

## بررسی RNA بلند غیر کدکننده NORAD در بافت تومور پستان زنان ایرانی

غزل اورک<sup>۱</sup>، مریم چراغ‌زاده<sup>۲</sup>، فاطمه مقصودی<sup>۳</sup>، فرشته عاملی<sup>۴</sup>، مریم عادل‌پور<sup>۵</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** سرطان پستان، عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. شناسایی نشانگرهای مولکولی جدیدی که در توسعه‌ی تومور نقش دارند، امکان تشخیص سرطان، درمان هدفمند و نظارت بر پاسخ به درمان سرطان را فراهم می‌کند. RNAهای طولانی غیر کدکننده (lncRNAs) در تنظیم فرایندهای سلولی مختلف، از جمله رونویسی و بازسازی کروموزوم نقش دارند. این مطالعه با هدف بررسی بیان و اهمیت RNA طولانی غیر کدکننده NORAD (lncRNA-NORAD) در سرطان پستان انجام شد.

**روش‌ها:** نمونه‌های سرطان پستان از بانک تومور ملی ایران تهیه شدند. RNA کل از هر نمونه استخراج و سپس با DNase تیمار شد. Q-PCR برای تشخیص بیان mRNA lncRNA-NORAD در بافت‌های بیماران مبتلا به سرطان پستان و بافت‌های غیرسرطانی مجاور به عنوان شاهد استفاده گردید.

**یافته‌ها:** تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time PCR نشان داد که بیان ژن NORAD در بافت تومور پستان به طور قابل توجهی نسبت به بافت غیرسرطانی مجاور افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** از آنجایی که بیان ژن lncRNA-NORAD در بافت‌های تومور پستان نسبت به بافت طبیعی مجاور تومور افزایش یافته است، این ژن می‌تواند بیومارکر مناسبی برای تشخیص سرطان پستان در نظر گرفته شود.

**واژگان کلیدی:** بیومارکرها؛ نوپلاسم‌های پستان؛ RNA بلند غیر کدکننده؛ بیان ژن؛ NORAD

**ارجاع:** اورک غزل، چراغ‌زاده مریم، مقصودی فاطمه، عاملی فرشته، عادل‌پور مریم. بررسی RNA بلند غیر کدکننده NORAD در بافت تومور پستان

زنان ایرانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۷۷): ۴۶۷-۴۷۳

## مقدمه

در حال حاضر سرطان پستان زنان از سرطان ریه پیشی گرفته است و علت اصلی بروز سرطان در جهان در سال ۲۰۲۰، با ۲/۳ میلیون مورد جدید تخمین زد شده، که ۱۱/۷ درصد از کل موارد سرطان را شامل می‌شود (۱). پنجمین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان پستان در سراسر جهان، با ۶۸۵۰۰۰ مرگ می‌باشد (۱).

سرطان پستان بر اساس الگوی بیان ملکول‌ها به چهار دسته تقسیم می‌شوند. دسته اول: لومینال A می‌باشد که از نظر فنوتیپ ایمونوهیستوشیمی بیان گیرنده‌ی استروژن آن (Estrogen receptor)

ER مثبت و بیان گیرنده‌ی پروژسترون (Progesterone receptor) PR بیشتر از ۲۰ درصد، بیان HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) منفی و دارای بیان پایین Ki67 می‌باشد (۲). این تومورها بهترین پیش‌آگهی را دارند و به طور کلی به درمان هورمونی پاسخ خوبی می‌دهند (۳). دسته‌ی دوم: لومینال B است که ER مثبت،  $PR < 20\%$ ، HER-2 مثبت و Ki67 بالا می‌باشد (۲). دسته‌ی سوم بیان بیش از حد HER-2 (HER-2 overexpression) می‌باشد که ER منفی، PR منفی و HER-2 مثبت می‌باشد (۲). این تومورها به شیمی‌درمانی و درمان غدد درون‌ریز پاسخ ضعیفی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- کارشناس ارشد آمار زیستی، گروه بهداشت عمومی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

۴- استادیار، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مریم عادل‌پور؛ استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

