



Over Expression of Long Non-Coding RNA HULC in Women with Breast Invasive Ductal Carcinoma in East Azerbaijan Province

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ravanbakhsh Gavvani R.¹ PhD,
Babaei E.*¹ PhD,
Hosseinpourfeizi M.A.¹ PhD,
Fakhrjou A.² PhD,
Montazeri V.³ PhD

How to cite this article

Ravanbakhsh Gavvani R, Babaei E, Hosseinpourfeizi M.A, Fakhrjou A, Montazeri V. Over Expression of Long Non-Coding RNA HULC in Women with Breast Invasive Ductal Carcinoma in East Azerbaijan Province. Pathobiology Research .2019; 22(2):97-102.

¹Biological Sciences Department, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Pathology Department, Medicine Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Thoracic Surgery Department, Medicine Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Correspondence

Address: Biological Sciences Department, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Postal Code: 5166616471

Phone: +98 (41) 33392686

Fax: +98 (41) 33356026

babaei@tabrizu.ac.ir

Article History

Received: September 30, 2018

Accepted: March 11, 2019

ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Aims Despite recent advances in diagnosis and treatment, breast cancer still remains the second leading cause of cancer-related death in women. Recent reports have detected a new class of non-coding molecules named long non-coding RNAs that play an important role in various biological processes involved in cancer. This study aimed to evaluate the expression level of long non-coding RNA HULC in breast cancer.

Materials & Methods In this experimental study, after collecting 40 breast tumors with invasive ductal carcinoma and 40 normal marginal tissues, RNA extraction and cDNA synthesis were done. The expression level of HULC was obtained by using the qRT-PCR method. REST 2009 software was employed to evaluate the association of its expression in tumor and normal tissues. Biomarker potential of HULC was evaluated by drawing ROC curve. Relationship between HULC expression and clinicopathological features was analyzed.

Results Results from REST indicated significant upregulation of HULC in tumor tissues compared to normal marginal specimens (95% CI; p=0.0001). ROC curve analysis also demonstrated the biomarker potential of HULC in breast cancer (ROCAUC=0.79; p<0.0001). Evaluation of the relationship between HULC expression and clinicopathological features revealed that there is a statistically significant positive correlation of HULC expression with advanced stages (95% CI; P=0.019).

Conclusion Considering the upregulation of HULC expression in invasive ductal carcinoma, this lncRNA could be considered as a new potential diagnostic biomarker in breast cancer.

Keywords Invasive Ductal Carcinoma ; Long Non-Coding RNA; HULC; Biomarkers

CITATION LINKS

[1] Cancer screening in the United States, 2017: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in ... [2] Non-coding RNAs in human ... [3] The functional role of long non-coding RNA in human ... [4] LncRNA NEAT1 impacts cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer via ... [5] LncRNA-TCONS_00034812 in cell proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle ... [6] Noncoding RNA and Polycomb ... [7] Long non-coding RNA and Polycomb: An intricate partnership in cancer ... [8] Invasion and metastasis-related long noncoding RNA expression profiles in ... [9] Long non-coding RNA implicated in the invasion and metastasis of head and neck ... [10] Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in Hepatoma cells through an miR-9-mediated ... [11] High expression of long noncoding RNA HULC is a poor predictor of prognosis and regulates cell ... [12] Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma. Int J Clin Exp ... [13] A novel lncRNA, LUADT1, promotes lung adenocarcinoma proliferation via the ... [14] Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation by ... [15] Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular ... [16] Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with ... [17] HULC and H19 played different roles in overall and disease-free survival from hepatocellular carcinoma after curative ... [18] Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical ... [19] Long non-coding RNA HULC promotes bladder cancer cells proliferation but inhibits apoptosis via regulation [20] The lncRNA HULC functions as an oncogene by targeting ATG7 and ITGB1 in epithelial ovarian ... [21] Long noncoding RNA highly up-regulated in liver cancer predicts unfavorable outcome and regulates metastasis- ... [22] Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the ... [23] Plasma HULC as a promising novel biomarker for ...

