مطالعه بیان افتراقی RNA غیرکد کننده PRNCR1 در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان

آیسان زینل زاده تبریزی[۱]، اسماعیل بابائی[۱*]، محمدعلی حسین پور فیضی[۱]

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۷

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایع ترین بدخیمی در زنان می باشد که باعث مرگ و میر بالائی در افراد مبتلا می شود. شناسائی مارکرهای مولکولی توموری سیال در خون می تواند به عنوان راهکار غیر تهاجمی در تشخیص زودهنگام و پیش آگهی در نظر گرفته شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی وجود RNA ژن PRNCR1 در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان و ارزیابی میزان بیان آن نسبت به نمونه های غیر توموری بود.

مواد و روش ها: نمونه های خون از ۳۲ بیمار سرطان پستان و ۲۵ خانم سالم گرفته شده و از پلاسمای آن ها RNA استخراج گردید. سپس، حضور کمی RNA ژن Lnc-PRNCR1 در پلاسما توسط تکنیک real-time PCR ارزیابی شد. هم چنین، میزان بیان این ژن نسبت به ویژگی های کلینیکی-پاتولوژیکی بیماران نیز مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز آماری داده ها توسط آزمون t-test انجام شد.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که ژن PRNCR1 در پلاسمای خون بیماران سرطانی قابل ردیابی است. بیان این ژن در نمونه های توموری نسبت به پلاسماهای سالم افزایش معنی داری نشان داد($P<0.05$). با این حال، داده های آماری نشان داد که بیان PRNCR1 در نمونه های توموری نسبت به ویژگی های کلینیکی-پاتولوژیکی از جمله سایز تومور، سن بیمار و درگیری گره های لنفاوی تفاوت معنی داری ندارد($P>0.05$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که ژن lnc-PRNCR1 سیال در پلاسما می تواند برای تمیز افراد مبتلا به کارسینومای پستان تهاجمی از نمونه های سالم به کار گرفته شود. با این حال، مطالعات بیشتری جهت مشخص کردن نقش تومورزایی lncRNA PRNCR1 در پستان باید انجام شود.

واژه های کلیدی: Long noncoding RNA، PRNCR1، سرطان پستان، Real-Time PCR

* نویسنده مسئول: گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email: babaei@tabrizu.ac.ir

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 پستان یکی از رایج ترین سرطان های تشخیصی در ایالات متحده آمریکا و دومین عامل ناشی از مرگ و میر سرطانی می باشد. میزان شیوع بدخیمی های پستان در کشورهای پیشرفته بیشتر از کشورهای در حال توسعه است. به عقیده کارشناسان، شیوه زندگی متفاوت و عادت های غذایی مبتلایان از عوامل موثر در بروز این بیماری هست(۱،۲). یکی از عوامل ژنتیکی دخیل در سرطان پستان که امروزه مورد توجه قرار گرفته است RNA های غیر کدکننده گردشی(سیال) در نمونه های مایع است. این RNA ها به سه صورت می توانند وارد جریان خون و سایر مایعات بدن شوند: ۱- RNA های خارج سلولی خود را درون وزیکول های غشایی مثل اگزوزوم ها و میکرووزیکول ها بسته بندی می کنند. ۲- RNA های خارج سلولی توسط سلول ها و بافت های توموری آزاد می شوند. lnc-RNA های گردشی می توانند از سلول های مجاور تومور(سلول های حاشیه تومور)، سلول های ایمنی و سایر سلول های خونی منشا یابند. ۳- RNA های خارج سلولی خود را درون وزیکول هایی مثل اجسام آپوپتوزی بسته بندی می کنند و یا با کمپلکس های پروتئینی همراه می شوند(۵-۳).

