Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Summer 2021. Vol 30. Num 2

Research Paper

Analyzing the Expression Level and Associated Clinical Characteristics of miRNA-138 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Iranian Patients

*Maryam Zare[1]

1. Department of Biology, Faculty of sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Zare M. Analyzing the Expression Level and Associated Clinical Characteristics of miRNA-138 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Iranian Patients. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2021; 30(2):108-117. https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.2.1689.1

https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.2.1689.1

CC BY NC

Received: 19 Apr 2021
Accepted: 28 Jun 2021
Available Online: 01 Jul 2021

Keywords:
Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC), miRNA-138, Downregulation, Biomarker, Diagnosis

ABSTRACT

Background Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) is the seventh most common and lethal malignancy worldwide with a high incidence in Iran. Esophageal cancer has a poor prognosis and low 5-years survival rate. Despite several studies on esophageal cancer, its underlying mechanism remains unclear. Therefore, it is significant to analyze the molecular factors involved in disease for introducing effective diagnosis and therapeutic approaches. Accordingly, the aberrant expression of miRNA was demonstrated in the etiology of esophageal cancer, and applying them as detecting biomarkers was further considered by researchers. This study aimed to evaluate the expression level of miRNA-138 in the tumor tissues of ESCC and normal adjacent tissues.

Objective In total, 35 samples of tumor and normal tissues of the esophagus were collected from ESCC patients.

Methods Then, RNA extraction was conducted and the expression level of miRNA-138 was assessed in the collected tissue samples, applying real-time RT-PCR. Moreover, the relationship between the miRNA-138 expression level and the patient's clinical characteristics was assessed.

Results According to the obtained results, the expression of miR-138 was significantly downregulated in the tumor tissues of ESCC, compared to normal adjacent tissues ($P<0.05$). Additionally, the level of miRNA-138 downregulation was significantly correlated with tumor differentiation degree and metastasis status ($P<0.05$).

Conclusion The significant downregulation of miRNA-138 in the tumor samples of ESCC indicated the role of this epigenetic alteration in esophageal carcinogenesis. Therefore, applying the miRNA-138 could be considered as a potential molecular biomarker for ESCC diagnosis and screening.

Extended Abstract

1. Introduction

Esophageal cancer, as a lethal malignancy, is the seventh most frequent cancer and the sixth cause of cancer death worldwide; it occurs at high incidence in the countries located in the Asian esophageal cancer belt region. It has low survival, poor prognosis, and the highest incidence rate in Iran [1-3]. Radiotherapy, chemotherapy, and esophagostomy are the most common treatment approaches for esophageal cancer. Despite numerous improvements in diagnosis and multimodality therapy, the overall 5-years survival rate remains low. Moreover, >85% of esophageal cancer patients die within 2 years of diagnosis [4, 5]. Several genetic and

* Corresponding Author:
Maryam Zare
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, PO BOX: 19395-4697, Nakhl Street, Artesh boulevard, Tehran, Iran.
Tel: +98 (912) 2787951
E-Mail: mariamzare@yahoo.com

epigenetic alterations, as well as environmental factors, are involved in the carcinogenesis of esophageal cancer, however; its precise underlying mechanism remains undiscovered. Therefore, investigating the molecular alterations of esophagus cancer is essential for improved early detection and effective treatment. Alteration in microRNAs (miRNA) expression represents a main epigenetic change in the carcinogenesis process. Additionally, miRNAs, are a class of small-regulatory non-coding RNA, i.e., critical in basic physiological processes. It can post-transcriptionally regulate gene expression through transcript degradation or translation inhibition. Aberrant miRNA expression is involved in the etiology of human cancers, including esophageal cancer and their expression pattern can be applied as useful biomarkers for cancer diagnosis [6, 7]. In this regard, researchers focused to identify new cancer miRNA biomarkers. Otherwise, miRNA expression varies according to cancer type, disease stage, and tumor histological characteristics [8]. Thus, identifying miRNA involved in esophageal cancer can provide great insight into its tumorigenesis and facilitate improved therapies. In the present study, the expression level of miRNA-138 was evaluated in fresh tumors and normal esophageal tissues, and its association was assessed with the clinicopathological characteristics of patients.

2. Methods

In total, 35 samples of tumor tissues along with adjacent normal tissues of the esophagus were collected from patients referring to Imam Khomeini Hospital following esophagectomy. All obtained samples were confirmed for origination from the esophagus and the status of differentiation was identified by pathological examination. The study was performed at Payame Noor University in 2020. This study was approved by the Ethics Committee of Payame Noor University (Code: IR.PNU.REC.1399.078). Following sample collection, total RNA was isolated applying TriPure Isolation Reagent (Roche, Germany) according to the manufacturer's procedure. After removing the genomic DNA with RNase-free DNase I (Fermentas, INC, MD, USA), cDNA synthesis was performed by miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Subsequently, real-time PCR was applied to evaluate the expression level of miRNA-138 using miScript SYBR Green kit (Qiagen, Hilden, Germany) on Light Cycler 4 system (Roach, Basel, Switzerland). The

Table 1. The relationship between miRNA-138 downregulation level and clinicopathological characteristics of esophageal cancer patients esophagus patients

Characteristic	miRNA-138 Downregulation level		X^2	P
	<69%	>69%		
Gender			3.44	0.064
Male	13(72.2)	5(27.8)		
Female	7(41.2)	10(58.8)		
Age, y			1.94	0.163
<64	14(66.7)	7(33.3)		
>64	6(42.9)	8(57.1)		
Tumor differentiation degree			6.63	0.036
Poor	6(35.3)	11(64.7)		
Moderate	5(71.4)	2(28.6)		
Well	9(81.8)	2(18.2)		
Metastasis			5.84	0.016
Yes	3(27.3)	8(72.7)		
No	17(70.8)	7(29.2)		

reaction mixture was prepared in the total volume of 25 µL containing 10 µL of SYBER Green Master Mix, 2 µL specific forward primer, 2 µL reverse primer (miScript Universal Primer), 2 µL of cDNA, and an adequate quantity of PCR grade water. RNU6B (MiScript PCR Control, Qiagen, Hilden, Germany) gene was used as an internal control. All reactions were performed in triplicate. Statistical analysis was performed using SPSS. The Pearson's correlation coefficient and Chi-squared test were used to analyze the associations between miRNA-138 expression and the clinicopathological characteristics. $P<0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

