مطالعه همبستگی پلی‌مورفیسم rs11614913 ژن miRNA-196a2 با خطر ابتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه در جمعیت جنوب ایران

پروین پیشوا[۱]، محمد طهماسب[۱]*، عباس قادری[۲]

دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۱ / پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸

[۱] گروه سلولی و مولکولی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
[۲] گروه ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فارس، شیراز
*مسئول مکاتبات: tahmaseb@khu.ac.ir

چکیده. سرطان ریه پنجمین سرطان شایع در ایران، با نرخ شیوع ۹/۲-۴/۷ در هر ۱۰۰ هزار نفر است. باوجود شیوع کم، بقا آن نیز محدود است. استفاده از نشانگرهای بیولوژیکی می‌تواند با تشخیص زودهنگام سرطان میزان بقا بیماران را افزایش دهد. در این مطالعه، امکان استفاده از چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) با شناسه rs11614913 در miRNA-196a2 به عنوان نشانگر زیستی در تشخیص زودهنگام سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک (NSCLC) بررسی شد. برای این منظور ۹۵ فرد مبتلا به NSCLC و ۱۰۰ فرد سالم در جمعیت جنوب ایران بررسی شدند. DNA استخراج شده از خون محیطی یا پرایمرهای اختصاصی، تکثیر و مورد هضم آنزیمی TaaI قرار گرفت. در صورت حضور باز T در جایگاه پلی‌مورفیسم، دو باند به اندازهٔ‌های ۱۸۷bp و ۱۹۶bp و در صورت حضور باز C تنها یک باند ۳۸۳bp مشاهده شد. با بررسی الگوی الکتروفورزی هضم آنزیمی، فراوانی الل C در این جایگاه در گروه بیماران ۰/۶۹۵ و در گروه کنترل ۰/۷۶ برآورد شد. بااستفاده از فراوانی اللی، فراوانی ژنوتیپی در هر دو گروه بیمار و سالم محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری وجود تعادل هاردی-واینبرگ را در دو الل این ژن در جمعیت تحت مطالعه تأیید می‌کند. براساس نتایج به‌دست آمده، ارتباط معنی‌داری بین SNP rs11614913 و استعداد ابتلا به NSCLC در کل جمعیت وجود ندارد، اما بررسی جمعیت تحت مطالعه بر حسب جنسیت نشان داد افراد مذکر با ژنوتیپ CC در مقایسه با CT+TT، دارای استعداد بیشتری برای ابتلا به سرطان NSCLC هستند.

واژه‌های کلیدی. میکروRNA، سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه، پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی

Association between gene polymorphism rs11614913 in microRNA196a2, with Non-small cell lung cancer risk in the population of southern Iran

Parvin Pishva[1], Mohammad Tahmaseb[1*], Abbas Ghaderi[2]

Received: 01/09/2015 / Accepted: 08/03/2016

[1]Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Iran
[2] Institute for Cancer Research, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
*Corresponding author: tahmaseb@khu.ac.ir

Abstract. Lung cancer is the fifth most common cancer in Iran, with rates of 4.7 to 9.2 per 100 thousand populations. Despite the low incidence, survival is not promising. Using biological markers could lead to longer survival rate in patients due to early diagnosis. In this study, we evaluated the association of SNP rs11614913 in mir-196a2 with risk of non-small cell lung cancer (NSCLC) in population of southern Iran. SNP rs11614913 in miR-196a2 was assayed in 95 lung cancer patients and 100 controls. The extracted DNA from peripheral blood was amplified using specific primers followed by TaaI digestion. Based on the nucleotide base in this SNP (T or C) two different patterns were produced. In case of T, two bands (187bp and 196bp) and in case of C just one band (383bp) was generated. Analysis of electrophoretic pattern of digestion products revealed that the frequencies of C allele for SNP rs11614913 miR-196a2 were 0.695 in patients and 0.76 in controls. The statistical analysis indicates the presence of Hardy-Weinberg equilibrium between the two alleles in the population studied ($p>0.05$). Based on the results in this study, no significant association between SNP rs11614913 and susceptibility to NSCLC was found. However, male participants who possess TC/TT genotypes showed high risk for NSCLC compared to those possessed CC genotypes.

Keywords. micro RNA, non-small cell lung cancer, SNP

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]

