Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2023 / Vol 25 / No 3

OPEN ACCESS

Original Paper

Expression of Let-7d MicroRNA in Colorectal Cancer Patients

Mohammad Arefi (M.Sc)[1], Ayyoob Khosravi (Ph.D)[2], Abbas Abdollahi (M.D)[3], Seyed Hamid Aghaei Bakhtiari (Ph.D)[4], Naeme Javid [5], Anvarsadat Kianmehr (Ph.D)*[6]

1 M.Sc in Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. 2 Assistant Professor, Stem Cell Research Center, Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. 3 Associate Professor, Minimally Invasive Surgery & Endoscopic Research Center, Department of General Surgery, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. 4 Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. 5 Ph.D Candidate in Molecular Medicine, Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. 6 Assistant Professor, Medical Cellular and Molecular Research Center, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Micro-ribonucleic acids (microRNAs) have introduced a new field in the molecular diagnosis of cancer. However, the role of circulating microRNAs in the plasma/serum of colorectal cancer patients is still unclear. This study was conducted to determine the expression of let-7d microRNA in patients with colorectal cancer.

Methods: This case-control study was conducted on 40 patients with colorectal cancer and 40 healthy people. In this study, 7 mL blood samples were collected from patients with colorectal cancer (both before and after tumor resection) and healthy individuals (only once). The serum samples were isolated and stored at - 80°C until molecular analysis. MicroRNAs were extracted from serum samples, and cDNA was synthesized. Let-7d expression was examined using the RT-qPCR method. Data were analyzed using GraphPad Prism v. 9 software. The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, sensitivity, and specificity were also calculated for the let-7d microRNA data to introduce a diagnostic biomarker between the preoperative patient group and the control group.

Results: In the preoperative samples of the patients, the expression of let-7d microRNA was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). The expression of let-7d microRNA significantly increased after tumor resection compared to before. The ROC analysis for let-7d microRNA in the preoperative patient group with the control group showed that the sensitivity was 33.3%, specificity was 92.3%, and the area under the curve (AUC) was 0.622.

Conclusion: Let-7d microRNA could potentially serve as a new noninvasive diagnostic biomarker for the early detection of colorectal cancer. However, further studies are required on this subject.

Keywords: Colorectal Neoplasms, let-7d microRNA, Biomarker

***Corresponding Author:** Anvarsadat Kianmehr (Ph.D), E-mail: kiabiotpro@yahoo.com

Received 18 Jun 2022
Final Revised 24 Jul 2023
Accepted 5 Aug 2023
Published Online 7 Nov 2023

Cite this article as: Arefi M, Khosravi A, Abdollahi A, Aghaei Bakhtiari SH, Javid N, Kianmehr A. [Expression of Let-7d MicroRNA in Colorectal Cancer Patients]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 25(3): 36-42. [Article in Persian]

© The author(s)
Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

پاییز ۱۴۰۲ / دوره ۲۵ / شماره ۳ (پی در پی ۸۷)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

بیان let-7d microRNA در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

محمد عارفی [۱]، دکتر ایوب خسروی [۲]، دکتر عباس عبداللهی [۳]

دکتر سیدحمید آقائی بختیاری [۴]، نائمه جاوید [۵]، دکتر انورسادات کیان مهر *[۶]

[۱] کارشناس ارشد زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. [۲] استادیار، مرکز تحقیقات سلول های بنیادی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. [۳] دانشیار، مرکز تحقیقات جراحی آندوسکوپیک و روشهای کم تهاجمی، گروه جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. [۴] دانشیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. [۵] دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. [۶] استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *میکروRNA ها (microRNAs) زمینه جدیدی را در تشخیص مولکولی سرطان‌ها فراهم کرده‌اند. هرچند هنوز نقش آنها در گردش سرم یا پلاسما در سرطان کولورکتال به خوبی مشخص نشده است. این مطالعه به منظور ارزیابی بیان let-7d microRNA در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه مورد شاهدی روی ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال و ۴۰ فرد سالم انجام شد. مقدار ۷ میلی‌لیتر نمونه خون از گروه مورد (قبل و بعد از جراحی) و از گروه شاهد (در یک مرحله) اخذ شد. سرم جداسازی شد و تا انجام آزمایشات مولکولی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. استخراج میکروRNA از نمونه‌های سرمی انجام و سنتز cDNA صورت گرفت. میزان بیان let-7d با استفاده از روش RT-qPCR انجام شد. داده‌ها با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism 9 آنالیز شدند. آنالیز منحنی راک (ROC)، حساسیت و ویژگی روی داده‌های let-7d microRNA به منظور معرفی بیومارکر تشخیصی بین گروه مورد قبل از عمل جراحی با گروه شاهد محاسبه گردید.*

