مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۱: از ۷۱-۸۰
بهار ۱۳۹۰

بهینه‌سازی استخراج و تکثیر microRNA های mir-21، mir-141 و mir-205 در ادرار بیماران مبتلا به سرطان مثانه

نسیم قربانمهر[۱]، محمود تولایی[۲]، بهزاد عین‌اللهی[۳]، محمودرضا رفیعی[۱]، سیدجواد مولی[٤*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۳ پذیرش مقاله: ۹۰/۰۱/۱۶

چکیده

هدف: در حال حاضر روش‌های تشخیص سرطان مثانه از حساسیت و اختصاصیت لازم برخوردار نیست؛ بنابراین یافتن نشانگر های تومور جدید که حساسیت و اختصاصیت بالایی داشته باشد مورد توجه قرار گرفته است. microRNA ها (miRNA, miR) گروه بزرگی از RNA های کوچک مولکول و غیرکدکننده است که نقش مهمی در کنترل بیان ژن‌ها دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که الگوی بیان miRNA ها در سلول‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری تغییر می‌کند. این تغییرات، در اکثر سرطان‌ها اختصاصی و وابسته به نوع سرطان است. هدف از این مطالعه بهینه‌یابی روش استخراج RNA کل حاوی miRNA ها از ادرار و استفاده از آن به‌عنوان یک روش تکرارپذیر در بررسی حضور miRNA ها در ادرار مبتلایان به سرطان مثانه است.

مواد و روش‌ها: RNA کل از ادرار مبتلایان به سرطان مثانه و گروه کنترل با استفاده از محلول RNX و تریزول LS به دو روش اصلی و تغییر یافته استخراج شد. حضور miRNA های با وابستگی احتمالی به سرطان مثانه به روش Real-Time در این نمونه‌ها بررسی شد.

نتایج: روش‌های RNX و تریزول LS تغییر یافته، روش‌های مناسبی برای استخراج RNA از نمونه‌های ادرار است. سطح mir-21 در RNA های استخراج شده به روش تریزول LS تغییر یافته بالاتر از روش RNX بود. قابل ذکر است که مقایسه نمونه‌های ادرار منجمد و غیرمنجمد نشان دهنده سطح بالاتر microRNA ها در نمونه‌های منجمد بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه روشی آسان، تکرارپذیر و قابل اعتماد برای تشخیص تکثیر miRNA ها در نمونه‌های ادراری به‌دست آمد. براساس اطلاعات miRNA ها نشانگرهای مناسبی برای تشخیص اولیه و غربالگری سرطان مثانه است.

کلیدواژگان: ادرار، نشانگرهای تومور، microRNAs، سرطان مثانه

۱- مقدمه

microRNA ها گروه بزرگی از RNA های کوچک مولکول درون‌زاد، تک رشته‌ای و غیر کدکننده هستند که

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک مولکولی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: sjmowla@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

به‌عنوان RNA راهنما باعث خاموش شدن بیان ژن‌ها در مرحله پس از رونویسی می‌شود [۱]. تاکنون بیش از ۷۰۰ نوع microRNA در انسان شناسایی شده است (mirBase release 13.0). هرکدام از این microRNA ها تعدادی mRNA هدف دارد. آن‌ها عملکرد مهاری خود را با اتصال به این اهداف و القای تجزیه یا مهار ترجمه آن‌ها انجام می‌دهند [۲، ۳]. نقش microRNA ها در فرایندهای حیاتی متنوعی از جمله رشد سلولی، تکوین، آپوپتوز (Apoptosis) و تمایز سلولی ثابت شده است [٤، ٥] چگونگی عملکرد و تنظیم بیان microRNA ها هنوز تا حدود زیادی ناشناخته است و حتی پیچیده‌تر از آن شبکه تنظیمی است که microRNA ها با یکدیگر و با ژن‌های هدف خود تشکیل می‌دهد.

مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان دهندهٔ وجود الگوی منحصربه‌فردی از microRNA ها در بافت‌های مختلف بدن و تغییر این الگو در برخی بیماری‌ها از جمله سرطان است [٦]. محققان نشان دادند که microRNA ها ابزار مناسبی برای طبقه‌بندی تومورها است [۷، ۸]. به‌تازگی microRNA ها در مایعات بدن مانند خون محیطی نیز شناسایی و ردیابی شده است [۹-۱۲]. این یافته باعث شد امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی آینده مطرح شود [۱۳-۱٦]. در این زمینه مطالعات زیادی برای بیماری‌های مختلف و به‌ویژه انواع سرطان‌ها در حال انجام است.

