

Evaluation of the Expression Level of miR-32 and PTEN in Melanoma

Zohreh Abdolrahimi¹

Faria Aslani¹

Shahram Gasembaglou²

Dariush Shanehbandi³

¹ ENT Specialist, Department of ENT, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Assistant Professor, Department of ENT, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Assistant Professor, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received September 17, 2023; Accepted November 8, 2023)

Abstract

Background and purpose: The aim is to investigate the change in the expression level of *miR-32* and *PTEN* genes in tumor samples with melanoma.

Materials and methods: This study collected tumor samples from 50 patients and 50 samples from healthy marginal tissue around the tumor as a control sample. Following that, the RNA related to the samples was extracted and the expression of the desired gene was evaluated using real-time polymerase chain reaction. Appropriate statistical tests assessed differences in expression levels of the two groups. In statistical tests.

Results: The expression of *PTEN* was lower in tumor samples than in healthy samples. In contrast, the expression of *miR-32* was higher in tumor samples and the difference was significant in both cases ($P < 0.05$).

Conclusion: Our findings indicated that the *miR-32* and *PTEN* genes can be used as diagnostic or predictive biomarkers in melanoma. However, it is recommended that further research be conducted in different communities with larger sample sizes. Similar tests can contribute to the immediate diagnosis of melanoma.

Using the potential of these biomarkers for diagnosis, early detection of melanoma and better treatment will become attainable and more successful.

Keywords: melanoma, miR-32, PTEN, real time-PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 2): 309-315 (Persian).

Corresponding Author: Shahram Gasembaglou- Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
(Email: shahramgasembaglou@yahoo.com)

ارزیابی میزان بیان miR-۳۲ و PTEN در ملانوما

زهرة عبدالرحیمی^۱فريا اصلائی^۱شهرام قاسم بگلو^۲داریوش شانه بندی^۳

چکیده

سابقه و هدف: هدف این مطالعه بررسی تغییر در سطح بیان miR-۳۲ و PTEN Phosphatase and tensin homolog در نمونه‌های مبتلابه ملانوما است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از ۵۰ بیمار از تومور و از بافت حاشیه‌ای سالم اطراف تومور، نمونه جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری، RNA مربوط به نمونه‌ها استخراج و بیان ژن مورد نظر با استفاده از Real time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. تفاوت در سطح بیان دو گروه با آزمون‌های آماری مناسب ارزیابی شد.

یافته‌ها: بیان PTEN در نمونه‌های تومور کم‌تر از نمونه‌های حاشیه تومور بود و در مقابل، بیان miR-۳۲ در نمونه‌های تومور بیش‌تر بود و این تفاوت در هر دو مورد معنی‌دار بود.

استنتاج: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که ژن‌های miR-۳۲ و PTEN پتانسیل استفاده به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی زیستی یا پیش‌بینی‌کننده در ملانوما را داراست. هرچند بهتر است تحقیقات بیش‌تری در جوامع مختلف با حجم نمونه بزرگ‌تر انجام شود. آزمایش‌های مشابه می‌تواند به یافتن راهی برای تشخیص سریع ملانوما کمک کند. در صورتی که قابلیت استفاده از این بیومارکرها برای تشخیص اثبات شود، تشخیص زودهنگام ملانوما و درمان بهتر، آسان‌تر و مؤثرتر حاصل می‌شود.

واژه‌های کلیدی: miR-۳۲، Real time-PCR، ملانوما، PTEN

مقدمه

تنها حدود شش تا ۱۰ ماه است. کم‌تر از ۱۰ درصد از آن‌ها می‌توانند تا پنج سال زنده بمانند. با این حال، در چند دهه اخیر، بهبود قابل توجهی در بقای این بیماران مشاهده نشده است (۲).

