

بررسی میزان بیان miR-20a و miR-204 موثر بر اتوفاژی در سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه

مینو پرگل^۱، شهره زارع کاریزی^۱، مرتضی کریمی پور^{۲*}

(۱) گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، تهران، ایران

(۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۸

چکیده

مقدمه: سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه (NSCLC) شایع‌ترین نوع سرطان ریه و کشنده‌ترین سرطان در سراسر جهان می‌باشد. این بیماری اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود. یکی از مکانیسم‌های سیستم ایمنی برای مقابله با سلول‌های سرطانی ریه، اتوفاژی می‌باشد. اتوفاژی یک فرآیند کاتابولیکی حفاظت شده است که طی آن پروتئین‌ها و اندامک‌ها از طریق لیزوزوم حذف می‌شوند. microRNA ها، RNA های کوچک ۲۲-۱۹ نوکلئوتیدی بوده که به عنوان عوامل تنظیمی مهم در سلول، می‌توانند به عنوان انکوژن یا سرکوبگر تومور در ایجاد سرطان ریه نقش داشته باشند. نقش miRNA ها در پیشرفت سرطان ریه با تنظیم ژن‌های چندین پروتئین عملکردی مسیر اتوفاژی حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان miR-204-5p و miR-20a موثر بر مسیر اتوفاژی در سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه میزان بیان miR-204-5p و miR-20a توسط تکنیک Real-Time PCR کمی در ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه بررسی گردید. ابتدا استخراج RNA از بافت‌های توموری و نرمال انجام شد، پس از طراحی پرایمر اختصاصی برای RNA مرجع و miRNA های مورد مطالعه، سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای ساقه-حلقه (stem-loop) اختصاصی miR-20a و miR-204-5p انجام شد و نتایج آن با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ آنالیز شد.

یافته‌های پژوهش: بر اساس آنالیز نتایج حاصل از qRT-PCR مشخص گردید که در نمونه‌های بافت توموری میزان بیان miR-20a در بیماران مبتلا به NSCLC، در مقایسه با بافت نرمال افزایش بیان و miR-204-5p کاهش بیان نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: این تغییرات میزان بیان، miR-20a را به عنوان انکوژن و miR-204-5p را به عنوان سرکوبگر تومور مطرح می‌کند. بنا بر این اندازه‌گیری سطح بیان miRNA های مورد مطالعه می‌تواند بیومارکری جهت تشخیص و پیشرفت سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک و هم‌چنین زمینه‌ای برای درمان هدفمند این سرطان باشد.

واژه‌های کلیدی: میکرو RNA، اتوفاژی، سرطان ریه، بیومارکر

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

Email: mortezakarimi@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سرطان سلول های غیر کوچک ریه (NSCLC) شایع ترین نوع سرطان ریه و کشنده ترین سرطان در سراسر جهان می باشد. این بیماری اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می شود. این نوع سرطان عمدتاً از لحاظ بافت شناسی به سه گروه تقسیم می شود: آدنوکارسینوما (AC)، کارسینوما سلول سنگفرشی (SCC) و کارسینوما سلول بزرگ.

سرطان سلول های غیر کوچک ریه اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می شود و میزان بقا پنج ساله حدود ۱۴ درصد می باشد (۱).

سیستم ایمنی برای مقابله با سلول های سرطانی مکانیسم های متعددی را در پیش می گیرد. یکی از این مکانیسم ها اتوفآژی است. اتوفآژی یک فرآیند کاتابولیکی حفاظت شده است که طی آن پروتئین ها و اندامک ها از طریق لیزوزوم حذف می شوند. طی این فرآیند بخش های سیتوپلاسم توسط وزیکول های دو غشایی خاصی به نام اتوفآگوزوم جدا می شوند که به سرعت با اندوزوم یا لیزوزوم ترکیب شده و تشکیل اتولیزوزوم می دهد. قرار گرفتن بخش داخلی در معرض هیدرولازهای لیزوزومی باعث تخریب محموله سیتوپلاسمی و در نهایت تخریب محصولات می شود، سپس آن ها در سیتوزول برای بازیافت آزاد می شوند (۲).

اتوفآژی، برای حفظ هموستازی سلولی و کنترل کیفیت از طریق حذف اندامک های پیر یا آسیب دیده و پروتئین های تهاجمی ضروری است. اتوفآژی هم چنین به شدت در پاسخ به استرس های سلولی از جمله فقدان مواد غذایی و فاکتور رشد، عفونت، هیپوکسی، استرس اکسیداتیو و درمان با داروهای ضد سرطان القاء می شود. در این حالت یک پاسخ حفاظت سلولی را فراهم می کند و منجر به سازگاری سلولی و بقا می شود (۳). از این رو عدم تنظیم این مسیر در بیماری ها از جمله سرطان دخیل می باشد.

