

بررسی میانگین بیان MicroRNA-155 (miR-155) و Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA (CEA mRNA) در خون محیطی بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی (OSCC)

آرمیتا نریمانی^۱، فرزانه حسینی^۲، نغمه بهرامی^۳، عبدالرضا محمدنیا^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی (OSCC یا Oral squamous cell carcinoma) حدود ۹۰ درصد از تمام تومورهای بدخیم دهانی را تشکیل می‌دهد. در این مطالعه، تغییرات بیان Micro RNA-155 (miR-155) و Carcinoembryonic antigen messenger RNA (CEA mRNA) در سرطان دهان مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه، ۳۰ فرد بیمار به عنوان گروه مورد و ۳۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. میزان miR-155 و CEA mRNA در خون محیطی با استفاده از روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: مثبت شدن نشانگر miR-155 در گروه مورد در ۲۱ نفر از ۳۰ نفر و در گروه شاهد نیز در ۷ نفر از ۳۰ نفر دیده شد. نشانگر CEA mRNA در ۲۳ نفر از گروه مورد و ۵ نفر از گروه شاهد مثبت بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، می‌توان نتیجه‌ی این مطالعه را به عنوان یک روش تشخیصی غربالگری برای کشف زودرس بیماری در مراحل اولیه دانست.

واژگان کلیدی: کارسینوم سلول‌های سنگفرشی سر و گردن، تشخیص زودهنگام، Micro RNA، Carcinoembryonic antigen، mRNA

ارجاع: نریمانی آرمیتا، حسینی فرزانه، بهرامی نغمه، محمدنیا عبدالرضا. بررسی میانگین بیان MicroRNA-155 (miR-155) و Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA (CEA mRNA) در خون محیطی بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی (OSCC). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۵۱۰): ۱۶۰۱-۱۵۹۷

مقدمه

وجود پیشرفت‌های اخیر در روش‌های تشخیص و درمان، کمتر از ۵۰ درصد بیماران OSCC به مدت ۵ سال زنده می‌مانند (۴-۵). بیشتر سرطان‌های دهان در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند. در واقع، این ضایعات زمانی که بر اثر پیشرفت زیاد، منجر به ظهور علائم بالینی شده باشد، کشف می‌شوند و این موضوع، سبب شده است که پیش‌آگهی سرطان دهان در اغلب نقاط جهان خوب نباشد (۶). به طور کلی، ۵ درصد کل موارد سرطان در مردان و ۲ درصد در زنان را این سرطان تشکیل می‌دهد. عوامل افزایش دهنده‌ی این بیماری در سنین بالا، عوامل سرطان‌زایی نظیر سیگار،

سرطان بیماری است که در نتیجه‌ی تقسیم غیر قابل کنترل سلول‌ها به وجود می‌آید که ناشی از عوامل محیطی و اختلالات ژنتیک می‌باشد (۱-۲). سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن، شامل گروه ناهمگونی از بدخیمی‌هایی است که شامل حفره‌ی دهان، حفره‌ی بینی، سینوس‌های پارانازال، حلق، حنجره و غدد بزاقی می‌باشد. سرطان دهان، که به طور عمده توسط کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (Oral squamous cell carcinoma یا OSCC) معرفی می‌شود، شایع‌ترین نوع سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن است (۳). با

۱- گروه سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات جراحی‌های فک و صورت و گروه جراحی فک و صورت، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری و گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: mohamadnia.ar@gmail.com

نویسنده‌ی مسؤؤل: عبدالرضا محمدنیا

الکل و تنباکو با افزایش میزان آسیب به DNA و همچنین، ویروس‌ها و دیگر عوامل میکروبی و تأثیر آن‌ها بر روی مخاط دهان گزارش شده است (۷).
نشانگرهای زیستی، مولکول‌های زیستی هستند که در خون یا سایر مایعات بدن و یا بافت وجود دارند و نشانه‌ی یک فرایند طبیعی یا غیر طبیعی و یا یک وضعیت خاص یا بیماری می‌باشند (۸). بررسی چندین نشانگر زیستی در کنار هم، می‌تواند نتایج دقیق‌تر و قابل اعتمادتری را جهت تشخیص سرطان‌ها در اختیار کادر درمانی قرار دهد (۹).

