



بررسی اهمیت کلینیکی تغییرات بیانی RNA بلند غیر کدکننده MALAT1 در سرطان پستان

الهام اورنگی: دکتری، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
 مجید متولی باشی: دکتری، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول) mbashi@sci.ui.ac.ir
 مریم طباطباییان: پزشک، مرکز تحقیقات سرطان، بیمارستان سیدالشهدا، اصفهان، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

سرطان پستان،
 RNAهای بلند غیر کدکننده،
 MALAT1
 بیومارکر

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از علل اصلی بیماری و مرگ در میان زنان است. RNAهای بلند غیر کدکننده نقش مهمی در رشد و پیشرفت تومور دارند. MALAT1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) یک RNA بلند غیر کدکننده است که بیان آن در چندین سرطان دچار اختلال می‌گردد، با این وجود ارزش تشخیصی آن در سرطان پستان نامشخص است. مطالعه حاضر به منظور بررسی تغییرات بیان MALAT1 در بافت تومور پستان، ارتباط آن با خصوصیات کلینیکال تومور و ارزش تشخیصی آن به عنوان بیومارکر، انجام گرفت.

روش کار: در این مطالعه مورد-شاهدی، سطح بیان MALAT1 در ۳۱ بافت تومور سینه و ۳۱ بافت نرمال حاشیه تومور با تکنیک Real-time PCR، اندازه‌گیری شد. تغییر بیان MALAT1 بین بافت‌ها و ارتباط آن با ویژگی‌های کلینیکال به ترتیب با t-test و one-way ANOVA بررسی شد. نقش MALAT1 به عنوان بیومارکر با منحنی ROC بررسی شد. **یافته‌ها:** سطح بیان MALAT1 در بافت تومور نسبت به بافت نرمال حاشیه تومور، کاهش معنادار (۲/۸۷ برابری) ($p < 0/001$)، نشان داد. هم‌چنین ارتباط مثبت و معناداری بین بیان MALAT1 با سن بیمار و ویژگی‌های تهاجمی تومور ($p < 0/05$) مشاهده شد. منحنی ROC نشان داد که سطح زیر منحنی معنادار و برابر با ۰/۷۷۳ است. حساسیت اختصاصیت MALAT1 به عنوان بیومارکر به ترتیب ۷۱/۴۳ و ۹۱/۶۷ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که MALAT1، کاهش بیان معناداری در سرطان پستان دارد و می‌تواند به عنوان یک بیومارکر در تشخیص بیماران از افراد سالم عمل کند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه اصفهان

شیوه استناد به این مقاله:

Orangi E, Motali-Bashi M, Tabatabaieian M. Evaluating the clinical importance of long non-coding RNA MALAT1 expression in breast cancer. Razi J Med Sci. 2019;26(3):13-23.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 1.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



Original Article

Evaluating the clinical importance of long non-coding RNA MALAT1 expression in breast cancer

Elham Orangi, PhD, Division of Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Majid Motovali-Bashi, PhD, Division of Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran (* Corresponding author) mbashi@sci.ui.ac.ir

Maryam Tabatabaiean, MD, Cancer Research Group, Seyed-o-Shohada Hospital, Isfahan, Iran

Abstract

Background: Breast cancer is one of the major causes of illness and mortality among women. Long non-coding RNAs (LncRNAs) have important role in tumor development and progression. Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) is a lncRNA that deregulates in several cancers, however, its value in the diagnosis of breast cancer is unclear. This study was conducted to investigate the MALAT1 expression levels in breast tumor tissue, its association with tumor clinical features and its diagnostic value as a biomarker in breast cancer.

Methods: In this study, the expression level of MALAT1 was measured in 31 breast tumor tissues and 31 adjacent normal tissues by real-time polymerase chain reaction. The MALAT1 expression alteration between the tumor and normal tissues and its association with clinical characteristics were analyzed with t-test and one-way ANOVA, respectively. The MALAT1 role as a biomarker was investigated by ROC curve.

Results: MALAT1 expression level in tumor tissues to adjacent normal tissues showed a significant decrement of 2.87 times (fold change= 0.348, $p < 0.001$). Also, there was a positive and significant correlation between MALAT1 expression and patient's age and tumor invasive features ($p < 0.05$). The ROC curve results showed that the area under the curve was significant and equal to 0.773. The sensitivity and specificity of MALAT1 as biomarker were 71.43 and 91.67, respectively.

Conclusion: The results of this study showed that the MALAT1 has a significant reduction in breast cancer and can act as a biomarker in diagnosing patients from healthy individuals.

Conflicts of interest: None

Funding: Esfahan University

Keywords

Breastcancer,
LncRNA,
MALAT1,
Biomarker

Received: 09/12/2018

Accepted: 07/04/2019

Cite this article as:

Orangi E, Motovali-Bashi M, Tabatabaiean M. Evaluating the clinical importance of long non-coding RNA MALAT1 expression in breast cancer. Razi J Med Sci. 2019;26(3):13-23.

This work is published under [CC BY-NC-SA 1.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



