نفس، سال ۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۵ تا ۲۱

# بررسی تغییرات بیان miR-335 در افراد مبتلا به سرطان ریه (Non Small Cell Lung Cancer) و مقایسه با افراد سالم

المیرا یاری[۱]، عبدالرضا محمدنیا[۲*]، نغمه بهرامی[۳،۴*]، ایمان سلحشوری فر[۱]، حمیدرضا جماعتی[۲]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
۲) مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳) گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴) مرکز تحقیقات جراحی فک و صورت، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

**چکیده:**

NSCLC از شایع‌ترین علل مرگ‌های ناشی از سرطان در سراسر جهان است. با پیشرفت و تکامل تکنیک‌های مولکولی و ابزارهای بیوانفورماتیک، کشف بیومارکرهای مولکولی با قابلیت تشخیص در مراحل اولیه بیماری را فراهم می‌گردد. میکروRNAها در سرطان‌های انسانی دچار بی‌نظمی‌هایی می‌شوند که با توجه به ویژگی‌های miRNA، می‌توان آنها را کاندید ایده‌آل برای تشخیص سرطان معرفی کرد.

در این مطالعه یک جستجوی بیوانفورماتیک انجام شد، در نهایت miR-335 انتخاب گردید. نمونه‌های خون محیطی و بافت پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، جهت سنجش میزان تغییرات بیان miR-335 توسط تکنیک Real Time-PCR بر روی ۳۰ نمونه از افراد مبتلا به سرطان ریه (NSCLC) و ۳۰ نمونه از افراد سالم در نظر گرفته شدند. مقایسه آماری بیانگر تفاوت آماری معنی‌داری (P-value <۰/۰۰۱) بین افراد بیمار و سالم بود.آنالیز داده ها نیز توسط فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ صورت گرفت.

آنالیز نتایج Real Time-PCR در خون محیطی نشان داد که میزان بیان miR-335 در افراد بیمار ۱/۷ برابر نسبت به افراد سالم کمتر است. برای تأیید بیشتر مشاهدات و درک ما از نقش این miRNA و اهداف آن در سلول‌های سرطانی و دسترسی به روش‌های تشخیصی و درمانی، نیاز به مطالعات گسترده است.

**واژگان کلیدی:** سرطان سلولهای غیر کوچک ریه، miRNA، Real Time-PCR

* **نویسندگان مسئول:**

عبدالرضا محمدنیا، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیک: mohamadnia.ar@gmail.com

نغمه بهرامی، گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پست الکترونیک: naghmehbahrami@gmail.com

## مقدمه:

سرطان ریه دومین سرطان شایع در مردان و زنان است که می توان به طور کلی به دو شکل کارسینوم سلول کوچک و کارسینوم سلول غیر کوچک طبقه بندی کرد که تقریبا ۸۵٪ سرطان ریه مربوط به نوع NSCLC است [۱, ۲].

سرطان ریه اگرچه بسیار قابل پیشگیری است، اما معمولاً در یک مرحله غیر قابل درمان تشخیص داده می شود. شیمی درمانی به طور فزاینده ای در کنار جراحی و پرتودرمانی در مدیریت این بیماری نقش مهمی دارد.بزرگترین امید برای درمان سرطان ریه، زمانی است که بیماری در اوایل سیر بیماری خود تشخیص داده شود. با این حال، بسیاری از افراد مبتلا به سرطان ریه در مراحل پیشرفته و معمولاً غیر قابل درمان تشخیص داده می شوند [۳]. علی رغم تلاش های فراوان، میزان بقای کلی ۵ ساله سرطان ریه کمتر از ۱۶٪ است [۴].

شناخت مارکرهای زیستی، درمان های مولکولی هدفمند را امکان پذیر کرده اند و الگوی جدیدی از درمان شخصی سازی شده را ایجاد کرده و همچنین منجر به توسعه سریع داروهای جدید برای درمان سرطان ریه شده است . چالش امروزه در تشخیص سرطان در ایجاد یک ارتباط دقیق بین بیومارکر و علام بالینی بیماری و داشتن یک روش تشخیص غیر تهاجمی در مراحل اولیه بیماری است [۵].

تحقیقات بر روی بیومارکرها مبتنی بر miRNA ، به دلیل ماهیت غیرتهاجمی آزمایش های غربالگری مبتنی بر miRNA و حساسیت و ویژگی آنها در تشخیص سرطان ها ، شاهد رشد خارق العاده ای بوده اند.