Email: adelipour-m@ajums.ac.ir

غیرطبیعی lncRNAها به طور قابل توجهی به شروع و پیشرفت سرطان در سرطان پستان کمک می‌کند (۱۲). lncRNA با تنظیم مهاجم و مهاجرت سلول‌ها، روی متاستاز سرطان پستان اثر می‌گذارد (۱۳). این موضوع، آن‌ها را به عنوان بیومارکر برای تشخیص و پیش‌آگهی سرطان مناسب می‌کند (۱۴). درک بیشتر در مورد مکانیسم‌های مولکولی که در سرطان به ویژه در پاتوژنز سرطان پستان دخیل هستند، می‌تواند به ارائه‌ی بسترهای درمانی بهتر کمک کند (۱۵). اخیراً RNAهای غیر کدکننده به دلیل عملکردشان در تنظیم بیان ژن و برهمکنش‌های عملکردی با سایر مولکول‌ها توجه محققان را در زمینه‌ی سرطان به خود جلب کرده‌اند (۱۵).

به عنوان مثال، RNA غیر کدکننده که توسط آسیب DNA فعال می‌شود (NORAD) نقش اساسی در حفاظت از DNA و ثبات کروموزومی دارد (۱۱). اما، مکانیسم مولکولی دقیق هنوز درک نشده است، NORAD در مقایسه با سایر lncRNAها بسیار حفظ شده است و در تعداد قابل توجهی از سلول‌ها به دلیل آسیب DNA به وفور بیان می‌شود (۱۶). lncRNA-NORAD هنگامی که حذف می‌شود، بیانگر بی‌ثباتی کروموزومی و آنیپلوئیدی می‌باشد (۱۶). NORAD ابتدا به عنوان رونوشت کدکننده‌ی اگزون در Chr20q11.23 شناسایی شد (۱۷). NORAD به عنوان یک انکوژن شناخته می‌شود و با پیش‌آگهی ناهمگلوب در سرطان‌های مختلف همراه است (۱۶). lncRNA NORAD در انواع مختلف سرطان‌ها دچار اختلال می‌شود (۱۶). این بیومارکر در فرایندهای متعدد مرتبط با کارسینوم‌ها، مانند تکثیر سلولی، آپوپتوز، مهاجم و متاستاز نقش داشته است (۱۶).

طبق اطلاعات ارائه شده و با توجه به نقش lncRNA NORAD در رشد و بقای تومور و متاستاز آن، بررسی بیشتر بیان این ژن می‌تواند به تعیین نقش دقیق آن در سرطان پستان کمک کند. بنابراین، در این مطالعه به بررسی بیان این ژن در سرطان پستان و ارتباط آن با پارامترهای کلینیکوپاتولوژیک پرداخته می‌شود.

## روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، یک مطالعه بنیادی می‌باشد و در سال ۱۴۰۰ در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز طراحی و انجام شد. در این مطالعه ۴۰ نمونه بافت توموری سرطان پستان و همچنین بافت‌های غیر سرطانی مجاور آن‌ها از بانک تومور انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) تهران، تهیه شدند. نمونه‌ها مربوط به بیمارانی بودند که برای اولین بار سرطان پستان در آن‌ها تشخیص داده شده و جراحی به عنوان اولین اقدام درمانی برای آن‌ها در نظر گرفته شده بود. ابتلا به سایر بیماری‌ها، استفاده از دارو و یا دریافت هر نوع درمانی از جمله معیارهای خروج از مطالعه بودند.

می‌دهند اما کاندید درمان ضد HER-2 هستند (۳). دسته‌ی چهارم، سرطان پستان سه‌گانه‌ی منفی (TNBC) یا Basal-like است که، ER منفی، PR منفی و HER-2 منفی می‌باشد (۲). این دسته معمولاً بدترین پیش‌آگهی را دارند و تحت شیمی‌درمانی سیستمیک قرار می‌گیرند (۳). اما توزیع زیرگروه‌های مختلف مولکولی سرطان پستان شامل زیرگروه لومینال A (۵۸/۵ درصد) شایع‌ترین و پس از آن TNBC (۱۶ درصد)، لومینال B (۱۴ درصد) و HER-2 مثبت (۱۱/۵ درصد) است (۴).

