

## تغییرات بیان RNA بلند غیر کدکننده MEG3 و ارتباط آن با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی در سرطان پستان

الهه سلیمانپور<sup>۱</sup> (MSc)، محمدعلی حسین پور فیضی<sup>۱\*</sup> (PhD)، اسماعیل بابایی<sup>۱</sup> (PhD)، وحید منتظری<sup>۲</sup> (MD)

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۲- بیمارستان نورنجات تبریز

دریافت: ۹۶/۴/۲۵، اصلاح: ۹۶/۷/۱، پذیرش: ۹۶/۷/۱۱

### خلاصه

**سابقه و هدف:** سرطان پستان یکی از رایج‌ترین بدخیمی‌ها و دومین عامل مرگ‌ومیر به علت سرطان در زنان می‌باشد. RNAهای بلند غیر کدکننده، نقش قابل توجهی در فرآیندهای مختلف سلولی و مولکولی از جمله تومورزایی دارند. MEG3 یک RNA بلند غیر کدکننده است که بیان آن در برخی سرطان‌ها دچار اختلال می‌گردد. این مطالعه به منظور بررسی تغییرات بیانی MEG3 در سرطان پستان و ارتباط آن با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۴۰ نمونه بافت توموری پستان و بافت نرمال حاشیه همان تومور به صورت تازه از زنان مبتلا به سرطان پستان در منطقه شمال غرب ایران جمع‌آوری شد. کلیه تومورها از لحاظ پاتولوژیکی از نوع تومورهای بدخیم تهاجمی مجاری بودند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، تفاوت میانگین بیان MEG3 در نمونه‌های توموری نسبت به بافت نرمال حاشیه همان تومور با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تکنیک qReal-Time PCR ارزیابی و جهت نرمال‌سازی تغییرات بیان از ژن  $\beta 2m$  به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

**یافته‌ها:** میزان بیان MEG3 در نمونه‌های توموری بافت پستان نسبت به بافت نرمال حاشیه همان تومور به طور معنی‌داری و به میزان ۳/۳۵۵ برابر کاهش یافته است ( $p=0/042$ ) و این کاهش بیان در افراد بیمار با افزایش سن بیمار ( $p=0/007$ )، درجه تمایز III تومور ( $p=0/049$ ) و درگیری گره‌های لنفاوی ( $p=0/018$ ) ارتباط معنی‌داری نشان داد ( $p<0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که بیان MEG3 در سرطان پستان به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد و این کاهش بیان با تهاجمی شدن تومور در ارتباط است.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، RNAهای بلند غیر کدکننده، بیومارکر، گره لنفاوی.

### مقدمه

سرطان پستان یک بیماری هتروژن و یکی از رایج‌ترین علت‌های مرگ و میر در زنان است. بر خلاف پیشرفت‌های اخیر در زمینه روش‌های تشخیصی و پیش‌آگهی سرطان پستان از قبیل ام‌ار‌ای، ماموگرافی، اولتراسوند پستان و بررسی میزان مارکرهای پروتئینی، تشخیص زود هنگام سرطان به علت عدم دقت، حساسیت و اختصاصیت کافی روش‌های ذکر شده، با مشکلات قابل توجهی مواجه است. بنابراین در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری برای یافتن بیومارکرهایی با توان تشخیصی بالا و زود هنگام صورت گرفته است (۱، ۲). طبق یافته‌های مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر، بیش از ۹۰ درصد DNA ژنومی، رونویسی می‌شوند که از این میان تنها ۱ تا ۲ درصد رونوشت‌ها به پروتئین ترجمه می‌شوند و مابقی به صورت RNAهای غیر کدکننده دسته‌بندی می‌گردند. این مناطق غیر کدکننده از ژنوم تنوع گسترده‌ای از RNAهای تنظیمی را شامل می‌شوند که در بیوزن، خصوصیات و عملکرد، نقش‌های متفاوتی داشته و از نظر سبب به دو دسته: RNAهای غیر کدکننده کوتاه، از قبیل miRNA (۸-۲۲ نوکلئوتید) و RNAهای غیر کدکننده بلند (lncRNA) (بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید) تقسیم می‌شوند (۳). MEG3 (Maternally Expressed

