ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(2):97-102

Over Expression of Long Non-Coding RNA HULC in Women with Breast Invasive Ductal Carcinoma in East Azerbaijan Province

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Ravanbakhsh Gavgani R.[1] *PhD,*
Babaei E.*[1] *PhD,*
Hosseinpourfeizi M.A.[1] *PhD,*
Fakhrjou A.[2] *PhD,*
Montazeri V.[3] *PhD*

How to cite this article
Ravanbakhsh Gavgani R, Babaei E Hosseinpourfeizi M.A, Fakhrjou A, Montazeri V. Over Expression of Long Non-Coding RNA HULC in Women with Breast Invasive Ductal Carcinoma in East Azerbaijan Province. Pathobiology Research .2019; 22(2):97-102.

[1]Biological Sciences Department, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Pathology Department, Medicine Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Thoracic Surgery Department, Medicine Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Correspondence
Address: Biological Sciences Department, Natural Sciences Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Postal Code: 5166616471
Phone: +98 (41) 33392686
Fax: +98 (41) 33356026
babaei@tabrizu.ac.ir

Article History
Received: September 30, 2018
Accepted: March 11, 2019
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Aims Despite recent advances in diagnosis and treatment, breast cancer still remains the second leading cause of cancer- related death in women. Recent reports have detected a new class of non-coding molecules named long non-coding RNAs that play an important role in various biological processes involved in cancer. This study aimed to evaluate the expression level of long non-coding RNA HULC in breast cancer.

Materials & Methods In this experimental study, after collecting 40 breast tumors with invasive ductal carcinoma and 40 normal marginal tissues, RNA extraction and cDNA synthesis were done. The expression level of HULC was obtained by using the qRT-PCR method. REST 2009 software was employed to evaluate the association of its expression in tumor and normal tissues. Biomarker potential of HULC was evaluated by drawing ROC curve. Relationship between HULC expression and clinicopathological features was analyzed.

Results Results from REST indicated significant upregulation of HULC in tumor tissues compared to normal marginal specimens (95% CI; p=0.0001). ROC curve analysis also demonstrated the biomarker potential of HULC in breast cancer (ROCAUC=0.79; p<0.0001). Evaluation of the relationship between HULC expression and clinicopathological features revealed that there is a statistically significant positive correlation of HULC expression with advanced stages (95% CI; P=0.019).

Conclusion Considering the upregulation of HULC expression in invasive ductal carcinoma, this lncRNA could be considered as a new potential diagnostic biomarker in breast cancer.

Keywords Invasive Ductal Carcinoma ; Long Non-Coding RNA; HULC; Biomarkers

CITATION LINKS

[1] Cancer screening in the United States, 2017: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in ... [2] Non-coding RNAs in human ... [3] The functional role of long non-coding RNA in human ... [4] LncRNA NEAT1 impacts cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer via ... [5] LncRNA-TCONS_00034812 in cell proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle ... [6] Noncoding RNA and Polycomb ... [7] Long non-coding RNA and Polycomb: An intricate partnership in cancer ... [8] Invasion and metastasis-related long noncoding RNA expression profiles in ... [9] Long non-coding RNA implicated in the invasion and metastasis of head and neck ... [10] Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in Hepatoma cells through an miR-9-mediated ... [11] High expression of long noncoding RNA HULC is a poor predictor of prognosis and regulates cell ... [12] Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma. Int J Clin Exp ... [13] A novel lncRNA, LUADT1, promotes lung adenocarcinoma proliferation via the ... [14] Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation by ... [15] Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular ... [16] Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with ... [17] HULC and H19 played different roles in overall and disease-free survival from hepatocellular carcinoma after curative ... [18] Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical ... [19] Long non-coding RNA HULC promotes bladder cancer cells proliferation but inhibits apoptosis via regulation [20] The lncRNA HULC functions as an oncogene by targeting ATG7 and ITGB1 in epithelial ovarian ... [21] Long noncoding RNA highly up-regulated in liver cancer predicts unfavorable outcome and regulates metastasis- ... [22] Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the ... [23] Plasma HULC as a promising novel biomarker for ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

افزایش بیان RNA غیرکدکننده طویل HULC در زنان مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجاری پستان در استان آذربایجان شرقی