نقش miRNA ها در پیشرفت سرطان ریه با تنظیم ژن های چندین پروتئین عملکردی مسیر اتوفآژی حائز اهمیت می باشد. میکرو RNA ها، مولکول های RNA کوچک ۲۲-۱۹ نوکلئوتیدی به

شدت محافظت شده و غیرکدکننده ای هستند که با تنظیم فرآیندهای سلولی گسترده و متنوع از طریق تداخل با بیان پروتئین یا تخریب mRNA عملکرد دارند. miRNA نقش مهمی در عملکردهای بیولوژیک از جمله تکثیر سلولی و تمایز، تعیین سرنوشت سلول، انتقال سیگنال، تکامل، میانکنش های ویروسی، تومورزایی و پیشرفت سرطان ایفا می کند (۵،۶). در سرطان، miRNA ها می توانند به طور کلی به عنوان سرکوبگر تومور یا انکوژن عمل کنند و حتی گاهی بسته به نوع تومور هر دو نقش را دارند (۷). در گروهی از مطالعات miRNA ها برای جلوگیری از پیشرفت سرطان ریه با مهار برخی پروتئین های عملکردی مسیر اتوفآژی مطرح شده اند (۸).

در این مطالعه از بین ژن های موثر در مراحل اتوفآژی، سه ژن کلیدی در نظر گرفته شد. سپس miRNA های درگیر با این ژن ها جهت بررسی انتخاب گردید. از ژن های هدف miR-20a در مسیر اتوفآژی می توان ULK-1 را ذکر کرد (۹). ULK-1 یک پروتئین کیناز است که در سراسر غشای اتوفآگوزوم در پستانداران بیان می شود و هیچ الگوی خاصی را در بافت نرمال نشان نمی دهد. جهش های منفی غالب ULK1 اتوفآژی را متوقف می کند، نشان می دهد که ULK1 یک پروتئین کیناز ضروری در این فرآیند است (۱۰). مطالعات دیگر نشان داده است که miR-204 ژن های درگیر در اتوفآژی از جمله BCL2 و LC3 را هدف قرار می دهد (۱۱). LC3 نقش کلیدی در فرآیند اتوفآژی در پستانداران بازی می کند. LC3 همولوگ پستانداری Atg8 مخمر است (۱۲) و به دو شکل پروتئین سیتوپلاسمی 18Da (LC3-I) و فرم فعال شده 16Da (LC3-II) وجود دارد. وقتی اتوفآژی اتفاق می افتد، فرم سیتوپلاسمی LC3-I شکسته شده و به فرم غشایی اتوفآژیک LC3-II تبدیل می شود. این تبدیل با فعالیت اتوفآژی مرتبط است (۱۳). Bcl-2 تنظیم کننده منفی و اصلی اتوفآژی از طریق میانکنش با Beclin-1 می باشد. هم چنین یک پروتئین ضدآپتوز است (۱۴). هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان miR-20a و miR-204-5p موثر بر مسیر اتوفآژی در سرطان سلول های غیر کوچک ریه می باشد.

چرا که miRNA های انتخاب شده در این مطالعه، ژن های کلیدی در مسیر اتوفاژی را تحت تاثیر قرار می دهند؛ با بررسی میزان بیان این miRNA ها و تعیین ژن های هدفشان در بیماران مبتلا به NSCLC می توان نقش ژن های مرتبط با اتوفاژی در سرطان ریه را بررسی کرده و در ادامه راه پیش بینی هایی در جهت طرح درمانی مناسب انجام داد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه: در این مطالعه ۳۰ نفر از بیماران با تشخیص ابتلا به سرطان ریه سلول غیر کوچک در بیمارستان مسیح دانشوری پس از اخذ رضایت نامه از بیمار وارد مطالعه شدند. از هر بیمار، نمونه توموری و بافت نرمال مجاور توموری در اتاق عمل توسط جراح تهیه شد و در دمای -70°C سانتی گراد ذخیره گردید. پس از تایید تومور و تشخیص توسط پاتولوژیست نمونه ها وارد مطالعه شدند.

استخراج RNA: استخراج RNA از بافت های توموری ریه و نرمال مجاور با استفاده از ترايزول شرکت Qiagen انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده در طول موج های 260 nm و 280 nm سنجیده شد.

سنتز cDNA: در این مطالعه برای سنتز cDNA از پرایمرهای stem-loop (۱۵) اختصاصی و مجزا برای miR-20a و miR-204-5p استفاده شد.