مقدمه

سرطان ریه یکی از سرطان‌های شایع در سطح جهان است و همچنین اصلی‌ترین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در دنیا شمرده می‌شود. براساس بررسی‌های انجام‌شده، بیش از ۱/۴ میلیون مرگ در هر سال با این سرطان مرتبط است (Wood *et al.*, 2015). مطالعات نشان می‌دهد سرطان ریه پنجمین سرطان شایع در ایران، با شیوع ۹/۲-۴/۷ در هر ۱۰۰ هزار نفر از جمعیت است (Hosseini *et al.*, 2014). فراوانی سرطان ریه در ایران کمتر از اروپا و ایالت متحد امریکا است. در کشور ما، سرطان ریه در رتبهٔ ۷ یا ۸ در مردان و در زنان فراتر از رتبهٔ دهم قرار دارد درحالی‌که در مقیاس جهانی، این سرطان در مردان و زنان به ترتیب در رتبهٔ یکم و چهارم قرار دارد. بیماران مبتلا به سرطان ریه در ایران بقای کمی دارند که اصلی‌ترین علت آن تشخیص دیرهنگام آن است (Hajmanoochehri *et al.*, 2014). کشف نشانگرهای زیستی و کاربرد آنها درباب تشخیص سرطان، مراحل و پیش‌آگهی آن می‌تواند به افزایش سرعت تشخیص زودهنگام و بهبود کیفیت در درمان بیمار منجر شود (Hu *et al.*, 2008).

سرطان سلول غیرکوچک ریه (Lung Cell Non-Small Cancer, NSCLC) مانند هر سرطان دیگر به‌واسطهٔ عملکرد معیوب و غیرمعمول برخی ژن‌ها (عمدتاً پروتوانکوژن‌ها و ژن-های سرکوب کنندهٔ تومور) ایجاد می‌شود. عملکرد غیرمعمول این ژن‌ها می‌تواند به‌علت وقوع جهش در آنها رخ دهد، اما یک احتمال دیگر، تأثیر عوامل دیگر بر آنها و تخریب فعالیت طبیعی آنها است. مولکول‌های miRNA یکی از این عوامل هستند که می‌توانند با برهم‌کنش با miRNA ژن‌های پروتوانکوژن یا سرکوب‌کنندهٔ تومور فعالیت‌های آنان را تغییر دهند و بدین-وسیله در ایجاد سرطان نقش ایفا کنند. مولکول‌های miRNA خود باید دچار تغییر شود تا موجب تغییر در عملکرد بیان پروتوانکوژن‌ها یا ژن‌های سرکوب‌کنندهٔ تومور شوند.

یکی از عواملی که می‌تواند بر عملکرد miRNA تأثیر بگذارد، پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (single nucleotide polymorphism, SNP) است. تحقیقات بسیاری برای فهم تأثیر SNP بر عملکرد miRNA (ازجمله تأثیر آن بر استعداد به ابتلا به سرطان و دیگر بیماری‌ها) انجام شده است. شناسایی SNPها و تعیین همبستگی آنها با بیماری‌هایی نظیر سرطان می‌تواند خطر ابتلا افراد به بیماری‌های مختلف در یک جمعیت را مشخص کند.

miRNA، RNA کوچک غیرکدکننده به طول حدود ۲۰-۱۸ نوکلئوتید است که فرآیند بیان ژن را ازطریق اتصال به ۳′UTR (به طور عمده)، ۵′UTR یا در برخی موارد به ناحیهٔ کدکنندهٔ mRNA هدف، تنظیم می‌کنند و سبب جلوگیری از ترجمه یا کاهش آن می‌شوند (Filipowicz *et al.*, 2008). علاوه‌براین می‌توانند در ژن‌هایی که واسطهٔ تنظیم ژن‌های miRNA هستند، مؤثر باشند. miRNA در فرایندهای بیولوژیک متنوع ازجمله فرآیند پردازش (Lee *et al.*, 1993)، سوخت‌وساز بدن (Bartel, 2004)، تکثیر (Ambros, 2005) و آپوپتوز (Ambros, 2004) دخالت دارد. به‌دلیل کشف بیان غیرطبیعی miRNA در سرطان‌ها، مطالعات بسیاری در زمینهٔ نقش miRNA در رشد تومورها و سرطان‌زایی به‌واسطهٔ فعال-کردن انکوژن‌ها و تخریب ژن‌های سرکوب‌گر تومور انجام شده است (Lujambio *et al.*, 2012).

ژن miRNA-196a2 (که آن را mir-196a2 نیز می‌نامند) طولی برابر با ۱۱۰bp دارد و برروی کروموزوم ۱۲ (12q12.13) در ناحیهٔ مجموعهٔ ژنی HOXC (بین دو ژن HoxC10 و HoxC-S2) قرار دارد (Chen *et al.*, 2011). نوعی SNP با مشخصهٔ rs11614913 در جایگاه ۷۸ این ژن کشف شده است که در آن به‌طور معمول باز C قرار دارد، ولی در برخی افراد باز T جایگزین آن شده است. اخیراً مطالعات فراوانی در باب همراهی این SNP با انواع سرطان‌ها انجام شده است. برای مثال، مشخص شده است ژنوتیپ CC (نسبت به دو ژنوتیپ TT و TC) با افزایش خطر ابتلا به سرطان‌های حنجره (Christensen *et al.*, 2010) و کلورکتال (Min *et al.*, 2011) همراه است. در ایران نیز بررسی احتمال همراهی این SNP با برخی سرطان‌ها ازجمله سرطان کلورکتال از مدتی پیش آغاز شده است. به‌علت اهمیت سرطان ریه، هدف این تحقیق بررسی احتمالی همراهی این SNP با خطر ابتلا به سرطان ریه در جامعهٔ ایرانی است.