بعضی فاکتورها در رشد بی‌رویه‌ی سلول‌ها دخیل هستند که عبارتند از: الف) انکوژن، ژن‌های تومورسایر سوز و سیکل سلولی؛ سرطان، بیماری تکثیر نامناسب سلولی، به شدت با چرخه‌ی سلولی در ارتباط است. همه‌ی سرطان‌ها از تجمع غیرطبیعی سلول‌های نئوپلاستیک تشکیل شده‌اند که در پاسخ به سیگنال‌های میتوژنیک به سمت تقسیم و تکثیر سلولی کنترل نشده تکثیر می‌شوند (۵). محرک‌های میتوژنیک شامل تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی چرخه‌ی سلولی و سایر ژن‌هایی است که چرخه‌ی سلولی را تنظیم می‌کنند (۵)، این نشان می‌دهد که مسیرهای متعدد و متمایز تغییرات ژنتیکی منجر به ایجاد سرطان می‌شود. محصولات هر دو انکوژن (از جمله کیناز وابسته به سیکلین (CDKs) و سیکلین‌ها) و ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور (از جمله مهارکننده‌های کیناز وابسته به سیکلین) ماشین چرخه‌ی سلولی را تنظیم می‌کنند و به ترتیب پیشرفت چرخه‌ی سلولی را ارتقا یا سرکوب می‌کنند (۵)؛ ب) آنژیوژن یکی دیگر از عواملی است که در رشد، پیشرفت و متاستاز سلول‌های توموری نقش دارد (۶)؛ ج) مسیرهای مرگ سلولی مثل آپوپتوز، از آن‌جایی که آپوپتوز در تعامل بین زایش و مرگ سلول نقش دارد این تعامل در سلول‌های سرطانی از بین می‌رود (۷).

خوشبختانه مرگ و میر سرطان پستان در دهه‌های اخیر به دلیل تشخیص پیشرفته، آگاهی بهبود یافته و درمان‌های کارآمد، کاهش یافته است (۸). بیماران با مراحل اولیه و پیشرفته‌ی سرطان پستان با جراحی همراه با رادیو/ یا شیمی‌درمانی درمان می‌شوند. با این وجود، پاسخ به درمان بیشتر بیماران به برخی از داروهای شیمی‌درمانی به دلیل مقاومت چند دارویی ضعیف است (۹). اهمیت بیومارکرها نه تنها در ارزش پیش‌آگهی آن‌ها و نشان‌دهنده‌ی سیر آینده‌ی بیماری است بلکه در استفاده از آن‌ها برای پیش‌بینی پاسخ بیمار به درمان می‌باشد (۱۰). از این رو، بیومارکرهای جدید به فوریت برای کشف درمان سرطان پستان مورد نیاز است.

lncRNAs، RNAهای غیر کدکننده‌ی پروتئین با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند (۱۱). lncRNAها نقش محوری در انواع مختلف سرطان از جمله سرطان پستان دارند. بیان

گرید پاتولوژیک و استیج بالینی تومورها توسط پاتولوژیست بر اساس پروتکل‌های استاندارد تعیین شده بود. در بررسی پاتولوژی، نمونه‌های سرطان پستان نگهداری شده در فرمالین، پس از قالب‌گیری با پارافین، برش داده شده و با رنگ هماتوکسیلین-انوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شده بودند. سپس Grade مربوط به هر نمونه، توسط پاتولوژیست و با استفاده از میکروسکوپ تعیین شد. برای تعیین گرید از سیستم درجه‌بندی نائینگهام استفاده شد که مبتنی بر ارزیابی میکروسکوپی از ویژگی‌های مورفولوژیک و سیتولوژیک سلول‌های تومور، از جمله درجه‌ی تشکیل لوله، پلی‌مورفیسم هسته‌ای و شمارش میتوز می‌باشد. مجموع این نمرات تومورهای پستان را به درجه ۱ (G1) با تمایز خوب و رشد کند، درجه ۲ (G2) با تمایز متوسط، و درجه ۳ (G3) با تمایز بسیار ضعیف و Proliferative طبقه‌بندی می‌کند.