MicroRNA ها یک خانواده فوق العاده از RNA های کوچک غیر رمزگذار مشتق از ژنوم هستند که بیان ژن پس از رونویسی سلول ها را کنترل می کنند. miRNA های عملکردی معمولاً در NSCLC دچار بی نظمی میشوند، که ناشی از حذف ژنومی، متیلاسیون یا تغییر پردازش است که ممکن است منجر به تغییر بسیاری از مسیرها و فرآیندهای مرتبط با سرطان شود. تجزیه و تحلیل نمونه های بالینی نشان می دهد که miRNA ها می توانند به عنوان مارکرهای زیستی مولکولی برای طبقه بندی سرطان ریه ، طبقه بندی پیش آگهی و پیش بینی پاسخ دارو استفاده شوند. [۱].

در تحقیق حاضر به بررسی miR-335 میپردازیم که در چندین نوع سرطان نقش ضد تومور را بازی می کند. بیان آن در بافتهای NSCLC نسبت به بافتهای مجاور غیر سرطانی کاهش یافته است، بنابراین miR-335 ممکن است به عنوان یک هدف درمانی جدید برای NSCLC باشد[۶].

## مواد و روش‌ها:

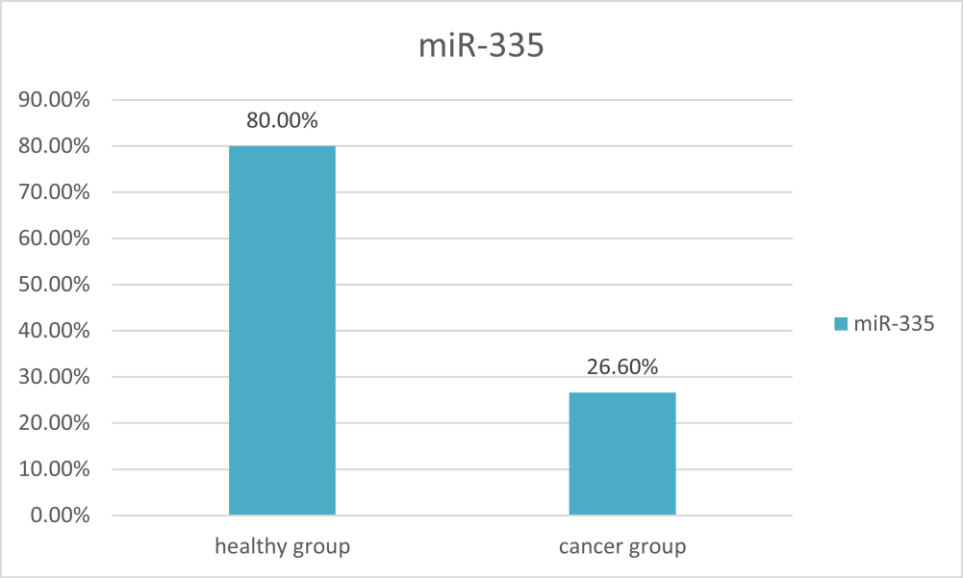
به منظور یافتن پروفایل های بیان miRNA مناسب در مجموعه داده های ریزآرایه ، ما یک جستجوی سیستماتیک در پایگاه داده Expression Omnibus (GEO) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) انجام دادیم[۷]. و در نهایت miR-335 انتخاب شد .

### انتخاب افراد بیمار و سالم:

ابتدا ۳۰ نفر از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری که براساس معاینات فیزیکی و تشخیص فرد متخصص، مبتلا به سرطان ریه (NSCLC) بودند، قبل از اینکه هرگونه درمانی روی آن‌ها انجام شود انتخاب شدند، همچنین افرادی که مبتلا به گونه بیماری‌های التهابی مزمن و یا حاد بودند، از این مطالعه خارج شدند. افرادی که به هر دلیلی یافته‌های پاتولوژیکی آن‌ها در دسترس نبود نیز از این مطالعه خارج شدند. ۳۰ نفر نیز از افراد سالم به عنوان گروه شاهد پس از معاینه توسط پزشک به‌طور داوطلبانه و با پر کردن فرم رضایت‌نامه در این مطالعه شرکت کردند.

### استخراج RNA ، سنتز cDNA و انجام Real-Time PCR :

مرحله استخراج RNA از سرم غیر منعقد با استفاده از RNeasy Midi Kit (qiagen Cat no.75144) انجام گرفت. ارزیابی غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجش شد. به منظور سنتز cDNA برای میکروRNA در این مطالعه از کیت ZIST ROYESH استفاده شد . روش Real-Time PCR برای بررسی بیان این مارکر استفاده شد . پس از پایان هر واکنش تفسیر نتایج بر اساس منحنی‌های Amplification و منحنی ذوب صورت گرفت.