افزایش بیان RNA غیرکدکننده طویل HULC در زنان مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجاری پستان در استان آذربایجان شرقی

ریحانه روان بخش‌گاوانی PhD

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اسماعیل بابائی * PhD

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

محمدعلی حسین‌پور فیضی PhD

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اشرف فخرجو PhD

گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

وحید منتظری MD

گروه جراحی توراکس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

اهداف: علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در زمینه تشخیص و درمان، سرطان پستان همچنان دومین عامل مرگ مرتبط با سرطان در میان زنان جهان است. گزارش‌های اخیر، گروه جدیدی از مولکول‌های غیرکدکننده به نام RNAهای غیرکدکننده طویل را شناسایی کرده‌اند که نقش مهمی را در فرآیندهای بیولوژیکی متعدد درگیر در سرطان ایفا می‌کنند. هدف از این مطالعه، ارزیابی بیان RNA غیرکدکننده طویل HULC در سرطان پستان بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، پس از جمع‌آوری ۴۰ نمونه بافت توموری کارسینومای تهاجمی مجاری پستان و ۴۰ بافت سالم حاشیه تومور، استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. با استفاده از PCR کمی، سطح بیان HULC در نمونه‌ها به دست آمد. از نرم‌افزار REST 2009 به منظور بررسی ارتباط بیان آن در بافت‌های توموری و بافت‌های سالم، استفاده شد. توان بیومارکری HULC نیز با رسم منحنی ROC ارزیابی شد. ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکیوپاتولوژیکی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از نرم‌افزار REST افزایش معنی‌دار بیان HULC را در بافت‌های توموری نسبت به حاشیه سالم آنها نشان داد ($p=0/0001$; CI ۹۵٪). آنالیز منحنی ROC نیز توان بیومارکری HULC را در سرطان پستان ثابت کرد ($ROC AUC=0/79$; $p<0/0001$). نتایج بررسی بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکیوپاتولوژیکی نشان داد که بین بیان HULC با مراحل پیشرفته تومور رابطه مثبت معنی‌داری وجود دارد ($p=0/019$; CI ۹۵٪).

نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش بیان HULC در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان، بیان این RNA غیرکدکننده طویل می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی بالقوه جدید در سرطان پستان مطرح شود.

کلیدواژه‌ها: کارسینومای تهاجمی مجاری، RNA غیرکدکننده طویل، HULC، بیومارکرها

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰

*نویسنده مسئول: babaei@tabrizu.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای در راستای معرفی مارکرهای مولکولی با توانایی پیش‌بینی ماهیت تومورها و امکان به‌کارگیری آنها به عنوان فاکتور کمک تشخیصی و پیش‌آگهی در کنار روش‌های دقیق پاتولوژیکی، صورت گرفته است. با وجود سال‌ها تلاش و تحقیق در این زمینه، سرطان پستان همچنان شایع‌ترین بدخیمی و دومین عامل عمده مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان جهان است. طبق آمار ارایه شده، سالانه تقریباً ۲۵٪ تشخیص‌های مرتبط به سرطان و ۱۵٪ مرگ ناشی از آن، به تومور پستان اختصاص دارد [1]. بنابراین بهبود استراتژی‌های تشخیصی و درمانی با استفاده روش‌های درمانی بالقوه باید از اولویت‌های تحقیقاتی باشد. در سال‌های اخیر به‌کارگیری بیومارکرهای ژنتیکی برای نیل به این

هدف توانسته است مژمژم واقع شود. با این وجود، به‌منظور یافتن بیومارکرهای بالقوه، فهم مسیرهای ژنتیکی و مولکولی که بتواند ایجاد، پیشرفت و گسترش سرطان را کنترل کند بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

با ظهور تکنولوژی‌های جدید توالی‌یابی ترانسکریپتوم، مشخص شده است که حدود ۹۰٪ ژنوم انسانی به‌طور فعالی RNAهای غیرکدکننده را رونویسی می‌کنند، در حالی که، حدود تنها ۲۰ هزار ژن که کمتر از ۲٪ ژنوم را شامل می‌شود، کدکننده پروتئین هستند [2]. RNAهای غیرکدکننده طویل (lncRNAs) به‌عنوان تنظیم‌کنندگان بیان ژن، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. این RNAها اغلب رونوشت‌های طویل‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که به‌عنوان مولکول‌های RNA سلولی درون‌زا با ژن‌های کمتر محافظت‌شده طی تکامل معروف هستند [3]. شواهد زیادی نشان می‌دهد که lncRNAها نقش مهمی در مسیرهای سلولی متعددی از جمله تکثیر سلولی و آپوپتوز [4، 5]، اپی‌ژنتیک [6، 7]، تهاجم و متاستاز [8، 9] و متابولیسم لیپید [10] ایفا می‌کنند. بنابراین، جای تعجب نخواهد بود که به‌هم‌خوردن تنظیم بیان lncRNAs با ایجاد اثرات وخیم بر بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی باعث بیماری به‌ویژه انواع مختلف سرطان از جمله گلیوما [11]، سرطان استخوان [12]، ریه [13] و کبد [14] می‌شود. در مجموع، این یافته‌ها اهمیت RNAهای غیرکدکننده طویل را برای معرفی به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی، پیش‌آگهی با اهداف درمانی بالقوه بیش از پیش آشکار می‌کنند.