با توجه به اینکه lncRNAها، نقش‌های کلیدی و مهمی در بسیاری از فرایندهای سلولی از جمله تکثیر، تمایز و نمو سلولی، تنظیم چرخه سلولی، پاسخ ایمنی و تومورزایی دارند و بیان نابه‌جای آن‌ها می‌تواند منجر به انواعی از بیماری‌ها از جمله سرطان گردد، بنابراین می‌تواند به عنوان بیومارکرهایی جدید در تشخیص، پیش‌آگهی و درمان سرطان‌ها، مورد مطالعه قرار گیرند (۱۲). ارتباط بین miRNAs و lncRNAs و اهمیت پاتوفیزیولوژیکی این برهمکنش‌ها اخیراً گزارش شده است (۱۴). *MALATI* (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) یکی از نخستین رونوشت‌های غیر کدکننده بلند شناخته شده مرتبط با سرطان است که در بسیاری از انواع سلول‌های انسانی بیان می‌شود و در بین گونه‌های پستانداران بسیار حفاظت شده است. در موقعیت کروموزومی ۱۱q۱۳ واقع شده و ۸۷۰۸ جفت باز دارد (۱۵). تغییرات بیان *MALATI* به ویژه افزایش بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها مشاهده شده است (۱۶). مطالعات متاآنالیز نشان داده که سطوح بیان بالای *MALATI* می‌تواند به عنوان فاکتوری در جهت پیش‌آگهی بیماری عمل کند (۱۷، ۱۸). با توجه به نقش *MALATI* در تنظیم فرایندهای مرتبط با تکثیر، پیشرفت و متاستاز سرطان، عملکرد آن به عنوان بیومارکر در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته که اهمیت آن در انواع مختلف از سرطان‌ها متفاوت بوده است (۱۹). Leucci و همکاران نشان دادند که در توالی *MALATI*، دو سایت اتصال برای mir9 وجود دارد و mir9 می‌تواند با اتصال به *MALATI* در هسته، آن را هدف تجزیه قرار دهد. داده‌های این مطالعه نشان داد که اهداف معمول miRNAs منحصرأ محدود به سیتوپلاسم نمی‌شود و عملکرد این مولکول‌ها بسیار گسترده‌تر و پیچیده‌تر از آن چیزی است که تاکنون تصور می‌شده است (۲۰). در مطالعه نقش *MALATI* به عنوان آنکوژن و یا سرکوبگر تومور در سرطان پستان، نتایج متفاوتی بدست آمده است. در برخی از مطالعات، کاهش بیان *MALATI* در بافت‌های تومور پستان و در

سرطان، مهم‌ترین چالش سلامتی بشر در بیشتر نقاط جهان است (۱). در کشورهای در حال توسعه، سرطان پستان به عنوان علت اصلی مرگ در بین زنان زیر ۵۰ سال محسوب می‌شود (۲). رخداد سرطان پستان و مرگ ناشی از آن در ایران در حال افزایش است (۳) و در حدود ۱۰٪ از همه موارد این بیماری، در اصفهان مشاهده شده‌اند (۴). تشخیص سرطان پستان در مراحل میانی و پیشرفته بیماری، منجر به کاهش میزان بقا ۵ ساله از ۹۰٪ (مراحل اولیه) به ۲۰٪ می‌گردد (۵). بنابراین مطالعه به منظور کشف مارکرهای مولکولی با حساسیت و اختصاصیت بالا که قادر به تشخیص بیماری در مراحل اولیه تومور باشند، ضروری است و منجر به انتخاب بهترین درمان و کاهش مرگ و میر ناشی از این بیماری می‌گردد (۶). پروژه ENCODE (Encyclopedia of DNA Element) نشان داده که بیش از ۸۰٪ ژنوم انسان رونویسی می‌شود و این در حالی است که فقط حدود ۱/۵٪ از ژنوم انسان کد کننده پروتئین می‌باشد (۷). RNAهای غیر کدینگ که بخش اعظم رونوشت‌های سلول را تشکیل می‌دهند به دو کلاس اصلی تقسیم می‌شوند. RNAهای غیر کدکننده کوتاه شامل miRNAs و RNAهای غیر کدکننده بلند (lncRNAs) (۸). miRNAها، RNAهای غیر کدکننده کوتاه با طول تقریباً ۲۵-۱۸ نوکلئوتیدند که قادر به تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی هستند. اختلال در بیان miRNA می‌تواند منجر به انواعی از بیماری‌ها از جمله سرطان شود (۹). نقش miRNAها به عنوان بیومارکر در تشخیص و پیش‌آگهی بسیاری از سرطان‌ها مورد مطالعه قرار گرفته که در این رابطه نتایج متناقضی بدست آمده است. بنابراین مطالعه به منظور یافت بیومارکرهای مکمل دیگر بسیار ضروری می‌باشد (۱۰). lncRNAها، رونوشت‌های بزرگتر از ۲۰۰ نوکلئوتیدند که محصول پروتئینی را تولید نمی‌کنند. آن‌ها بیش از ۸۰٪ از RNAهای غیر کدینگ را شامل می‌شوند (۱۱). این مولکول‌ها قادر به تنظیم بیان ژن در سطوح رونویسی، پس از رونویسی و اپیژنتیک هستند.

در حدود ۵۰-۳۰ میلی گرم از نمونه بافت هر بیمار به منظور استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های بافت پس از کوبیدن در هاون چینی همراه با نیتروژن مایع تخریب شدند. برای استخراج RNA از محلول Trizol (Sigma Aldrich) و مطابق با دستورالعمل سازنده استفاده شد. بافت‌های تخریب شده در محلول Trizol و توسط سرنگ ۲/۵ cc و سوزن ۱۸g هموژن شدند. تمامی مراحل استخراج زیر هود لامینار و با استفاده از تیوپ‌ها و استریپ‌های عاری از RNase انجام گرفت. رسوب نهایی RNA در آب DEPC حل و در ۷۰°- نگهداری شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۲٪ بررسی شد. به منظور حذف آلودگی DNA، نمونه‌های RNA توسط DNase عاری از RNase تیمار شدند.

به منظور ساخت cDNA برای تکثیر lncRNA ها از کیت Takara Bio, Prime Script RT reagent (Japan) استفاده شد. مخلوطی از ۵۰۰ نانوگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RT، ۲ میکرولیتر بافر 5X PrimeScript، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای الیگو ۵۰dt میکرومولار و رندوم هگزامر ۱۰۰ میکرومولار استفاده شد. واکنش رونویسی معکوس در دمای ۳۷° سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۸۵° سانتیگراد به مدت ۵ ثانیه انجام شد.

ساخت cDNA از miRNAها با استفاده از کیت BON-miR miRNA 1st-strand cDNA synthesis (Bonyakhteh, Iran) انجام گرفت. واکنش پلی‌آدنیلایسیون در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در ۳۷° سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. واکنش در ۶۵° سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه غیرفعال شد. سپس ساخت cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۰/۷ میکرولیتر آنزیم RT، ۱ میکرولیتر آداپتور Bon-RT ۱۰ میکرومولار، ۲

برخی افزایش بیان آن گزارش شده است (۲۱-۲۴). چنین نتایج متناقضی هم‌چنین برای miR-9 مشاهده شده و مشخص نیست که آیا این miRNA به عنوان یک آکوژن و یا یک سرکوبگر تومور عمل می‌کند (۲۵-۲۷).