مواد و روش‌ها

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه موردی- شاهدی ۹۵ بیمار مبتلا (۱۸ زن و ۷۷ مرد) به سرطان ریه از بیماران مراجعه‌کننده به بخش برونکوسکوپی درمانگاه فوق‌تخصصی شهیدفقیهی شیراز و ۱۰۰ نمونهٔ کنترل (۲۰ زن و ۸۰ مرد) از افراد مراجعه کننده به بخش برونکوسکوپی درمانگاه فوق‌تخصصی شهیدفقیهی شیراز بدون هرگونه سابقهٔ ابتلا به سرطان در خود فرد و بستگان درجه‌اول او از مراجعان سازمان انتقال خون شیراز و با اخذ رضایت‌نامهٔ کتبی آگاهانه تحت بررسی قرار گرفتند. هر دو گروه ازنظر سنی، جنسی و جغرافیایی در دامنهٔ تقریباً یکسانی قرار داشتند.

استخراج DNA ژنومی

در این مطالعه استخراج DNA به روش خارج‌سازی نمکی (Miller *et al*., 1988) با استفاده از آنزیم لیزکننده پروتئیناز K انجام شد. کیفیت DNA استخراج‌شده به‌وسیلهٔ الکتروفورز و کمیت آن به‌روش نورسنجی تحت بررسی قرار گرفت.

تکثیر ژن mir-196a

ژن mir-196a2 از روی مطالعات قبلی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (Mirtalebi *et al*., 2014) با توالی F: 5′: GTCTACTCTCTAGTCCTTAGG و R: 5′: TTGAGAGGACGGCATAAAGC تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱۲/۵میکرولیتر Master Mix شرکت Amplicon و یک میکرومولار از هر دو پرایمر و صد نانوگرم DNA استخراج شده ژنومی انجام شد. پرایمرها به‌گونه‌ای طراحی شده‌اند که پرایمر F به ۱۲۰ باز در بالادست و پرایمر R به ۱۵۰ باز در پایین‌دست ژن متصل می‌شود و بدین‌ترتیب یک محصول PCR، یک قطعهٔ ۳۸۳ جفت بازی خواهد شد. در این صورت، موقعیت SNP در جایگاه ۱۹۸ از انتهای پرایمر F قرار خواهد گرفت (شکل ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پروفایل دمایی به‌ترتیب زیر انجام شد: واسرشت اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه واسرشتی به‌مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اتصال پرایمر به DNA به‌مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۶۳/۸ درجهٔ سانتی‌گراد و طویل‌شدن به‌مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد.

در آخرین مرحله، طویل‌شدن نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. برای اطمینان از حضور و کیفیت باند تکثیرشده محصول نهایی بر ژل اگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و سپس با Green Viewer رنگ آمیزی شد.

تعیین ژنوتیپ mir-196a2

برای تعیین ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مورفیسم rs11614913 از روش RFLP استفاده شد. محصول PCR تحت اثر آنزیم محدودکنندهٔ TaaI (شرکت فرمنتاز) قرار گرفت. برای واکنش هضم آنزیمی، محلولی حاوی ۱۰میکرولیتر محصول PCR همراه با ۲ ماکرولیتر بافر تانگو 10X، ۲ واحد آنزیم TaaI و ۶ میکرو لیتر از ddH_2O تهیه و در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت انکوبه شد. محصول هضم‌شده برای تعیین ژنوتیپ بر ژل اگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

نتایج

توزیع نمونه‌ها

در این مطالعه ۹۵ بیمار مبتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه (NSCLC) (۷۷ مرد و ۱۸ زن) با میانگین سنی ۱۲/۱۳ ±۶۳/۹۵ و ۱۰۰ نفر شاهد نرمال (۸۰ مرد و ۲۰ زن) با میانگین سنی ۱۲/۱۵ ±۵۹/۷ سال بررسی شدند (جدول ۱).