امروزه lnc-RNA ها به عنوان قسمت مهمی از تنظیم فعالیت های ژن ها در سلول در نظر گرفته می شوند که در کنترل مکانیسم های مهم سلولی مثل چرخه سلولی، آپوپتوز و تمایز نقش ایفا می کنند(۶). ژن PRNCR1 از نوع غیر کدکننده طویل است که در موقعیت ژنی 8q24.2 قرار گرفته است. این ژن با طول تقریبی 13kb، دارای یک اگزون است و اولین بار در سرطان پروستات کشف شده است. محصول RNA ژن PRNCR1 به گیرنده آندروژنی(AR) متصل می شود و سبب افزایش فعالیت های گیرنده آندروژنی و تکثیر سلول های سرطانی می شود(۷،۸). اهمیت بیومارکرهای سرطانی در ژن های کدکننده پروتئینی، رونوشت های آن ها و یا پروتئین ها هستند. از آن جایی که سرطان یک بیماری چند عاملی است بیومارکرهای مولکولی، ابزارهای تشخیصی و پیشگویی با ارزشی هستند که می توانند کنترل بیماری ها را آسان تر کنند. در مقایسه با RNA های کدکننده پروتئین، استفاده از lncRNA به عنوان مارکر به نفع می باشد زیرا بیان آن ها یک شناساگر خوبی برای وضعیت تومورها می تواند باشد(۹).

با توجه به بیان بالای ژن PRNCR1 در نمونه های توموری از جمله سرطان روده بزرگ و کارسینومای پستان و هم چنین آزاد شدن RNA های بلند غیرکدکننده در خون، در مطالعه حاضر برای اولین بار حضور این RNA توان بیومارکی آن در نمونه های پلاسمای بیماران مبتلا به کارسینومای مجرائی تهاجمی پستان در منطقه شمال غرب کشور مورد ارزیابی قرار گرفته است. هم چنین، ارتباط وجود PRNCR1 با یافته های پاتولوژیکی بیماران نیز مطالعه گردید.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: نمونه های خونی مورد نیاز این تحقیق زیر نظر جراح متخصص توراکس و با رضایت کامل بیماران در بیمارستان نورنجات تبریز جمع آوری گردید و در لوله های فالکون ۱۵ میلی لیتری دارای EDTA قرار داده شد. برای تمامی افراد فرم رضایت مندی پر شد. نمونه ها بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند تا برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گیرند. تعداد نمونه ها ۳۲ خون فرد بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۲۵ خون فرد سالم که هیچ گونه سابقه فامیلی ابتلا به سرطان پستان نداشتند می باشد.

استخراج پلاسما و RNA: برای استخراج پلاسما از خون از روش سانتریفیوژ استفاده شد. RNA تام از پلاسما با استفاده از محلول تریزول (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) و طبق دستور شرکت سازنده استخراج گردید. به دلیل حساسیت کار با RNA از نظر آلودگی با RNase، کلیه لوازم مورد استفاده با محلول DEPC ۰/۱ درصد تیمار گردید.

انجام Real-time PCR: در تحقیق حاضر، از کیت سنتر cDNA شرکت Bioneer کره جنوبی استفاده گردید. به منظور حذف DNA ژنومی که ممکن است همراه RNA استخراج شده باشد قبل از تهیه cDNA،

از آنزیم DNaseI استفاده شده و سپس RNA ها با استفاده از پرایمر Oligo dT و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Thermo-Fisher schientific, USA) به cDNA تبدیل شدند. به منظور اطمینان از صحت سنتز cDNA واکنش PCR برای ژن کنترل داخلی GAPDH انجام شد.

برای ژن PRNCR1، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد(جدول شماره ۱). جهت طراحی پرایمرها از نرم افزار GeneRunner استفاده شد و پس از طراحی، اختصاصیت آن در نرم افزار NCBI-BLAST کنترل شد تا اختصاصی ژن های مورد نظر باشد.

به منظور بررسی کمی بیان ژن، واکنش real-time RCR به روش SYBR® Green انجام گرفت. واکنش ها در پلیت های ۴۸ چاهکی ۰/۱ میکرولیتری و در دستگاه IlluminaEco انجام شد. پس از تهیه مخلوط واکنش اولیه با اضافه کردن مواد بافر سایبر و پرایمرها، cDNA های اختصاصی به چاهک های مربوط اضافه گردیدند. پس از اتمام واکنش، محصول real-time PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵ درصد بررسی شد.

تحلیل آماری: داده های آماری با نرم افزار SPSS PASW STATISTIC18 و با استفاده از آزمون Independent T-Test مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، بیان ژن در نمونه های توموری به صورت مقایسه ای با نمونه های پلاسمای سالم سنجیده شده و میزان معنی داری اختلاف به صورت $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

نتایج به دست آمده نشان داد که پرایمرهای طراحی شده برای ژن lnc-PRNCR1 با اختصاصیت بالائی باعث تکثیر RNA این ژن در نمونه های پلاسما می شود که در شکل شماره یک، منحنی ذوب قطعه تکثیر شده و تک باند موجود در ژل آگارز بیانگر کیفیت آزمایش است. اطلاعات کامل پرایمرهای مورد استفاده نیز در جدول شماره ۱ آورده شده است.

