Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(110): 12-20

To Select the Appropriate Reference Gene for Normalizing the Quantitative Data to Assess MicroRNAs in Plasma Samples of Patients with Gastric Cancer

Pegah Parvaee[1], Mahdieh Mondanizadeh[2*], Behzad Khansarinejad[3], Amir Nader Emami Razavi[4]

1- MSc in Biotechnolgy, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4- Researcher, Cancer Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 7 May 2016, Accepted: 1 Jun 2016

Abstract

Background: Circulating microRNAs are promising biomarkers in diagnosis and assessment of cancerous patients. Quantitative Real-time PCR assay is a sensitive test for evaluating the levels of miRNAs expression. Nevertheless, there is no concurrence on selecting appropriate reference genes for qPCR analysis of miRNAs in circulation. Therefore, the current study aimed to select a suitable reference gene for normalizing the RT-qPCR assay results in plasma samples of patients with gastric cancer.

Materials and Methods: Based on previously published studies, three molecules SNORD47, U6 RNA, and miR-103 were selected as the candidate reference genes. After RNA extraction from plasma samples of 40 patients with gastric cancer and 40 healthy individuals, expression levels of these molecules were evaluated using Real-time PCR method.

Results: The results showed that the developed assays are able to diagnose their specified targets by a suitable linear range. By comparing patients and control groups, although the expression levels of miR-103 molecule were not equal between the two groups (p= 0.017), SNORD47 and U6 RNAs had similar expression levels. However, the variations of SNORD47 expression were lower that U6 RNA.

Conclusion: Based on the results of the current study, the SNORD47 molecule has a stable expression levels in plasma samples of patients with gastric cancer and normal individuals and can be used as an appropriate reference gene for normalizing the quantitative data of qPCR assay.

Keywords: Gastric cancer, miRNAs, RT-qPCR, Reference gene

*Corresponding Author:
Address: Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Email: M_mondanizadeh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۵ (شماره پیاپی ۱۱۰)، مرداد ۱۳۹۵، ۲۰-۱۲

انتخاب ژن رفرانس مناسب جهت نرمالیزه کردن داده های کمّی سنجش میکرو RNAها در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده

پگاه پروایی[۱]، مهدیه موندنی زاده[۲*]، بهزاد خوانساری نژاد[۳]، امیرنادر امامی رضوی[۴]

۱- کارشناسی ارشد زیست فن‌آوری، گروه زیست فن‌آوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست فن‌آوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۳- استادیار، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۴- محقق، انستیتو سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: میکرو RNA های موجود در گردش خون بیومارکرهایی امیدبخش برای تشخیص و ارزیابی بیماران مبتلا به سرطان می‌باشد. آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز کمی زمان واقعی(RT-qPCR) روشی حساس برای برآورد میزان بیان میکرو RNA ها است. با این وجود، در حال حاضر هیچ توافقی برای انتخاب ژن‌های رفرنس مناسب برای آنالیزهای qPCR بر روی میکرو RNA در گردش خون وجود ندارد. از این رو، هدف از این مطالعه انتخاب ژن رفرنس مناسب جهت نرمالیزه کردن نتایج RT-qPCR در نمونه‌های پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان معده بوده است.

مواد و روش‌ها: بر اساس مطالعات پیشین سه مولکول SNORD47، U6 و miR-103 به عنوان ژن رفرنس منتخب مورد بررسی قرار گرفتند. بدین ترتیب بعد از استخراج از نمونه‌های پلاسمای ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۴۰ نفر سالم، سطوح بیان این مولکول‌ها به روش Real-time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تست‌های طراحی شده قادر به تشخیص حساس اهداف تعیین شده در یک دامنه خطی مناسب می‌باشند. بر اساس مقایسه دو گروه افراد بیمار و سالم، اگرچه میزان بیان مولکول miR-103 بین دو گروه یکسان نبود (p=۰/۰۱۷)، RNAهای SNORD47 و U6 دارای تغیرات سطوح بیانی مشابه بودند. با این وجود تغییرات در بیان مولکول SNORD47 کمتر از مولکول U6 بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مولکول SNORD47 دارای سطوح بیانی پایداری در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم است و می‌تواند به عنوان یک ژن رفرانس مناسب جهت نرمالیزه کردن داده‌های کمّی تست qPCR مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان معده، میکرو RNA، RT-qPCR، ژن رفرنس