هدف از مطالعه حاضر، در ابتدا بررسی سطوح بیان MALATI در نمونه‌های بافت تومور پستان در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور و بررسی ارتباط آماری بین بیان MALATI و miR-9 بود. در ادامه ارتباط سطوح بیان MALATI با خصوصیات کلینیکال بیماران مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت امکان استفاده از MALATI به عنوان بیومارکر در تشخیص بیماران باسرطان پستان از افراد سالم بررسی شد.

روش کار

این مطالعه مورد-شاهدی پس از تأیید کمیته اخلاقی دانشگاه اصفهان، بر روی نمونه‌های بافت تومور و بافت نرمال حاشیه تومور مربوط به ۳۱ زن مبتلا به سرطان پستان انجام گرفت. رضایتنامه آگاهانه کتبی از همه بیماران بدست آمد. نمونه‌های بیولوژیک مورد استفاده در این تحقیق از بانک بین‌المللی بافتهای تومورال ایران وابسته به انستیتو کانسر دانشگاه علوم پزشکی تهران و همچنین از مرکز تحقیقات سرطان بیمارستان سیدالشهدا اصفهان در محدوده زمانی سال ۹۶-۹۵ تهیه شده است. تمامی نمونه‌ها پس از بررسی توسط پاتولوژیست به عنوان سرطان پستان تهاجمی شناخته شد. نمونه‌ها پس از خروج از بدن و انتقال به تیوپ‌های عاری از RNase، فوراً در نیتروژن مایع منجمد شده و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۷۰°- نگهداری شد. بیماران مورد مطالعه پیش از عمل تحت هیچ‌گونه درمانی شامل شیمی درمانی و پرتودرمانی قرار نگرفته بودند. اطلاعات کلینیکال بیماران در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای MALATI و β -actin

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصول به جفت باز
MALATI	Forward	5-AGTAAAGCCCTGAACATATCACAC-3'
	Reverse	5-TAAACGGGTCATCAAACACCT-3'
β -actin	Forward	5-GTCATTCCAAATATGAGATGCGT-3'
	Reverse	5-CAATGCTATCACCTCCCCTG-3'

ژن‌های هدف بین گروه‌های بیمار و سالم توسط T-test محاسبه شد. ارتباط بین سطوح بیان و ویژگی‌های کلینیکی بیمار با تست one-way ANOVA بررسی شد. ارتباط بین بیان miR-9 با بیان MALAT1، با آنالیز رگرسیون و تست پیرسون بررسی شد. $p < 0.05$ نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری است. توان بیومارکری MALAT1 در تشخیص بیماران و میزان حساسیت و اختصاصیت آن با رسم منحنی ROC و محاسبه سطح زیر منحنی آنالیز شد.

یافته‌ها

مشخصات کلینیکی بیماران مطالعه شده شامل سن بیمار، مرحله تومور، درجه هیستولوژیک تومور، اندازه تومور و تهاجم به گره‌های لنفاوی در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین سن بیماران ۵۲/۷۴ (۳۱-۷۵) سال بود.

بررسی منحنی‌های استاندارد مربوط به ژن‌های MALAT1 و β -actin و ژن‌های miR-9 و snord نشان داد که یک ارتباط خطی قوی بین مقدار Ct هر ژن و لوگاریتم غلظت cdNA اولیه آن ژن وجود دارد. مقدار r^2 ژن MALAT1 و ژن β -actin و مقدار r^2 ژن miR-9 و ژن snord تقریباً مشابه و بین ۰/۹۶ تا ۱ بود (شکل ۱). کارایی تکثیر این ژن‌ها، کامل و بنابراین نتایج بدست آمده در استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه کمیت ژن‌های هدف، کاملاً معتبر و دقیق می‌باشد.

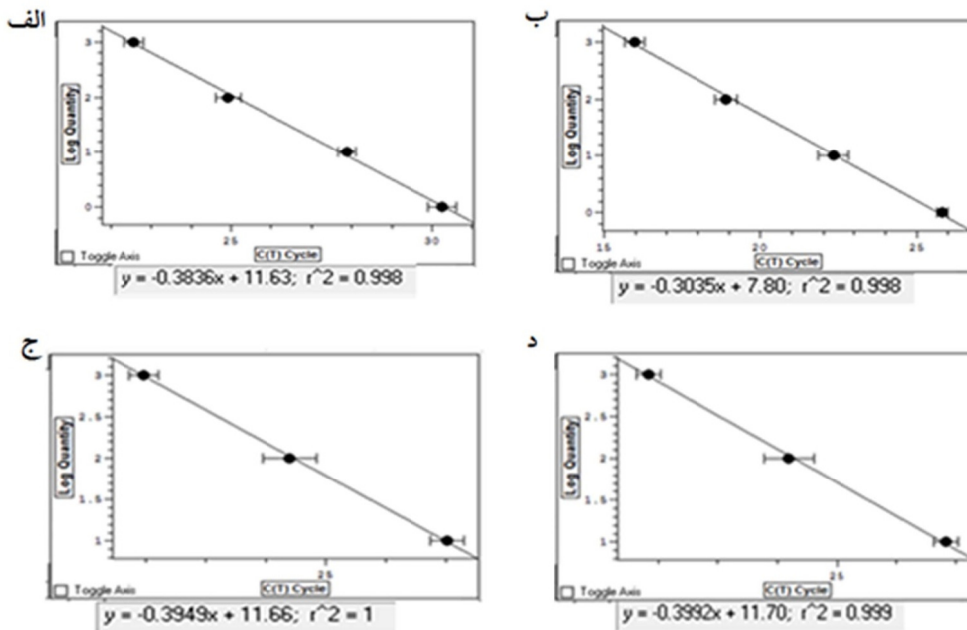
در بررسی منحنی‌های ذوب ژن‌های هدف و رفرنس، به منظور تأیید اختصاصیت پرایمرهای استفاده شده، وجود تنها یک پیک در یک tm مشخص پس از تکثیر هر ژن، نشان‌دهنده اختصاصیت بالای پرایمرهای مورد استفاده بود (شکل ۲).