تخلیص DNA و تکثیر ژن miR-196a2

مقدار جذب DNA تخلیص‌شده در دو طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نسبت A260/A280 برای اکثر نمونه‌ها ما بین ۱/۶۲و ۲/۲ قرار داشت و الکتروفورز نمونه‌ها که صورت گرفت، نیز مؤید حفظ تمامیت DNA ژنوم بود. محصول PCR نیز با اندازهٔ به‌دست‌آمده از مطالعات بیوانفورماتیکی (۳۸۳bp) مطابقت داشت (شکل ۲a).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]

```
OLIGO            start  len   tm     gc%    seq
LEFT PRIMER        1    21   53.11   47.62  GTCTACTCTCTAGTCCTTAGG
RIGHT PRIMER     383    20   57.98   50.00  TTGAGAGGACGGCATAAAGC

PRODUCT SIZE: 383

  1 GTCTACTCTCTAGTCCTTAGGGAGGTTGTGGGGGCGGAAAGGGGGACGGGGCTGAATTTC
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 TTCCTTCCCCAACCCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATAGATGCAAAGCTGAATCTCCCGCCC

121 TGCTCGCTCAGCTGATCTGTGGCTTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGGATTGAGTTTTGAAC

181 TCGGCAACAAGAAACT^GTCTGAGTTACATCAGTCGGTTTTCGTCGAGGGCCCCAACCCAC

241 CTCTCCCACTCCTACCCTCCCCAGTGGGACTGCCCCACTGCCCCCTCCCAGATAGGGCAA

301 AGTGGGTGCAGACCAAGGAGGACAAGCTGTGAGTGGGGTTGCAGAACAAGTCTGGAGAAC

361 CCTGCTTTATGCCGTCCTCTCAA
        <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

شکل ۱- موقعیت پرایمرهای F و R بر ژن (has-miR-196a2 (gene ID: 406973 برای بررسی SNP rs11614913 . زیر بازهای ژن miR196a2 (به طول ۱۱۰bp) خط کشیده شده است. پرایمرها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که ۱۲۰bp بالا دست و ۱۵۰bp پایین دست ژن (مجموعا ۳۸۳bp) را نیز تکثیر می‌کنند. باز پلی‌مورف (باز T) در موقعیت ۱۹۸ از ابتدای محصول PCR به صورت پررنگ نشان داده شده است. توالی شناسایی آنزیم TaaI (CAN^G**T**) با یک خط پررنگ زیر آن مشخص شده است. در صورت حضور باز T در این جایگاه، هضم محصول PCR با آنزیم TaaI سبب تولید دو قطعهٔ ۱۹۶bp و ۱۸۷bp می‌شود در صورتی که حضور الل C در این جایگاه، برشی ایجاد نخواهد شد و قطعهٔ ۳۸۳bp باقی خواهد ماند.

Fig. 1. The position of F and R primers on miR196a2.The sequences of the gene (110bp long) is underlined. The primers were designed for 120bp upstream and 150bp downstream of the gene. Therefore the PCR product is 383bp long. The polymorphic base (T, which is bold in the figure) is on the position of 198 from 5' end of PCR product. The restriction site for TaaI (CAN^G**T**) is underlined (with thick line).In case of presence of T base, the digestion of PCR products are 196 and 187 base pairs. Otherwise, there was no digestion and the fragment of 383bp remains.

فراوانی ژنوتیپی و اللی

با توجه به نتایج آماری به‌دست‌آمده هیچ‌یک از سه ژنوتیپ TT، TC و CC در هیچیک از الگوهای سه‌گانهٔ (هم‌بارزی، غالبیت و مغلوبیت) تأثیری بر خطر سرطان NSCLC نداشت (جدول ۲). در ضمن اگر چه فراوانی آللی این SNP در افراد دو نمونهٔ بیمار و شاهد تفاوتی با یکدیگر نداشت، در گروه مردان فراوانی اللی در دو نمونهٔ بیمار و شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بود (p=0.02, OR, 1.78; 95% CI, 1.08 to 2.93.) (جدول ۲).

بررسی الگوی الکتروفورزی هضم آنزیمی نمونه‌های PCR شده در افراد بیمار برای ژنوتیپ‌های TT، CT و CC به‌ترتیب فراوانی ۷/۴ درصد، ۴۶/۳ درصد و ۴۶/۳ درصد برآورد شد. فراوانی ژنوتیپ‌های سه‌گانهٔ فوق در افراد شاهد به ترتیب برابر با ۶ درصد، ۳۶ درصد و ۵۸ درصد بود.

با توجه به فراوانی‌های ژنوتیپی فوق، فراوانی دو آلل T و C در نمونهٔ بیمار به‌ترتیب برابر با ۰/۳۰۵ و ۰/۶۹۵ و در نمونه‌های شاهد به‌ترتیب برابر با ۰/۲۴ و ۰/۷۶ برآورد شد (جدول ۲).

