مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا | سال هفتم | شماره ۳ | پاییز ۱۳۹۶

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs1951032 در بالادست ژن miR-487a با بروز سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی

رضا هاشمی، مریم پیمانی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: miRNAها گروهی از RNAهای غیرکدکننده‌ی درگیر در تنظیم ژن‌های هدف از طریق واکنش مستقیم با mRNAها می‌باشند؛ بنابراین هرگونه تنوعی در ژن‌های کدکننده miRNAها می‌تواند در تغییر عملکرد آن‌ها مؤثر باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs1951032 در بالادست ژن miR-487a با بروز سرطان سینه در جمعیت ایرانی است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۱۴۰ نمونه شامل ۷۰ خانم مبتلا به سرطان سینه و ۷۰ خانم سالم صورت گرفت که ازلحاظ سن همسانه سازی شده بودند. DNA از خون محیطی استخراج گردید و تعیین پلی‌مورفیسم ژنتیکی با تکنیک High Resolution Melting (HRM) انجام شد. سپس جهت تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی رخداده در هر نمونه با روش توالی‌یابی دنبال گردید. جهت بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم و بیماری سرطان سینه از آزمون رگرسیون لجستیک استفاده شد.

نتایج: آنالیز آماری نشان داد که ارتباط معناداری بین ژنوتیپ TC از پلی‌مورفیسم rs1951032 با OR = ۵/۳۰۸ و P value=۰/۰۴ با بروز مرگ‌ومیر در مبتلایان وجود دارد و این نتیجه در حالی است که با توجه به عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مختلف در جمعیت بیمار و سالم، این پلی‌مورفیسم با خطر بروز بیماری در افراد در ارتباط نیست.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه احتمالاً ژنوتیپ TC در rs1951032 در بیوژنز و عملکرد miR-487a اختلال ایجاد نموده و بنابراین قادر به سرکوب کردن ژن‌های هدف ازجمله ABCG2 نیست؛ بنابراین rs1951032 با افزایش بروز مرگ‌ومیر در بین مبتلایان در ارتباط است.

کلمات کلیدی: سرطان سینه، پلی‌مورفیسم، miRNA

مقدمه

سرطان سینه دومین مرتبه ازنظر درصد مرگ‌ومیر ناشی از سرطان را در میان زنان در اکثر نقاط جهان، ازجمله ایران داراست (۱) و مرگ‌ومیر حاصل از آن سالانه ۵۱۹۰۰۰ مورد تخمین زده می‌شود (۲). مطالعات انجام‌شده توسط وزارت بهداشت و آموزش پزشکی ایران نشان می‌دهد که در این کشور نیز مرگ‌ومیر به علت ابتلا به این سرطان پس از ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی و نیز تصادفات قرار دارد (۳). سرطان سینه، تکثیر بدخیم آن دسته از سلول‌های اپی تلیال است که مجاری یا لوبول‌های سینه را می‌پوشانند. فاکتورهایی از قبیل قاعدگی زودرس، یائسگی باتاخیر، نازایی یا سن زیاد در هنگام اولین زایمان، استفاده از داروهای هورمونی و سابقه فامیلی سرطان سینه، ریسک ابتلا به سرطان سینه را افزایش می‌دهد (۴). حدود ۳۰٪ از کل سرطان‌های تک ژنی سینه، به علت جهش در ژن‌های سرطان سینه Breast Cancer genes (BRCA) است که درنهایت منجر به سرطان سینه با الگوی توارث غالب خواهد شد. البته به علت نفوذ ناکامل، ممکن است باوجود داشتن الل معیوب، فرد به سرطان سینه مبتلا نشود (۵). درگذشته بیش‌تر تمرکز پژوهشگران سرطان بر روی ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی نظیر انکوژن‌ها، مهارکننده‌های توموری و همچنین ژن‌هایی که محصول آن‌ها درترمیم ژنوم دخالت دارند معطوف بود (۶).

در دو دهه اخیر به نقش تنظیم‌کنندگی ژن‌های غیر کدکننده RNAهای کوچک توجه ویژه‌ای شده است (۷). miRNAها از روی توالی ژن‌های خود که معمولاً درون اینترون قرار دارند، با

* **نویسنده مسئول: مریم پیمانی**، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران Email: Peymani62_m@yahoo.com

www.SID.ir

کمک RNA پلی مراز نوع II رونویسی می‌شوند. پس از پردازش، miRNA بالغ با توالی حدود ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتید ایجاد می‌شوند. miRNAها نقش تنظیمی خود را به‌صورت مهار در سطح ترجمه به دو روش می‌توانند ایفا کنند: اگر این miRNAها به‌طور کامل با توالی RNA هدف مکمل نباشند، بااتصال به آن، منجر به مهار ترجمه می‌شوند و درصورتی‌که کاملاً مکمل توالی هدف باشند mRNA هدف را خواهند شکست (۸).

