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به مراکز شیمی درمانی شهرستان ساری (بیمارستان امام خمینی و کلینیک طبوبی) انجام شد. معیار ورود به مطالعه، بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده ای بودند که بیماری آن ها توسط انکولوژیست تشخیص و توسط پاتولوژیست مورد تایید قرار گرفت. گروه کنترل از میان افراد غیر مبتلا به سرطان که جهت آزمایشات روتین در همان رده سنی بودند و بنا به نظر متخصص از نظر نتایج آزمایشگاهی و تصویربرداری کاملاً سالم تشخیص داده شده اند و هیچ گونه سابقه بیماری در زمینه بیماری های زنان و زایمان نداشته اند انتخاب شدند. در این مطالعه به منظور خالص سازی total RNA حاوی microRNA از بافی کوت، از محلول RNA extraction buffer شرکت bonbiotech استفاده گردید. مقدار ۱ میلی لیتر از بافر لیز و کلروفرم سرد اضافه گردید و در سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شد. فاز روئی را برداشته و ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت یک شبانه روز

ارتباط بین سطح بیان miR-210 و مشخصات بالینی بیماران با تست‌های Mann-Whitney Test و Kruskal-Wallis Test انجام شد. برای نرمال‌سازی داده‌های پراکنده از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شد. هم‌چنین $P < 0/05$ نشان دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری است.

یافته‌ها و بحث

نتایج به‌دست آمده از بررسی بیان miR-210 در گروه بیمار و کنترل در تصاویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. برای بررسی اختصاصی‌تر، منحنی ذوب (Melt curve) نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. منحنی ذوب miR-210 و SNORD به صورت تک قله‌ای به‌دست آمد که این خود بیانگر وجود تنها یک محصول اختصاصی در PCR است که در تصاویر شماره ۳ الی ۶ نشان داده شده است.

آنالیزهای آماری توسط آزمون T-test نشان داد که سطح بیان miR-210 در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با خون افراد سالم اختلاف معنادار ($P < 0/05$) داشته است. هم‌چنین میزان بیان miR-210 در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به خون افراد سالم ۲۰ برابر بوده است (تصویر شماره ۷).

قرار گرفت. برای نرمالیزه کردن بیان miRNA 210 پرایمرهای اختصاصی ژن SNORD 47 به‌عنوان housekeeping gene استفاده شد. جدول شماره ۳ و جدول شماره ۴، ترکیبات و شرایط انجام QRT-PCR بر روی cDNA های سنتز شده را ارائه می‌دهد.

جدول شماره ۳: ترکیبات QRT-PCR بر روی cDNA سنتز شده

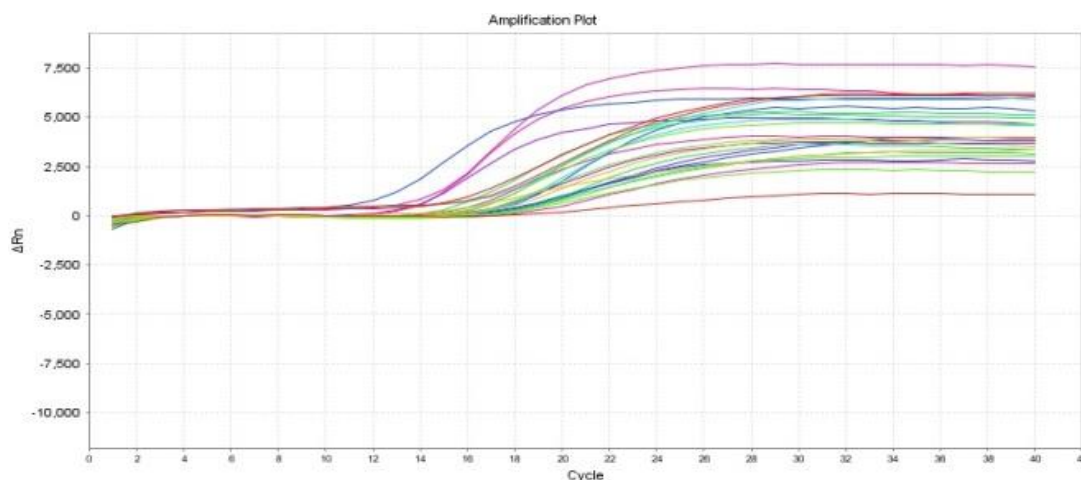
ماده	حجم یا وزن
cDNA	۱ μ l
miRNA-specific forward primer	۰/۵ μ l
Universal reverse primer	۰/۵ μ l
2x miRNA QPCR master mix	۶/۵ μ l
RNase-free PCR- garde H2O	Up to ۱۳ μ l