یافته‌ها: *میزان بیان let-7d microRNA در نمونه‌های قبل از عمل جراحی گروه مورد در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد کاهش آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان بیان let-7d microRNA گروه مورد بعد از جراحی در مقایسه با قبل از جراحی افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). آنالیز منحنی راک (ROC) برای let-7d microRNA در گروه مورد قبل از عمل با گروه شاهد نشان داد که حساسیت ۳۳/۳ درصد، ویژگی ۹۲/۳ درصد و سطح زیرمنحنی (AUC) ۰/۶۲۲ تعیین شد.*

نتیجه‌گیری: *let-7d microRNA به طور بالقوه می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی غیرتهاجمی جدید در تشخیص زود هنگام سرطان کولورکتال مطرح باشد؛ هرچند انجام مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.*

واژه‌های کلیدی: *سرطان کولورکتال، let-7d microRNA ، بیومارکر*

* نویسنده مسؤول: دکتر انورسادات کیان مهر ، پست الکترونیکی kiabiotpro@yahoo.com

نشانی: گرگان، ابتدای جاده قدیم گرگان به کردکوی، مجموعه آموزش عالی (شادروان فلسفی) دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی، گروه زیست فناوری پزشکی، تلفن ۰۱۷-۳۲۴۵۰۹۹۵، نمابر ۳۲۴۳۰۵۶۴

وصول ۱۴۰۱/۳/۲۸ اصلاح نهایی ۱۴۰۲/۵/۲ پذیرش ۱۴۰۲/۵/۱۴ انتشار ۱۴۰۲/۸/۱۶

مقدمه

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در دنیا است و سالانه بیش از ۱ تا ۲ میلیون بیمار مبتلا به این سرطان تشخیص داده می‌شوند.[۱] سرطان کولورکتال در سال ۲۰۲۰ باعث مرگ ۲۴۴۸۲۴ نفر در اروپا، ۶۹۴۳۵ نفر در آمریکای لاتین و کارائیب، ۶۳۹۸۷ نفر در آمریکای شمالی، ۷۶۰۳ نفر در اقیانوسیه و ۵۰۶۴۴۹ نفر در آسیا شده است.[۲] شیوع آن در مناطق جغرافیایی مختلف بسیار متفاوت بوده و ارتباط نزدیکی با سبک زندگی افراد دارد. بروز آن در مردان بیشتر از زنان است و با افزایش سن زیاد می‌شود؛ به طوری که میانگین سن تشخیص آن در کشورهای توسعه یافته در حدود ۷۰ سالگی است.[۱] عوامل محیطی و ژنتیکی از جمله عوامل اثرگذار در بروز این سرطان هستند. براساس گزارش سازمان ثبت ملی سرطان، سالانه در ایران نزدیک به یک میلیون نفر به سرطان کولورکتال مبتلا می‌شوند. با وجود بهبود روش‌های درمانی و تشخیصی و برنامه‌های غربالگری

شیوع و مرگ و میر سرطان کولورکتال هنوز چشمگیر است. نرخ بالای مرگ و میر این سرطان به‌طور قابل ملاحظه‌ای با مرحله تشخیص پیشرفت آن مرتبط است. بنابراین تشخیص سرطان کولورکتال در مراحل اولیه برای زندگی طولانی‌تر بیماران با اهمیت است.[۳و۴] تشخیص دیرهنگام سرطان کولورکتال از دلایل اصلی میزان مرگ و میر بالای آن است. درمان بیماری زمانی که در مراحل اولیه تشخیص داده شود؛ به طور قابل توجهی موثرتر بوده و بقاء برای بیمارانی که در مراحل پایانی سرطان کولورکتال تشخیص داده شده‌اند؛ بسیار بدتر است.[۵]