در حال حاضر مشخص‌شده است که پروفایل بیان miRNAها در بین بافت طبیعی و توموری متفاوت است و با بررسی بیان آن‌ها می‌توان بافت توموری را از بافت طبیعی تمیز داد (۹). miRNAها نقش‌های پراهمیتی در کنترل بسیاری از فرایندهای بیولوژیک ازجمله رشد، تمایز و تکثیر سلول‌ها و همچنین خون‌سازی، رگ زایی و آپوپتوز ایفا می‌کنند (۱۰). همچنین ثابت‌شده است که miRNAها می‌توانند هم به‌عنوان سرطان‌زا و هم سرکوبگر سرطان عمل کنند (۱۱). مطالعات گذشته نشان داد که miR-487 باهدف قرار دادن BCRP رده سلولی MCF7 را نسبت به داروی mitoxantrone به‌عنوان مهارکننده تومورزایی مقاوم می‌کند (۱۲). مقاومت دارویی در میان محققین به‌عنوان مانع اصلی در درمان سرطان‌های مختلف به‌وسیله شیمی‌درمانی قلمداد می‌شود. این پدیده از طریق مکانیسم‌های مختلف، درنهایت موجب کاهش اثر داروهای ضد سرطان علیه سلول‌های سرطانی و بروز مرگ‌ومیر در مبتلایان می‌گردد. یکی از بارزترین این مکانیسم‌ها از طریق بالا رفتن میزان بیان پروتئین‌های گذرنده از غشاهای سلولی اِعمال می‌شود که عضو ابر خانواده انتقال‌دهنده‌های متصل شونده به ATP (ABC) می‌باشند. این پروتئین‌ها با استفاده از هیدرولیز ATP داروها را فعالانه از سلول توموری خارج و یا درون اندامک‌های داخل سلولی محصور می‌نمایند. ABCG2 به‌عنوان عضوی از این خانواده در انتقال مواد به‌ویژه چربی‌ها به داخل و خارج سلول‌ها نقش دارد. این انتقال‌دهنده پروتئینی توسط ژن ABCG2 کد می‌شود. ABCG2 که در جفت و روده بیان می‌شود بانام‌های مستعار ABCP، MXR و BCRP، در مقاومت دارویی شناخته می‌شود (۱۳).

SNP[1]ها که به‌عنوان یک تنوع ژنتیکی و گاهی تعیین‌کننده تنوع فنوتیپی بین افراد می‌باشند، به نظر می‌رسد که در حساسیت افراد به سرطان‌ها و پیشرفت بیماری در آن‌ها دخیل باشند (۱۴). SNPها نزدیک به ۹۰ درصد پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی انسان را تشکیل می‌دهند. در حال حاضر بیش از ۱۷ میلیون SNP در پایگاه داده‌ی NCBI[2] ثبت‌شده است. درنتیجه، SNPها در میان نشانگرهای ژنتیکی منتشر در میان کل ژنوم انسان، بخشی بسیار اطلاع رساننده به شمار می‌آیند (۱۵). دانشمندان تخمین می‌زنند که یک SNP در هر ۳۰۰ نوکلئوتید اتفاق می‌افتد که این بدان معناست که در ژنوم انسان تقریباً ۱۰ میلیون SNP وجود دارد (۱۶). چندین SNP در ژن‌های miRNAها یا سایت‌های هدف آن‌ها نشان داده شده است که بواسطه اثر در عملکرد تنظیمی miRNAها در بروز بیماری‌ها نقش دارند. مشاهده شده است که SNPها بر بیوژنز miRNAها و عملکرد آن‌ها اثر گذاشته و سبب اختلال یا تقویت پروسه بیوژنز و عملکرد miRNAها می‌شوند. ازآنجایی‌که miRNAها واحدهای کوچک عملکردی می‌باشند SNPها در المنت‌های پیش‌ساز آن‌ها ممکن است منجر به تولید miRNAهای جدید با عملکرد متفاوت گردند همچنین ثابت‌شده است که miRNAها می‌توانند هم به‌عنوان سرطان‌زا و هم سرکوبگر سرطان عمل کنند. تنوعات ژنتیکی می‌تواند با اثر بر بیان و عملکرد ژن‌های هدف در بروز و پیشرفت سرطان مؤثر باشد و ازآنجایی‌که بیش از ۶۰٪ ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها تحت عملکرد تنظیمی miRNAها می‌باشند این مسئله نشان‌دهنده اهمیت تنوعات ژنتیکی مرتبط با miRNAها است. بعلاوه SNPها در ژن‌های کدکننده miRNAها تولید miRNAها را تحت تأثیر قرار داده و SNP در محل اتصال miRNAها در ژن‌های هدف، اینتراکشن بین ژن‌ها و miRNAها را تحت تأثیر قرار خواهد داد (۱۷).