ریز RNA (MicroRNA یا miRNA)‌ها زیر گروه بزرگی از RNAهای غیر کد کننده‌ی ۲۵-۱۸ نوکلئوتیدی هستند که از نظر تکاملی حفاظت شده می‌باشند (۱۰). این مولکول‌ها، بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه‌ی Messenger RNA (mRNA) یا القای تجزیه‌ی آن کنترل می‌کنند (۱۱-۱۳). بسیاری از مطالعات اخیر نشان دهنده‌ی نقش بالقوه‌ی miRNAها در رشد سرطان دهان می‌باشند (۱۴). miR-155 یک miRNA چند منظوره است و دارای نقش مهمی در فرایندهای مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک نظیر تمایز، ایمنی، التهاب، سرطان و بیماری‌های قلبی-عروقی می‌باشد (۱۵).
توموری است. میزان این آنتی ژن در بسیاری از بیماری‌های سرطانی همچون سرطان کولون، سینه، ریه و ... افزایش می‌یابد (۱۶).

جدول ۱. شرایط دمایی واکنش

(Real-time PCR) Real-time polymerase chain reaction

چرخه‌ها	طول چرخه‌ها	دما (درجه‌ی سانتی گراد)
۱	۱۵ دقیقه	۹۵
۳۵-۴۰	۱۵-۳۰ ثانیه	۹۵
	۶۰ ثانیه	۵۵-۶۰
۱	Melting analysis	۵۵-۹۵

یافته‌ها

جمعیت مورد مطالعه را ۳۰ فرد سالم (گروه شاهد) و ۳۰ فرد مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی دهان (گروه مورد) تشکیل دادند. این دو گروه، از لحاظ متغیر زمینه‌های سن با هم مطابقت داشتند. گروه‌ها با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی مقایسه شدند و از نظر میانگین سنی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که عامل سن در دو گروه اشکالی ایجاد نمی‌کند ($P = ۰/۴۴۲$).

واکاوای بیان نشانگرهای مورد مطالعه: نشانگر زیستی CEA mRNA در گروه مورد در ۲۳ نفر از ۳۰ نفر (۷۷ درصد) و در گروه شاهد، در ۵ نفر از ۳۰ نفر مثبت بود. مقایسه‌ی آماری میزان مثبت شدن این نشانگر زیستی در گروه‌های مورد و شاهد با استفاده از آزمون Two-sample binomial صورت گرفت که نشان دهنده‌ی تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه بود ($P < ۰/۰۰۱$).
نشانگر زیستی miR-155 در گروه مورد در ۲۱ نفر از ۳۰ نفر (۷۰ درصد) مثبت بود و در گروه شاهد در ۷ نفر از ۳۰ نفر مثبت بودند. مقایسه‌ی آماری میزان مثبت شدن این نشانگر زیستی در گروه‌های مورد و شاهد با استفاده از آزمون

روش‌ها

۳۰ نفر از بیماران مراجعه کننده به انستیتوی سرطان دانشگاه علوم پزشکی تهران که بر اساس معاینات فیزیکی و تشخیص سرطان سلول‌های سنگفرشی دهان توسط متخصص، قبل از این که هر گونه درمانی روی آن‌ها انجام شود، به عنوان گروه مورد انتخاب شدند. ۳۰ نفر نیز از افراد سالم به عنوان گروه شاهد، پس از معاینه به طور داوطلبانه و با پر کردن فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. نمونه‌های بیماران و افراد سالم شامل خون محیطی بودند. افراد از نظر سن در گروه‌های یکسانی با محدوده‌ی سنی ۲۲-۷۷ سال در نظر گرفته شدند.