RNA بیش بیان‌یافته در سرطان کبد (HULC)، به‌عنوان RNA بیش بیان‌شده در بیماران مبتلا به سرطان کبد برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ گزارش شد [15] و نقش آن نیز به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی مشخص شد [16، 17]. ژن RNA غیرکدکننده HULC با دو آگرون فاقد توانایی کدکنندگی پروتئین، روی کروموزوم 6p24.3 قرار گرفته است [15]. مطالعات نشان می‌دهد این lncRNA متعلق به سرطان کبد نیست و افزایش بیان این lncRNA در سرطان‌های دیگری از جمله سرطان معده [18] و گلیوما [11] نیز گزارش شده است. علی‌رغم این مطالعات، بیان HULC و نقش آن در سرطان پستان هنوز مشخص نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر به تشخیص و ارزیابی بیان RNA غیرکدکننده طویل HULC در سرطان پستان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

۱) جمع‌آوری نمونه‌های انسانی و بررسی نتایج پاتولوژی آنها نمونه‌های بافتی انسانی بلافاصله پس از برش در اتاق عمل، داخل ازت مایع به محل آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- ذخیره شدند. پس از بررسی نتایج آسیب‌شناسی بیماران بستری در بیمارستان نورنجات، ۴۰ نمونه بافت توموری با آسیب‌شناسی کارسینومای تهاجمی مجاری پستان به همراه نمونه‌های بافت سالم حاشیه تومور مربوطه، انتخاب شد. قبل از جمع‌آوری نمونه‌ها، رضایت‌نامه کتبی از بیماران به دست آمد. این مطالعه با تایید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد (شماره تایید: IR.TBZMED.REC.1392.249). مشخصات بیماران از نظر سن، سمت درگیر، اندازه تومور، درگیری گره‌های لنفاوی، درجه تمایز تومور در جدول ۱ ذکر شده است. میانگین سنی بیماران مورد بررسی (۵۲/۴۲±۱/۹۲) ۸۰-۳۵ سال بود. بافت‌های تومور براساس سیستم TNM دسته‌بندی شدند.

صورت گرفته به ترتیب زیر بود: واسرشتگی اولیه 95°C به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشتگی 95°C به مدت ۲۵ ثانیه، تکثیر 59°C به مدت ۲۵ ثانیه، گسترش 72°C به مدت ۲۵ ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی 72°C به مدت ۳ دقیقه. بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی برای نرمال کردن داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. PCR در زمان واقعی در سه تکرار مستقل انجام شد. همچنین به منظور تایید بیشتر هویت باندهای تکثیرشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای HULC، چند نمونه از محصولات PCR توالی‌یابی شدند. لازم به ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Gene Runner v. 3.05 طراحی شده و اختصاصی بودن پرایمرها، در سایت NCBI بررسی شد.

۴) آنالیز آماری نتایج

برای بررسی تغییرات بیان HULC در بافت‌های توموری پستان نسبت به بافت‌های حاشیه سالم مجاور آن، از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد. برای بررسی ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکیوپاتولوژیکی، از فرمول محاسبه بیان نسبی ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) استفاده شد. در این فرمول $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{HULC}) - \text{Ct}(\beta\text{-actin})$ است. آنالیز آماری بین دو گروه توسط آزمون T- استیودنت و در بیش از دو گروه توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه انجام شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 22.0 مورد آنالیز قرار گرفتند. لازم به ذکر است برای ارزیابی نرمال بودن توزیع بیان RNA غیرکدکننده HULC در نمونه‌ها، آزمون کالموگروف-اسمیرنوف به کار رفت. همچنین به منظور ارزیابی پتانسیل بیومارکری RNA غیرکدکننده HULC از نرم‌افزار سیگما پلات ۱۲/۵ (منحنی ROC) استفاده شد. این نرم‌افزار، آنالیزهای لازم برای بررسی پتانسیل یک ژن یا تست را برای مطرح شدن به عنوان یک بیومارکر، بررسی می‌کند. در این آنالیز، مقادیر بیان نسبی HULC در بافت‌های توموری و بافت‌های غیرتوموری حاشیه آن (به عنوان بافت نرمال در نظر گرفته شده است)، مورد استفاده قرار گرفت. سطح زیر نمودار (AUC یا A)، بیانگر توانایی عامل مورد بررسی به منظور قرارگرفتن به عنوان بیومارکر تشخیصی است. هرچه AUC به سمت یک متمایل شود این توانایی افزایش می‌یابد.

