BRIEF REPORT

Investigation of Mir-210 Expression in Breast Cancer Patients

Omolbanin Amjadi[1]
Fatemeh Samadi[2]
Reza Alizadeh-Navaei[3]
Reza Valadan[4]
Ehsan Zaboli[3]
Najmeh Ahangar[5]
Elahe Mahmoodi[6]
Akbar Hedayatizadeh-Omran[3]

[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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ۲۲۷ آذر سال ۱۴۰۲ (۱۲۵-۱۱۸)

بررسی بیان miR-210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

ام البنین امجدی[۱]
فاطمه صمدی[۲]
رضا علیزاده نوایی[۳]
رضا ولدان[۴]
احسان زابلی[۳]
نجمه آهنگر[۵]
الهه محمودی[۶]
اکبر 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= ۰/۰۳۱، r = - ۰/۳۰۹) و یک ارتباط مثبت بین افزایش بیان mir-210 و میزان مارکر Ki-67 وجود دارد (P= ۰/۰۰۴، r = - ۰/۴۱۲).

استنتاج: ارزیابی miR-210، می‌تواند به عنوان یک مارکر احتمالی تشخیصی در سرطان پستان استفاده شود.

واژه های 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(۴،۳). miRNA ها در تمایز، توسعه، تکثیر و آپوپتوز سلولی در انواع مختلف سلول، از جمله سلول‌های سرطانی، نقش اساسی دارند. در

مولف مسئول: اکبر هدایتی زاده عمران– ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، پژوهشکده بیماری های غیر واگیر E-mail: akbar_hedayati@yahoo.com
۱. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات سرطان گوارش، پژوهشکده بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان گوارش، پژوهشکده بیماری های 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 بیماری های 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

سرطان، همه این فرآیندها از طریق تغییر بیان miRNA ها تنظیم می‌شود، که خود بیانگر این است که miRNA ها در سرطان‌زایی نقش دارند. تشخیص و درمان به موقع برای پیش‌آگهی سرطان پستان مهم بوده و از miRNA ها می‌توان به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی تومورها استفاده نمود(۵). نقش انکوژنی miR-210 به‌طور گسترده‌ای در ایجاد و پیشرفت بعضی از سرطان‌ها، از جمله سرطان پستان، ریه، سر و گردن، سرطان پانکراس و گلیوبلاستوما مشخص شده است(۷،۶). 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 روش‌ها

این مطالعه، یک مطالعه مقطعی (Cross-sectional) است که بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان مراجعه‌کننده به مراکز شیمی درمانی شهرستان ساری (بیمارستان امام خمینی و کلینیک طوبی) انجام شد. معیار ورود به مطالعه، بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده‌ای بودند که بیماری آن‌ها 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 کاملا سالم تشخیص داده شده‌اند و هیچ‌گونه سابقه بیماری در زمینه بیماری های زنان و زایمان نداشته‌اند 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 میلی‌لیتر از بافر لیز و کلروفرم سرد اضافه گردید و در سانتریفیوژ یخچال‌دار قرار داده شد. فاز رویی را برداشته و ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت یک شبانه روز 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

miRNA	توالی (´3 - ´5)	دما °C
miR-210 forward primer	TTGCGTGGAAGACTATT	۶۰
SNORD 47 forward primer	ATCACTGTAAAACCGTT	۶۰

جهت سنتز cDNA ابتدا واکنش پلی‌آدنیلاسیون (طبق مقادیر جدول شماره ۱) انجام و سپس RNA پلی‌آدنیله به cDNA مربوطه تبدیل و سپس RNA پلی‌آدنیله با ۱ میکرولیتر از پرایمر BON-RT adaptor (10 µM) ترکیب و RNA با استفاده از آنزیم رونوشت‌برداری معکوس، نوکلئوتید و بافر به cDNA تبدیل گردید.