سپس از آن‌ها، خون محیطی به مقدار ۲ میلی‌لیتر از طریق سرنگ خون‌گیری معمولی در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای گرفته شد و بلافاصله وارد مرحله‌ی استخراج RNA شد.

استخراج RNA با استفاده از RNA Blood Mini Kit از qiagen (qiagen Cat no.52304) انجام شد.

برای ساخت complementary DNA (cDNA) از Viva 2-steps RT-PCR Kit (Cat no.RTPL12) استفاده شد. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) برای بررسی ژن CEA با استفاده از

بحث

سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن شامل گروه ناهمگونی از بدخیمی‌هایی است که شامل حفره‌ی دهان، حفره‌ی بینی، سینوس‌های پارانازال، حلق، حنجره و غدد بزاقی می‌باشد (۳). کارسینومای سلول‌های پوششی، شایع‌ترین سرطان دهان با منشأ اپیتلیالی است که در حفره‌ی دهان مشاهده می‌شود (۶).

بر اساس مطالعات انجام شده، چندین سطح از مولکول‌های تنظیم کننده (miRNA، mRNA) و پروتئین در پیشرفت و نگهداری فنوتیپ‌های سرطانی دخیل هستند (۱۷). علاوه بر عملکرد بیولوژیکی کلیدی miRNA در تومورزایی OSCC، نشان داده شده است که سطوح بیان برخی از miRNAها با متغیرهای آسیب‌شناسی بالینی ارتباط دارد (۱۸) و دارای ارزش تشخیصی و پیش‌آگهی در OSCC می‌باشد (۱۹، ۱۴).

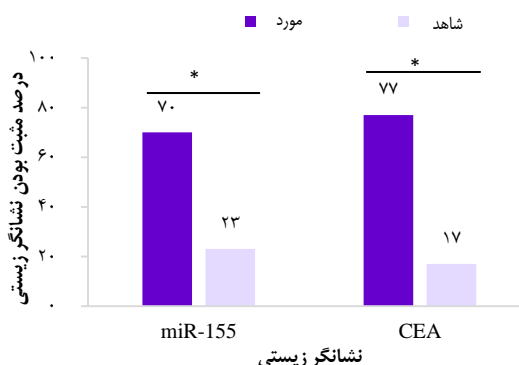
استفاده از Real-time PCR کمی، در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی و مولکولی در حال افزایش است و جایگزین خوبی برای PCR معمولی است (۲۰).

در مطالعه‌ی حاضر، تغییرات بیان miR-155 و CEA mRNA در سرطان دهان در خون محیطی برای تشخیص زودهنگام مورد بررسی قرار گرفت. مثبت شدن نشانگر miR-155 در گروه مورد در ۲۱ نفر از ۳۰ نفر مشاهده شد. همچنین، نشانگر CEA mRNA در گروه مورد در ۲۳ نفر از ۳۰ نفر مثبت بود.

در مطالعه‌ی Zheng و همکاران، مشخص شد که miRNAها به طور انتخابی وارد گردش خون می‌شوند و به احتمال قوی، نحوه‌ی این ترشح به واسطه‌ی ارتباطات بین سلولی است. وجود miRNAها در خون محیطی، ممکن است در توسعه‌ی سرطان نقش بازی کند (۲۱). در این پژوهش مانند مطالعه‌ی حاضر از روش Real-time PCR برای تشخیص سطح سرمی miRNA استفاده شد.