The expression level of miRNA-138 was assessed in tumor and adjacent normal esophageal tissues per patient by real-time PCR. Totally, 35 patients (18 males & 17 females) were explored in this study. The age range of the patients at the time of diagnosis was 47-88 years with a mean of 64 years. According to the obtained results, the expression of miR-138 was considerably decreased in tumor tissues, compared with normal adjacent tissues ($n=35$; $P<0.05$). The relative expression of miRNA-138 in tumor tissues was 69% lower than that in the normal tissues. The patients were grouped into a<69% downregulation group and a>69% downregulation group according to the mean of downregulation level (69%), i.e., used as the cutoff point. The correlation between miRNA-138 expression and clinicopathological characteristics was assessed by statistical analysis (Table 1). Accordingly, there was no significant correlation between miRNA-138 downregulation level and gender ($P=0.064$) or the age ($P=0.163$) of patients. However, the level of miRNA-138 reduction was significantly associated with the differentiation degree of the tumors ($P=0.036$) and lower levels of miRNA-138 expression were observed in the poorly differentiated samples. In other words, patients at the late stages of disease had a higher possibility of miRNA-138 downregulation, compared to early stages patients. Moreover, a significant correlation was observed between the metastasis occurrence and miRNA-138 decreased level ($P=0.016$); patients with a lower level of miRNA-138 expression had a higher chance of metastasis and aggressive malignancy.

4. Discussion and Conclusion

Esophageal cancer is a complicated disease with a poor prognosis, low survival rate, and high incidence in Iran. However, its exact molecular mechanism is less known and demands further investigation. According to the present study, miRNA-138 was downregulated in esophageal tumor tissues; however, it was expressed at a considerably higher level in the adjacent normal tissues. Moreover, the level of downregulation was significantly related to the differentiation degree and metastatic behavior of tumors. The significant downregulation of miRNA-138 in esophageal cancer indicated the role of this epigenetic alteration in esophageal carcinogenesis. Thus, miRNA-138 could be potentially considered as a molecular biomarker for esophageal cancer.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of Payame Noor University of Tehran (Code: IR.PNU.REC.1399.078).

Funding

This article is taken from the research project of the responsible author, approved by Payame Noor University and sponsored by Payame Noor University.

Conflicts of interest

The author declared no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

بررسی میزان بیان miRNA-138 در سرطان سلول سنگ‌فرشی مری و ارتباط آن با پارامترهای کلینیکی در جمعیت بیماران ایرانی

*مریم زارع[1]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۳۰ فروردین ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۰۷ تیر ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۰

چکیده

زمینه سرطان سلول سنگ‌فرشی مری هفتمین بدخیمی شایع و کشنده در جهان است که شیوع زیادی در ایران دارد. پیش‌آگهی سرطان مری ضعیف بوده و بقای پنج ساله بیماران ناچیز است. با وجود مطالعات صورت‌گرفته روی این سرطان، هنوز مکانیسم دقیق آن مشخص نشده است. بنابراین، بررسی عوامل مولکولی دخیل در این بیماری برای یافتن راه‌های تشخیصی و درمانی اهمیت دارد. در این رابطه تغییرات miRNAها در سرطان مری نشان داده شده و محققین به کاربرد آن‌ها به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی سرطان مری توجه کرده‌اند.

هدف در این مطالعه میزان بیان miRNA-138 در بافت توموری و بافت نرمال مجاور ارزیابی شده است.

روش‌ها برای انجام این پژوهش که در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور در سال ۱۳۹۹ انجام شد، ۳۵ نمونه بافت توموری سرطان مری و بافت نرمال مجاور از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی تهران جمع‌آوری شد. سپس استخراج RNA انجام شده و میزان بیان miRNA-138 در نمونه‌های بافتی با روش real time RT-PCR ارزیابی شد. همچنین رابطه بین تغییرات بیان miRNA-138 با پارامترهای کلینیکی بیماران نیز بررسی شد.

یافته‌ها بر اساس نتایج، بیان miRNA-138 در بافت توموری سرطان مری به طور معنی‌داری نسبت به بافت نرمال کاهش یافته است (P<۰/۰۵). همچنین ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان miRNA-138 در بافت توموری با درجه تمایز تومورها و وضعیت متاستاز آن‌ها مشاهده است (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری کاهش بیان miRNA-138 در سرطان سلول سنگ‌فرشی مری نشان‌دهنده نقش این تغییر اپی‌ژنتیکی در سرطان‌زایی مری است. بنابراین، کاربرد miRNA-138 به‌عنوان یک بیومارکر مولکولی بالقوه برای شناسایی و پیگیری سرطان مری می‌تواند مد نظر قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها:
سرطان سلول سنگ‌فرشی مری، miRNA-138، کاهش بیان، بیومارکر، تشخیص