ریحانه روان‌بخش‌گاوگانی PhD
گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز،ایران
اسماعیل بابائی* PhD
گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز،ایران
محمدعلی حسین‌پور فیضی PhD
گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز،ایران
اشرف فخرجو PhD
گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
وحید منتظری MD
گروه جراحی توراکس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده
اهداف: علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در زمینه تشخیص و درمان، سرطان پستان همچنان دومین عامل مرگ مرتبط با سرطان در میان زنان جهان است. گزارش‌های اخیر، گروه جدیدی از مولکول‌های غیرکدکننده به نام RNAهای غیرکدکننده طویل را شناسایی کرده‌اند که نقش مهمی را در فرآیندهای بیولوژیکی متعدد درگیر در سرطان ایفا می‌کنند. هدف از این مطالعه، ارزیابی بیان RNA غیرکدکننده طویل HULC در سرطان پستان بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، پس از جمع‌آوری ۴۰ نمونه بافت توموری کارسینومای تهاجمی مجاری پستان و ۴۰ بافت سالم حاشیه تومور، استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. با استفاده از PCR کمی، سطح بیان HULC در نمونه‌ها به دست آمد. از نرم‌افزار REST 2009 به‌منظور بررسی ارتباط بیان آن در بافت‌های توموری و بافت‌های سالم، استفاده شد. توان بیومارکری HULC نیز با رسم منحنی ROC ارزیابی شد. ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نیز مورد بررسی قرار گرفت.
یافته‌ها: نتایج حاصل از نرم‌افزار REST افزایش معنی‌دار بیان HULC را در بافت‌های توموری نسبت به حاشیه سالم آنها نشان داد (p=۰/۰۰۰۱؛ CI ۹۵%). آنالیز منحنی ROC نیز توان بیومارکری HULC را در سرطان پستان ثابت کرد (p<۰/۰۰۰۱؛ ROCAUC=۰/۷۹). نتایج بررسی بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نشان داد که بین بیان HULC با مراحل پیشرفته تومور رابطه مثبت معنی‌داری وجود دارد (p=۰/۰۱۹؛ CI ۹۵%).
نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش بیان HULC در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان، بیان این RNA غیرکدکننده طویل می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی بالقوه جدید در سرطان پستان مطرح شود.
کلیدواژه‌ها: کارسینومای تهاجمی مجاری، RNA غیرکدکننده طویل، HULC، بیومارکرها

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰
*نویسنده مسئول: babaei@tabrizu.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای در راستای معرفی مارکرهای مولکولی با توانایی پیش‌بینی ماهیت تومورها و امکان به‌کارگیری آنها به‌عنوان فاکتور کمک‌تشخیصی و پیش‌آگهی در کنار روش‌های دقیق پاتولوژیکی، صورت گرفته است. با وجود سال‌ها تلاش و تحقیق در این زمینه، سرطان پستان همچنان شایع‌ترین بدخیمی و دومین عامل عمده مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان جهان است. طبق آمار ارایه‌شده، سالانه تقریباً ۲۵% تشخیص‌های مرتبط به سرطان و ۱۵% مرگ ناشی از آن، به تومور پستان اختصاص دارد[1]. بنابراین بهبود استراتژی‌های تشخیصی و درمانی با استفاده روش‌های درمانی بالقوه باید از اولویت‌های تحقیقاتی باشد. در سال‌های اخیر به‌کارگیری بیومارکرهای ژنتیکی برای نیل به این هدف توانسته است مثمر ثمر واقع شود. با این وجود، به‌منظور یافتن بیومارکرهای بالقوه، فهم مسیرهای ژنتیکی و مولکولی که بتواند ایجاد، پیشرفت و گسترش سرطان را کنترل کند بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

با ظهور تکنولوژی‌های جدید توالی‌یابی ترانسکریپتوم، مشخص شده است که حدود ۹۰% ژنوم انسانی به‌طور فعالی RNAهای غیرکدکننده را رونویسی می‌کنند، در حالی که، حدود تنها ۲۰ هزار ژن که کمتر از ۲% ژنوم را شامل می‌شود، کدکننده پروتئین هستند[2]. RNAهای غیرکدکننده طویل (lncRNAs) به‌عنوان تنظیم‌کنندگان بیان ژن، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. این RNAها اغلب رونوشت‌های طویل‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که به‌عنوان مولکول‌های RNA سلولی درون‌زا با ژن‌های کمتر محافظت‌شده طی تکامل معروف هستند[3]. شواهد زیادی نشان می‌دهد که lncRNAها نقش مهمی در مسیرهای سلولی متعددی از جمله تکثیر سلولی و آپوپتوز[4, 5]، اپی‌ژنتیک[6, 7]، تهاجم و متاستاز[8, 9] و متابولیزم لیپید[10] ایفا می‌کنند. بنابراین، جای تعجب نخواهد بود که به‌هم‌خوردن تنظیم بیان lncRNAs با ایجاد اثرات وخیم بر بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی باعث بیماری به‌ویژه انواع مختلف سرطان از جمله گلیوما[11]، سرطان استخوان[12]، ریه[13] و کبد[14] می‌شود. در مجموع، این یافته‌ها اهمیت RNAهای غیرکدکننده طویل را برای معرفی به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی، پیش‌آگهی با اهداف درمانی بالقوه بیش از پیش آشکار می‌کنند.