جهت سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت Fermentas و شرایط دمایی 95°C درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه، 65°C درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، 25°C درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، 42°C درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و 70°C درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید. برای این منظور از 1000 نانوگرم از RNA مربوط به هر نمونه استفاده کرده و $1/5$ میکرولیتر از پرایمر ساقه-حلقه-Stem (loop) به آن اضافه شد (برای باز شدن ساختار پرایمر ساقه-حلقه ابتدا باید در دستگاه ترموسایکلر در دمای 95°C درجه سانتی گراد به مدت زمان ۸ دقیقه قرار گیرد). سپس به وسیله Nuclease Free water به حجم 13 میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب های مربوطه را به خوبی spin کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای 65°C درجه

سانتی گراد قرار داده و به مدت ۲ دقیقه روی یخ گذاشته و سپس ۴ میکرولیتر از بافر $5X$ و 0.5 میکرولیتر از RNase inhibitor و ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP را اضافه کرده و در نهایت 0.5 میکرولیتر از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس اضافه شد. حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر می باشد. میکروتیوب های مربوطه spin و داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. cDNA ساخته شده برای نگهداری تا زمان استفاده به فریزر -20°C درجه سانتی گراد منتقل گردید.

طراحی پرایمر: توالی دقیق miRNA بالغ-miR-20a و miR-204-5p از سایت miRBase به دست آمد. پرایمرهای اختصاصی برای miR-204-5p، miR-20a و ژن مرجع RNU44 با استفاده از نرم افزار Allele ID و متناسب با تکنیک Syber Green qRT-PCR طراحی گردید.

Real Time PCR و واکنش Real Time PCR

برای miR-20a و miR-204-5p به عنوان میکروRNA های هدف و RNU44 به عنوان RNA مرجع با استفاده از سایبرگرین انجام گرفت.

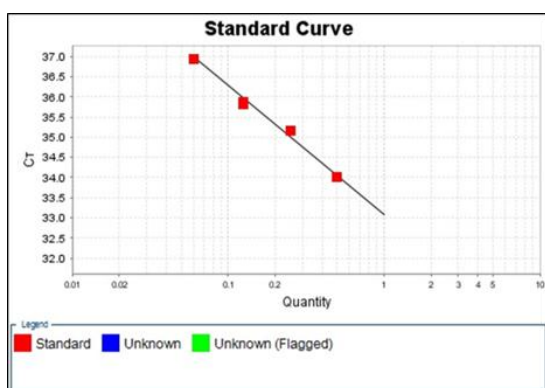
شرایط مناسب دمایی جهت بررسی miRNA های مورد مطالعه توسط Real-Time PCR در هر سیکل، 95°C درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و 60°C درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه می باشد. تعداد سیکل ۴۰ در نظر گرفته شد.

آنالیز نتایج Real-Time PCR: آنالیزهای آماری توسط نرم افزار Prism graph pad انجام گردید. جهت بررسی تغییرات میزان بیان miRNA های مورد نظر در بافت توموری نسبت به نرمال از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده گردید. هم چنین معنادار بودن یا نبودن نتایج با یافته های بالینی و آزمایشگاهی بیماران نیز بر اساس آزمون T-test ارزیابی گردید. در نهایت $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

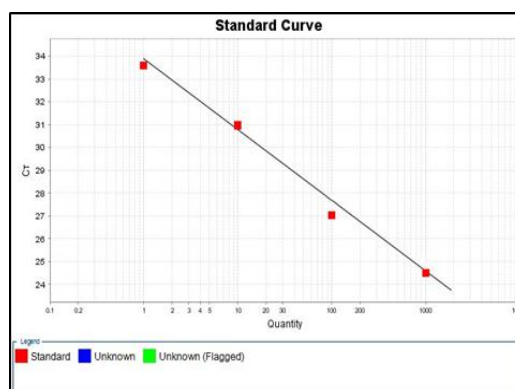
یافته های پژوهش

تحقیق حاضر تغییرات بیان miR-20a و miR-204-5p در نمونه های مربوط به ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان سلول های غیر کوچک ریه را مورد بررسی قرار داد. از میان این بیماران از نظر نوع زیر گروه بافتی، ۵۷ درصد بیماران مبتلا به آدنوکارسینوما و ۴۳ درصد مبتلا

نتایج qRT-PCR مربوط به miRNA ها و ژن مرجع RNU44 به شرح زیر می باشد:
جهت بررسی کارایی PCR رقت سریالی ۱:۵ ساخته شد. درصد کارایی تکثیر به دست آمده برای miR-20a و miR-204-5p به ترتیب ۹۹ درصد و ۱۰۱ درصد به دست آمد.
منحنی استاندارد miR-20a و miR-204-5p در شکل شماره ۱ الف و ب نشان داده شده است.

