

ارتباط بین بیان microRNA129-2 با سرطان دهانه رحم در بیماران آلوده به HPV

ژیلا ناظری گیوی^۱، خدیجه عنصری^{۱*}، الهام مسلمی^۲

^۱گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران، ^۲گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۱۱/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع می‌باشد که اولین عامل مرگ و میر در بین زنان دنیا و رتبه هفتم از کل سرطان‌ها را به خود اختصاص داده است. یکی از عوامل خطر در ایجاد سرطان دهانه رحم، آلودگی به ویروس پاپیلومای انسانی می‌باشد. از طرفی microRNAs به عنوان یک مارکرهای جدید برای تشخیص سرطان دهانه رحم پیشنهاد شده‌اند. از این میان، microRNA129-2 یک متوقف کننده تکثیر سلولی و مهار کننده تهاجم سلولی به شمار می‌رود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان microRNA129-2 در زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم آلوده به پاپیلوما ویروس و مقایسه آن با بیماران فاقد آلودگی با عفونت پاپیلوما ویروس و افراد سالم بود.

روش بررسی: در این مطالعه نیمه تجربی، تعداد ۲۰ نمونه بافت پارافینه از زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم آلوده به ویروس پاپیلوما، ۲۰ نمونه بافت پارافینه از زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم بدون عفونت ویروس پاپیلوما و ۲۰ نمونه پاپ اسمیر نرمال از بیمارستان میرزا کوچک خان جنگلی در شهر تهران در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. پس از پارافین زدایی، استخراج RNA صورت گرفت و بیان miR129-2 با روش Real Time PCR در بین گروه‌ها بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Grafpad prism6 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کاهش معنی‌داری بین بیان microRNA129-2 در بیماران آلوده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P=0/0004$). همچنین میزان بیان miR129-2 در بافت‌های سرطانی آلوده به عفونت پاپیلوما ویروس نسبت به بافت‌های سرطانی فاقد آلودگی کاهش نشان داد ($P=0/0001$). اگرچه این کاهش بین بیماران بدون آلودگی با پاپیلوما ویروس و گروه کنترل مشاهده گردید، ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است ($P=0/083$). ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان miR129-2 با سن بیماران ($P=0/903$) و درجه بیماری مشاهده نشد ($P=0/392$).

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش میزان بیان miR129-2 در نمونه‌های سرطانی، بررسی میزان بیان miR129-2 می‌تواند به عنوان یک عامل تشخیصی ارزشمند اولیه مطرح گردد و در تعیین پیش‌آگهی سرطان دهانه رحم نقش مهمی ایفاء کند.

واژه‌های کلیدی: سرطان دهانه رحم، ویروس پاپیلومای انسانی، بیان miR129-2

* نویسنده مسئول: خدیجه عنصری، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، گروه زیست‌شناسی

Email: onsory@gmail.com

مقدمه

سرطان دهانه رحم دومین سرطان شایع در زنان و چهارمین علت عمده مرگ و میر در بسیاری از کشورهای در حال توسعه می‌باشد. سالانه حدود ۵۰۰ هزار زن به سرطان دهانه رحم مبتلا می‌شوند و حدود ۳۰۰ هزار نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند که بیشتر آنها در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد (۱). در ایران پس از سرطان سینه، سرطان دهانه رحم، شایع‌ترین سرطان میان زنان بوده و پس از سرطان تخمدان دومین عامل مرگ و میر محسوب می‌شود (۲). مرگ و میر ناشی از این سرطان در کشورهای که زنان غربالگری سرطان سرویکس را به طور معمول انجام نمی‌دهند، بالاتر بوده و معمولاً در مرحله آخر بیماری یا CIN3 تشخیص داده می‌شود (۳). ویروس‌ها با ۲۰-۱۵ درصد سرطان‌های انسان در ارتباط می‌باشند. گزارش‌ها حاکی از آن است که از میان ویروس‌ها، پاپیلوما ویروس انسانی در ابتلا زنان به سرطان دهانه رحم نقش به‌سزایی بازی می‌کند، به طوری که عامل بیش از ۸۰ درصد ابتلا به سرطان دهانه رحم را به خود اختصاص داده است (۴). تاکنون بیش از صد نوع HPV شناسایی شده است که سبب آلودگی ناحیه تناسلی شده و حداقل ۱۳ ژنوتیپ به عنوان HighRisk یا انکوژن در نظر گرفته شده‌اند. اغلب این ویروس‌ها قادر به آلوده کردن مجرای جنسی مخصوصاً بافت اپی‌تلیال می‌باشند. انواع کم‌خطر مانند HPV6 و HPV11، عامل