در این مطالعه، آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و مقادیر ارایه شده به صورت میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین بودند.

یافته‌ها

۱) افزایش بیان HULC در بافت‌های توموری پستان در مقایسه با بافت‌های حاشیه سالم مجاور

نتایج اولیه مطالعه حاضر بیان متمایز HULC را در بافت‌های توموری پستان نشان داد (شکل ۱-A) و به منظور اطمینان بیشتر از هویت باند تکثیرشده، چند نمونه از محصولات PCR توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی تایید کرد که ژن تکثیرشده متعلق به ژن HULC است (شکل ۱-B).

نتایج حاصل از نرم‌افزار REST، تفاوت معنی‌دار بیان ژن HULC در نمونه‌های توموری نسبت به حاشیه تومور نشان داد. براساس نتایج حاصل، بیان ژن HULC در نمونه‌های توموری ۹/۱ برابر بیشتر از نمونه‌های حاشیه سالم مربوطه است ($p = 0.001$ ، 91.1 ± 0.654 ، CI ۹۵٪؛ نمودار ۱).

۲) توانایی HULC به عنوان بیومارکر تشخیصی بالقوه

به منظور ارزیابی پتانسیل بیومارکری HULC، آنالیز منحنی ROC با استفاده از نرم‌افزار سیگما پلات صورت گرفت. نتایج حاصل نشان

جدول ۱) ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکیوپاتولوژیکی بیماران مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجاری پستان

ویژگی‌ها	تعداد بیماران (%)	HULC (میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین)	ارزش عددی P
گروه سنی (سال)			
کمتر از ۴۵	۱۷ (۴۲/۵)	۱۴/۸۹ \pm ۰/۹۹	۰/۴۲۲
بیشتر از ۴۵	۲۳ (۵۷/۵)	۱۴/۵۱ \pm ۰/۷۱	
اندازه تومور			
کمتر از ۲ سانتی‌متر	۲۱ (۵۲/۵)	۱۳/۹۲ \pm ۰/۷۴	۰/۴۸۵
بیشتر از ۲ سانتی‌متر	۱۶ (۴۰/۰)	۱۵/۳۵ \pm ۰/۹۴	
مرحله تومور براساس TNM			
مرحله یک	۱۴ (۳۵/۰)	۱۶/۸۶ \pm ۰/۹۰	۰/۰۱۹*
مرحله دو	۱۳ (۳۲/۵)	۱۴/۴۵ \pm ۰/۱۱	
مرحله سه	۱۰ (۲۵/۰)	۱۳/۱۹ \pm ۰/۹۸	
متاستاز به گره‌های لنفاوی			
ندارد	۱۴ (۳۵/۰)	۱۳/۴۲ \pm ۰/۱۳	۰/۱۸۶
دارد	۲۴ (۶۰/۰)	۱۵/۴۱ \pm ۰/۶۷	
درجه تمایز تومور			
ضعیف	۴ (۱۰/۰)	۱۱/۶۸ \pm ۰/۵۰	۰/۰۲۲
متوسط	۳۰ (۷۵/۰)	۱۴/۹۱ \pm ۰/۶۴	
خوب	۴ (۱۰/۰)	۱۵/۸۶ \pm ۰/۷۲	
محل تومور			
پستان راست	۱۷ (۴۲/۵)	۱۴/۵۵ \pm ۰/۹۶	۰/۶۴
پستان چپ	۱۹ (۴۷/۵)	۱۵/۱۳ \pm ۰/۷۷	

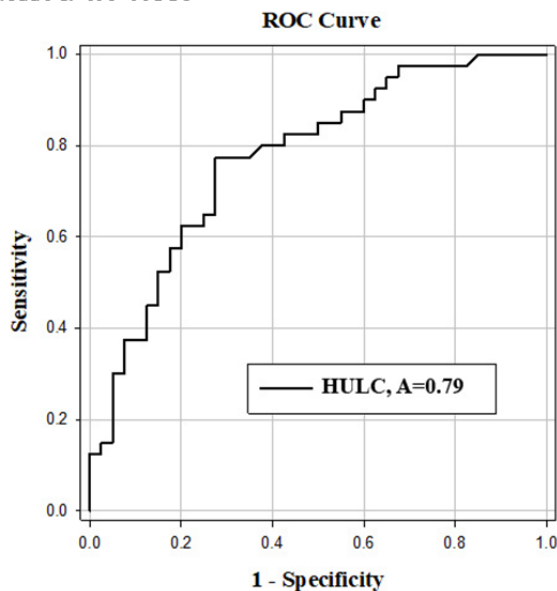
توجه: ارزش عددی با قلم ضخیم نوشته شده، معنی‌دار است ($p < 0.05$).