در بررسی سطح بیان MALAT1 در بافت تومور نسبت به بافت نرمال مجاور تومور، کاهش معنادار ۲/۸۷ برابری مشاهده شد ($p < 0.001$)، $\text{fold change} = 0.348$ (جدول ۳ و شکل ۳). همچنین بیان miR-9 در نمونه‌های بافت تومور در مقایسه با بافت نرمال مجاور، ۳/۹۰ برابر کاهش یافته بود ($p = 0.0051$)، $\text{fold change} = 0.26$ (جدول ۴ و شکل ۳). در بررسی ارتباط بین بیان miR-9 با بیان

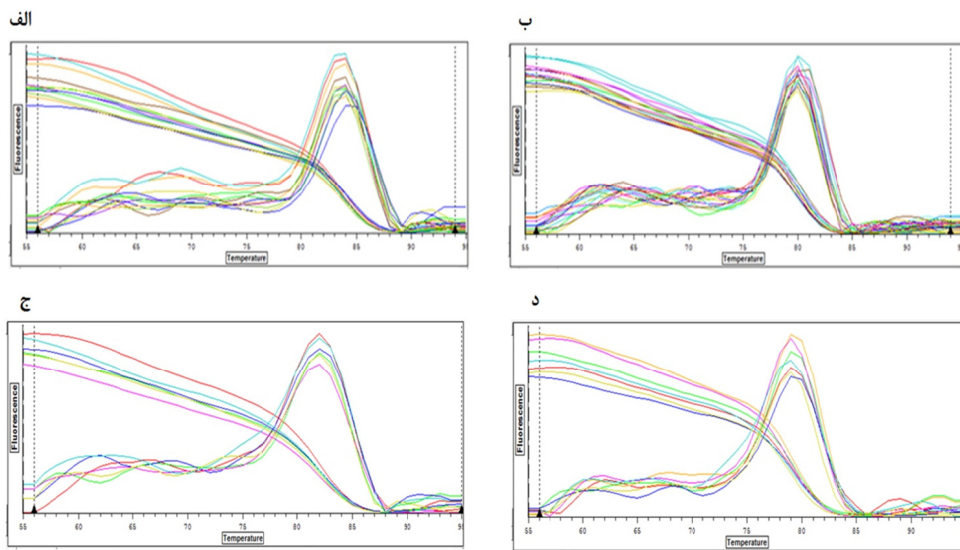
میکرولیتر مخلوط ۲ dNTP میکرومولار، ۱۰ میکرولیتر RNA پلی‌آدنیل‌ه شده و ۲ میکرولیتر بافر RT و در دمای 65° سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، 25° سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، 42° سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و 85° سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

سطح بیان MALAT1، پس از انتخاب β -actin به عنوان ژن کنترل، توسط qRT-PCR و با استفاده از SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Japan) مطابق با دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد. پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار Oligo (نسخه ۷/۵) طراحی و اختصاصیت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۲ ارائه شده است. کیت BON-miR High-Specificity miRNA OPCR Core Reagent Kit (Bonyakhteh, Iran) به منظور بررسی کمی سطح بیان miR-9 و مطابق با دستورالعمل سازنده استفاده شد. ژن Snord به عنوان ژن کنترل انتخاب گردید. پرایمرهای این مرحله توسط شرکت بن‌یاخته طراحی و ساخته شد. واکنش qRT-PCR توسط دستگاه Chromo4 (BioRad) و در دمای 95° برای ۲ دقیقه، سپس 40° چرخه در دمای 95° سانتیگراد برای ۵ ثانیه و 60° سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه انجام گرفت. همه نمونه‌ها ۳ بار آزمایش شدند و میانگین Ct هر نمونه برای محاسبه کمیت با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. یکی از نکات مهم در استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در محاسبه کمیت نسبی یک ژن، یکسان بودن کارایی تکثیر ژن هدف و ژن رفرنس می‌باشد. برای تأیید این مسأله، از رسم منحنی استاندارد استفاده شد. پس از تهیه سری رقت از cdNA، هر رقت با استفاده از پرایمرهای ژن هدف و ژن رفرنس تکثیر گردید. مقادیر Ct برای هر ژن در هر رقت محاسبه و منحنی استاندارد رسم گردید. همچنین به منظور تأیید اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده، پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب رسم شد و تعداد پیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. وجود تنها یک پیک نشان‌دهنده اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده می‌باشد.

تمامی آنالیزهای آماری مورد نیاز، توسط نرم افزار Genex6 انجام شد و کلیه گراف‌ها توسط نرم افزار GraphPad Prism7 رسم شد. تفاوت در سطوح بیان



شکل ۱- منحنی‌های استاندارد جهت بررسی کارایی تکثیر ژن‌های هدف و رفرنس. الف: منحنی استاندارد ژن β -actin، ب: منحنی استاندارد *MALAT1*، ج: منحنی استاندارد *snord* و د: منحنی استاندارد *miR-9*. مقدار r^2 ژن‌های *MALAT1* و β -actin و مقدار r^2 ژن‌های *miR-9* و *snord* مشابه و بین ۰/۹۹۸ تا ۱ است.



شکل ۲- منحنی‌های ذوب ژن‌های هدف و رفرنس جهت بررسی اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده. الف: منحنی ذوب β -actin و مشاهده تک پیک در دمای 84°C ، ب: منحنی ذوب *MALAT1* و مشاهده تک پیک در دمای 80°C ، ج: منحنی ذوب *snord* و مشاهده تک پیک در دمای 82°C ، د: منحنی ذوب *miR-9* و مشاهده تک پیک در دمای 79°C .

