مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط تغییرات بیانی RNA بلند غیرکدکننده PRNCR1 با سرطان پستان

الهه سلیمانپور[۱]، اسماعیل بابایی[۱]، محمدعلی حسینپورفیضی[۱*]، وحید منتظری[۲]

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- گروه جراحی قفسه صدری سینه، بیمارستان نورنجات، تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان ازجمله رایج‌ترین انواع بدخیمی‌ها است که منجر به مرگ‌ومیر زنان مبتلا به‌ویژه در کشورهای صنعتی می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که مولکول‌های RNA غیرکدکننده با تأثیر بر ژن‌های هدف در بروز، پیشرفت تومور و همچنین مقاومت به درمان نقش مهمی را ایفا می‌کنند. RNA غیرکدکننده سرطان پروستات (PRNCR1)، RNA غیرکدکننده بلندی است که در برخی سرطان‌ها بیان بالایی دارد و این افزایش بیان، با تأثیر بر ژن‌های زیردست گیرنده آندروژن منجر به سرطان‌زایی می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی تغییرات بیانی PRNCR1 در سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۳۰ نمونه بافت توموری و بافت غیر توموری حاشیه تومور از زنان مبتلا به سرطان پستان در محدوده زمانی سال ۹۴-۹۳ از استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و تغییرات بیانی PRNCR1 با استفاده از qReal-Time PCR موردمطالعه قرار گرفت. آنالیزهای آماری (t-test) جهت مطالعه ارتباط بین تغییر بیان PRNCR1 با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی نمونه‌های توموری صورت پذیرفت.

نتایج: داده‌های حاصل حاکی از افزایش معنی‌دار بیان PRNCR1 در نمونه‌های بافت توموری پستان در مقابل بافت نرمال حاشیه تومور بود. همچنین بررسی خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی نشان داد که افزایش بیان PRNCR1 در سرطان پستان با افزایش سایز تومور و متاستاز گره‌های لنفاوی ارتباط مثبت و معنی‌داری دارد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه، نشان داد که PRNCR1 تغییرات بیان قابل‌توجهی در سرطان پستان دارد. با توجه به تأثیر آن در کنترل ژن‌های زیردست گیرنده آندروژن، می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی مناسب در سرطان پستان پیشنهاد شود. هرچند بررسی‌های جامع‌تر در این زمینه موردنیاز است.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، RNA بلند غیرکدکننده، گیرنده آندروژن،PRNCR1

مقدمه

سرطان پستان یکی از رایج‌ترین علت‌های مرگ‌ومیر در زنان به‌ویژه در کشورهای صنعتی است (۱). غربالگری سرطان پستان اجازه‌ی تشخیص زودهنگام بدخیمی و درنهایت کاهش میزان مرگ‌ومیر را می‌دهد. هرچند به‌طور رایج تکنیک‌های متعدد تصویربرداری به‌منظور غربالگری بدخیمی‌های پستان استفاده می‌شود، اما اغلب حساسیت و اختصاصیت تشخیصی کافی را ندارند. بنابراین، دست‌یابی به روش‌های تشخیصی مناسب، قابل‌اعتماد، دقیق، غیرتهاجمی و همچنین مقرون‌به‌صرفه برای شناسایی ناهنجاری‌های بافت پستان موردنیاز است (۲، ۳).

در سال‌های اخیر، محققان، مناطق گسترده‌ای از ژنوم انسان را شناسایی کرده‌اند که قبلاً بر این باور بوده‌اند که غیرکدکننده و غیر عملکردی هستند و به همین دلیل، RNAهای غیرکدکننده نامیده شدند. این مناطق غیرکدکننده که بیش از ۹۰ درصد ژنوم را به خود اختصاص داده‌اند، تنوع گسترده‌ای از RNAهای تنظیمی را شامل می‌شوند که در بیوژنز، خصوصیات و عملکرد متفاوت بوده و نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها و فرآیندهای بیولوژیکی در شرایط طبیعی و بیماری‌ها، بخصوص سرطان دارند (۶-۴) و ازنظر طول به دودسته RNAهای غیرکدکننده‌ی کوتاه، از قبیل miRNA (۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید) و RNAهای غیرکدکننده‌ی بلند (lncRNA) (بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید) تقسیم می‌شوند (۷).

در سال ۲۰۱۰، Chung و همکاران برای اولین بار RNA بلند غیرکدکننده‌ای با طول تقریبی ۱۳ کیلو باز را در موقعیت ۸q۲۴ شناسایی کردند. این رونوشت بلند غیرکدکننده، RNA

*نویسنده مسئول: محمدعلی حسینپورفیضی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
Email: pourfeizi@eastp.ir