***نویسنده مسئول:** ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه زیست فن‌آوری و پزشکی مولکولی

Email: m_mondanizadeh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان یکی از معضلات جدی در جوامع امروزی می‌باشد، به طوری که بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی دومین جایگاه مرگ ومیر در دنیا را به خود اختصاص داده است(۱). در بین سرطان‌های مختلف، سرطان معده به عنوان چهارمین بیماری بدخیم انسانی ودومین عامل مرگ ناشی از سرطان، سالانه حدود ۸۰۰ هزار نفر را به کام مرگ می‌کشاند(۲، ۳). سرطان معده معمولاً یک بیماری بدون علامت است و تنها با بررسی‌های دقیق و مکرر در افراد در معرض خطر قابل تشخیص است. در افراد مبتلا به این بیماری در بیش از نیمی از حالات پیشرفته، هیچ علامتی مشاهده نمی‌شود و سرطان هنگامی تشخیص داده می‌شود که وارد مرحله پیشرفته گردد و بسیاری از این افراد پس از مدت کوتاهی جان خود را از دست می‌دهند. این در حالی است که تشخیص سریع و به موقع این بیماری می‌تواند میزان بقای ۵ ساله افراد مبتلا را تا ۶۰ درصد افزایش دهد. روش‌های میکروسکوپی و اندوسکوپی که امروزه برای تشخیص سرطان معده استفاده می‌شوند، روش‌هایی تهاجمی محسوب می‌گردند که متاسفانه این روش‌ها برای غربال‌گری‌های روتین مناسب نمی‌باشند. بنابراین نیاز به بیومارکرهایی که توانایی تشخیص بیماری را در مراحل اولیه و به صورت سریع، ساده و با حساسیت و اختصاصیت بالا داشته باشند، به شدت احساس می‌شود(۴). امروزه بسیاری از تحقیقات در مبحث سرطان بر روی عوامل مولکولی به نام میکرو RNA متمرکز شده است. تاکنون تحقیقات متعددی تغییر بیان این عوامل ژنتیکی را در انواع متفاوتی از تومور نشان می‌دهند(۵). میکرو RNAها، RNAهای کوچک تک رشته‌ای و غیرکدکننده باطول ۱۹ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که با اتصال از طریق ناحیه ۷ نوکلئوتیدی درانتهای `۵ خود به نام seed به قسمت 3`-UTR در mRNA هدف به صورت ناقص یا کامل سبب تجزیه یا جلوگیری از ترجمه‌ی آن می‌شوند و نقش بسیار مهمی در فرآیند تنظیم بیان ژن دارند(۶). در طی ۱۰ سال گذشته نقش این عوامل ژنتیکی در بسیاری از فرآیندهای زیستی نظیر تمایز، نمو، پاسخ‌های استرسی، آپوپتوز و تکثیر نشان داده شده است(۷). در واقع، مشخص شده که میکرو RNAها می‌توانند به عنوان یک انکوژن و یا سرکوب‌گر تومور در ایجاد سرطان‌های مختلف ایفای نقش نمایند(۸). بدین ترتیب تغییرات بیان این عوامل ژنتیکی که بسته به نوع هر تومور متفاوت می‌باشند، فرصتی منحصر به فرد را در استفاده از آن‌ها برای تشخیص سرطان فراهم می‌آورد(۹). به عنوان مثال تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش میزان بیان mir-9 (۱۰) و mir-21 (۱۱، ۱۲) به ترتیب با سرطان معده و سرطان کولون وکاهش میزان بیان mir-34 (۱۳) و mir-449a (۱۴) به ترتیب با سرطان ریه و پروستات همراه می‌باشند. امروزه تحقیقات مختلفی حضور میکرو RNAها را در حالات فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی متعددی از جمله سرطان در پلاسما نشان داده‌اند و مشخص شده که میکرو RNAهایی که در ایجاد و پیشرفت تومور نقش دارند از پایداری قابل ملاحظه‌ای در خون وپلاسما برخوردار می‌باشند(۱۵). بدین ترتیب سهولت دسترسی به نمونه و پایداری حضور آن‌ها در پلاسما امکان استفاده از این عوامل مولکولی را به عنوان یک بیومارکر غیرتهاجمی فراهم آورده است. از سویی دیگر، مطالعات حاکی از وجود پروفایل اختصاصی بیانی میکرو RNAهادر هر تومور در خون می‌باشد(۱۶، ۱۷). از این رو با استفاده از این یافته‌ها می‌توان تشخیص هر سرطان را با اندازه‌گیری میکرو RNAهای مخصوص آن تومور در خون با استفاده روش‌های مولکولی از جمله Real-time PCR کمّی (qRT–PCR) انجام داد. تکنیک qRT-PCR، روشی مناسب برای تعیین کمّیت و میزان بیان ژن‌ها بوده که نتایج آن از صحت و دقت بالاتری نسبت به روش‌های پیشین برخوردار است و به عنوان یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری میکرو RNAهای موجود در پلاسما محسوب می‌گردد(۱۸). از مهم‌ترین مزیت‌های این تکنیک می‌توان به حساسیت و کمّیت‌سنجی دقیق آن نسبت به سایر روش‌ها اشاره کرد. در مطالعات آنالیز بیان ژن، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی جهت کاهش خطای نمونه‌برداری بسیار با اهمیت می‌باشد. به طوری که نرمال سازی به عنوان یکی از اجزای ضروری روش qRT–