RNA بیش بیان‌یافته در سرطان کبد (HULC)، به‌عنوان RNA بیش‌بیان‌شده در بیماران مبتلا به سرطان کبد برای اولین‌بار در سال ۲۰۰۷ گزارش شد[15] و نقش آن نیز به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی مشخص شد[16, 17]. ژن RNA غیرکدکننده HULC با دو اگزون فاقد توانایی کدکنندگی پروتئین، روی کروموزوم 6p24.3 قرار گرفته است[15]. مطالعات نشان می‌دهد این lncRNA متعلق به سرطان کبد نیست و افزایش بیان این lncRNA در سرطان‌های دیگری از جمله سرطان معده[18] و گلیوما[11] نیز گزارش شده است. علی‌رغم این مطالعات، بیان HULC و نقش آن در سرطان پستان هنوز مشخص نشده است. بنابرین در مطالعه حاضر به تشخیص و ارزیابی بیان RNA غیرکدکننده طویل HULC در سرطان پستان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

۱) جمع‌آوری نمونه‌های انسانی و بررسی نتایج پاتولوژی آنها
نمونه‌های بافتی انسانی بلافاصله پس از برش در اتاق عمل، داخل ازت مایع به محل آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- ذخیره شدند. پس از بررسی نتایج آسیب‌شناسی بیماران بستری در بیمارستان نورنجات، ۴۰ نمونه بافت توموری با آسیب‌شناسی کارسینومای تهاجمی مجاری پستان به همراه نمونه‌های بافت سالم حاشیه تومور مربوطه، انتخاب شد. قبل از جمع‌آوری نمونه‌ها، رضایت‌نامه کتبی از بیماران به دست آمد. این مطالعه با تایید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد (شماره تایید: IR.TBZMED.REC.1392.249). مشخصات بیماران از نظر سن، سمت درگیر، اندازه تومور، درگیری گره‌های لنفاوی، درجه تمایز تومور در جدول ۱ ذکر شده است. میانگین سنی بیماران مورد بررسی (۵۲/۴۲±۱/۹۲) ۸۰-۳۵ سال بود. بافت‌های تومور براساس سیستم TNM دسته‌بندی شدند.

جدول ۱) ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی بیماران مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجاری پستان

ویژگی‌ها	تعداد بیماران (%)	HULC (میانگین±خطای استاندارد از میانگین)	ارزش عددی *P*
گروه سنی (سال)			
کمتر از ۴۵	۱۷ (۴۲/۵)	۱۴/۸۹±۰/۹۹	۰/۴۲۲
بیشتر از ۴۵	۲۳ (۵۷/۵)	۱۴/۵۱±۰/۷۱	
اندازه تومور			
کمتر از ۲سانتی‌متر	۲۱ (۵۲/۵)	۱۳/۹۲±۰/۷۴	۰/۴۸۵
بیشتر از ۲سانتی‌متر	۱۶ (۴۰/۰)	۱۵/۳۵±۰/۹۴	
مرحله تومور براساس TNM			
مرحله یک	۱۴ (۳۵/۰)	۱۶/۸۶±۰/۹۰	**۰/۰۱۹***
مرحله دو	۱۳ (۳۲/۵)	۱۴/۴۵±۱/۱۱	
مرحله سه	۱۰ (۲۵/۰)	۱۳/۱۹±۰/۹۸	
متاستاز به گره‌های لنفاوی			
ندارد	۱۴ (۳۵/۰)	۱۳/۴۲±۱/۱۳	۰/۱۸۶
دارد	۲۴ (۶۰/۰)	۱۵/۴۱±۰/۶۷	
درجه تمایز تومور			
ضعیف	۴ (۱۰/۰)	۱۱/۶۸±۱/۵۰	۰/۲۲
متوسط	۳۰ (۷۵/۰)	۱۴/۹۱±۰/۶۴	
خوب	۴ (۱۰/۰)	۱۵/۸۶±۲/۷۲	
محل تومور			
پستان راست	۱۷ (۴۲/۵)	۱۴/۵۵±۰/۹۶	۰/۶۴
پستان چپ	۱۹ (۴۷/۵)	۱۵/۱۳±۰/۷۷	

توجه: ارزش عددی با قلم ضخیم نوشته‌شده، معنی‌دار است (*p<۰/۰۵).