زگیل‌های خوش خیم می‌باشند و به سمت سرطانی شدن پیشرفت نکرده و معمولاً بهبود می‌یابند. اما انواع پرخطر، شامل HPV16، HPV18، HPV31، HPV33 و HPV45، با توسعه سرطان دستگاه تناسلی در ارتباط می‌باشند و در ۹۹ درصد سرطان‌های دهانه رحم گزارش شده‌اند (۵). در این میان HPV16 از بقیه تیپ‌ها شیوع بیشتری دارد (۶). ژنهای این ویروس کد کننده دو انکوپروتئین E6 و E7 می‌باشند که این دو به همراه هم، الگوی بیان و فعالیت بسیاری از ژن‌ها و پروتئین‌های سلولی را تغییر داده و با ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین‌های سلولی، باعث تکثیر غیرطبیعی سلول‌ها می‌شوند (۷). ویروس پاپیلوما انسانی با تغییر در بیان پروتئین‌ها و سرکوب کننده‌های تومور باعث ایجاد سرطان می‌گردد. ژن‌های این ویروس، کدکننده پروتئین‌هایی هستند که با تأثیر بر روی سرکوب کننده‌های تومور که نقش مهمی در تنظیم زمان تقسیم و افزایش تعداد سلول‌ها دارند مستقیماً در تنظیم رشد و تکثیر سلولی تأثیرگذار هستند. اگرچه این ویروس در بسیاری از بانوان به وسیله سیستم ایمنی بدن حذف می‌شود، اما در برخی از افراد منجر به سرطان دهانه رحم می‌شود (۸). همچنین microRNAs در تنظیم فرایندهای سلولی نظیر تکثیر، تمایز و مرگ سلولی نقش دارند و به عنوان تنظیم کننده‌های بعد از رونویسی در بیان ژن عمل می‌کنند و در کنار متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون‌ها، به عنوان مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی معرفی

می‌شوند. تغییر در بیان microRNAs می‌تواند بر روی فرآیندهای زیستی مهم از جمله تکثیر تمایز و آپاپتوز نقش موثری داشته باشد (۹). این microRNAs بالغ، از طریق جفت شدن با 3' UTR مولکول mRNAs هدف، باعث تجزیه یا مهار ترجمه شده و نقش تنظیمی خود را اعمال می‌نمایند. اعضای خانواده miR-129 در انواع مختلف سرطان‌های انسانی به عنوان یک سرکوبگر تومور عمل می‌نماید و یک متوقف کننده تکثیر سلولی و مهارکننده تهاجم سلولی است که نقش مهمی در عدم گسترش و پیشرفت سرطان بازی می‌کند (۱۰). جایگاه ژنی miR129-2 بر روی کروموزوم 11P11.2 بوده و در توقف چرخه سلولی نقش دارد (۱۱).

هدف از این مطالعه، بررسی بیان miR129-2 در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم آلوده به HPV و همچنین بیماران فاقد عفونت و مقایسه بیان آن در افراد سالم بود.

روش بررسی

در این مطالعه نیمه تجربی، جهت بررسی بیان microRNA 129-2 در بافت دهانه رحم، مجموعاً ۱۷۶ نمونه بافت پارافینه جمع‌آوری گردید. ولی از آنجایی که معیار ورود به مطالعه انتخاب نمونه‌ها در مرحله CINIII و IC (Cervical intraepithelial Neoplasia) یا نئوپلازی داخل اپی تلیومی دهانه رحم بودند، نمونه‌های پارافینه بیماران به وسیله پاتولوژیست مربوطه بررسی و بعد از تعیین درجه و مرحله

بیماری انتخاب گردید. بنابراین، پس از مطالعه دقیق پرونده بیماران مراجعه کننده به بیمارستان، پرونده‌هایی که نتایج آزمایش پاتولوژی آنها CIII و IC گزارش شده بود جهت ورود به مطالعه انتخاب شد. از طرفی نمونه‌های سرطانی آلوده به عفونت HPV در گروه اول و نمونه‌های فاقد آلودگی در گروه دوم بیماران قرار گرفتند و بقیه نمونه‌ها از مطالعه خارج گردید. بدین ترتیب، ۲۰ نمونه سرطانی آلوده به HPV، ۲۰ نمونه مبتلا به سرطان دهانه رحم بدون عفونت به این ویروس و ۲۰ نمونه پاپ اسمیر از زنان سالم مراجعه کننده به بیمارستان میرزا کوچک خان جنگلی، تهران در سال ۱۳۹۴ بعد از اخذ رضایت‌نامه کتبی آگاهانه از بیماران و افراد سالم، طبق رهنمود اخلاقی نمونه‌گیری انجام شد. افراد شرکت کننده از لحاظ سنی همسان شده و هر دو گروه در رنج سنی بین ۲۱ تا ۴۶ سال قرار داشتند. در پژوهش حاضر مقادیر متغیرهای کمی به صورت خطای معیار \pm میانگین و مقادیر متغیرهای کیفی به صورت درصد فراوانی نشان داده شد. از آمار توصیفی برای تهیه جداول، رسم نمودارها و محاسبه شاخص‌های آماری استفاده شد. به منظور مقایسه میانگین بیان ژن miR129-2 بین گروه‌های مورد مطالعه، از آزمون تی نمونه‌های مستقل استفاده گردید. داده‌ها به وسیله نرم‌افزار Graphpad Prism مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقادیر ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

با دقت ۲۰:۱ و در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد.

DNA ژنومی استخراج شده هر دو گروه از نظر ابتلا به HPV16 و HPV18 با استفاده از کیت DNA PCR Amplification Kit HPV (HPV DNA Technology) بررسی شد و در هر آزمایش از نمونه های کنترل مثبت و منفی نیز استفاده شد. میکروتیوپ های تهیه شده به وسیله شرکت DNA Technology حاوی پرایمر اختصاصی HPV16 و HPV18 استفاده گردید. برنامه زمانی شامل ۵ دقیقه دناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ چرخه سه مرحله ای (دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد و گسترش یافتن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد هر یک به مدت ۴۵ ثانیه) و دمای نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. جهت تشخیص، پس از انجام مراحل PCR، میکروتیوپ را داخل دستگاه Flash PCR Gene detector شرکت DNA Technology قرار داده شد تا با استفاده از نور فلورسنت، HPV 16 و 18 در نرم افزار Gene V4 گزارش شود.

