

بررسی میزان بیان miR-33 a، miR-429 و miR-200 c در سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه

غزاله گلشن‌راد ^۱M.Sc.، شهره زارع کاربزی ^۱Ph.D.*، مرتضی کریمی پور ^۲Ph.D.

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، تهران، ایران

۲- مرکز بیوتکنولوژی پزشکی، عضو هیئت علمی انستیتو پاستور، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: shohrehzare@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۹

چکیده

هدف: در این تحقیق ارتباط miR-33a، miR-429 و miR-200c با مسیر EMT در سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از روش Real Time-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان miRNAهای مذکور از ۳۰ بافت توموری سلول‌های غیرکوچک ریه (NSCLC) (۶۶ درصد در مرحله I و II و ۳۴ درصد بیماران در مرحله III) استفاده شد. پس از استخراج RNA از نمونه‌های بافتی سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای ساقه حلقه انجام شد. بررسی کمی میزان بیان ژن‌های فوق‌الذکر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام و آنالیز داده‌ها با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت.

نتایج: ارزیابی تغییرات بیان برای miR-33a نشان داد که تعداد ۱۱ نمونه از ۳۰ نمونه توموری افزایش بیان داشتند. miR-429 افزایش بیان در ۱۲ نمونه توموری و miR-200c افزایش بیان در ۱۸ نمونه توموری داشتند. اما این تغییرات معنی‌دار نبود (به ترتیب $p=0/09$ ، $p=0/072$ و $p=0/084$).

نتیجه‌گیری: از آنجایی که نمونه‌های این مطالعه در مراحل ابتدایی سرطان بودند، شاید توجیه‌کننده عدم تغییر بیان معنی‌دار می‌باشد. همچنین این پژوهش در مقیاس کوچک طراحی شده، لذا برای به‌دست آوردن نتایج دقیق‌تر، تحقیقات بیشتر و افزایش تعداد نمونه‌ها نیاز است.

واژگان کلیدی: سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه، انتقال اپیتلیال-مزانشیمی، miRNA

مقدمه

سرطان ریه از علل شایع مرگ مرتبط با سرطان و در نتیجه یک مشکل عمده برای سلامت عمومی جامعه است (۱). سرطان ریه به دو نوع سرطان سلول‌های کوچک (SCLC) و سرطان سلول‌های غیرکوچک (NSCLC) تقسیم می‌شود که تقریباً ۸۵ درصد سرطان ریه مربوط به انواع NSCLC است. این نوع سرطان از نظر بافت شناسی به سه نوع آدنوکارسینوم (AdC)، کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) و کارسینوم سلول بزرگ (LCC) طبقه‌بندی می‌شود (۲،۳). برآوردهای انجمن سرطان آمریکا در زمینه سرطان ریه در ایالات متحده تا سال ۲۰۱۷ حدود ۲۲۲۵۰۰ مورد جدید سرطان ریه و ۱۵۵۸۷۰ مرگ و میر ناشی از آن بود (۴). از عواملی که باعث سرطان ریه می‌شوند می‌توان به سیگار کشیدن، قرار گرفتن در معرض دود تنباکو، نیکل، کروم، آزبست و آرسنیک اشاره کرد (۵). سرطان ریه اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود زمانیکه درمان علاج‌بخش دیگر امکان‌پذیر نیست (۶). درمان سرطان فردمحور مبتنی بر پایه ژنتیکی در ۱۰ سال گذشته به‌خصوص در NSCLC پیشرفت کرده است (۷). بنابراین، نیاز فوری به کشف اهداف تشخیصی و درمانی جدید بر پایه مطالعات مولکولی برای بیماران مبتلا به سرطان وجود دارد (۸، ۹). شواهد نشان می‌دهد که پیشرفت تومور با عوامل ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و محیطی کنترل می‌شود (۱۰). مسیر EMT در ایجاد تهاجم و متاستاز سرطان نقش دارد، تهاجم باعث متاستاز سرطان به ماتریکس خارج سلولی (ECM) می‌شود. EMT یکی از مهم‌ترین فعالیت‌هایی است که موجب انتقال سلول به استروما شده، همچنین مولکول‌های وابسته به EMT آبخاری از سیگنال‌های داخل سلولی را می‌سازند که در کاهش فعالیت E-cadherin دخالت دارند. به دنبال کاهش فعالیت E-cadherine، چسبندگی بین سلولی نیز کاهش یافته و سلول به سمت متاستاز پیش می‌رود (۱۱). مطالعات نشان داده که microRNAها از طریق تنظیم