۲) استخراج RNA

استخراج RNA تام سلولی از نمونه‌های بافتی انسانی جمع‌آوری شده با استفاده از کیت تریزول (اینویترژن؛ ایالات متحده) و طبق پروتکل شرکت صورت گرفت. کیفیت RNAهای استخراج شده با الکتروفورز داخل ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین شدند. نمایان شدن باندهای 5S، 18S و 28S حاکی از کیفیت بالای RNAهای استخراجی هستند. تعیین غلظت و درجه خلوص RNAهای استخراجی با اندازه‌گیری جذب آنها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، توسط دستگاه پیکودراپ صورت گرفت.

۳) سنتز cDNA و qPCR

غلظت RNAهای استخراجی که در محدوده ۶۰۰-۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (OD) در بازه ۲-۱/۶ قرار داشتند، برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور یک میکروگرم از RNA استخراجی با آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و توسط کیت سنتز PrimeScript RT (تاکارا؛ چین) و طبق پروتکل شرکت به cDNA تبدیل شد. qPCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی برای ژن‌های ACTB (بتا-اکتین) و HULC و با استفاده از کیت SYBR® Premix EX Taq™ II (تاکارا؛ چین) توسط دستگاه Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences؛ استرالیا) انجام شد. توالی‌های پرایمر مورد استفاده به منظور تکثیر HULC برای پرایمر مستقیم '5'ATCGTGGACATTTCAACCTC3' و توالی پرایمر معکوس '5'GCTGTGCTTAGTTTATTGCC3' و توالی مورد استفاده برای تکثیر بتا-اکتین برای پرایمر مستقیم '5'AGAGCTACGAGCTGCCTGAC3' و پرایمر معکوس '5'AGCACTGTGTTGGCGTACAG3' است. اندازه محصول تکثیرشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای HULC، ۱۶۱ جفت‌باز و برای بتا-اکتین، ۱۸۴ جفت‌باز بود. برنامه qPCR



نمودار ۲) منحنی ROC برای ژن HULC: سطح زیر نمودار (A) نشان‌دهنده توان بیومارکری بیان HULC در بافت‌های توموری سرطان پستان است.

۳) ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی

نتایج بررسی بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی نشان داد که بین افزایش بیان این lncRNA با مراحل پیشرفته تومور (Stage III) ارتباط معنی‌داری وجود دارد (p=0/019, CI ۹۵٪). نتایج حاصل ارتباط معنی‌داری با سایر ویژگی‌ها نشان نداد (p>0/05, CI ۹۵٪؛ جدول ۱).

بحث

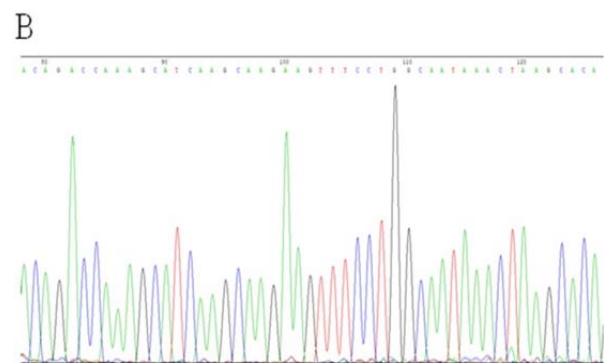
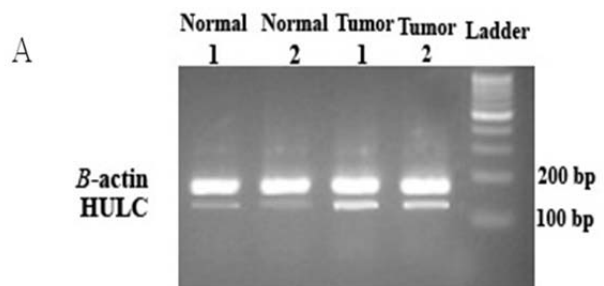
سرطان پستان که در حدود ۸۰٪ آن از نوع کارسینومای نهانجی مجاری پستان است [1]، همچنان به‌عنوان شایع‌ترین سرطان در میان زنان جهان است. اگرچه این سرطان بروز بالایی در کشورهای پیشرفته دارد ولی تقریباً ۶۴٪ مرگ ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد [1]. علی‌رغم تلاش‌های بسیار برای یافتن راهکارهای درمانی برای تشخیص و درمان سرطان پستان، مکانیزم‌های ژنتیک مولکولی درگیر در پاتوژنز این بیماری همچنان ناشناخته باقی مانده است.

