

نقش بالقوه RNA غیر کدکننده حلقوی hsa_circ_0003098 در سرطان پستان و ارتباط آن با اطلاعات جمعیت شناختی و متاستاز به غدد لنفاوی

نویسندگان:

زهرا فیروزی^۱، الهام محمدی سلیمانی^۲، محمد مهدی تقی زاده^۳، حسین منصوری^۴، یاسر منصوری^۵*

۱- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

۲- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

۴- پزشک، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

۵- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.1, Spring 2022

چکیده:

مقدمه: شواهد زیادی آشکار ساخته اند RNAهای حلقوی که RNAهای غیر کدکننده تک رشته‌ای هستند و دو انتهای آن‌ها با پیوند کووالان به هم متصل می‌شود، نقش مهمی در شروع و پیشرفت سرطان پستان با سازوکارهای مختلف دارند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی بیان hsa_circ_0003098 و نقش بالقوه آن در سرطان پستان و هم چنین ارزیابی شبکه circRNA/miRNA/mRNA بود.

روش کار: روش Real-time PCR برای ارزیابی بیان hsa_circ_0003098 در تومورهای پستانی در مقایسه با بافت نرمال مجاور استفاده شد. ارتباط بیان با ویژگی‌های جمعیت شناختی و کلینیکوپاتولوژی مختلف در بیماران مبتلا به سرطان پستان با تحلیل‌های آماری مشخص شد. در نهایت، با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی و نرم افزارهای مختلف و همچنین به کارگیری روش‌های بیوانفورماتیک، مسیر بالقوه circRNA/miRNA/mRNA تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که بیان hsa_circ_0003098 به طور مشخصی در تومورهای پستانی در مقایسه با بافت‌های نرمال مجاور افزایش می‌یابد. به علاوه، افزایش بیان hsa_circ_0003098 با متاستاز به غدد لنفاوی و استفاده از رنگ مو نیز مرتبط است. در مرحله بعد مشاهده شد که این RNA حلقوی می‌تواند بیان mRNAها و miRNAهای کلیدی را در شبکه‌ی رقابتی درون زا (ceRNA) تنظیم کند.

نتیجه گیری: hsa_circ_0003098 که به طور مشخص در تومورهای پستانی افزایش می‌یابد و با متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط است، می‌تواند در فیزیوپاتولوژی سرطان پستان از طریق به دام انداختن miRNAهای درگیر در شبکه hsa_circ_0003098/miRNAs/mRNAs نقش‌های کلیدی بازی کند.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، hsa_circ_0003098، RNAهای غیر کدکننده

Pars J Med Sci 2022;20(1):63-73

مقدمه:

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان و دومین عامل مرگ و میر مرتبط با سرطان در زنان در سراسر جهان است [۱]. اگرچه مطالعات زیادی روی پاتوبیولوژی، تشخیص و درمان سرطان پستان انجام گرفته است، اما این بدخیمی هنوز موضوعی چالش‌برانگیز است [۲]. بنابراین ضروری است که سازوکارهای مولکولی مرتبط با شروع و پیشرفت آن شناسایی شوند. مطالعات اخیر نشان داده اند که انواع مختلفی از RNAهای غیر کدکننده (ncRNA یا Non-coding RNAs) نقش‌های کلیدی در سرطان پستان ایفا می‌کنند [۳، ۴]. بیش از ۷۵ درصد ژنوم انسان به RNA رونویسی می‌شود که دارای عملکرد بیوشیمیایی است، اما حدود ۲ درصد ژنوم انسان کدکننده پروتئین و مابقی آن RNAهای غیر کدکننده هستند که شامل RNAهای غیر کدکننده طویل (LncRNAs)، میکرو RNAها (miRNAs) و RNAهای غیر کدکننده حلقوی (circRNAs) می‌شوند [۵، ۶].

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان و دومین عامل مرگ و میر مرتبط با سرطان در زنان در سراسر جهان است [۱]. اگرچه مطالعات زیادی روی پاتوبیولوژی، تشخیص و درمان سرطان پستان انجام گرفته است، اما این بدخیمی هنوز موضوعی چالش‌برانگیز است [۲]. بنابراین ضروری است که سازوکارهای مولکولی مرتبط با شروع و پیشرفت آن شناسایی شوند. مطالعات اخیر نشان داده اند که انواع مختلفی از RNAهای غیر کدکننده

* نویسنده مسئول، نشانی: استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

تلفن تماس: ۰۷۱۵۳۳۵۰۹۹۴، دورنگار: ۰۷۱۵۳۳۵۷۰۹۱، پست الکترونیک: fums.mansoori@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰ اصلاح: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷

اطلاعات کلینیکوپاتولوژی و همچنین شبکه circRNA/miRNA/mRNA مرتبط با این RNA در سرطان پستان ناشناخته است.

در این مطالعه، برای اولین بار در جهان، بیان hsa_circ_0003098 بین بافت توموری و بافت نرمال مجاور تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان مقایسه و ارتباط بین بیان این RNA حلقوی و متغیرهای جمعیت شناختی و پاتولوژی ارزیابی شد. به علاوه، از آن جایی که RNAهای حلقوی می‌توانند بیان mRNAها را از طریق مهار miRNAها در شبکه (competing) ceRNA (endogenous RNA) تنظیم کنند، و بدین ترتیب روی فرایند تومورزایی مؤثر باشند (۲۱)، شبکه circRNA/miRNA/mRNA مربوط به circBANP در سرطان پستان نیز بررسی شد.