miRNAها به طور مؤثر در مایعات بدن انسان مانند خون، بزاق، ادرار و هوای تنفسی وجود دارند. از این رو، می‌توان با روش‌های غیر تهاجمی آن‌ها را در دسترس قرار داد. Wong و همکاران، حضور miR-184 در پلاسما ۸۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی زبان را در مقایسه با ۱۳ درصد از گروه سالم تشخیص دادند (۲۲). در بزاق بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی دهان، miR-125a و miR-200 به طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی شاهد بیشتر بیان شده است (۲۳). علاوه بر این، Liu و همکاران (۲۴) سطح بالایی از miR-31 در بزاق بیماران مبتلا به سرطان دهان را نشان دادند؛ در حالی که سطح miR-31 در پلاسما افزایش یافته است (۲۳-۲۴). به طور مشابهی، در مطالعه‌ی انجام شده نیز افزایش بیان در miR-155 در بیماران مبتلا به OSCC نسبت به گروه شاهد دیده شد

Two-sample binomial صورت گرفت که بیانگر تفاوت آماری معنی‌داری بین این دو گروه بود ($P < 0/001$) (شکل ۱).



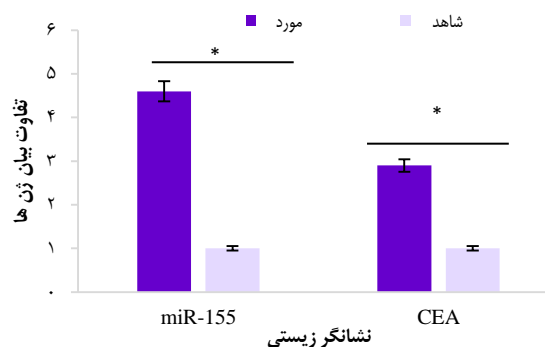
شکل ۱. درصد مثبت شدن

Carcinoembryonic antigen-messenger RNA

(CEA mRNA) و (miR-155) MicroRNA-155 در خون محیطی افراد گروه مورد (Oral squamous cell carcinoma با OSCC) و افراد گروه شاهد
 $P < 0/001$ °

محاسبه‌ی تفاوت میزان بیان نشانگر زیستی در دو گروه

تحقیق: به این منظور، از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد. مقدار $\Delta\Delta Ct$ برای نشانگر زیستی miR-155 عدد ۲/۲- محاسبه شد و برای نشانگر زیستی CEA mRNA عدد ۱/۵۴- به دست آمد. سپس، از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده گردید. بنابراین، میزان بیان miR-155 در گروه مورد به طور متوسط ۴/۶ برابر گروه شاهد بود و برای CEA mRNA نیز میزان بیان این نشانگر زیستی در گروه مورد به طور متوسط ۲/۹۰ برابر گروه شاهد بود ($P < 0/001$) (شکل ۲).



شکل ۲. تفاوت بیان ژن‌های (miR-155) Micro RNA-155 و (CEA) Carcinoembryonic antigen در گروه مورد نسبت به گروه شاهد
 $P < 0/001$ °

بیماران مبتلا به کارسینومای سلول های سنگفرشی دهان نسبت به افراد سالم بیشتر است. بنابراین، بررسی سطح بیان این دو نشانگر در خون بیماران می تواند به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه در تشخیص سرطان OSCC در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه ی حاضر با کد پژوهشی ۱۵۷۳۰۵۰۳۹۶۱۰۱۳ در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال به تصویب رسید. بدین وسیله از زحمات استادان محترم دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم زیستی قدردانی و تشکر به عمل می آید.

و از نظر آماری، اختلاف معنی داری بین آن ها وجود داشت. Kurokawa و همکاران، در مطالعه ای سطوح سرمی ۶ تومور نشانگر از جمله CEA را در بیماران مبتلا به کارسینومای سلول سنگفرشی دهان مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مطالعه ی آن ها نشان داد که میزان سطوح سرمی CEA. ۳۴/۵ درصد در بیماران مبتلا به OSCC افزایش داشت (۲۵). در مطالعه ی اخیر نیز افزایش بیان CEA در مبتلایان به OSCC نسبت به گروه شاهد وجود داشت و اختلاف آماری معنی داری بین این دو گروه گزارش گردید. به طور کلی، نتایج حاصل از مطالعه ی حاضر در تطابق با مطالعات پیشین نشان داد که بیان دو نشانگر CEA و miR-155 در