مقدمه

امروزه سرطان‌ها به‌منزله بیماری شایع و کشنده چالشی بزرگ برای جوامع گوناگون محسوب شده و دومین عامل مرگ‌ومیر افراد زیر ۷۰ سال در جهان هستند. در این راستا، سرطان مری هفتمین سرطان شایع و ششمین عامل مرگ ناشی از سرطان در جهان بوده و میزان شیوع آن در ایران نیز زیاد است [۱]. با وجود اینکه از دیدگاه هیستولوژیکی، دو نوع اصلی از سرطان مری شامل کارسینومای سلول سنگ‌فرشی مری و آدنوکارسینومای مری وجود دارد، اما بیش از ۹۰ درصد این سرطان از نوع کارسینومای سلول سنگ‌فرشی است. میزان بروز این سرطان در مناطق گوناگون دنیا، متفاوت بوده و بالاترین میزان وقوع آن در منطقه کمربند آسیایی سرطان مری مشاهده شده است که شامل نواحی جنوب شرقی و مرکزی آسیا و از جمله کشور ایران است [۲]. این سرطان در ایران، دومین سرطان شایع در مردان بوده و جایگاه سوم را در بین زنان ایرانی داراست و شیوع آن در نواحی شمالی ایران به ویژه استان گلستان و منطقه بندر ترکمن زیاد است [۳]. رایج‌ترین روش‌های درمانی برای سرطان مری شامل شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی برای برداشت بافت توموری است. با این وجود، تشخیص این سرطان در مراحل پیشرفته بیماری صورت گرفته و میزان بقای پنج ساله بیماران پس از درمان بسیار کم بوده و میزان مرگ بیماران پس از تشخیص

* نویسنده مسئول:
مریم زارع
نشانی: تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.
تلفن: ۲۷۸۷۹۵۱ (۹۱۲) ۹۸+
رایانامه: mariamzare@yahoo.com

بیش از ۸۵ درصد است [۵،۴]. با وجود مطالعات صورت‌گرفته و تعیین نقش عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز این سرطان، هنوز مکانیسم بیماری‌زایی آن دقیقاً مشخص نشده است. لذا شناسایی تغییرات مولکولی مؤثر در سرطان مری برای ارائه روش‌های دقیق‌تر تشخیص و درمان اهمیت ویژه‌ای دارد.

یکی از تغییرات اپی‌ژنتیکی مؤثر در روند سرطان‌زایی، تغییر در الگوی بیان miRNAهاست. miRNAها مولکول‌های RNA کوچک و غیرکدکننده هستند که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و سلولی نقش تنظیمی دارند. نقش اصلی miRNA ها در سلول، تنظیم بیان ژن پس از فرایند رونویسی است و از طریق اتصال به مناطق 3'-UTR در رونوشت‌ها، سبب توقف فرایند ترجمه و یا تجزیه رونوشت می‌شوند. بر اساس مطالعات مختلف، تغییرات بیان miRNAها در ایجاد بیماری‌های گوناگون و از جمله سرطان‌ها مؤثر است [۶]. به علاوه، برخی مطالعات نشان داده‌اند که الگوی بیانی این مولکول‌ها می‌تواند به شکل بیومارکرهایی در سرطان‌ها کارآرایی داشته باشد [۷]. از این رو امروزه مطالعات زیادی برای شناسایی و معرفی بیومارکرهای miRNA انجام می‌گیرد تا بتوان آن‌ها را جایگزین روش‌های تشخیصی تهاجمی برای سرطان‌ها و از جمله سرطان مری کرد. بیومارکرهای خونی اغلب برای تشخیص مراحل اولیه سرطان سلول سنگ‌فرشی مری کاربرد دارند. الگوی بیان miRNAها در سرطان‌های گوناگون متفاوت بوده و علاوه بر آن، با پارامترهایی چون خصوصیات هیستولوژیکی تومور، شدت بیماری، علائم بالینی و چگونگی پاسخ به شیمی درمانی نیز مرتبط است [۸]. بنابراین شناسایی و تعیین انواع miRNAهای دخیل در ایجاد سرطان مری علاوه بر آشکار نمودن بخشی از مکانیسم‌های مولکولی این سرطان، برای معرفی بیومارکرهای کاربردی هم حائز اهمیت است. بر این اساس در این مطالعه تغییرات بیان miRNA-138 در بافت توموری و نرمال بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگ‌فرشی مری مطالعه شد و ارتباط آن با پارامترهای کلینیکی بیماران نیز ارزیابی گردید.

روش‌ها

نمونه‌های بافتی: در این مطالعه، نمونه‌های بافت توموری مری به همراه بخشی از بافت نرمال مجاور از بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگ‌فرشی مری که تحت عمل جراحی برداشتن تومور قرار گرفته‌اند، به دست آمد. این پژوهش، در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور در سال ۱۳۹۹ انجام شد و برای انجام آن ۳۵ نمونه بافت توموری سرطان مری و بافت نرمال مجاور از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی تهران جمع‌آوری شد. بیماران شامل ۱۸ مرد و ۱۷ زن بودند. محدوده سنی بیماران ۴۷ تا ۸۸ سال با میانگین سنی ۶۴ سال بوده، همچنین ۱۱ نمونه توموری دارای متاستاز و ۲۴ نمونه فاقد متاستاز بوده‌اند. از نظر درجه تمایز تومورها نیز ۱۷ نمونه در وضعیت Poor Differentiated و ۷ نمونه در وضعیت Moderate Differentiated و ۱۱ نمونه در وضعیت Well Differentuated بوده‌اند.

همه نمونه‌های بافتی بلافاصله پس از عمل جراحی دریافت شده و پس از قرارگیری در ظرف محتوی ازت مایع به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده تا زمان استفاده برای استخراج RNA، در دمای ۸۰- درجه نگهداری شدند. بررسی‌ها و آزمایشات پاتولوژیکی برای تأیید منشا بافتی نمونه‌ها و تعیین نوع کارسینومای سلول سنگ‌فرشی مری انجام شد.