روش کار:

جمعیت مورد مطالعه

در این مطالعه، ۴۵ نمونه توموری و ۴۵ بافت مجاور تومور از زنان دارای سرطان پستان تشخیص داده شده که تحت عمل جراحی در بیمارستان شهید فقیهی شیراز بودند، گرفته شد. تمام افراد شرکت کننده در این پژوهش، قبل از جراحی، هیچ نوع پرتو درمانی و شیمی درمانی نشده بودند و هیچ گونه سرطان تشخیص داده شده دیگری نداشتند. بافت تازه سریعاً در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر 80°C منتقل شد. این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی فسا با کد اخلاق IR.FUMS.REC.1398.187 می‌باشد. تمام شرکت کنندگان فرم رضایت نامه اخذ نمونه و اطلاعات کلینیکی را امضا کردند. اطلاعات پاتولوژی از بیمارستان و اطلاعات جمعیت شناختی و مرتبط با باروری با استفاده از پرسشنامه گردآوری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA تام از بافت های تازه، با محلول استخراج RNA (Invitrogen, Thermo Fisher) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط ژل الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر سنجیده شد. پرایمر برای hsa_circ_0003098 به صورت واگرا طراحی شد. به منظور سنتز cDNA در حجم ۲۰ میکرو لیتر، از رندوم هگزامر و پرایمر اختصاصی استفاده شد، به گونه ای که به ازای هر واکنش، ۱ میکرو لیتر آنزیم RT، ۱ میکرو لیتر RI، ۴ میکرو لیتر بافر، ۲/۵ میکرو لیتر dNTP، ۱/۵ میکرو لیتر پرایمر اختصاصی، ۱ میکرو لیتر رندوم هگزامر، ۲ میکرو لیتر RNA و ۷ میکرو لیتر آب فاقد نوکلئاز استفاده شد. بقیه مراحل طبق دستورالعمل شرکت (Fermentas, Cat.No: K1622) در شرایط دمایی 37°C به

RNAهای غیر کدکننده حلقوی، جدیدترین گروه شناسایی شده از RNAهای غیر کدکننده هستند که از طریق ایجاد پیوند کووالان بین دو سر یک RNA تک رشته‌ای ایجاد می‌شوند [۷] و بر خلاف فرم خطی خود کلاهیک در انتهای ۵' و دم پلی A در انتهای ۳' ندارند. این ساختار باعث می‌شود که به حمله ریبونوکلازها از جمله اگزونوکلازها و RNase R مقاوم شده و نسبت به فرم خطی خود پایداری بیشتری داشته باشند [۸]. شواهد زیادی نشان می‌دهند که RNAهای حلقوی می‌توانند در بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها، از طریق سازوکارهایی همچون اتصال به پروتئین‌ها و تنظیم تولید آن‌ها، تنظیم نسخه برداری و ترجمه، مهار عملکرد پروتئین‌ها و جذب miRNAهای خاص و جلوگیری از عملکرد آن‌ها ایفای نقش کنند [۹، ۱۰]. در سال‌های اخیر، نقش RNAهای حلقوی در جذب و مهار miRNAها و متعاقباً افزایش بیان ژن‌های هدف آن‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۱۱). مطالعات زیادی نقش RNAهای حلقوی را در فرایندهای مختلف سرطان پستان از جمله تکثیر سلولی، تهاجم، آپوپتوز، تشخیص و درمان گزارش کرده‌اند [۱۲]. hsa_circ_0003098 (circBANP) روی کروموزوم شماره ۱۶ واقع شده و از ژن BANP منشا گرفته است [۱۳]. این RNA حلقوی به عنوان آنکوژن و مارکر تشخیصی در سرطان کولورکتال عمل می‌کند و باعث ارتقاء تکثیر، تهاجم، مهاجرت و سرکوب آپوپتوز در این بیماری می‌شود. همچنین به عنوان دام برای let-7d-5p عمل کرده، از فعالیت آن جلوگیری می‌کند و باعث افزایش بیان ژن‌های مورد هدف آن می‌شود [۱۴]. circBANP همچنین در رده‌های سلولی سرطان کولورکتال از جمله HT29 و HCT116 نیز افزایش بیان می‌یابد [۱۵]. اثبات شده است که شبکه circBANP/miR-503/LARP1 در تکثیر سلولی و پیشرفت سرطان ریه نیز نقش دارد [۱۶].

در این مطالعه، ابتدا شبکه‌های ceRNA (competing) endogenous RNA در سرطان‌های مختلف غیر از سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین شبکه‌های مختلف، circBANP/let-7a/FZD5 برای داشتن نقش در سرطان کولورکتال [۱۴] و circBANP/miR-503/LARP1 برای داشتن نقش در سرطان ریه، انتخاب شدند [۱۶]. از آن جایی که نقش و عملکرد let-7a و هدف آن FZD5 و هم چنین miR-503 در سرطان پستان به خوبی اثبات شده است [۱۷-۲۰] و circBANP نیز روی let-7a/FZD5 و miR-503 اثر می‌گذارد [۱۴، ۱۶]، احتمال داده شد که این RNA حلقوی نیز در سرطان پستان نقش داشته باشد و بتواند به عنوان مارکر سرطان پستان عمل کند.

با وجود مطالعات فراوانی که در زمینه hsa_circ_0003098 انجام شده است، هنوز بیان این RNA حلقوی، رابطه بین بیان آن با

مدت ۵ دقیقه، ۴۲ °C به مدت ۶۰ دقیقه، ۷۰ °C به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل انجام شد.

برای بررسی mRNA‌های مرتبط با miRNA ها جستجو در پایگاه داده‌های DIANA-miRPath (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath>) و TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) و mirTarBase (<http://miRTarBase.mbc.nctu.edu.tw/>) انجام شد. در رسم شبکه ارتباطی از سه جفت اینترکشن، miRNA-miRNA و پروتئین- پروتئین استفاده شد. اینترکشن‌های بین پروتئینی با استفاده از دیتابیس STRING (<https://string-db.org/>) جمع‌آوری شد. در خاتمه با استفاده از نرم افزار cytoscape شبکه ارتباطی بین circ-miR-mRNA ترسیم شد (نسخه ۳,۷,۲).

مسیرهای مولکولی درگیر در شبکه hsa_circ_0003098/miRNA/mRNA

برای پیش‌بینی مسیرهای مرتبط با mRNA‌های درگیر در این شبکه، آن‌ها را وارد دیتابیس <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp> کرده و مسیرهای مولکولی با اهمیت بیشتر انتخاب شدند. پایگاه داده جامعی است که اطلاعات زیادی در اختیار ما قرار می‌دهد از جمله اینکه ژن‌ها در چه مسیرهایی درگیر هستند، در همین راستا، لیست ژن‌های درگیر در هر مسیر نیز آورده شده است.

تحلیل بقا mRNA‌های درگیر در شبکه

در انجام این بررسی برای پیش‌بینی تحلیل بقای مربوط به یک ژن از میزان بیان مربوط به آن و آزمون Log-rank در بیماران مبتلا به سرطان پستان استفاده شده است. دیتابیس GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) برای انجام این تحلیل استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش.