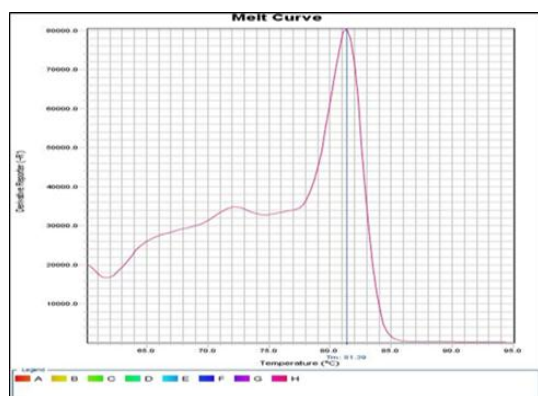


شکل شماره ۱. ب miR-20a



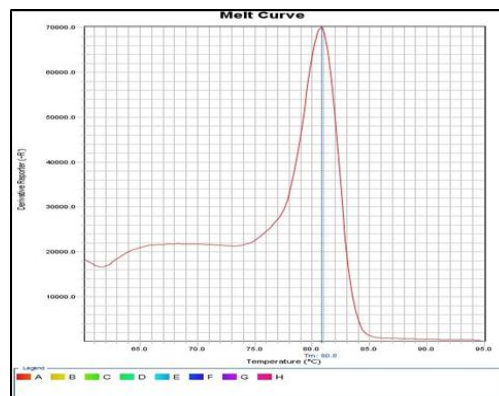
شکل شماره ۱. الف miR-204-5p

miR-20a حدود ۸۰ درجه سانتی گراد تخمین زده شد که نشان دهنده اختصاصی و تک باند بودن محصول PCR است (شکل ۲ الف و ب).



شکل شماره ۲. ب منحنی دمای ذوب miR-20a

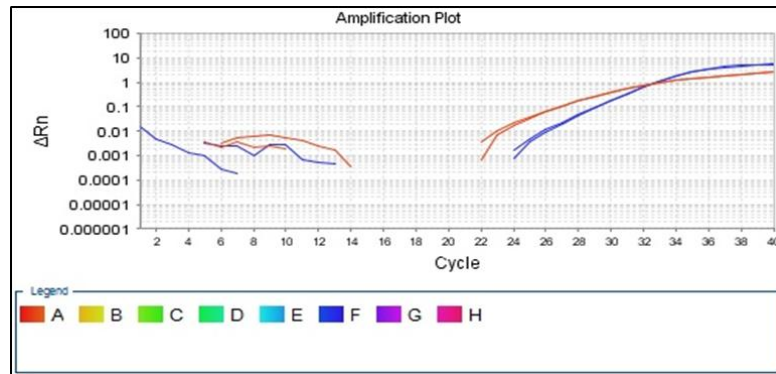
آنالیز منحنی ذوب: دمای ذوب محصول PCR برای miR-204-5p طبق محاسبات برنامه Allele ID7.5 حدود ۷۸/۵ درجه سانتی گراد و برای



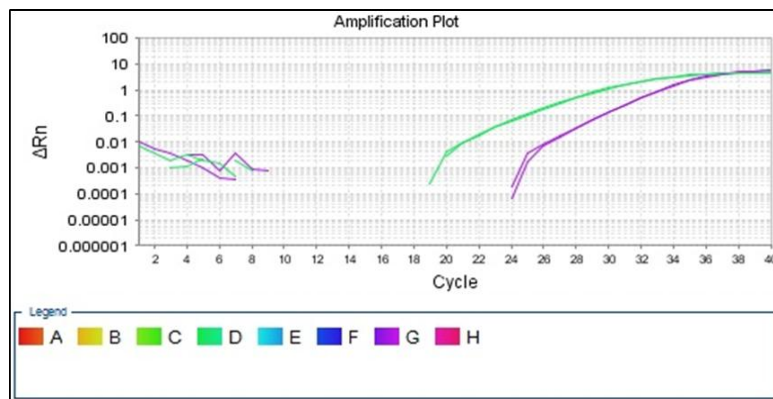
شکل شماره ۲. الف منحنی دمای ذوب miR-204-5p

۳-الف مربوط به فاز لگاریتمی تکثیر-miR-204-5p می باشد. شکل شماره ۳-ب مربوط به فاز لگاریتمی تکثیر-miR-20a می باشد.

نمودار تکثیر: نتیجه واکنش Real-Time PCR به صورت منحنی سیگموئیدی نشان داده می شود که محور افقی بر اساس تعداد چرخه های واکنش و محور عمودی بر اساس $Rn\Delta$ می باشد. شکل شماره



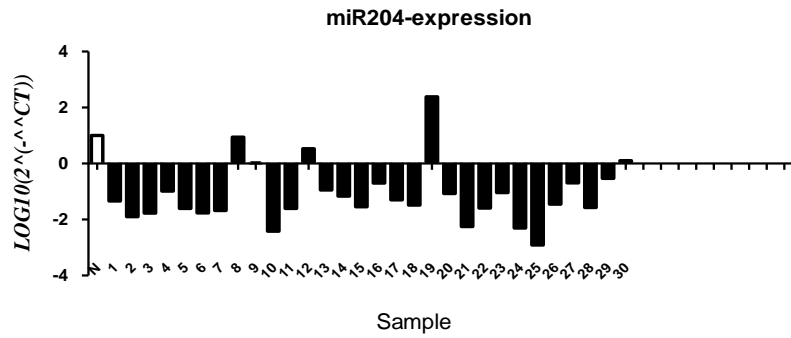
شکل شماره ۳. الف نمایی از فاز لگاریتمی تکثیر مربوط به miR-204-5p (منحنی آبی) و ژن مرجع RNU44 (منحنی قرمز)