غیرکدکننده‌ی سرطان پروستات (PRNCR1) نامیده شد (قبلاً PCAT8 نامیده می‌شد) و گزارش شد که افزایش بیان PRNCR1 درروند سرطان‌زایی سرطان پروستات نقش دارد (۸، ۹). گیرنده آندروژن (Androgen Receptor یا AR)، یک فاکتور رونویسی است که بیان ژن‌های پایین‌دستش از قبیل FGF8، Cdk1، Cdk2 و PSA (۱۰) را تنظیم می‌کند که برای تکامل پروستات و همچنین سرطان‌زایی ضروری می‌باشند. AR این کار را با تشکیل کمپلکس‌هایی با تعدادی فاکتورهای تنظیمی یا کمک تنظیم‌کننده‌ها و تغییردهنده‌های ساختار کروماتینی انجام می‌دهد (۱۱، ۱۲). Chung و همکاران به‌منظور بررسی ارتباط بین PRNCR1 و AR، یک وکتور بیانی AR طراحی کرده و به همراه siRNA مربوط به PRNCR1، به سلول‌های AR-null PC-3 منتقل کردند. نتایج نشان داد که حذف بیان PRNCR1، باعث کاهش میزان قابل‌توجهی از فعالیت گیرنده آندروژن در حضور آندروژن می‌شود؛ بنابراین یافته‌های حاصل، بیانگر نقش PRNCR1 در سرطان پروستات با تأثیر بر فعالیت گیرنده آندروژن بود (۸).

Yang و همکاران همچنین تائید کردند که دو lncRNAی وابسته به سرطان پروستات یعنی رونوشت ۱ اختصاصی پروستات (PCGEM1) و PRNCR1 در فعال‌سازی ژن‌های تنظیمی AR نقش دارند. آن‌ها نشان دادند که بیان این دو RNA غیرکدکننده‌ی بلند در سرطان تهاجمی پروستات به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد که منجر به اتصال به ژن AR می‌شود. به این صورت که PRNCR1 به انتهای کربوکسیلی استیله شده گیرنده آندروژن متصل شده که این اتصال منجر به ارتباط با یک هیستون متیل ترانسفراز به نام DOT1L (Disruptor of telomeric silencing 1-like) می‌گردد. اتصال به DOT1L لازمه ی به‌کارگیری دومین lncRNA، یعنی PCGEM1 است. DOT1L، یک متیل ترانسفراز لیزین است که با متیلاسیون لیزین ۳۴۹ انتهای آمینوی گیرنده آندروژن، باعث اتصال PCGEM1 به انتهای آمینوی متیله شده‌ی گیرنده آندروژن می‌شود. در سرطان پروستات مقاوم به درمان، این RNAهای بلند غیرکدکننده، بیش‌ازحد بیان یافته، به AR متصل شده و منجر به افزایش فعالیت رونوشت AR با طول کامل یا حتی فرم کوتاه شده‌ی آن می‌شوند. این امر منجر به فعال‌سازی ژن‌های تحت کنترل AR از طریق روش‌های وابسته به لیگاند یا مستقل از لیگاند و درنهایت، افزایش تکثیر سلول‌های سرطان پروستات می‌شود (۱۳). همچنین حذف lncRNAهای فوق در مدل زنوگرفت، با کاهش رشد سلولی و مهار رشد تومور همراه بود (۱۳). ازآنجاکه این lncRNAها شدیداً فعالیت AR را تقویت می‌کنند، می‌توانند به‌عنوان هدف درمانی در سرطان پروستات موردتوجه قرار گیرند (۸، ۱۴).

علاوه بر این‌که گیرنده آندروژن یک هدف درمانی تائید شده در سرطان پروستات است، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که AR، همچنین می‌تواند در سرطان پستان با تومورهای دارا یا فاقد گیرنده‌های استروژن، به‌عنوان هدف درمانی قرار گیرد. بیان AR همچنین ممکن است نقش مهمی در پیشرفت و تهاجمی شدن تومورهای پستان داشته باشد (۱۵، ۱۶).

با توجه به نقش کلیدی AR در سرطان پستان و همچنین تأثیر تغییرات بیانی PRNCR1 در بیان ژن‌های زیردست AR، در مطالعه حاضر، بیان PRNCR1 برای نخستین بار در نمونه‌های بافت توموری پستان موردبررسی قرار گرفت. همچنین ارتباط بین تغییرات بیانی با خصوصیت کلینیکوپاتولوژیکی بیماران و پتانسیل بیومارکری آن جهت تشخیص سرطان پستان موردمطالعه واقع گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه با تائید کمیته اخلاقی تحقیقات پزشکی بیمارستان نورنجات تبریز و همچنین با کسب رضایت‌نامه کتبی از بیماران مبتلا به سرطان پستان صورت گرفت. کلیه اصول اخلاقی مبتنی بر برخورد مناسب و شایسته با بیماران و حفظ اطلاعات محرمانه آن‌ها، به‌طور دقیق رعایت گردید.

بافت توموری و بافت غیر توموری حاشیه تومور مربوط به ۳۰ بیمار خانم مبتلا به سرطان پستان از بیمارستان نورنجات تبریز در محدوده زمانی سال ۹۴-۹۳ جمع‌آوری گردید. نمونه‌های بافت به‌صورت تازه از اتاق عمل تهیه شد و جهت بررسی‌های پاتولوژیکی به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال‌شده و بخشی از نمونه‌های بافت جهت مطالعه موردنظر به‌طور مستقیم در میکروتیوب‌های عاری از RNase قرار داده شدند. میکروتیوب‌های حاوی بافت‌ها، بلافاصله به فلاسک قابل‌حمل حاوی نیتروژن مایع موجود در اتاق عمل، منتقل شدند. سپس، نمونه‌های بافت موجود در فلاسک نیتروژن مایع، به آزمایشگاه ارسال و به تانک حاوی نیتروژن مایع انتقال داده شده و تا زمان استفاده در آنجا نگهداری شدند. تمام نمونه‌های انتخاب‌شده پس از بررسی‌های پاتولوژیکی، نمونه‌های بدخیمی تهاجمی مجاری بودند و بیماران قبل از

نمونه‌برداری تحت هیچ‌گونه شیمی‌درمانی و یا پرتودرمانی قرار نگرفته بودند. سن متوسط بیماران ۲/۰۳±۵۰ (بین ۳۵ تا ۸۰ سال) بوده و تمام بیماران ازنظر جنسیت، محل سکونت و شیوه‌ی زندگی مشابه بودند. مشخصات کلینیکوپاتولوژیکی بیماران در جدول ۱ مشاهده می‌گردد.