در حال حاضر روش‌های غربالگری سرطان کولورکتال به‌طور معمول شامل کولونوسکوپی و سنجش خون مخفی در مدفوع است.[۶] روش‌های مولکولی مبتنی بر آنالیز مولکول‌های DNA و RNA به‌منظور تشخیص زود هنگام بیماری‌ها در حال توسعه هستند و یکی از جدیدترین آنها به‌کارگیری microRNA ها به‌عنوان مارکرهای زیستی است.[۷] microRNA ها مولکول‌های RNA کوچکی هستند که در بسیاری از فرایندهای طبیعی بدن نقش دارند و بیان آنها در بیماری‌های مختلف دچار کاهش یا افزایش می‌شود.[۷] مشخصاً microRNA ها می‌توانند با اتصال به ناحیه 3′-UTR مولکول mRNA موجب کاهش بیان یا تجزیه آن شوند. با توجه به الگوی بیان microRNA ها که مختص هر نوع بافت توموری است؛[۸] نقش بیولوژیکی microRNA ها به عنوان تنظیم کننده چندین فرآیند سلولی مانند تکثیر، تمایز و آپوپتوز که با پیشرفت سرطان مرتبطند؛ نشان داده شده است.[۹و۱۰]

سرطان کولورکتال پروفایل بیانی microRNA مختص به خود را دارد که برخی از این microRNA ها به عنوان انکوژن و برخی به عنوان سرکوب کننده تومور عمل می‌کنند. let-7d microRNA مولکول‌های RNA غیرکدکننده حدود ۲۲ نوکلئوتید است.[۱۱] let-7d microRNA بالغ، بیان microRNA های هدف را در سطح پس از ترجمه و از طریق جفت شدن ناقص به ناحیه 3'-UTR آنها به طور منفی تنظیم می‌کند.[۱۲] در سرطان کولورکتال، بیان let-7d microRNA کاهش می‌یابد که بر تنظیم پس از رونویسی microRNA های هدف اثر گذاشته و منجر به تومورزایی و پیشرفت سرطان کولون می‌شود.[۱۳] کاهش بیان Let-7 با افزایش متاستاز غدد لنفامی و ظرفیت تکثیری ارتباط دارد.[۱۴و۱۵]

let-7d microRNA به عنوان یک microRNA سرکوبگر تومور شناخته شده و به احتمال زیاد بیان ژن‌های HMGA2 یا k-RAS را کاهش می‌دهد.[۱۶] بیان microRNA های پلاسمایی موجود در سرطان کولورکتال می‌تواند در قبل و بعد از عمل جراحی متفاوت باشد.[۱۷و۱۸] این مطالعه به منظور ارزیابی بیان let-7d microRNA در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه مورد شاهدی روی ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال و ۴۰ فرد سالم در گروه زیست فناوری پزشکی دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان طی سال ۱۳۹۶ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گلستان (IR.GOUMS.REC.1396.244) قرار گرفت.

بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به مرکز آموزشی درمانی قائم(عج) مشهد مراجعه نموده بودند و ابتلای قطعی آنها قبلاً توسط پزشک متخصص تشخیص داده شده بود. هیچیک از بیماران سابقه جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، سابقه استعمال دخانیات و یا ابتلا به دیابت نداشتند. ۴۰ فرد داوطلب سالم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند که فاقد سابقه مصرف مواد دخانی و فاقد ابتلا به بیماری‌های خاص به خصوص دیابت بودند. قبل از خونگیری از شرکت کنندگان در مطالعه رضایت‌نامه کتبی دریافت شد.

مقدار ۷ میلی‌لیتر نمونه خون از گروه‌های مورد و شاهد گرفته شد. خونگیری از بیماران در دو مرحله انجام گردید. خونگیری اول قبل از عمل جراحی و خونگیری دوم بعد از عمل جراحی و در روز ترخیص از بیمارستان انجام شد. زمان بستری شدن بیماران به‌طور میانگین ۳ تا ۷ روز بود. نمونه‌گیری به صورت ناشتا از طریق سرنگ‌های خونگیری ونوجت و لوله‌های خلاء خونگیری حاوی فعال کننده لخته انجام شد. بعد از نمونه‌گیری مشخصات بیمار و کد اختصاصی طرح بر روی آن درج شد و برای جلوگیری از همولیز به آرامی در دمای اتاق به مدت زمان ۱۵ دقیقه انکوبه شد. لوله‌های لخته با دور 4000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم‌های جدا شده برای انجام آزمایشات بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