www.SID.ir

Archive of SID

PCR به حساب می‌آید و استفاده از یک ژن رفرنس به عنوان کنترل داخلی یکی از معمول‌ترین شیوه‌ها برای نرمال سازی محسوب می‌شود. در واقع، در روش qRT–PCR، میزان بیان ژن مورد نظر نسبت به یک ژن رفرنس داخلی که فرض می‌شود در همه سلول‌ها در افراد سالم و بیمار میزان بیان ثابتی داشته و تحت تأثیر شرایط آزمایش و بیماری قرار نمی‌گیرد، مقایسه می‌شود. در صورت نقض این فرض، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی تحت تأثیر قرار گرفته و ممکن است سبب ایجاد خطا در تعیین نتایج آزمایش شود. به این صورت که نوسانات تصادفی بیان ژن‌های رفرنس در بین نمونه‌ها سبب می‌شود که تعیین اختلافات اندک بین ژن‌های هدف امکان پذیر نگردد. هم‌چنین در صورت تأثیر گذاری شرایط آزمایشگاهی و بیماری بر روی این ژن‌ها، فرآیند نرمال‌سازی با مشکل مواجه می‌شود(۱۹). علاوه بر این، میزان بیان ژن‌های رفرنس به عنوان عاملی برای نرمال سازی بیان ژن‌ها در تکنیک qRT-PCR باید با کمک آزمایشات تجربی برای بافت‌های خاص، انواع نمونه‌ها و برای هر فرد مورد اعتبار سنجی قرار گیرد. بنابراین انتخاب ژن رفرنس مناسب جهت انجام آزمون‌های qRT-PCR در مطالعات انجام شده در بیماران مبتلا به سرطان معده از اهمیت به سزایی برخوردار است. برخی از مطالعات که اخیراً برروی نمونه بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان معده صورت گرفته است نشان دهنده ثبات بیان miR-103 در بین افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده است، درحالی که بعضی از مطالعات دیگر حاکی از تغییرات بیان mir-103 در این بیماران نسبت به افراد کنترل می‌باشد. از سوی دیگر، برخی از RNAهای کوچک هم‌چون SNORD47 و U6 نیز به عنوان ژن های رفرنس به کار گرفته شده‌اند.

از این رو، هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیان miR-103، SNORD47 و U6 RNA در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم به منظور تعیین یک ژن مناسب جهت بررسی تغییرات بیان miRNAها در سرطان معده است تا بتوان ژن رفرنس مناسب را در آنالیزهای بیان miRNAها در افراد مبتلا به سرطان معده تعیین نمود.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه پلاسما

در این مطالعه تجربی ۲ میلی لیتر از نمونه پلاسمای ۴۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان معده که بیماری آن‌ها از قبل با اندوسکوپی مورد تأیید قرار گرفته بود و تحت تاثیر هیچ گونه شیمی درمانی، پرتو درمانی و عمل جراحی قرار نگرفته بودند، از بانک تومور ایران خریداری شد و ۲ میلی‌لیتر از نمونه پلاسمای ۴۰ نفر فرد سالم به عنوان گروه کنترل (نمونه گروه کنترل از بین زوجین مراجعه کننده به آزمایشگاه پیش از ازدواج مرکز بهداشت شهر اراک شهرستان انتخاب شد که نتیجه آزمایش‌های آن‌ها طبیعی بود و نیز سابقه بیماری گوارشی مزمن نداشتند) تهیه گردید. لازم به ذکر است نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از همه شرکت کنندگان رضایت نامه کتبی دریافت گردید.