نام ژن	(۵' به ۳') توالی پرایمر
hsa_circ_0003098 (F)	GGACGGTCAGCGTCGTC
hsa_circ_0003098 (R)	CAGGCACAGCGTTGCTAATG
β2M (F)	AGATGAGTATGCCTGCCGTG
β2M (R)	GCGGCATCTTCAAACCTCCA

یافته‌ها:

بعد از بررسی میزان بیان hsa_circ_0003098 در بافت توموری و بافت نرمال مجاور تومور به روش RT-PCR، نتایج تحلیل‌های آماری نشان داد که hsa_circ_0003098 به طور مشخصی بیان بیشتری در بافت توموری (۲/۰۰۴ = میانه) در مقایسه با بافت

مدت ۵ دقیقه، ۴۲ °C به مدت ۶۰ دقیقه، ۷۰ °C به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل انجام شد.

انجام واکنش Real-Time PCR

RT-PCR با استفاده از مستر میکس حاوی رنگ ROX و سایبرگرین انجام شد (Ampliqon, Cat.No: A325402-25). ژن بتا ۲ میکرو گلوبولین (β2M) به عنوان کنترل داخلی، برای نرمال سازی داده‌ها استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. یک میکرو لیتر cDNA، ۰/۷۵ میکرو لیتر از هر پرایمر، ۵ میکرو لیتر آب فاقد نوکلئاز و ۷/۵ میکرو لیتر مستر میکس برای هر واکنش استفاده شد. واکنش‌ها تحت شرایط دمایی ۹۵ °C برای ۲۰ ثانیه، ۶۰ °C برای ۳۰ ثانیه در ۴۵ سیکل انجام شد. کلیه واکنش‌ها به صورت دوتایی انجام شدند و از روش $-\Delta\Delta CT$ برای تحلیل‌ها استفاده شد.

تحلیل‌های آماری

از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار برای نمایش $\Delta\Delta CT$ و میانه برای نمایش Fold Gchange استفاده شد. مقایسه Fold Gchange‌ها بین تومور و بافت نرمال مجاور آن با استفاده از آزمون ویلکاکسون انجام شد. مقایسه Fold Gchange در زیر گروه‌های کلینیکال با استفاده از آزمون مان-ویتنی و کروسکال-والیس انجام شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ انتخاب شد. محاسبات در نرم افزار IBM SPSS نسخه ۲۶ و رسم نمودارها در نرم افزار Excel 2019 انجام شد.

تحلیل‌های بیوانفورماتیک

تشکیل شبکه hsa_circ_0003098/miRNA/mRNA

برای جستجوی miRNA‌های مرتبط با این RNA حلقوی از پایگاه داده ای Circinteractome

میزان بیان hsa_circ_0003098 در نمونه‌های توموری در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور و ارتباط آن با اطلاعات جمعیت‌شناختی و کلینیکوپاتولوژی

مسیرهای مولکولی درگیر در شبکه

پس از وارد کردن مجموعه ژن های کدکننده درگیر در شبکه به پایگاه داده جامع enrichment <https://toppgene.cchmc.org> شکل ۳. شبکه hsa_circ_0003098/miRNA/mRNA. این شبکه با نرم افزار سایتواسکیپ ۳,۷,۲ رسم شده است. مستطیل صورتی رنگ نشان دهنده hsa_circ_0003098، لوزی های سبز miRNAهای مرتبط با این RNA حلقوی بوده و دایره ها mRNAهای مرتبط با miRNAها میباشند.

مسیرهای مولکولی درگیر در شبکه

پس از وارد کردن مجموعه ژن های کدکننده درگیر در شبکه به پایگاه داده جامع enrichment <https://toppgene.cchmc.org> خروجی مسیرهای مولکولی درگیر دارای نقش احتمالی سرطان پستان در جدول ۳ آورده شده است. تعداد ژن هایی از این شبکه که در هر یک از این مسیرهای مولکولی نقش دارند نیز نوشته شده است که نشان از اهمیت ارتباط شبکه این RNA حلقوی با مسیرهای مولکولی مهم دارد.

تحلیل بقا

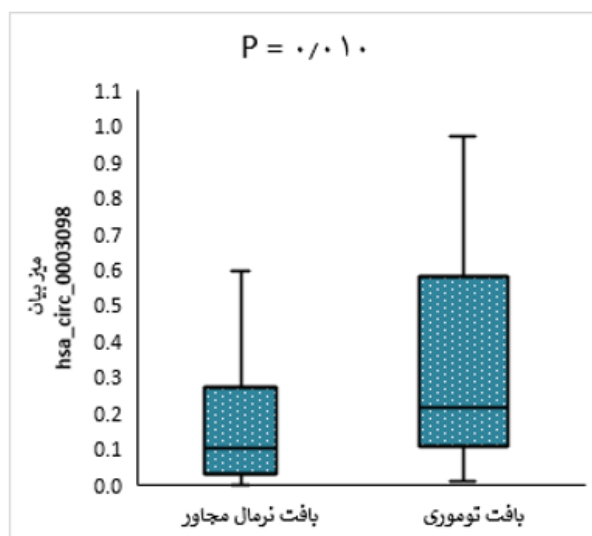
با استفاده از پایگاه اطلاعاتی GEPIA برای ژن های پر اهمیت کدکننده درگیر در شبکه که اسامی آنها ذکر شده بود، تحلیل بقا در بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام شد. مشاهده شد که کاهش و افزایش بیان ژن های پراهمیت در این شبکه تفاوت بیان معناداری در بقای افراد مبتلا به سرطان پستان ایجاد نکرده است (شکل ۴).

نرمال مجاور (۱/۲۳۴ = میانه) دارد (P-value = ۰/۰۱۰)، شکل (۱).

در مرحله دیگر تحلیل ها، نتایج آزمون من-ویتینی آشکار ساخت که ژن hsa_circ_0003098 در بیماری که متاستاز به غدد لنفاوی رخ داده، در مقایسه با بیماری که متاستاز به غدد لنفاوی اتفاق نیفتاده، بیشتر است (P-value = ۰/۰۳۵، شکل ۲ A، جدول ۲)، که این نتیجه، تأکیدی بر نقش آنکوژنی این RNA حلقوی است. به علاوه، بیان این RNA حلقوی در زنانی که در پنج سال اخیر از رنگ مو استفاده کردند، در مقایسه با زنانی که استفاده نکردند، بیشتر است (P-value = ۰/۰۲۷، شکل ۲ B، جدول ۲).