۲) استخراج RNA

استخراج RNA تام سلولی از نمونه‌های بافتی انسانی جمع‌آوری‌شده با استفاده از کیت تریزول (اینویتروژن؛ ایالات متحده) و طبق پروتکل شرکت صورت گرفت. کیفیت RNAهای استخراج‌شده با الکتروفورز داخل ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید تعیین شدند. نمایان‌شدن باندهای 5S، 18S و 28S حاکی از کیفیت بالای RNAهای استخراجی هستند. تعیین غلظت و درجه خلوص RNAهای استخراجی با اندازه‌گیری جذب آنها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰نانومتر، توسط دستگاه پیکودراپ صورت گرفت.

۳) سنتز cDNA و qPCR

غلظت RNAهای استخراجی که در محدوده ۶۰۰-۳۰۰نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰نانومتر به ۲۸۰نانومتر (OD) در بازه ۲-۱/۶ قرار داشتند، برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور یک‌میکروگرم از RNA استخراجی با آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و توسط کیت سنتز PrimeScript RT (تاکارا؛ چین) و طبق پروتکل شرکت به cDNA تبدیل شد. qPCR با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده اختصاصی برای ژن‌های *ACTB* (بتا-اکتین) و HULC و با استفاده از کیت SYBR® Premix EX TaqTM II (تاکارا؛ چین) توسط دستگاه Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences؛ استرالیا) انجام شد. توالی‌های پرایمر مورد استفاده به‌منظور تکثیر HULC برای پرایمر مستقیم 5′ATCGTGGACATTTCAACCTC3′ و پرایمر معکوس 5′GCTGTGCTTAGTTTATTGCC3′ و توالی مورد استفاده برای تکثیر بتا-اکتین برای پرایمر مستقیم 5′AGAGCTACGAGCTGCCTGAC3′ و پرایمر معکوس 5′AGCACTGTGTTGGCGTACAG3′ است. اندازه محصول تکثیرشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای HULC، ۱۶۱جفت‌باز و برای بتا-اکتین، ۱۸۴جفت‌باز بود. برنامه qPCR صورت‌گرفته به‌ترتیب زیر بود: واسرشتگی اولیه ۹۵°C به‌مدت ۱۵دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشتگی ۹۵°C به‌مدت ۲۵ثانیه، تکثیر ۵۹°C به‌مدت ۲۵ثانیه، گسترش ۷۲°C به‌مدت ۲۵ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی ۷۲°C به‌مدت ۳دقیقه. بتا-اکتین به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌کردن داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. PCR در زمان واقعی در سه تکرار مستقل انجام شد. همچنین به‌منظور تایید بیشتر هویت باندهای تکثیرشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای HULC، چند نمونه از محصولات PCR توالی‌یابی شدند. لازم به ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Gene Runner v. 3.05 طراحی شده و اختصاصی‌بودن پرایمرها، در سایت NCBI بررسی شد.

۴) آنالیز آماری نتایج

برای بررسی تغییرات بیان HULC در بافت‌های توموری پستان نسبت به بافت‌های حاشیه سالم مجاور آن، از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد. برای بررسی ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی، از فرمول محاسبه بیان نسبی ($2^{-\Delta Ct}$) استفاده شد. در این فرمول $\Delta Ct=Ct(HULC)-Ct(\beta\text{-actin})$ است. آنالیز آماری بین دو گروه توسط آزمون T- استیودنت و در بیش از دو گروه توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 22.0 مورد آنالیز قرار گرفتند. لازم به ذکر است برای ارزیابی نرمال‌بودن توزیع بیان RNA غیرکدکننده HULC در نمونه‌ها، آزمون کالموگروف-اسمیرنوف به کار رفت. همچنین، به‌منظور ارزیابی پتانسیل بیومارکری RNA غیرکدکننده HULC از نرم‌افزار سیگما پلات ۱۲/۵ (منحنی ROC) استفاده شد. این نرم‌افزار، آنالیزهای لازم برای بررسی پتانسیل یک ژن یا تست را برای مطرح‌شدن به‌عنوان یک بیومارکر، بررسی می‌کند. در این آنالیز، مقادیر بیان نسبی HULC در بافت‌های توموری و بافت‌های غیرتوموری حاشیه آن (به‌عنوان بافت نرمال در نظر گرفته شده است)، مورد استفاده قرار گرفت. سطح زیر نمودار (AUC یا A)، بیانگر توانایی عامل مورد بررسی به‌منظور قرارگرفتن به‌عنوان بیومارکر تشخیصی است. هرچه AUC به سمت یک متمایل شود این توانایی افزایش می‌یابد.