استخراج RNA از سرم با استفاده از محلول ترایزول (*TRIzol*® reagent) و مطابق با دستورالعمل شرک سازنده (Invitrogen) انجام گرفت. ترایزول یک محلول تک فازی از فنول، گوانیدین ایزوتیوسیانات و سایر ترکیبات اختصاصی است که سبب تسهیل در جداسازی انواعی از RNA ها کوچک و بزرگ می‌شود و سبب حفظ RNA از طریق غیرفعال کردن RNase ها می‌شود. مراحل استخراج به صورت زیر انجام شد. کرایو ویال حاوی سرم از فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از ذوب شدن کامل سرم با استفاده از سمپلر چند بار پیپت شد. سپس 500µl سرم به میکروتیوب 2ml انتقال و به آن 1 ml از محلول ترایزول اضافه گردید. به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس 200µl کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس میکروتیوب حاوی نمونه با دور 14000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

سانتریفیوژ شد که باعث تشکیل سه فاز آبی (بالایی)، میانی و آلی (پائینی) گردید. مقدار 500µl از فاز آبی به میکروتیوب 1.5 ml عاری از نوکلئاز انتقال داده شد و برابر حجم برداشته شده به آن ایزوپروپانول اضافه گردید. میکروتیوب حاصله به مدت یک شب در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور 14000 rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و 1ml اتانل ۷۵ درصد به میکروتیوب اضافه و ۵ دقیقه روی یخ انکوبه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور 8000 rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق خشک گردید. در نهایت به رسوب مقدار 30µl آب دوبار تقطیر اضافه و به مدت زمان ۱۵ دقیقه در ترموبلاک با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از سنجش غلظت کمی RNA ها توسط دستگاه پیکو دراپ (Picodrop)، نمونه‌های RNA تا زمان سنتز cDNA در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای سنجش کمی و کیفی RNA، مقدار 2µl از RNA ی تام استخراج شده جدا و غلظت آن (سنجش کمی) توسط دستگاه پیکودراپ (Picodrop Ltd, UK) در طول موج 260 nm مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر (ng/µl) و نسبت جذب A260/280 نمونه نیز گزارش گردید. همچنین برای بررسی کیفیت RNAی تام استخراج شده، مقدار 2µl از RNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد ساخته شده با بافر TAE بارگذاری گردید و در نهایت با دستگاه عکسبرداری از ژل (ژل داک) مورد بررسی قرار گرفت.

سنتز cDNA، به وسیله یک پرایمر اختصاصی به نام RT Stem Loop برای سنتز میکرو RNA های هدف انجام گرفت. مطابق دستورالعمل کیت شرکت بن یاخته، این Stem Loop ها فقط به microRNA های هدف خود از انتهای دم ’3 میکرو RNA اتصال هیدروژنی برقرار نموده و در مرحله تکثیر سبب سنتز cDNA می‌شوند. در زیر به طور مختصر مراحل سنتز cDNA آمده است.

یک میکروگرم از نمونه RNA استخراج شده با یک میکروگرم از Stem Loop RT های مشخص شده درون میکروتیوب 0.2 µl ریخته و با یکدیگر مخلوط شد. به طوری که به ازای هر نمونه این کار چهاربار با Stem Loop های اختصاصی انجام گردید. بلافاصله میکروتیوب در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد. پس از اتمام انکوبه میکروتیوب بلافاصله بر روی یخ گذاشته شد و مواد داخل کیت مطابق دستورالعمل با حجم‌های مشخص شده به آن اضافه گردید. بعد از اضافه شدن مواد و اسپین، میکروتیوب حاصله در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد بهترین دما برای فعالیت آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) است و این آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال می‌شود. پس از اتمام سنتز cDNA، میکروتیوب به فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد و تا زمان استفاده در آن نگهداری گردید.

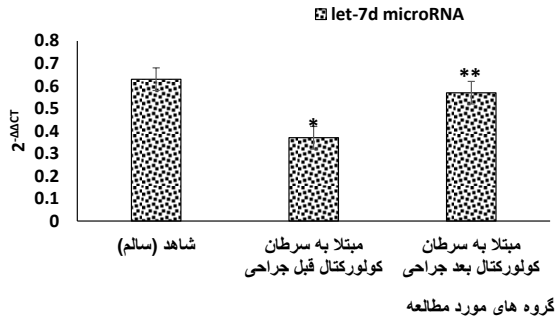
برای بررسی بیان let-7d microRNA از روش RT-qPCR استفاده شد. در این روش از دو پرایمر پیشرو (Forward) و معکوس (Reverse) برای تکثیر let-7d استفاده شد. همچنین برای نرمالایزکردن بیان، از ژن رفرانس let-7g استفاده گردید (جدول یک).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی پرایمر پیشرو (´3-´5)	توالی پرایمر معکوس (´3-´5)
let-7d	GCGTGAGGTAGTAGGTT	GAGCAGGGTCCGAGGT
let-7g	CGATGAGGTAGTAGTTTCTACAG	GAGCAGGGTCCGAGGT