شبکه تنظیمی مرتبط با hsa_circ_0003098

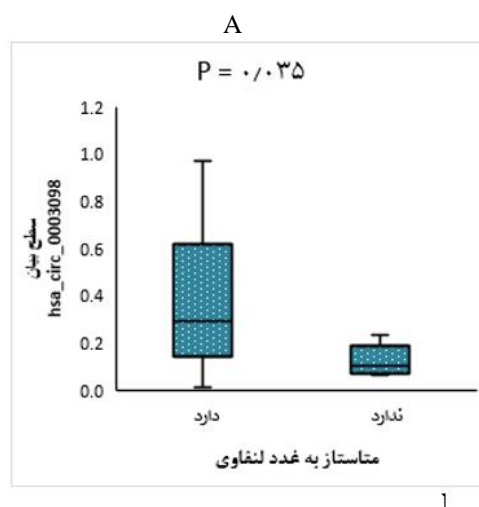
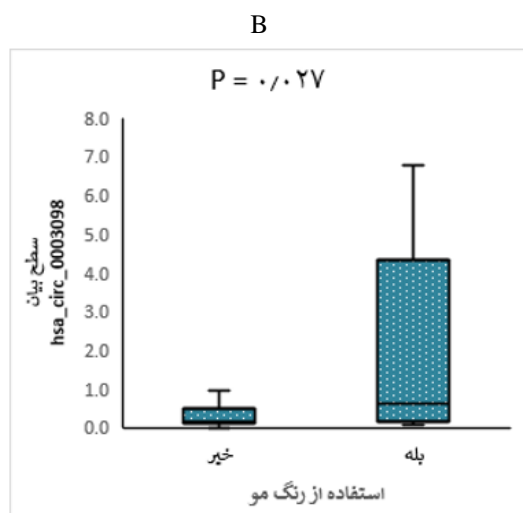
شبکه hsa_circ_0003098/miRNA/mRNA متشکل از circRNA، ۱ miRNA، ۲۴ و mRNA ۲۲۷ است. این شبکه دارای ۲۴ circRNA-miRNA، ۲۴۷ miRNA-mRNA و ۶۳۳ اینترکشن پروتئین-پروتئین است. در ادامه با تحلیل شبکه، miRNAها و mRNAهای پراهمیت تر که دارای اینترکشن های بیشتری بودند را در شبکه با بهره گیری از سه امتیاز Betweenness centrality و closeness centrality degree، شناسایی کرده و به جستجوی نقش آنها در پژوهش های مرتبط با سرطان پستان پرداخته شد. PTEN، EGFR، AKT1، HDAC1، STAT3، VEGFA، CCND1، CTNNB1، MAPK1، HIF1A، MTOR و RELA ژن های کدکننده پروتئین با بیشترین تعداد اینترکشن در شبکه بودند. miRNA با بیشترین اینترکشن ارتباطی نیز hsa-miR-210 بود (شکل ۳).



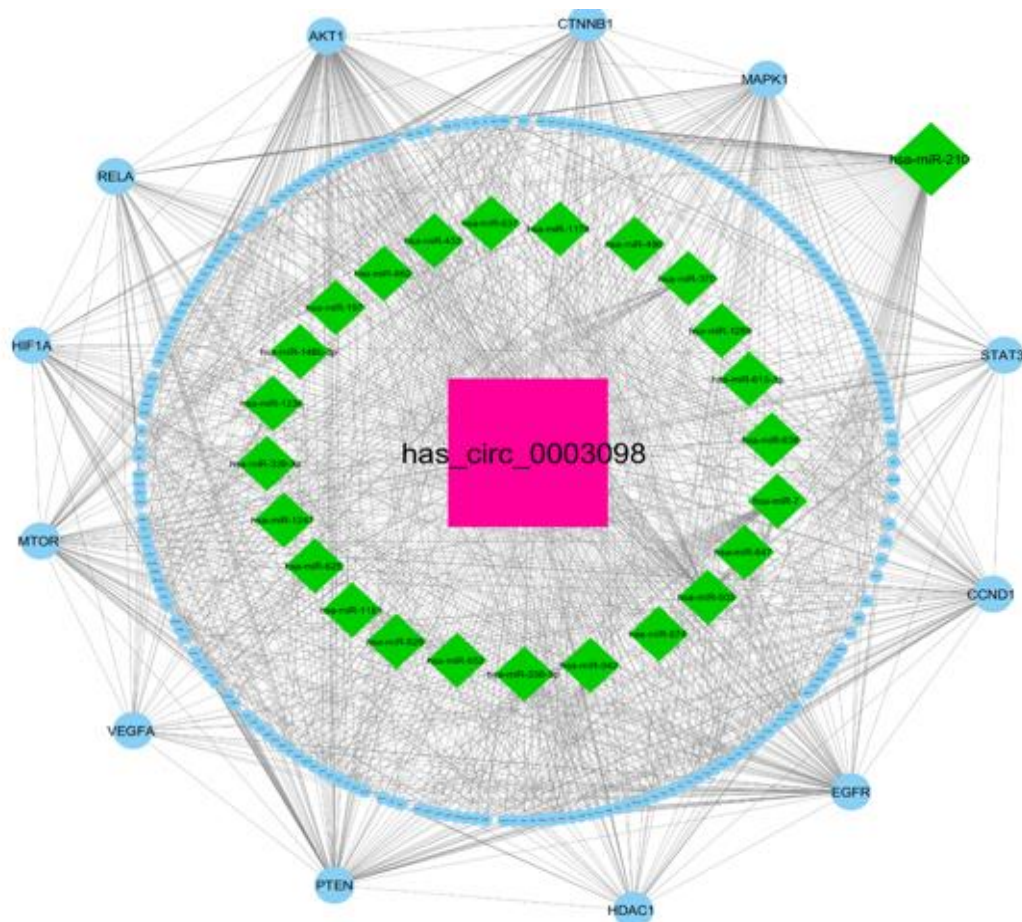
شکل ۱. مقایسه بیان hsa_circ_0003098 در بافت توموری و نرمال مجاور تومور.