استخراج RNA: برای استخراج RNA کل از نمونه‌های بافت توموری و نرمال، از معرف TriPure (Roche, Mannheim,Germany) استفاده شده و مراحل کار بر اساس پروتکل مربوطه انجام گردید. به این منظور، ۱ میلی‌لیتر معرف TriPure به حدود ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافتی هموژنیزه‌شده اضافه گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه اضافه شده و پس از ۱۵ ثانیه تکان شدید و ۲ تا ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ و در دمای C° ۴ سانتریفیوژ شد. سپس فاز رویی محتوی RNA جدا شده و به ویال دیگر منتقل گشت و به میزان هم حجم محلول، به آن ایزوپروپانل اضافه شد. سپس ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و پس از آن ۱۰ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید تا RNA رسوب کند. رسوب RNA پس از شست‌وشو با اتانول ۷۵ درصد، در ۲۰ میکرولیتر آب DEPC حل شده و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در دمای ۵۵°C انکوبه شد. در ادامه، برای برطرف کردن آلودگی احتمالی با DNA ژنومی، RNA به‌دست‌آمده با محلول DNAase عاری از RNAase (Fermentase INC, MD, USA) تیمار گردید.

سنتز cDNA و انجام Real time RT-PCR: سنتز cDNA با استفاده از کیت miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. بر این اساس، فرایند پلی آدنیله شدن انتهای miRNAها توسط آنزیم پلی A پلیمراز و سپس سنتز cDNA توسط پرایمر oligo-dT و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به موازات هم و در یک مخلوط واکنش انجام شد. به این منظور، مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر بافر ۵x miScript HiFlex، ۲ میکرولیتر ۱۰x miScript Nucleics Mix، ۲ میکرو لیتر miScript Reverse Transcriptase Mix، ۱ میکروگرم RNA کل استخراج شده و مقدار لازم RNase-free water تهیه گردید. سپس مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و متعاقبا برای توقف عمل سنتز، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه قرار گرفت.

بعد از سنتز cDNA، سنجش میزان بیان miRNA-138 طی

واکنش real time PCR انجام شد. این واکنش با استفاده از کیت miScript SYBR Green kit (Qiagen, Hilden, Germany) و به همراه توالی پرایمر اختصاصی miRNA-138 انجام شد. پرایمر اختصاصی miRNA-138 که مشابه توالی این miRNA است به‌منزله پرایمر Forward و پرایمر Universal که منطبق بر توالی ثابت اضافه شده در انتهای cDNA سنتز شده است، به‌منزله پرایمر Reverse استفاده شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر بافر SYBER Green Master Mix، ۲ میکرولیتر پرایمر Forward، ۲ میکرولیتر پرایمر (miScript Universal Primer) Reverse، ۲ میکرولیتر cDNA و حجم مناسبی آب عاری از Rnase آماده شد. واکنش real time PCR در دستگاه LightCycler ۴ (Roach, Basel, Switzerland) انجام شد. همچنین از ژن RNU6B (MiScript PCR Control, Qiagen,Hilden,Germany) به‌عنوان کنترل داخلی بیان ژن و برای نرمالیزه کردن بیان ژن استفاده و همه واکنش‌های PCR در سه سری جداگانه انجام شد. در ادامه، براساس داده‌های حاصل از واکنش real time PCR و تعیین میزان CT مربوط به ژن هدف (miRNA-138) و ژن کنترل داخلی (RNU6B)، میزان ΔCT (CT کنترل – CT ژن هدف = ΔCT) به دست آمده و تغییرات بیان (fold change) با استفاده از فرمول ۲-ΔΔCT محاسبه شد.

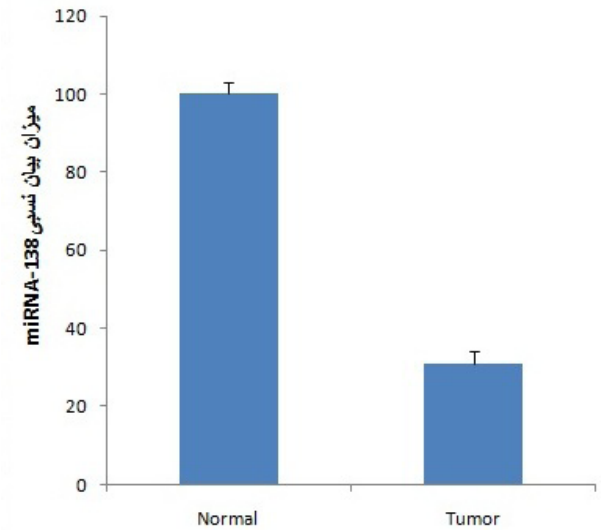
آنالیز آماری: برای بررسی نتایج و ارزیابی میزان بیان miRNA-138 از نرم‌افزار Spss نسخه ۲۰ استفاده شد. مقایسه بیان miRNA-138 در بافت توموری و نرمال و نیز ارتباط بین میزان کاهش بیان miRNA-138 با پارامترهای کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران با آزمون مربع کای پیرسون (Pearson's chi-squared test) ارزیابی شد. سطح معنی‌داری ارزش P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه میزان بیان miRNA-138 در سرطان سلول سنگ‌فرشی مری سنجش و ارزیابی شد. به این منظور، مجموعاً از ۳۵ نمونه بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان مری به همراه بافت نرمال مجاور آن استفاده شد. بیماران شامل ۱۸ مرد و ۱۷ زن بودند. محدوده سنی بیماران ۴۷ تا ۸۸ سال با میانگین سنی ۶۴ سال (۸/۳±۶۴) بوده است (جدول شماره ۱).