پرایمرها از شرکت بن یاخته تهیه شد. ابتدا مسترمیکس ریل تایم (SYBR Green qPCR Master Mix 2X) و آب دوبار تقطیر و نمونه‌های cDNA از فریزر خارج و در دمای اتاق ذوب شدند. سپس مطابق دستورالعمل کیت شرکت یکتاتجهیز، مواد لازم به میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR اضافه شد. نمونه‌ها با استفاده از میکروفیوژ کپ استریپ، اسپین و سپس درون دستگاه Real-Time PCR شرکت Roche (Roche LightCycler 96) قرار داده شد. این تست برای تمام نمونه‌ها بخ صورت دو بار تکرار انجام گردید.

در روش مقایسه‌ای یا ΔΔCt برای آنالیز داده‌های Real-Time PCR مقادیر Ct به دست آمده از دو نمونه مختلف (مثلاً قبل و بعد از تیمار یا تست و کنترل) به طور مستقیم با یک ژن خانه‌دار (به عنوان کنترل) نرمال شده و سپس با هم مقایسه شدند. سپس تفاوت مقادیر ΔCt بین نمونه‌های تست و کنترل یعنی ΔΔCt محاسبه گردید. میزان برابری یا fold-change بیان ژن مورد نظر بین دو نمونه برابر با $2^{-\Delta\Delta CT}$ است. در این مطالعه برای آنالیز داده‌های حاصل از تکنیک Real-Time PCR از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده گردید و میانگین بیان ژن let-7g به عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی میزان بیان ژن در نظر گرفته شد. میزان بیان let-7d microRNA با روش کمی نسبی (Relative quantification) ارزیابی گردید. پس از به دست آوردن Ct برای let-7d microRNA در تمامی نمونه‌های گروه‌های مورد و شاهد و محاسبه ΔCT (حاصل تفریق Ct let-7d microRNA از Ct ژن let-7g)، $2^{-\Delta\Delta CT}$ یا به عبارتی سطح بیان نسبی let-7d microRNA به دست آمد. سپس داده‌های حاصله با استفاده نرم‌افزار GraphPad prism 9.0 و به کاربردن test-t (باتوجه به نرمال بودن توزیع نمونه‌ها) آنالیز شدند. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. همچنین با استفاده از نرم‌افزار MedCalc حساسیت، ویژگی و منحنی راک (ROC) و نواحی



نمودار ۱ : میزان بیان let-7d microRNA در مبتلایان به سرطان کولورکتال قبل و بعد از عمل جراحی در مقایسه با گروه شاهد (سالم)
*** P<۰/۰۰۷ در مقایسه با گروه شاهد؛ ** P<۰/۰۰۴ در مقایسه با قبل از عمل جراحی**

زیرمنحنی (AUC) برای ارزیابی ارزش تشخیصی let-7d microRNA محاسبه و آنالیز شد. مقدار سطح زیرمنحنی قابل قبول بین ۰/۵ تا ۱ متغیر در نظر گرفته شد.[۱۹]

یافته‌ها

میانگین سنی گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۹/۸۵±۵۹/۲۲ سال و ۹/۶۵±۵۸/۵۷ سال تعیین شد.

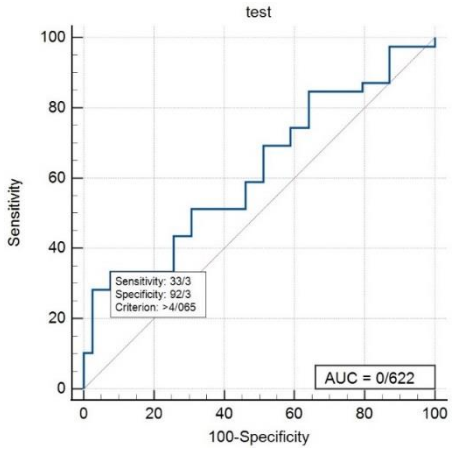
غلظت نمونه‌های RNA استخراج شده، به طور میانگین 110 ng/µl و نسبت جذب A260/280 نمونه‌ها به‌طور میانگین ۱/۲ بودند.

میزان بیان let-7d microRNA در نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال قبل از عمل جراحی نسبت به گروه شاهد کاهش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۷)؛ اما میزان آن بعد از عمل جراحی نسبت به گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. میزان بیان let-7d microRNA در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال بعد از عمل جراحی نسبت به قبل از عمل جراحی افزایش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۰۴) (نمودار یک).