انتخاب ژن های رفرنس و طراحی الیگونوکلئوتیدها

در این بررسی، بر اساس داده‌های منتشر شده و مقالات پیشین ژن‌های mir-103، SNORD47 و U6 به عنوان ژن‌های رفرنس انسانی برای نرمال سازی مقادیر کمی برگزیده شدند(۲۰). طراحی پرایمرهای ساقه–حلقه به منظور سنتز c-DNA و پرایمرهای اختصاصی qRT-PCR برای بررسی‌های کمی بیان ژن‌های منتخب با کمک نرم افزارهای AllelelID6، GeneRunner، Oligo6 و mfold (برای بررسی ساختارهای ثانویه) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ و ۲ ذکر شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. توالی پرایمرهای ساقه–حلقه طراحی شده برای ژن های mir-103، SNORD47 و U6

(در انتهای ´۵ این پرایمرها یک ساختار ساقه –حلقه وجود دارد و این ناحیه انتهایی پرایمر به صورت عمومی طراحی شده است، در حالی که انتهای ´۳ این پرایمرها به صورت کاملاً اختصاصی برای miRNA مربوطه طراحی می‌گردد)

ژن	توالی پرایمر
mir-103	GTCGTATCGAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTCGATACGACCAAGGCA-3`-5`
SNORD47	5`-GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACAACCTCA-3`
U6	5`-GTCGTATCGAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTCGATACGACAAAATAT-3`

جدول ۲. توالی پرایمرهای اختصاصی Real-Time PCR برای بررسی‌های کمی بیان mir-103، SNORD47 و U6

ژن	توالی پرایمر
mir-103	F: 5`-GCTTCTTTACAGTGCTGCC-3` R: 5`-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3`
SNORD 47	F: 5`-ATCACTGTAAAACCGTTCCA-3` R: 5`-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3`
U6	F:۵ `-CTCGCTTCGGCAGCACA-3` R: 5`-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3`

استخراج میکرو RNA ها از پلاسما

استخراج میکرو RNA ها از پلاسما با استفاده از کیت RNX Plus (سیناکلون–ایران) انجام شد. مراحل انجام کار مطابق با دستورالعمل موجود در کیت صورت پذیرفت. به طور خلاصه، ۱ میلی لیتر محلول RNX Plus بر روی ۲۰۰ میکرولیتر پلاسمای سانتریفیوژ شده، افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس، بعد از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به محتویات فوق، انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از سانتریفیوژ در ۴ درجه سانتی‌گراد، محلول رویی (فاز آبی) جدا سازی و به دو برابر حجم آن اتانول مطلق سرد اضافه گردید. بعد از قرار دادن نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در نهایت رسوب حاصله در ۴۰ میکرولیتر آب فاقد RNase-DNase حل شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بعدی نگهداری گردید.

به منظور محاسبه غلظت و خلوص miRNA استخراج شده، نسبت A260/A280 با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (اپندورف) محاسبه گردید.

تبدیل میکرو RNA استخراج شده به cDNA

در این مرحله ابتدا مقدار ۵ میکرولیتر از میکرو RNA استخراج شده را با ۰/۷۵ میکرولیتر از پرایمر ساقه–حلقه و مقدار ۱/۷۵ میکرولیتر آب فاقد RNase مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده و سپس مقدار ۱ میکرولیتر از بافر 10 X RT و ۱ میکرولیتر dNTp (۱۰ میلی مولار) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانس کیرپتاز معکوس M-MuLV (ویوانتیس) را به آن اضافه کرده و مطابق با برنامه دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه و ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر قرار دادیم. c-DNAهای سنتز شده بلافاصله در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد برای آزمایشات بعدی ذخیره شد.