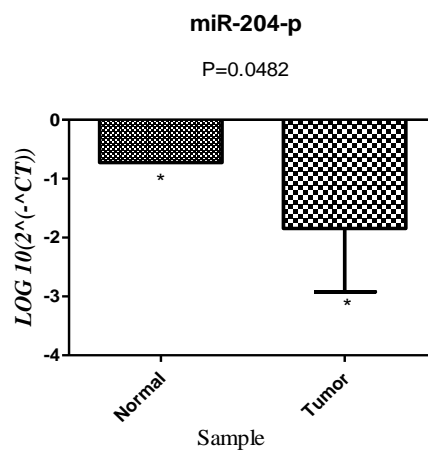
شکل شماره ۳. ب نمایی از فاز لگاریتمی تکثیر مربوط به miR-20a (منحنی بنفش) و ژن مرجع RNU44 (منحنی سبز)

با مقایسه میزان بیان miR-204-5p در نمونه بافت های توموری با نرمال مشخص شد که miR-204-5p کاهش بیان معنادار ($P=0.04$) را در نمونه بافت های توموری در مقایسه با نرمال نشان می دهد (نمودار شماره ۲).

نتایج مربوط به بررسی میزان بیان miR-204-5p و miR-20a در بافت های توموری و نرمال افراد مبتلا به سرطان سلول های غیر کوچک ریه: میزان بیان miR-204-5p در هر یک از نمونه های توموری محاسبه شده است. همان طور که نمودار شماره ۱ نشان می دهد در اکثر نمونه ها miR-204-5p کاهش بیان داشته است (نمودار شماره ۱).

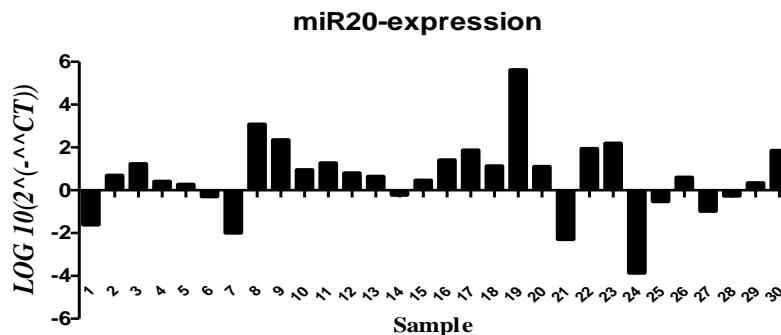


نمودار شماره ۱. میزان بیان miR-204-5p در نمونه های نرمال و توموری



نمودار شماره ۲. مقایسه میزان بیان miR-204-5p در نمونه های توموری با نرمال

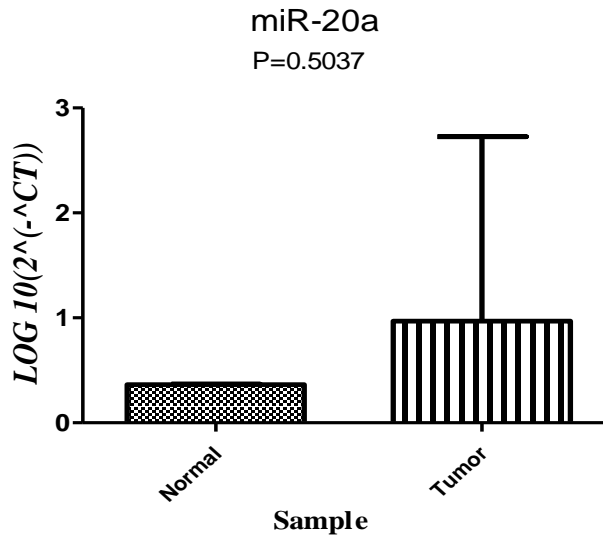
میزان تغییرات بیان miR-20a در هر یک از نمونه های توموری محاسبه گردیده و نمایش داده شده است (نمودار شماره ۳). همان طور که نمودار نشان می دهد در اکثر نمونه ها miR-20a افزایش بیان داشته است.



نمودار شماره ۳. میزان بیان miR-20a در نمونه های توموری

نمونه های بافت توموری نشان می دهد اما این افزایش بیان، معنی دار نمی باشد ($P=0.5$) (نمودار شماره ۴).