**شکل ۱- درصد مثبت بودن miR-335 در خون محیطی بیماران و افراد سالم**

شرایط دمایی وزمانی به ترتیب: دناتوراسیون اولیه۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه ، دناتوراسیون۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه،اتصال پرایمرها ۵۶درجه به مدت ۶۰ثانیه و تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۲۵ ثانیه ( برای ۳۵ سیکل) و تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت۵ دقیقه بود.

اجزا و دماهای واکنش در مراحل set up مقدماتی تحقیق به گونه ای تنظیم گردید که بهینه ترین نتایج برای مارکرها حاصل شده وحتی الامکان از اشتباهاتی که تفسیر نتایج را با مشکل مواجه می کنند اجتناب شود. پس از تایید نتایج مثبت Ct value مربوط به مارکر یا ژن رفرانس مثبت شده ثبت شدند به منظور بررسی تفاوت میزان بیان ژن در دو گروه تحقیق از روشCt ΔΔکه روش معمول بررسی میزان تفاوت بیان ژن درReal-time RT-PCR می باشد استفاده شد. Ct value های مربوط به مارکر وژن رفرانس در هر نمونه از نتایج تست فوق استخراج و میزان تفاوت بیان مارکرمشخص گردید.

## یافته ها:

جمعیت مورد مطالعه را ۳۰ فرد سالم و ۳۰ فرد مبتلا به NSCLC تشکیل می‌دهند. این ۲ گروه از لحاظ متغییر زمینه‌های سن با هم مطابقت داشتند. گروه‌ها با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی مقایسه شدند و از نظر میانگین سنی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که فاکتور سن در گروه‌های مورد مطالعه اشکالی ایجاد نمی‌کند.

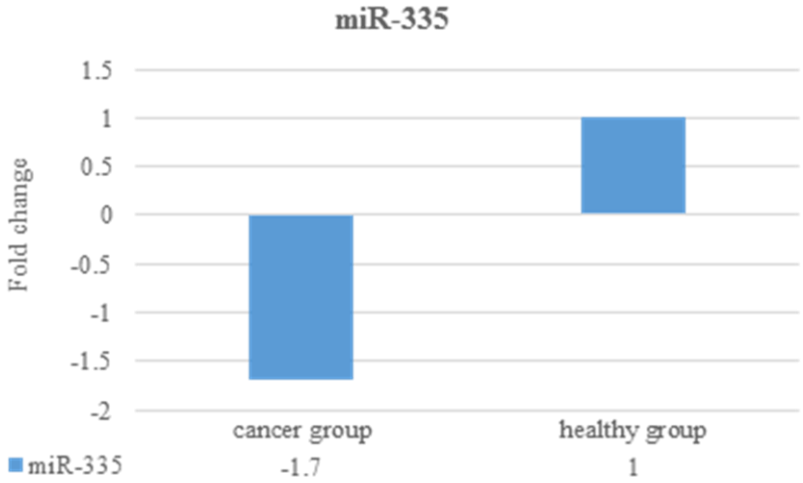
**نتایج ارزیابی بیان بیومارکرmiR-335 :**

واکنش Real-Time -PCR برای مارکرانجام شد . البته به این ترتیب، ۲ ویال cDNA ساخته شده از افراد بیمار و افراد سالم جهت بیان ژن مرجع و بیومارکر مورد بررسی، آزمایش شدند. تفسیر نتایج باتوجه به منحنی های ذوب صورت گرفت.

پس از جمع‌آوری نتایج واکنش Real Time PCR، افرادی که نتایج مثبتی برای بیان بیومارکر چه در گروه افراد سالم و چه در گروه افراد بیمار داشتند، مشخص شدند.

بیومارکر miR-335 درخون محیطی گروه افراد بیمار در ۸ نفر از ۳۰ نفر مثبت بود. میزان این بیومارکر در گروه افراد سالم ۲۴ نفر از ۳۰ نفر بود. مقایسه آماری میزان مثبت شدن این بیومارکر در گروه افراد بیمار و گروه افراد سالم با استفاده از آزمون Two-sample binomial صورت گرفت که بیانگر تفاوت آماری معنی-داری بین این دو گروه بود (P-value < 0.001).

جهت آنالیز نتیجه Real-time PCR از فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ در دو گروه بیمار و سالم استفاده گردید. پس از انجام محاسبات نشان داده شد که در خون محیطی میزان




**شکل۲- تفاوت بیان miR-335 در خون محیطی نمونه های سرطانی و نرمال**



بیان مارکر miR-335 در افراد بیمار ۱/۷ برابر کمتر از افراد سالم می باشد.