EMT به متاستاز کمک می‌کنند. همچنین شواهد اخیر نشان می‌دهد که عوامل رونویسی مرتبط با EMT ممکن است به‌طور مستقیم در متاستاز دخیل باشند (۱۲). میکروRNAها می‌توانند به‌عنوان انکوژن و یا مهارکننده تومور از طریق مهار بیان ژن‌های هدف وابسته به سرطان عمل کنند (۱۳، ۱۴). در دهه گذشته مطالعات بسیاری، نقش میکروRNAهای موثر در مسیر EMT را در سرطان مختلف از جمله ریه نشان داده است (۱۵، ۱۷). لذا در تحقیق حاضر، مطالعه این سه miRNA که دارای اهداف ژنی بسیار مهمی در مسیر EMT می‌باشند در دستور کار قرار گرفت.

miR-33 a در متاستاز سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه در سطوح پایین بیان شده و مهار بیان miR-33a موجب القا EMT و بیان بالای miR-33a توسط تنظیم بیان Twist1 موجب توقف EMT در سلول‌های NSCLC می‌شود. همچنین miR-33a به‌عنوان سرکوبگر تومور شناخته شده، زیرا بیان بیش از حد miR-33a برای مهار رشد سلول‌های سرطانی گزارش شده است (۱۸).

miR-200 c و miR-429 از اعضای خانواده miR-200 می‌باشند و اعضای این خانواده تنظیم‌کننده‌های مهم EMT و متاستاز هستند. miR-200 c یک سرکوب‌کننده تومور در انواع مختلف سرطان به‌شمار می‌رود (۱۵). یافته‌های اخیر نشان داده است که miR-200 c حداقل تا حدی از طریق تحریک USP25، که یکی از اعضای خانواده پروتئازهای ubiquitin است تهاجم را سرکوب می‌کند (۱۹). miR-200 c تغییرات اپیتلیال - مزانشیمی را با کاهش مقادیر ZEB1/2 و افزایش مقادیر E-cadherin، تنظیم می‌کند که به‌عنوان نشانگر اپیتلیال شناخته شده است. E-cadherin اصلی مورد نیاز برای اتصال بین سلولی است. miR-200 c می‌تواند موجب مهار پس از رونویسی این فاکتورهای رونویسی گردد و از این طریق موجب کنترل EMT شود (۲۰). گزارش شده است که miR-429 در سرطان

منتقل شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه نمونه تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. استخراج RNA و سنتز cDNA از هر کدام از نمونه‌های توموری و نمونه نرمال مجاور توموری (به‌عنوان کنترل)، RNA با استفاده از کیت (Gene All, Korea) با توجه به پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. از نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸-۲/۲ داشتند جهت سنتز cDNA استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای ساقه حلقه اختصاصی توسط (Prime Script RT reagent kit, Takara, Japan, Cat. NO RR037A) برطبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. از RNU44 به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمرهای ساقه-حلقه اختصاصی جهت سنتز cDNA در جدول ۱ ارائه شده است.

کولورکتال، کارسینوم هیپاتوسلولار، کارسینوم مری، سرطان پستان و سرطان ریه نقش دارد (۲۱). مطالعات اولیه گزارش دادند که سطح پایین miR-429 باقی‌مانده کلی کوتاه در بیماران NSCLC ارتباط دارد و همچنین نقش miR-429 در تنظیم سلول‌های NSCLC به‌طور بالقوه ناشی از مهار بیان 1-DLC است (۲۲).