بررسی کمی میزان بیان ژن‌های mir-103، SNORD47 و U6

واکنش qRT-PCR در دستگاه Light cycle 96 (روشه،آلمان) همراه با مانیتور، نرم‌افزار و رک‌های اختصاصی (روشه،آلمان) و با سه بار تکرار صورت پذیرفت. در این واکنش مقدار ۷/۵ میکرولیتر از(X ۱) SYBR® PremixExTaq ™ II با مقدار ۰/۴۵ میکرولیتر از پرایمرسنس، ۰/۴۵میکرولیتر پرایمرآنتی‌سنس(همگانی) و ۱/۵ میکرولیتر DNA(c-DNA) الگو به همراه ۵/۱ میکرولیتر آب فاقد RNase مخلوط گردید. برنامه زمانی–گرمایی دستگاه در سه مرحله زیر تنظیم گردید:

۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت سازی اولیه مولکول cDNA، سپس ۴۰ سیکل شامل ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت

www.SID.ir

Archive of SID

سازی، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها و ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور طویل سازی.

هم‌چنین پس از پایان یافتن سیکل‌ها، منحنی ذوب نمونه‌ها به منظور تعیین خلوص آن‌ها در بازه دمایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسم شد.

تحلیل آماری

تعیین دامنه تشخیصی آزمون‌های طراحی شده برای هر الگو با استفاده از آنالیز رگرسیون خطی صورت پذیرفت. به منظور بررسی تغییرات بیان از ضریب تغییرات شاخص‌های Cq و نیز تست آماری تی تست استیودنت استفاده شد. تعیین نرمال بودن داده‌ها در گروه‌های متغیر مستقل با استفاده از تست کولموگروف-اسمیرنف صورت پذیرفت. کلیه تحلیل‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و سطح معنی داری کوچک تر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

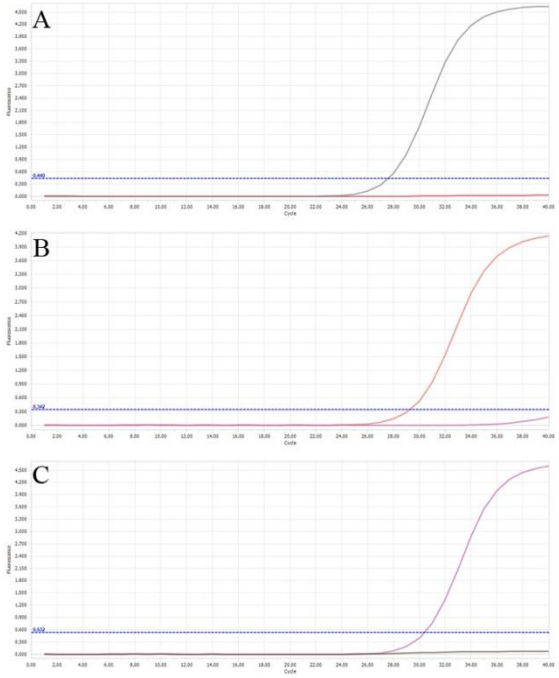
یافته‌ها

نمونه‌ها و بیماران

در مجموع، ۴۰ نمونه از افراد سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند که از این تعداد، ۲۰ مورد مذکر و ۲۰ مورد مونث بودند. میانگین سنی افراد این گروه ۲۸ سال بود (دامنه ۲۶ تا ۳۸ سال). در مقابل از مجموع ۴۰ بیمار، تعداد ۱۷ (۴۲/۵ درصد) بیمار مونث و ۲۳ (۵۷/۵ درصد) بیمار مذکر بودند. میانگین سنی افراد در این گروه ۴۹ سال (دامنه ۲۸ تا ۶۸ سال) بود.

بررسی صحت عملکرد روش RT-qPCR

به منظور بررسی صحت عملکرد الیگونوکلئوتیدهای طراحی شده، آزمون Real-time PCR با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی بر روی هر الگو انجام گرفت و پس از مشاهده محصولات اختصاصی و افتراق آن‌ها از دایمرهای پرایمر با استفاده از آنالیز منحنی ذوب اقدام به بهینه سازی شرایط واکنش گردید. شکل ۱ نتایج حاصل از تکثیر محصولات هر یک از اهداف miR-103، SNORD 47 و U6 را نشان می‌دهد.