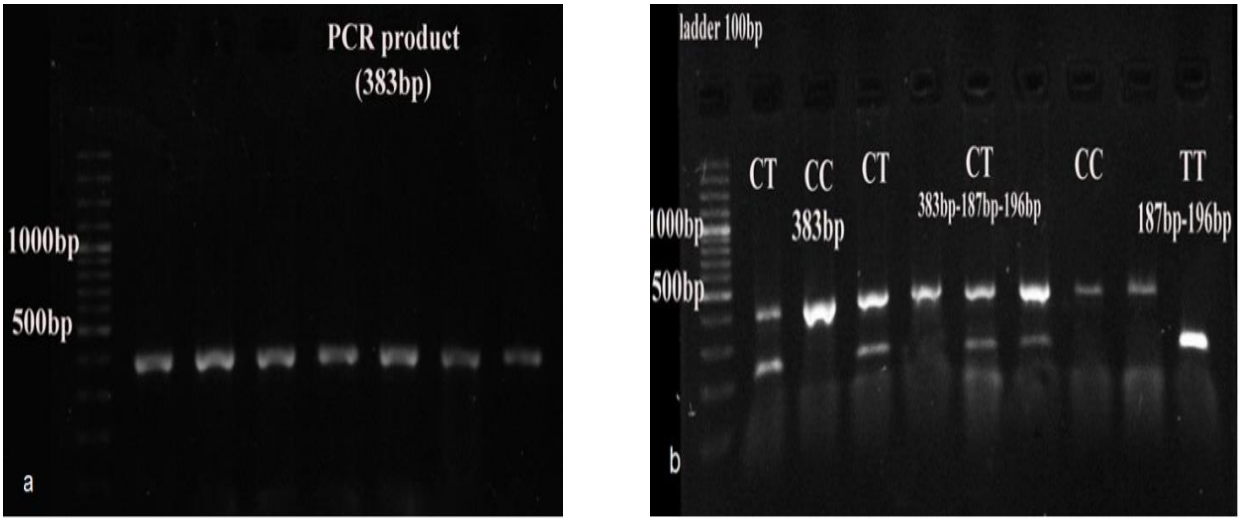
فراوانی‌های مشاهده‌شده برای دو الل این SNP وجود تعادل هاردی-واینبرگ را در دو گروه بیمار و شاهد نشان داد ($p>0.05$).

جدول ۱- توزیع برخی از متغیرها بین دو گروه مبتلایان به سرطان NSCLC و افراد کنترل.

Table 1. Distribution of selected variables between non-small cell lung cancer patient and control subjects.

Variables	n(%) Patients n=95	n(%) Control n=100
Age(y)(mean±SD)	63.95±12.13	59.7±12.15
Age(y)		
≥60	60(63)	57(57)
<60	35(37)	43(43)
Gender		
Male	77(81)	80(80)
Female	18(19)	20(20)

SD: standard deviation. *p*-value was revealed by two-sides Chi-square test



شکل ۲- بررسی محصول PCR و محصول هضم‌شده بر ژل آگاروز a) اکتروفورز محصول PCR: اندازهٔ قطعهٔ تکثیرشده برابر با ۳۸۳ جفت باز است. b) الکتروفورز محصول هضم‌شده با آنزیم TaaI. آنزیم سبب شکست محصول PCR به دو قطعهٔ ۱۹۶bp و ۱۸۷bp می‌شود. افراد با ژنوتیپ‌های هموزیگوت CC و TT و هتروزیگوت CT در عکس مشخص شده‌اند.

Fig. 2. Examine of the PCR products and the digestion products on the agarose gel. a) PCR products electrophoresis: the products are 383 base pare long. b) Digestion products electrophoresis: digestion of PCR products with TaaI could produce 196bp and 187bp fragment (in TT individuals), 383bp, 196bp, 187bp (in CT individuals) and 387bp (in CC individuals).

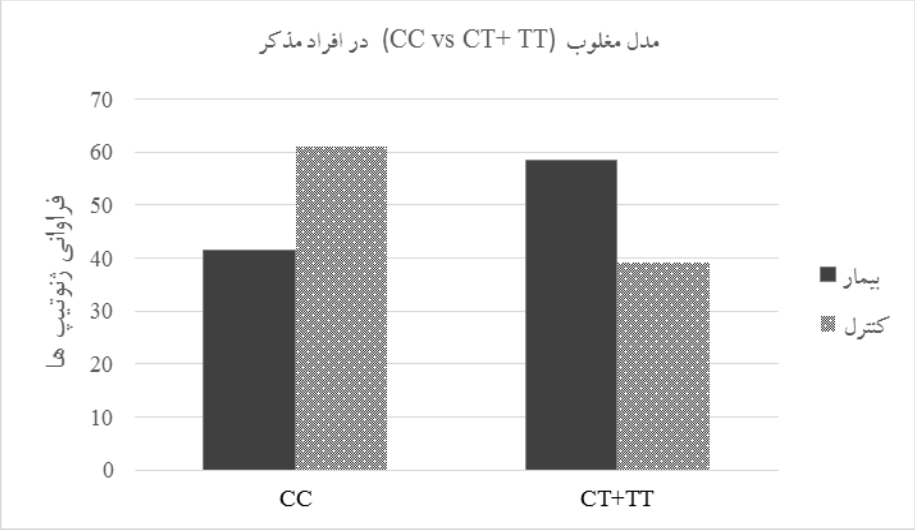
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]

جدول ۲- فراوانی اللی و ژنوتیپی ژن miR196-a2 بین بیماران مبتلا به سرطان NSCLC و افراد کنترل و همراهی آن با خطر ابتلا به سرطان NSCLC. مواردی که از نظری آماری معنی‌دار هستند به صورت پررنگ (Bold) نوشته شده‌اند.

Table 2. miR-196a allelic and genotype frequencies between non-small cell lung cancer patient and control subjects and their association with non-small cell lung cancer risks.

Variables	n (%)				*P-value*
	Genotypes	Patient(n=95)	Control(n=100)	OR(95%CI)	
Total					
	T allele	58(30.5)	48(24)	1	
	C allele	132(69.5)	152(76)	1.40(0.89-2.18)	0.18
	TT	7(7.4)	6(6)	1	0.26
	TC	44(46.3)	36(36)	0.95(0.29-3.09)	
	CC	44(46.3)	58(58)	1.54(0.48-4.90)	
	TTvsTC/CC	88(92.6)	94(94)	1.31(0.77-2.21)	0.92
	CCvsTC/TT	51(53.7)	42(42)	0.62(0.35-1.10)	0.14
Age(y)					
>60	T allele	33(28.9)	26(23)	1	
	C allele	81(71.1)	76(67)	1.19(0.65-2.17)	0.68
	TT	4(7)	5(9.8)	1	0.40
	TC	25(43.9)	16(31.4)	0.51(0.12-2.20)	
	CC	28(49.1)	30(58.8)	0.86(0.21-3.52)	
	TTvsTC/CC	53(93)	46(90)	0.69(0.17-2.74)	0.86
	CCvsTC/TT	29(50.9)	21(41)	0.67(0.31-1.45)	0.41
<60	T allele	25(32.9)	22(22.5)	1	
	C allele	51(67.1)	76(77.5)	1.69(0.86-3.32)	0.17
	TT	3(7.9)	1(2)	1	0.22
	TC	19(50)	20(41)	3.16(0.3-33.0)	
	CC	16(42.1)	28(57)	5.25(0.5-54.78)	
	TTvsTC/CC	35(92.1)	48(98)	4.11(0.41-41.2)	0.44
	CCvsTC/TT	22(57.9)	21(43)	0.54(0.23-1.28)	024
Sex					
Male	T allele	52(33.8)	35(23)	1	
	C allele	102(66.2)	119(77)	1.73(1.05-2.87)	**0.04**
	TT	7(9.1)	5(6.5)	1	**0.05**
	TC	38(49.4)	25(32.5)	0.92(0.26-3.23)	
	CC	32(41.5)	47(61)	2.06(0.6-7.05)	
	TTvsTC/CC	70(90.9)	72(93.5)	1.44(0.44-4.75)	0.76
	CCvsTC/TT	45(58.4)	30(39)	0.45(0.24-0.86)	**0.02**
Female	T allele	6(16.7)	13(36)	1	
	C allele	30(83.3)	23(64)	0.35(0.12-1.07)	0.11
	TT	0	1(4)	1	0.38
	TC	6(33.3)	11(48)	0.6(0.02-16.68)	
	CC	12(66.7)	11(48)	0.31(0.01-8.31)	