با توجه به آنالیز منحنی راک (ROC) برای let-7d microRNA در گروه مورد قبل از عمل جراحی در مقایسه با گروه شاهد، حساسیت ۳۳/۳ درصد، ویژگی ۹۲/۳ درصد و سطح زیرمنحنی (AUC) ۰/۶۲۲ تعیین شد (نمودار ۲).

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، میزان بیان let-7d microRNA در نمونه‌های قبل از عمل جراحی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با گروه شاهد کاهش آماری معنی‌داری مشاهده شد. در مطالعه Mizuno و همکاران بیان let-7d microRNA در سرطان کولورکتال کاهش نشان داد و استدلال شد که این microRNA ها بر تنظیم پس از رونویسی mRNA های هدف اثر گذاشته و منجر به تومورزایی و پیشرفت کولون می‌شود.[۱۳] از طرفی یافته‌های مطالعه ما نشان داد که میزان بیان let-7d microRNA در نمونه‌های بعد از عمل



نمودار ۲ : آنالیز منحنی راک (ROC) برای let-7d microRNA به عنوان بیومارکر تشخیصی

جراحی نسبت به گروه شاهد از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارد و این یافته نیاز به بررسی بیشتری دارد. در مطالعه Huang و همکاران نتیجه‌گیری شد که بیان microRNA های پلاسمایی موجود در سرطان کولورکتال می‌تواند در قبل و بعد از عمل جراحی متفاوت باشد.[۱۷]

در مطالعه حاضر بیان let-7d microRNA بعد از عمل جراحی نسبت به قبل از آن افزایش آماری معنی‌داری یافت. مطالعه Huang و همکاران[۱۷] و نیز مطالعه Wang و همکاران[۱۸] نشان داد که بیان microRNA های پلاسمایی موجود در سرطان کولورکتال می‌تواند در قبل و بعد از عمل جراحی متفاوت باشد. هرچند مکانیسم مولکولی این افزایش بیان مشخص نیست و نیاز به بررسی بیشتری دارد؛ اما به نظر می‌رسد تغییر در سطح بیان microRNA های سرم در قبل و بعد از جراحی، ارتباط بین microRNA ها و پروتئین‌های کلیدی مکانیسم‌های مرتبط با درمان را نشان می‌دهد.[۱۸] برای درک بهتر مسیرهای بیولوژیکی ممکن که احتمال دارد microRNA های سرم در آن دخیل باشند؛ Wang و همکاران با کمک آنالیزهای کامپیوتری یک شبکه miRNA-mRNA ساختند که نتایج حاصله نشان داد؛ این microRNA ها در چرخه سلولی، تکثیر، پاسخ محرک‌های هورمونی، تنظیم مهاجرت سلولی، آپاپتوز و مسیرهای مرتبط با سلول‌های بنیادی دخالت دارند.[۱۸] مطالعه Wei و همکاران بر روی سرطان پستان نشان داد که let-7d microRNA رشد تومور و متاستاز را در سرطان پستان مهار کرده و همچنین افزایش بیان let-7d microRNA تکثیر و تهاجم رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 را مهار کرده است.[۲۰] Eichelmann و همکاران به بررسی رابطه بین microRNA ها و پاسخ شیمی‌درمانی و بیولوژی تومور پرداخته و نشان دادند که تغییر microRNA ها چه به صورت کاهشی و چه به صورت افزایشی بر پاسخ شیمی‌درمانی و بیولوژی تومور در کارسینوم سلول سنگفرشی مری موثر است و این تغییر بالا یا پایین، اثرات خود را به واسطه تنظیم تعادل چندین هدف معتبر یا

پیش‌بینی‌شده اعمال می‌کند. لذا microRNA ها ابزارهای بالقوه تشخیصی و درمانی در نبرد با سرطان مری هستند.[۲۱] مطالعه شهابی و همکاران بر روی سرطان پستان نشان داد که let-7d microRNA می‌تواند از طریق هدف قراردادن ژن Rab25، تغییر وضعیت از اپیتلیال به مزانشیمال را در سرطان پستان مهار نماید.[۲۲] Kudelova و همکاران به بررسی بیان microRNA ها در قبل و بعد از جراحی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال پرداخته و نشان داده که microRNA های مورد مطالعه می‌توانند به عنوان بیومارکر مناسب برای تعیین خطر عود سرطان کولورکتال و پیش‌بینی پاسخ بیمار به درمان کمکی کمک نمایند. آنها همچنین نتیجه‌گیری کردند که ممکن است بتوان بیمارانی را که نیاز به نظارت شدیدتر دارند و همچنین بیمارانی که بعید است از درمان کمکی بهره‌مند شوند را انتخاب کرد. آنها با تجزیه و تحلیل مسیرهای پیام‌رسانی ضمن اذعان به نقش microRNA ها در توسعه سرطان پیشنهاد کردند که این microRNA ها در بهبود زخم و بازسازی اپیتلیوم روده نیز نقش دارند.[۲۳]