جدول ۱- تعداد و خصوصیات کلینیک-پاتولوژیکی نمونه‌های توموری پستان

خصوصیات کلینیک-پاتولوژیکی	تعداد نمونه
بافت توموری	۳۰
بافت حاشیه توموری	۳۰
سن	
بیشتر و مساوی ۵۰ سال	۱۷
کمتر از ۵۰ سال	۱۳
درجه تمایزی TNM*	
Stage I	۸
Stage II	۱۵
Stage III	۷
متاستاز گره لنفاوی	
مثبت	۱۷
منفی	۱۳
سایز تومور	
بزرگ‌تر و مساوی ۲,۵ سانتیمتر	۱۴
کوچک‌تر از ۲,۵ سانتیمتر	۱۶

*TNM= tumor-node-metastasis staging

استخراج RNA با استفاده از محلول استخراج TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Lot. no. 5017511) بر اساس دستورالعمل کارخانه انجام گرفت. به‌طور خلاصه، نمونه های بافت به‌طور مستقیم و منجمد از تانک نیتروژن مایع، جهت هموژنیزه شدن به هاون چینی مستقر در زیر هود، منتقل گردید و توسط هاون به‌خوبی کوبیده شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول TRIzol به نمونه‌ی بافت هموژنیزه شده اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفورم افزوده گردید و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و سپس محلول رویی به میکروتیوب دیگری منتقل شد و هم‌حجم محلول فوق، ایزوپروپانول ۱۰۰ درصد اضافه گردید. به دنبال ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰g، محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل به‌منظور شستشو، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و مجدد با دور ۷۵۰۰g سانتریفیوژ صورت گرفت. محلول رویی مجدداً دور ریخته شد و رسوب حاصل به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی در آب فاقد RNA (RNase-free water) حل و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت RNAهای استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز و بررسی میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

به‌منظور حذف آلودگی‌های احتمالی با DNA، قبل از انجام واکنش RT-PCR، RNAی مورداستفاده توسط آنزیم DNase I تیمار گردید. RNA تیمار شده با DNase I، با ۰/۵ میکرولیتر آنزیم رندوم هگزامر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحله بعد، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP و ۲ میکرولیتر بافر RT و به مقدار موردنیاز آب مقطر استریل اضافه و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RT اضافه شد. انکوباسیون مخلوط واکنش در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ دقیقه انجام گرفت.

ژن β2m، یک ژن خانه‌دار است که برای حفظ و نگهداری سلول‌ها به‌طور پیوسته بیان می‌شود، بنابراین به‌عنوان یکی از کاندیدهای مناسب جهت استفاده به‌عنوان ژن کنترل داخلی، در این مطالعه موردبررسی قرار گرفت. پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner (نسخه ۴) طراحی و با نرم‌افزار OLIGO (نسخه ۷/۵) ارزیابی گردیدند. اختصاصیت پرایمرها توسط سایت NCBI تائید شد. همچنین توالی‌های تکثیری توسط سایت UNAFold (۱۷) ازنظر ساختار-های ثانویه‌ای که ممکن بود درروند کار Real-Time PCR اختلال ایجاد کند، بررسی گردید. توالی پرایمرهای طراحی‌شده در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

پس از سنتز cDNA، بررسی کمی سطح بیان PRNCR1 با استفاده از روش qRT-PCR و با استفاده از SYBR® Green Supermix (Takara, Japan, Lot. no. AF31017N) انجام پذیرفت. واکنش در ۴۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله ۲۵ ثانیه‌ای بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

داده‌های حاصل از تغییرات بیان با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و با استفاده از نرم‌افزار REST آنالیز شدند. سایر آنالیزهای آماری با استفاده از

جدول ۲- اطلاعات حاصل از بررسی میزان خلوص RNA استخراج‌شده با توجه به میزان جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه

نمونه‌های توموری	میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰	نمونه‌های حاشیه توموری	میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰
T1	۱/۹۷	N1	۱/۸۹
T2	۲/۰	N2	۱/۹۳
T3	۱/۸۹	N3	۱/۶۹
T4	۲/۰۱	N4	۱/۹۸
T5	۲/۰۱	N5	۲/۰
T6	۱/۹۸	N6	۲/۰۱
T7	۱/۷۶	N7	۱/۸۹
T8	۱/۸۸	N8	۱/۶۹
T9	۲/۰	N9	۱/۹۶
T10	۱/۶۰	N10	۱/۷۸
T11	۱/۹۱	N11	۲/۰۱
T12	۱/۵۳	N12	۱/۸۹
T13	۱/۸۸	N13	۲/۰
T14	۲/۰۱	N14	۱/۹۱
T15	۱/۷۶	N15	۱/۸۸
T16	۱/۹۳	N16	۱/۷۶
T17	۲/۰۲	N17	۱/۹۳
T18	۲/۰	N18	۲/۰۱
T19	۱/۹۰	N19	۱/۸۹
T20	۱/۸۷	N20	۱/۹۳
T21	۱/۹۲	N21	۲/۰
T22	۱/۹۰	N22	۱/۹۴
T23	۱/۷۸	N23	۱/۸۶
T24	۱/۸۵	N24	۱/۸۹
T25	۲/۰	N25	۱/۹۱
T26	۲/۰۱	N26	۱/۹۰
T27	۱/۹۹	N27	۲/۰۱
T28	۱/۷۹	N28	۱/۸۰
T29	۱/۸۹	N29	۱/۷۶
T30	۲/۰	N30	۱/۹۶