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه: جهت بررسی الگوی بیان miR-33a، miR-429 و miR-200c، پس از اخذ رضایت‌نامه تعداد ۳۰ نمونه بافت تومور ریه و بافت نرمال حاشیه تومور از بیماران مبتلا به سرطان ریه غیر سلول کوچک در اطاق عمل توسط جراح در بیمارستان مسیح دانشوری تهران گرفته شد. نوع تومور توسط پاتولوژیست‌ها تشخیص داده شد. بیمارانی که وارد مطالعه شدند قبل از جراحی هیچ‌گونه درمانی اعم از شیمی‌درمانی و رادیوتراپی روی آن‌ها انجام نشده بود. نمونه‌هایی که تحت درمان بودند و یا پاتولوژی آن‌ها غیر از NSCLC بود از مطالعه خارج شدند، نمونه‌ها در داخل ازت مایع در اطاق عمل قراردادده شد و به آزمایشگاه

جدول ۱: پرایمرهای ساقه-حلقه طراحی شده جهت سنتز cDNA.

ژن	توالی (۳' → ۵')
miR-200c-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGAT ACGACTCCATC
miR-429	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGAT ACGACACGGTT
miR-33a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGAT ACGACTGCAAT
RNU44	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGACCGGTATTGCGACTGGA TACGACAGTCAG

توالی‌هایی که زیر آنها خط کشیده شده اختصاصی هر ANRim می‌باشد و بقیه توالی ساقه-حلقه مشترک می‌باشد.

۱۵ دقیقه، سپس به مدت ۴۰ سیکل: ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۵۸ درجه به مدت یک دقیقه. همه‌ی نمونه‌ها به صورت duplicate و روش بررسی سایبرگری نبود. جهت طراحی پرایمر از نرم افزار AlleleID v7.4 (Premier Biosoft, US) و سایت (NCBI) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش فوق در جدول ۲ ارایه شده است.

ارزیابی بیان miR-33a و miR-429 و miR-200c

واکنش Real-time PCR در حجم ۱۵ μL شامل: ۷.۵ μL از RealQ Plus 2x Master Mix Green از High ROX™ (Ampliqon, Denmark) ، ۱۰ نانوگرم cDNA، ۵/۵ میکرولیتر آب و یک میکرولیتر (۳ پیکومول) از مخلوط پرایمر رفت و برگشت صورت گرفت. برنامه دمایی و زمانی شامل: دناتوراسیون اولیه به مدت

جدول ۲: پرایمرهای طراحی شده و توالی آن‌ها.

نام miRNA	توالی (۵' → ۳')	طول محصول
miR-200c-3p	CACGCCTAATACTGCCGGGT	Forward
	GTATGCAGAGCAGGGTCC	Reverse
miR-429	AGCCGCCTAATACTGTCTGGTA	Forward
	GTATGCAGAGCAGGGTCC	Reverse
miR-33a-5p	CATCCGCAGTGCATTGTAGTTG	Forward
	GTATGCAGAGCAGGGTCC	Reverse
RNU44	CCTGGATGATGATAGCAAATG	Forward
	GTATGCAGAGCAGGGTCC	Reverse

پرایمر Reverse برای همه forwardها مشترک است.

به طوری که بیماران از نظر نوع زیرگروه بافتی ۵۷ درصد مبتلا به آدنوکارسینوما و ۴۳ درصد مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی، ۶۶ درصد در مرحله I و II و ۳۴ درصد بیماران در مرحله III بودند. از نظر جنسیت، ۲۷ درصد زن و ۷۳ درصد مرد و از نظر سنی، ۳ درصد زیر ۴۰ سال، ۳ درصد بین ۴۰ تا ۵۰ سال، ۴۷ درصد بین ۵۰ تا ۶۰ سال و ۴۷ درصد بین ۶۰ تا ۷۰ سال داشتند، همچنین از نظر استعمال دخانیات ۷۳ درصد غیرسیگاری و ۲۷ درصد سیگاری بودند.