با توجه به شواهد اخیر مبنی بر نقش گروه جدیدی از مولکول‌های غیرکدکننده به نام RNAهای غیرکدکننده طویل در سرطان، در این مطالعه بیان RNA غیرکدکننده طویل جدید به نام HULC مورد ارزیابی قرار گرفت.

HULC برای اولین بار پانزیت و همکاران در سال ۲۰۰۷ افزایش بیان این RNA را در سرطان کبد گزارش کردند [15]. پس از آن مطالعات تغییرات بیان این lncRNA در سرطان‌های دیگر آغاز شد به‌طوری که ونگ و همکاران [19]، ژائو و همکاران [18]، یان و همکاران [11]، چن و همکاران [20] و همچنین شی و همکاران [21]، افزایش بیان HULC را به‌ترتیب در بیماران مبتلا به سرطان مثانه، معده، گلیوما، تخمدان و همچنین سرطان پستان سه‌گانه منفی نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر نیز هم‌راستا با این مطالعات، افزایش بیان HULC را در سرطان پستان نشان داد.

یکی از اهداف اصلی در مطالعه حاضر، ارزیابی توان بیومارکری (به‌عنوان بیومارکر تشخیصی و پیش‌آگهی) تغییرات بیان HULC در سرطان پستان بود. به همین منظور آنالیز منحنی ROC برای

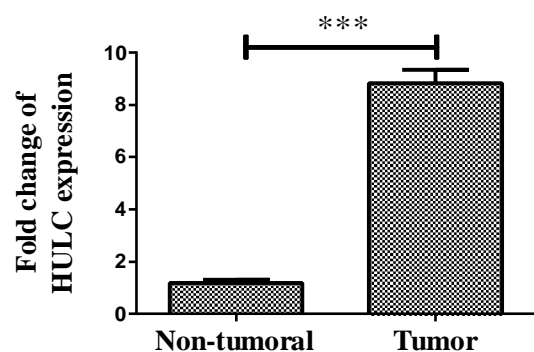
داد که سطح زیر نمودار (AUC) برای HULC، ۰/۷۹ است (p<0/0001, CI ۹۵٪). که این میزان در سطح خوب و قابل قبولی است و بنابراین بیان این ژن می‌تواند به‌عنوان بیومارکر مناسب برای تشخیص سرطان پستان در نمونه‌های بافتی محسوب شود. حساسیت و اختصاصیت به‌دست‌آمده به‌ترتیب ۰/۷۸ و ۰/۷۳ است و مقدار Cut off محاسبه‌شده ۱۷/۱ است (نمودار ۲).



Homo sapiens hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA (HULC), long non-coding RNA Sequence ID: NR_004855.2 Length: 500 Number of Matches: 1

Range 1: 192 to 306	GenBank	Graphics	Text Match & Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
193 bits (104)	3e-47	111/115 (97%)	2/115 (1%)	Plus/Plus
Query 14	TGNATCTTTGG-A-NAACTCTGAAGTAAAGGCCGGAAATATCTTTGTTTAAACATTAAA	71		
Sbjct 192	TGTATCTTTGGAGAAATCTGAAGTAAAGGCCGGAAATATCTTTGTTTAAACATTAAA	251		
Query 72	AACAAAACAGACCAAGCATCAAGCAAGAAAGTTTCTGGCAATAAACAAGCACA	126		
Sbjct 252	AACAAAACAGACCAAGCATCAAGCAAGAAAGTTTCTGGCAATAAACAAGCACA	306		

شکل ۱) بیان ژن HULC. شکل A نمایانگر بارگذاری باندهای تکثیرشده بتا-اکتین و HULC در ژل آگارز ۳٪ است. افزایش بیان HULC در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های نرمال دیده می‌شود. مارکر مورد استفاده ۱۰۰ جفت‌باز است. شکل B به‌منظور اطمینان از هویت باندهای تکثیرشده، ابتدا چند نمونه حاصل از تکثیر PCR توالی‌یابی شدند و سپس توالی‌ها در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بررسی نشان می‌دهد که باندهای تکثیر یافته متعلق به HULC است.



نمودار ۱) نمودار افزایش معنی‌دار بیان ژن HULC در نمونه‌های توموری نسبت به بافت‌های غیرتوموری حاشیه آن نشان می‌دهد (p<0/0001 (***)).