بعد از پارافین زدایی، استخراج RNA به وسیله ترایزول صورت گرفت. برای این منظور، ابتدا برش های نازک از بلوک های بافت پارافینه را در یک میکروتیوپ استریل قرار داده و به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر زایلن یا گزلیول به نمونه اضافه کرده، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس میکروتیوپ ها به مدت ۵ دقیقه در

به منظور استخراج DNA از بافت پارافین زدایی شده، از کیت High-pure PCR template preparation kit for Genomic DNA Roche استفاده شد. برای این منظور، 60 میکرولیتر پروتئیناز K و ۱ سی سی از بافر لیز کننده بافت به هر میکروتیوپ اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و دوباره مراحل تکرار شد، با این تفاوت که به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. به میزان ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به محلول اضافه شد. سپس محلول ها به ستون های فیلتر دار اضافه شده و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ستون ها دور ریخته شد و فیلتر به ستون جدید منتقل گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر Washing buffer به آن اضافه شد. نمونه ها به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد، ستون ها دور ریخته شد و فیلتر به ستون جدید منتقل شد. مجدداً به میزان ۴۰۰ میکرولیتر Washing buffer اضافه شد و مجدداً در همان شرایط سانتریفوژ صورت گرفت. این مرحله ۳ بار تکرار گردید. سپس ستون ها دور ریخته شده و فیلتر به ستون جدید انتقال داده شد و به میزان ۶۰ میکرولیتر Elution Buffer به آن اضافه شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شدند. فیلترها دور ریخته شد. سپس با اندازه گیری نسبت جذب نوری محلول با دستگاه اسپکتوفتومتر Deno vix، میزان خلوص DNA

۷۰ درجه سانتی‌گراد برای غیرفعال کردن آنزیم انجام شد. در انتهای این مرحله کل cDNA تک رشته‌ای حاصل شد و با خاصیت RNase موجود در آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، RNA حذف شد.

پس از تهیه cDNA، میزان بیان miR129-2 در هر دو گروه مورد و شاهد، ژن گلیسر آلدهید فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن مرجع مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهای اختصاصی برای GAPDH و miR129-2 در جدول ۱ آورده شده است.

بیان ژن توسط Real-Time PCR

(ABI StepOne, USA) صورت گرفت. دمای اتصال برای GAPDH و miR129-2 به ترتیب ۵۸ و ۶۷ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. اختصاصیت پرایمر و عدم آلودگی به DNA ژنومی به وسیله پیک منحنی ذوب اختصاصی (۹۱ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای GAPDH و miR129-2) مشخص گردید. جهت انجام واکنش Real-Time PCR ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس SYBER™ (2X)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر جلویی، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر عقبی، ۲ میکرولیتر cDNA سنتز شده و ۷ میکرولیتر dH2O ترکیب و در دستگاه قرار داده شد. سیکل دمایی به کار رفته عبارت بود از یک مرحله واسرشت اولیه در دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت فعال‌سازی آغازی آنزیم پلیمران، در ادامه ۴۰ سیکل هر یک شامل دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه. واکنش‌ها به صورت سه تایی به همراه یک واکنش بدون الگو برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد.

میکروفیوژ با دور ۲۸۰۰ اسپین (Spin) نموده و سپس مایع رویی با سمپلر خارج گردید. این مرحله ۳ بار تکرار گردید. سپس مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد به میکروتیوب اضافه و چند بار میکروتیوب را وارونه نموده و به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس میکروتیوب‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶ درجه با دور ۱۳۰۰۰ دقیقه سانتی‌فیوژ شده تا اگر پارافین در بافت باقی مانده باشد مشاهده گردد و با تکرار دوباره این مرحله پارافین به طور کامل از داخل بافت خارج شود. مایع رویی حاوی اتانول و زایلین را دور ریخته و مرحله اضافه نمودن اتانول مطلق سرد را مجدداً تکرار کرده تا اینکه زایلین به طور کامل از بافت جدا شد. بعد از خارج کردن اتانول، چند دقیقه درب میکروتیوب‌ها را باز گذاشته تا الکل از لوله‌ها خارج شود. سپس به منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و طبق مواد زیر که شامل ۱ میکرولیتر ۱۰X Random Hexamer، ۱ میکرولیتر پرایمر Oligi، ۱،۱۰X dT، ۱ میکرولیتر ۱۰ mM dNTP، ۵ میکرولیتر RNA، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MMuLV، ۲،۱۰X DEPC میکرولیتر MMuLV Buffer، ۹/۵ میکرولیتر به هر میکروتیوب اضافه شد. کل واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA و سپس ۱۰ دقیقه در دمای

به منظور بررسی میزان بیان miR129-2 از مقایسه میانگین Ct (چرخه آستانه) در سه بار تکرار استفاده شد. مقایسه میزان بیان در دو گروه مورد و شاهد بر مبنای آزمون آماری تی تست برای دو گروه مستقل و با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد که در آن مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

افراد شرکت کننده در مطالعه در رنج سنی ۲۱ تا ۴۶ سال با میانگین سنی ۲۵/۱ سال قرار داشتند. بیشترین تعداد مبتلایان کوچکتر از ۳۵ سال بودند. افراد شرکت کننده سابقه مصرف قرص‌های ضد بارداری (بیش از ۵ سال)، سیگار و هیچ بیماری سیستم ایمنی نداشتند. بیشترین تعداد بیماران بیش از ۲ فرزند داشتند. همچنین بیشترین تعداد بیماران در Stage IC بیماری قرار داشتند. ارتباط معنی‌داری بین هیچ یک از متغیرها مشاهده نشد. اطلاعات دموگرافیک شرکت کنندگان در جدول ۲ و منحنی‌های تکثیر و ذوب به ترتیب در نمودارهای ۱ و ۲ قابل مشاهده می‌باشند.