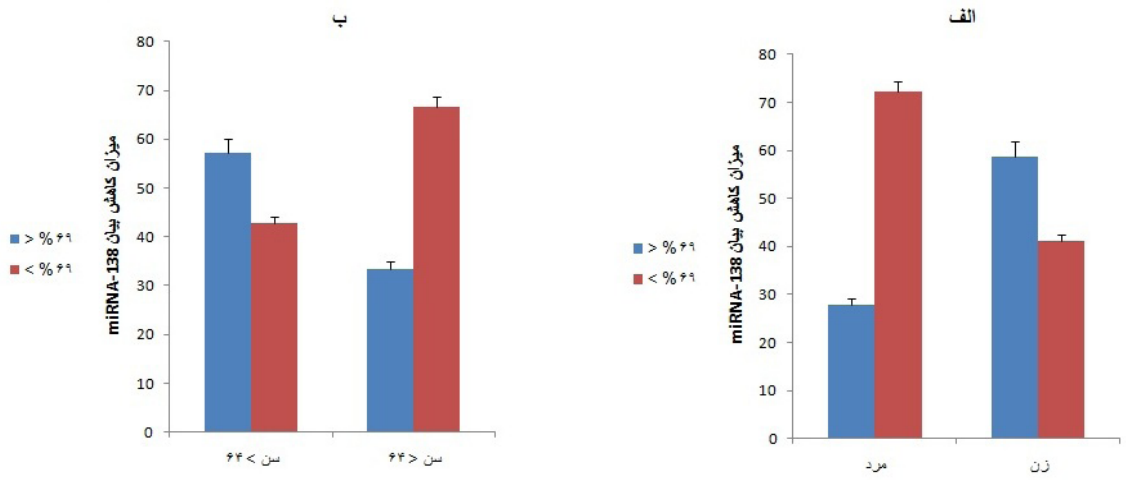
نتایج ارزیابی real time RT-PCR نشان داده است که سطح بیان miRNA-138 در بافت توموری مری در مقایسه با بافت نرمال مری به طور معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۱). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، در نمونه‌های بافت توموری، بیان miRNA-138 به طور متوسط حدود ۶۹ درصد (۱۰/۲±۶۹) کمتر از نمونه‌های بافت نرمال مری مشاهده است.

نمونه‌های توموری بر اساس میزان کاهش بیان miRNA-138و با در نظر گرفتن میزان متوسط کاهش بیان ۶۹ درصد به عنوان حد مرزی، به دو گروه تقسیم شدند: نمونه‌هایی که بیشتر از ۶۹ درصد (<۶۹٪) کاهش بیان داشته‌اند و نمونه‌هایی که کمتر از ۶۹ درصد (<۶۹٪) کاهش بیان نشان داده‌اند. متعاقباً ارتباط بین وضعیت بیماران با میزان کاهش بیان miRNA-138 ارزیابی شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، از بین ۱۸ بیمار مرد، ۲۷/۸ درصد در گروه کاهش بیان بیشتر از ۶۹ درصد (<۶۹٪) و ۷۲/۲ درصد در گروه کاهش بیان کمتر از ۶۹ درصد (<۶۹٪) قرار گرفته‌اند. از میان ۱۷

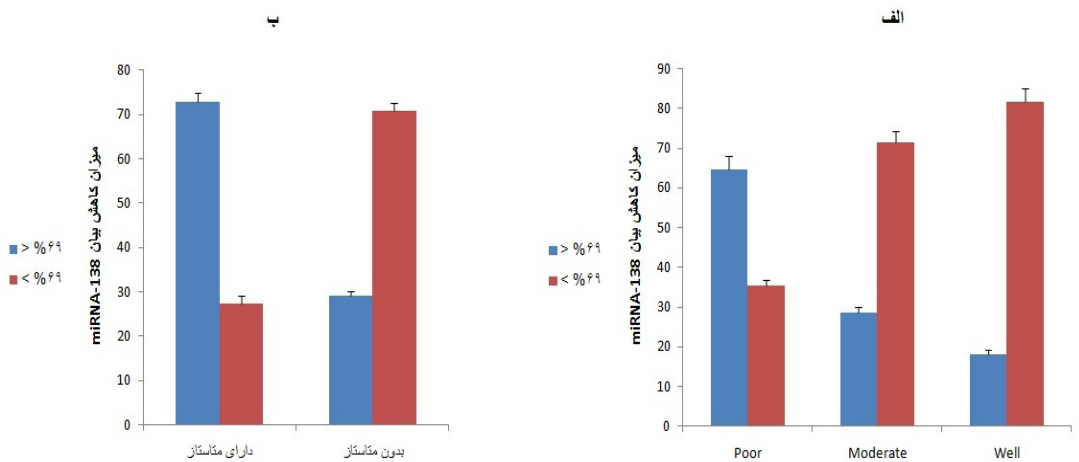


مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۱. کاهش بیان miRNA-138 در سرطان سلول سنگ‌فرشی مری
نتایج به‌دست‌آمده از سنجش Real time RT-PCR نشان داده است که بیان miRNA-138 در بافت توموری کارسینومای سلول سنگ‌فرشی مری به میزان ۶۹ درصد نسبت به بافت نرمال مری کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵).



تصویر ۲. میزان کاهش بیان miRNA-138 در بیماران مبتلا به سرطان مری بر اساس جنسیت و محدوده سنی؛ الف) میزان کاهش بیان miRNA-138 با جنسیت بیماران ارتباط معنی‌داری ندارد (P>۰/۰۵)؛ ب) میزان کاهش بیان miRNA-138 با محدوده سنی بیماران ارتباط معنی‌داری ندارد (P>۰/۰۵).



تصویر ۳. میزان کاهش بیان miRNA-138 در بیماران مبتلا به سرطان مری بر اساس درجه تمایز تومورها و وجود متاستاز
الف) میزان کاهش بیان miRNA-138 به طور معنی‌داری با درجه تمایز تومورها مرتبط است (P<۰/۰۵)؛ ب) میزان کاهش بیان miRNA-138 به طور معنی‌داری با وضعیت متاستاز تومورها مرتبط است (P<۰/۰۵).