	TTvsTC/CC	18(100)	22(96)	0.41(0.02-10.55)	0.89
	CCvsTC/TT	6(33.3)	12(52)	2.1(0.61-7.82)	0.37

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]



شکل ۳- نمودار فراوانی مدل مغلوب (CC vs CT+TT) در افراد مذکر دو گروه بیمار و شاهد. بررسی آماری نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین مردان بیمار و شاهد در توزیع ژنوتیپ‌های CC و (CT+TT) است (p=0.01).

Fig. 3. Comparison of the recessive model (CC vs CT+TT) among male subjects in patients and controls. Statistic analysis showed that there was significant difference in CC and CT+TT genotype distribution in males in two groups (p=0.2)

بررسی آماری رگرسیون لجستیک دربارهٔ داده‌های تفکیک‌شده برحسب سن و جنس نشان داد که مردان در مدل مغلوبیت که در آن ژنوتیپ CC نسبت به ژنوتیپ‌های CT و TT (CC vs TT/CT) سنجیده می‌شوند، دارای کاهش خطر ابتلا به سرطان بودند(p=0. 01, OR, 0.42; 95% CI, 0.22 to 0.81) (جدول ۲ و شکل ۳).

بحث

در سال‌های اخیر، سرطان به‌عنوان سومین عامل مرگ‌ومیر در ایران پس‌از بیماری‌های قلبی و عروقی و تصادف شناخته شده است. سرطان ریه یکی از پنج تومور پیشرونده در ایران است و به‌طور پیوسته میزان آن در مردان و زنان، مشابه جنوب و شرق اروپا درحال افزایش است (Hosseini *et al*., 2014). miRNA، RNAهای کوچک غیرکدکننده درون‌زنی، ریبونوکلئیک اسید تک‌رشته (RNAs) هستند که بیان ژن را تنظیم می‌کنند و در بسیاری از مسیرهای مهم ازجمله مسیرهای رشد و نمو و نیز سرطانی‌شدن دخیل هستند. آنها ویژه‌بافتی (Tissue-specific) هستند و مشخص شده است که بیان آنها در سرطانها دچار بی‌نظمی می‌شود (Lin *et al*., 2011). شواهد نشان می‌دهد در سرطان‌های انسانی ازجمله سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه، بیان برخی miRNA دچار تغییر می‌شود و ممکن است همچون انکوژن یا ژن‌های سرکوبگر تومور عمل کنند (Lin *et al*., 2010). یکی از عواملی که می‌تواند بر عملکرد miRNA تأثیر بگذارد پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (polymorphism, SNP single nucleotide) است. تحقیقات بسیاری برای فهم نقش SNP در پیش‌ساز miRNA و تأثیر آن بر بیان یا عملکرد آن (ازجمله تأثیر آن بر استعداد ابتلا به سرطان و دیگر بیماری‌ها) انجام شده است. شناسایی SNP و تعیین همبستگی آنها با بیماری‌هایی نظیر سرطان می‌تواند درک بهتری از میزان خطر افراد در یک جمعیت را به محققان به‌دست می‌دهد. بسیاری از مطالعات نشان داده است که has-mir-196a2 , rs11614913به‌طور درخور توجهی با استعداد ابتلا به بیماری‌های مختلف ازجمله سرطان ریه (Tian *et al*., 2009)، سرطان سینه (Hu *et al*., 2009)، سرطان معده (Peng *et al*., 2010)، سرطان کبد (Qi *et al*., 2010)، سرطان کیسهٔ صفرا (Srivastava *et al*., 2010)، سرطان پروستات (George *et al*., 2011)، و سرطان مری (Wang *et al*., 2010) در ارتباط است. برای مثال، ضمن مطالعه‌ای که در جمعیت چین انجام شده است، مشخص شد که ژنوتیپ CC در مدل مغلوبیت (CC vs CT/TT) سبب کاهش خطر ابتلا به سرطان می‌شود (p=0.038, OR, 1.25; 95% CI, 1.01 to 1.54) (Peng *et al*., 2010). همچنین مشاهدات هانگ و

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]