## بحث:

سرطان ریه کشنده ترین سرطان در میان مردان و زنان در جهان است. اکثر موارد سرطان ریه به عنوان سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) طبقه بندی می شوند[۱].

miRNAها در زمینه تحقیقات سرطان تحول ایجاد کرده اند. شواهد قوی از بی نظمی مداوم آنها در نئوپلاسم های انسانی از طریق مکانیزم های مرتبط با تغییرات ژنومی و فعال سازی آنکوژن نشان می دهد که آنها ممکن است به عنوان ژن های انکوژن یا سرکوب کننده تومور عمل کنند[۸].

در مجموع نتایج امیدوار کننده در این تحقیق نشان داد ، میزان بیان miR-335 در خون محیطی در افراد بیمار ۱/۷ برابر کمتر از افراد سالم می باشد .

اما ، نتایج متناقض نیز بین گروه های مختلف و سرطان های متفاوت گزارش شده است. که ممکن است به دلیل تفاوت در مرحله و درمان دریافت شده توسط بیماران و تجزیه و تحلیل های متفاوت نمونه ها باشد. بنابراین، روشهای جمع آوری نمونه و بهترین زمان نمونه گیری و تعداد کافی نمونه برای دستیابی به بهترین نتیجه لازم است.

همان طور که گفته شد در این مطالعه ، ما نشان دادیم که بیان miR-335 در خون محیطی ۱/۷ برابر کاهش می یابد. بنابراین می توان آن را در مراحل اولیه به عنوان نشانگرهای زیستی با پتانسیل تشخیص بالا در نظر گرفت. بعلاوه بی نظمی بیان miR-335 در سرطان های مختلف، مانند adrenal cortical carcinoma [۹]، bladder cancer [۱۰, ۱۱]، breast cancer [10-14]، cervical cancer [۱۵]، chondrosarcoma [۱۶]، gastric cancer [۱۷]، osteosarcoma [۱۸]، ovarian cancer [۱۹] کشف شده است که با کاهش بیان miR-335 در مطالعه ما مطابقت دارد ولی در موارد glioma [۲۰] ، astrocytoma[۲۱] افزایش بیان miR-335 مشاهده شده است که در تضاد با نتایج این مطالعه است. در این تحقیق، بررسی بیان میکروRNA با نتایج بدست آمده در این زمینه در بیماران مبتلا به انواع مختلف تومورها مطابقت داشت و همچنین مطالعات پیشین بر روی miR-335 در مورد سرطان NSCLC نتایج مشابهی را ارائه دادند.

ژیان لیو و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که بیان miR-335 در NSCLC نسبت به بافت های مجاور غیر سرطانی کاهش می یابد، و نشان داده شد که کاهش تنظیم بیان miR-335 در سلول های سرطانی ریه

A459 باعث تقویت تکثیر سلول می شود، که واسطه آن فعال شدن مسیر سیگنالینگ AKT/mTOR است و نشان می دهد که miR-335 ممکن است به عنوان یک هدف درمانی جدید برای NSCLC دارای پتانسیل باشد[۶].

در سال ۲۰۱۹ هم ونون دو و همکارانش نشان دادند که کاهش بیان miR-335-5p و افزایش بیان ROCK1 در بافت های NSCLC با متاستاز غدد لنفاوی همراه است. بیان بیش از حد miR-335-5p به طور قابل توجهی از طریق TGF-β1 ، مهاجرت و تهاجم NSCLC را مهار می کند[۲۲].

در مجموع miRNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی می توانند نتایج مطلوبی را برآورده کنند، بنابراین انجام مطالعات در این زمینه تحقیقاتی ارزشمند است. با وجود تکامل ابزارهای بیوانفورماتیک و تکنیک های مولکولی، پیش بینی می شود که با استفاده از miRNA ها به عنوان بیومارکر پیش بینی کننده NSCLC و سرطان های دیگر در مراحل اولیه بتوان استراتژی مناسب درمانی را هم انتخاب نمود. البته مطالعات تکمیلی در این زمینه باید انجام گردد .