جدول شماره ۴: شرایط انجام QRT-PCR بر روی cDNA های سنتز شده

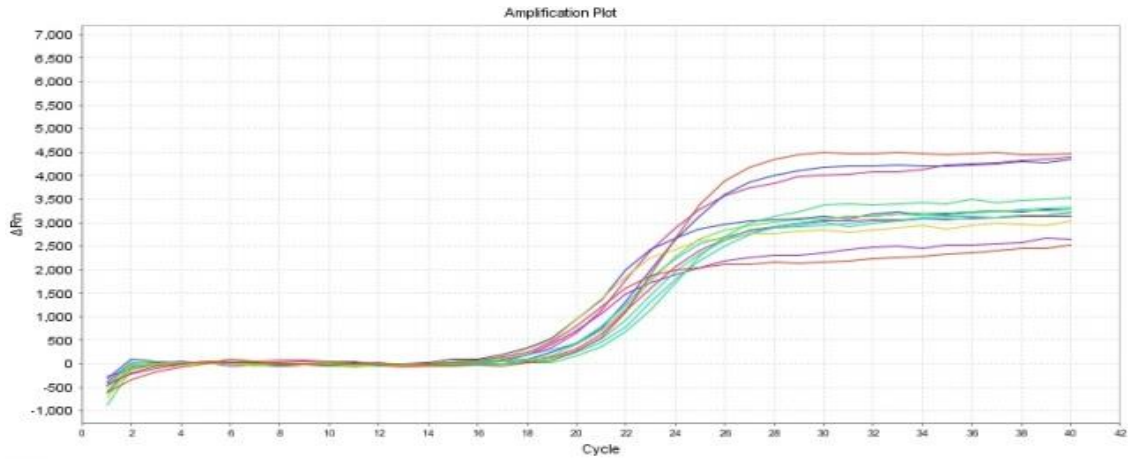
تعداد سیکل	مدت زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱	۲ دقیقه	۹۵
۴۰	۵ ثانیه	۹۵
۴۰	۳۰ ثانیه	۶۰

تجزیه و تحلیل داده‌ها

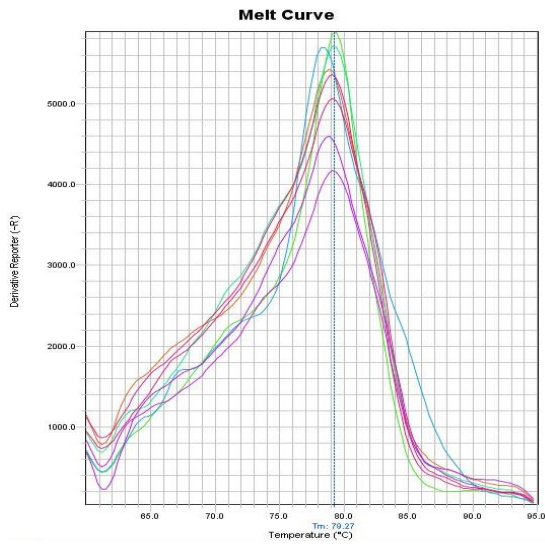
در مطالعه حاضر بررسی بیان miR-210 به روش RT-PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین انجام شد. بیان نسبی miR-210 با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام و آنالیزهای آماری مورد نیاز توسط نرم‌افزارهای SPSS 16 انجام و نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad prism 9 رسم و بررسی بیان miR-210 توسط آزمون T-test و



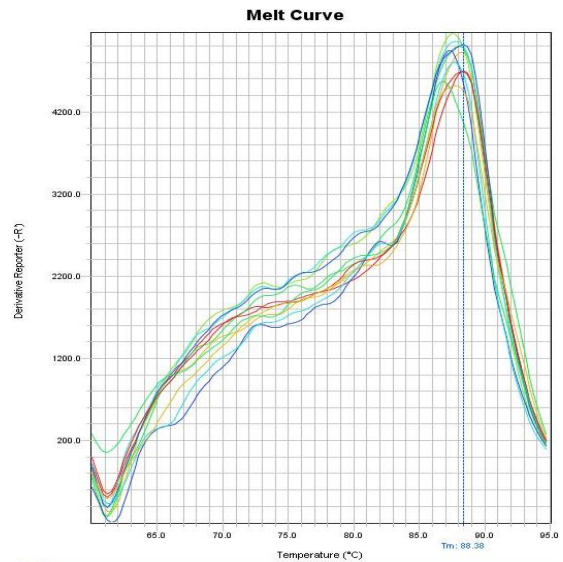
تصویر شماره ۱: منحنی تکثیر miR 210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان



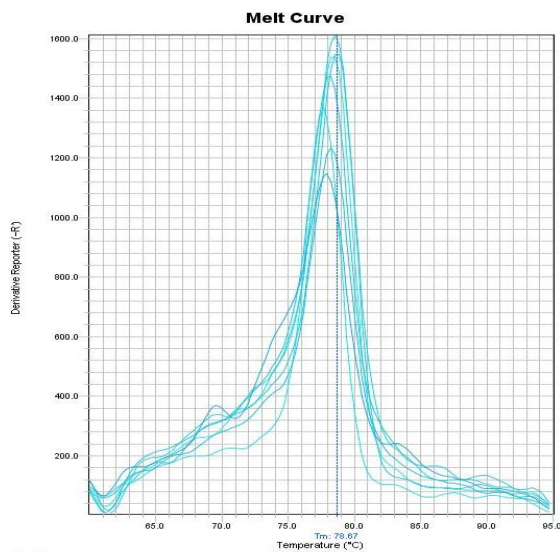
تصویر شماره ۲: منحنی تکثیر miR 210 در گروه کنترل



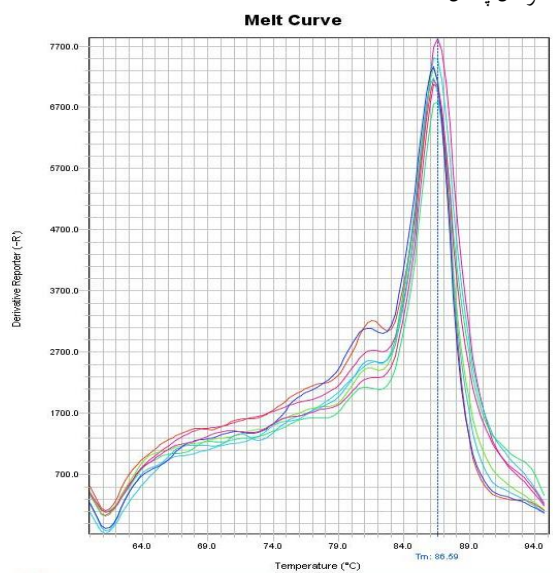
تصویر شماره ۵: نمودار منحنی ذوب کنترل داخلی SNORD در گروه بیمار



تصویر شماره ۳: نمودار منحنی ذوب miR 210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان



تصویر شماره ۶: نمودار منحنی ذوب کنترل داخلی SNORD در گروه کنترل



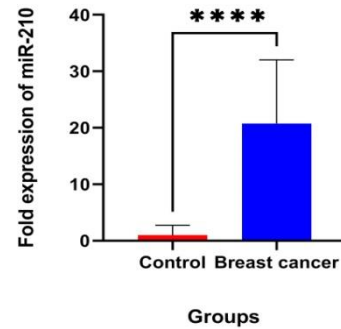
تصویر شماره ۴: نمودار منحنی ذوب miR210 در گروه کنترل

جدول شماره ۶: نتایج آنالیز همبستگی بین خصوصیات پاتولوژیک

متغیر (Spearman's rho)	ضریب همبستگی	سطح معنی داری	تعداد
سن	*۰/۳۰۹	۰/۰۳۱	۴۹
اندازه تومور	۰/۱۱۸	۰/۴۱۹	۴۹
غدد لنفاوی ۱	۰/۱۶۳	۰/۳۳۶	۳۷
غدد لنفاوی ۲	۰/۲۲۷	۰/۱۷۶	۳۷
Ki-67	۰/۴۱۲	۰/۰۰۴	۴۸

در راستای مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای که توسط Adhami و همکاران در سال ۲۰۱۷ به منظور معرفی بیومارکرهای سرطان پستان، طی یک مطالعه مروری سیستماتیک انجام شد، نشان داده شد که بیان miR-210 در سرطان پستان افزایش می‌یابد (۸). هم‌چنین در مطالعه دیگری توسط Huang و همکاران افزایش بیان miR-210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان به اثبات رسیده و مشخص شد که بیان miR-210 ارتباط معنی‌داری با هیپوکسی، آنژیوژنز و فاکتور رگرایی VEGF داشته است (۹). Shidfar و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای را بر روی بافت پستان بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام دادند، که نتایج حاصل از آن نشان داد که بیان miR-18a و miR-210 به‌طور قابل توجهی در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل، بالا بوده است (۱۰). مطالعه Aljarallah نیز نشان داد که میزان بیان miR-210 در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد بود (۱۱).