نتایج ارزیابی بیان miR-33a در بیماران مبتلا به

سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه

میزان بیان miR-33a با استفاده از روش Real Time-PCR در ۳۰ نمونه بافت NSCLC و ۳۰ نمونه بافت مجاور سالم آن بررسی شد. بررسی‌ها نشان‌دهنده

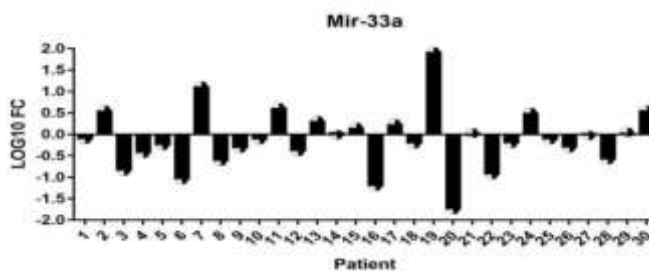
آنالیز آماری

جهت آنالیز نتایج PCR Real-time از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و از آزمون T-test و نرم افزار GraphPad Prism v7.03 (GraphPad Software Inc., USA) جهت مقایسه معنی‌دار بود نتایج در دو گروه توموری و نرمال استفاده شد. همچنین برای همه‌ی آزمون‌ها میزان $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری تست در نظر گرفته شد.

نتایج

۳۰ نمونه بافت توموری و بافت نرمال مجاور توموری بارضایت بیماران از بیمارستان مسیح دانشوری تهیه شد. بیماران از نظر سیگاری و غیرسیگاری بودن و پاتولوژی تومور شامل هر دو نوع سرطان سلول غیرکوچک ریه (سلول سنگفرشی و آدنوکارسینوما) دسته‌بندی شدند.

افزایش بیان در ۳۷ درصد نمونه‌ها و کاهش بیان در ۶۳ درصد نمونه‌ها می‌باشد (شکل ۱).

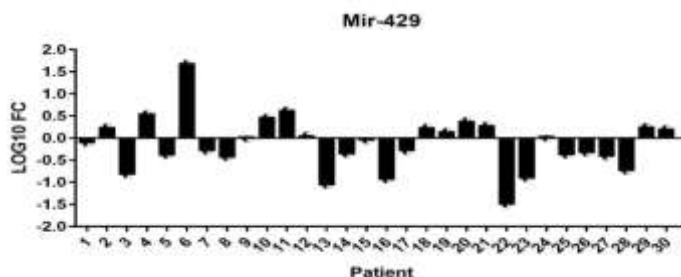


شکل ۱: نمودار مربوط به تغییرات بیان miR-33a در نمونه‌های توموری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های این ژن با $p=0/09$ بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح بیان این میکروRNA در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های سالم است (شکل ۲-ا).
نتایج ارزیابی بیان miR-429 در بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه
 تغییرات بیان miR-429 در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های سالم نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین بیان miR-429 در نمونه‌های توموری و نمونه‌های سالم وجود ندارد ($p=0/084$) (شکل ۲-ب).
 به طوری که از ۳۰ نمونه توموری، ۱۲ نمونه (۴۰ درصد) افزایش بیان و بقیه نمونه‌های توموری (۶۰ درصد) نشان‌دهنده کاهش بیان miR-429 بودند (شکل ۳).