آنالیزهای آماری در خصوص مقایسه میزان بیان miR-20a در نمونه بافت های توموری با نرمال مشخص می کند این ژن افزایش بیان را در بعضی



نمودار شماره ۴. مقایسه میزان بیان miR-20a در نمونه های توموری با نرمال

بافت توموری NSCLC افزایش بیان را در مقایسه با بافت نرمال نشان داد.

miR-20a در مسیر اتوفآژی ژن ULK-1 را تحت تاثیر قرار می دهد. ULK-1 در فرآیند اتوفآژی علاوه بر مرحله آغاز تشکیل اتوفآگوزوم، در مرحله طولیل سازی، فیوژن و تخریب نیز نقش دارد. این ژن در کل به عنوان ژنی جهت پیشرفت اتوفآژی مطرح می باشد (۱۸). با توجه به افزایش میزان بیان در بافت های توموری سرطان سلول های غیر کوچک ریه این miRNA احتمالاً به عنوان انکوژن در مسیر اتوفآژی عملکرد دارد.

با توجه به نقش انکوژنی miR-20a و تاثیر آن روی ژن ULK-1 انتظار می رود با افزایش بیان این miRNA میزان بیان ULK-1 کاهش یابد (۱۹). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۵ Zhao و همکاران انجام دادند تاثیر miR-20a بر پیشرفت و متاستاز سرطان دهانه رحم در محیط *in vivo* و *in vitro* را بررسی کردند. نتایج تحقیق آن ها نشان داد که سطح بیان miR-20a به میزان قابل توجهی در بیماران مبتلا

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر میزان تغییرات بیان miR-20a در هر یک از نمونه های توموری محاسبه شد و مشخص گردید، در اکثر نمونه ها miR-20a افزایش بیان داشته است. اما افزایش بیان miR-20a معنی دار نبود ($P=0.5$). هم چنین ارتباط معناداری بین افزایش بیان miR-20a و زیرگروه بافتی و نیز مرحله بیماری یافت نشد ($P \geq 0.2$). یکی از محدودیت های اصلی تحقیق حاضر این است که جامعه آماری مورد مطالعه از یک مرکز درمانی با جمعیت کوچک بیماران انتخاب گردیده که با تشخیص NSCLC تحت عمل جراحی ریه قرار گرفته اند.

بین افزایش میزان بیان miR-20a و مصرف دخانیات ارتباط معنادار مشاهده شد ($P=0.01$). بدین معنی که مصرف دخانیات باعث افزایش انکوومیر miR-20a و در نهایت افزایش شانس ابتلا به سرطان ریه می شود. این نتیجه با توجه به یافته های گسترده و اثبات شده نقش دخانیات در ایجاد بدخیمی های ریه قابل انتظار بود (۱۶، ۱۷). در این مطالعه miR-20a در

اتوفاژی رخ می دهد، فرم سیتوپلاسمی LC3(LC3I) به فرم غشایی اتوفاژیک LC3(LC3II) که روی اتوفاگوزوم قرار می گیرد، تبدیل می شود. این تبدیل به نظر می رسد با فعالیت اتوفاژی مرتبط باشد، در واقع LC3 در مرحله طویل سازی تشکیل اتوفاگوزوم نقش دارد(۲۵).

Thakur و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیان و عملکرد miR-204 در سلول های سرطانی غیر کوچک ریه از طریق هدف قرار دادن ATF2 را بررسی کردند. این گروه، کاهش بیان miR-204 در بافت NSCLC در مقایسه با بافت نرمال را مشاهده کردند. این محققین این طور بیان کردند که افزایش بیان ناپایدار و موقتی miR-204، تکثیر و مهاجرت سلولی را سرکوب کرده و آپتوز را القا می کند(۲۶).

طبق مطالعات انجام شده کاهش بیان miR-204 با پیش آگهی ضعیف در سرطان پستان و لوسمی میلوئید حاد در ارتباط است(۲۷،۲۸).

هم چنین بیان miR-204 با سرکوب انکوژن های هدف باعث افزایش حساسیت سلول های نوروبلاستوما به سیس پلاتین می شود(۲۹).

در مطالعه Sumbul و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات بالقوه miR-204-5p در سرطان روده بزرگ از طریق تاثیر بر بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی بررسی گردید. در مطالعه مذکور افزایش میزان بیان miR-204-5p در گروه بیماران مشاهده شد. این نتیجه متناقض با سایر مطالعات بدین صورت تفسیر شد؛ با توجه به نقش miR-204-5p که سرکوبگر تومور می باشد، این miRNA در راستای مهار فعالیت LC3 دخیل در اتوفاژی سلول های توموری و BCL2 عملکرد دارد، بنا بر این هم چنان در راستای حذف تومور فعالیت دارد(۳۰). تمامی مطالعات تاییدکننده نقش سرکوبگر توموری miR-204 در سرطان های مختلف می باشند. در این مطالعه مشخص گردید میزان بیان miR-204-5p و miR-20a موثر بر اتوفاژی در سرطان سلول های غیر کوچک ریه تغییر می کند و ارتباط معناداری بین تفاوت بیان miRNA های مورد بررسی در نمونه های بافت توموری با بافت نرمال مجاور وجود دارد.