HRM تکنیکی باقدرت تفکیکی بالا برای بررسی تغییرات نوکلئوتیدی در تمام طول ژن است. این روش شامل تکثیر قطعه ژنی موردنظر طی واکنشی است که محتوی رنگ متصل شونده به DNA دو رشته‌ای فلورسنت است. بعد از PCR محصولات واکنشی متصل شده به‌تدریج دناتوره می‌شوند و با کاهش فلورسنس، شکل منحنی ذوب ایجادشده برای توالی‌های DNA متفاوت بسیار متغیر بوده، به‌طوری‌که قادر به تمایز امپلیکون‌هایی که حداقل در یک جفت باز متفاوت‌اند، خواهد بود (۱۸).

[1] Single Nucleotide Polymorphis
[2] National Center for Biotechnology Information

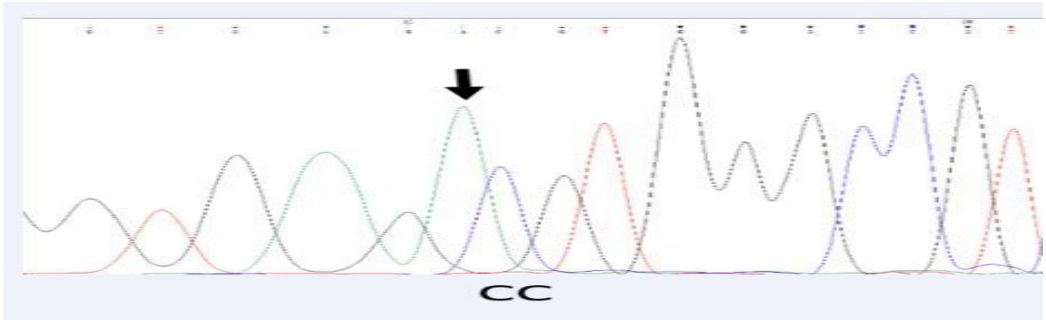
Archive of SID
www.SID.ir

ازآنجایی‌که مطالعات درزمینه‌ی پلی‌مورفیسم‌ها یک ابزار مفید برای مطالعه تنوع ژنتیکی انسان است، در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم rs1951032 در ۶۰ نوکلئوتید بالادست ژن کدکننده miRNA478 (شکل ۱) با خطر ابتلا به سرطان سینه در جمعیت ایران (استان اصفهان) با روش HRM مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