جدول ۲. ارتباط بین میزان بیان hsa_circ_0003098 و اطلاعات جمعیت شناختی و کلینیکی پاتولوژی در بیماران مبتلا به سرطان پستان

hsa_circ_0003098 میزان بیان					
گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	p-value	
سن	<50	۱۹	۱,۸	۲۱۵۵,۴	۹۳۳۶,۶
	≥50	۲۶	۲,۱	۴,۲	۴,۸
اندازه تومور	<2,5	۲۸	۱,۶	۷,۸	۲۱,۴
	≥2,5	۱۷	۲,۲	۲۴۲,۶	۹۸۷۱,۸
گیرنده استروژن	منفی	۰	۰	۰	۰
	مثبت	۴۵	۲,۱	۹۱۲,۵	۶۰۶۷,۶
گیرنده پروژسترون	منفی	۲	۲,۱	۲,۰۱۵	۲,۱
	مثبت	۴۳	۲,۱	۹۵۴,۸	۶۲۰۷,۱
Her2 گیرنده	منفی	۳۲	۲,۱	۱۲۸۱,۰۸	۷۱۹۵,۱
	مثبت	۱۳	۲,۱	۵,۳	۶,۸
گرید نوکلئار	۱	۶	۴,۱	۲۳,۷	۴۴,۹
	۲	۳۱	۲,۱	۱۳۱۷,۱	۷۳۱۱,۱
	۳	۸	۱,۱	۱۱,۲	۲۳,۳
متاستاز به غدد لنفاوی	دارد	۳۲	۲,۹	۱۲۸۰,۲	۷۱۹۵,۳
	ندارد	۱۳	۱,۱	۷,۳	۱۸,۵
نوع کارسینوم تهاجمی	کارسینوم لوبولار	۱	۶,۱	۶,۱	۰
	کارسینوم داکتال	۴۴	۲	۹۳۳,۱	۶۱۳۶,۲
سن شروع قاعدگی (سال)	<14	۲۹	۱,۵	۶۶	۱۳,۰۵
	≥14	۱۶	۲,۳	۲۵۵۴,۵	۱۰۱۷۵,۱
شاخص توده بدنی	≤25	۱۷	۲,۱	۸,۴	۱۶,۴
	25-29	۲۰	۲,۱	۲۰۳۸,۵	۹۱۰۲,۵
	≥30	۸	۱,۹	۱۸,۸	۳۹,۲
سن اولین بارداری (منجر به فرزند (سال)	<25	۲۹	۲	۱۴۰۹,۶	۷۵۵۸,۵
	≥25	۱۲	۲,۱	۵,۳	۷,۳
استفاده از رنگ مو	بله	۹	۶,۱	۲۶,۰۴	۳۹,۳
	خیر	۳۶	۱,۶	۱۱۳۴,۱	۶۷۷۴,۵



شکل ۲. A. ارتباط بین بیان hsa_circ_0003098 و متاستاز به غدد لنفاوی. B. ارتباط بین بیان hsa_circ_0003098 و استفاده از رنگ مو.

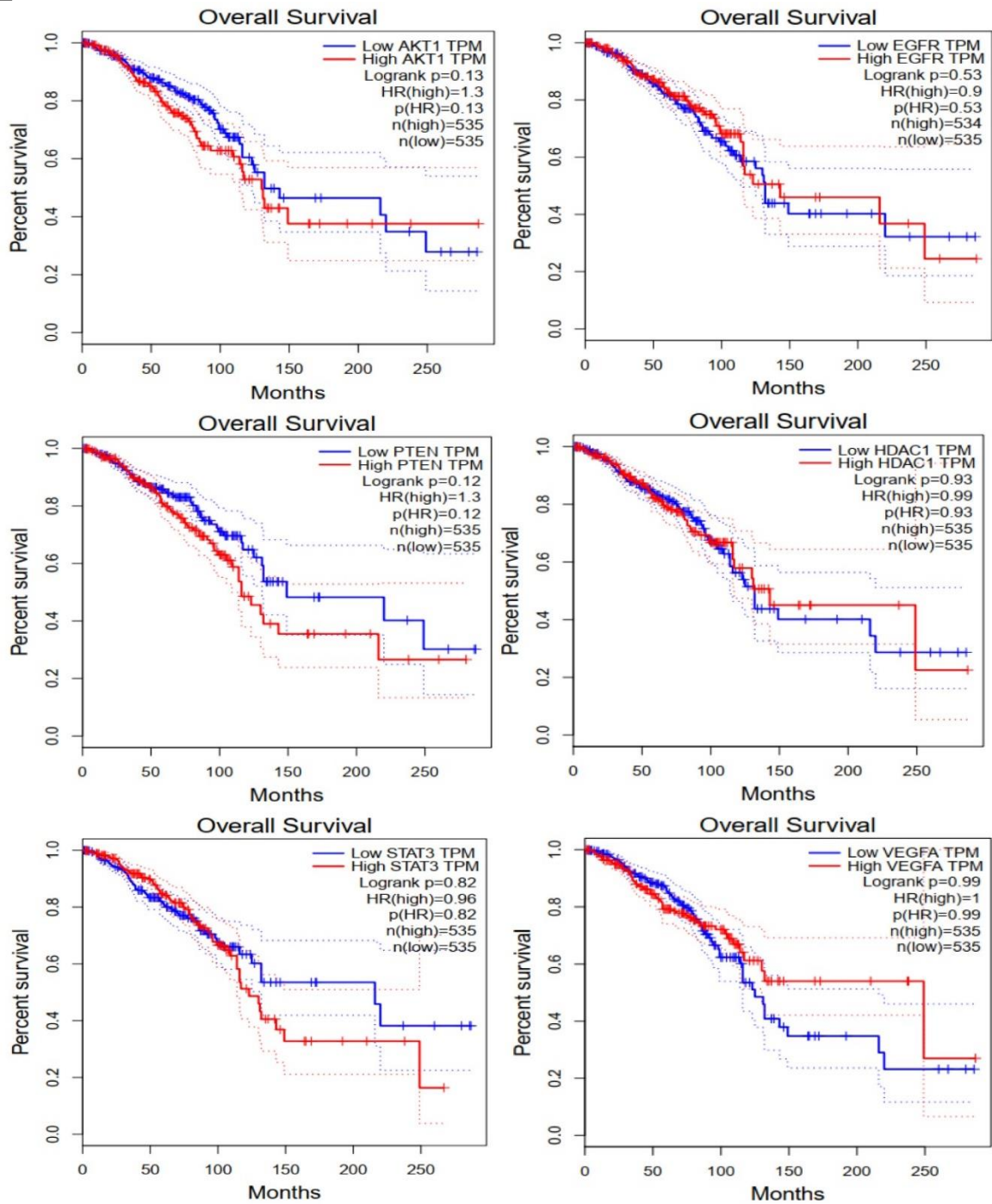


شکل ۳. شبکه hsa_circ_0003098/miRNA/mRNA. این شبکه با نرم افزار سایتواسکیپ ۳,۷,۲ رسم شده است. مستطیل صورتی رنگ نشان دهنده hsa_circ_0003098، لوزی های سبز miRNAهای مرتبط با این RNA حلقوی بوده و دایره ها mRNAهای مرتبط با miRNAها میباشند.