Nashtahosseini و همکاران نیز مطالعه‌ای مشابه در سال ۲۰۲۱ طراحی کردند، که نتایج به‌دست آمده نشان داد که سطح سرمی miR-660 و miR-210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم به‌طور قابل توجهی افزایش یافته بود که همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (۱۲). نتایج پژوهش Toyama در خصوص ارتباط miR210 با متاستاز به غدد لنفاوی و استیج بیماری همسو با نتایج حاصل از مطالعه حاضر نبود و بیان بیش از حد miR-210 در سرطان پستان با پیش‌آگهی ضعیف آن مرتبط است و با تهاجم بیش‌تر و زمان کوتاه‌تر برای متاستاز همراه است (۱۳). در



تصویر شماره ۷: مقایسه بیان miR-210 بین دو گروه بیمار مبتلا به سرطان پستان و کنترل

همان طوری که در جدول شماره ۵ آمده است، افزایش بیان miR-210 در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان با سایر مشخصات پاتولوژیک آن‌ها از جمله grade تومور، تهاجم عروقی، تهاجم اطراف عصبی، تهاجم لنفی، اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری، متاستاز دوردست در زمان تشخیص و هم‌چنین با خصوصیات بالینی بیماران مبتلا به سرطان پستان مانند وضعیت PR، ER، P53، HER-2/neu هیچ ارتباط معنی‌داری ندارد ($P > 0.05$).

جدول شماره ۶ نشان می‌دهد، یک ارتباط منفی بین سن بیماران مبتلا به سرطان پستان و بیان miR-210 وجود دارد ($r = -0.309$, $P = 0.031$). هم‌چنین آنالیز همبستگی نشان داد یک ارتباط مثبت معنی‌داری بین بیان miR-210 و بیان مارکر Ki-67 وجود دارد ($P = 0.004$, $r = -0.412$).

جدول شماره ۵: ارتباط میان بیان miR-210 با خصوصیات پاتولوژیک و بالینی بیماران مبتلا به سرطان پستان

متغیر	بیان miR-210
grade تومور	$P = 0.835$
تهاجم عروقی	$P = 0.656$
تهاجم اطراف عصبی	$P = 0.971$
تهاجم لنفی	$P = 0.960$
اندازه تومور	$P = 0.109$
درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری	$P = 0.706$
متاستاز دوردست در زمان تشخیص	$P = 0.243$
وضعیت PR	$P = 0.365$
وضعیت ER	$P = 0.362$
وضعیت HER-2/neu	$P = 0.424$
وضعیت P53	$P = 0.462$

سپاسگزاری

این پژوهش منتج از پایان نامه خانم فاطمه صمدی دانشجوی پزشکی بوده و نویسندگان از حمایت‌های معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تقدیر و تشکر می‌نمایند.

مجموع با توجه به موارد پیشگفت و مطالعه حاضر می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که ارزیابی miR-210، می‌تواند به‌عنوان یک مارکر احتمالی تشخیصی در سرطان پستان استفاده شود.

References

- Naghibzadeh B, Razmpa E, Amiri N, Naghibzadeh G, Bandarian F. Thyroid involvement by laryngeal cancer among Iranian patients. *The Journal of Laryngology & Otology* 2013; 127(5): 501-504.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209-249.
- Ali R, Samman N, Al Zahrani H, Nehdi A, Rahman S, Khan AL, et al. Isolation and characterization of a new naturally immortalized human breast carcinoma cell line, KAIMRC1. *BMC Cancer* 2017; 17(1): 803.
- Listinsky JJ, Siegal GP, Listinsky CM. The emerging importance of α -L-fucose in human breast cancer: a review. *Am J Transl Res* 2011; 3(4): 292-322.
- Izzotti A, Carozzo S, Pulliero A, Zhabayeva D, Ravetti JL, Bersimbaev R. Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention. *Am J Cancer Res* 2016; 6(7): 1461-1493.
- Bastos EP, Brentani H, Pasini FS, Silva AR, Torres CH, Puga RD, et al. MicroRNAs discriminate familial from sporadic non-BRCA1/2 breast carcinoma arising in patients \leq 35 years. *PloS One* 2014; 9(7): e101656.
- Bastos EP, Brentani H, Pereira CA, Polpo A, Lima L, Puga RD, et al. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PloS One* 2011; 6(6): e20980.
- Adhami M, Haghdoost AA, Sadeghi B, Malekpour Afshar R. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. *Breast Cancer* 2018; 25(2): 198-205.
- Huang X, Zuo J. Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2014; 46(3): 220-232.
- Shidfar A, Costa FF, Scholtens D, Bischof JM, Sullivan ME, Ivancic DZ, et al. Expression of miR-18a and miR-210 in Normal Breast Tissue as Candidate Biomarkers of Breast Cancer Risk miRNA in Normal Breast as Breast Cancer Risk Biomarkers. *Cancer Prev Res* 2017; 10(1): 89-97.
- AlJarallah M, Poorhasan N. MicroRNA-210 as a Biomarker in Breast Cancer. *Pers M J* 2020; 5(19): 10-12.
- Nashtahosseini Z, Aghamaali MR, Sadeghi F, Heydari N, Parsian H. Circulating status of microRNAs 660-5p and 210-3p in breast cancer patients. *J Gene Med* 2021; 23(4): e3320.
- Toyama, T Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, et al. High expression

of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese

triple-negative breast cancer patients. Jpn J Clin Oncol 2012; 42(4): 256-263.