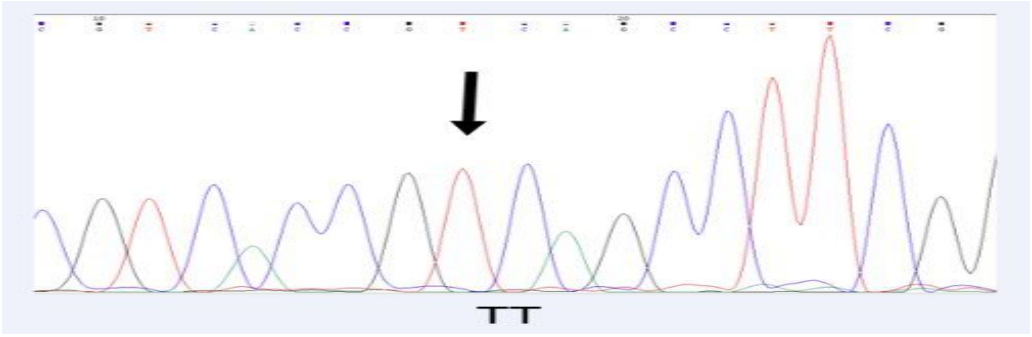
مواد و روش‌ها

جامعه موردمطالعه: مطالعه مذکور مورد- شاهدی و بر روی خانم‌های بیمار مبتلا به سرطان سینه (۷۰ نفر) و ساکن اصفهان انجام گرفت. نمونه‌های بیماران با تائید آزمایش‌های پاتولوژیک در تشخیص سرطان سینه در بیمارستان سیدالشهدا اصفهان پس از معاینات بالینی انتخاب گردیدند. گروه شاهد (۷۰ نفر) زنان سالم بدون سابقه سرطان سینه و یا هر بیماری بدخیم دیگری بودند. بعلاوه هیچ‌یک از بستگان درجه اول آن‌ها سابقه سرطان سینه نداشته‌اند. زنانی که در طول زندگی هیسترکتومی، یائسگی مصنوعی داشته و یا در معرض هر نوع اشعه و شیمی‌درمانی قرار داشته‌اند از مطالعه حذف شدند. شایان‌ذکر است که تمامی افراد در این مطالعه، قبل از ورود به این تحقیق، بامطالعه و امضای رضایت‌نامه کتبی به‌صورت آگاهانه شرکت نموده‌اند.

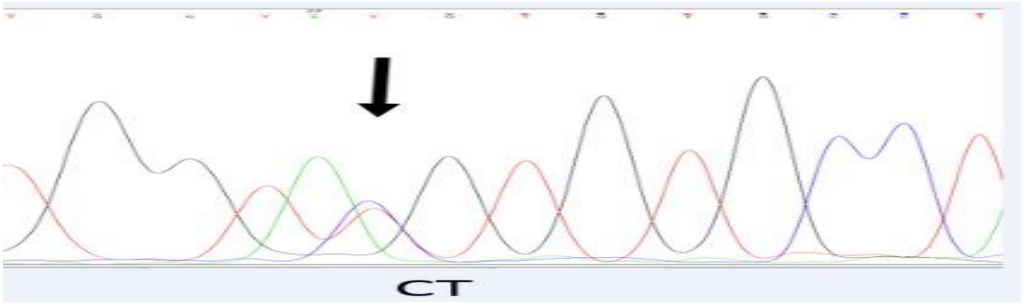
اطلاعات جمعیتی و عوامل خطر ابتلا با استفاده از پرسشنامه کوتاه ساختاری ازجمله اطلاعات مربوط به سن، وزن، وضعیت تأهل، تعداد حاملگی و تعداد فرزندان، سن در تولد اولین فرزند،



۱- الف



۱- ب



۱- ج

شکل۱- نتیجه Sequencing پلی‌مورفیسم rs1951032

www.SID.ir

مدت متوسط دوره شیردهی، سابقه خانوادگی سرطان سینه (بستگان درجه اول)، سن شروع قاعدگی، سن ازدواج، وضعیت یائسگی، سن یائسگی، سن شروع سرطان سینه، متاستاز غدد لنفاوی، مرحله سرطان در زمان آزمایش جمع‌آوری گردید.

نمونه‌های خون محیطی از هر دو گروه مورد و شاهد جمع‌آوری و درون تیوب‌های حاوی EDTA تا زمان انجام آزمایش‌ها و تجزیه‌وتحلیل‌های ژنومیک در 20- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

غربال‌گری پلی‌مورفیسم rs19510322 توسط روش HRM:

به‌منظور شناسایی میزان شیوع پلی‌مورفیسم rs1951032 در جامعه موردمطالعه، همه نمونه‌ها با استفاده از روش HRM غربال‌گری شدند. DNA سلول‌های خون (طبق دستورالعمل کارخانه سازنده) با استفاده از کیت استخراج Genet Bio-Korea استخراج شد. سپس DNA ژنومی جهت آزمایش‌های HRM مورداستفاده قرار گرفت. با مراجعه به سایت NCBI و پایگاه dbSNP و به دست آوردن توالی بالادست ژن miR-487a، با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 پرایمرها طراحی گردید. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول پیوست۱ مشاهده می‌شود.

پس از ارزیابی نمونه‌های استخراج و تخلیص شده توسط اسپکتروفتومتر و الکتروفورز، از تکنیک HRM-Real Time PCR جهت تکثیر بخشی از ژن حاوی SNP و مشاهده تنوع آلل در بین نمونه‌ها، استفاده شد. به این منظور واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۱۰ پیکومول از هرکدام از پرایمرهای F و R، ۲ میکرولیتر از مسترمیکس 5X Hot Firepol norox(Evagreen) و ۱۰۰ نانوگرم از DNA به همراه ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر در نظر گرفته شد. برنامه تکثیر DNA در این تکنیک به‌صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ °C برای ۱۵ دقیقه و سپس سیکل PCR شامل دناتوراسیون ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه برای ۲۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در پایان جهت تعیین ژنوتیپ در دامنه دمایی ۹۵ °C- ۸۰ با تغییرات دمای ۰/۲ درجه در هر step واکنش دنبال شد. در شکل پیوست ۱ نموداری از تغییرات منحنی تکنیک HRM در پلی‌مورفیسم rs1951032 برای ژنوتیپ‌های مختلف مشاهده می‌شود.