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش بیان HULC در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان، بیان این RNA غیرکدکننده طویل می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی بالقوه جدید در سرطان پستان مطرح شود.

تشکر و قدردانی: بر خود فرض می‌دانیم که از تمامی مسئولین و پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان نورنجات تبریز که در تهیه نمونه‌های بافتی همکاری داشتند و نیز کارکنان دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی نماییم.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر با تایید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (شماره تایید: IR.TBZMED.REC.1392.249) صورت گرفته است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ریحانه روان‌بخش‌گاوانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ اسماعیل بابائی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۴۰٪)؛ محمدعلی حسین‌پور فیضی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۱۰٪)؛ اشرف فخرجو (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ وحید منتظری (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر در دانشگاه تبریز و تحت حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شد (شماره طرح: ۹۳۰۴۵۰۱).

منابع

- Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2017: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):100-21.
- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(12):861-74.
- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol cancer* 2011;10(1):38.
- Peng W, Wang Z, Fan H. LncRNA NEAT1 impacts cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer via regulation of Akt signaling. *Pathol Oncol Res.* 2017; 23(3):651-6.
- Liu Y, Sun Z, Zhu J, Xiao B, Dong J, Li X. LncRNA-TCONS_00034812 in cell proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells and its mechanism. *J Cell physiol.* 2018; 233(6): 4801-14.
- Brockdorff N. Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *RNA.* 2013; 19(4): 429-42.
- Achour C, Aguilo F. Long non-coding RNA and Polycomb: An intricate partnership in cancer biology. 2018; 23:2106-32.
- Gao Y, Chen G, Zeng Y, Zeng J, Lin M, Liu X, Liu J. Invasion and metastasis-related long noncoding RNA expression profiles in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2015;36(10):7409-22.
- Luo X, Qiu Y, Jiang Y, Chen F, Jiang L, Zhou Y, et al. Long non-coding RNA implicated in the invasion and metastasis of head and neck cancer: Possible function

بررسی پتانسیل تشخیصی آن صورت گرفت. نتایج حاصل از منحنی ROC، سطح زیرمنحنی (AUC) را ۰/۷۸ نشان داد. این میزان از AUC، بیانگر توان بیومارکری HULC در تشخیص بافت‌های توموری از نمونه‌های سالم است. نتایج این مطالعه هم‌راستا با مطالعات پانزیت و همکاران^[15] و ژائو و همکاران بود که توان تشخیصی بیان HULC را به‌ترتیب در سرطان کبد (AUC=۰/۷۸) و سرطان معده به اثبات رسانده بودند (AUC=۰/۷۶۹)^[18].

علاوه بر توان تشخیصی این بیومارکر، هدف این تحقیق بررسی توان این بیومارکر در پیش‌آگهی سرطان پستان نیز است. مطالعات انجام‌شده روی بیماران مبتلا به سرطان معده^[18] و سرطان استخوان^[12]، با هدف بررسی رابطه بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی، نشان داد که بین بیان این lncRNA و مراحل پیشرفته تومور رابطه معنی‌داری وجود دارد. نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با مطالعات صورت‌گرفته در سرطان معده^[18]، استخوان^[12] و سرطان پستان سه‌گانه منفی^[21] است. علاوه بر این، ژائو و همکاران^[18]، سان و همکاران^[12] و همچنین شی و همکاران^[21] نشان دادند که بین بیان بالای HULC و متاستاز به گره‌های لنفاوی و متاستاز به نواحی دور ارتباط معنی‌داری وجود دارد. مطالعه دیگر صورت‌گرفته روی بیماران مبتلا به سرطان گلیوما نشان داد که رابطه معنی‌داری بین بیان HULC با درجه تمایز ضعیف تومور و سن بالای بیماران مبتلا وجود دارد^[18]. با این وجود علی‌رغم مطالعات انجام‌یافته هنوز بر ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی بین محققان بحث‌هایی وجود دارد، به‌طوری که نتایج مطالعات هم‌مره و همکاران که روی بیماران مبتلا به سرطان کبد انجام شده است، ثابت می‌کند که بیان HULC در مراحل اولیه تومور به‌طور معنی‌داری بالاتر از مراحل پیشرفته آن است. همچنین این گروه نشان دادند که بیان این RNA در تومورهای تمایز یافته به‌طور معنی‌داری بیش از تومورهای با تمایز ضعیف است^[22]. با این وجود ژئی و همکاران نیز بیش‌بیان HULC را در تومورهای با تمایز ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان کبد گزارش کردند^[23]. برخلاف این مطالعات، در این مطالعه بین بیان HULC و سایر ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی از قبیل سن بیماران مبتلا، درگیری گره‌های لنفاوی، درجه تمایز تومور، اندازه تومور رابطه معنی‌داری یافت نشد. بنابراین ارزش پیش‌آگهی آن هنوز نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