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورداستفاده برای PRNCR1 و β2m

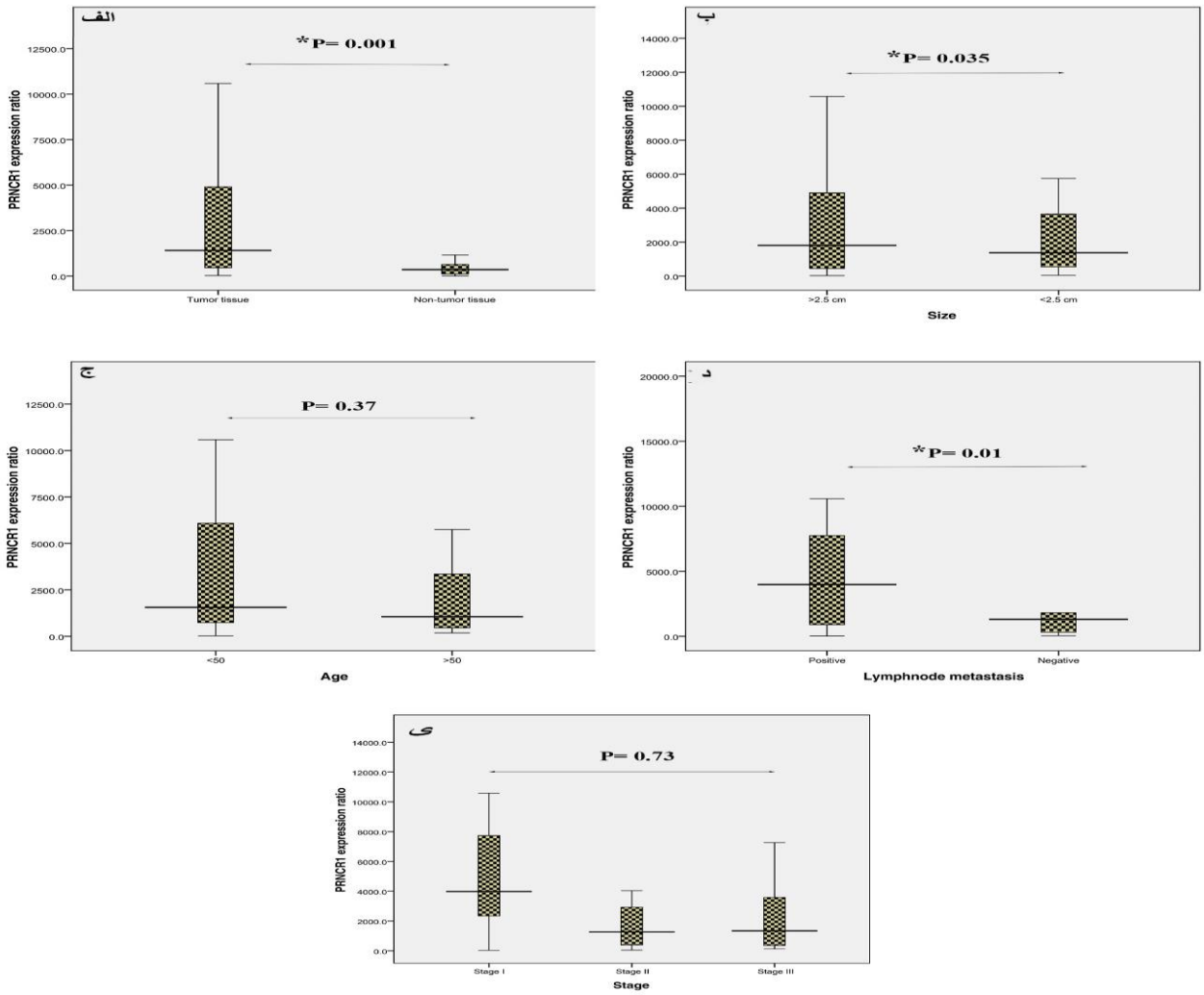
نام ژن		توالی پرایمر	طول محصول به جفت باز
PRNCR1	Forward	5’- CTAAGTCCACAGAGCAGGCAG-3’	۹۱
	Reverse	5’-GAAGAAGAGCAGCATCCACAT-3’	
β2m	Forward	5’- CTACTCTCTCTTTCTGGCCTG-3’	۱۹۱
	Reverse	5’- GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3’	

نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و تست‌های t-test و One way-Anova انجام گرفت و ارزش P (p value) کوچک‌تر از ۰/۰۵ مبنای معنی‌دار بودن تفاوت‌ها بود.