سرطان مثانه از جمله سرطان‌های شایع با میزان مرگ و میر بالا است [۱۷]. در این سرطان نیز مانند دیگر انواع سرطان‌ها تشخیص زود هنگام، هزینه‌های درمان را کاهش داده، امکان پاسخ به درمان و احتمال بهبودی را افزایش می‌دهد. روش رایج تشخیص در این سرطان سیستوسکوپی (Cystoscopy) است که روشی دردناک، تهاجمی و پرهزینه است. روش‌های آزمایشگاهی دیگری هم وجود دارند مانند آزمون‌های BTA (Bladder Tumor Antigen)، FDP (Fibrin Degradation Products) و ... که با وجود سهولت انجام، دقت و اختصاصیت کمی دارد. بنابراین نیاز به روش‌های جدید که آسان کم هزینه و غیرتهاجمی باشد و در حد امکان قابلیت ردگیری سریع تغییرات اولیه مولکولی را داشته باشد، احساس می‌شود. در این راستا microRNA های موجود در مایعات بدن که نمایانگر تغییرات فیزیولوژیک بدن است می‌تواند انتخاب خوبی برای ردیابی بدخیمی‌های مثانه در ادرار فرد باشد.

microRNA ها به دلیل ساختار کوچک و ویژهٔ خود از پایداری بالایی در شرایط مختلف محیطی برخوردار بوده و در برابر انجماد و ذوب مکرر مقاوم‌تر از سایر انواع RNA است و بر خلاف اکثر پروتئین‌ها، pH اسیدی و قلیایی و رقت‌های مختلف نمکی را به‌خوبی تحمل می‌کند. به همین دلیل می‌توان آن‌ها را به‌عنوان یک نشانگر زیستی ایده‌آل مطرح نمود [۱۸]. از سوی دیگر ادرار به دلیل ویژگی‌های خاص خود نمونه بسیار مناسبی برای بررسی بدخیمی‌های مثانه است. جمع‌آوری نمونه ادرار آسان و غیرتهاجمی است و در شرایط مختلف و به دفعات امکان جمع‌آوری نمونه برای پیگیری روند بیماری و غربالگری افراد سالم و مشکوک وجود دارد. در ضمن پروتئین‌های مهار کنندهٔ PCR که در سرم فراوان است، در ادرار به میزان کمتری یافت می‌شود و در نهایت ادرار به دلیل تماس مستقیم با سیستم و مجاری ادراری نمونه بسیار مناسبی برای بررسی بدخیمی‌های مثانه است.

اولین گام برای استفاده از microRNA های موجود در ادرار به‌عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی، داشتن یک روش دقیق و تکرارپذیر برای استخراج، ردیابی و سنجش میزان microRNA های این نمونه است. با توجه به مشکلات استخراج RNA از ادرار در این مقاله تمرکز محققان حاضر بر بررسی روش‌های استخراج RNA کل (حاوی microRNA ها) و یافتن مناسب‌ترین روش است. بررسی دقت و تکرارپذیری روش مورد نظر، کاربرد دو RNA کوچک مولکول U6 snRNA و 5s rRNA به‌عنوان کنترل داخلی و بررسی حضور چهار microRNA: mir-21، mir-141، mir-127 و mir-205 مرتبط با سرطان مثانه، دیگر مواردی است که در مطالعه حاضر به آن‌ها پرداخته می‌شود.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه ادرار

نمونه ادرار بیماران از مردان مبتلا به سرطان مثانه بستری در بخش اورولوژی و نفرولوژی بیمارستان بقیه ا... جمع‌آوری شد. جمع‌آوری نمونه مردان گروه کنترل در آزمایشگاه پاتولوژی قلهک انجام شد. برای تأیید سلامت این افراد یک بررسی کامل خون و ادرار شامل آزمون PSA (Prostate-Specific Antigen)، سونوگرافی کلیه، مثانه، پروستات و ویزیت اورولوژی صورت گرفت. نمونه‌گیری‌ها به‌طور آگاهانه و با رضایت کامل فرد انجام شدند. نمونه‌ها در لوله‌های اپندورف تقسیم شد و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲- استخراج RNA کل

به‌منظور استخراج RNA کل، نمونه‌های ادرار به پنج گروه تقسیم شد و استخراج به روش‌های زیر انجام شد (جدول ۱). نمونه‌های مورد بررسی در این گروه‌ها به‌طور اتفاقی از افراد کنترل و بیمار انتخاب شد.