در پایان، به‌منظور تعیین ژنوتیپ‌های همه نمونه‌ها، تعداد ۹ نمونه برای این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی جهت تعیین توالی به شرکت کهن ژن ارسال شد که در شکل۱ نتیجه توالی‌یابی نمونه‌های تکثیرشده نشان داده شده است.

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ صورت گرفت. جهت بررسی اختلاف توزیع ژنوتیپ‌ها بین دو گروه بیمار و کنترل از آزمون رگرسیون لجستیک استفاده گردید و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توزیع فراوانی خصوصیات دموگرافیک و کلینیکالی در زنان مبتلا به سرطان سینه

فاکتورها		فراوانی
ER	+	۴۷
HER2	+	۲۹
PR	+	۴۰
Stage	I	۱۷
	II	۱۱
	III	۱۱
	IV	۳۱
Grade	I	۱۴
	II	۳۴
	III	۲۲
متاستاز		۲۳
مرگ‌ومیر		۱۰

نتایج

در مطالعه حاضر میانگین سنی زنان مبتلا به سرطان سینه ۵۲/۱۱±۰۷/۴۵ سال و در گروه شاهد ۵۲/۱۴±۱۶/۱۱ می‌باشند که اختلاف معنی‌داری بین میانگین سنی دو گروه موردمطالعه وجود نداشت. مشخصات زنان مبتلا در جدول ۱ آورده شده است. جدول۲ توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی پلی‌مورفیسم موردمطالعه را نشان می‌دهد. آنالیز داده‌ها نشان داد که گروه کنترل (۰/۴۷= P، ۲=df) و گروه بیمار (۰/۶۲=P ، ۲=df) برای توزیع

www.SID.ir
eofSID

ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم مذکور در تعادل هاردی- واینبرگ است.

بر اساس آنالیز داده‌ها (جدول۲) و بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و بروز سرطان سینه نشان داد که بین فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم موردمطالعه با خطر بروز بیماری ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (P- value>۰/۰۵).

پس از ارائه توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مربوط به پلی‌مورفیسم rs1951032 در ادامه به بررسی رابطه ریسک فاکتورها با پلی‌مورفیسم مورد پژوهش پرداخته شده است. در این مطالعه، برای اولین بار ارتباط پارامترهای مختلفی ازجمله هورمون استروژن، پروژسترون و HER2 و Stage بیماری، مرحله و grade بیماری، متاستاز و میزان مرگ‌ومیر با پلی‌مورفیسم rs1951032 مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی فراوانی ژنوتیپ‌های CC، TC، TT در بین دو گروه دارای گیرنده‌ی استروژن و بدون گیرنده استروژن در جمعیت بیمار اختلاف معناداری نداشت. همچنین ازلحاظ گیرنده‌ی پروژسترون (PR) بررسی گردید و نشان داده شد که اختلاف معناداری بین دو گروه PR+ و PR- در جمعیت بیمار ازلحاظ فراوانی ژنوتیپ‌ها وجود ندارد. ازنظر بروز متاستاز و stage نیز فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت بیمار مطالعه شد و نتایج معنی‌داری به دست نیامد. درنهایت از زمانی که بیمار به پزشک جهت تشخیص بیماری مراجعه کرده بود تا زمان مرگ بیمار که یک بازه زمانی ۱± ساله بود تعداد ۱۰نفر مرگ‌ومیر گزارش شده بود، که فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت بیمار مورد بررسی قرار گرفت و نتایج قابل‌توجهی به دست آمد که در جدول۳ قابل‌مشاهده است. در این بررسی نشان داده شد که فراوانی ژنوتیپ‌های CC و TT در بین دو گروه اختلاف معناداری نشان نمی‌دهد (P- value>۰/۰۵). درحالی‌که ژنوتیپ TC در مقابل CC در بین دو گروه موردمطالعه اختلاف قابل‌ملاحظه و معناداری نشان می‌دهد که این نتیجه نشان‌دهنده ارتباط ژنوتیپ TC با بروز مرگ‌ومیر است (P- value<۰/۰۵ و OR = ۵/۳۰۸). احتمالاً به دلیل تعداد کم ژنوتیپ TT در جمعیتی که دچار مرگ‌ومیر شده‌اند فراوانی این ژنوتیپ نتیجه معناداری نشان نمی‌دهد.