همکارانش نشان داد که ژنوتیپ CT/CC درمعرض خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه در مقایسه با TT (TC/CC vs TT) هستند (p<0.05, OR, 1.42; 95% CI, 1.03 to 1.94). گروه‌بندی نمونه‌ها براساس جنس، سن، وضعیت مصرف سیگار و سابقهٔ خانوادگی نیز چنین ارتباطی را نشان داد (Hong *et al*., 2011). در این تحقیق، نتایج آماری مبین آن بود که صرفاً در گروه مردان برخی اختلافات معنی‌دار قابل مشاهده است. برای مثال، فراوانی آللی C و T در دو گروه مردان بیمار و شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<0.05, OR, 1.78; 95% CI, 1.08 to 2.93). بااین‌حال، SNP به دست آمده در برخی جوامع ارتباط معنی‌داری با برخی سرطان‌ها نشان نداده است (Eslami Samarin *et al*., 2015). همچنین مدل هم‌بارزی و مغلوبیت نیز دارای تفاوت درخورتوجهی بود (جدول ۳). به‌نظر می‌رسد مردانی‌که دارای ژنوتیپ TC یا TT هستند استعداد بیشتری برای ابتلا به سرطان در مقایسه با افراد با ژنوتیپ CC دارند (p<0.05, OR, 1.42; 95% CI, 1.03 to 1.94). هو و همکارانش پیشنهاد کردند که پلی‌مورفیسم rs11614913 می‌تواند به عنوان نشانگر تشخیصی برای سرطان ریه در نظر گرفته شود (Hu *et al*., 2008)؛ البته در برخی جمعیت‌ها چنین ارتباطی یافت نشده است. برای مثال وینسی و همکارانش موفق به پیداکردن ارتباط معناداری بین ژنوتیپ‌های rs11614913 و خطر ابتلا به سرطان ریه نشدند (Vinci *et al*., 2011). برای استفاده از SNP به‌منزلهٔ یک بیومارکر در پیش‌آگهی سرطان، SNP تحت مطالعه باید همبستگی قابل ملاحظه‌ای با سرطان وجود داشته باشد. هر چه میزان همبستگی بالاتر باشد، تأثیر SNP در ایجاد سرطان افزایش می‌یابد. به‌همین‌علت است که مطالعهٔ همبستگی SNP با سرطان‌ها امروزه از اهمیت زیادی برخوردار است.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شیراز و دانشکدهٔ علوم زیستی دانشگاه خوارزمی صورت گرفته است. از کمک‌های صمیمانهٔ آقای مهیار ملک‌زاده از همکاران مرکز تحقیقات سرطان شیراز در تأمین نمونه‌های این پروژه تشکر می‌گردد

References

Ambros, V. 2003. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. – Cell 113(2): 673-676.

Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. – Nature 16(431): 350-355.

Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. – Cell 116(2): 281-297.

Chen, C., Zhang, Y., Zhang, L., Weakley, S.M. and Yao, Q. 2011. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. – J. Cell. Mol. Med. 15(1): 14-23.

Christensen, B.C., Avissar-Whiting, M., Ouellet, L.G., Butler R.A., Nelson, H.H., McClean, M.D., Marsit, C.J. and Kelsey, K.T. 2010. Mature microRNA sequence polymorphism in MIR196A2 is associated with risk and prognosis of head and neck cancer. – Clin. Cancer Res. 16(14): 3713-3720.

Eslami Samarin, Z., Tahmaseb, M. and Ghaderi, A. 2015. Evaluation of single nucleotide polymorphism rs11614913 in mir196a2 with breast cancer susceptibility in Southern Iranian population. – Nova Biol. Rep. 2(3): 227-234.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? – Nat. Rev. Genet. 9(2): 102-114.

George, G.P., Gangwar, R., Mandal, R.K., Sankhwar, S.N. and Mittal, R.D. 2011. Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. – Mol. Biol. Rep. 38: 1609-1615.

Hajmanoochehri, F., Mohammadi, N., Zohal, M.A, Sodagar, A. and Ebtehaj, M. 2014. Epidemiological and clinicopathological characteristics of lung cancer in a teaching hospital in Iran. – Asian. Pac. J. Cancer Prev. 15(6): 2495-24500.

Hong, Y.S., Kang, H.J., Kwak, J.Y., Park, B.L., You, C.H., Kim, Y.M. and Kim, H. 2011. Association between microRNA196a2 rs11614913 genotypes and the risk of non-small cell lung cancer

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]

in Korean population. – J. Prev. Med. Public. Health 44(3): 125-130.