بیان ژن PRNCR1 به صورت کمی در نمونه های پلاسمای افراد مبتلا به کارسینومای تهاجمی پستان و نیز پلاسماهای افراد سالم کنترل، مورد بررسی قرار گرفت. RNA به دست آمده از پلاسماهای مورد بررسی، نشان دادند که PRNCR1 در خون بیماران توموری با اختلاف معنی داری نسبت به نمونه های سالم قابل ردیابی است($P<0.05$) به طوری که در اکثر نمونه های توموری، وجود lnc-RNA PRNCR1 مشاهده گردید(شکل شماره ۲).

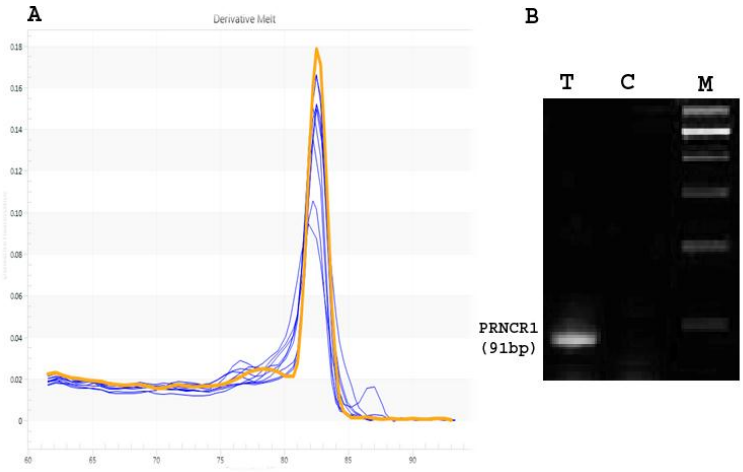
به منظور ارزیابی نقش PRNCR1 در پیشروی تومور، بیان آن در مراحل مختلف توموری، تومورهای با متاستاز به گره های لنفاوی و نیز در تومورهای با اندازه پایین تر و بالاتر از دو سانتی متر مورد مطالعه قرار گرفت. همان طور که در شکل شماره ۳ قسمت A مشاهده می شود، بیان ژن PRNCR1 در بیماران مرحله ۱ و ۲ نسبت به مرحله ۳ اختلاف معنی دار ندارد. با این حال، افزایش جزئی در نسبت بیانی این ژن در نمونه های مرحله ۳ دیده می شود($P=0.113$).

تومورهای با متاستاز به گره های لنفاوی به نوعی بیانگر درجه بدخیمی بالای آن ها نسبت به نمونه های فاقد دست اندازی به گره های لنفاوی هستند(شکل شماره ۳ قسمت B). در این مطالعه، بیان PRNCR1 در این دو گروه اختلاف معنی داری نشان نداد($P=0.214$).

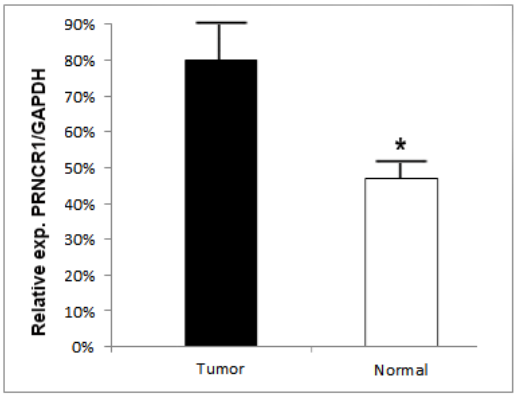
هم چنین، اندازه تومور می تواند به طور غیرمستقیم بیانگر درجه پیشروی تومور باشد. شکل شماره ۳ قسمت C نشان می دهد که بیان PRNCR1 در تومورهای بزرگ تر از ۲ سانتی متر نسبت به انواع کوچک تر افزایش یافته است هر چند که این افزایش معنی دار نمی باشد($P=0.155$).