جدول ۲- توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی آلی در دو گروه کنترل و بیمار

پلی‌مورفیسم	بیمار (٪)	کنترل (٪)	OR(95% CI)	سطح معناداری
		ژنوتیپ		
CC	(۳۵٪)۲۵	(۲۴٪)۱۷	۱ (رفرنس)	-
TC	(۲۷٪)۱۹	(۳۵٪)۲۴	۰/۵۳۸(۰/۱-۲۲۸/۲۷۴)	۰/۱۵۹
TT	(۳۷٪)۲۶	(۳۸٪)۲۹	۰/۶۱۰(۰/۱-۲۷۱/۳۷۴)	۰/۲۳۲
		آلل		
C	(۴۹٪) ۶۹	(۴۱٪) ۵۸	۱ (رفرنس)	
T	(۵۱٪) ۷۱	(۵۹٪) ۸۲	۱/۳۷۴ (۰/۸۵۷ – ۲/۲۰۳)	۰/۱۸۶۶۸

جدول ۳- توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs1951032 برحسب مرگ‌ومیر در جمعیت بیمار

پلی‌مورفیسم	ژنوتیپ	عدم مرگ	وقوع مرگ	OR(95% CI)	سطح معناداری
rs1951032	CC	(۳۳٪)۲۳	(۳٪)۲	رفرنس (۱)	
	TC	(۱۹٪)۱۳	(۹٪)۶	۵/۳۰۸(۰/۳۰-۹۹۳/۰۴)	۰/۰۴
	TT	(۳۴٪)۲۴	(۳٪)۲	۰/۹۵۸(۰/۷-۱۲۴/۳۸۳)	۰/۹۶۷

نتیجه‌گیری

مطالعات اخیر ارتباط بین SNPهای ژن‌های کدکننده miRNAها را با خطر بروز سرطان نشان داده است. miRNAها، RNAهای غیرکدکننده‌ای هستند که اثرات تنظیمی منفی، در بیان ژن‌های هدف خود دارند. این تنظیم‌گرهای کوچک می‌توانند

www.SID.ir

از طریق اینتراکشن اختصاصی بین 3'UTR ژن‌ها و انتهای 5' miRNAها (مناطق seed region) اتصال برقرار نمایند. نشان داده شده است که تغییرات ژنتیکی در 3'UTR mRNAها و همچنین ژن‌های کدکننده miRNAها بر قدرت اتصال miRNA-mRNA و یا پروسه بیوژنز و عملکرد miRNAها مؤثر بوده و ممکن است با تغییر سطح بیان ژن‌های هدف، سبب افزایش یا کاهش بروز سرطان گردد (۱۹، ۲۰).

بر اساس گزارش‌های اخیر IRAC، فراوانی افراد مبتلا به سرطان سینه و همچنین میزان مرگ‌ومیر ناشی از این سرطان در بین مبتلایان در سراسر جهان روبه افزایش است (۲۱).

آنالیزهای SNPی مرتبط با miRNAها نشان داده است که این پلی‌مورفیسم‌ها در پاتوفیزیولوژی‌های مختلف انواع مختلف سرطان‌ها ازجمله سرطان سینه دخالت دارد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که rs353291 واقع در miR-145 با گسترش بروز سرطان سینه در ارتباط است (۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر در جمعیت چین نشان داده شد که rs2910164 واقع در miR-146a و همچنین rs116149139 مربوط به miR-196a می‌تواند به‌عنوان بیومارک‌هایی برای پیش‌بینی بروز سرطان سینه در جمعیت موردمطالعه در نظر گرفته شود (۲۳). در سال ۲۰۱۳ نیز بامطالعه بر روی افراد جوان مبتلا به سرطان سینه در جمعیت چین rs895819 واقع در pre-miR-27a به‌عنوان یک ریسک فاکتور پیشنهاد گردید (۲۴).

miR-487 بر روی کروموزوم ۱۴ ژنوم انسانی واقع شده است و به‌عنوان محرک تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطان سینه MCF7 از طریق مسیر TGB1 نشان داده شده است (۲۵). همچنین افزایش بیان این miRNA باهدف قرار دادن BCRP مقاومت دارویی سلول‌ها را در مقابل داروهای مقابله‌کننده با تهاجم سلولی افزایش می‌دهد (۱۲). با توجه به اهمیت و عملکرد تنوع ژنتیکی در miRNAی اولیه بر روی تشکیل ساختار ثانویه رونوشت‌های اولیه miRNAها و احتمالاً تولید miRNAی بالغ، در این مطالعه به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs1951032 در بالادست ژن کدکننده miRNA-487a بالغ با خطر ابتلا به سرطان سینه و یافتن ژنوتیپ‌های غالب مرتبط با سرطان سینه در جامعه مبتلایان به سرطان سینه در ایران و در شهر اصفهان پرداخته شد. برای انجام این مطالعه از تکنیک HRM جهت تعیین وجود جهش در بین جمعیت موردمطالعه و سپس از تکنیک توالی‌یابی به‌منظور تعیین ژنوتیپ‌های افراد موردمطالعه برای پلی‌مورفیسم مدنظر استفاده گردید (۱۸).