در مطالعه حاضر آنالیز منحنی ROC برای let-7d microRNA نشان داد که حساسیت برابر با ۳۳/۳ درصد و ویژگی برابر با ۹۲/۳ درصد تعیین شد. همچنین سطح زیرمنحنی (AUC) ۰/۶۲۲ به‌دست آمد که در قیاس با مقالات مشابه[۲۴-۲۶] عدد قابل قبولی بوده و نشان می‌دهد که از let-7d microRNA می‌توان به عنوان بیومارکر تشخیصی استفاده نمود. در مطالعه Yang و همکاران در سرطان malignant pleural effusion سطح زیر منحنی ۰/۶۶۶ برای hsa-miR-3663-3p به‌دست آمد.[۲۴] در مطالعه Wang و همکاران در سرطان تخمدان سطح زیر منحنی ۶ در چهار میکروRNA آن شامل miR-346، miR-127-3p، miR-143-3p و miR-205-5p به‌دست آمد.[۲۵] در مطالعه Abdel Ghany و همکاران در سرطان Non-Small-Cell Lung سطح زیر منحنی ۶ در هر دو میکروRNA آن شامل miRNA-30a و miRNA-221 به‌دست آمد.[۲۶] مطالعات آزمایشگاهی با حجم نمونه بیشتر برای درک مکانیسم احتمالی افزایش بیان let-7d microRNA پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش بیان let-7d microRNA ممکن است با کنترل رشد تومور و جلوگیری از متاستاز احتمالی مرتبط باشد. لذا let-7d microRNA می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی غیرتهاجمی جدید در تشخیص زود هنگام سرطان کولورکتال مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای محمد عارفی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست فناوری پزشکی از دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان (شماره گرانت ۹۷۰۴۲۶) انجام شد. بدین‌وسیله از شرکت‌کنندگان در مطالعه تشکر نموده و آرزوی سلامتی می‌نماییم. همچنین از جناب آقای دکتر ناصر بهنام‌پور به‌خاطر آنالیز آماری داده‌ها سپاسگزاری می‌گردد. بین نویسندگان تضاد منافعی وجود ندارد.

References

1. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. Lancet. 2014 Apr; 383(9927): 1490-502. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
2. Sihvola S, Kuosmanen L, Kvist T. Resilience and related factors in colorectal cancer patients: A systematic review. Eur J Oncol Nurs. 2022 Feb; 56: 102079. doi: 10.1016/j.ejon.2021.102079.
3. Ansari R, Mahdavinia M, Sadjadi A, Nouraie M, Kamangar F, Bishehsari F, et al. Incidence and age distribution of colorectal cancer in Iran: results of a population-based cancer registry. Cancer Lett. 2006 Aug; 240(1): 143-47. doi: 10.1016/j.canlet.2005.09.004.
4. Dolatkhah R, Somi MH, Kermani IA, Ghojazadeh M, Jafarabadi MA, Farassati F, et al. Increased colorectal cancer incidence in Iran: a systematic review and meta-analysis. BMC Public Health. 2015 Oct; 15: 997. doi: 10.1186/s12889-015-2342-9.
5. Andrew AS, Parker S, Anderson JC, Rees JR, Robinson C, Riddle B, et al. Risk Factors for Diagnosis of Colorectal Cancer at a Late Stage: a Population-Based Study. J Gen Intern Med. 2018 Dec; 33(12): 2100-105. doi: 10.1007/s11606-018-4648-7.
6. Kuipers EJ, Rösch T, Bretthauer M. Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. Nat Rev Clin Oncol. 2013 Mar; 10(3): 130-42. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.12.
7. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Curr Genomics. 2010 Nov; 11(7): 537-61. doi: 10.2174/138920210793175895.
8. Tsukamoto M, Iinuma H, Yagi T, Matsuda K, Hashiguchi Y. Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. Oncology. 2017; 92(6): 360-70. doi: 10.1159/000463387.
9. Hosseinahli N, Aghapour M, Duijf PHG, Baradaran B. Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. J Cell Physiol. 2018 Aug; 233(8): 5574-88. doi: 10.1002/jcp.26514.
10. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006 Apr; 6(4): 259-69. doi: 10.1038/nrc1840.
11. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature. 2000 Feb; 403(6772): 901-906. doi: 10.1038/35002607.
12. Berindan-Neagoe I, Calin GA. Molecular pathways: microRNAs, cancer cells, and microenvironment. Clin Cancer Res. 2014 Dec; 20(24): 6247-53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2500.
13. Mizuno R, Kawada K, Sakai Y. The Molecular Basis and Therapeutic Potential of Let-7 MicroRNAs against Colorectal Cancer. Can J Gastroenterol Hepatol. 2018 Jun; 2018: 5769591.