**استخراج RNA از نمونه‌های بافت:** ابتدا بافت‌های منجمد با استفاده از ازت مایع و هاون هموژن شدند و سپس استخراج RNA Total از بافت‌ها، با استفاده از RiboEx<sup>TM</sup> شرکت Gene All مطابق با دستورالعمل‌های سازنده کیت انجام گرفت. RNA استخراج شده تا قبل از استفاده برای سنتز cDNA در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت سنجش کیفیت RNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز و برای بررسی کمیت آن از دستگاه نانودراپ استفاده شد. **تیمار با DNase** وجود DNA ژنومی آلوده (gdNA) در آماده سازی RNA یک علت مکرر مثبت کاذب در سنجش‌های مبتنی بر RT-PCR با هدف تجزیه و تحلیل بیان ژن است. همچنین با توجه به تک‌اگزونه بودن ژن مورد نظر؛ گنجانیدن مرحله‌ی تیمار با DNase ضروری بود. در این مطالعه از DNase-free Kit، RNase از شرکت sinaclon استفاده و مطابق با پروتکل سازنده کیت تیمار با DNase انجام شد.

**سنتز cDNA از RNA استخراج شده از بافت:** در این مطالعه از cDNA Synthesis Kit از شرکت یکتا تجهیز آزما جهت سنتز cDNA استفاده گردید. مطابق پروتکل سازنده‌ی کیت cDNA از RNAهای استخراج شده سنتز شد.

**بیان ژن NORAD به روش کمی (QPCR) Real-Time PCR** ما بیان mRNA ژن هدف (NORAD) را توسط Real-Time PCR با استفاده از مستر میکس SYBR green (Ampliqon؛ دانمارک) با سیستم Applied Biosystems QuantStudio3 اندازه‌گیری کردیم. تسوالی پرایمرهای ژن NORAD عبارت بودند از: R: 5'-CTTAGTCACGGGGATGGTGG-3' و F: 5'-CGCTCTGTAGACCTGTGGT-3' (اندازه‌ی محصول ۱۱۷ جفت باز).

مقداری از بافت توموری و بافت غیرسرطانی مجاور آن در اتاق عمل توسط جراح جدا شد و در کرایوتیوب‌های جدا منتقل شدند و بلافاصله وارد تانک ازت شده و بعد به فریزر منفی هشتاد انتقال داده شدند. همچنین کل بافت جدا شده طی جراحی به ظرف حاوی فرمالین ۱۰ درصد منتقل گردید و برای بررسی توسط پاتولوژیست، قالب‌گیری و مطالعات هیستوپاتولوژیک به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها با استفاده از یخ خشک برای آزمایشگاه ما ارسال شدند.

این مطالعه مورد تأیید کمیته‌ی اخلاق پزشکی انستیتو سرطان بیمارستان امام خمینی (ره) و همچنین کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جنبدی-شاپور (شناسه اخلاق: IR.AJUMS.MEDICINE.REC.1400.068) قرار گرفت. قبل از جمع‌آوری نمونه، یک رضایت‌نامه‌ی آگاهانه‌ی کتبی از هر یک از بیماران اخذ شد. مطالعه مطابق با اعلامیه‌ی هلسینکی و به خوبی با دستورالعمل‌های عمل بالینی انجام گردید.

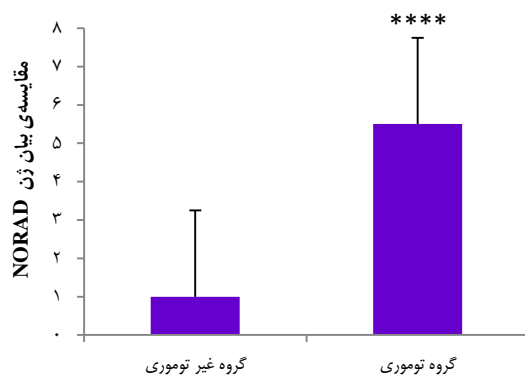
با توجه به اطلاعات دموگرافیک نشان داده شده در جدول ۱، میانگین سنی بیماران ۱۰/۷ ± ۵۲ سال بود. با توجه به اینکه نمونه‌های شاهد از بافت غیرسرطانی مجاور تومور سرطانی همان بیمار برداشته شده است، شاخص سن برای نمونه‌های شاهد و بیمار یکسان است.