برای اولین بار در یک جمعیت ایرانی، طی مطالعه جاری بر روی پلی‌مورفیسم rs1951032 در ژن‌های کد کننده مربوط به miRNA-487a نشان داده شد که توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی‌مورفیسم rs1951032 با بروز سرطان سینه در جمعیت موردمطالعه ارتباط معناداری ندارد.

نتیجه قابل‌ملاحظه در این مطالعه، مشاهده اختلاف معنادار فراوانی ژنوتیپ‌ها در بیمارانی که دچار مرگ‌ومیر می‌شوند با سایر بیماران بود که ژنوتیپ TC با ۵/۳۰۸ = OR زمینه‌ساز افزایش بروز مرگ‌ومیر در بیماران می‌گردد و به دلیل تعداد کم ژنوتیپ TT در جمعیتی که دچار مرگ‌ومیر شده‌اند امکان ارائه نظر قطعی درزمینه ی ارتباط ژنوتیپ TT با بروز مرگ‌ومیر در بیماران وجود ندارد.

در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت آمریکایی با نژاد آفریقایی و اروپایی انجام شد نشان داده شد که پلی‌مورفیسم موردنظر با خطر بروز سرطان سینه در جمعیت موردنظر در ارتباط است (۱۷).

مطالعات بیوانفورماتیکی با استفاده از پایگاه miRNASNP v.2.0، حضور پلی‌مورفیسم rs1951032 را در ۲۳ جفت بالادست منطقه ژنی کدکننده miR-487 نشان می‌دهد که احتمالاً حضور این پلی‌مورفیسم می‌تواند با اثرگذاری بر بیوژنز و عملکرد

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 58-64 of ABCG2 3' UTR	5' ...ACGUGGCCUUGGCUUGUAUGAUU...
hsa-miR-487a-3p	3' UUGACCUACAGGGACAUACUAA

شکل۲– اثر مهاری miRNA-487a بر ABCG

Archive of SID

miRNA-487 اثر مهاری این miRNA را بر روی ABCG2 تحت تأثیر قرار داده و کاهش دهد (شکل ۲) و با افزایش بیان ABCG2 و عدم پاسخگویی بیماران به درمان، زمینه‌ساز بروز مرگ‌ومیر در مبتلایان گردد. هرچند در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم مدنظر با بروز بیماری و همچنین بروز مرگ‌ومیر در بیماران مشاهده نشد، با توجه به اهمیت miRNA مدنظر در مقاومت دارویی، مطالعه در جمعیت بزرگ‌تری از بیماران برای پلی‌مورفیسم rs1951032 و همچنین سایر پلی‌مورفیسم‌های مرتبط با miR-487 پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت کارکنان بیمارستان سیدالشهدا و مهدیه اصفهان جهت تهیه نمونه از بیماران انجام پذیرفت که بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از آن‌ها مراتب قدردانی را دارند. کد طرح پژوهش ۱۳۳۰۵۰۳۹۶۲۰۱۶ است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol. 2005;16(3):481-8.
2. Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. Eur J Hum Genet. 2009;17(6):722-31..
3. Hajizadeh N, Pourhoseingholi MA, Emadedin M, Baghestani A, Fazeli Z. Incidence rate of breast cancer in iranian women, trend analysis from 2003 to 2009. IJAPBS. 2015; 4(3): 107-12.
4. Trichopoulos D, Lagiou P, Adami HO. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the crucial role of the number of mammary tissue-specific stem cells. Breast Cance Res. 2005, 7(1):13-17.
5. Nokiani FA, Akbari H, Madani H, Izadi B. Prevalence of breast cancer in breast sample reports in Iran, 2001-2004. Breast J. 2007;13(5):536.
6. .Mousavi SM,Montazeri A, Mohaghegh A, Mousavi Jarrah A, Harirchi I, et al. Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review, Breast J. 2007;13(3):83-91.
7. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. Nat Rev Cancer. 2007;7(12):937-48.
8. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK,et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. Mol Cancer. 2006;5:24.
9. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J. 2002;21(17):4663-70.
10. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev. 2003;17(24):3011-6.
11. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(2):126-39.
12. Ma MT, He M, Wang Y, Jiao XY, Zhao L, Bai XF,et al. MiR-487a resensitizes mitoxantrone (MX)-resistant breast cancer cells (MCF-7/MX) to MX by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Cancer Lett. 2013;339(1):107-15.
13. Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, Sommer SS, Rossi JJ. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. RNA. 2009;15(9):1640-51.
14. Fishman A. The effects of parity, breastfeeding, and infertility treatment on the risk of hereditary breast and ovarian cancer: a review. Int J Gynecol Cancer. 2010;20(11 Suppl 2):S31-3.
15. Wang Z, Wang J, Chong SS, Lee CGL. Mining Potential Functionally Significant Polymorphisms at the ATP-Binding-Cassette Transporter Genes. Curr Pharmacogenomics Person Med. 2009;7: 40-58.
16. Tsui C, Coleman LE, Griffith JL, Bennett EA, Goodson SG, Scott JD,et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that map to gaps in the human SNP map. Nucleic Acids Res. 2003:15;31(16):4910-6.
17. Yao S, Graham K, Shen J, Campbell LE, Singh P, Zirpoli G,et al. Genetic variants in microRNAs and breast cancer risk in African American and European American women. Breast Cancer Res Treat. 2013;141(3):447-59.
18. Taylor CF. Mutation scanning using high resolution melting. Biochem Soc Transact 2009; 37 (Pt2): 433-37.
19. Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. Carcinogenesis. 2008;29(7):1306-11.