کلینیکی بیماران در جدول ۳ ارائه شده است. سن یکی از مهم‌ترین فاکتورهای افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان است. بیماران مورد مطالعه از لحاظ سن به دو گروه کمتر و مساوی ۵۰ سال و بزرگتر از ۵۰ سال تقسیم شدند. نتایج نشان داد که ارتباط معناداری بین

MALAT1 در نمونه‌های بافت تومور پستان، نتایج نشان داد که به لحاظ آماری ارتباط معناداری بین بیان این RNA های غیر کدینگ وجود ندارد ($p = 0/722$ ، شکل ۴). ($r = -0/047$) ارتباط بین سطح بیان *MALAT1* و خصوصیات

تهاجمی‌تر، شامل تومورهای بزرگتر از ۵ سانتی‌متر، تومورهای در مرحله III و IV، تومورهای با درجه III و تومورهای با تهاجم به گره‌های لنفاوی، بیان MALAT1 به طور معناداری افزایش یافته است (جدول ۵). پتانسیل MALAT1 به عنوان بیومارکر تشخیصی، جهت تمایز بیماران با سرطان پستان از افراد سالم، با رسم منحنی ROC بررسی شد. سطح زیر منحنی (AUC) برای MALAT1، ۰/۷۷۳ (p=۰/۰۰۰۷) بدست آمد. حساسیت و اختصاصیت محاسبه شده به ترتیب ۷۱/۴۳ و ۹۱/۶۷ بود (شکل ۵). این نتایج نشان داد که بررسی سطح بیان MALAT1 می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی در سرطان پستان عمل کند.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف عمده تحقیقات در زمینه سرطان، شناسایی بیومارکرهای مناسب به منظور تشخیص تومور در مراحل اولیه و یا پیش‌آگهی بیماری است (۲۸). miRNAs و lncRNAs، اهداف جدید و امیدبخشی هستند که به عنوان بیومارکر برای تشخیص، پیش‌آگهی و درمان سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پستان استفاده می‌شوند (۱۰، ۲۹). این دو گروه از ncRNAها نه تنها به طور مجزا در تنظیم بیماری‌ها از جمله سرطان دخیلند بلکه ارتباط بین آنها، جنبه جدیدی از بیماری‌زایی را نشان می‌دهد. در دهه گذشته مطالعاتی در زمینه بررسی ارتباط بین miRNAs و lncRNAs در پستانداران شروع و مشخص گردیده که miRNAs علاوه بر تنظیم بیان ژن در سطح mRNA، می‌توانند با هدف‌گیری lncRNAs باعث کاهش پایداری آنها شوند و از طرف دیگر lncRNAs به عنوان تله‌های

جدول ۲- تعداد و خصوصیات کلینیکی بیماران مورد مطالعه

تعداد نمونه	خصوصیات کلینیکی بیماران
	سن (۱۲/۰۵ ± ۵۲/۷۴)
۱۲ (٪ ۳۸/۷)	کمتر و مساوی ۵۰ سال
۱۹ (٪ ۶۱/۳)	بیشتر از ۵۰ سال
	اندازه تومور (سانتی‌متر)
۲۰ (٪ ۶۴/۵)	کمتر و مساوی ۵ سانتی‌متر
۱۱ (٪ ۳۵/۵)	بیش‌تر از ۵ سانتی‌متر
	مرحله تومور
۱۹ (٪ ۶۱/۳)	مرحله II/I
۱۲ (٪ ۳۸/۷)	مرحله IV/III
	درجه هیستولوژیک تومور
۱۸ (٪ ۵۸/۱)	درجه II/I
۱۳ (٪ ۴۱/۹)	درجه III
	درگیری غدد لنفاوی
۱۸ (٪ ۵۸/۱)	مثبت
۱۳ (٪ ۴۱/۹)	منفی
	سابقه فامیلی سرطان
۸ (٪ ۲۵/۸)	مثبت
۲۳ (٪ ۷۴/۲)	منفی

بیان MALAT1 و سن بیماران وجود دارد (p<۰/۰۰۱) (جدول ۵). اندازه تومور، درجه هیستولوژیک تومور، مرحله تومور و تهاجم به گره‌های لنفاوی از مهم‌ترین معیارهای اندازه‌گیری پیشرفت تومور هستند. دسته بندی بیماران در این مطالعه بر اساس هر کدام از این معیارهای مذکور در جدول ۲ قابل مشاهده است. نتایج نشان داد که ارتباط مثبت و معناداری بین سطح بیان MALAT1 با اندازه تومور (p=۰/۰۰۰۲)، مرحله تومور (p<۰۰۰۱) و درجه هیستولوژیک تومور (p<۰۰۰۱) و تهاجم به گره‌های لنفاوی (p<۰۰۰۱) وجود دارد (جدول ۵). به عبارتی در تومورهای با ویژگی‌های

جدول ۳- بررسی سطح بیان MALAT1 در نمونه‌های بافت تومور پستان در مقایسه با بافت نرمال مجاور

Log ₂ fold change (-ddct)	Fold change	Sd (fold change)	تفسیر	p value
۰	۱	۰/۶۷۴	گروه مرجع	
-۱/۳۳	۰/۳۹۷	۰/۵۲۷	کاهش	۰/۰۰۰۱

جدول ۴- ربررسی سطح بیان miR-9 در نمونه‌های بافت تومور پستان در مقایسه با بافت نرمال مجاور

Log ₂ fold change (-ddct)	Fold change	Sd (fold change)	تفسیر	p value
۰	۱	۱/۲۴	گروه مرجع	
-۱/۹۶۴	۰/۲۶	۱/۵۲	کاهش	۰/۰۰۵۱

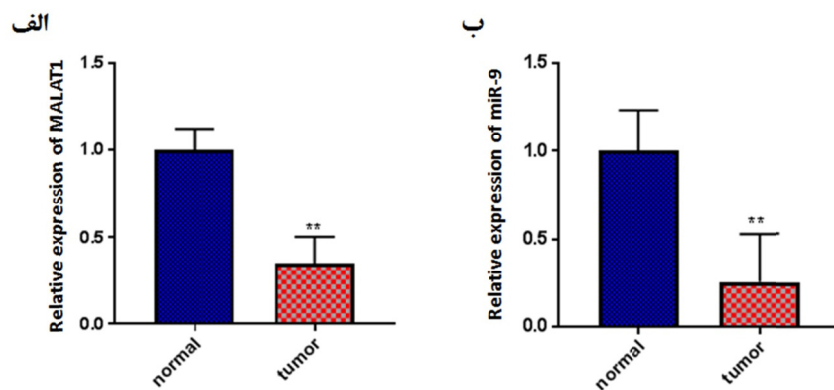
جدول ۵- ارتباط بین خصوصیات کلینیکیال تومور و سطح بیان MALAT1