این بررسی به طور کلی و بدون در نظر گرفتن شرایط سنی و مرحله بیماری در نظر گرفته شده است. مقادیر میانگین بیان miR129-2 در زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم آلوده به HPV، بیماران فاقد آلودگی به HPV و گروه کنترل به صورت گرافیکی در نمودار ۳ قابل مشاهده است. مقادیر میانگین و خطای معیار میزان بیان miR 129-2 نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان miR 129-2 در بیماران آلوده نسبت به گروه کنترل وجود دارد (p=۰/۰۰۰۴). همچنین کاهش بیان قابل ملاحظه ای در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم آلوده به HPV نسبت به بیماران فاقد آلودگی وجود دارد (p=۰/۰۰۰۱). اگرچه این کاهش بیان بین بیماران فاقد آلودگی با پاپیلوما ویروس و گروه کنترل مشاهده شده است، ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (p=۰/۰۸۳).

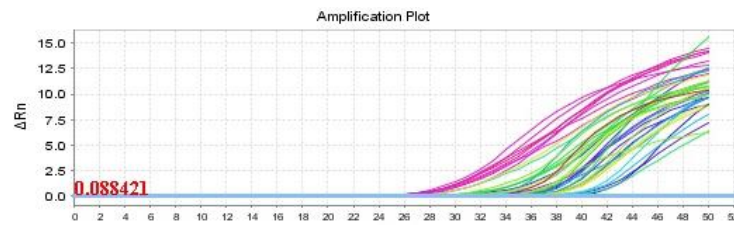
نتایج نشان داد که ارتباط مثبتی بین کاهش بیان miR-129-2 بر حسب مرحله بیماری در مبتلایان به سرطان دهانه رحم وجود ندارد (p=۰/۳۹۲) (نمودار ۴).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای اختصاصی microRNA 129-2 و ژن مرجع مورد استفاده در افراد مورد مطالعه (۱۲)

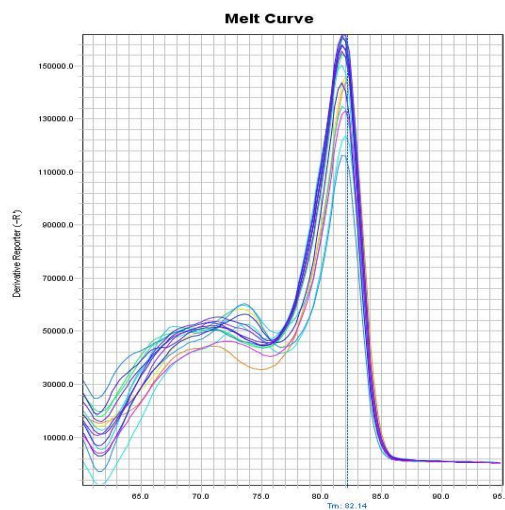
نام پرایمر	توالی نوکلئیدی 5'→3'	(سانتیگراد) دمای ذوب
miR129-2-F	GTGAAGCCCTTACCCCAA	51.09
miR129-2-R	GTGCAGGTCCGAGGT	51.06
GAPDH-F	ATGGAGAAGGCTGGGGCT	62.05
GAPDH-R	ATCTTGAGGCTGTTGTCATACTTCTC	61.62

جدول ۲: اطلاعات دموگرافیک بیماران و افراد سالم

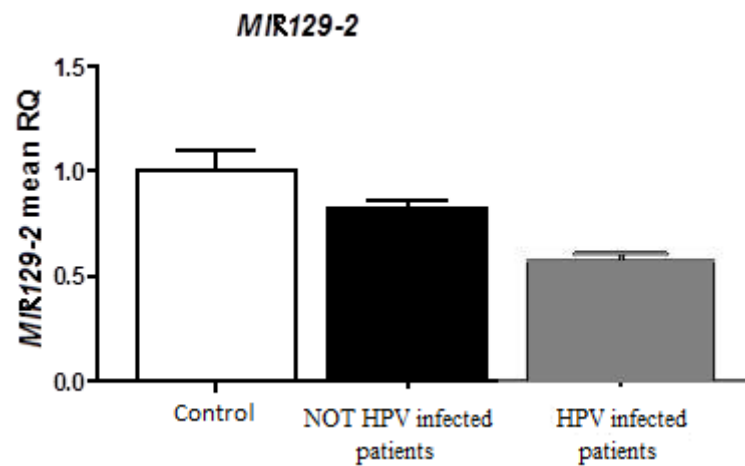
متغیرها	بیماران فاقد آلودگی (درصد)	بیماران آلوده (درصد)	افراد سالم (درصد)	سطح معنی داری
سن				
< ۳۵	۷ (۳۵)	۱۲ (۶۰)	۱۰ (۲۵)	۰/۹۰۳
۳۵ ≤	۱۳ (۶۵)	۸ (۴۰)	۱۰ (۲۵)	
وضعیت تأهل				
متاهل	۱۶ (۸۰)	۱۸ (۹۰)	۱۶ (۴۰)	۰/۲۰۵
مجرد	۴ (۲۰)	۲ (۱۰)	۴ (۱۰)	
تعداد فرزندان				
≤ ۱	۱۱ (۶۹)	۷ (۳۵)	۱۰ (۲۵)	۰/۵۳۷
≥ ۲	۵ (۳۱)	۱۳ (۶۵)	۱۰ (۲۵)	
مرحله بیماری				
IC	۱۴ (۷۰)	۱۶ (۸۰)	-	۰/۳۹۲
CIII	۶ (۳۰)	۴ (۲۰)	-	