جدول ۱: روش‌های مورد استفاده برای استخراج RNA کل از ادرار

نام گروه	محلول استخراج	حجم نمونه (میکرولیتر)	مجاورت با پروتئیناز K*	روش استخراج	تعداد نمونه
گروه ۱	تریزول LS (Invitrogen)	۲۵۰	خیر	طبق دستورالعمل کمپانی	۱۲
گروه ۲	تریزول LS (Invitrogen)	۵۰۰	خیر	طبق دستورالعمل کمپانی	۸
گروه۳	تریزول LS (Invitrogen)	۵۰۰	بلی	طبق دستورالعمل کمپانی	۱۰
گروه٤	تریزول LS (Invitrogen)	۵۰۰	بلی	با ایجاد تغییراتی در دستورالعمل کمپانی**	۲۲
گروه ۵	RNX (ایران)	۵۰۰	بلی	طبق دستورالعمل کمپانی	۱۱

* به‌منظور مجاورت نمونه‌ها با پروتئیناز k ۵۰ میکرولیتر از این آنزیم (TAKARA ، ژاپن) به ۵۰۰ میکرولیتر نمونه افزوده شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله استخراج انجام شد.

** تغییرات انجام شده در روش استخراج به این صورت بود که در مرحله رسوب‌دهی RNA از اتانول ۱۰۰ درصد حجمی/حجمی به‌جای پروپان‌دیول (Propanediol) استفاده شد و نمونه به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس لوله به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. در مرحله محلول‌سازی، رسوب RNA در ٤۰ میکرولیتر آب مجاور شده با DEPC (Diethylprocarbonate) (سیناژن، ایران) حل شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

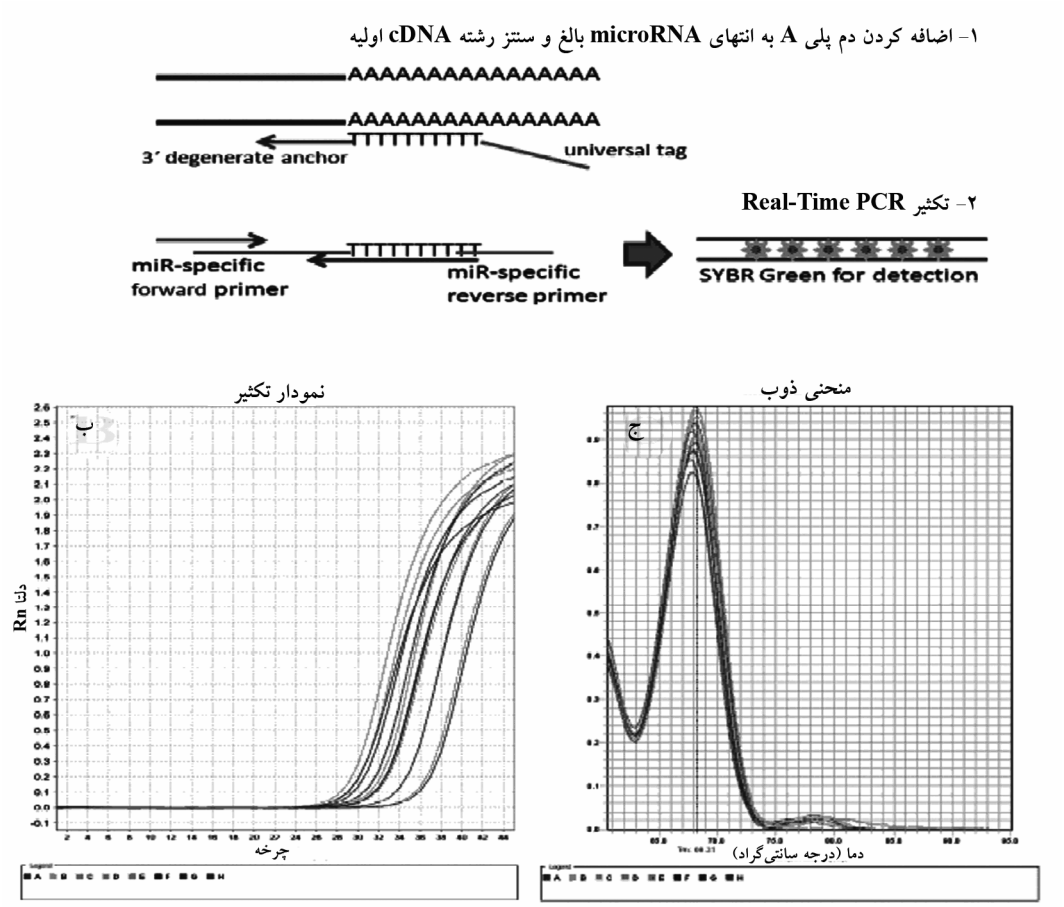
در پایان کمیت و کیفیت تمام RNA های استخراج شده در گروه‌های مختلف با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-1000 (Thermo scientific, Wilmington, DE) بررسی شد.