پروسه‌های دمایی این مرحله در دستگاه ترموسایکلر انجام که مقادیر مربوطه جهت واکنش پلی آدنیلاسیون در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۲: مقادیر جهت واکنش پلی آدنیلاسیون

ماده	حجم یا وزن
Total RNA	۱ µg
rATP	۱ µl
10x poly A polymerase buffer	۲ µl
Poly A polymerase	۰/۲ µl
RNase-free water	Up to ۲۰ µl

واکنش Real-Time PCR

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

قرار گرفت. برای نرمالیزه کردن بیان miRNA 210 از 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 µl
miRNA-specific forward primer	۰/۵ µl
Universal reverse primer	۰/۵ µl
2x miRNA QPCR master mix	۶/۵ µl
RNase-free PCR- garde H2O	Up to ۱۳ µl

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

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

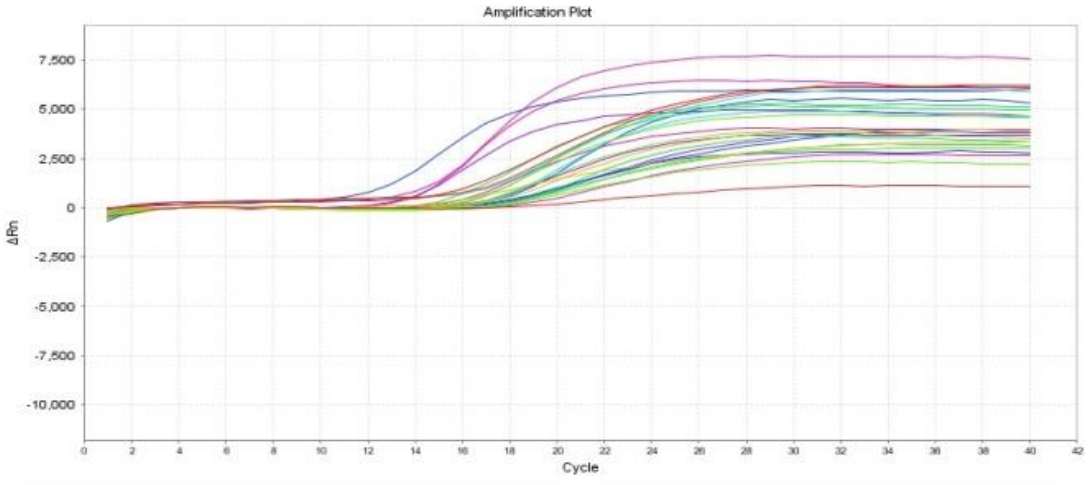
تجزیه و تحلیل داده ها

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 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< ۰/۰۵ نشان دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری است.

یافته‌ها و بحث

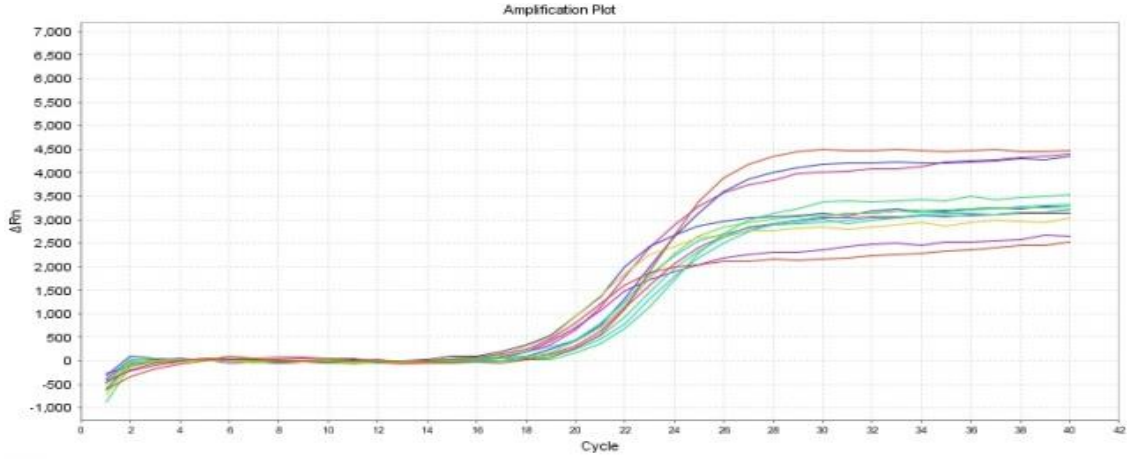
نتایج به‌دست آمده از بررسی بیان miR-210 در گروه بیمار و کنترل در تصاویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. برای بررسی اختصاصی‌تر، منحنی ذوب(Melt curve) نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. منحنی ذوب miR-210 و SNORD به صورت تک قله‌ای به‌دست آمد که این خود بیانگر وجود تنها یک محصول اختصاصی در PCR است که در تصاویر 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< ۰/۰۵) داشته است. هم چنین میزان بیان miR-210 در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به خون افراد سالم ۲۰ برابر بوده است (تصویر شماره ۷).