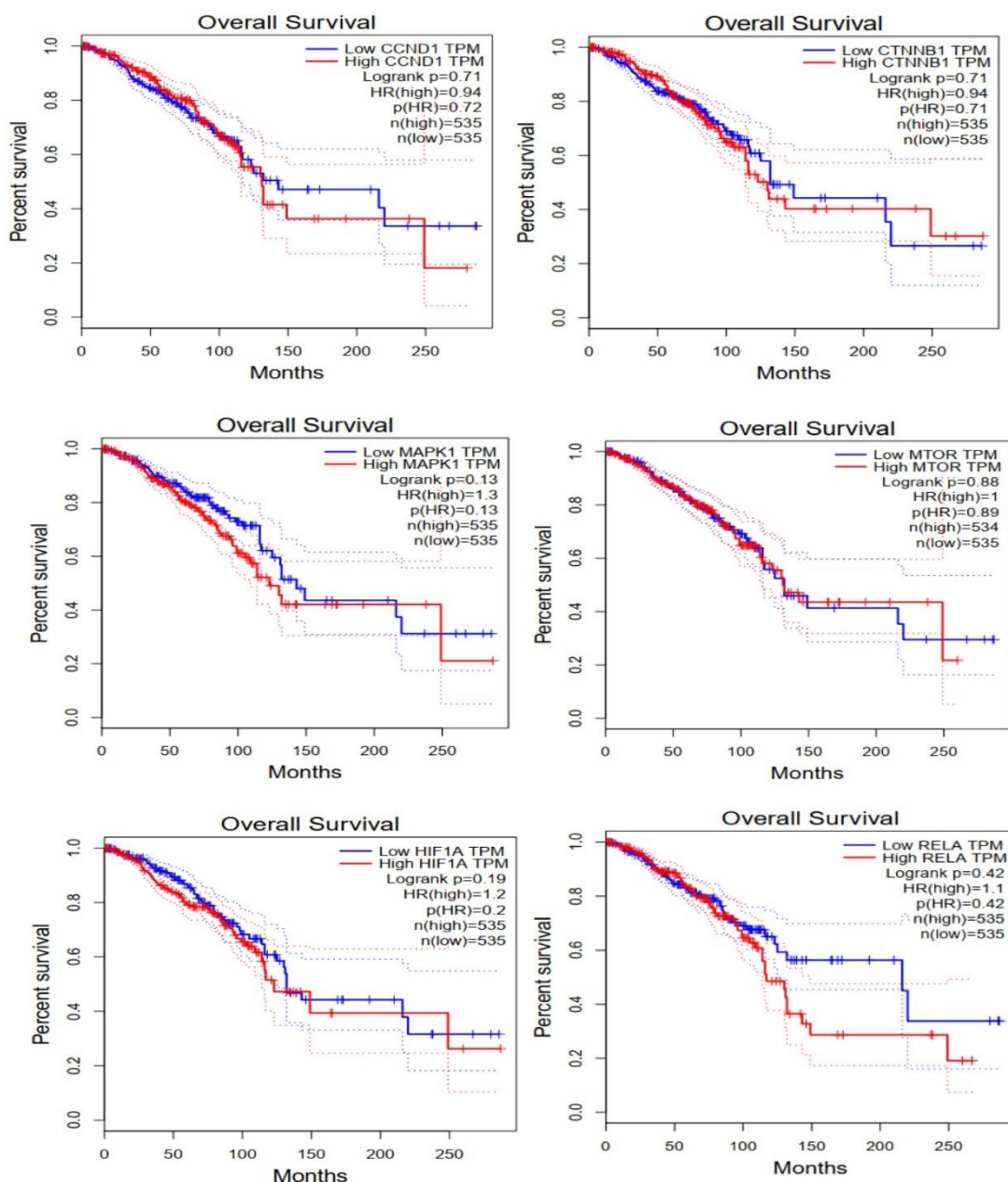
جدول ۳. مسیرهای مولکولی پراهمیت مرتبط با ژن های کد کننده دخیل در شبکه.

سایت منبع	P-value	تعداد ژن های در این مسیر	مسیرهای مولکولی پراهمیت
BioSystems: REACTOME	> 0.001	۵۴	Cytokine Signaling in Immune system
BioSystems: REACTOME	> 0.001	۵۱	Developmental Biology
BioSystems: REACTOME	> 0.001	۴۴	Signaling by Interleukins
MSigDB C2 BIOCARTA (v7.3)	> 0.001	۳۹	Pathways in cancer
MSigDB C2 BIOCARTA (v7.3)	> 0.001	۳۹	PI3K-Akt Signaling Pathway
BioSystems: KEGG	> 0.001	۳۹	Pathways in cancer
BioSystems: KEGG	> 0.001	۲۸	PI3K-Akt signaling pathway
BioSystems: REACTOME	> 0.001	۲۵	Signalling by NGF
BioSystems: KEGG	> 0.001	۳۴	MicroRNAs in cancer
BioSystems: REACTOME	> 0.001	۳۲	Fc epsilon receptor (FCERI) signaling

A



B



شکل ۴. نمودارهای تحلیل بقای مربوط به ژن های کدکننده پر اهمیت در شبکه.

مقادیر Log rank P-values که در پراتز نمایش داده شده است، در نمونه های کارسینوم تهاجمی پستان (BRCA) موجود در پایگاه اطلاعاتی GEPIA معنادار نبودند.