۲-۳- انجام Real-Time RT-PCR

برای مقایسه سطوح miRNA ها در RNA کل استخراج شده در گروه‌های چهار (تریزول LS تغییر یافته) و پنج (RNX)، حجم مساوی ۵۰۰ میکرولیتر از سه نمونه (۲ بیمار و یک کنترل) به هر دوی این روش‌ها استخراج شد و سپس ٤ میکرولیتر از RNA کل حاصل با آنزیم DNase I (Fermentas) مجاور شد. ۵ میکرولیتر از ۱۰ میکرولیتر محصول این مرحله با استفاده از کیت سنتز cDNA (Exiqon, Denmark, product # 203300) پلی‌آدنیله شده و cDNA ساخته شد. سپس محصول cDNA به نسبت ۱:۲۰

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

رقیق شد و ۸ میکرولیتر از آن برای بررسی حضور mir-21, 141, 127, 205 و U6 snRNA در این نمونه‌ها با استفاده از روش Real-time qRT-PCR و مخلوط سایبر گرین (Exiqon product # 203400) استفاده شد. برای این بررسی از آغازگرهای (Primers) حاوی LNA (Locked Nucleic Acid) تهیه شده از شرکت Exiqon استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱ شکل شماتیک از روش ساخت cDNA و تکثیر microRNA ها به کمک Real-Time RT-PCR؛ **الف)** اضافه کردن دم پلی A به انتهای '۳ microRNA بالغ و ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای پلی T، تکثیر cDNA حاصل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی LNA و بررسی محصول در روش Real-Time PCR با استفاده از رنگ سایبر گرین، **ب)** نمودار تکثیر miR-21 در نمونه‌های ادرار، **ج)** منحنی ذوب محصول تکثیر miR-21 در نمونه‌های ادرار

به‌منظور مطالعه تکرارپذیری بررسی‌ها، RNA کل از ۸ نمونه مختلف (۵ طبیعی و ۳ بیمار) به روش تریزول تغییر یافته، استخراج شد. برای هر نمونه ۲ بار cDNA ساخته شد و mir-21 و 5srRNA به‌صورت دو نسخه‌ای (Duplicate) بررسی شد. دو تکرار مربوط به هر نمونه در زمان‌های جداگانه انجام شد.

برای بررسی حضور miR-21، miR-141، miR-127، miR-205 در نمونه‌های ادرار، یک مخلوط از ۱۰ نمونه مختلف برای هر یک از دو گروه مورد بررسی (افراد کنترل و افراد مبتلا به سرطان مثانه) تهیه شد. برای تهیه مخلوط نمونه‌ها ۵۰ میکرولیتر از نمونه ۱۰ فرد هر گروه مخلوط شده و به حجم کلی ۵۰۰ میکرولیتر رسید. RNA کل این مخلوط‌ها به روش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

تریزول LS تغییر یافته استخراج شد. حضور miR-21، miR-141، miR-127، miR-205 به روش ذکر شده و به‌صورت دو نسخه‌ای بررسی شد.

۲-٤- تکثیر 5s rRNA به‌عنوان کنترل داخلی

حضور 5srRNA در مخلوط نمونه‌های فوق بررسی شد سپس ۲۲ نمونه مختلف (بیمار و کنترل) انتخاب شد و میزان این RNA کوچک مولکول در آن‌ها به روش Real-Time به‌صورت دو نسخه‌ای بررسی شد.

۲-۵- بررسی اثر انجماد بر تکثیر microRNA های موجود در ادرار

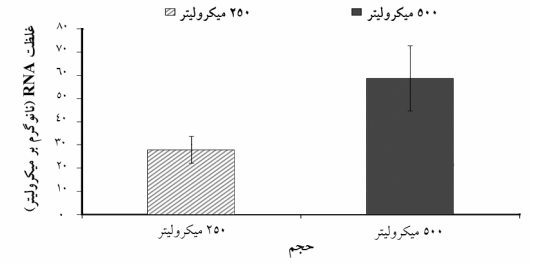
به این منظور RNA کل از ٤ نمونه مختلف تازه و منجمد نشده با روش تریزول LS تغییر یافته استخراج شد. در همان زمان حجم ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و منجمد شد. بعد از ۵ روز RNA کل از این نمونه‌های منجمد استخراج شد. محصول RNA هر دو گروه در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ده روز بعد به‌طور همزمان دو microRNA miR-21 و miR-141 و 5s rRNA به روش ذکر شده، در آن‌ها بررسی شد.