Gene 3) یک رونوشت غیر کدکننده با طول ۱/۶ کیلو باز در انسان است که از ژن MEG3 در لوکوس DLK1/MEG3 و موقعیت کروموزومی ۱۴q۳۲ رونویسی می‌شود. MEG3 در حالت طبیعی در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌شود (۴) اما بیان آن در بافت‌های مغزی و غده هیپوفیز به طور قابل توجهی، بالاتر می‌باشد (۵). MEG3 مشکل از ده‌اگزون است و تا امروز ۱۲ ایزوفرم آن شناسایی شده است. این ایزوفرم‌ها، MEG3، MEG3a، MEG3k تا MEG3n نامیده می‌شوند. ایزوفرم غالب آن، MEG3 است که حاوی اگزون‌های ۱-۴ و ۸-۱۰ می‌باشد (۶). مطالعات اخیر نشان دادند که در انواع مختلفی از سرطان‌ها بیان MEG3 کاهش می‌یابد و به عنوان سرکوبگر تومور عمل می‌کند. در سرطان دهانه رحم، کاهش بیان MEG3 با تأثیر بر رشد سلولی و آپوپتوز و با هدف قرار دادن miR-21 منجر به پیشرفت تومور می‌شود (۷). در سرطان دستگاه گوارش بیان MEG3 در بیماران و رده‌های سلولی مرتبط کاهش یافته که این کاهش بیان با بدخیمی و تهاجمی شدن تومور در ارتباط می‌باشد (۸). در سرطان مثانه نیز دیده شد که در نمونه‌های توموری از بیان MEG3 به طور معنی‌داری کاسته شد و این کاهش بیان با افزایش اتوفاجی و افزایش رشد سلولی همراه بود (۹). نتایج

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دکترای الهه سلیمانپور، دانشجوی رشته ژنتیک مولکولی دانشگاه تبریز می‌باشد.

\*مسئول مقاله: دکتر محمدعلی حسین پور فیضی

آدرس: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم جانوری. تلفن: ۰۴۱-۳۳۶۲۲۸۰

روش درمانی مناسب است، نمونه‌های توموری حاصل بر اساس فاکتورهای اشاره شده، دسته‌بندی شدند. استخراج RNA با استفاده از محلول استخراج TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Lot. no. 5017511) براساس دستورالعمل کارخانه انجام گرفت (۱۳ و ۱۴).

۱ میلی‌لیتر از محلول TRIzol به نمونه بافت هموژنیزه شده اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن افزوده و پس از ۱۵-۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، با سرعت ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز آبی بالایی به میکروتیوب دیگری منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول ۱۰۰ درصد اضافه گردید. به دنبال ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰g، فاز آبی دور ریخته شد و به رسوب حاصل به منظور شستشو، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و مجدد با دور ۷۵۰۰g سانتریفیوژ صورت گرفت. فاز آبی رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل به منظور انجام آزمایشات بعدی در آب فاقد RNAse (RNase-free water) حل و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده با استفاده از ژل آگارز و بررسی میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شدند. به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی با DNA، قبل از انجام واکنش RT-PCR، RNA مورد استفاده توسط آنزیم DNase I تیمار گردید. RNA تیمار شده با DNase I با ۰/۵ میکرولیتر آنزیم رندوم هگزامر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در مرحله بعد ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP و ۲ میکرولیتر بافر RT و به مقدار مورد نیاز آب مقطر استریل اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و در نهایت ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RT اضافه گردید. انکوباسیون مخلوط واکنش در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت و ۲۰ دقیقه انجام گرفت.

ژن  $\beta 2m$  یک ژن خانه دار است و به‌عنوان ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد. پرایمرهای مورد استفاده در این روش با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner (نسخه ۴) و نرم‌افزار OLIGO (نسخه ۷/۵) طراحی و ارزیابی گردیدند. اختصاصیت پرایمرها توسط سایت NCBI تایید و همچنین توالی‌های تکثیری توسط سایت UNafold (۱۵) از نظر ساختارهای ثانویه، بررسی شدند. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشند.