AKT1 (0.13), EGFR (0.53), PTEN (0.12), HDAC1 (0.93), STAT3 (0.82), VEGFA (0.99), CCND1 (0.71), CTNNB1 (0.71), MAPK1 (0.13), MTOR (0.88), HIF1A (0.19), RELA (0.42)

بحث:

سلول های توموری در سرطان های مختلف از جمله سرطان پستان تأثیرگذارند [۱۲]. هم چنین، RNA های حلقوی به دلیل پایداری بالا، حفاظت شدگی و بیان ویژه بافتی، به عنوان مارکرهای تشخیصی و پیش آگهی دهنده در آنکولوژی عمل می کنند [۸]. نتایج این مطالعه نشان داد که hsa_circ_0003098

شواهد زیادی نشان می دهد که RNA های حلقوی از طریق نقش های بیولوژیک خود، تأثیر به سزایی در سرطان پستان دارند. این RNA های غیر کدکننده از مسیر تنظیم فرآیند نسخه برداری، به دام انداختن miRNA ها، به دام انداختن پروتئین ها و تنظیم فرآیند ترجمه [۹-۱۱] روی رشد، تکثیر، تهاجم، مهاجرت و آپوپتوز

اندوکراین موجود در رنگ مو می توانند با ایجاد تغییرات اپی ژنتیک، اختلال در سنتز و متابولیسم هورمون های استروئیدی و عمل کردن به عنوان آگونیست یا آنتاگونیست گیرنده هورمون های استروئیدی روی ابتلا به سرطان پستان اثر بگذارند [۲۵، ۲۶]. این ترکیبات همچنین می توانند بر میزان بیان RNA های غیر کدکننده در سرطان پستان نیز تأثیرگذار باشند. به عنوان نمونه، می توانند موجب افزایش بیان miR-21 و کاهش بیان ژن های هدف آن در رده های سلولی سرطان پستان شوند [۲۷]. مطالعه حاضر برای نخستین بار ارتباط بین بیان یک RNA حلقوی و استفاده از رنگ مو را ارزیابی کرده است، اما مطالعات بیشتری برای نشان دادن ارتباط بین ترکیبات مختل کننده اندوکراین و بیان hsa_circ_0003098 نیاز است. به علاوه، این مطالعه نشان داد که در بیمارانی که متاستاز به غدد لنفاوی رخ داده است، hsa_circ_0003098 بیان بیشتری دارد. بنابر این یکی از سازوکارهای احتمالی که منجر به پیشرفت سرطان پستان و متاستاز به غدد لنفاوی می شود، افزایش بیان hsa_circ_0003098 خواهد بود.

نتیجه گیری:

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که hsa_circ_0003098 در تومورهای پستانی بیان افزایش یافته دارد. به علاوه، برای اولین بار آشکار شد که ارتباط معناداری بین میزان بیان hsa_circ_0003098 و متغیرهای جمعیت شناختی و کلینیکی پاتولوژی از جمله استفاده از رنگ مو و متاستاز به غدد لنفاوی در بیماران مبتلا به سرطان پستان وجود دارد. مطالعات بیوانفورماتیک نیز به اهمیت این RNA حلقوی در مسیره های تنظیمی مرتبط با پاتوژنز سرطان پستان تأکید کرده اند. به هر حال، پژوهش های بیشتری برای بررسی نقش و عملکرد hsa_circ_0003098 در سرطان پستان نیاز است.

تشکر و قدردانی:

مقاله حاضر با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی فسا انجام شده است. از تمام بیماران شرکت کننده در پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می شود.

بیان بیشتری در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور دارد. تعدادی از مطالعات، نقش کلیدی این RNA حلقوی را در مراحل پاتولوژیک سرطان های مختلف آشکار ساخته اند [۱۴-۱۶]. برای نمونه، hsa_circ_0003098 در سرطان کولورکتال در بافت توموری افزایش بیان می یابد و نقش آنکوژنی خود را از طریق مهار let-7d-5p و افزایش بیان ژن هدف آن، HMGA1، ایفا می کند. سرکوب این RNA حلقوی باعث مهار پیشرفت چرخه سلولی، مهاجرت و تهاجم در سرطان کولورکتال از طریق شبکه let-7d-5p/HMGA1 می شود [۱۴]. به علاوه، این RNA حلقوی در رده های سلولی سرطان کولورکتال از جمله HT29 و HCT116 نیز افزایش بیان می یابد [۱۵].

hsa_circ_0003098 در شروع و پیشرفت سرطان ریه نیز نقش دارد و سرکوب آن باعث مهار تکثیر سلولی در این سرطان می شود. hsa_circ_0003098 در سرطان ریه نقش آنکوژنی داشته و از طریق مهار miR-503 و افزایش بیان LARP1 باعث ارتقا تکثیر و تهاجم در سرطان ریه می شود [۱۶]. نتایج مطالعه حاضر مشابه مطالعات انجام گرفته در سرطان کولورکتال و ریه، نشان دهنده افزایش بیان و نقش آنکوژنی hsa_circ_0003098 در سرطان پستان بود. به علاوه، با مطالعات بیوانفورماتیک، شبکه بررسی های تکمیلی در خصوص اهمیت ژن های کدکننده مهم و miRNA های پراهمیت در این شبکه و مشخص شدن نقش کلیدی هر کدام از آن ها در سرطان پستان در مطالعات گذشته، می توان به اهمیت hsa_circ_0003098 در سرطان پستان تأکید کرد.

این مطالعه همچنین نشان داد که بیان hsa_circ_0003098 به طور مشخصی در بیمارانی که از رنگ مو استفاده می کردند، بیشتر از سایر بیماران بود. رنگ مو شامل مقدار زیادی از ترکیبات موتاژن و ترکیبات مختل کننده سیستم اندوکراین از جمله آمین های آروماتیک و ۴ آمینوبی فنیل است که نقش اساسی در بسیاری از سرطان های انسانی ایفا می کنند [۲۲، ۲۳]. ترکیب ۴ آمینوبی فنیل یک کارسینوژن است که می تواند مسیره های مرتبط با استروژن را به هم زده و بدین ترتیب خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهد [۲۴]. ترکیبات مختل کننده سیستم

References:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA: Cancer J Clin. 2019;69(1):7-34.
2. Al-Mansouri LJ, Alokail MS. Molecular basis of breast cancer. Saudi Med J. 2006;27(1):9-16.
3. Piao H-I, Ma L. Non-coding RNAs as regulators of mammary development and breast cancer. J Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2012;17(1):33-42.