Archive of SID
www.SID.ir

20. Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R, Kim H, Wickramasinghe P, Shimizu M,et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. Cancer Res. 2010;70(7):2789-98.
21. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359-86.
22. Chacon-Cortes D, Smith RA, Haupt LM, Lea RA, Youl PH, Griffiths LR. Genetic association analysis of miRNA SNPs implicates MIR145 in breast cancer susceptibility. BMC Med Genet. 2015;16:107.
23. Qi P, Wang L, Zhou B, Yao WJ, Xu S, Zhou Y, et al. Associations of miRNA polymorphisms and expression levels with breast cancer risk in the Chinese population. Genet Mol Res. 2015;14(2):6289-96.
24. Zhang N, Huo Q, Wang X, Chen X, Long L, Jiang L,et al. A genetic variant in pre-miR-27a is associated with a reduced breast cancer risk in younger Chinese population. Gene. 2013;529(1):125-30.
25. Ma M, He M, Jiang Q, Yan Y, Guan S, Zhang J,et al. MiR-487a Promotes TGF-β1-induced EMT, the Migration and Invasion of Breast Cancer Cells by Directly Targeting MAGI2. Int J Biol Sci. 2016;12(4):397-408.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Investigating the Association of rs1951032 Polymorphism in the Pre-miR-487a Flanking Region with Incidence of Breast Cancer in Iranian Women

Hashemi R, Peymani M*

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 11 Dec 2016 Accepted: 16 Apr 2017

Abstract

Background & Objective: MiRNAs are among non-coding RNAs involved in regulation of the target genes through a direct interaction with the mRNA. Therefore, any variation in the miRNA genes could be effective in modification of the functionality of miRNA. The aim of the present study is to investigate the association of rs1951032 in the pre-miR-487a flanking region with incidence of breast cancer in Iranian population.

Materials & Methods: This case-control study was performed on 140 samples collected from 70 breast cancer patients and 70 healthy participants with a similar age range. DNA extraction was performed and genotype determination was carried out by High Resolution Melting (HRM) technique. Additional confirmation was performed by sequencing of the PCR products. Finally, logistic regression analysis was used to investigate the association between the polymorphism and breast cancer.

Results: Statistical analysis showed a significant association between rs1951032 TC genotypes with OR= 5.308 and increased incidence of mortality among patients. However, since there was no significant association between these genotypes in patients and healthy individuals, this polymorphism is not associated with the incidence of disease in individuals.

Conclusions: Based on the findings of this study, rs1951032 (TC genotype) is associated with impairment in miR-487a function and biogenesis and therefore cannot suppress target gene ABCG2. Thus, rs1951032 is associated with increased incidence of mortality among patients.

Keywords: Breast cancer, Polymorphism, miRNA

* **Corresponding author: Maryam Peymani,** Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email: Peymani62_m@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2017): 328-336

www.SID.ir