## منابع:


1) Petrek H, Yu AM. MicroRNAs in non-small cell lung cancer: Gene regulation, impact on cancer cellular processes, and therapeutic potential. Pharmacol Res Perspect. 2019;7(6):e00528.
2) Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. Eur Respir J. 2016;48(3):889-902.
3) Cersosimo RJ. Lung cancer: a review. Am J Health Syst Pharm. 2002;59(7):611-642.
4) Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010;17(6):1471-1474.
5) Villalobos P, Wistuba, II. Lung Cancer Biomarkers. Hematol Oncol Clin North Am. 2017;31(1):13-29.
6) Liu J, Bian T, Feng J, et al. miR-335 inhibited cell proliferation of lung cancer cells by target Tra2beta. Cancer Sci. 2018;109(2):289-296.
7) Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D991-995.
8) Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce CM. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. J Cell Sci. 2007;120(Pt 11):1833-1840.
9) Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, et al. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. Clin Cancer Res. 2009;15.۷۶۹۲-۷۶۸۴:(۲۴)
10) Liu XK, Chen D, Li X. MiR-335 suppresses cell proliferation and migration by upregulating CRKL in bladder cancer. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23(6):2399-2408.
11) Wu D, Niu X, Pan H, et al. MicroRNA-335 is downregulated in bladder cancer and inhibits cell growth, migration and invasion via targeting ROCK1. Mol Med Rep. 2016;13(5):4379-4385.
12) Png KJ, Yoshida M, Zhang XH, et al. MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. Genes Dev. 2011;25(3):226-231.
13) Gao Y, Zeng F, Wu JY, et al. MiR-335 inhibits migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein c-Met. Tumour Biol. 2015;36(4):2875-2883.
14) Dong Y, Liu Y, Jiang A, et al. MicroRNA-335 suppresses the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells by targeting EphA4. Mol Cell Biochem. 2018;439(1-2):95-104.
15) Wang C, Jiang T. MicroRNA-335 represents an independent prognostic marker in cervical cancer. Tumour Biol. 2015;36.۵۸۳۰-۵۸۲۵:(۸)
16) Yoshitaka T, Kawai A, Miyaki S, et al. Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. J Orthop Res. 2013;31(12):1992-1998.
17) Zare A, Ahadi A, Larki P, et al. The clinical significance of miR-335, miR-124, miR-218 and miR-484 downregulation in gastric cancer. Mol Biol Rep. 2018;45(6):1587-1595.
18) Liu ZF, Liang ZQ, Li L, et al. MiR-335 functions as a tumor suppressor and regulates survivin expression in osteosarcoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(7):1251-1257.
19) Cao J, Cai J, Huang D, et al. miR-335 represents an invasion suppressor gene in ovarian cancer by targeting Bcl-w. Oncol Rep. 2013;30(2):701-706.
20) Jiang J, Sun X, Wang W, et al. Tumor microRNA-335 expression is associated with poor prognosis in human glioma. Med Oncol. 2012;29(5):3472-3477.

21) Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells. Mol Cancer. 2011;10:59.
22) Du W, Tang H, Lei Z, et al. miR-335-5p inhibits TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer via ROCK1. Respir Res. 2019;20(1):225.

*Nafas*, Vol. 8, No. 4, Winter 2022, Pages: 15-21 **Original Article**

# Evaluation of miR-335 Expression Changes in Patients with non-small cell Lung Cancer and Comparison with Healthy Individuals

**Elmira Yari[1], Abdolreza Mohamadnia[2*], Naghmeh Bahrami[3,4*], Iman Salhshouri Far[1], Hamidreza Jamaati[2]**

1) Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2) Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3) Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4) Craniomaxillofacial Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Abstract:**

Introduction & Objective: NSCLC is one of the most common causes of cancer deaths worldwide. With the development of molecular techniques and bioinformatics tools, the discovery of molecular biomarkers with the ability to detect in the early stages of the disease is provided. MicroRNAs cause abnormalities in human cancers that, given the properties of miRNAs, can be considered the ideal candidate for diagnosing cancer.

Materials and Methods: In this study, a bioinformatics search was performed, and finally miR-335 was selected. Peripheral blood and tissue samples after RNA extraction and cDNA synthesis were used to measure the expression changes of miR-335 by Real Time-PCR technique on 30 samples from lung cancer patients (NSCLC) and 30 samples from healthy individuals. Statistical comparison showed a statistically significant difference (P-value <0.001) between patient and healthy individuals. Data analysis was performed by formula -ΔΔct2.

Results: Analysis of Real Time-PCR results in peripheral blood showed that the expression of miR-335 in patients was 1.7 times lower than healthy individuals. Extensive studies are needed to further confirm our observations and understanding of the role of this miRNA and its targets in cancer cells and access to diagnostic and therapeutic methods.

**Keywords:** Non-small cell lung cancer, miRNA, Real Time-PCR

* **Corresponding Authors**:

Abdolreza Mohamadnia, Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: mohamadnia.ar@gmail.com

Naghmeh Bahrami. Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: naghmehbahrami@gmail.com