در این مطالعه، آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و مقادیر ارایه‌شده به‌صورت میانگین±خطای استاندارد از میانگین بودند.

یافته‌ها

۱) افزایش بیان HULC در بافت‌های توموری پستان در مقایسه با بافت‌های حاشیه سالم مجاور

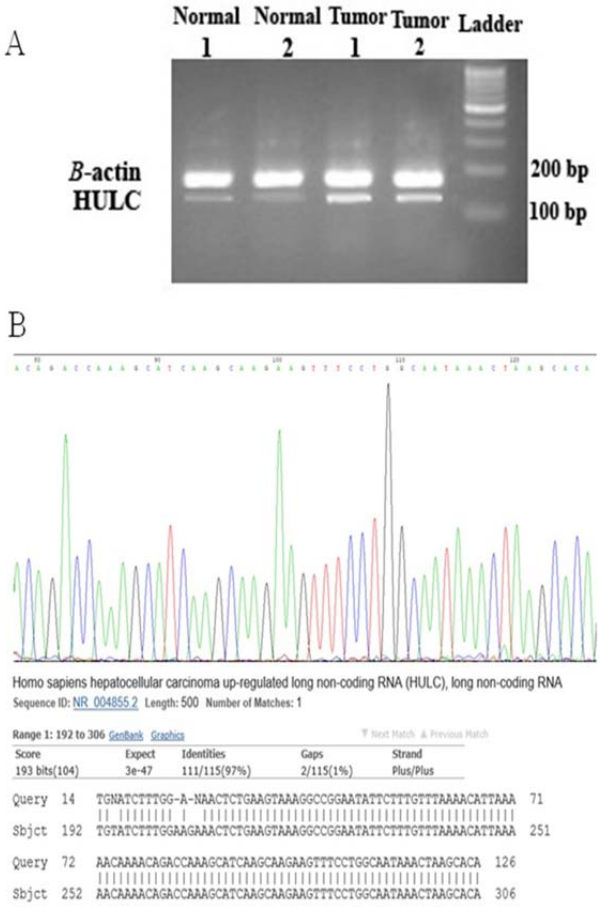
نتایج اولیه مطالعه حاضر بیان متمایز HULC را در بافت‌های توموری پستان نشان داد (شکل ۱-A) و به‌منظور اطمینان بیشتر از هویت باند تکثیرشده، چند نمونه از محصولات PCR توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی تایید کرد که ژن تکثیرشده متعلق به ژن *HULC* است (شکل ۱-B).

نتایج حاصل از نرم‌افزار REST، تفاوت معنی‌دار بیان ژن *HULC* در نمونه‌های توموری نسبت به حاشیه تومور نشان داد. براساس نتایج حاصل، بیان ژن *HULC* در نمونه‌های توموری ۹/۱ برابر بیشتر از نمونه‌های حاشیه سالم مربوطه است (p=۰/۰۰۰۱، ۹/۱±۰/۶۵۴، CI ۹۵%؛ نمودار ۱).

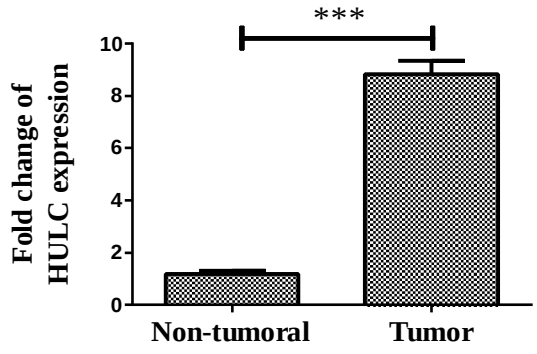
۲) توانایی HULC به‌عنوان بیومارکر تشخیصی بالقوه

به‌منظور ارزیابی پتانسیل بیومارکری HULC، آنالیز منحنی ROC با استفاده از نرم‌افزار سیگما پلات صورت گرفت. نتایج حاصل نشان