۲-٦- تجزیه و تحلیل‌های آماری

داده‌های مربوط به غلظت و خلوص (نسبت جذب در طول موج‌های ۲٦۰/۲۸۰) با استفاده از آزمون‌های آماری غیرپارامتری unpaired Mann-whitney U و ویلکاکسون (Wilcoxon) مقایسه و بررسی شد. مقدار P<۰/۰۵ به‌عنوان معیار معنی‌داری در تمام آزمون‌ها در نظر گرفته شد. تکرارپذیری و همبستگی نتایج Real-Time با استفاده از آزمون‌های آلفای کرونباخ (Cronbach's α) و T-test سنجیده شد. تمام آزمون‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

۳- نتایج

طراحی این مطالعه به‌منظور یافتن یک دستورالعمل قابل اعتماد و تکرارپذیر برای استخراج RNA کل حاوی miRNA ها صورت گرفت.



نمودار ۱ تأثیر حجم نمونه ادرار بر غلظت RNA کل حاصل از استخراج؛ مقایسه دو حجم ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرولیتر از ادرار اختلاف معنی‌دار غلظت RNA کل در بین آن دو را نشان می‌دهد. P value کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نمودار ۲ تأثیر مجاورت ادرار با پروتئیناز k بر کیفیت RNA کل استخراج شده؛ مقایسه شدت جذب نوری در دو گروه تریزول و تریزول+پروتئیناز K، تأثیر معنی‌دار افزودن پروتئیناز بر خلوص RNA K کل استخراج شده را نشان می‌دهد (P value>۰/۰۵).

۳-۱- تأثیر حجم نمونه، مجاورت با پروتئیناز و تغییرات دستورالعمل بر محصول RNA کل

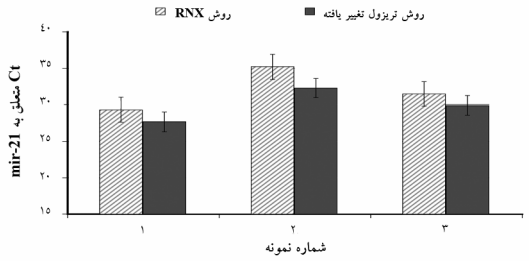
مقایسه دو حجم اولیه ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرولیتر از ادرار نشان داد که افزایش حجم نمونه باعث افزایش غلظت RNA (۳۳/٤ نانوگرم بر میکرولیتر در گروه یک در مقابل ۷۵/۳۸ نانوگرم بر میکرولیتر در گروه دوم). اختلاف این دو غلظت با P=۰/۰۲ معنی‌دار بود (نمودار ۱). خلوص (نسبت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

جذب در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰) RNA بـه‌دسـت آمـده در این دو گروه (۱/۴۳ در گروه یک در مقابل ۱/۴۹ در گـروه دو) اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌داد.

مجاورت نمونـه‌هـا بـا پروتئینـاز نـسبت جـذب در طـول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ را از ۱/۴۹ در گروه دو بـه ۱/۶۶ در گـروه سه افزایش داد (نمودار ۲)؛ اما این تغییر اختلاف معنـی‌داری در غلظت RNA ایجاد نکرد.

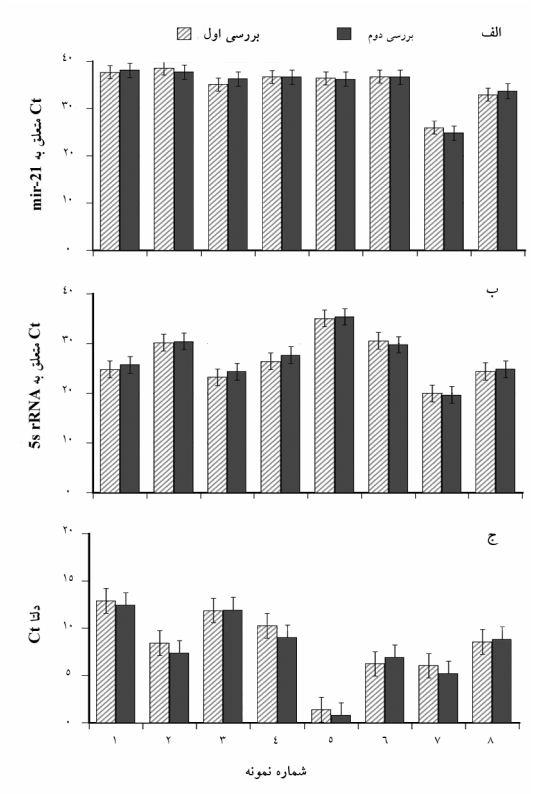
ایجاد تغییرات جزیی در دستورالعمل تریزول LS، هرچنـد باعث بهبود غلظت از ۴۳/۳۱ در گروه سه به ۵۲/۷۷ نانوگرم بر میکرولیتر در گروه چهار شد؛ اما تجزیه و تحلیـل‌هـای آمـاری نـشان داد کـه ایـن اخـتلاف معنـی‌دار نیـست. نـسبت جـذب ۲۶۰/۲۸۰ در گروه چهار (۱/۸۱) بـه‌طـور معنـی‌داری بـالاتر از گـروه سـه (۱/۶۶) بـود (P=۰/۰۰۶). مقایـسه بـین دو روش استخراج تریزول LS تغییر یافتـه و RNX (گـروه‌هـای ٤ و ٥) اختلاف معنی‌داری را در غلظـت و خلـوص RNA حاصـل از این دو روش نشان نداد.