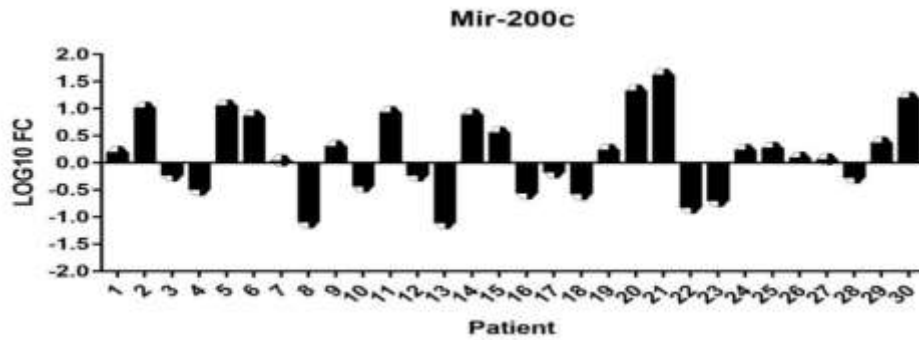
تجزیه و تحلیل آماری داده‌های این ژن با $p=0/09$ بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح بیان این میکروRNA در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های سالم است (شکل ۲-ا).

نتایج ارزیابی بیان miR-429 در بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه

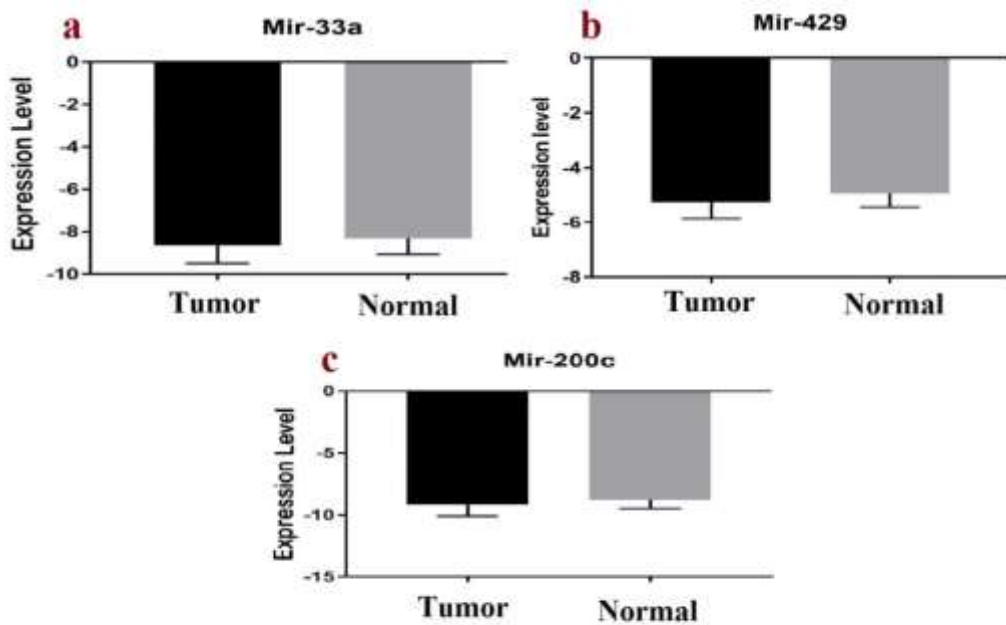


شکل ۳: نمودار مربوط به تغییرات بیان miR-429 در نمونه‌های توموری

نتایج ارزیابی بیان miR-200c در بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه
 ارزیابی بیان miR-200c در ۳۰ نمونه توموری و ۳۰ نمونه سالم مجاور آن براساس شکل ۴، بیانگر کاهش بیان ۱۲ نمونه (۴۰ درصد) و افزایش بیان ۱۸ نمونه از ۳۰ نمونه توموری (۶۰ درصد) می‌باشد. در نهایت با آنالیزهای آماری هیچ اختلاف معنی‌داری بین سطح بیان این میکروRNA در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های سالم مشاهده نشد ($p=0/072$) (شکل ۲-ج).



شکل ۴: نمودار مربوط به تغییرات بیان miR-200c در نمونه های توموری



شکل ۲: نمودار (a) مربوط به مقایسه بیان miR-33a (b) مربوط به مقایسه بیان miR-429 و (c) مربوط به مقایسه بیان miR-200c میان نمونه های توموری و نمونه های سالم.