References

- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10(8): 789-99.
- PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Cancer Prevention Overview (PDQ[®]): Health Professional Version. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2002.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359-E386.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1): 11-30.
- Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(1): 67-76.
- Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Tang CH, Huang SH, Tsai MH, et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. *Clin Chim Acta* 2011; 412(15-16): 1357-65.
- de Cassia Braga RK, Kowalski LP, Latorre MR. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129(2): 219-28.
- Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(8): 597-608.
- Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, et al. Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem* 2002; 48(8): 1225-31.
- Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett* 2009; 285(2): 116-26.
- Kanellopoulou C, Monticelli S. A role for microRNAs in the development of the immune system and in the pathogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol* 2008; 18(2): 79-88.
- Kim M, Kasinski AL, Slack FJ. MicroRNA therapeutics in preclinical cancer models. *Lancet Oncol* 2011; 12(4): 319-21.
- Montano M. MicroRNAs: miRRORS of health and disease. *Transl Res* 2011; 157(4): 157-62.
- Sethi N, Wright A, Wood H, Rabbitts P. MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research. *Eur J Cancer* 2014; 50(15): 2619-35.
- Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer* 2007; 43(10): 1529-44.
- Wagener C, Muller-Wallraf R, Nisson S, Groner J, Breuer H. Localization and concentration of carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal tumors: correlation with CEA levels in plasma. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67(3): 539-47.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64(2): 235-48.
- Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009; 15(12): 3998-4008.
- Avisar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15(8): 2850-5.
- Logan J, Logan MJ, Edwards KJ, Saunders NA. Real-time PCR: Current Technology and Applications. Poole, UK: Horizon Scientific Press; 2009.
- Zheng Y, Cui L, Sun W, Zhou H, Yuan X, Huo M, et al. MicroRNA-21 is a new marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Cancer Biomark* 2011; 10(2): 71-7.
- Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* 2008; 14(9): 2588-92.
- Lin SC, Liu CJ, Lin JA, Chiang WF, Hung PS, Chang KW. miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol* 2010; 46(3): 204-8.
- Liu CJ, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34(2): 219-24.
- Kurokawa H, Tsuru S, Okada M, Nakamura T, Kajiyama M. Evaluation of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma in the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1993; 22(1): 35-8.

The Expression of MicroRNA-155 (miR-155) and Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA (CEA mRNA) in Peripheral Blood of Patients with Oral Squamous Cell Carcinomas (OSCC)

Armita Narimani¹, Farzaneh Hosseini², Naghmeh Bahrami³, Abdolreza Mohamadnia⁴

Original Article

Abstract

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for about 90% of all malignant oral tumors, and is often diagnosed in advanced stages. In this study, changes in the expression of microRNA-155 (miR-155) and carcinoembryonic antigen messenger RNA (CEA mRNA) in peripheral blood of patients with oral cancer were investigated.

Methods: In this study, 30 patients and 30 healthy people were selected. The miR-155 and CEA mRNA levels in their peripheral blood were measured and evaluated using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) technique.

Findings: Positive miR-155 marker was observed in 21 people from 30 with oral cancer, and 7 of 30 healthy subjects. The CEA mRNA marker was positive in 23 of the 30 patients, and 5 out of 30 healthy subjects.

Conclusion: In sum, the outcome of this study can be seen as a screening diagnostic test for early detection of the disease in the early stages.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma, Early diagnosis, MicroRNAs, Carcinoembryonic antigen, mRNA

Citation: Narimani A, Hosseini F, Bahrami N, Mohamadnia A. **The Expression of MicroRNA-155 (miR-155) and Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA (CEA mRNA) in Peripheral Blood of Patients with Oral Squamous Cell Carcinomas (OSCC).** J Isfahan Med Sch 2019; 36(510): 1597-601.

1- Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Craniomaxillofacial Research Center AND Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD) AND Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Abdolreza Mohamadnia, Email: mohamadnia.ar@gmail.com