منحنی ROC ابزار مناسبی برای بررسی دقت تشخیصی و یا پتانسیل یک ژن یا تست جهت بررسی احتمال استفاده به‌عنوان بیومارکر است (۱۸). بسیاری از روش‌های شناسایی بیومارکرها مبتنی بر حداکثر میزان محیط زیر منحنی ROC (AUC یا A) هستند، به این صورت که هرچه محیط زیر منحنی به یک نزدیک‌تر باشد، ژن موردبررسی دقت تشخیصی بالاتری دارد (۱۹)؛ بنابراین به‌منظور بررسی میزان حساسیت و اختصاصیت PRNCR1 به‌عنوان بیومارکر، محیط زیر منحنی با استفاده از نرم‌افزار Sigma Plot (نسخه ۱۲/۵) اندازه‌گیری شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز با نرم‌افزار REST نشان داد که بیان PRNCR1 در نمونه‌های بافت توموری پستان در مقایسه با نمونه‌های نرمال حاشیه تومور، افزایش معنی‌داری داشته است (p=۰/۰۰۱). به‌این‌ترتیب که بیان PRNCR1 در نمونه‌های بافت توموری ۶/۶۳۶ برابر بیشتر از نمونه‌های نرمال حاشیه تومور بود (شکل ۱ الف).



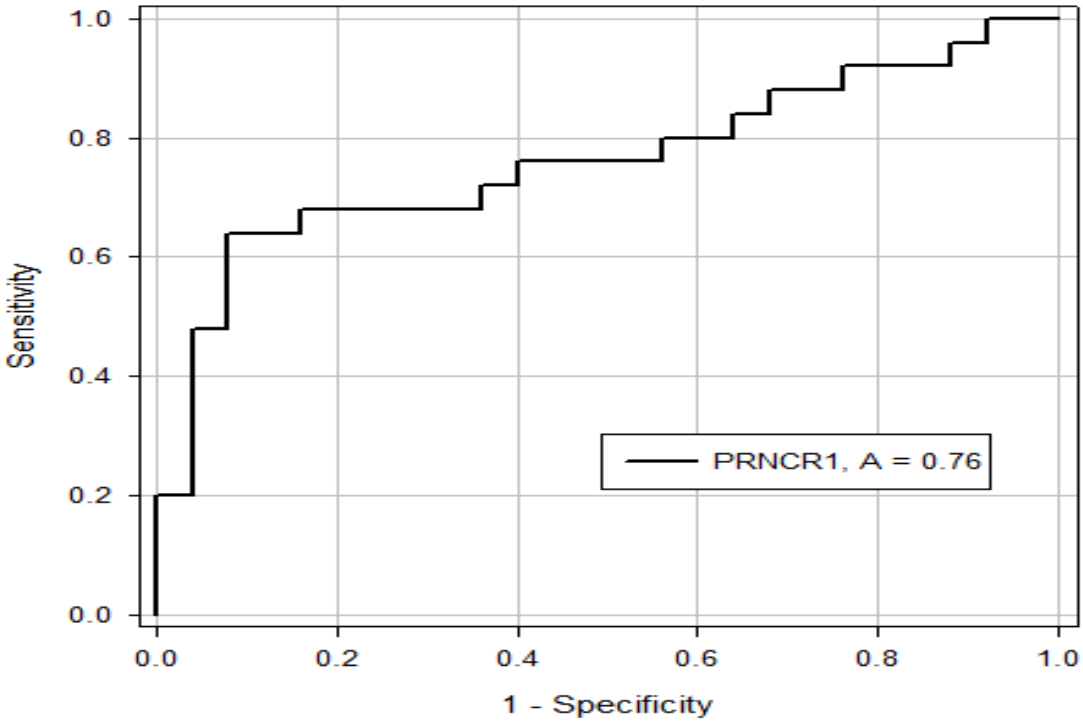
شکل ۱- بررسی تفاوت بیان **PRNCR1** و خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی نمونه‌های بافت توموری پستان. الف) تغییرات بیانی **PRNCR1** در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های نرمال حاشیه تومور و ارتباط افزایش بیان آن با ب) سایز تومور ج) سن بیمار د) درگیری گره لنفاوی و ی) درجه توموری. (محور **Y** میزان بیان **PRNCR1** ژن ضرب‌در ۱۰۰۰ است). * نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن رابطه است.

به‌منظور بررسی ارتباط تفاوت بیان PRNCR1 در نمونه‌های بافت توموری با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی (سن، درجه تمایز تومور، سایز تومور و درگیری گره‌های لنفاوی) از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) استفاده شد. تومورها ازنظر سایز در دو گروه کوچک‌تر یا مساوی ۲/۵ سانتیمتر و بزرگ‌تر از ۲/۵ سانتیمتر تقسیم شدند و نتیجه آنالیز t-test، ارتباط معنی‌داری بین تغییرات سطح بیان PRNCR1 و اندازه تومور نشان داد (p =۰/۰۳۵). بدین‌صورت که ارتباط مثبت و معنی‌داری بین افزایش سطح بیان PRNCR1 با افزایش سایز تومور مشاهده گردید (شکل ۲ ب). بیماران همچنین در دو گروه سنی کمتر یا مساوی پنجاه سال و بیشتر از پنجاه سال دسته‌بندی شدند؛ اما تفاوت معنی‌داری بین تغییرات بیان PRNCR1 در دو گروه سنی موردنظر دیده نشد (p =۰/۳۷) (شکل ۱ ج).