نمودار ۳ میانگین مقادیر miR-21 Ct در نمونه‌های ادرار استخراج شـده بـه دو روش تریزول تغییر یافته و RNX؛ مقایسه میـانگین مقـادیر miR-21 Ct در نمونه‌های ادرار استخراج شده به دو روش تریـزول تغییـر یافتـه و RNX نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در محتوای miR-21 در بین محصولات RNA حاصل از این دو روش است.

۳-۲- تأثیر روش استخراج در غلظت microRNAها

نتایج Real-Time روی سه نمونه استخراج شده به هـر دو روش فوق (تریزول LS تغییر یافتـه و RNX) نـشان داد کـه بـا وجود عدم تفاوت در کیفیت و کمیت RNA استخراج شـده بـه این دو روش، میانگین Ct بـرای mir-21 در روش تریـزول LS تغییر یافته پـایین‌تـر از روش RNX اسـت (نمـودار ۳). حـضور u6 snRNA در هر سه نمونه فوق غیرقابل تشخیص بود.



نمودار ٤ تکرارپذیری روش و نتایج به‌دست آمده در ۸ نمونه مختلف؛ **الـف و ب)** نـشان دهنـده Ct هـای دو تکـرار سـنجش miR-21 و 5s rRNA در ۸ نمونه مختلف است. **ج)** نمایانگر ΔCt های محاسبه شده بـرای دو تکـرار بررسی ۸ نمونه مذکور است. نتایج به‌دست آمده از دو بار سنجش هر نمونـه در روزهای مختلف نشان دهنده تکرارپذیری نتایج است.

۳-۳- تکرارپذیری و همبستگی نتایج در تکرارهای مختلف

بررسی‌ها همبـستگی معنـی‌داری را بـین نتـایج تکرارهـای مختلف سنجش mir-21 و همچنـین 5srRNA در هـر نمونـه نشان داد. همبستگی بین دو سنجش mir-21 در هـشت نمونـه مختلف ۰/۹۸۵ و بـرای 5srRNA ۰/۹۸۹ بـا مقـدار P=۰/۰۰۰

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

بود. مقدار آلفای کرونباخ این سنجش برای mir-21 ۰/۹۹۱ و برای 5srRNA ۰/۹۹۵ بود. از آن‌جایی که ΔCt از اهمیت ویژه‌ای در محاسبات کمّی در واکنش‌های Real-Time برخوردار است، به‌منظور اثبات دقت و تکرارپذیری سنجش، ΔCt های این دو سنجش به‌دست آمد به این طریق که Ct 5srRNA در هر سنجش از mir-21 Ct در همان سنجش کم شد. همبستگی بین دو ΔCt در این ۸ نمونه ۰/۹۹۰ و آلفای کرونباخ آن ۰/۹۹۵ بود (نمودار ٤).

۳-٤- تعیین حضور miR-21، miR-141 و miR-205 در نمونه‌های ادرار

بررسی حضور چهار microRNA: miR-21، miR-141، miR-127، miR-205 در مخلوط نمونه‌ها نشان داد که غیر از miR-127 که در هیچ‌یک از دو گروه حضور نداشت، وجود سایر microRNA در هر دو گروه بیمار و کنترل قابل تشخیص بود.

۳-۵- بررسی تکثیر U6 snRNA و 5s rRNA به‌عنوان کنترل داخلی

U6 snRNA در اکثر نمونه‌های مورد بررسی غیرقابل تشخیص بود، بنابراین استفاده از آن به‌عنوان کنترل داخلی امکان‌پذیر نبود. بررسی حضور 5s rRNA در مخلوط نمونه‌های دو گروه بیمار و کنترل، نشان دهنده وجود این RNA کوچک مولکول در حد قابل توجهی در نمونه‌ها بود. سپس بررسی روی ۲۲ نمونه مجزای بیمار و کنترل انجام شد و مشخص شد که 5s rRNA در تمام نمونه‌ها وجود دارد.