از محدودیت‌های موجود در این مطالعه می‌توان به عدم امکان بررسی بیان HULC در سایر زیرگروه‌های سرطان پستان از جمله کارسینومای درجا مجاری پستان یا کارسینومای لوبولار اشاره کرد که البته این امر به‌علت تعداد بسیار کم بیماران در هر یک از این زیرگروه‌ها و همچنین ناکافی بودن این تعداد برای آنالیز بود. در آینده بر آن هستیم با افزایش نمونه‌ها به بررسی بیان HULC در زیرگروه‌های مختلف سرطان پستان و همچنین مقایسه نتایج آنها با یکدیگر بپردازیم.

پیشنهاد می‌شود نقش عملکردی HULC در ایجاد سرطان پستان از طریق مهار بیان آن در رده‌های سلولی سرطان پستان مورد مطالعه قرار گیرد.

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر با توجه به افزایش بیان HULC در سرطان پستان و همچنین ارزش بیان این lncRNA به‌عنوان بیومارکر تشخیصی، علاوه بر این که پیشنهاد می‌کند HULC می‌تواند به‌عنوان یک مارکر مولکولی بالقوه برای سرطان پستان مطرح شود بلکه این مطالعه تاکید بیشتری بر اهمیت نقش

- 17- Yang Z, Lu Y, Xu Q, Tang B, Park CK, Chen X. HULC and H19 played different roles in overall and disease-free survival from hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: a preliminary analysis from gene expression omnibus. *Dis Markers*. 2015;2015:191029.
- 18- Zhao Y, Guo Q, Chen J, Hu J, Wang S, Sun Y. Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical and in vitro investigation. *Oncol Rep*. 2014;31(1):358-64.
- 19- Wang J, Ma W, Liu Y. Long non-coding RNA HULC promotes bladder cancer cells proliferation but inhibits apoptosis via regulation of ZIC2 and PI3K/AKT signaling pathway. *Cancer Biomark*. 2017;20(4):425-34.
- 20- Chen S, Wu DD, Sang XB, Wang LL, Zong ZH, Sun KX, et al. The lncRNA HULC functions as an oncogene by targeting ATG7 and ITGB1 in epithelial ovarian carcinoma. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3118.
- 21- Shi F, Xiao F, Ding P, Qin H, Huang R. Long noncoding RNA highly up-regulated in liver cancer predicts unfavorable outcome and regulates metastasis by MMPs in triple-negative breast cancer. *Arch Med Res*. 2016;47(6):446-53.
- 22- Hämmerle M, Gutschner T, Uckelmann H, Ozgur S, Fiskin E, Gross M, et al. Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1). *Hepatology*. 2013;58(5):1703-12.
- 23- Xie H, Ma H, Zhou D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma. *BioMed Res Int*. 2013;2013.
- and mechanisms. *Mol Cancer*. 2018;17(1):14.
- 10- Cui M, Xiao Z, Wang Y, Zheng M, Song T, Cai X, Sun B, Ye L, Zhang X. Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in Hepatoma cells through an miR-9-mediated RXRA signaling pathway. *Cancer Res*. 2015;75(5):846-57.
- 11- Yan H, Tian R, Zhang M, Wu J, Ding M, He J. High expression of long noncoding RNA HULC is a poor predictor of prognosis and regulates cell proliferation in glioma. *Onco Targets Ther*. 2017;10:113-20.
- 12- Sun X-H, Yang L-B, Geng X-L, Wang R, Zhang Z-C. Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3):2994-3000.
- 13- Qiu M, Xu Y, Wang J, Zhang E, Sun M, Zheng Y, et al. A novel lncRNA, LUADT1, promotes lung adenocarcinoma proliferation via the epigenetic suppression of p27. *Cell Death Dis*. 2015;6(8):e1858.
- 14- Huang MD, Chen WM, Qi FZ, Xia R, Sun M, Xu TP, et al. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation by epigenetic silencing of KLF2. *J Hemat Oncol*. 2015;8(1):50-57.
- 15- Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*. 2007;132(1):330-42.
- 16- Peng W, Gao W, Feng J. Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Med Oncol*. 2014;31(12):346.