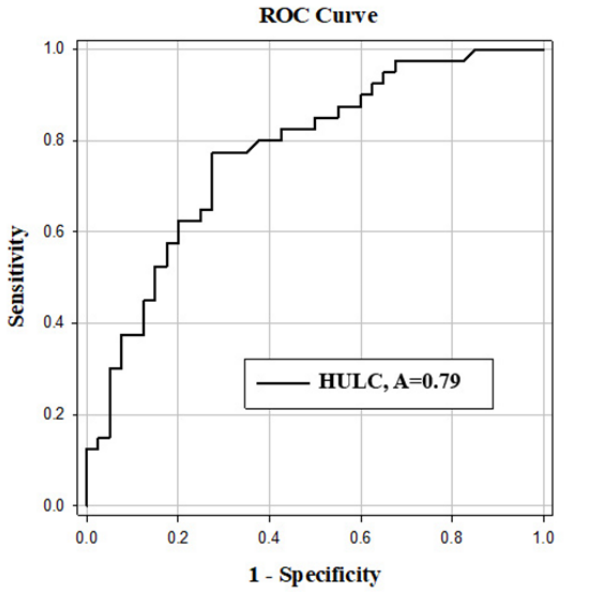
داد که سطح زیر نمودار (AUC) برای HULC، ۰/۷۹ است (p<۰/۰۰۰۱، CI ۹۵%)، که این میزان در سطح خوب و قابل قبولی است و بنابراین بیان این ژن می‌تواند به‌عنوان بیومارکر مناسب برای تشخیص سرطان پستان در نمونه‌های بافتی محسوب شود. حساسیت و اختصاصیت به‌دست‌آمده به‌ترتیب ۰/۷۸ و ۰/۷۳ است و مقدار Cut off محاسبه‌شده ۱۷/۱ است (نمودار ۲).



شکل ۱) بیان ژن HULC. شکل A نمایانگر بارگذاری باندهای تکثیرشده بتا-اکتین و HULC در ژل آگارز ۳% است. افزایش بیان HULC در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های نرمال دیده می‌شود. مارکر مورد استفاده ۱۰۰جفت‌باز است. شکل B به‌منظور اطمینان از هویت باندهای تکثیرشده، ابتدا چند نمونه حاصل از تکثیر PCR توالی‌یابی شدند و سپس توالی‌ها در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بررسی نشان می‌دهد که باندهای تکثیریافته متعلق به HULC است.



نمودار ۱) نمودار افزایش معنی‌دار بیان ژن HULC در نمونه‌های توموری نسبت به بافت‌های غیرتوموری حاشیه آن نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۰۱***)



نمودار ۲) منحنی ROC برای ژن HULC؛ سطح زیر نمودار (A) نشان‌دهنده توان بیومارکری بیان HULC در بافت‌های توموری سرطان پستان است.

۳) ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی

نتایج بررسی بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نشان داد که بین افزایش بیان این lncRNA با مراحل پیشرفته تومور (StageIII) ارتباط معنی‌داری وجود دارد (p=۰/۰۱۹، CI ۹۵%). نتایج حاصل ارتباط معنی‌داری با سایر ویژگی‌ها نشان نداد (p>۰/۰۵، CI ۹۵%؛ جدول ۱).

بحث

سرطان پستان که در حدود ۸۰% آن از نوع کارسینومای تهاجمی مجاری پستان است[1]، همچنان به‌عنوان شایع‌ترین سرطان در میان زنان جهان است. اگرچه این سرطان بروز بالایی در کشورهای پیشرفته دارد ولی تقریبا ٦٤% مرگ ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد[1]. علی‌رغم تلاش‌های بسیار برای یافتن راهکارهای درمانی برای تشخیص و درمان سرطان پستان، مکانیزم‌های ژنتیک مولکولی درگیر در پاتوژنز این بیماری همچنان ناشناخته باقی مانده است.

با توجه به شواهد اخیر مبنی بر نقش گروه جدیدی از مولکول‌های غیرکدکننده به نام RNAهای غیرکدکننده طویل در سرطان، در این مطالعه بیان RNA غیرکدکننده طویل جدید به نام HULC مورد ارزیابی قرار گرفت.

HULC برای اولین‌بار *پانزیت* و همکاران در سال ۲۰۰۷ افزایش بیان این RNA را در سرطان کبد گزارش کردند[15]. پس از آن مطالعات تغییرات بیان این lncRNA در سرطان‌های دیگر آغاز شد به‌طوری که *ونگ* و همکاران[19]، *ژائو* و همکاران[18]، *یان* و همکاران[11]، *چن* و همکاران[20] و همچنین *شی* و همکاران[21]، افزایش بیان HULC را به‌ترتیب در بیماران مبتلا به سرطان مثانه، معده، گلیوما، تخمدان و همچنین سرطان پستان سه‌گانه منفی نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر نیز هم‌راستا با این مطالعات، افزایش بیان HULC را در سرطان پستان نشان داد.