۳-٦- اثر انجماد- ذوب بر کیفیت تکثیر microRNA ها

نتایج بررسی‌های کمّی نشان داد که Ct های miR-21، miR-141 و 5s rRNA در حالت تازه در سه نمونه از چهار نمونه مورد بررسی به‌طور قابل توجهی بالاتر از حالت منجمد است و نمونه چهارم اختلاف چندانی را نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۲ مقایسه میزان miR-21، miR-141 و 5s rRNA در نمونه‌های تازه و منجمد؛ Ct های پایین‌تر در شکل منجمد نمونه‌ها مشاهده می‌شود.

شماره نمونه	نمونه ۱		نمونه ۲		نمونه۳		نمونه٤	
RNA	قبل از انجماد	بعد از انجماد	قبل از انجماد	بعد از انجماد	قبل از انجماد	بعد از انجماد	قبل از انجماد	بعد از انجماد
Ct miR-21	۳٤/٦۰	۳۰/۷٦	۳۱/٤۱	۳۲/۰۲	۳٦/٦٥	٦٤/۳۳	۳٦/٦٥	۳۲/۹٤
Ct miR-141	۳٥/۳۷	۳۱/۷۰	۳۱/۷۳	۳۲/۹۷	۳٥/۳۹	۳۰/۸۲	۳٦/٤٤	۳۳/٥٤
Ct 5s rRNA	۲٦/۲۹	۲۳/٥۱	۲۲/۱٤	۲۲/٤۷	۲۷/٦٦	۸۲/۲٤	۲٦/٤۰	۲٤/۳۹

٤- بحث

در پژوهش حاضر تلاش شد تا روش‌های استخراج RNA از ادرار بهینه‌یابی شود. روشی، مناسب است که بتواند این microRNA های دارای نقش احتمالی نشانگر زیستی را به‌طور قابل اعتماد و تکرارپذیر استخراج کند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در صورت داشتن حجم بالایی از نمونه ادرار، میزان مصرف تریزول برای استخراج RNA به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد که این موضوع از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد و مطالعات هم نشان داده است که نیازی به این حجم بالای ادرار نمی‌باشد. با رقیق‌سازی‌های متوالی ادرار (فرمول زیر) مشخص می‌شود که مقدار RNA به‌کار رفته برای تکثیر هریک از microRNAها، محصول حدود ۰/۵ میکرولیتر از حجم اولیه ادرار است.

میکرولیتر ۵/ ۰=۱/۵۰×۱/۲×۱/۱۰×۵۰۰ میکرولیتر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

از بین پنج گروه مورد مطالعه بیشترین کمیت و بهترین کیفیت RNA متعلق به گروه‌های چهار و پنج (تریزول LS تغییر یافته و RNX) بود. با وجود این‌که اختلاف این دو از نظر آماری معنی‌دار نبود، اما نتایج Real-Time نشان داد که قابلیت تریزول LS در حفظ و نگهداری RNA های کوچک مولکول مانند microRNA ها بیشتر است.

در مطالعات قبلی ارتباط برخی از microRNA ها با سرطان مثانه در نمونه‌های بافتی این سرطان‌ها گزارش شده بود [۱۹-۲۱]. در بین این microRNA ها تغییر فاحش بیانی چهار miR مورد بررسی در این تحقیق در اکثر مقالات ذکر شده بود. در این مطالعه محققان حاضر سعی بر بررسی حضور این چهار miR در ادرار افراد مبتلا به سرطان مثانه در مقایسه با گروه کنترل داشتند. از بین این miR، miR-127 در نمونه‌های بیماران و گروه کنترل یا قابل تشخیص نبود یا به مرزهای انتهایی تشخیص بسیار نزدیک بود. سایر microRNA ها در اکثر نمونه‌ها حضور داشت. این می‌تواند اولین گام در استفاده از این microRNA ها به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی سرطان مثانه باشد.