بیمار زن نیز، ۵۸/۸ درصد در گروه کاهش بیان بیشتر از ۶۹ درصد (>۶۹٪) و ۴۱/۲ درصد در گروه کمتر از ۶۹ درصد (<۶۹٪) قرار داشته‌اند (تصویر شماره ۲). با وجود اینکه کاهش بیان بیشتری در میان زنان بیمار مشاهده شد، اما ارتباط آماری بین جنسیت بیماران با میزان کاهش بیان معنی‌دار نبوده است (P=۰/۰۶۴)

از نظر محدوده سنی، ۶۰ درصد بیماران کمتر از سن متوسط (۶۴ سال) و ۴۰ درصد بیشتر از سن متوسط (۶۴ سال) داشته‌اند. بر اساس نتایج، به نظر می‌رسد که شدت کاهش بیان miRNA در بیماران با سن بالاتر، بیشتر بوده است؛ به طوری که در ۵۷ درصد بیماران با سن بالاتر (محدوده سنی >۶۴)، بیان miRNA-138 به میزان بیشتر از ۶۹ درصد (>۶۹٪) کاهش یافته است (تصویر شماره ۳). با این حال، ارتباط آماری معنی‌داری بین محدوده سنی بیماران با میزان کاهش بیان مشاهده نشد (P=۰/۱۶۳).

وضعیت هیستولوژیکی تومورها از نظر درجه تمایز به صورت Well، Moderate و Poor بوده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان داده‌اند که میزان کاهش بیان miRNA-138 در بافت‌های توموری به طور معنی‌داری با درجه تمایز تومورها ارتباط داشته است (P=۰/۰۳۶). بر اساس آنالیزهای آماری، در ۱۸/۲ درصد تومورهای با درجه تمایز Well، میزان کاهش بیان miRNA-138 بیشتر از ۶۹ درصد بوده است، در حالی که ۲۸/۶ درصد تومورهای Moderate و ۶۴/۷ درصد تومورهای با درجه تمایز Poor کاهش بیان بیشتر از ۶۹ درصد را نشان داده‌اند. این امر نشان

جدول ۱. اطلاعات مربوط به پارامترهای کلینیکی بیماران و ارتباط آن با میزان کاهش بیان miRNA-138

وضعیت بیماران		تعداد کل	تعداد (درصد)		P	X^2
			میزان کاهش بیان miRNA-138			
			< ٦٩ ٪	> ٦٩٪		
جنسیت	مرد	۱۸ (۵۱/۴)	۱۳ (۷۲/۲)	۵ (۲۷/۸)	۰/۰۶۴	۳/۴۴
	زن	۱۷ (۴۸/۶)	۷ (۴۱/۲)	۱۰ (۵۸/۸)		
محدوده سنی	<۶۴	۲۱ (۶۰)	۱۴ (۶۶/۷)	۷ (۳۳/۳)	۰/۱۶۳	۱/۹۴
	>۶۴	۱۴ (۴۰)	۶ (۴۲/۹)	۸ (۵۷/۱)		
درجه تمایز تومور	Poor	۱۷ (۴۸/۶)	۶ (۳۵/۳)	۱۱ (۶۴/۷)	۰/۰۳۶	۶/۶۳
	Moderate	۷ (۲۰)	۵ (۷۱/۴)	۲ (۲۸/۶)		
	well	۱۱ (۳۱/۴)	۹ (۸۱/۸)	۲ (۱۸/۲)		
وجود متاستاز	بله	۱۱ (۳۱/۴)	۳ (۲۷/۳)	۸ (۷۲/۷)	۰/۰۱۶	۵/۸۴
	خیر	۲۴ (۶۸/۶)	۱۷ (۷۰/۸)	۷ (۲۹/۲)		

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

می‌دهد که احتمالاً تومورهایی که در مراحل پیشرفته‌تر هستند، دارای بیان کمتری از miRNA-138 هستند. به عبارت دیگر، با پیشرفت مرحله بیماری میزان بیان miRNA-138 نیز کاهش بیشتری می‌یابد. همچنین وضعیت متاستاز بیماران و ارتباط آن با کاهش بیان miRNA-138 بررسی شد. بر این اساس، ۳۱/۴ درصد تومورها دارای متاستاز بوده و ۶۸/۶ درصد بدون متاستاز بوده‌اند. نتایج آنالیز آماری نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار بین وجود متاستاز و کاهش بیان miRNA-138 بوده است (P=۰/۰۱۶). به طوری که ۷۲/۸ درصد تومورهای دارای متاستاز، کاهش شدیدی در بیان miRNA-138 (کاهش بیان >۶۹٪) نشان داده‌اند و ۲۷/۳ درصد نیز کاهش بیان کمتر از ۶۹ درصد نشان داده‌اند. همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، ۲۹/۲ درصد از نمونه‌های توموری بدون متاستاز، دارای کاهش بیان بیشتر از ۶۹ درصد بوده و ۷۰/۸ درصد نیز دارای کاهش بیان کمتر از ۶۹ درصد بوده‌اند. در واقع به نظر می‌رسد که کاهش بیان miRNA-138 می‌تواند در تشدید بدخیمی و تهاجم و متاستاز تومور به بافت‌های اطراف مؤثر باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان مری نوعی سرطان شایع و کشنده است که در اثر تغییر در سلول‌های دیواره مری و رشد غیرطبیعی آن‌ها ایجاد می‌شود. این سرطان هفتمین سرطان شایع در جهان و ششمین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است. میزان شیوع این سرطان در برخی از نقاط جهان و به ویژه کشور ایران بالاست [۹،۱]. از سوی دیگر به دلیل پیشرفت سریع بیماری و تشخیص دیر هنگام آن، میزان بهبودی بیماران کم بوده و تنها ۱۰ الی ۱۵ درصد بیماران می‌توانند بقای ۵ ساله داشته باشند [۴]. بنابراین، شناسایی دقیق مکانیسم‌های مولکولی این بیماری می‌تواند برای ارائه راهکارهای تشخیص سریع‌تر و درمان هدفمندتر مناسب باشد.