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیک بیماران

متغیرها	تعداد بیماران (درصد)
سن (سال)	
< ۵۰	۴۰/۰
> ۵۰	۶۰/۰
نژاد	
فارس	۲۲/۵
آذری	۳۲/۵
گیلکی و مازانی	۱۰/۰
کرد	۱۰/۰
لر	۷/۵
ناشناخته	۱۷/۵
مرحله	
I-II	۷۲/۵
III	۲۷/۵
درجه‌ی بافت‌شناسی	
درجه I (با تمایز کم)	۱۰/۰
درجه II (تمایز متوسط)	۵۵/۰
درجه III (تمایز ضعیف)	۳۵/۰
سایز تومور (سانتی‌متر)	
< ۵	۶۲/۵
≥ ۵	۳۷/۵

از Real-Time PCR کمی (QPCR) بررسی شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، cDNAهای مربوط به بیان ژن NORAD تکثیر شدند و داده‌ها با ژن HPRT1 به عنوان کنترل داخلی مقایسه شدند.

**بررسی تفاوت بیان NORAD در دو گروه نرمال و توموری:**  
آنالیز داده‌های حاصل از Real Time PCR نشان داد که ژن NORAD در بافت بیماران با سرطان پستان در مقایسه با بافت غیرسرطانی مجاور ۵ برابر افزایش بیان دارد (شکل ۱) که این افزایش بیان بین گروه‌های توموری و غیر توموری مجاور از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0/05$ ).



شکل ۱. مقایسه بیان ژن NORAD بین گروه‌های توموری و غیر توموری. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است. از HPRT1 به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (\*\*\*\*:  $P < 0/0001$  در مقایسه با گروه غیر توموری می‌باشد).

**ارتباط بین بیان NORAD و پارامترهای کلینیکی پاتولوژیک بیماران سرطانی پستان:** ارتباط بین بیان NORAD و پارامترهای مختلف بالینی - آسیب‌شناسی بافت پستان در جدول ۲ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین بیان NORAD با پارامترهای بالینی از جمله اندازه‌ی تومور، نکروز، تهاجم لنفوی و عروقی، مرحله، درجه‌ی تومور و مارکرهای هیستوپاتولوژیک (p53، Her-2، گیرنده‌ی استروژن و گیرنده‌ی پروژسترون) ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲).

**بررسی حساسیت و اختصاصیت ژن مورد مطالعه:** برای بررسی میزان اختصاصیت و حساسیت ژن مورد مطالعه از منحنی راک استفاده شد (شکل ۲؛ الف). سطح زیر منحنی (Area under the curve) کیفیت تشخیصی (دقت) ژن مورد مطالعه را نشان می‌دهد که این مقدار برای ژن NORAD برابر با ۸۲ درصد ( $P < 0/0001$ ) محاسبه شد (شکل ۲؛ ب). سطح زیر منحنی در صورت اینکه ۸۰ درصد باشد، از نظر آماری قابل قبول است. با توجه به نتایج به دست آمده،

و بیان ژن هیپوگوانتین فسفریبوزیل ترانسفراز ۱ (HPRT1) به عنوان کنترل داخلی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن HPRT1، به روش PCR بررسی شد. توالی پرایمرها به شرح زیر است؛ F: 5'- CCTGGCGTCGTGATTAGTG-3' و R: 5'- TCAGTCCTGTCCATAATTAGTCC-3' (اندازه‌ی محصول ۱۲۵ جفت باز).