در مورد کنترل‌های داخلی، حضور U6 snRNA در اکثر نمونه‌های مورد بررسی یا قابل تشخیص نبود یا به مرزهای انتهایی تشخیص نزدیک بود (Ct بالای ۳۸). این یافته‌ها با گزارشی که اخیراً توسط هنک (Hanke) و همکارانش ارایه شده بود تطابق داشت [۱۰]. بنابراین U6 snRNA نمی‌تواند کنترل داخلی مناسبی برای نمونه‌های ادرار باشد. یک کنترل داخلی مناسب باید دو خصوصیت کلیدی داشته باشد؛ اول این‌که در تمام نمونه‌های گروه آزمون و کنترل به میزان قابل قبولی بیان داشته باشد و دیگر این‌که این بیان تحت تأثیر عامل مورد بررسی نباشد به‌عنوان مثال اگر مطالعه روی نمونه‌های سرطانی انجام می‌شود، میزان کنترل داخلی نباید تحت تأثیر فرایند تومورزایی باشد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بیانگر آن است که 5s rRNA برخلاف U6 snRNA کنترل داخلی مناسبی برای نمونه‌های ادرار است. زیرا در تمام نمونه‌ها به میزان قابل قبولی حضور دارند و میزان آن نیز در نمونه‌های مختلف از ثبات خوبی برخوردار است.

تکرار روند بررسی روی نمونه‌های مختلف نشان می‌دهد که دستورالعمل مورد استفاده روشی تکرارپذیر و قابل اعتماد است و به همین دلیل می‌توان از آن برای بررسی microRNA های ادراری به‌عنوان نشانگر زیستی برای تشخیص انواع بیماری‌ها از جمله سرطان مثانه استفاده نمود. به‌ویژه همبستگی و مشابهت ΔCt های به‌دست آمده از تکرار بررسی روی نمونه یک فرد دلیل خوبی برای تکرارپذیر بودن روش مورد استفاده است.

یافته دیگری که مناسب بودن microRNA های ادراری به‌عنوان نشانگر زیستی تقویت می‌کند، مقاومت آن‌ها در مقابل روند انجماد است [۱۸]. نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که روند انجماد و ذوب نه تنها باعث کاهش قدرت تشخیص microRNA ها در ادرار نمی‌شود بلکه اثر مثبت هم دارد. حتی اگر این افزایش ایجاد شده معنی‌دار نباشد، باز می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که فرایند انجماد نمونه و بررسی با تأخیر آن که معمولاً در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی انجام می‌شود تأثیر منفی بر نمونه ندارد.

۵- تشکر و قدردانی

با تشکر و سپاس از مرکز تحقیقات اورولوژی و نفرولوژی و بخش اورولوژی مردان بیمارستان بقیه ا...، برای تأمین بخشی از هزینه‌های مالی این تحقیق و نمونه‌های بیماران، جناب آقای دکتر لواسانی برای همکاری صمیمانه در جمع‌آوری نمونه‌های گروه کنترل و آزمایشگاه تشخیص طبی قلهک که در بررسی سلامت مراجعین گروه کنترل ما را یاری فرمودند.

٦- منابع

[1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116(2):

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

281-97.

[2] Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniataki E, Mourelatos Z. The microRNA world: small is mighty. Trends Biochem Sci 2003; 28(10): 534-40.

[3] Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. Biol Reprod 2010; 82(4): 791-801.

[4] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006; 6(11): 857-66.

[5] Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. Curr Opin Genet Dev 2005; 15(4): 410-5.

[6] Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(7): 2257-61.

[7] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435(7043): 834-8.

[8] Tam W. The emergent role of microRNAs in molecular diagnostics of cancer. J Mol Diagn 2008; 10(5): 411-4.

[9] Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. Expert Opin Biol Ther 2009; 9(6): 703-11.

[10] Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. Urol Oncol 2010; 28(6):655-61.

[11] Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. Int J Legal Med 2010; 124(3): 217-26.

[12] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. Clin Cancer Res 2009; 15(17): 5473-7.

[13] Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. PPlasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. Int J Cancer 2010; 127(1): 118-26.

[14] Rosell R, Wei J, Taron M. Circulating MicroRNA Signatures of Tumor-Derived Exosomes for Early Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer 2009; 10(1): 8-9.

[15] Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106(11): 4402-7.

[16] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[19] Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P, Sevignani C, Byrne D, Negrini M, Pagano F, Gomella LG, Croce CM, Baffa R. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. Urol Oncol 2007; 25(5): 387-92.

[20] Wang G, Zhang H, He H, Tong W, Wang B, Liao G, Chen Z, Du C. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. Int Urol Nephrol 2010; 42(1): 95-102.

[21] Dyrskjøt L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, Silahtaroglu AN, Lamy P, Ramanathan R, Fristrup N, Jensen JL, Andersen CL, Zieger K, Kauppinen S, Ulhøi BP, Kjems J, Borre M, Orntoft TF. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. Cancer Res 2009; 69(11): 4851-60.

Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. PloS One 2008; 3(9): e3148.

[17] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010; 60(5): 277-300.

[18] Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Res 2008; 18(10): 997-1006.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]