Hosseini, M., Naghan, P.A., Jafari, A.M., Yousefifard, M., Taslimi, S., Khodadad, K., Mohammadi, F., Sadr, M., Rezaei, M., Mortaz, E. and Masjedi, M.R. 2014. Nutrition and lung cancer: a case control study in Iran. – BMC. Cancer 14: 2-9.

Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., Zeng, Y., Miao, R., Jin, G., Ma, H., Chen, Y. and Shen, H. 2008. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. – J. Clin. Invest. 118(7): 2600-2608.

Hu, Z., Liang J., Wang, Z., Tian, T. and Zhou, X. 2009. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. – Hum. Mut. 30: 79-84.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. – Cell 75(5): 843-854.

Lin, P.Y. and Yang, P.C. Circulating miRNA signature for early diagnosis of lung cancer. – EMBO. Mol. Med. 3(8): 436-437.

Lujambio, A. and Lowe, S.W. 2012. The microcosmos of cancer. – Nature 482:347-355.

Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. – Nucleic Acid Res. 16(3): 1215-1216.

Min, K.T., Kim, J.W., Jeon, Y.J., Jang, M.J., Chong, S.Y., Oh, D. and Kim, N.K. 2012. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. – Mol. Carcinog. 51: 65-73.

Mirtalebi, H., Heydari Nasrabadi, M. and Asadzadeh-Aghdaei, H. 2014. Association of miR-196a2 (rs11614t913) polymorphism with colorectal cancer in Tehran population. – Med. Sci. J. Islamic Azad Uni. 23: 11-15.

Peng, S., Kuang, Z., Sheng, C., Zhang, Y. and Xu, H. 2010. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. – Dig. Dis. Sci. 55: 2288-2293.

Lin, P.Y., Yu, S.L. and Yang, P.C. 2010. MicroRNA in lung cancer. – British J. Cancer 103: 1144-1148.

Qi, P., Dou, T.H., Geng, L., Zhou, F.G. and Gu, X. 2010. Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. – Hum. Immunol. 71: 621-626.

Srivastava, K., Srivastava, A. and Mittal, B. 2010. Common genetic variants in premicroRNAs and risk of gallbladder cancer in North Indian population. – J. Hum. Genet. 55: 495-499.

Tian, T., Shu, Y., Chen, J., Hu, Z. and Xu, L. 2009. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. – Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 18: 1183-1187.

Vinci, S., Gelmini, S., Pratesi, N., Conti, S., Malentacchi, F., Simi, L., Pazzagli, M., Orlando, C. 2011. Genetic variants in miR-146a, miR-149, miR-196a2, miR-499 and their influence on relative expression in lung cancers. – Clin. Chem. Lab. Med. 49(12): 2073-2080.

Wang, K., Guo, H., Hu, H., Xiong, G. and Guan, X. 2010. A functional variation in pre-microRNA-196a is associated with susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma risk in Chinese Han. – Biomarkers 15: 614-618.

Wood, S.L., Pernemalm, M., Crosbie, P.A. and Whetton, A.D. 2015. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. – Cancer. Treat. Rev. 41(4): 361-75.

*****

Pishva, P., Tahmaseb, M. and Ghaderi, A. 2016. Association between gene polymorphism rs11614913 in microRNA196a2, with Non-small cell lung cancer risk in the population of southern Iran. – Nova Biol. Rep. 3: 15-23.

پیشوا، پ.، طهماسب، م. و قادری، ع. ۱۳۹۵. مطالعه همبستگی پلی‌مورفیسم rs11614913 ژن miRNA-196a2 با خطر ابتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه در جمعیت جنوب ایران. – یافته های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۳-۱۵.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.2.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.15]