یکی از اهداف اصلی در مطالعه حاضر، ارزیابی توان بیومارکری (به‌عنوان بیومارکر تشخیصی و پیش‌آگهی) تغییرات بیان HULC در سرطان پستان بود. به همین منظور آنالیز منحنی ROC برای

بررسی پتانسیل تشخیصی آن صورت گرفت. نتایج حاصل از منحنی ROC، سطح زیرمنحنی (AUC) را ۰/۷۸ نشان داد. این میزان از AUC، بیانگر توان بیومارکری HULC در تشخیص بافت‌های توموری از نمونه‌های سالم است. نتایج این مطالعه هم‌راستا با مطالعات *پانزیت* و همکاران[15] و *ژائو* و همکاران بود که توان تشخیصی بیان HULC را به‌ترتیب در سرطان کبد (AUC=۰/۷۸) و سرطان معده به اثبات رسانده بودند (AUC=۰/۷۶۹) [18].

علاوه بر توان تشخیصی این بیومارکر، هدف این تحقیق بررسی توان این بیومارکر در پیش‌آگهی سرطان پستان نیز است. مطالعات انجام‌شده روی بیماران مبتلا به سرطان معده[18] و سرطان استخوان[12]، با هدف بررسی رابطه بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی، نشان داد که بین بیان این lncRNA و مراحل پیشرفته تومور رابطه معنی‌داری وجود دارد. نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با مطالعات صورت‌گرفته در سرطان معده[18]، استخوان[12] و سرطان پستان سه‌گانه منفی[21] است. علاوه بر این، *ژائو* و همکاران[18]، *سان* و همکاران[12] و همچنین *شی* و همکاران[21] نشان دادند که بین بیان بالای HULC و متاستاز به گره‌های لنفاوی و متاستاز به نواحی دور ارتباط معنی‌داری وجود دارد. مطالعه دیگر صورت‌گرفته روی بیماران مبتلا به سرطان گلیوما نشان داد که رابطه معنی‌داری بین بیان HULC با درجه تمایز ضعیف تومور و سن بالای بیماران مبتلا وجود دارد[18]. با این وجود علی‌رغم مطالعات انجام‌یافته هنوز بر ارتباط بیان HULC با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی بین محققان بحث‌هایی وجود دارد، به‌طوری که نتایج مطالعات *همراه* و همکاران که روی بیماران مبتلا به سرطان کبد انجام شده است، ثابت می‌کند که بیان HULC در مراحل اولیه تومور به‌طور معنی‌داری بالاتر از مراحل پیشرفته آن است. همچنین این گروه نشان دادند که بیان این RNA در تومورهای تمایزیافته به‌طور معنی‌داری بیش از تومورهای با تمایز ضعیف است[22]. با این وجود *ژی* و همکاران نیز بیش‌بیان HULC را در تومورهای با تماز ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان کبد گزارش کردند[23]. برخلاف این مطالعات، در این مطالعه بین بیان HULC و سایر ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی از قبیل سن بیماران مبتلا، درگیری گره‌های لنفاوی، درجه تمایز تومور، اندازه تومور رابطه معنی‌داری یافت نشد. بنابراین ارزش پیش‌آگهی آن هنوز نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

از محدودیت‌های موجود در این مطالعه می‌توان به عدم امکان بررسی بیان HULC در سایر زیرگروه‌های سرطان پستان از جمله کارسینومای درجا مجاری پستان یا کارسینومای لوبولار اشاره کرد که البته این امر به‌علت تعداد بسیارکم بیماران در هر یک از این زیرگروه‌ها و همچنین ناکافی‌بودن این تعداد برای آنالیز بود. در آینده بر آن هستیم با افزایش نمونه‌ها به بررسی بیان HULC در زیرگروه‌های مختلف سرطان پستان و همچنین مقایسه نتایج آنها با یکدیگر بپردازیم.

پیشنهاد می‌شود نقش عملکردی HULC در ایجاد سرطان پستان از طریق مهار بیان آن در رده‌های سلولی سرطان پستان مورد مطالعه قرار گیرد.

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر با توجه به افزایش بیان HULC در سرطان پستان و همچنین ارزش بیان این lncRNA به‌عنوان بیومارکر تشخیصی، علاوه بر این که پیشنهاد می‌کند HULC می‌تواند به‌عنوان یک مارکر مولکولی بالقوه برای سرطان پستان مطرح شود بلکه این مطالعه تاکید بیشتری بر اهمیت نقش RNAهای غیرکدکننده طویل در سرطان دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش بیان HULC در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان، بیان این RNA غیرکدکننده طویل می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی بالقوه جدید در سرطان پستان مطرح شود.

تشکر و قدردانی: بر خود فرض می‌دانیم که از تمامی مسئولین و پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان نورنجات تبریز که در تهیه نمونه‌های بافتی همکاری داشتند و نیز کارکنان دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی نماییم.