جدول شماره ۱. اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز قطعاتی ژنی PRNCR1 و GAPDH

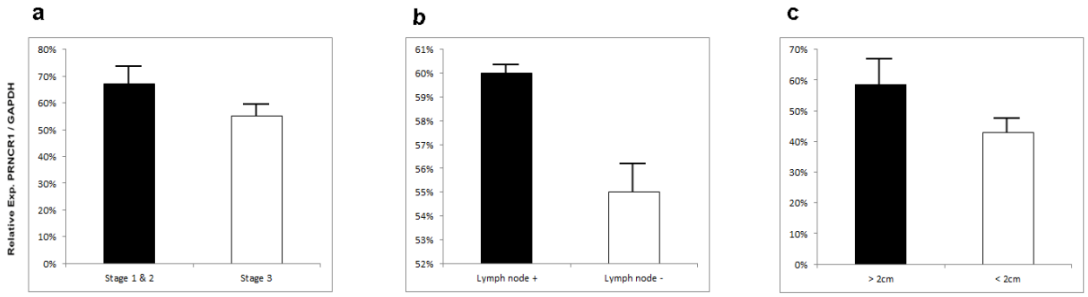
نام ژن	نوع پرایمر	طول پرایمر	توالی پرایمر	درصد GC	دمای ذوب(T_m)
PRNCR1	Forward	21 mer	CTAAGTCCACAGAGCAGGCAG	57.1%	66 ° C
PRNCR1	Reverse	21 mer	GAAGAAGAGCAGCATCCACAT	47.6%	65 ° C
GAPDH	Forward	18 mer	CACGATACCAAAGTTGTC	44.44%	56° C
GAPDH	Reverse	18 mer	TGTAACCATGAGAAGTAT	33.33%	57° C



شکل شماره ۱. A: منحنی ذوب مربوط به قطعه تکثیر شده از ژن PRNCR1. B: الگوی الکتروفورزی قطعه تکثیر شده از ژن PRNCR1 توسط پرایمرهای اختصاصی. T: tumor, C: control, M: marker



شکل شماره ۲. بیان نسبی ژن PRNCR1 در پلاسمای توموری نسبت به نمونه های سالم.
***: بیانگر اختلاف معنی دار($P\leq0.05$) می باشد.**



شکل شماره ۳. بیان نسبی ژن PRNCR1. A: مراحل توموری ۱-۲ نسبت به مرحله ۳. B: بیان ژن در نمونه های با درگیری غدد لنفاوی و نمونه های بدون درگیری C: بیان ژن در تومورهای با اندازه کم تر و بزرگ تر از سه سانتی متر

بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر، سرطان پستان با استفاده از معاینات جسمی و تصاویر حاصل از تکنیک هایی از جمله ماموگرافی و سی تی اسکن تشخیص داده می شود. با این وجود، تکنیک های تصویر برداری موجود حساسیت کافی برای آشکار نمودن توده های کوچک و در مراحل اولیه بیماری را ندارند. هم چنین، ناهمگونی بالای تومورهای پستانی و در برخی موارد نیز شباهت بالای تومورهای بدخیم و خوش خیم، تشخیص به موقع تومور-های بدخیم و طبقه بندی مناسب آن ها را با مشکل مواجه کرده است(۱۰). در نتیجه، تلاش برای شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی جهت تشخیص زودهنگام و افتراقی تومورهای پستانی و انتخاب روش درمانی مناسب تر از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. به عبارتی جستجوی مارکرهای مولکولی که بتوانند به تشخیص این سرطان در مراحل اولیه پیشروی، درک بهتری از رفتار سلول های سرطانی و در نهایت انتخاب بهترین روش درمانی برای هر بیمار کمک کنند بسیار حائز اهمیت است. در سال های اخیر نیز تلاش های زیادی به منظور کشف مارکرهای مولکولی که بتوانند به عنوان فاکتور کمک تشخیصی و پیش آگهی دهنده در کنار سایر روش های پاتولوژیکی به کار گرفته شوند، انجام شده است(۱،۱۰).

نتایج حاصل از مطالعات اخیر پیشنهاد می کنند که lncRNA ها ممکن است نقش های عملکردی در بروز و رشد سرطان ایفا کنند و بنا بر این lncRNA های عملکردی می توانند برای تشخیص سرطان و یا پیش آگهی و یا به عنوان اهداف درمانی مورد استفاده قرار گیرند(۱۱،۱۲). یکی از این lncRNA ها، RNA بلند غیر کدکننده PRNCR1 است که بیان آن در برخی از بافت های توموری و سلول های سرطانی دچار اختلال می شود که می تواند حکایت از نقش آن در بروز و پیشروی سرطان مورد نظر می باشد.