P value	Fold Change Malat1	تعداد	مشخصات بیماران
*./۰۰۰۱	۰/۳۳ ± ۰/۲	۱۲	سن کمتر و مساوی ۵۰ سال
	۰/۵۷ ± ۰/۵۱	۱۹	بیشتر از ۵۰ سال
*./۰۰۰۲	۰/۳۶ ± ۰/۲۵	۲۰	اندازه تومور کمتر و مساوی ۵ سانتی متر
	۰/۷۶ ± ۰/۶۸	۱۱	بیشتر از ۵ سانتی متر
*./۰۰۰۱	۰/۶۲ ± ۰/۱۱	۱۹	مرحله تومور II/I
	۰/۵۴ ± ۱/۰۱	۱۲	مرحله IV/III
*./۰۰۰۱	۰/۴۴ ± ۰/۱۶	۱۸	درجه تومور II/I
	۱/۲۶ ± ۱/۰۵	۱۳	درجه III
*./۰۰۰۱	۰/۲۱ ± ۰/۱۶	۱۸	درگیری غدد لنفاوی مثبت
	۰/۶۵ ± ۰/۶۱	۱۳	منفی

*نشان دهنده معنادار بودن

بود در حالی که بیان گونه اسپلایس شده آن عمدتاً کاهش یافته بود (۰/۱۸/۸) (۳۳). تناقضات مشاهده شده در مطالعه سطوح بیان MALAT1 بین مطالعات مختلف، می تواند به علت وجود تفاوت های بیولوژیکی، شامل تفاوت در تخلیص سلول ها، جمعیت کنترل مطالعه شده و روش استخراج RNA و یا تفاوت های تکنیکی شامل به کارگیری روش های مختلف چون میکروآرای، PCR کمی و تعیین توالی نسل جدید و یا تفاوت در نرمال سازی داده ها و روش های آماری به کار رفته جهت آنالیز داده ها باشد. در مطالعه حاضر، ارتباط معناداری بین افزایش بیان MALAT1 با فاکتورهای کلینیکی تومور شامل سن بیمار، اندازه تومور، درجه تومور، مرحله تومور و تهاجم به گره های لنفاوی مشاهده شد. از آنجایی که از یک طرف بیان MALAT1 در بافت تومور پستان نسبت به بافت نرمال مجاور تومور کاهش یافته و از طرف دیگر در تومورهای با ویژگی های تهاجمی تر شامل تومورهای با اندازه بیشتر از ۵ سانتی متر، تومورهای با درجه III، تومورهای با مرحله IV، III و تومورهای با تهاجم به گره های لنفاوی، افزایش بیان MALAT1 مشاهده شده، بنابراین می توان گفت که بیان MALAT1 با رفتار تهاجمی تر تومور مرتبط است و احتمالاً افزایش بیان MALAT1 با متاستاز و پیشرفت سرطان پستان همراه است. این

مولکولی برای miRNA عمل کرده و با اتصال به miRNA و تسخیر آن، مانع تجزیه mRNAs هدف شوند. IncRNA ها هم چنین می توانند برای اتصال به mRNAs هدف مشترک با miRNA ها رقابت کنند (۱۴، ۳۰، ۳۱). در مطالعه حاضر، کاهش معناداری در بیان MALAT1 در بافت های تومور پستان در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور مشاهده شد. در تطابق با این یافته ها، کاهش بیان MALAT1 در رده های سلولی سرطان پستان و بافت های تومور پستان گزارش شده است (۲۱، ۲۲). Yang و همکارانش نشان دادند که MALAT1 با تنظیم منفی CCD1، تکثیر سلولی را مهار کرده و به عنوان یک سرکوبگر تومور در سرطان پستان عمل می کند (۲۲). در تضاد با این نتایج، Miao و همکارانش، افزایش بیان MALAT1 را در بافت و سرم بیماران با سرطان پستان مشاهده کردند. آن ها گزارش دادند که MALAT1 می تواند به عنوان یک مارکر ذاتی در تشخیص سرطان پستان عمل کند (۲۴). هم چنین Zidan و همکارانش دریافتند که سطح سرمی MALAT1 در بیماران با تومور پستان در مقایسه با افراد سالم افزایش نشان می دهد (۳۲). در مطالعه ای که به منظور بررسی کمیت MALAT1 با طول کامل آن و گونه اسپلایس شده آن انجام شد، بیان MALAT1 در ۱۴٪ از تومورهای پستان، افزایش یافته



شکل ۳- نمودارهای مربوط به بررسی سطوح بیان *MALAT1* و miR-9 در نمونه‌های بافت تومور پستان در مقایسه با بافت نرمال حاشیه تومور. الف) سطح بیان *MALAT1* در نمونه‌های تومور نسبت به نمونه‌های نرمال کاهش معنادار ۲/۸۷ برابری نشان داد ($p < 0.001$). ب) miR-9 در نمونه‌های تومور نسبت به نمونه‌های نرمال کاهش معنادار ۳/۹ برابری نشان داد ($p = 0.0051$). ** نشان‌دهنده معنادار بودن است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند.

نشان داد که ارتباط معناداری بین بیان *MALAT1* با miR-9 در بافت تومور پستان وجود ندارد. تا کنون گزارش مشابهی مبنی بر وجود یا عدم وجود ارتباط بین بیان این دو RNA غیر کدینگ در سرطان پستان گزارش نشده است. این در حالی است که وجود دو سایت اتصال برای miR-9 در توالی *MALAT1* توسط Leucci و همکاران نشان داده شده است. بنابراین miR9 می‌تواند با اتصال به *MALAT1* در هسته، آن را هدف تجزیه قرار دهد (۲۰). در مطالعات قبلی ارتباط بین *MALAT1* با miR-125b و miR-205 به ترتیب در سرطان مثانه و کارسینومای سلولی کلیوی مشاهده شده است (۳۱، ۳۶). در این زمینه استفاده از anti-miRها و siRNAها به منظور بررسی ارتباط بین *MALAT1* و miR-9 در رده‌های سلولی سرطان پستان پیشنهاد می‌شود. در انتها آنالیز منحنی ROC نشان داد که سطح *MALAT1* در بافت تومور پستان، حساسیت، اختصاصیت و در نتیجه پتانسیل کافی و مناسبی در تشخیص بیماران با سرطان پستان از افراد سالم دارد و می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی در سرطان پستان عمل کند. بررسی تغییرات بیان *MALAT1* در بافت‌های تومور پستان می‌تواند، جهت غربالگری این سرطان در جنبه‌های مختلف شامل تشخیص اولیه سرطان با حساسیت و اختصاصیت بالا، پیش‌آگهی تومور و خطر متاستاز و عود تومور استفاده شود و این یکی از مهم‌ترین کاربردهای نتایج حاصل از این مطالعه می‌باشد. در مجموع نتایج ما نشان داد که بیان *MALAT1* در