به سرطان سرویکس در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است و این miRNA به عنوان انکوژن عمل می کند. بیان نا به جای miR-20a با متاستاز به گره های لنفی، اندازه تومور و ویژگی های بافت شناسی ارتباط معناداری را نشان داد(۳۰). هم چنین در مطالعات مشابه روی سرطان کبد، کیسه صفرا و معده نیز افزایش بیان miR-204 در بافت توموری و نقش آن در تومورزایی عنوان شده است. مجموعه مطالعات فوق حاکی از افزایش بیان miR-204 در سرطان های مختلف می باشد و همان طور که قبلاً اشاره شد احتمالاً در مسیر اتوفاژی این miRNA نقش انکوژنی دارد.

در این مطالعه miR-204-5p در بافت NSCLC در مقایسه با بافت نرمال کاهش بیان را نشان داد(P=0.04).

بین کاهش میزان بیان miR-204-5p و مصرف دخانیات ارتباط معنادار مشاهده گردید(P=0.04). با توجه به ارتباط معنادار مصرف سیگار و بیان این miRNA، می توان نتیجه گرفت که مصرف دخانیات در سرطانی شدن سلول نقش حائز اهمیتی دارد.

هم چنین ارتباط معناداری بین کاهش بیان miR-204-5p و زیرگروه بافتی، مرحله بیماری یافت نشد که می تواند به دلیل کوچک بودن جامعه آماری مورد مطالعه و انتخاب آن از یک مرکز درمانی باشد(P≥0.3).

همان طور که قبلاً اشاره شد میزان بیان miR-204-5p در مطالعه حاضر کاهش را نشان داد. البته کاهش بیان این miRNA در چند سرطان دیگر نیز گزارش شده و به عنوان یک سرکوبگر بالقوه در مهار متاستاز تومورهای مختلف از جمله معده، کولورکتال، پروستات و NSCLC مطرح شده است(۲۴-۲۱). در مسیر اتوفاژی این miRNA روی ژن های BCL2 و LC3 نقش مهاری ایفا می کند و انتظار می رود با کاهش بیان miR-204-5p، افزایش بیان ژن های هدف دیده شود.

ژن BCL2 نقش آنتی آپتوزی داشته و علاوه بر سرکوب فرآیند آپتوز در مسیرهای سیگنالینگ دیگر، از جمله اتوفاژی فعالیت دارد. LC3 شامل یک فرم محلول LC3I و فرم لیپیدی LC3II است. زمانی که

سرکوبگر تومور در مسیر اتوفازی نقش دارد. در نهایت این یافته ها می تواند سطح اهمیت miRNA ها را ارتقاء داده و به عنوان هدفی برای درمان هدفمند ضد سرطانی و راهی برای پیشرفت داروهای ضد سرطان مطرح نماید.

کد/خلاق مقاله:

sbmub.REC.1394.112

References

1. Shen J, Todd NW, Zhang H, Yu L, Lingxiao X, Mei Y, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest* 2011;91:579-87. doi: 10.1038/labinvest.2010.194
2. Frankel L, Lund AH. MicroRNA regulation of autophagy. *Carcinogenesis* 2012;33:2018-25.
3. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Daniel J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451:1069-75.
4. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007;78: 217-45. doi: 10.1016/S0070-2153(06)78006-1
5. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis function and decay. *Nature Rev Genet* 2010;11:597-610.
6. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs. *J Physiol Biochem* 2011; 67:129-39.
7. Shenouda SK, Alahari K. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Met Rev* 2009; 28:369-78.
8. Ma Q, Jiang Q, Pu Q, Zhang X, Yang W, Wang Y, et al. MicroRNA-143 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer and its relative mechanism. *Int J Biol Sci* 2013; 9:680-92.
9. Fullgrabe J, Daniel J, Bertrand J. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Mole Cell Biol* 2014;15:65-73. doi: 10.1038/nrm3716
10. Liu B, Cheng Y, Yang JM. Autophagy in health and disease. 3th ed. Acad Publication 2013;6:161-80.
11. Imam JS, Plyler JR, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, Rebeles J, et al. Genomic loss

میزان بیان miR-20a در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال مجاور افزایش نشان می دهد و احتمالاً به عنوان یک انکوژن در مسیر اتوفازی نقش دارد. miR-20a می تواند در جهت پیشرفت تومورزایی در سرطان ریه عملکرد داشته باشد. miR-204-5p در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال مجاور کاهش بیان نشان می دهد، بنا بر این احتمالاً به عنوان یک

of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PLoS One* 2012; 7: 52397.

12. Tanida I, Tanidamiyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP and MAP-LC3. *J Biol Chem* 2001;276:1701-06.

13. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3 a mammalian homologue of yeast Apg8p is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-08.

14. Pattingre S, Tassa A, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005;122:927-39.

15. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 2005;33: 179-84. doi: 10.1093/nar/gni178

16. Sukhwinder K, Rachagani S, Apar K. Ganti Smoking and microRNA dysregulation a cancerous combination. *Trends Mole Med* 2014;20:36-47.