به دنبال مطالعه بیان ژن PRNCR1 در نمونه های توموری و حاشیه توموری پستان و نتایج قابل قبول از نقطه نظر ارزش بیومارکری این ژن، برآن شدیم تا احتمال حضور این LncRNA را در نمونه های پلاسما نیز مورد مطالعه قرار دهیم(۱۳).

لی و همکاران در مقاله ای عنوان کرده اند که PRNCR1 با فعال کردن گیرنده آندروژنی در سرطان پروستات سبب تنظیم بالای بیان این ژن می شود. گیرنده آندروژنی یک نقش کلیدی در مهاجرت سلول ها و متاستاز در سرطان معده ایفا می کند. نتایج به دست آمده نشان داد که SNP های موجود در PRNCR1 ممکن است یک بیومارکر برای سرطان معده باشد(۱۴).

در مطالعه ای دیگر، یانگ و همکاران با مقایسه بیان ژن PRNCR1 بین افراد مبتلا به سرطان کولورکتال و افراد سالم، نشان دادند که این ژن در این بیماران افزایش بیان دارد و پیش بینی گردید که ژن PRNCR1 می تواند یک بیومارکر حساس برای تشخیص سرطان کولورکتال باشد. هم چنین، گزارش دادند که مهار ژن PRNCR1، چرخه سلولی را در فاز

G_0/G_1 القا می کند و کاهش محسوسی در میزان سلول ها در فاز S مشاهده شد. در مقابل، مهار ژن PRNCR1، در کاهش آپوپتوز سلولی یا توانایی تهاجمی بودن تاثیری ندارد. بنا بر این، اطلاعات به دست آمده نشان می دهد که ژن PRNCR1، تکثیر سلول های سرطان کولورکتال را شروع می کند و یک انکوژن بالقوه برای این سرطان می باشد(۱۵).

نتایج این تحقیق ضمن تایید یافته های قبلی مبنی بر افزایش بیان PRNCR1 در نمونه های توموری نسبت به انواع سالم، نشان می دهد که محصول این ژن در پلاسما قابل ردیابی است و می تواند در تمییز سرطان کارسینومای مجرائی تهاجمی از طریق خون مفید باشد. با این حال، بیان این ژن ارتباط معنی داری با یافته های کلینیکی-پاتولوژیکی نشان نداد. به عبارتی، در تومورهای با شدت توموری بیشتر(متاستاز به گره لنفاوی و اندازه توموری بزرگ) بیان آن افزایش پیدا نمی کند که با داده های یانگ و همکاران هم خوانی دارد و ممکن است این ژن در مراحل اولیه تومورزائی دخالت داشته باشد که برای اثبات این ادعا نیازمند مطالعه نمونه های بیشتر و بررسی های مولکولی زیاد است که بخشی از آن در آزمایشگاه ما در حال انجام است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری بیماران محترم و خانواده های ایشان، کارکنان اتاق عمل و بخش پاتولوژی بیمارستان نور نجات تبریز کمال تشکر را دارند. این تحقیق در دانشگاه تبریز و با حمایت مرکز مطالعات و همکاری های علمی بین المللی(CISSC) انجام گرفته است.

References

1.Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. J Pathol 2011; 223: 307-17. doi: 10.1002/path.2808.

2.Mehra K, Berkowitz A, Sanft T. diet physical activity, and body weight in cancer survivorship. Med Clin North Am 2017; 101: 1151-65. doi: 10.1016/j.mcna.2017.06.004. 3.

3.Hayes EL, Lewiswambi SJ. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer an overview of the proposed roles of noncoding RNA. Breast Cancer Res 2015; 17: 40. doi: 10.1186/s13058-015-0542-y.

4.Switlik WZ, Szemraj J. Circulating miRNAs as non-invasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis prognosis and prediction of treatment response. Postepy Hig Med Dosw 2017; 71: 649-62.

5.Umu SU, Langseth H, Bucherjohannessen C, Fromm B, Keller A, Meese E, et al. A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. RNA Biol 2017; 1;15: 242-50. doi: 10.1080/15476286.2017.1403003.