بحث

یکی از مسیرهای مهم در پیشروی سرطانی شدن سلول، مسیر EMT می‌باشد. EMT دارای نقش مهم در افزایش پتانسیل بدخیمی و کاهش حساسیت به درمان‌های معمول در سلول‌های NSCLC است. از دست دادن بیان مارکرهای EMT مانند E-cadherin و cytokeratin و به دست آوردن بیان مارکرهای مزانشیمی مانند N-cadherin و vimentin به طور قابل توجهی با پیشرفت مرحله NSCLC ارتباط دارد.

اکنون مشخص شده است که RNAهای غیرکدکننده از قبیل microRNAها از طریق تنظیم EMT در ایجاد و یا جلوگیری از متاستاز کمک می‌کنند (۱۰). به همین منظور miR-33 a, miR-429, و miR-200 c در این مطالعه، به عنوان میکروRNAهای درگیر در این مسیر بررسی شدند، زیرا این miRNAها هدف‌های ژنی مهمی در مسیر EMT از جمله ZEB2, Snail-1, TWIST, N-cadherin, PI3K, Akt دارند. مطالعات پیشین روی این microRNAها نتایج مختلفی را در

بیان miR429 وابسته به بافت است و در بافت‌های مختلف ژن‌های متفاوتی هدف قرار می‌دهد. باتوجه به گزارش کاهش بیان این miRNA در مطالعه‌ی Lang و همکاران افزایش تعداد نمونه‌ها می‌تواند راهکاری منطقی برای به‌دست‌آوردن نتایج قابل اطمینان در این زمینه باشد.

تغییرات نابه‌جا در الگوی بیان miR-33 a نیز در سرطان‌های متعددی گزارش شده است. مطالعات نشان داده است که miR-33a می‌تواند با تنظیم بیان β -catenin مانع از گسترش سلول‌های سرطانی ریه و مهاجم در رده‌ی سلولی بافت ریه A549 شود. β -catenin در پیشرفت چرخه سلولی نقش دارد و بیان غیرطبیعی آن در سلول‌های مختلف تومور مشاهده شده است. همچنین MiR-33a با کاهش بیان نابه‌جای خود سبب متاستاز سرطان ریه سلول غیر کوچک می‌شود و با بیان Twist1 رابطه معکوس دارد (۲۵). درسال

۲۰۱۷، Li-Kun Hou و همکاران به‌بررسی بیان microRNA-33 a در NSCLCs و بافت نرمال ریه پرداختند. در مطالعه مذکور ۱۴۷ نمونه توموری که در مراحل انتهایی سرطان قرار داشتند و ۳۲ نمونه طبیعی ریه گنجانده شدند. تجزیه و تحلیل miR-33a در این نمونه‌ها توسط qRT-PCR نشان داد که میزان بیان آن در بیوپسی‌های تومور NSCLC نسبت به بافت‌های غیر سرطانی مجاور پایین‌تر است. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). علاوه‌براین، سطح بیان miR-33 a در هر درجه‌ی بیوپسی تومور NSCLC به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از بافت ریه طبیعی بود (۲۶). درمطالعه حاضر تغییر بیان معنی‌داری در miR-33a مشاهده نشد. شاید بتوان با افزایش تعداد نمونه‌ها نتایج دقیق‌تری را برای miR-33 a به‌دست آورد.

درنهایت، برای microRNA‌های انتخابی در این پژوهش تغییر بیان معنی‌داری مشاهده نشد. از آنجایی‌که این پژوهش در مقیاس کوچک طراحی شده، لذا برای