تاییدیه‌اخلاقی: مطالعه حاضر با تایید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (شماره تایید: IR.TBZMED.REC.1392.249) صورت گرفته است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ریحانه روان‌بخش‌گاوگانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰%)؛ اسماعیل بابائی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ محمدعلی حسین‌پور فیضی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۱۰%)؛ اشرف فخرجو (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ وحید منتظری (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۵%)

منابع مالی: مطالعه حاضر در دانشگاه تبریز و تحت حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شد (شماره طرح: ۹۳۰۴۵۰۰۱).

منابع

1- Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2017: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. CA Cancer J Clin. 2017;67(2):100-21.

2- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet. 2011;12(12):861-74.

3- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. Mol cancer 2011;10(1):38.

4- Peng W, Wang Z, Fan H. LncRNA NEAT1 impacts cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer via regulation of Akt signaling. Pathol Oncol Res. 2017; 23(3):651-6.

5- Liu Y, Sun Z, Zhu J, Xiao B, Dong J, Li X. LncRNA-TCONS_00034812 in cell proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells and its mechanism. J Cell physiol. 2018; 233(6): 4801-14.

6- Brockdorff N. Noncoding RNA and Polycomb recruitment. RNA. 2013; 19(4): 429-42.

7- Achour C, Aguilo F. Long non-coding RNA and Polycomb: An intricate partnership in cancer biology. 2018; 23:2106-32.

8- Gao Y, Chen G, Zeng Y, Zeng J, Lin M, Liu X, Liu J. Invasion and metastasis-related long noncoding RNA expression profiles in hepatocellular carcinoma. Tumour Biol. 2015;36(10):7409-22.

9- Luo X, Qiu Y, Jiang Y, Chen F, Jiang L, Zhou Y, et al. Long non-coding RNA implicated in the invasion and metastasis of head and neck cancer: Possible function

and mechanisms. Mol Cancer. 2018;17(1):14.
10- Cui M, Xiao Z, Wang Y, Zheng M, Song T, Cai X, Sun B, Ye L, Zhang X. Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in Hepatoma cells through an miR-9-mediated RXRA signaling pathway. Cancer Res. 2015;75(5):846-57.
11- Yan H, Tian R, Zhang M, Wu J, Ding M, He J. High expression of long noncoding RNA HULC is a poor predictor of prognosis and regulates cell proliferation in glioma. Onco Targets Ther. 2017;10:113-20.
12- Sun X-H, Yang L-B, Geng X-L, Wang R, Zhang Z-C. Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(3):2994-3000.
13- Qiu M, Xu Y, Wang J, Zhang E, Sun M, Zheng Y, et al. A novel lncRNA, LUADT1, promotes lung adenocarcinoma proliferation via the epigenetic suppression of p27. Cell Death Dis. 2015;6(8):e1858.
14- Huang MD, Chen WM, Qi FZ, Xia R, Sun M, Xu TP, et al. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation by epigenetic silencing of KLF2. J Hemat Oncol. 2015;8(1):50-57.
15- Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. Gastroenterology. 2007;132(1):330-42.
16- Peng W, Gao W, Feng J. Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with pancreatic cancer. Med Oncol. 2014;31(12):346.
17- Yang Z, Lu Y, Xu Q, Tang B, Park CK, Chen X. HULC and H19 played different roles in overall and disease-free survival from hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: a preliminary analysis from gene expression omnibus. Dis Markers. 2015;2015:191029.
18- Zhao Y, Guo Q, Chen J, Hu J, Wang S, Sun Y. Role of long non-coding RNA HULC in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of gastric cancer: a clinical and in vitro investigation. Oncol Rep. 2014;31(1):358-64.
19- Wang J, Ma W, Liu Y. Long non-coding RNA HULC promotes bladder cancer cells proliferation but inhibits apoptosis via regulation of ZIC2 and PI3K/AKT signaling pathway. Cancer Biomark. 2017;20(4):425-34.
20- Chen S, Wu DD, Sang XB, Wang LL, Zong ZH, Sun KX, et al. The lncRNA HULC functions as an oncogene by targeting ATG7 and ITGB1 in epithelial ovarian carcinoma. Cell Death Dis. 2017;8(10):e3118.
21- Shi F, Xiao F, Ding P, Qin H, Huang R. Long noncoding RNA highly up-regulated in liver cancer predicts unfavorable outcome and regulates metastasis by MMPs in triple-negative breast cancer. Arch Med Res. 2016;47(6):446-53.
22- Hämmerle M, Gutschner T, Uckelmann H, Ozgur S, Fiskin E, Gross M, et al. Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1). Hepatology. 2013;58(5):1703-12.
23- Xie H, Ma H, Zhou D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma. BioMed Res Int. 2013;2013.