علاوه بر آن، تومورها ازنظر متاستاز گره‌های لنفاوی به دو گروه مثبت و منفی دسته‌بندی شدند و با محاسبه p =۰/۰۱، ارتباط مثبت و معنی‌داری بین افزایش بیان PRNCR1 و متاستاز گره‌های لنفاوی دیده شد (شکل ۱ د).

ازلحاظ درجه تمایز، نمونه‌های توموری همچنین در سه دسته I، II و III تقسیم می‌شوند که طبق آنالیزهای صورت گرفته ارتباط معنی‌داری بین بیان PRNCR1 با درجه تمایزی توموری با احتساب p =۰/۷۳۰ مشاهده نگردید (شکل ۱ ی).

به‌منظور بررسی پتانسیل PRNCR1، جهت استفاده به‌عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان پستان، منحنی ROC با استفاده از نرم‌افزار Sigma Plot رسم گردید. همان‌طور که در شکل ۲ قابل‌مشاهده است، سطح زیر منحنی (A) به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار، عدد ۰/۷۶ را نشان می‌دهد. عدد حاصله نشان می‌دهد که PRNCR1 احتمالاً بتواند به‌عنوان بیومارکر مناسبی جهت تشخیص سرطان پستان مورداستفاده قرار گیرد.



شکل ۲- منحنی ROC برای PRNCR1 در نمونه‌های بافت توموری به‌منظور بررسی میزان حساسیت، اختصاصیت و پتانسیل بیومارکری PRNCR1 جهت تشخیص سرطان پستان

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، برای اولین بار ارتباط بین تغییرات بیانی RNA بلند غیرکدکننده PRNCR1 با سرطان پستان موردبررسی قرار گرفت. تاکنون PRNCR1 تنها در سرطان‌های پروستات و کلورکتال موردبررسی قرار گرفته است و نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که هم‌راستا با سرطان‌های پروستات و کلورکتال (۱۳، ۲۰)، PRNCR1 در نمونه‌های توموری بافت پستان نسبت به نمونه‌های نرمال حاشیه‌ی توموری افزایش بیان معنی‌داری

دارد که این افزایش بیان در نمونه‌های توموری پستان با متاستاز به گره‌های لنفاوی ارتباط مستقیمی نشان داد. علاوه بر آن، دیده شد که مطابق یافته‌های گزارش‌شده در سرطان کلورکتال (۲۰)، ارتباط معنی‌داری نیز بین افزایش سطح بیان PRNCR1 با افزایش سایز تومور در نمونه‌های بافت پستان وجود دارد.

RNAهای غیرکدکننده با دخالت در سه مسیر مختلف در بسیاری از فرآیندهای مربوط به سرطان ازجمله شروع، پیشرفت و متاستاز نقش دارند (۲۱)، برخی از lncRNAها به‌عنوان انکوژن عمل می‌کنند، از قبیل MALAT1 در سرطان ریه (۲۲) و H19 در سرطان کولون (۲۳). برخی با متاستاز و پیشرفت تومور در ارتباط هستند از قبیل HOTAIR (۲۴) و برخی دیگر از قبیل MEG3 نقش سرکوبگری توموری دارد (۲۵).

با توجه به مطالعات متعدد صورت گرفته درگذشته، منطقه‌ی ۸q۲۴ حاوی مناطق تنظیمی به‌خصوص تقویت‌کننده‌ها است و بعدها دیده شد که لوکوس‌هایی با ریسک بالای درگیری در سرطان‌های اپی‌تلیال از قبیل کولون، پستان و پروستات هستند (۲۶). در سال ۲۰۱۰ برای اولین بار،PRNCR1 در موقعیت ۸q۲۴ در سرطان پروستات شناسایی شد و دیده شد که بیان PRNCR1 می‌تواند با حیات سلول سرطانی پروستات و فعالیت گیرنده آندروژن در ارتباط باشد (۸). PRNCR1 بافاصله‌ای کمتر از یک مگا باز از ژن CMYC در موقعیت ۸q۲۴ قرار دارد و همچنین SNPهایی در ژن PRNCR1 شناسایی شد که دیده شد می‌توانند با تأثیر بر ساختار ثانویه یا شکل فضایی رونوشت PRNCR1، پایداری آن را تغییر دهد (۸). Yang و همکاران نشان دادند که بیان دو PRNCR1 lncRNA و PCGEM1 در سرطان پروستات افزایش قابل‌توجهی می‌یابند و عملکرد خود را از طریق اتصال به ژن گیرنده آندروژن، افزایش فعالیت آن و بنابراین فعال‌سازی ژن‌های هدف آن، کنترل می‌کنند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان هدف‌های درمانی استفاده شود. آن‌ها همچنین گزارش کردند که PRNCR1 جهت اتصال به گیرنده آندروژن، نیازمند حضور PCGEM1 است (۱۳). برخلاف یافته‌های حاصل از مطالعات Yang، Presner و همکاران نتوانستند ارتباط معنی‌داری بین تغییرات بیانی lncRNAهای مربوطه بافرم تهاجمی سرطان پروستات پیدا کنند (۲۷).