عوامل گوناگونی در تغییرات نئوپلاستیک

ملانوم پوستی در اثر تغییر شکل ملانوسیت‌های تولیدکننده رنگ‌دانه ایجاد می‌شود و یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها در میان جوانان است. این بیماری دارای قدرت تهاجمی بالا و متاستاز سریع به سایر اندام‌ها است (۱). دوره بقای افراد مبتلابه ملانوما متاستاتیک

E-mail: Shahramgasembaglou@yahoo.com

مؤلف مسئول: شهرام قاسم بگلو - تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی

۱. متخصص گوش، گلو و بینی و جراحی سر و گردن، گروه گوش و حلق و بینی (ENT)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. استادیار، گروه گوش و حلق و بینی (ENT)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۷/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۸/۱۷

ملانوسیت‌ها و ایجاد ملانوما نقش دارند از جمله آن‌ها می‌توان به در معرض نور مزمن خورشید قرار گرفتن، رنگ پوست، موهای بلوند یا قرمز، خال‌های بزرگ مادرزادی، سرکوب سیستم ایمنی، پلی مورفیسم‌های ژنتیکی، مصرف الکل، عوامل ژنتیکی و سابقه خانوادگی اشاره کرد (۳-۵). میکرو RNA (به اختصار miRNA) یک مولکول نوکلئوتیدی کوتاه با حدود ۱۸-۲۵ نوکلئوتید است که در دسته RNAهای غیر کدکننده قرار می‌گیرد و در فرآیند خاموش شدن RNA و تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش دارد (۶، ۷). PTEN یک سرکوب‌کننده تومور شناخته شده است. برای مثال عدم بیان این ژن، با پیشرفت تومور و پیش‌آگهی ضعیف در سرطان کولورکتال (CRC) مرتبط است. تغییر بیان PTEN از سلول‌های طبیعی به آدنوم، تومور و متاستاز کاهشی است که نشان‌دهنده نقشی در سرطان‌زایی CRC است (۸). در مطالعات رابطه‌ی نزدیکی بین عملکرد بازخورد این دو ژن و رابطه آن‌ها با یکدیگر گزارش شده است (۹، ۱۰). در راستای این مطالعه، هدف بررسی تغییر در سطح نسبی تغییرات بیان ژن‌های PTEN و miR-۳۲ در نمونه‌های توموری بیماران ملانوما است.

مواد و روش‌ها

ابزار آزمایش

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۵۰ نمونه تومور همراه با حاشیه‌های سالم آن‌ها پس از تأیید متخصص پوست، توسط جراح استخراج شد و سپس مورد بررسی قرار گرفت. معیار ورود افراد شامل بیمارانی با تأیید پاتولوژیست بود. افرادی که سابقه شیمی‌درمانی، رادیوتراپی یا مصرف داروهایی که می‌تواند با بیان ژن‌های هدف تداخل داشته باشد، از هر بدخیمی دیگری رنج می‌بردند یا تمایلی به همکاری نداشتند از مطالعه حذف شدند. پیش از انجام تمامی مراحل، کلیات طرح از نظر اخلاق پزشکی توسط کمیته اخلاق دانشگاه

علوم پزشکی تبریز بررسی و تصویب شد. کد اخلاقی پروژه IR.TBZMED.REC1399,606 است. یک فرم رضایت کتبی از همه افراد برای تحقیق در مورد نمونه‌های آن‌ها گرفته شد. نمونه‌برداری از سال ۱۳۹۵ آغاز و در سال ۱۳۹۸ به پایان رسید. در این مدت نمونه‌ها در مخزن نیتروژن در دمای -70°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حدود ۱۰۰ میکروگرم از نمونه بافت جدا شد. با افزودن ۷۰۰ میکرولیتر محلول تریزول (ROCHE®)، نمونه مورد نظر همگن شد. محلول به میکروتیوب منتقل و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه انکوبه شد سپس حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس لوله به آرامی وارونه و هم زده شد و این کار تا زمانی که سه فاز مخلوط شود ادامه یافت. هم زدن نمونه در این مرحله به دلیل احتمال شکستن RNA توصیه نمی‌شود. لوله به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (Sigma®) استفاده شد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی به یک میکروتیوب جدید ۱/۵ میلی‌لیتری بدون Rnase منتقل شد و یک میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد، لوله وارونه و ۲۰ دقیقه در فریزر انکوبه شد. سپس فرآیند سانتریفیوژ مجدد با همان شرایط انجام گردید. پس از سانتریفیوژ، رسوب RNA در پایین تشکیل شد. نخست تمام مایع رویی خارج شد و سپس یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰-۷۵ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و ۷۵۰۰ دور در دقیقه انجام شد. مایع رویی دوباره برداشته شد، سپس پلیت به‌طور کامل در هوا خشک شد. سپس حدود ۴۰ میکرولیتر محلول آب DEPC (cinagene®) اضافه شد. با استفاده از دستگاه Bath Dry، رسوب RNA را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 60°C درجه سانتی‌گراد قرار داده تا در آب حل شود. پس از چرخش، غلظت نمونه با استفاده از دستگاه نانو قطره اسپکتروفتومتر (Termo®) به دست آمد.