امروزه miRNAها بیومارکرهای امیدبخش و جایگزین برای تشخیص زودهنگام سرطان‌ها هستند و مطالعات زیادی با هدف شناسایی و معرفی این بیومارکرها برای انواع سرطان‌ها از جمله سرطان مری در حال انجام است. بر این اساس، تغییر بیان بعضی از miRNAها شامل: miR-223، miRNA-210، miRNA-375، miRNA-9 NA-132 در سرطان مری گزارش شده است. بنابراین، با توجه به اهمیت این سرطان و شیوع بالای آن به ویژه در ایران، در این مطالعه الگوی بیان miRNA-138 در سطح نمونه‌های بافتی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان سلول سنگ‌فرشی مری برای اولین بار ارزیابی شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان بیان miRNA-138 در بافت توموری بیماران در مقایسه با بافت نرمال مجاور به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. به نظر می‌رسد که بیان miRNA-138 در بیماران با سنین بالاتر نسبت به بیماران با سن کمتر کاهش بیشتری داشته است. به علاوه در تومورهای مراحل پیشرفته‌تر بیماری (درجه تمایز Poor)، کاهش بیان بیشتری نسبت به تومورهای مراحل ابتدایی‌تر (Well) مشاهده شد. همچنین کاهش شدید بیان miRNA-138 با وقوع متاستاز نیز مرتبط بوده و در بیمارانی که دارای متاستاز بوده‌اند، بیان miRNA-138 به میزان بیشتری کاهش یافته است. بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که کاهش بیان miRNA-138 نقش مهمی در پیشرفت مراحل تومورزایی مری و فرایند تهاجم و متاستاز تومورها داراست.

در این راستا، مطالعه انجام‌شده توسط ژنگ و همکاران نیز نتایج

مشابهی درباره کاهش بیان miRNA-138 در سطح نمونه‌های بافتی و نیز سرم بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگ‌فرشی مری نشان داده است. همچنین مشاهده شد که کاهش بیان miRNA-138 با مراحل پیشرفته بیماری و ایجاد متاستاز و نیز کاهش بقای ۵ ساله بیماران سرطان مری در ارتباط بوده است [۱۰]. سایر مطالعات انجام‌شده در این زمینه نشان داده‌اند که بیان miRNA-138 در سرطان پستان نیز کاهش می‌یابد و این کاهش بیان باعث افزایش بیان انکوژن CREPT به عنوان ژن هدف miRNA-138 می‌گردد که نشان‌دهنده نقش تنظیمی miRNA ها در بیان سایر ژن‌هاست [۱۱]. همچنین در مطالعه‌ای که لی و همکاران انجام دادند، نشان داده شد که بیان کمتر miRNA-138 در سطح رده سلولی سرطان ریه و نیز نمونه‌های بافتی این سرطان می‌تواند میزان بیان ژن SOX را به‌عنوان یکی از ژن‌های هدف miRNA-138 افزایش دهد که این فرایند نیز به نوبه خود باعث تحریک فرایند تبدیل اپیتلیال به مزانشیم (EMT) و تولید و تکثیر سلول‌های توموری و افزایش متاستاز می‌گردد [۱۲]. از سوی دیگر پنگ و همکاران کاهش بیان miRNA-138 را در سرطان معده نشان داده‌اند که البته مقدار کاهش سطح miR-NA-138 ارتباط مستقیمی با پیشرفت تومور و قدرت تهاجم آن به گره‌های لنفاوی دارد [۱۳]. به علاوه نشان داده شده که کاهش بیان miRNA-138 در بافت‌های توموری و رده سلولی سرطان سرویکس به واسطه افزایش بیان ژن هدف c-Met باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۴]. از سوی دیگر، مطالعه‌ای دیگر نشان داده است که کاهش بیان miRNA-138 در سرطان بافت پوششی سر و گردن باعث متاستاز و جلوگیری از مرگ سلولی می‌شود [۱۵]. در سرطان مثانه Gallbladder نیز مهار بیان miRNA-138 و ارتباط آن با پیشرفت تومور گزارش شده است [۱۶].

به نظر می‌رسد که miRNA-138 به‌عنوان یک miRNA مهارکننده تومور در سرطان‌های گوناگون باشد و بیان نرمال آن مانع از ایجاد تومور و پیشرفت آن می‌گردد. در واقع بسیاری از ژن‌هایی که توسط miRNA-138 تنظیم می‌شوند، جزو ژن‌های مرتبط با تکثیر سلولی، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، فرایند تبدیل اپیتلیال به مزانشیمال (EMT)، تهاجم و تحرک سلولی هستند [۱۷]. به علاوه برخی مطالعات نیز نشان داده‌اند که بیان miR-NA-138 در پاسخ مناسب تومورها به شیمی درمانی نیز مؤثر است [۱۷، ۱۸].

یکی از خصوصیات قابل توجه سرطان مری این است که وقوع آن دارای تنوع وسیعی از نظر مناطق جغرافیایی، نژاد، قومیت و جنسیت است و البته این موضوع به دلیل تنوع ژنتیکی افراد در جمعیت‌های گوناگون و نیز تنوع عوامل محیطی، عادات غذایی، سبک زندگی و مصرف الکل و تنباکو است. برای مثال میزان وقوع سرطان مری و نیز میزان بقا و بهبودی در جمعیت سیاه پوستان بیشتر از سفید پوستان است [۱۹، ۲۰]. در واقع تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی بین اقوام و نژادهای گوناگون به طرق متفاوتی می‌تواند بر ریسک و خطر ابتلا به سرطان‌ها تأثیرگذار باشد. از جمله اینکه یک آلل خاص می‌تواند با درجات متفاوتی به‌عنوان یک عامل خطر در جمعیت‌های مختلف عمل کند و یا اینکه یک تغییر مولکولی مشخص ممکن است در تعامل با سایر فاکتورهای محیطی و ژنتیکی که در جمعیت‌ها متفاوت است، اثرات متفاوتی بجا بگذارد [۲۱]. بنابراین بررسی انواع تغییرات ژنتیکی و به ویژه اپی‌ژنتیکی مؤثر در روند سرطان‌زایی در میان جمعیت‌های مختلف حائز اهمیت است.