doi: 10.1155/2018/5769591.

14. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. Biol Rev Camb Philos Soc. 2009 Feb; 84(1): 55-71. doi: 10.1111/j.1469-185X.2008.00061.x.

15. Kita Y, Yonemori K, Osako Y, Baba K, Mori S, Maemura K, et al. Noncoding RNA and colorectal cancer: its epigenetic role. J Hum Genet. 2017 Jan; 62(1): 41-47. doi: 10.1038/jhg.2016.66.

16. Wang Y, Le Y, Xue JY, Zheng ZJ, Xue YM. Let-7d miRNA prevents TGF-β1-induced EMT and renal fibrogenesis through regulation of HMGA2 expression. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Oct; 479(4): 676-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.154.

17. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. Int J Cancer. 2010 Jul; 127(1): 118-26. doi: 10.1002/ijc.25007.

18. Wang WT, Zhao YN, Yan JX, Weng MY, Wang Y, Chen YQ, et al. Differentially expressed microRNAs in the serum of cervical squamous cell carcinoma patients before and after surgery. J Hematol Oncol. 2014 Jan; 7: 6. doi: 10.1186/1756-8722-7-6.

19. Cook NR. Methods for evaluating novel biomarkers - a new paradigm. Int J Clin Pract. 2010 Dec; 64(13): 1723-27. doi: 10.1111/j.1742-1241.2010.02469.x.

20. Wei Y, Liu G, Wu B, Yuan Y, Pan Y. Let-7d Inhibits Growth and Metastasis in Breast Cancer by Targeting Jab1/Cops5. Cell Physiol Biochem. 2018; 47(5): 2126-35. doi: 10.1159/000491523.

21. Eichelmann AK, Matuszcak C, Lindner K, Haier J, Hussey DJ, Hummel R. Complex role of miR-130a-3p and miR-148a-3p balance on drug resistance and tumor biology in esophageal squamous cell carcinoma. Sci Rep. 2018 Dec; 8(1): 17553. doi: 10.1038/s41598-018-35799-1.

22. Shahabi A, Naghili B, Ansarin K, Montazeri M, Dadashpour M, Zarghami N. Let-7d and miR-185 Impede Epithelial-Mesenchymal Transition by Downregulating Rab25 in Breast Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2021 Jan; 22(1): 305-13. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.1.305.

23. Kudelova E, Holubekova V, Grendar M, Kolkova Z, Samec M, Vanova B, et al. Circulating miRNA expression over the course of colorectal cancer treatment. Oncol Lett. 2022 Jan; 23(1): 18. doi: 10.3892/ol.2021.13136.

24. Yang Y, Ma L, Qiao X, Zhang X, Dong SF, Wu MT, et al. Salivary microRNAs show potential as biomarkers for early diagnosis of malignant pleural effusion. Transl Lung Cancer Res. 2020 Aug; 9(4): 1247-57. doi: 10.21037/tlcr-19-530.

25. Wang W, Wu LR, Li C, Zhou X, Liu P, Jia X, et al. Five serum microRNAs for detection and predicting of ovarian cancer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X. 2019 Apr; 3: 100017. doi: 10.1016/j.eurox.2019.100017.

26. Abdel Ghany SM, Ali EM, Ahmed A, Hozayen W, Mohamed-Hussein A, Elnaggar M, et al. Circulating miRNA-30a and miRNA-221 as Novel Biomarkers for the Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer. Middle East Journal of Cancer. 2020; 11(1): 50-58. doi: 10.30476/mejc.2019.81242.0.