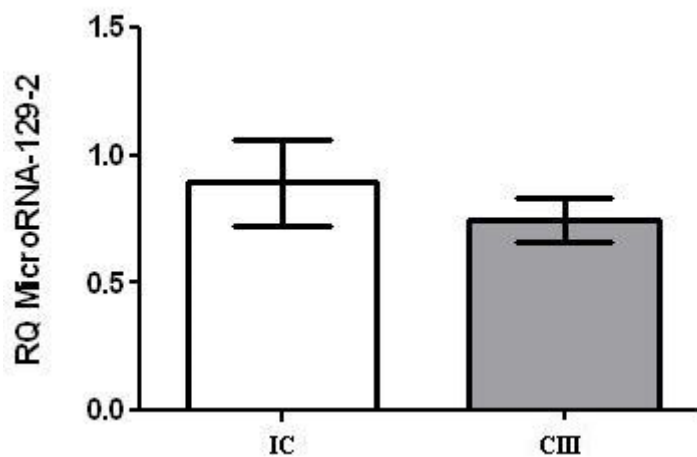
نمودار ۱: منحنی تکثیر miR129-2



نمودار ۲: منحنی ذوب miR129-2



نمودار ۳: مقایسه میانگین بیان miR 129-2 بین بیماران و کنترل



نمودار ۴: مقایسه میانگین بیان miR 129-2 بر حسب مرحله بیماری

بحث

میزبان افزایش می‌دهد. پروتئین‌های ویروسی با ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین‌های سلولی، باعث تکثیر غیرطبیعی سلول‌ها می‌شوند (۱۳). نتایج تحقیق‌های اخیر حاکی از آن است که پتانسیل سرطان زایی

واکنش‌های مهمی بین ویروس پاپیلومای انسانی و فاکتورهای ژنتیکی بدن میزبان به وجود می‌آید که احتمال ابتلا به سرطان دهانه رحم را در

129 به عنوان یک سرکوبگر تومور عمل می‌نماید و کاهش بیان آن می‌تواند در تومورزایی سلول نقش مهمی داشته باشد. نتایج حاصله از مطالعه حاضر نشان داد که ۶۷ درصد از نمونه‌های سرطان دهانه رحم، آلوده به HPV تیپ ۱۶ بودند که نشان دهنده فراوانی بالای این نوع ویروس در جمعیت بیماران مورد مطالعه می‌باشد و با نتایج حاصله از دو مطالعه‌ای که به طور جداگانه به وسیله هوی و تواری صورت گرفته همراستا می‌باشد (به ترتیب ۳۸/۵ و ۴۵/۸ درصد) (۱۶ و ۱۷). از طرفی مطابق با سایر مطالعات انجام گرفته در این مطالعه نیز، ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان microRNA129-2 در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. این کاهش بیان در بین هر دو گروه بیماران آلوده به عفونت HPV و همچنین گروه فاقد آلودگی نسبت به گروه سالم به چشم می‌خورد. در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به گلیوما صورت گرفت نیز کاهش بیان microRNA129-2 در بافت‌های توموری مشاهده شده است. در این تحقیق گزارش شد که با افزایش بیان microRNA129-2 در سلول‌های سرطانی، می‌توان تکثیر و تهاجم سلولی در این سلول‌ها را مهار نمود (۱۸). همچنین در مطالعه شادان بر روی سرطان پانکراس، در بسیاری از نمونه‌ها کاهش بیان microRNA129-2 به وضوح مشاهده شده است (۱۹). در مطالعه اخیر که به وسیله گودبول و همکاران بر روی بیماران مبتلا به سرطان سینه صورت گرفت مشخص شد که miR-129-2 با اتصال به

ژنوتیپ‌های پرخطر HPV به بیان ژن‌های E6 و E7 بستگی دارد (۷). این دو ژن در مسیر چرخه سلولی تداخل ایجاد کرده و اختلال در نظم این مسیر منجر به تجمع آسیب به DNA، مانع از آپوپتوز و در نتیجه پیشرفت سلول به سمت سرطانی شدن می‌گردد. به نظر می‌رسد که بر هم زدن تنظیم میتوز وابسته به E6 و E7 باشد و در این میان نقش E7 از E6 مهم‌تر است (۱۴). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که پروتئین‌های E6 و E7 تیپ HPV16، موجب تغییراتی در DNA سلول عفونی می‌شوند، تغییراتی که در روند رونویسی به وسیله انکو پروتئین‌های HPV صورت می‌گیرد، باعث اتصال E7 به RB و آزاد شدن E2F و در نتیجه ادامه رونویسی و سنتز پروتئین سلولی می‌شود. از طرفی اتصال E6 ویروس HPV به P53، موجب مهار کنترل تکثیر سلولی می‌گردد. طبق نتایج حاصله علاوه بر ویروس‌ها، عوامل اپی ژنتیکی نیز در اتیولوژی سرطان دهانه رحم دخیل هستند. طبق بررسی‌های اخیر، مسیرهای مهمی برای تنظیم بیان ژن شناسایی شده اند که با واسطه microRNAs صورت می‌گیرند. این مولکول‌ها می‌توانند به عنوان انکوژن و یا سرکوبگر تومور عمل کرده و در رشد، مرگ برنامه‌ریزی شده، تمایز و تکثیر سلولی مؤثر باشند (۹). بسیاری از microRNAs در نمونه سرطانی به صورت غیرطبیعی بیان می‌شود. تغییرات زیادی در سلول‌های سرطانی رخ می‌دهد که می‌توانند در یک مسیر مستقیم یا غیر مستقیم، بیان microRNAs را تحت تأثیر قرار دهند (۱۵). تحقیق‌ها نشان می‌دهند که miR-