اضافه و چندین بار عمودی (وارونه کردن) حرکت داده شد و پس از چرخش، نمونه‌ها توسط ۹۶ Light Cycler بررسی شدند.

برای ارزیابی کارایی هر ژن از شیب منحنی استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد برای هر ژن با استفاده از CT محاسبه شده، از رقیق‌سازی سریالی محصولات آن ژن در مقابل غلظت لگاریتمی cDNA به دست آمد. در مرحله بعد، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، دلتا CT ژن در هر نمونه از تفاوت بین CT ژن مربوطه و CT ژن U6 (یک ژن بسیار حفاظت‌شده در میان گونه‌ها) به عنوان ژن مرجع محاسبه و بیان ژن‌ها در حالت پایه در مقایسه با ژن‌های مرجع با فرمول $\Delta CT - 2$ محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶/۰۰ انجام شد. P-value برای همه روابط محاسبه و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

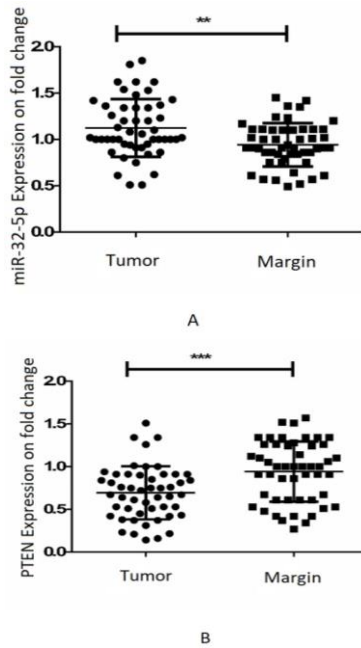
یافته‌ها و بحث

در این مطالعه ۵۰ نمونه تومور مورد بررسی قرار گرفت که نمونه‌های بافت و هم‌چنین نمونه‌ای از حاشیه سالم در بیمارستان امام رضا توسط جراح طرح و زیر نظر متخصصان مربوطه جمع‌آوری شد. اطلاعات بالینی آسیب‌شناسی مربوط به هر یک از پرونده‌های موجود بررسی و خلاصه شد. اطلاعات دموگرافیک و آسیب‌شناسی بالینی افراد در جدول زیر قابل مشاهده است (جدول شماره ۱). سطح بیان نسبی هر دو ژن مورد مطالعه در نمونه‌های بیمار نسبت به بافت حاشیه‌ای تغییرات معنی‌داری داشت. هر دو ژن در بیماران تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های حاشیه‌ای سالم تومور داشتند. بیان ژن miR-32 در بافت تومور افزایش قابل توجهی داشت ($P < 0.05$). هم‌چنین بیان PTEN در بافت‌های سرطانی نسبت به حاشیه‌های سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (تصویر شماره ۱) ($P < 0.05$).