6.Winkle M, Kluiver JL, Diepstra A, Berg A. Emerging roles for long non coding RNAs in Bcell development and malignancy. Crit Rev Oncol Hematol 2017;120:77-85. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.011.

7.Park JY, Lee JE, Park JB, Yoo H, Lee SH, Kim JH. Roles of long non coding rnas on tumorigenesis and glioma development. Brain Tumor Res Treat 2014;2:1-6. doi: 10.14791/btrt.2014.2.1.1.

8.Zhang A, Zhang J, Kaipainen A, Lucas JM, Yang H. Long non coding RNA a newly deciphered code in prostate cancer. Cancer Lett 2016;375:323-30. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.003.

9. Clark MB, Gascoigne DK, Dinger ME, Mattick JS. Lnc RNAdb a reference database for long noncoding RNAs. Nucleic Acids Res 2011;39:146-51. doi: 10.1093/nar/gkq1138.

10.Velloso FJ, Bianco AF, Farias JO, Torres NE, Ferruzo PY, Anschau V, et al. The crossroads of breast cancer progression insights into the modulation of major signaling pathways. Onco Targets Ther 2017; 10: 5491-524. doi: 10.2147/OTT.S142154.

11.Hauptman N, Damjan G. Long non coding RNA in cancer. Int J Mol Sci 2013; 14: 4655-69. doi: 10.3390/ijms14034655.

12. Lin C, Yang JC, Tanasa B, Li W. lncRNA dependent mechanisms of androgen receptor regulated gene activation programs. Nature 2013; 500: 598-602. doi: 10.1038/nature12451

13.Soleimanpour E, Hosseinpourfeizi M, Babaei E, Montazeri V. [The study of long noncoding RNA, MEG3, expression level and its association with clinicopathologic features in breast cancer]. JBUMS 2017; 19:14-20. (Persian)
14. Jia F, Bai P, Liang Y, Sun R, Yuan F. Association between polymorphisms in long non coding RNA PRNCR1 in 8q24 and riskof gastric cancer. Tumor Biol 2016; 299-303. doi: 10.1007/s13277-015-3750-2.
15.Qiu M, Xu Y, Wang J, Zheng Y, Li M, Xu L, et al. Upregulation of long non coding RNA PRNCR1 in colorectal cancer promotes cell proliferation and cell cycle progression. Oncol Rep 2016; 35: 318-24. doi: 10.3892/or.2015.4364.

Study of the Differential Expression of Non-coding RNA, such as PRNCR1, in the Plasma of Breast Cancer Patients

Zeynalzadehtabrizi A[1], Babaei E[1], Hoseinpourfeizi M[1]*

(Received: February 6, 2018 Accepted: July 8, 2018)

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most common malignancy in women, causing high mortality in the affected patients. The identification of circulating tumor biomarkers in blood could be considered as non-invasive strategy for early diagnosis and prognosis. The aim of this study was to investigate the presence of PRNCR1 (prostate cancer associated non-coding RNA 1) gene in the plasma of patients with breast cancer and to evaluate its expression compared to the normal ones.

Materials & Methods: This study was carried out on the 32 blood samples from breast cancer patients and 25 ones from healthy women. The RNA was extracted from the plasma of the samples. Subsequently, the presence of RNA of PRNCR1 gene in plasma of patients was quantitatively evaluated by a real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR). Moreover, the expression of PRNCR1 gene was studied in terms of clinico-pathological characteristics of patients. The statistical analysis of data was performed in SPSS software using t-test.

Findings: The results showed that the PRNCR1 gene could be detected in the plasma of cancer patients. The obtained results indicated significantly higher expression in tumor samples, compared to the healthy ones ($P<0.05$). However, statistical data showed that the expression of PRNCR1 gene in tumor samples does not have any significant correlation with clinical-pathological characteristics, including tumor size, age, and lymph node involvement ($P>0.5$).

Discussion &Conclusions: The data demonstrated that circulating non-coding PRNCR1 of plasma could be used in the discrimination of breast invasive ductal carcinomas from those of normal people. However, more studies should be conducted to determine the tumorigenic role of lncRNA PRNCR1.

Keywords: PRNCR1, Long noncoding RNA, Breast cancer, real-time PCR

1. Dept of Biological Sciences, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
**Corresponding author email: babaei@tabrizu.ac.ir*