شد که این امر ناشی از متیلاسیون microRNA در نتیجه آلودگی این سلول‌ها به HPV16 بوده است (۲۲). تحقیق بر روی سرطان کولورکتال و آندومتر نیز نشان داد که افزایش متیلاسیون microRNA129-2 و در نتیجه کاهش بیان آن، منجر به سرطانی سلول‌ها شده است (۲۳). در مطالعه دیگری مشاهده شد که خاموش‌سازی E6 و E7 در افراد دارای عفونت HPV16، بیان برخی از microRNAs را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۴). تحقیق دیگری نشان داد که ابتلا به انواع پرخطر HPV در سرطان دهانه رحم، میزان متیلاسیون microRNA129-2 را افزایش می‌دهد که حاصل آن کاهش بیان این مولکول بوده است. حتی در ضایعات پیش سرطانی نیز افزایش متیلاسیون این microRNA مشاهده شده است (۲۵). متیلاسیون DNA بر نقش تنظیمی microRNAs تأثیر گذاشته و بر گسترش، پیشرفت و پیش‌آگهی سرطان مؤثر است. جزایر CPG در پروموتور در 5' UTR مولکول miR129-2 وجود دارد. متیلاسیون DNA در ناحیه مربوط به miR-129 و کاهش بیان آن در سلول‌های سرطانی نسبت به سایر سلول‌ها در سرطان رحم، معده، کلورکتال، کبد و لوکمی مشاهده شده است (۲۹-۲۶). همچنین نتایج حاصله از تحقیقات دیگر حاکی از آن است که میزان بیان microRNA129-2 در سلول‌های HCC به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است (۳۰). در مجموع شواهد حاکی از حضور HPVس تیپ پرخطر در بسیاری از انواع سرطان‌های انسانی می‌باشد که باعث ایجاد و گسترش سرطان‌ها می‌شود. در هر حال

3'UTR ژن پروژسترون باعث کاهش بیان این هورمون شده است. در نتیجه درمان هورمونی که با حضور بالای میزان پروژسترون تحت تأثیر قرار می‌گرفت با وجود miR-129-2 موفقیت‌آمیز گزارش گردید (۲۰). تحقیقی که به وسیله پرونینا و همکاران صورت گرفت نیز نشان داد که رابطه متقابلی بین کاهش بیان miR-129-2 و گسترش سلول‌های سرطانی کلیوی وجود دارد. در این تحقیق با متیلاسیون پروموتور microRNA129-2 باعث غیرفعال شدن آن شده و در نتیجه با افزایش بیان ژن‌های هدف، روند گسترش سلول‌های سرطانی صورت گرفته است (۲۱). با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که microRNA129-2 نقش‌های مهمی در تنظیم بیان ژن‌های هدف و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به انواع سرطان‌ها بازی می‌کند. از طرفی، تغییرات زیادی در سلول‌های سرطانی رخ می‌دهد که می‌توانند در یک مسیر مستقیم یا غیر مستقیم، بیان microRNA را تحت تأثیر قرار دهند. ناهنجاری ژن‌های microRNAs یا پروتئین‌های درگیر در ساخت آنها، اختلال در تنظیم اپی‌ژنتیک microRNAs و موتاسیون‌های ژنی، نمونه‌هایی از این دسته تغییرات هستند. علاوه بر این، تحت تأثیر موتاسیون، ویژگی‌های اتصال microRNAs و mRNAs تغییر یافته و این برهم‌کنش‌های تغییر یافته microRNA:mRNA منجر به ناقص شدن فرایندهای ترجمه‌ای می‌شود (۱۵). در تحقیقی که صورت گرفت، افزایش متیلاسیون microRNA129-2 و به دنبال آن کاهش بیان آن باعث افزایش خطر ابتلا افراد به سرطان معده