بررسی ارتباط بین بیان ژن و اطلاعات بالینی - آسیب‌شناسی بیماران نشان داد که هر دو ژن با متاستاز

خلوص و غلظت RNA استخراج‌شده توسط اسپکتروفتومتر بررسی شد. غلظت نمونه در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر اسکن شد. خلوص RNA با تقسیم غلظت نمونه در ۲۸۰ نانومتر بر ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. مقدار بسیار اندکی محلول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. مشاهده دو بانده S28 و S18، دلیلی بر یکپارچگی RNA استخراج‌شده و آسیب ندیدن آن در طول فرآیند استخراج بود.

با استفاده از کیت سنتز (EXIQON®) در مراحل زیر و حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر cDNA سنتز شد. در سنتز cDNA ب، غلظت RNA را $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ در نظر گرفتیم. رقیق کردن برای به دست آوردن حجم نمونه در غلظت $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ مورد نیاز بود. به ازای هر نمونه سه میکرولیتر آب، یک میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و دو میکرولیتر از بافر موجود در کیت به میکروتیوب اضافه شد و استوک موردنظر تهیه شد. چهار میکرولیتر RNA رقیق‌شده به هر 0.2 میکرولوله اضافه و بالا و پایین چندین بار انجام شد و پس از چرخش، نمونه‌ها در ترموسایکلر (EXIQON®) برای سنتز cDNA قرار گرفتند. پس از تکمیل چرخه‌ها، لوله‌ها در فریزر نگهداری شدند. میزان بیان ژن‌ها و ژن U6 به عنوان کنترل داخلی با استفاده از دستگاه Roche و رنگ syber green I تعیین شد. پیش از بررسی میزان بیان ژن‌های موردبررسی در این مطالعه با همین روش اقدام به بررسی میزان بیان ژن (U6) جهت تأیید صحت سنتز cDNA شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر و براساس مقادیر نشان داده شده در زیر انجام شد. برای بررسی بیان هر ژن طبق توصیه کیت، نخست نمونه‌ها از یک تا ۲۰ رقیق شدند. دو میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC، پنج میکرولیتر Master Mix 2x Syber Green PCR و یک میکرولیتر Primer Mix به صورت ساعت‌گرد و پادساعت‌گرد هم زده شد. در پایان دو میکرولیتر از template به هر لوله



تصویر شماره ۱: تغییرات بیان ژن miR-۳۲ (A) و PTEN (B) را در حاشیه و بافت تومور ملانوما نشان می‌دهد.

** Significant difference

*** Extremely Significant

miRNAها گروه کوچک غیر کدکننده‌ای از RNA

هستند که در تنظیم رشد و توسعه سرطان نقش دارند (۶). نقش انکوژنیک گروه ژنی miRNA در همه انواع سرطان مورد بحث قرار گرفته است. PTEN و miR-۳۲ ژن‌های مهمی هستند که بیان و تغییرات اپی ژنتیک آن‌ها در چندین سرطان ارزیابی و تأیید شده است (۱۵). برخی از تحقیقات نشان داده است که miRNA باعث کاهش رشد و توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی به طور مثال در سرطان پروستات و CRC می‌شود (۱۰، ۱۶). PTEN به عنوان یک سرکوبگر تومور طبقه‌بندی می‌شود و فعالیت آن در اثر حذف، جهش یا تغییرات اپی ژنتیک از بین می‌رود (۱۷). استفاده از miRNAها به عنوان هدف جدیدی برای درمان سرطان پیشنهاد شده است (۱۰، ۱۸، ۱۹). با توجه به نتایج مطالعه، بیان دو ژن miR-۳۲ و PTEN می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی تشخیصی در نمونه‌های بیماران ملانوما نسبت به بافت حاشیه استفاده شود. با این حال، برای تأیید این ادعا به مطالعات بیش‌تری نیاز است.