برای هر واکنش qPCR از مسترمیکس ۰/۳ میکرولیتر از هر پرایمر، ۶/۲۵ میکرولیتر سایبرگرین با آب مقطر به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر رسانده شده بود، استفاده شد. به هر میکروتیوپ ۰/۵ میکرولیتر cDNA اضافه گردید. واکنش‌ها به صورت دوبار تکرار انجام شد. شرایط چرخه‌ی PCR به صورت زیر تنظیم شد: یک مرحله قبل از انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۴۰ سیکل هر سیکل شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد است. منحنی ذوب با گرمایش خطی از ۶۰ به ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ایجاد شد. برای محاسبه‌ی نسبی مقادیر کمی از داده‌های یک نمونه فردی که با ژن کنترل داخلی خود نرمال شده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده شد. بیان چند برابری هر نمونه با بافت نرمال مقایسه گردید.

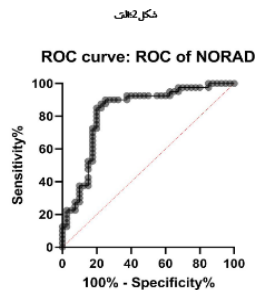
استفاده از این روش‌های کمی مستلزم کارایی PCR برای ژن‌ها به طور مشابه و ترجیحاً بیشتر و یا مساوی ۹۰ درصد می‌باشد. کارایی با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR، مقادیر Efficiency برای پرایمر NORAD، ۹۲ درصد و برای پرایمر HPRT1، ۹۸ درصد به دست آمد. بر همین اساس مقادیر مربوط به کارایی‌های واکنش‌ها برای NORAD و HPRT1 توسط فرمول (کارایی پرایمرها + ۱) = E به ترتیب برابر با ۱/۹۲، ۱/۹۸ محاسبه شد. با توجه به اینکه مقادیر مربوط به کارایی واکنش برای هر دو ژن مورد نظر بین ۱/۹ تا ۲ است، از رابطه‌ی  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  برای به دست آوردن Fold change هر ژن استفاده شد.

داده‌های حاصل به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار و با استفاده از آزمون‌های غیر پارامتریک، Mann-Whitney و Kruskal-Wallis برای مقایسه بین دو و چند گروه و به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) و GraphPad Prism 9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.  $P \leq 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

در بررسی بافت‌شناسی توسط پاتولوژیست، همه‌ی بیماران دارای سرطان پستان تأیید شدند. از بافت‌های تازه منجمد شده، RNA توتال جدا شد و پس از سنتز cDNA، بیان ژن NORAD با استفاده

بررسی گردید. آنالیز داده‌های حاصل از Real Time PCR نشان داد که ژن NORAD در بافت بیماران با سرطان پستان در مقایسه با بافت نرمال مجاور افزایش بیان داشته است که این افزایش بیان بین گروه‌های توموری و غیر توموری مجاور از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۱).



شکل ۲: الف) منحنی ROC ژن NORAD، ب) نتایج منحنی ROC

Test Result Variable(s): NORAD			Asymptotic 95% Confidence Interval	
Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Lower Bound	Upper Bound
0.8263	0.048	<0.0001	0.730	0.922

شکل ۲. الف) منحنی ROC ژن NORAD، ب) نتایج منحنی ROC ژن NORAD

بعد از نشان دادن افزایش بیان این ژن در بافت تومور پستان، ارتباط بیان NORAD با ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی سرطان پستان بررسی گردید. آنالیزهای صورت گرفته نشان داد که بین بیان NORAD با پارامترهای بالینی و مارکرهای هیستوپاتولوژیک ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲)، که می‌تواند به علت حجم نمونه‌ی مورد مطالعه باشد. با توجه به بدست آمدن حساسیت و ویژگی قابل قبول، می‌توان بررسی ژن NORAD را جهت تمایز بافت سرطانی پستان از بافت غیرسرطانی پیشنهاد داد. اگرچه اظهار نظر قطعی در این مورد نیازمند بررسی در مطالعات بیشتر و با حجم نمونه‌ی بالاتر می‌باشد.

نقش انکوژنی NORAD در سرطان معده نیز توسط Yu و همکاران نشان داده شد به طوری که خاموش کردن NORAD، تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم و انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (Epithelial-mesenchymal transition) را کاهش اما آپوپتوز سلولی را افزایش داد (۱۸).