یافته‌ها بر خلاف یافته‌های Meseure و همکارانش است. آن‌ها ارتباطی بین افزایش بیان *MALAT1* با اندازه تومور، مرحله و درجه تومور و وضعیت غدد لنفاوی مشاهده نکردند و گزارش دادند که سطوح بالای *MALAT1* در بافت تومور پستان، نقشی در رفتار تهاجمی سرطان پستان ندارد (۳۳). ارتباط مشاهده شده در مطالعه حاضر بین افزایش بیان *MALAT1* با سن بیمار و اندازه تومور، در تضاد با نتایج Zidan و همکارانش است. آن‌ها نشان دادند که افزایش سطح *MALAT1*، ارتباطی با سن بیمار و اندازه تومور ندارد و فقط با وضعیت غدد لنفاوی، درجه و مرحله تومور مرتبط است (۳۲). در بررسی سطح بیان miR-9، کاهش معناداری در بیان miR-9 در بافت تومور پستان نسبت به بافت نرمال مجاور تومور مشاهده شد که در تأیید نتایج Hasanzadeh و Lehmann (۳۴، ۳۵) و در تناقض با نتایج برخی از مطالعات دیگر است (۲۷-۲۵). نتایج بدست آمده از مطالعات بیوانفورماتیکی، نشان داده که مسیرهای سیگنالینگ مختلفی از اهداف miR-9 هستند. برخی از این مسیرها در ارتباط با شروع و پیشرفت سرطان اند و با تومورزایی و متاستاز همراه می‌باشند و برخی هم‌چون مسیر سیگنالینگ p53 در ارتباط با مهار تومور هستند (۳۴). بنابراین miR-9 می‌تواند با هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالینگ مختلف، به عنوان یک سرکوبگر تومور و یا یک آنکومیر عمل کند و احتمالاً این یکی از دلایل مهم وجود تناقض در بین مطالعات در بررسی نقش miR-9 در سرطان‌های مختلف می‌باشد. نتایج تست پیرسون

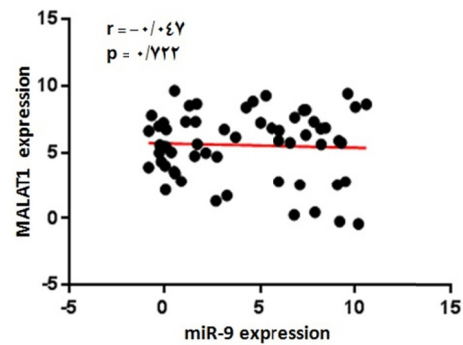
مراکز کلینیکی، مطالعات بیشتر بر روی گروه‌های بزرگتری از بیماران لازم و ضروری است.

تقدیر و تشکر

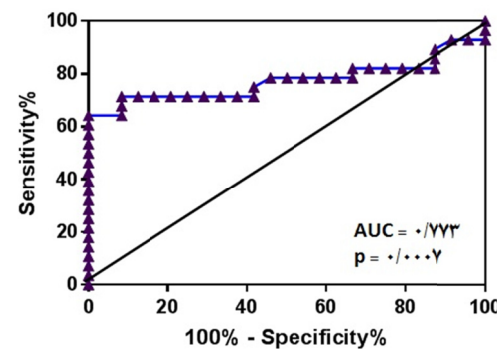
این پژوهش حاصل بخشی از پایان نامه دکترا می‌باشد که در دانشگاه اصفهان و با کمک مالی شماره ۱۱۸۴۴ اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و کمک مالی شماره ۹۶۰۲۰۲ ستاد توسعه زیست فناوری انجام شده است. از کارکنان بیمارستان سیدالشهدا شهر اصفهان و تمامی بیمارانی که در جمع‌آوری نمونه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*; 2018.68(1):7-30.
2. Sørensen KP, Thomassen M, Tan Q, Bak M, Cold S, Burton M, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 2013.142(3):529-36.
3. Enayatrad M, Amoori N, Salehiniya H. Epidemiology and trends in breast cancer mortality in Iran. *Iran J Public Health*; 2015.44(3):430.
4. Asadpour A. Isfahan: First degree of cancer in Iran. *Jame Jam*; 2006.1942:15.
5. Howlander N, Noone A, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse S. SEER cancer statistics review, 1975-2011. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2014. Based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site. 2013.
6. Zhang Y, Zhang K, Luo Z, Liu L, Wu L, Liu J. Circulating long non-coding HOX transcript antisense intergenic ribonucleic acid in plasma as a potential biomarker for diagnosis of breast cancer. *Thoracic Cancer*; 2016.7(6):627-32.
7. Cerik S, Schwarzenbacher D, Adiprasito JB, Stotz M, Hutterer GC, Gerger A, et al. Current status of long non-coding RNAs in human breast cancer. *Int J Mol Sci*; 2016.17(9):1485.
8. Mallory AC, Shkumatava A. LncRNAs in vertebrates: advances and challenges. *Biochimie*; 2015.117:3-14.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*; 2004.116(2):281-97.
10. Shi T, Gao G, Cao Y. Long noncoding RNAs as novel biomarkers have a promising future in cancer diagnostics. *Dis Markers*; 2016.2016.
11. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol*;



شکل ۴- نمودار ارتباط بین سطح بیان *MALAT1* و *miR-9* در نمونه‌های بافت تومور پستان. آنالیز رگرسیون و تست پیرسون نشان داد که ارتباط معناداری بین بیان این دو RNA غیر کدینگ وجود ندارد.



شکل ۵- منحنی ROC به منظور بررسی ارزش تشخیصی *MALAT1* در سرطان پستان. سطح زیر منحنی (AUC = 0.773)، نشان دهنده حساسیت و اختصاصیت کافی *MALAT1* به عنوان بیومارکر، در تشخیص بیماران با سرطان پستان از افراد سالم است.