نقش اصلی این ویروس و به طور اختصاصی نقش انکوپروتئین‌های ویروسی ایجاد کننده این سرطان‌ها نیاز به تحقیقات گسترده‌ای دارد. بنابراین مطالعات سلولی و مولکولی بیشتری نیاز است تا ارتباط این انکوپروتئین‌ها، مخصوصاً E5 و E6 در اپیتلیال نرمال و سلول‌های سرطانی آشکار گردد(۳۱). امروزه مشخص شده که روش‌های درمانی رایج در سرطان (جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی) بازده و اثربخشی کمی داشته و در دهه‌های اخیر مطالعه‌های زیادی در استفاده از داروهای گیاهی و ژن درمانی که اثرات جانبی کمتری داشته باشند انجام شده که نتایج امید بخشی نشان داده‌اند(۳۲). اخیراً در درمان سرطان‌ها از microRNAs به تنهایی یا همراه با داروها، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی استفاده شده است (۳۳). یک microRNA می‌تواند صدها هدف ژنی داشته باشد و معمولاً اهداف یک microRNA مربوط به mRNAs با کارکردهای مشابه است. این نتایج حاصل اولین تحقیقی است که به بررسی تأثیر بیان miR129-2 بر روی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم پرداخته است و از آنجایی که این مولکول همانند سایر microRNAs در اکثر مایعات بدن یافت می‌شود، می‌توان از تغییر بیان آن در پیش‌آگهی و یا تشخیص سرطان و در مراحل پیشرفته‌تر، در درمان انواع سرطان‌ها بهره برد. یکی از محدودیت‌های این تحقیق، حجم کم نمونه‌ها می‌باشد که در مطالعه‌های بعدی بررسی بیان microRNA129-2 در دیگر انواع سرطان‌ها و همچنین

بررسی بیان ژن‌ها و microRNAs دیگر با استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی microRNAs می‌توانند ابزار مهمی در تشخیص زود هنگام بیماری و پیش‌آگهی آن و همچنین اهداف مهمی در جهت طراحی و گسترش درمان‌های جدید باشند. غربالگری در سرطان گردن رحم برای یافتن ژن‌ها و پروتئین‌هایی که به عنوان مارکرهای بیولوژیکی معرفی شده‌اند و نقش مهمی در شناسایی مکانیسم مولکولی تومور نیز بازی می‌کنند، در حال پیشرفت است. می‌توان از microRNAs به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص، پیش‌بینی و حتی درمان استفاده کرد و بررسی بیان microRNA129-2 می‌تواند کلید تشخیص پاسخ‌های سلولی به داروهای ضد سرطانی باشد.

تقدیر و تشکر

از پرسنل محترم بیمارستان میرزا کوچک خان جنگلی که در جمع‌آوری نمونه‌ها ما را یاری دادند و همچنین بخش پاتولوژی که در تشخیص مرحله هر نمونه همکاری نمودند کمال امتنان و تشکر را داریم.

REFERENCES

1. Jemal A, Bray F, Melissa M, Ferlay J, Ward W, Forman D. Global cancer statistics 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinician* 2011; 61(2): 69-90.
2. Karimi Zarchi M, Akhavan A, Fallahzadeh H, Gholami H, Dehghani A, Teimoori S. Outcome of cervical cancer in Iranian patients according to tumor histology, stage of disease and therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2010; 11(5): 1289-91.
3. Behtash N, Mehrdad N. Cervical cancer: screening and prevention. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2006; 7: 83-6.
4. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254(5035): 1167-73.
5. Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; 24(3): 52-61.
6. Bosch FX, Munoz N, Desanjose S, Navarro C, Moreo P, Ascunce N, et al. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention* 1993; 2(5): 415-22.
7. Vousden KH. Interactions between papillomavirus proteins and tumor suppressor gene products. *Advances in Cancer Research* 1994; 64: 1-24.
8. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 MicroRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research* 2004; 64: 3753-56.
9. Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK. A role for MicroRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes and Development* 2007; 21: 3238-43.
10. Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, et al. MiR-21 is an EGFR-regulated antiapoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106: 12085-90.
11. Xiao Y, Li X, Wang H, Wen R, He J, Tang J. Epigenetic regulation of miR129-2 and its effects on the proliferation and invasion in lung cancer cells. *Journal of Cell Molecular Medicine* 2015; 19(9): 2172-80.
12. Hossein Yazdi A, Moslemi E, Mahmoudi Lamouki R, Taghavi A, Izadi A. Ubiquitin D gene expression in types of leukemia. *Research in Medicine* 2017; 41(1): 45-9.
13. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular Cell* 2010; 38(3): 323-32.
14. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 2013; 49(6): 1374-403.
15. Krok JL, Oliveri JM, Young GS, Katz ML, Tatum CM, Paskett ED. Evaluating the Stage of Change Model to a Cervical Cancer Screening Intervention Among Ohio Appalachian Women. *Women Health* 2016; 56(4): 468-86.
16. Hooi DJ, Lissenberg-Witte BI, de Koning MNC, Pinedo HM, Kenter GG, Meijer CJLM, et al. High prevalence of high-risk HPV genotypes other than 16 and 18 in cervical cancers of Curaçao: implications for choice of prophylactic HPV vaccine. *Transm Infect* 2017. pii: sextrans-2017-053109.
17. Tewari D, Novak-Weekley S, Hong C, Aslam S, Behrens CM. Performance of the cobas HPV test for the triage of atypical squamous cells of undetermined significance cytology in cervical specimens collected in surepath. *American Journal of Clinical Pathology* 2017; 148(5): 450-7.
18. Yu Y, Jun Q, Xi Z, Liang-Fang S. MiR129-2 functions as a tumor suppressor in glioma cells by targeting HMGB1 and is down-regulated by DNA methylation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2015; 404(1-2): 229-39.
19. Shadan A, Hala D, Randall EB, Fazlul H. Differential expression of micrnas in tissues and plasma co-exists as a biomarker for pancreatic cancer. *Cancer Science and Therapy* 2015; 7(11): 336-46.
20. Godbole M, Chandrani P, Gardi N, Dhamne H, Patel K, Yadav N, et al, miR-129-2 mediates down-regulation of progesterone receptor in response to progesterone in breast cancer cells. *Cancer Biology and Therapy* 2017; 6: 1-5.
21. Pronina IV, Klimov EA, Burdenny AM, Beresneva EV, Fridman MV, Ermilova VD, et al. Methylation of the genes for the microRNAs miR-129-2 and miR-9-1, changes in their expression,