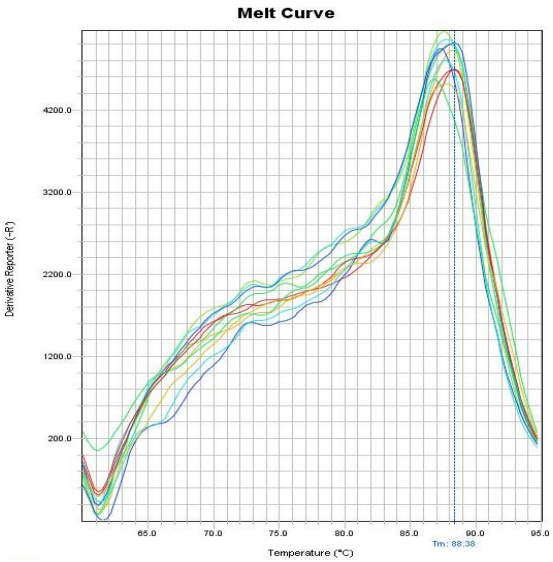


تصویر شماره ۱: منحنی تکثیر miR 210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

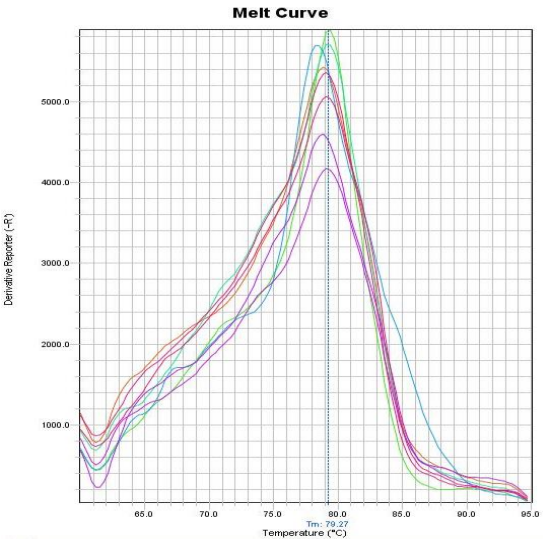
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]



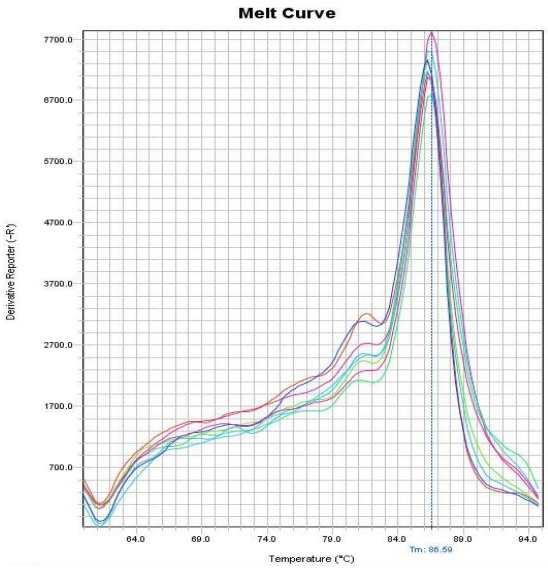
تصویر شماره ۲: منحنی تکثیر miR 210 در گروه کنترل