سرطان‌های مختلف نشان داده‌اند. Chang و همکاران با تحقیق روی رده‌ی سلولی MCF-7 پیشنهاد کردند که miR-200 c مهاجم و مهاجرت را در سرطان پستان را از طریق هدف قرار دادن بیان HMGB1 مهار می‌کند (۲۳). نتایج مطالعه‌ی دیگر روی این miRNA در ۷۹ بیمار نشان داد که بیان سطح miR-200 c در بافت‌های NSCLC پایین‌تر از بافت‌های غیرتوموری بود. این کاهش بیان سبب برداشته شدن اثر مهاری miR-200 c روی ژن‌های ZEB1/2 و کاهش بیان E-cadherin و در نهایت کاهش چسبندگی سلولی می‌شود. اما در تحقیق حاضر این کاهش بیان معنی‌دار نبود. ازجمله دلایلی که می‌توان برای این تناقض مطرح کرد می‌توان به کم‌بودن تعداد نمونه‌ها اشاره کرد. همچنین نمونه‌ها در مراحل ابتدایی سرطان ریه بودند و شاید همین امر توجیه‌کننده عدم تغییر بیان miR-200 c باشد.

دیگر عضو متعلق به خانواده‌ی miR-200، یعنی miR-429 نیز در این پژوهش مورد بررسی قرارگرفت که تغییر بیان هدف‌داری را در نمونه‌های NSCLC نشان نداد. هر چند که پیش‌تر افزایش بیان آن در سرطان روده گزارش شده بود (۲۴). درسال ۲۰۱۴، Lang و همکاران بررسی کردند که افزایش miR-429 باعث ایجاد تومور در سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه می‌شود و چندین ژن سرکوب‌کننده تومور را هدف قرار می‌دهد. بیان بیش از حد miR-429 در رده‌ی سلول‌های A549 (NSCLC) به‌طور قابل توجهی باعث مهاجرت و مهاجم سلول شده، درحالی‌که مهار miR-429 مانع از این اثرات می‌شود. miR-429 با هدف قرار دادن ژن‌های PTEN، RASSF8 و TIMP2، بیان آن‌ها را کاهش می‌دهد. این ژن‌ها جز سرکوب‌کننده‌های تومور هستند و به این ترتیب باعث متاستاز و سرطانی شدن سلول‌ها می‌شوند (۲۲). اما در تحقیق حاضر تغییر بیان معنی‌داری برای miR429 مشاهده نشد، ازجمله دلایلی که برای عدم تغییر بیان می‌توانیم مطرح کنیم این است که

8. Brothers JF, Hijazi K, Mascaux C, El-Zein RA, et al. Bridging the clinical gaps: genetic, epigenetic and transcriptomic biomarkers for the early detection of lung cancer in the post-National Lung Screening Trial era. *BMC medicine*. 2013; 11(1): 168-172 .
9. Gazala S, Pelletier JS, Storie D, Johnson JA, et al. A systematic review and meta-analysis to assess patient-reported outcomes after lung cancer surgery. *Sci World J*. 2013; 2013(3): 1-8.
10. Behrens C, Feng L, Kadara H, Kim HJ, et al. Expression of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 in non-small cell lung carcinoma and preneoplastic lesions. *Clin Cancer Res*. 2009; 16(1):34-44.
11. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18(2): 128-133.
12. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010; 29(34): 4741-51.
13. Lin P, Yu S, Yang P. MicroRNA in lung cancer. *Br J cancer*. 2010; 103(8): 1144-1148.
14. Wouters MD, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Pothof J. MicroRNAs, the DNA damage response and cancer. *Mutat Res-Fund Mol M*. 2011; 717(1-2): 54-66 .
15. Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, Rapa I, et al. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2010; 8(9): 1207-16.
16. Yang L, Yang J, Li J, Shen X, et al. MicroRNA-33a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis and could be a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2015; 5: 13677.
17. Zhu W, He J, Chen D, Zhang B, et al. Expression of miR-29c, miR-93, and miR-429 as potential biomarkers for detection