همچنین افزایش بیان ژن NORAD در بافت‌های سرطان مثانه ۹۰ بیمار نسبت به بافت‌های غیرسرطانی مجاور نشان داده شد. به علاوه نقش پیش‌آگهی دهنده‌ی این ژن برای بقای کلی بیماران مبتلا به سرطان پستان تأیید شد (۱۹). بنابراین NORAD را می‌توان به عنوان یک کاندید امیدوار کننده به عنوان یک بیومارکر جدید برای

با در نظر گرفتن  $\text{cut off} = 3/6$ ، حساسیت NORAD برابر ۹۰ درصد و اختصاصیت آن ۷۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲. ارتباط بیان NORAD با ویژگی‌های بالینی پاتولوژیک سرطان پستان

متغیرها	NORAD	
	P	Mean fold change
سایز تومور (سانتی‌متر)	۰/۱۳۹	۲/۱۷
		۵/۱۲
درجه	۰/۰۸۱	۷/۹۶
		۲/۷۰
		۲/۸۵
مرحله	۰/۷۹۲	۳/۲۷
		۳/۳۱
		۳/۵۰
گیرنده‌ی استروژن	۰/۵۴۱	۲/۴۸
		۲/۴۸
گیرنده‌ی پروژسترون	۰/۹۹۷	۴/۱۷
		۲/۰۴
P53	۰/۴۹۵	۵/۹۷
		۱/۵۷
Her-2	۰/۱۹۰	۱/۳۸
		۳/۷۵
نکروزیس	۰/۸۹۶	۲/۶۴
		۴/۴۷
تهاجم به عروق لنفاوی	۰/۶۶۱	۳/۱۷
		۳/۴۸
تهاجم عروقی	۰/۶۶۱	۳/۱۷
		۳/۴۸

### بحث

در این مطالعه به بررسی میزان بیان این ژن در نمونه‌های سرطان پستان در مقایسه با نمونه‌های سالم و همچنین ارتباط میزان آن با درجه‌ی تومور پرداخته شد. در مطالعه‌ی حاضر، ابتدا بیان NORAD در سطح mRNA در بافت توموری و بافت نرمال مجاور آن‌ها

سرطان پستان پیشنهاد داد. اگرچه اظهار نظر قطعی در این مورد نیازمند بررسی در مطالعات بیشتر و با حجم نمونه‌ی بالاتر می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اعضای گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تشخیص و پیش‌آگهی سرطان و همچنین یک هدف درمانی برای سرطان مورد توجه قرار داد. با این حال، در این مطالعه محدودیت‌هایی مثل عدم استفاده از تومورهای خوش‌خیم و یا نمونه‌ی کنترل از بافت طبیعی از بیمار سالم نیز وجود داشت.

### نتیجه‌گیری

با توجه به بدست آمدن حساسیت و ویژگی قابل قبول، می‌توان بررسی ژن NORAD را به عنوان بیومارکر مناسبی برای تشخیص