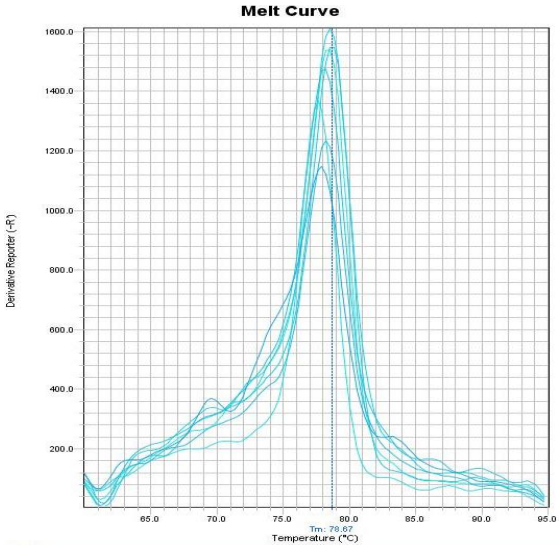
تصویر شماره ۳: نمودار منحنی ذوب miR 210 در بیماران مبتلا به سرطان پستان



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

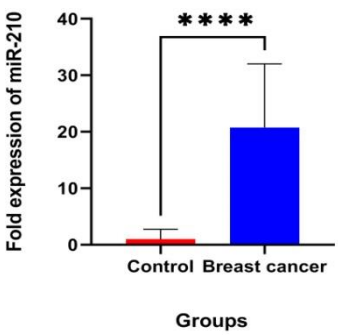


تصویر شماره ۴: نمودار منحنی ذوب miR210 در گروه کنترل



تصویر شماره۶: نمودار منحنی ذوب کنترل داخلی SNORD در گروه کنترل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]



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> ۰/۰۵).

جدول شماره ۶ نشان میدهد، یک ارتباط منفی بین سن بیماران مبتلا به سرطان پستان و بیان miR-210 وجود دارد (P= ۰/۰۳۱، r = - ۰/۳۰۹). هم‌چنین آنالیز همبستگی نشان داد یک ارتباط مثبت معنی‌داری بین بیان mir-210 و بیان مارکر Ki-67 وجود دارد (P= ۰/۰۰۴، r = - ۰/۴۱۲).

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 = ۰/۸۳۵
تهاجم عروقی	P= ۰/۶۵۶
تهاجم اطراف عصبی	P= ۰/۹۷۱
تهاجم لنفی	P= ۰/۹۶۰
اندازه تومور	P= ۰/۱۰۹
درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری	P= ۰/۷۰۶
متاستاز دوردست در زمان تشخیص	P= ۰/۲۴۳
وضعیت PR	P= ۰/۳۶۵
وضعیت ER	P= ۰/۳۶۲
وضعیت HER-2/neu	P= ۰/۴۲۴
وضعیت P53	P= ۰/۴۶۲

جدول شماره ۶: نتایج آنالیز همبستگی بین خصوصیات پاتولوژیک و بالینی بیماران و بیان miR-210.

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 رگزایی 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 به طور 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 به طور قابل توجهی افزایش یافته بود که همسو با نتایج مطالعه ی 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

مجمـوع بـا توجـه بـه مـوارد پیشـگفت و مطالعـه حاضر می‌توان این‌گونـه نتیجه‌گیری کـرد کـه ارزیـابی miR-210، مـی‌توانـد بـه‌عنـوان یـک مـارکر احتمـالی تشخیصی در سرطان پستان استفاده شود.

سپاسگزاری

این پژوهش منتج از پایان نامه خانم فاطمه صـمدی دانشجوی پزشـکی بـوده و نویسـندگان از حمایـت‌هـای معاونـت تحقیقـات و فنـاوری دانشـگاه علـوم پزشـکی مازندران تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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≤35 years. PloS One 2014; 9(7): e101656.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 RiskmiRNA in Normal Breast as Breast Cancer Risk Biomarkers. Cancer Prev Res 2017; 10(1): 89-97.
11. AlJarallah M, Poorhasan N. MicroRNA-210 as a Biomarker in Breast Cancer. Pers M J 2020; 5(19): 10-12.
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.
13. Toyama, T Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, et al. High expression

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

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

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]