نتایج این مطالعه نیز کاهش بیان miRNA-138 را در سطح نمونه‌های بافتی سرطان مری نشان داده است که می‌تواند با پیشرفت بیماری و توانایی متاستاز تومورها در ارتباط باشد. البته مطالعه روی تعداد بیشتر نمونه‌های بافتی و به ویژه بررسی بیان در سطح سرم بیماران می‌تواند نتایج دقیق‌تری را ارائه دهد. بر این اساس به نظر می‌رسد که شناسایی تغییرات بیان miRNAها در سرطان مری می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد مکانیسم پیچیده سرطان‌زایی مری ارائه نموده و نیز برای معرفی بیومارکرهای تشخیصی و اهداف درمانی جدید سرطان مری نیز کمک‌کننده باشد. با این وجود، تأیید پتانسیل بیومارکری miRNA-138 برای عملکردهای تشخیصی و ردیابی سرطان مری، قطعاً به مطالعات بیشتر و دقیق‌تر و از جمله در سطح سرم بیماران نیاز دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه پیام نور تهران قرار گرفته است (کد: IR.PNU.REC.1399.078).

حامی مالی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی نویسنده مسئول، تصویب‌شده در دانشگاه پیام نور است و معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور از آن حمایت مالی کرده است.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسنده این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021; 71(3):209-49. [DOI:10.3322/caac.21660] [PMID]

[2] Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. Gut. 2015; 64(3):381-7. [DOI:10.1136/gutjnl-2014-308124] [PMID]

[3] Kolahdoozan S, Sajadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. Archives of Iranian Medicine. 2010; 13(2):143-6. https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=168243

[4] Abbas G, Krasna M. Overview of esophageal cancer. Annals of Cardiothoracic Surgery. 2017; 6(2):131-6. [DOI:10.21037/acs.2017.03.03] [PMID] [PMCID]

[5] Domper Arnal MJ, Ferrandez Arenas A, Lanas Arbeloa A. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. World Journal of Gastroenterology. 2015; 21(26):7933-43. [DOI:10.3748/wjg.v21.i26.7933] [PMID] [PMCID]

[6] Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. Cancer Cell International. 2015; 15:38. [DOI:10.1186/s12935-015-0185-1] [PMID] [PMCID]

[7] Catela Ivkovic T, Voss G, Cornella H, Ceder Y. MicroRNAs as cancer therapeutics: A step closer to clinical application. Cancer Letters. 2017; 407:113-22. [DOI:10.1016/j.canlet.2017.04.007] [PMID]

[8] Yao C, Liu HN, Wu H, Chen YJ, Li Y, Fang Y, et al. Diagnostic andprognostic value of circulating microRNAs for esophageal squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. Journal of Cancer. 2018; 9(16):2876-84. [DOI:10.7150/jca.25351] [PMID] [PMCID]

[9] Abnet CC, Arnold M, Wei WQ. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma. Gastroenterology. 2017; 154(2):360-73. [DOI:10.1053/j.gastro.2017.08.023] [PMID] [PMCID]

[10] Zheng S, Zhang X, Wang X, Li J. Downregulation of miR-138 predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Biomarkers. 2017; 20(1):49-54. [DOI:10.3233/CBM-170079] [PMID]

[11] Liang Z, Feng Q, Xu L, Li S, Zhou L. CREPT regulated by miR-138 promotes breast cancer progression. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017; 493(1):263-9. [DOI:10.1016/j.bbrc.2017.09.033] [PMID]

[12] Li D, He C, Wang J, Wang Y, Bu J, Kong X, et al. MicroRNA-138 inhibits cell growth, invasion, and EMT of non-small cell lung cancer via SOX4/p53 feedback loop. Oncology Research. 2018; 26(3):385-400. [DOI:10.3727/096504017X14973124850905] [PMID] [PMCID]

[13] Pang L, Li B, Zheng B, Niu L, Ge L. miR-138 inhibits gastric cancer growth by suppressing SOX4. Oncology Reports. 2017; 38(2):1295-302. [DOI:10.3892/or.2017.5745] [PMID]

[14] Li B, Yang XX, Wang D, Ji HK. MicroRNA-138 inhibits proliferation of cervical cancer cells by targeting c-Met. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2016; 20(6):1109-14. [PMID]

[15] Liu X, Jiang L, Wang A, Yu J, Shi F, Zhou X. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Letters. 2009; 286(2):217-22. [DOI:10.1016/j.canlet.2009.05.030]

[16] Ma F, Zhang M, Gong W, Weng M, Quan Z. MiR-138 suppresses cell proliferation by targeting bag-1 in gallbladder carcinoma. PLoS One. 2015; 10(5):e0126499. [DOI:10.1371/journal.pone.0126499]

[17] Sha HH, Wang DD, Chen D, Liu SW, Wang Z, Yan DL, et al. MiR-138: A promising therapeutic target for cancer. Tumor Biology. 2017; 39(4):1010428317697575. [DOI:10.1177/1010428317697575] [PMID]

[18] Golubovskaya VM, Sumbler B, Ho B, Yemma M, Cance WG. MiR-138 and MiR-135 directly target focal adhesion kinase, inhibit cell invasion, and increase sensitivity to chemotherapy in cancer cells. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 2014; 14(1):18-28. [DOI:10.2174/1871520614011401081134 35] [PMID] [PMCID]

[19] Brown LM. The role of race/ethnicity in the epidemiology of esophageal cancer. Journal of the Association for Academic Minority Physicians. 2000; 11(2-3):32-7. [PMID]

[20] Chen S, Zhou K, Yang L, Ding G, Li H. Racial differences in esophageal squamous cell carcinoma: Incidence and molecular features. BioMed Research International. 2017; 2017:1204082. [DOI:10.1155/2017/1204082] [PMID] [PMCID]

[21] Jing L, Su L, Ring BZ. Ethnic background and genetic variation in the evaluation of cancer risk: A systematic review. PLoS One. 2014; 9(6):e97522. [DOI:10.1371/journal.pone.0097522]