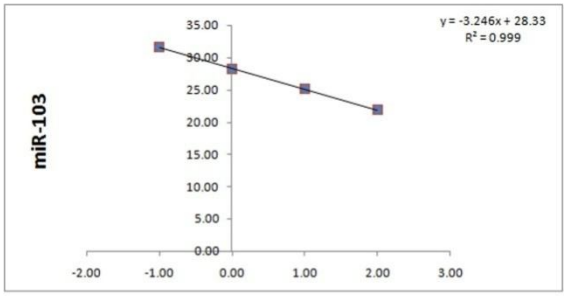


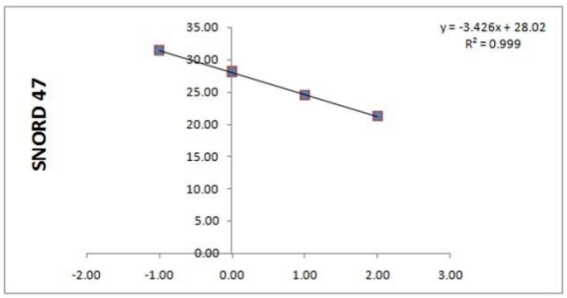
شکل ۱. نتایج حاصل از واکنش Real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی miR-103 (A)، SNORD47 (B) و U6(C) (نقطه آستانه به صورت خط افقی و نمودار تکثیر نمونه مثبت و کنترل منفی در شکل نشان داده شده است).

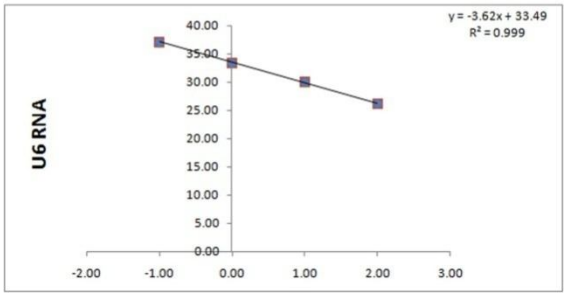
به منظور تعیین توانایی تشخیص اهداف مورد بررسی توسط الیگونوکلئوتیدها در بازه‌ای از غلظت‌های مختلف الگو، اقدام به تولید یک منحنی از غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ نانوگرم از cDNA شد. سپس هر غلظت با ۳ تکرار با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر مولکول مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌گونه که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد، بر اساس نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون خطی، تست‌های طراحی شده برای هر سه مولکول مورد بررسی، دارای کارایی مناسب جهت تشخیص اهدافشان در دامنه‌ای از غلظت‌های مختلف می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID







شکل ۲. بررسی خطی بودن تست‌های به کار گرفته شده جهت تشخیص اهداف مورد بررسی.
(ضرایب تعیین رگرسیون و شیب خط معادلهٔ رگرسیون در قسمت بالا و سمت راست هر تصویر نشان داده شده است).

بررسی نوسانات سطوح بیانی RNAهای مورد بررسی در بیماران و افراد کنترل

به منظور بررسی تغییرات بیان اهداف مورد نظر در بین افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده، مقدار ۱ میکروگرم cDNA در هر واکنش qPCR دوبار مورد آزمایش قرار گرفت و شاخص‌های Cq بین گروه بیماران و کنترل مقایسه شدند. همان‌گونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌گردد، بر اساس نتایج حاصل از مقایسه دو گروه به وسیله آزمون تی تست، میزان بیان RNAهای SNORD47 (p=۰/۳۵۳) و U6 (p=۰/۱۹۸) دارای تغییرات بیان معنی‌دار بین گروه بیمار و کنترل نبود. از سوی دیگر بیان مولکول miR-103 بین دو گروه یکسان نبود(p=۰/۰۱۷) و بر این اساس شاخص Cqهای مولکول miR-103 در بین گروه مبتلایان به سرطان معده نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود(شکل ۲). از سوی دیگر، میزان تغییرات بیان در گروه بیماران و کنترل نیز به وسیله ضریب تغییرات محاسبه گردید. بر این اساس میزان تغییرات شاخص‌های Cq مولکول U6 در گروه‌های بیماران و کنترل به ترتیب ۵/۰۸ درصد و ۵/۵۶ درصد محاسبه گردید. به طور مشابه ضریب تغییرات محاسبه شده برای SNORD47 در این دو گروه ۴/۱ و ۱/۵۵ درصد بود.