بافت‌های تومور پستان در مقایسه با بافت‌های نرمال مجاور تومور به‌طور معناداری کاهش یافته است. علاوه بر آن ارتباط آماری معناداری بین بیان *MALAT1* و *miR-9* در بافت‌های توموری مشاهده نشد. هم‌چنین یک ارتباط مثبتی بین بیان *MALAT1* با مشخصات کلینیکی بیماران دیده شد. این ارتباط مثبت نشان داد که افزایش بیان *MALAT1* نقش مهمی در پیشرفت و بدخیمی تومور بازی می‌کند. در نهایت با بررسی سطح بیان *MALAT1* در بافت پستان، می‌توان بیماران با سرطان پستان را از افراد سالم تشخیص داد. در نتیجه *MALAT1* می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی در سرطان پستان عمل کند. یکی از محدودیت‌های این مطالعه، بررسی جمعیت آماری نسبتاً کوچکی از بیماران با سرطان پستان است. به منظور دستیابی به نتایج معتبرتر و امکان استفاده از *MALAT1* به عنوان یک بیومارکر ذاتی در تشخیص بیماران با سرطان پستان در

2011.21(6):354-61.

12. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Rev Genet*; 2009.10(3):155.

13. Li J, Meng H, Bai Y, Wang K. Regulation of lncRNA and its role in cancer metastasis. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*; 2016.23(5):205-17.

14. Bayoumi AS, Sayed A, Broskova Z, Teoh J-P, Wilson J, Su H, et al. Crosstalk between long noncoding RNAs and microRNAs in health and disease. *Int J Mol Sci*; 2016.17(3):356.

15. Gutschner T, Hämmerle M, Diederichs S. MALAT1—aparadigm for long noncoding RNA function in cancer. *J Mol Med*; 2013.91(7):791-801.

16. Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, Nakagawa S. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*; 2016.1859(1):192-9.

17. Zhang J, Zhang B, Wang T, Wang H. LncRNA MALAT1 overexpression is an unfavorable prognostic factor in human cancer: evidence from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*; 2015.8(4):5499.

18. Wei Y, Niu B. Role of MALAT1 as a prognostic factor for survival in various cancers: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Dis Markers*; 2015.2015.

19. Wang Y, Xue D, Li Y, Pan X, Zhang X, Kuang B, et al. The long noncoding RNA MALAT-1 is a novel biomarker in various cancers: a meta-analysis based on the GEO database and literature. *J Cancer*; 2016.7(8):991.

20. Leucci E, Patella F, Waage J, Holmstrøm K, Lindow M, Porse B, et al. microRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci Rep*; 2013.3:2535.

21. Xu S, Sui S, Zhang J, Bai N, Shi Q, Zhang G, et al. Downregulation of long noncoding RNA MALAT1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K-AKT pathway in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*; 2015.8(5):4881.

22. Yang Z, Lu W, Ning L, Hao D, Jian S, Hai-Feng C. Downregulation of long non-coding RNA MALAT1 induces tumor progression of human breast cancer through regulating CCND1 expression. *Open Life Sci*; 2016.11(1):232-6.

23. Zhao Z, Chen C, Liu Y, Wu C. 17 β -Estradiol treatment inhibits breast cell proliferation, migration and invasion by decreasing MALAT-1 RNA level. *Biochem Biophys Res Commun*; 2014.445(2): 388-93.

24. Miao Y, Fan R, Chen L, Qian H. Clinical significance of long non-coding RNA MALAT1 expression in tissue and serum of breast cancer. *Ann Clin Lab Sci*; 2016.46(4):418-24.

25. Zhou X, Marian C, Makambi KH, Kostı O, Kallakury BV, Loffredo CA, et al. MicroRNA-9 as potential biomarker for breast cancer local recurrence and tumor estrogen receptor status. *PloS One*;

2012.7(6):e39011.

26. Mohammadi-Yeganeh S, Mansouri A, Paryan M. Targeting Of miR9/NOTCH1 Interaction Reduces Metastatic Behavior in Triple-negative Breast Cancer. *Chem Biol Drug Des*; 2015.86(5):1185-91.

27. Liu X, Luo Z, Peng H, Jiang H, Xu L. Prognostic role of miR-9 expression in various human malignant neoplasms: a meta-analysis. *Oncol Targets Ther*; 2016.9:3039.

28. Weber DG, Johnen G, Casjens S, Bryk O, Pesch B, Jöckel KH, et al. Evaluation of long noncoding RNA MALAT1 as a candidate blood-based biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer. *BMC Res Notes*; 2013.6(1):518.

29. Fernandez-Mercado M, Manterola L, Larrea E, Goicoechea I, Arestin M, Armesto M, et al. The circulating transcriptome as a source of non-invasive cancer biomarkers: concepts and controversies of non-coding and coding RNA in body fluids. *J Cell Mol Med*; 2015.19(10):2307-23.

30. Liu Y, Sun M, Xia R, Zhang E, Liu X, Zhang Z, et al. LincHOTAIR epigenetically silences miR34a by binding to PRC2 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in human gastric cancer. *Cell Death Dis*; 2015.6(7):e1802.

31. Han Y, Liu Y, Zhang H, Wang T, Diao R, Jiang Z, et al. Hsa-miR-125b suppresses bladder cancer development by down-regulating oncogene SIRT7 and oncogenic long non-coding RNA MALAT1. *FEBS Lett*; 2013.587(23):3875-82.

32. Zidan HE, Karam RA, El-Seifi OS, Elrahman TMA. Circulating long non-coding RNA MALAT1 expression as molecular biomarker in Egyptian patients with breast cancer. *Cancer Genet*; 2018.220:32-7.

33. Meseure D, Vacher S, Lallemand F, Alsibai KD, Hatem R, Chemlali W, et al. Prognostic value of a newly identified MALAT1 alternatively spliced transcript in breast cancer. *Br J Cancer*; 2016.114(12):1395.

34. Hasanzadeh A, Tanha HM, Ghaedi K, Madani M. Aberrant expression of miR-9 in benign and malignant breast tumors. *Mol Cell Probes*; 2016.30(5):279-84.

35. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol*; 2008.214(1):17-24.

36. Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, Deng G, Nakajima K, Tabatabai ZL, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with miR-205. *Cancer Res*; 2015.