### References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209-49.
2. Tsang JYS, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol* 2020; 27(1): 27-35.
3. Szymiczek A, Lone A, Akbari MR. Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet* 2021; 99(5): 613-37.
4. Al-Thoubaity FK. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Ann Med Surg (Lond)*. 2019; 49: 44-8.
5. Kashyap D, Garg VK, Sandberg EN, Goel N, Bishayee A. Oncogenic and tumor suppressive components of the cell cycle in breast cancer progression and prognosis. *Pharmaceutics* 2021; 13(4): 569.
6. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77(9): 1745-70.
7. Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kiffin R, Martinez-Vicente M, Kon M, et al. Chaperone-mediated autophagy at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 4): 495-9.
8. Geffken K, Spiegel S. Sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Adv Biol Regul* 2018; 67: 59-65.
9. Chen S, Wang H, Huang YF, Li ML, Cheng JH, Hu P, et al. WW domain-binding protein 2: an adaptor protein closely linked to the development of breast cancer. *Mol Cancer* 2017; 16(1): 128.
10. Schmidt M, Fasching PA, Beckmann MW, Kölbl H. Biomarkers in breast cancer—an update. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2012; 72(9): 819-32.
11. Shi P, Zhang J, Li X, Li W, Li H, Fu P. Long non-coding RNA NORAD inhibition upregulates microRNA-323a-3p to suppress tumorigenesis and development of breast cancer through the PUM1/eIF2 axis. *Cell Cycle* 2021; 20(13): 1295-307.
12. Zhang T, Hu H, Yan G, Wu T, Liu S, Chen W, et al. Long non-coding RNA and breast cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2019; 18: 1533033819843889.
13. Huang Q-Y, Liu G-F, Qian X-L, Tang L-B, Huang Q-Y, Xiong L-X. Long non-coding RNA: dual effects on breast cancer metastasis and clinical applications. *Cancers* 2019; 11(11): 1802.
14. Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer. *Dis Markers* 2017; 2017: 7243968.
15. Maleki Dana P, Mansournia MA, Mirhashemi SM. PIWI-interacting RNAs: new biomarkers for diagnosis and treatment of breast cancer. *Cell Biosci* 2020; 10(1): 1-8.
16. Soghli N, Yousefi T, Abolghasemi M, Qujeq D. NORAD, a critical long non-coding RNA in human cancers. *Life Sci* 2021; 264: 118665.
17. Munschauer M, Nguyen CT, Sirokman K, Hartigan CR, Hogstrom L, Engreitz JM, et al. The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability. *Nature* 2018; 561: 132-6.
18. Yu SY, Peng H, Zhu Q, Wu YX, Wu F, Han CR, et al. Silencing the long noncoding RNA NORAD inhibits gastric cancer cell proliferation and invasion by the RhoA/ROCK1 pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(9): 3760-70.
19. Li Q, Li C, Chen J, Liu P, Cui Y, Zhou X, et al. High expression of long noncoding RNA NORAD indicates a poor prognosis and promotes clinical progression and metastasis in bladder cancer. *Urol Oncol* 2018; 36(6): 310.e15-310.e22.

## Evaluation of Long Noncoding RNA-NORAD in Breast Tumor Tissues of Iranian Women

Gazal Orak<sup>1</sup>, Maryam Cheraghzadeh<sup>2</sup>, Fatemeh Maghsoodi<sup>3</sup>,  
Fereshteh Ameli<sup>4</sup>, Maryam Adelipour<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Breast cancer is the leading cause of cancer death for women worldwide. Identification of novel molecular markers that are involved in tumor development has allowed cancer diagnosis, targeted therapy and monitoring the response to cancer treatment. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are involved in the regulation of various cellular processes, including chromosome transcription and remodeling. This study aimed to investigate the expression and significance of long noncoding RNA NORAD (Non-Coding RNA Activated by DNA Damage) (lncRNA-NORAD) in breast cancer.

**Methods:** Breast cancer samples were obtained from Iran National Tumor bank. Total RNA was extracted from each sample and then treated with DNase. Q-PCR was used to detect the mRNA expression of lncRNA-NORAD in breast cancer and adjacent noncancerous tissues as respective controls.

**Findings:** Analysis of Real Time-PCR data showed that NORAD gene expression increased significantly in the breast tumor tissues compared to adjacent noncancerous tissues ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Since the expression of lncRNA-NORAD gene is increased in breast tumor tissues compared to the normal tissue adjacent to the tumor, this gene can be considered as a suitable biomarker for breast cancer.

**Keywords:** Biomarkers; Breast neoplasms; Long noncoding RNA; Gene expression; NORAD

**Citation:** Orak G, Cheraghzadeh M, Maghsoodi F, Ameli F, Adelipour M. **Evaluation of Long Noncoding RNA-NORAD in Breast Tumor Tissues of Iranian Women.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(677): 467-73.

1- MSc Student of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

3- MSc of Biostatistics, Department of Public Health, School of Health, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

**Corresponding Author:** Maryam Adelipour, Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran; Email: adelipour-m@ajums.ac.ir