Independent Samples Test for SNORD47

A		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means
		F	Sig.	Sig. (2-tailed)
Cqs	Equal variances assumed	4.885	.033	.440
	Equal variances not assumed			.353

Independent Samples Test for U6 RNA

B		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Eq Mean
		F	Sig.	Sig. (2-ta
Cqs	Equal variances assumed	3.196	.082	
	Equal variances not assumed			

Independent Samples Test for miR-103

C		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means
		F	Sig.	Sig. (2-tailed)
Cqs	Equal variances assumed	15.374	.000	.035
	Equal variances not assumed			.017

شکل ۳. ارزیابی تغییرات بیان اهداف RNAمورد بررسی در بین افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده. (A) تغییرات SNORD47، (B) مولکول U6 و (C) تغییرات بیان miR-103

بحث

یکی از معیارهای مهم به منظور انتخاب ژن رفرنس، اندازه قابل مقایسه آن با اهداف مورد مطالعه است. بر این اساس به منظور نرمال کردن داده‌های کمی میکرو RNAها، باید از RNAهایی با اندازه کوچک استفاده نمود(۲۱). از این‌رو، با توجه به درک اهمیت روز افزون نقش میکروRNAها در توسعه و نیز تشخیص سرطان‌های مختلف از جمله سرطان معده، هدف این مطالعه انتخاب RNA رفرنس مناسب جهت نرمال کردن داده‌های کمّی ناشی از بیان miRNAها در نمونه پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان معده بود. بر اساس مرور مقالات مختلف، سه مولکول

www.SID.ir

Archive of SID

SNORD47، U6 و miR-103 از جمله فراوان‌ترین RNAهای رفرنس استفاده شده در نرمال کردن داده‌های میکرو RNAها در پلاسما و سرم بودند که از این‌رو در مطالعه حاضر مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی الگوهای cDNA در غلظت‌های مختلف با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای طراحی شده نشان داد که هر سه تست قادر به تشخیص خطی دامنه‌ای از غلظت‌های مختلف الگو در یک نمونه بالینی می‌باشند. نتایج حاصل از بررسی کمی شاخص‌های Cq در بین نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد کنترل نشان داد که سطوح بیانی مولکول miR-103 دارای تفاوت بیان در دوگروه می‌باشد. به طور دقیق‌تر بر اساس نتایج آزمون آماری تی تست استیودنت میانگین شاخص‌های Cq در گروه بیماران معادل ۲۶/۰۷ (SD=۱/۹) و در افراد کنترل ۲۸/۴ (SD=۱/۳۵) محاسبه شد که این یافته از نظر آماری معنی‌دار بود(p=۰/۰۱۷). این یافته نشان می‌دهد که مولکول miR-103 در بیمارن مبتلا به سرطان معده خود دستخوش افزایش بیان می‌شود و از این‌رو نمی‌توان از آن به عنوان یک ژن رفرنس به در آزمون RT-qPCR استفاده نمود. اگرچه این یافته با برخی از مطالعاتی که افزایش بیان miR-103 را در مدل‌های حیوانی دارای سرطان معده گزارش نموده‌اند تطابق دارد(۲۲)، اما با برخی از مطالعات پیشین که miR-103 را به عنوان نرمال کننده سطوح بیانی میکروRNAها در پلاسما معرفی نمودند مغایر است(۲۳، ۲۴). از جمله سانگ و همکاران در پژوهشی مشابه در سال ۲۰۱۱ در چین عنوان نمودند که سطح بیانی مولکول miR-103 در سرم افراد سالم و مبتلایان به سرطان معده تقریباً یکسان است(۲۰)، این در صورتی است که نتایج پژوهش حاضر این یافته را نقض می‌کند. از سوی دیگر، نتایج این مطالعه نشان داد که بیان دو مولکول SNORD47 و U6 در دوگروه جمعیت مورد مطالعه یکسان و فاقد تغییرات معنی‌دار می‌باشد (شاخص p به ترتیب معادل ۰/۳۵۳ و ۰/۱۹۸). این یافته با برخی از مطالعات قبلی که از سطوح بیانی این دو RNA جهت نرمال کردن داده‌های کمی سنجش میکرو RNAها در سرم یا پلاسما استفاده نموده‌اند هم‌سو است(۶، ۲۵). نتایج ارزیابی ضرایب تغییرات داده‌ها در هر گروه مشخص نمود که تغییرات در مولکول SNORD47 کمتر از مولکول U6 می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، هر دو مولکول SNORD47 و U6 دارای سطوح بیانی پایداری در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم هستند و از این‌رو می‌توانند به عنوان ژن رفرنس مناسب در نرمال کردن ارزیابی‌های کمی سطوح بیانی میکرو RNAها به کار گرفته شوند. با این وجود، به نظر می‌رسد مولکول SNORD47 به علت نوسانات کمتر بیانی و شاخص‌های Cq پایین‌تر از ارجحیت بیشتری برخوردار باشد. به علاوه امکان استفاده از مولکول miR-103 به عنوان ژن رفرنس مورد تأیید قرار نگرفت، چراکه نشان داده شد این مولکول در مبتلایان به سرطان معده دستخوش افزایش بیان می‌گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد که هزینه آن توسط معاونت تحقیقات و فن‌آوری تأمین گردیده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران مرکز تومور بانک ایران و نیز آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی و ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک به ویژه خانم ندا مولایی اعلام می‌دارند.

منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61(2):69-90.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians. 2008; 58(2):71-96.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians. 2005; 55(2):74-108.
4. Hundt S, Haug U, Brenner H. Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2007; 16(10):1935-53.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993; 75(5):843-54.
6. Mondanizadeh M, Arefian E, Mosayebi G, Saidijam M, Khansarinejad B, Hashemi SM. MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA. Journal of cellular biochemistry. 2015; 116(6):943-53.
7. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nature reviews Molecular cell biology. 2014; 15(8):509-24.
8. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. Trends in molecular medicine. 2014;20(8):460-9.
9. Ren A, Dong Y, Tsoi H, Yu J. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. International journal of molecular sciences. 2015; 16(2):2810-23.
10. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. Nature cell biology. 2010; 12(3):247-56.
11. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge C, Ramos K, Colburn N, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. Oncogene. 2008;27(31):4373-9.
12. Allgayer H. Pdcd4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA. Critical reviews in oncology/hematology. 2010;73(3):185-91.
13. Kasinski AL, Slack FJ. miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. Cancer research. 2012; 72(21):5576-87.
14. Noonan EJ, Place RF, Basak S, Pookot D, Li L-C. miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells. Oncotarget. 2010; 1(5):349-58.
15. Zhou X, Zhu W, Li H, Wen W, Cheng W, Wang F, et al. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. Scientific reports. 2015; 5:11251-2.
16. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. Nature reviews Clinical oncology. 2011; 8(8):467-77.
17. Song JH, Meltzer SJ. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers. Gastroenterology. 2012; 143(1):35-47.
18. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DS. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. Clinical chemistry. 2011; 57(1):84-91.
19. Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretzschmar HA, Egensperger R, Kreth FW. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. Neuro-oncology. 2010; 12(6):570-9.
20. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. Digestive diseases and sciences. 2012; 57(4):897-904.
21. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. Rna. 2008; 14(5):844-52.
22. Rotkrua P, Shimada S, Mogushi K, Akiyama Y, Tanaka H, Yuasa Y. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model. British journal of cancer. 2013; 108(4):932-40.
23. Wang Y, Tang N, Hui T, Wang S, Zeng X, Li H, et al. Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR analysis of plasma microRNAs levels in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity. Journal of Applied Toxicology. 2013; 33(11):1330-6.
24. Serafin A, Foco L, Blankenburg H, Picard A, Zanigni S, Zanon A, et al. Identification of a set of endogenous reference genes for miRNA expression studies in Parkinson's disease blood samples. BMC research notes. 2014; 7(1):1-2.
25. Galiveti CR, Rozhdestvensky TS, Brosius J, Lehrach H, Konthur Z. Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. Rna. 2010; 16(2):450-61.

www.SID.ir