4. Darbeheshti F, Mahdiannasser M, Noroozi Z, Firoozi Z, Mansoori B, Daraei A, et al. Circular RNA-associated ceRNA network involved in HIF-1 signalling in triple-negative breast cancer: circ_0047303 as a potential key regulator. *J Cell Mol Med*. 2021;25(24):11322-32.
5. Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet*. 2013;9(6):e1003569.
6. Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, Calin GA. Noncoding RNA therapeutics—Challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(8):629-51.
7. Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 2014;56(1):55-66.
8. Suzuki H, Zuo Y, Wang J, Zhang MQ, Malhotra A, Mayeda A. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(8):e63-e.
9. Han B, Chao J, Yao H. Circular RNA and its mechanisms in disease: from the bench to the clinic. *Pharmacol Ther*. 2018;187:31-44.
10. Wu J, Qi X, Liu L, Hu X, Liu J, Yang J, et al. Emerging epigenetic regulation of circular RNAs in human cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:589-96.
11. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441):384-8.
12. Wang X, Fang L. Advances in circular RNAs and their roles in breast Cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):1-12.
13. Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *Rna*. 2014;20(11):1666-70.
14. Ni Y, Lu C, Wang W, Gao W, Yu C. circBANP promotes colorectal cancer growth and metastasis via sponging let-7d-5p to modulate HMGA1/Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Ther Oncolytics*. 2021;21:119-33.
15. Zhu M, Xu Y, Chen Y, Yan F. Circular BANP, an upregulated circular RNA that modulates cell proliferation in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2017;88:138-44.
16. Han J, Zhao G, Ma X, Dong Q, Zhang H, Wang Y, et al. CircRNA circ-BANP-mediated miR-503/LARP1 signaling contributes to lung cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(4):2429-35.
17. Liu K, Zhang C, Li T, Ding Y, Tu T, Zhou F, et al. Let-7a inhibits growth and migration of breast cancer cells by targeting HMGA1. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2526-34.
18. Sharma P, Sharma V, Ahluwalia TS, Dogra N, Kumar S, Singh S. Let-7a induces metabolic reprogramming in breast cancer cells via targeting mitochondrial encoded ND4. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):1-13.
19. Liu F, Liu Y, Shen J, Zhang G, Han J. MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating fizzled 5 expression. *Oncotarget*. 2016;7(31):49130.
20. Long J, Ou C, Xia H, Zhu Y, Liu D. MiR-503 inhibited cell proliferation of human breast cancer cells by suppressing CCND1 expression. *Tumor Biol*. 2015;36(11):8697-702.
21. Abdollahzadeh R, Daraei A, Mansoori Y, Sepahvand M, Amoli MM, Tavakkoly-Bazzaz J. Competing endogenous RNA (ceRNA) cross talk and language in ceRNA regulatory networks: A new look at hallmarks of breast cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(7):10080-100.
22. Stiel L, Adkins-Jackson PB, Clark P, Mitchell E, Montgomery S. A review of hair product use on breast cancer risk in African American women. *Cancer Med*. 2016;5(3):597-604.
23. Turesky RJ, Freeman JP, Holland RD, Nestorick DM, Miller DW, Ratnasinghe DL, et al. Identification of aminobiphenyl derivatives in commercial hair dyes. *Chem Res Toxicol*. 2003;16(9):1162-73.
24. Hamblen EL, Cronin MT, Schultz TW. Estrogenicity and acute toxicity of selected anilines using a recombinant yeast assay. *Chemosphere*. 2003;52(7):1173-81.
25. Knowler KC, To SQ, Leung Y-K, Ho S-M, Clyne CD. Endocrine disruption of the epigenome: a breast cancer link. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(2):T33.
26. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342.
27. Teng Y, Manavalan TT, Hu C, Medjakovic S, Jungbauer A, Klinge CM. Endocrine disruptors fludioxonil and fenhexamid stimulate miR-21 expression in breast cancer cells. *Toxicol Sci*. 2013;131(1):71-83.

Potential role of hsa_circ_0003098 circular RNA in breast cancer and its association with demographic factors and lymph node metastasis

Zahra Firoozi¹, Elham Mohammadisoleimani², Mohammad Mehdi Naghizadeh³
Hosein Mansoori⁴, Yaser Mansoori^{5*}

Received: 2021.12.01

Revised: 2022.03.06

Accepted: 2022.05.17

1. MSc, Department of Medical Genetics, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
2. MSc, Department of Medical Biotechnology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
3. PhD, Noncommunicable Diseases Research Center, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
4. MD, Department of Medical Genetics, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
5. PhD, Department of Medical Genetics, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.1, Spring 2022

Pars J Med Sci 2022; 20(1):63-73

Abstract:

Introduction:

A growing amount of evidence has revealed that circular RNAs (circRNAs), covalently closed single-stranded non-coding RNAs (ncRNAs), play significant roles in initiation and progression of breast cancer (BC) through different mechanisms. This study aims to investigate the hsa_circ_0003098 expression and its potential roles in BC, as well as the circRNA/miRNA/mRNA crosstalk in these contexts.

Materials and Methods:

Real-time PCR (RT-PCR) was used to assess the expression of hsa_circ_0003098 in the breast tumors compared with adjacent normal tissues. Its association with different demographic and clinicopathological characteristics of BC patients was assessed by statistical analysis. Finally, we used bioinformatic approaches to uncover the potential circRNA/miRNA/mRNA axes using some databases and software.

Results:

Our results revealed that hsa_circ_0003098 expression is significantly upregulated in BC tumors compared with the adjacent normal tissues. Moreover, hsa_circ_0003098 over-expression is significantly associated with lymph node metastasis and hair dye use. Next, we found that this circRNA can regulate key mRNAs and miRNAs in the ceRNA network.

Conclusion:

It is suggested that hsa_circ_0006960, which is significantly up-expressed in breast tumors and associated with lymph node metastasis, could play key roles in the physiopathology of breast cancer through sponging off the miRNAs involved in hsa_circ_0003098/miRNAs/mRNAs network.

Keywords: Breast Cancer, Non-Coding RNAs, hsa_circ_0003098

* Corresponding author Email: fums.mansoori@gmail.com