به دست آوردن نتایج دقیق‌تر، تحقیقات بیشتر و افزایش تعداد نمونه‌ها نیاز است. این یافته‌ها می‌تواند سطح اهمیت microRNAها را ارتقا داده و کمکی به درک مکانیسم‌های مولکولی سرطان ریه باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا به انجام رسیده است. بدین وسیله از کلیه‌ی افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(2): 115-132.
2. Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *lancet oncol*. 2015; 16(7): e342-e351.
3. Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. *Gene cand*. 2014; 5(1-2): 1-7.
4. Ahmadi AM, Ghasemi H, Nooshin S, Zayani Z, et al. Assessing Gene Expression and Methylation of KMT2D and IGF2 Genes in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Canc Clin Oncol*. 2018; 7(1): 55-59.
5. Alberg AJ, Samet J M. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003; 123(1): 21S-49S .
6. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60(5): 277-300.
7. Chen G, Noor A, Kronenberger P, Teugels E, et al. Synergistic effect of afatinib with su11274 in non-small cell lung cancer cells resistant to gefitinib or erlotinib. *PloS one*. 2013; 8(3): e59708 .

- of early stage non-small lung cancer. *PloS one*. 2014; 9(2): e87780 .
18. Kuo PL, Liao SH, HungJY, Huang MS, et al. MicroRNA-33a functions as a bone metastasis suppressor in lung cancer by targeting parathyroid hormone related protein. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6): 3756-3766 .
19. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013; 62(9): 1315-1326 .
20. Wellner U, SchubertJ, Burk UC, Schmalhofer O, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat cell biol*. 2009; 11(12): 1487-1493.
21. Xing L, Todd NW, Yu L, Fang H, et al. Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers. *Mod Pathol*. 2010; 23(8): 1157-1163.
22. Lang Y, Xu S, Ma J, Wu J, et al. MicroRNA-429 induces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer cells and targets multiple tumor suppressor genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 450(1): 154-159 .
23. Chang I, Mitsui Y, Fukuhara S, Gill A, et al. Loss of miR-200c up-regulates CYP1B1 and confers docetaxel resistance in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2009; 6 (10):7774-84.
24. Han Y, Zhao Q, Zhou J, Shi R. miR-429 mediates tumor growth and metastasis in colorectal cancer. *Am J Cancer Res*. 2017; 7 (2): 218-225.
25. Cao L, Xie J, LinY, Zheng L, et al. miR-183 inhibits invasion of gastric cancer by targeting Ezrin. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(9): 5582-5594.
26. Hou L, Ma Y, Han Y, Gai-Xia L, et al. Association of microRNA-33a molecular signature with non-small cell lung cancer diagnosis and prognosis after chemotherapy. In *PloS one*. 2017; 12 (1): e0170431.

miR-33a, miR-429 and miR-200c with EMT pathway was investigated in non-small cell lung cancer

Golshan Rad Gh M.SC¹, Zare Karizi Sh Ph.D.^{1*}, Karimipoor M Ph.D.²

1. Department of Genetic, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Pishva Branch, Varamin, Iran
2. Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute, Tehran, Iran

* Email corresponding author: shohrehzare@yahoo.com

Received: 9 Jun. 2019

Accepted: 22 Jan. 2020

Abstract

Aim: In this study, the correlation of miR-33a, miR-429 and miR-200c with EMT pathway was investigated in the non-small cell lung cancer.

Material and methods: Real-Time PCR was used to evaluate the expression levels of the mentioned miRNA in 30 non-small cell lung tumor tissues (66% of cells were in stages I, II and the rest were in stage III). RNA extraction was performed and cDNA synthesized using stem-loop primers. The quantitative evolution of gene expression were performed using specific primers and data was analyzed by $2^{-\Delta\Delta ct}$

Results: The evaluation of expression changes for miR-33a showed that 11 samples were up-regulated. miR-429 and miR-200c showed an increased expressions in 12 and 18 tumor samples, respectively. There was no significant difference between the levels of expression ($P \leq 0.05$).

Conclusion: There was no significant change in the level of expression of miR-33a, miR-429 and miR-200c. These results could be due to sample size or the early stage of samples.

Keywords: non-small cell lung cancer, Epithelial–mesenchymal transition. miRNA