17. Lantz PM, Mendez D, Martin A. Radon smoking, and lung cancer the need to refocus radon control policy. *Am J Publ Health* 2013;103:443-47. doi: 10.2105/AJPH.2012.300926

18. Wu Y. MicroRNA delivery by cationic lipoplexes for lung cancer therapy. *Mol Pharm* 2011; 8: 1381-09.

19. Pileczki V, Cojocneanupetric R, Maralani M, Berindan I, Sandulescu R.

- MicroRNAs as regulators of apoptosis. *Clujul Medp* 2016; 89:50-55.
20. Zhao Sh, Yao D, Chen J, Ding N, Ren F. MiR-20a promotes cervical cancer proliferation and metastasis invitro and invivo. *Plos One* 2015; 20:20905.
21. Zhang B, Sun X, Lu S, Liu Z, Liu Y, Li H, et al. MiR-204 inhibits human NSCLC metastasis through suppression of NUA1. *British J Cancer* 2014; 111:2316-27.
22. Todorova K, Metodi V, Metodieva G, Zasheva D, Mincheff M. MiR-204 is dysregulated in metastatic prostate cancer invitro. *Mole Carcinogene* 2016; 55:131-47.
23. Yin Y, Zhang B, Wang W, Fei B, Quan Ch, Zhang J, et al. MiR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A. *Am Associ Cancer Res* 2014; 37:6187-200. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1030
24. Blandino G, Sacconi A, Biagioni F, Canu V, Mori F, Lorenzon L, et al. miR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer. *Cell Dea Dis* 2012; 3: 423-36.
25. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8.
26. Thakur A, Zhang Sh, Gao L, Puyu Sh, Chen M, Ren H. miRNA-204 suppresses human non-small cell lung cancer by targeting ATF2. *Tumor Biol* 2016; 37: 11177-86. doi: 10.1007/s13277-016-4906-4
27. Butrym A, Rybka J, Baczynska D, Tukiendorf A, Kuliczowski K. Low expression of microRNA-204 is associated with poor clinical outcome of acute myeloid leukemia patients. *J Exp Clin Canc Res* 2015; 34:68-81.
28. Li WD, Jin XJ, Zhang QB, Zhang G, Deng XB, Ma L. Decreased expression of miR-204 is associated with poor prognosis in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7:3287-92.
29. Ryan J, Tivnan A, Fay J, Bryan K, Meehan M, Creevey L, et al. MicroRNA-204 increases sensitivity of neuro blastoma cells to cisplatin and is associated with a favourable clinical outcome. *Br J Cancer* 2012; 107:967-76. doi: 10.1038/bjc.2012.356
30. Sümbül A, Gogebakan B, Ergun S, Yengil E, Tonyal O, Yaldız M, et al. MiR-204-5p expression in colorectal cancer an autophagy associated gene. *Tumor Biol* 2014; 35:12713-09. doi: 10.1007/s13277-014-2596-3

Evaluation of MiR-20a and MiR-204 Expression Involved in Autophagy in Non-small Cell lung Cancer

Pargol M¹, Zare Karizi S¹, Karimipour M^{2*}

(Received: August 19, 2017 Accepted: November 20, 2017)

Abstract

Introduction: Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer and the most lethal cancer worldwide. It is often diagnosed at advanced stages. One of the mechanisms of the immune system to fight lung cancer cells is autophagy. Autophagy is a conserved catabolic process in which proteins and organelles are deleted by lysosomes. microRNAs are small RNAs containing about 19–22 nucleotides that function as important regulatory elements in the cell and as oncogene or tumor suppressors in lung cancer. The role of miRNAs is important in lung cancer progression by regulating autophagy genes of several proteins. The aim of this study was to evaluate the expression of miR-204-5p and miR-20a expressions involved in the autophagy pathway in non-small cell lung cancer.

Materials & Methods: In this study, miR-204-5p and miR-20a expression levels were studied, using the quantitative Real-Time PCR technique, in 30 patients with non-small cell lung cancer. RNA was extracted

from tumor and adjacent normal tissue of NSCLC patients. cDNA was synthesized using specific stem-loop for miR-20a, miR-204-5p, and RNU44 reference gene. Finally, the expression levels of miRNAs were assessed by Real-Time PCR and the data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Ethics code: sbmub.REC.1394.112*

Findings: Based on the results of the qRT-PCR analysis it was revealed that miR-20a and miR-204 were upregulated and downregulated in tumor tissues, respectively.

Discussion & Conclusions: These changes in the expression level, suggest that miR-20a and miR-204-5p are oncogenes and tumor suppressors, respectively. So, measuring the expression level of miR-20a could be a biomarker for the diagnosis and progression of non-small cell lung cancer as well as a platform for the targeted treatment of cancer.

Keywords: MicroRNA, Autophagy, Lung cancer, Biomarker

1. Dept of Biology, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Varamin, Tehran, Iran

2. Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: mortezakarimi@yahoo.com