- and activation of their potential target genes in clear cell renal cell carcinoma. [Article in Russian]. *Mol Biol (Mosk)* 2017; 51(1): 73-84
22. Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH, et al. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *International Journal of Cancer* 2011; 129: 2600-10.
23. Kaur S, Lotsari JE, Al-Sohaily S, Warusavitarne J, Kohonen-Corish MR, Peltomäki P. Identification of subgroup-specific MicroRNA patterns by epigenetic profiling of sporadic and Lynch syndrome-associated colorectal and endometrial carcinoma. *Clinical Epigenetics* 2015; 7(1): 20.
24. Jiménez-Wences H, Martínez-Carrillo DN, Peralta-Zaragoza O, Campos-Viguri GE, Hernández-Sotelo D, Jiménez-López MA, et al. Methylation and expression of miRNAs in precancerous lesions and cervical cancer with HPV16 infection. *Oncology Reports* 2016; 35(4): 2297-305.
25. Wilting SM, Miok V, Jaspers A, Boon D, Sorgard H, Lando M, et al. Aberrant methylation-mediated silencing of MicroRNAs contributes to HPV-induced anchorage independence. *Oncotarget* 2016; 7(28): 43805-19.
26. Huang YW, Liu JC, Deatherage DE, Luo J, Mutch DG, Goodfellow PJ, et al. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer Research* 2009; 69: 9038-46.
27. Shen R, Pan S, Qi S, Lin X, Chenq S. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 in gastric cancer. *Biochemical Biophysical Research Communication* 2010; 394(4):1047-52.
28. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, et al. MicroRNA profiling in human medulla blastoma. *Cancer* 2009; 124: 568-77.
29. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, et al. MicroRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *International Journal of Oncology* 2009; 34: 537-42.
30. Liu Z, Dou C, Yao B, Xu M, Ding L, Wang Y, et al. Methylation-mediated repression of microRNA-129-2 suppresses cell aggressiveness by inhibiting high mobility group box 1 in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016; 14; 7(24): 36909-23.
31. Ranieri D, Belleudi F, Magenta A, Torrisi MR. HPV16 E5 expression induces switching from FGFR2b to FGFR2c and epithelial-mesenchymal transition. *International Journal of Cancer* 2015; 137(1): 61-72.
32. Mokhtari MJ, Motamed N, Shokrgozar MA. Evaluation of silibinin on the viability, migration and adhesion of the human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. *Cell Biology International* 2008; 32: 888-92.
33. Carlos C, James DB. Sizing up MicroRNAs as cancer genes. *Nature* 2005; 11: 712-4.

Relationship Between MicroRNA129-2 Expression and Cervical Cancer in Patients Infected with HPV

Nazeri Givi Zh¹, Onsory Kh^{1*}, Moslemi E²

¹Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran, ²Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 12 May 2017 Accepted: 7 Jan 2017

Abstract

Background and Aim: Cervical cancer is the fourth most common cancer that is the first cause of mortality among women in the world and the seventh rank among all cancers. One of the risk factors for cervical cancer is infection with the *papilloma virus*. On the other hand, microRNAs have been suggested as new markers for cervical cancer diagnosis. Meanwhile, microRNA129-2 is a cellular proliferation inhibitor and an invertebrate cellular agent. The aim of this study was to evaluate the expression of microRNA129-2 in women with *papilloma virus* infected cervical cancer and compare it with women with cervical cancer without infection with *papilloma virus* and healthy group.

Methods: In this semi-experimental study, 20 paraffin tissue samples from women with *papilloma virus* infected cervical cancer, 20 samples of paraffin tissue from women with cervical cancer without infection of the *papilloma virus* and 20 samples of normal pap smear from Mirzakocheh Khan Hospital The forest was collected in Tehran in 1394. After de-paraffinization, extraction of RNA was performed and expression of miR129-2 was investigated using Real Time PCR method among the groups. Data was analyzed using Grafpad prism6 software.

Results: According to the results a significant decrease was seen in the expression of this gene in infected patients compared to control group ($p = 0.0004$). Also, expression of miR129-2 in infected tissues of *papilloma viruses* was reduced in comparison with non-contaminated cancerous tissues ($p = 0.0001$). Although this decrease in expression was observed between the patients without infection with the *papilloma virus* and the control group, it was not statistically significant ($p = 0.083$). There was no significant relationship between expression of miR129-2 with age ($p = 0.99$) and grade of disease ($p = 0.39$).

Conclusion: Considering the reduced expression of miR129-2 in cancerous samples, the expression of miR129-2 expression can be considered as a valuable initial diagnostic agent and it plays an important role in determining the prognosis of cervical cancer.

Key words: Cervical cancer, Human *papilloma virus*, miR129-2 expression

*Corresponding Author: Onsory Kh, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
Email: onsory@gmail.com

Please cite this article as follows:

Nazeri Givi Zh, Onsory Kh, Moslemi E. Relationship Between MicroRNA129-2 Expression and Cervical Cancer in Patients Infected with HPV. Armaghane-danesh 2018; 22 (6): 725-738.