در بررسی‌های انجام‌شده در سرطان کولورکتال، ارتباط معنی‌داری بین تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژن PRNCR1 با احتمال ابتلا به سرطان کلورکتال دیده شد (۲۱). به دنبال آن، تغییرات بیان PRNCR1 در نمونه‌های توموری و رده‌های سلولی سرطان کلورکتال موردبررسی قرار گرفت. در مطالعه انجام‌شده توسط Yang و همکاران، PRNCR1 در نمونه‌های توموری کلورکتال افزایش بیان قابل‌توجهی نسبت به نمونه‌های نرمال حاشیه تومور نشان داد و این سطح بالای بیان با افزایش سایز تومور همراه بود که گزارش‌های حاصله مشابه با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر در سرطان پستان بود. آن‌ها همچنین با بررسی منحنی ROC و گزارش سطح زیر منحنی ۰/۷۹۹، گزارش کردند که ارزش تشخیصی PRNCR1 بالاتر از بیومارکر CEA-CA199 (AUC=۰/۶۵۱) است. بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر با حساسیت تشخیصی مناسب مورداستفاده قرار گیرد. توقف بیان PRNCR1 با روش اولیگونوکلئوتید آنتی‌سنس، نشان داد که حذف آن باعث توقف تکثیر سلولی شده اما تأثیری روی آپوپتوز سلولی یا توانایی تهاجم ندارد (۲۰).

مطالعه دیگری در سرطان معده، نشان داد که پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در PRNCR1 با افزایش احتمال ابتلا به سرطان معده در ارتباط است و SNPهای موجود در PRNCR1 نیز می‌توانند به‌عنوان بیومارکری برای تشخیص این بیماری استفاده شوند (۲۸).

در حال حاضر، اطلاعات اندکی درزمینه نقش و عملکرد PRNCR1 در دسترس است؛ اما نکته‌ی قابل‌توجه این است که PRNCR1 فعالیت خود را به‌واسطه گیرنده آندروژن انجام می‌دهد. در سرطان پستان، AR بیشتر و گسترده‌تر از گیرنده‌های استروژن و پروژسترون بیان می‌شود و اخیراً AR به‌عنوان مارکر مناسبی جهت دسته‌بندی سرطان پستان مورداستفاده قرار گرفته است (۲۹)، هرچند گیرنده آندروژن در زیرگروه‌های مختلف سرطان پستان، عملکردهای متفاوتی دارد (۳۰). مطالعه در جمعیت بزرگی از زنان مبتلا به سرطان پستان نشان داده است که بیان AR با درجه تمایزی تومور، خصوصیات پاتولوژیکی و فنوتیپ مولکولی در ارتباط است (۳۱). بنابراین بررسی تغییرات بیانی PRNCR1 با توجه به ارتباطش با AR در سرطان پستان، به‌منظور بررسی پتانسیل تشخیصی و درمانی آن حائز اهمیت است.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که در سرطان پستان، مطابق با نتایج گزارش‌شده در سرطان‌های پروستات و کلورکتال، سطح بیان PRNCR1 در نمونه‌های توموری به‌طور معنی‌داری افزایش

می‌یابد که این افزایش بیان PRNCR1 در نمونه‌های توموری می‌تواند مبین نقش انکوژنی این RNAی بلند غیرکدکننده باشد. همچنین نتیجه حاصل از بررسی پتانسیل تشخیصی PRNCR1 به‌عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان پستان، هم‌راستا با نتایج حاصل از سرطان کلورکتال (۲۰)، نشان داد که PRNCR1 حساسیت و اختصاصیت قابل‌توجهی جهت استفاده به‌عنوان بیومارکر تشخیصی را دارد.

نظر به عملکردهای مختلف گیرنده آندروژن در سرطان‌های پستان با زمینه‌ی مولکولی متفاوت، بررسی تغییرات بیان PRNCR1 در زیرگروه‌های مختلف با تمرکز بر میزان و عملکرد AR پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به محدود بودن تعداد نمونه‌های موردمطالعه در این تحقیق، به‌منظور دستیابی به نتایج مطلوب و جامع‌تر، بررسی جامعه‌ی آماری گسترده‌تر، پیشنهاد می‌شود. مطالعه رده‌های مختلف سلول سرطانی پستان، حذف بیان PRNCR1 در رده‌ی سلولی مربوطه و بررسی تغییراتی از قبیل میزان تکثیر، آپوپتوز و خاصیت تهاجمی در رده سلولی سرطانی از سایر پیشنهادهای مطرح‌شده می‌باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از کارکنان محترم بیمارستان نورنجات و همچنین بیماران محترم که صمیمانه ما را جهت جمع‌آوری نمونه همکاری کردند، اعلام می‌دارند. کد اخلاق مطالعه حاضر ۵,۴,۳۲۵۹ از دانشگاه تبریز می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Shulman LN, Willett W, Sievers A, Knaul FM. Breast cancer in developing countries: opportunities for improved survival. J Oncol. 2010;2010:1-6.
2. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. Breast Cancer Res. 2010;12(6):R90.
3. Sinclair N, Littenberg B, Geller B, Muss H. Accuracy of screening mammography in older women. AJR Am J Roentgenol. 2011;197(5):1268-73.
4. Dermitzakis ET, Reymond A, Antonarakis SE. Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. Nat Rev Genet. 2005;6(2):151-7.
5. Nana-Sinkam SP, Croce CM. Non-coding RNAs in cancer initiation and progression and as novel biomarkers. Mol Oncol. 2011;5(6):483-91.
6. Ponjavic J, Ponting CP, Lunter G. Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. Genome Res. 2007;17(5):556-65.
7. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. Nature. 2009;458(7235):223-7.
8. Chung S, Nakagawa H, Uemura M, Piao L, Ashikawa K, Hosono N, et al. Association of a novel long non-coding RNA in 8q24 with prostate cancer susceptibility. Cancer Sci. 2011;102(1):245-52.
9. Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, Dhanasekaran SM, Cao Q, Brenner JC, et al. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. Nat Biotechnol. 2011;29(8):742-9.
10. Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, et al. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. Mol Cancer. 2007;6:39.
11. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. Endocr Rev. 2007;28(7):778-808.
12. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. Acta Pharmacol Sin. 2015;36(1):3-23.
13. Yang L, Lin C, Jin C, Yang JC, Tanasa B, Li W, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. Nature. 2013;500(7464):598-602.
14. Petrovics G, Zhang W, Makarem M, Street JP, Connelly R, Sun L, et al. Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients. Oncogene. 2004;23(2):605-11.
15. Iacopetta D, Rechoum Y, Fuqua SA. The Role of Androgen Receptor in Breast Cancer. Drug Discov Today Dis Mech. 2012;9(1-2):e19-e27.

16. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, et al. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. Cancer Cell. 2011;20(1):119-31.
17. Zuker M MN. The UNAFold Web Server[internet]. Albany: The RNA Institute, College of Arts and Sciences: 1995 [updated 2017 March 13; cited 2017 April 16]. Available from: http://unafold.rna.albany.edu/.
18. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. Semin Nucl Med. 1978;8(4):283-98.
19. Pepe MS, Thompson ML. Combining diagnostic test results to increase accuracy. Biostatistics. 2000;1(2):123-40.
20. Yang L, Qiu M, Xu Y, Wang J, Zheng Y, Li M, et al. Upregulation of long non-coding RNA PRNCR1 in colorectal cancer promotes cell proliferation and cell cycle progression. Oncol Rep. 2016;35(1):318-24.
21. Li L, Sun R, Liang Y, Pan X, Li Z, Bai P, et al. Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of colorectal cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2013;32(1):104.
22. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. Oncogene. 2003;22(39):8031-41.
23. Barsyte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, Khosravi F, Jurisica I, Andrulis IL, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. Cancer Res. 2006;66(10):5330-7.
24. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature. 2010;464(7291):1071-6.
25. Zhang X, Rice K, Wang Y, Chen W, Zhong Y, Nakayama Y, et al. Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. Endocrinology. 2010;151(3):939-47.
26. Fletcher O, Johnson N, Gibson L, Coupland B, Fraser A, Leonard A, et al. Association of genetic variants at 8q24 with breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17(3):702-5.
27. Prensner JR, Sahu A, Iyer MK, Malik R, Chandler B, Asangani IA, et al. The IncRNAs PCGEM1 and PRNCR1 are not implicated in castration resistant prostate cancer. Oncotarget. 2014;5(6):1434-8.
28. Li L, Jia F, Bai P, Liang Y, Sun R, Yuan F, et al. Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of gastric cancer. Tumour Biol. 2016;37(1):299-303.
29. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. Breast Cancer Res. 2014;16(1):R7.
30. Pietri E, Conteduca V, Andreis D, Massa I, Melegari E, Sarti S, et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. Endocr Relat Cancer. 2016;23(10):R485-98.
31. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. Mod Pathol. 2011;24(7):924-31.

Original Article

Evaluating Long non-coding RNA PRNCR1 in Breast Cancer

Soleimanpour E[1], Babaei E[1], Hosseinpourfeizi MA[1]*, Montazeri V[2]

1. Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Department of Thoracic Surgery, Noornejat Hospital, Tabriz, Iran

Received: 10 Jun 2017 Accepted: 26 Sep 2017

Abstract

Background & Objective: Breast cancer is one of the most common malignancies leading to death in women especially in industrial countries. Recent studies revealed that noncoding RNAs play important roles in various cellular activities such as tumor initiation, progression, and resistance to therapy. PRNCR1 is a long noncoding RNA that upregulates in some cancers and through androgen receptor signaling causes carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate the expression pattern of PRNCR1 in breast cancer patients.

Material & methods: In the present study, 30 breast tumor specimens and paired adjacent nontumoral tissues were collected from breast cancer women from East Azarbaijan province during the period of 2014-2015 and the expression level of PRNCR1 was evaluated using qRT-PCR. Also, the statistical analysis (t-test) was performed to examine the association between PRNCR1 and clinic-pathologic characteristics of tumor samples.

Results: The data revealed that PRNCR1 significantly upregulates in breast tumor tissues compared to the paired adjacent normal tissues. Moreover, overexpression of PRNCR1 in breast tumor tissues was significantly related to tumor size and lymph node metastasis ($P<0.05$).

Conclusion: The results revealed that PRNCR1 significantly dysregulates in breast cancer. Considering its effect on downstream pathways of androgen receptor, suggesting that it might be used as a therapeutic agent, although further studies are required.

Keywords: Breast cancer, long noncoding RNA, androgen receptor, PRNCR1

***Corresponding Author: Mohammadali Hosseinpourfeizi,** Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
E-mail: pourfeizi@eastp.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 637- 646