تومور و مرحله بیماری ارتباط معنی‌داری دارند ($P < 0.05$). ارتباط معنی‌داری بین سن و جنس در هر دو ژن وجود نداشت ($P < 0.05$). رابطه بین این متغیرها در جدول نشان داده شده است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱ اطلاعات دموگرافیک و آسیب شناسی بالینی

متغیرها	تعداد (درصد)
سن	
> ۵۰	۳۸ (۱۹)
< ۵۰	۶۴ (۳۱)
جنسیت	
مرد	۵۶ (۲۸)
زن	۴۴ (۲۲)
درگیری گره لنفی	
دارد	۴۲ (۲۱)
ندارد	۵۸ (۲۹)
موقعیت	
سر و گردن	۳۶ (۱۸)
پا	۳۰ (۱۵)
دست	۳۲ (۱۶)
استیج	
II	۴۰ (۲۰)
III	۴۸ (۲۴)
IV	۱۲ (۶)
متاستاز	
دارد	۲۰ (۱۰)
ندارد	۸۰ (۴۰)

جدول شماره ۲ ارتباط اطلاعات بالینی - آسیب شناسی و بیان ژن

متغیرها	سطح معنی‌داری ^۱
سن	۰/۱۷
miR-۳۲	۰/۲۱
PTEN	۰/۸۵
جنسیت	۰/۹۲
PTEN	* ۰/۰۱۱
متاستاز	* ۰/۰۰۴
PTEN	* ۰/۰۳۶
استیج	* ۰/۰۲۳
PTEN	

۱: spearman correlation test

* $P > 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ملانوما مهاجم‌ترین و مرگبارترین نوع سرطان پوست است و می‌تواند به نواحی مختلف بدن متاستاز دهد (۱۱). این بیماری با نمونه‌برداری و معاینات پاتولوژیک به طور قطعی تشخیص داده می‌شود (۴). در مراحل اولیه، ملانوما را می‌توان با جراحی درمان کرد، اما زمانی که به مرحله متاستاز پیشرفت می‌کند، درمان آن بسیار دشوار است و به بسیاری از درمان‌های رایج مقاوم می‌شود (۳، ۴، ۱۲، ۱۳). بنابراین، شناسایی تغییرات مولکولی مرتبط با متاستاز در ملانوما و استفاده از این یافته‌ها در زمینه‌های پیش‌آگهی نتیجه و درمان هدفمند ضروری است (۱۴).

References

1. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *The Lancet* 2014; 383(9919): 816-827.
2. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life* 2014; 7(4): 572-576.
3. Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2011; 30(4): 222-228.
4. Wang H, Naghavi M, Allen C, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The lancet* 2016; 388(10053): 1459-1544.
5. Armstrong BK, Kricker A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 1993; 3(6): 395-401.
6. Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. Therapeutic microRNA strategies in human cancer. *Aaps J* 2009; 11(4): 747-757.
7. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 2014; 157(1): 77-94.
8. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2014; 3: 326.
9. Yan SY, Chen MM, Li GM, Wang YQ, Fan JG. MiR-32 induces cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN. *Tumour Biol* 2015; 36(6): 4747-475.
10. Wu W, Yang J, Feng X, Wang H, Ye S, Yang P, Tan W, Wei G, Zhou Y. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer* 2013; 12: 30.
11. Fidler IJ. Critical determinants of melanoma metastasis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; 1(2): 203-208.
12. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388(10053): 1545-1602.
13. Kozar I, Margue C, Rothengatter S, Haan C, Kreis S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019; 1871(2): 313-322.
14. Garbe C, Büttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Krüger S, et al, et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102(5): 695-699.
15. Zarredar H, Ansarin K, Baradaran B, Shekari N, Eyvazi S, Safari F, Farajnia S. Critical microRNAs in Lung Cancer: Recent Advances and Potential Applications. *Anticancer Agents Med Chem* 2018; 18(14): 1991-2005.
16. Jalava S, Urbanucci A, Latonen L, et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* 2012; 31(41): 4460-4471.
17. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 2003; 22(3): 183-198.
18. Aguisa-Touré AH, Li G. Genetic alterations

of PTEN in human melanoma. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(9): 1475-1491.
19. Chen E, Li Q, Wang H, Zhang P, Zhao X,

Yang F, Yang J. MiR-32 promotes tumorigenesis of colorectal cancer by targeting BMP5. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 1046-1051.