پس از سنتز cDNA، بررسی کمی سطح بیان MEG3 با استفاده از روش SYBR® Green Supermix (Takara، با استفاده از Japan, Lot. no. AF31017N) انجام پذیرفت. واکنش در ۴۰ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله ۲۵ ثانیه‌ای بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

مطالعه Sun و همکارانش حاکی از کاهش بیان MEG3 در نمونه‌های توموری پستان در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور بود. آنها به منظور بررسی اثرات MEG3 در رده سلول‌های سرطان پستان MCF-7 و MB231، بیان MEG3 را در این رده‌های سلولی به صورت نابجا، افزایش دادند و مشاهده شد که افزایش بیان آن، با کاهش توانایی تکثیر سلولی، تشکیل کلنی، مهاجرت و تهاجم همراه بود. همچنین گزارش کردند که MEG3 از طریق افزایش فعالیت P53 و متعاقباً تأثیر بر ژن‌های هدفش، از قبیل P21، Mpsin و KAI1، این فرآیندها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۰). مطالعات نشان داد که تنها رونوشت کامل MEG3 توانایی فعال کردن P53 را دارد (۱۱). Zhang و همکارانش گزارش کردند که بیان MEG3 در سرطان پستان کاهش می‌یابد که این کاهش بیان با تأثیر بر مسیر سیگنالینگ AKT، که مسیری حیاتی برای رشد و رگ‌زایی سلول‌های پستان است، منجر به افزایش رشد و تکثیر سلول، رگ‌زایی، متاستاز و تهاجم می‌شود (۱۲).

نظر به نقش عملکردی MEG3 در پیشرفت سرطان‌های مختلف و همچنین مطالعات گسترده در زمینه نقش و اهمیت RNAهای غیرکدکننده در بروز بدخیمی‌ها، هدف از تحقیق حاضر مطالعه تغییرات بیانی MEG3 در نمونه‌های توموری بافت پستان تهاجمی مجاری در مقایسه با نمونه‌های نرمال حاشیه همان تومور با تمرکز بر بررسی امکان استفاده از آن بعنوان بیومارکر تشخیصی یا پیش‌آگهی سرطان و مطالعه ارتباط آن با خصوصیات کلینیکی‌پاتولوژیکی، برای اولین بار در ایران می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی پس از با تایید در کمیته اخلاقی تحقیقات پزشکی بیمارستان نور نجات تبریز با کد اخلاق ۵/۴/۳۲۵۹ و همچنین با کسب رضایتنامه کتبی و آگاهانه از بیماران مبتلا به سرطان پستان ضمن رعایت اصول اخلاقی و حفظ اطلاعات محرمانه بیماران بر روی بافت توموری و بافت غیرتوموری حاشیه تومور مربوط به ۴۰ خانم مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به بیمارستان نور نجات تبریز انجام شد. از نمونه‌های سالم حاشیه تومور به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شدند.

نمونه‌های بافت به صورت تازه از اتاق عمل تهیه شدند. تمام نمونه‌های انتخاب شده پس از بررسی‌های پاتولوژیکی، نمونه‌های بدخیمی تهاجمی مجاری بودند و بیماران قبل از نمونه برداری تحت هیچ‌گونه شیمی درمانی و یا پرتو درمانی قرار نگرفته بودند. میانگین سن بیماران  $50 \pm 3/2$  (بین ۳۵ تا ۸۰ سال) بوده و تمام بیماران از نظر جنسیت، محل سکونت و شیوه زندگی مشابه بودند. از آنجا که سن، اندازه تومور، درجه تمایز و میزان متاستاز سلول‌های توموری به گره‌های لنفاوی از جمله عوامل مهم در آغاز و پیشرفت تومور و همچنین انتخاب

جدول ۱. توالی پرایمر های مورد استفاده برای MEG3 و  $\beta 2m$

| نام ژن     | توالی پرایمر                        | طول محصول به جفت باز |
|------------|-------------------------------------|----------------------|
| MEG3       | Forward 5'-TGCCCATCTACACCTCACGA-3'  | ۱۱۳                  |
|            | Reverse 5'-GTCCTCTTCATCCTTTGCCAT-3' |                      |
| $\beta 2m$ | Forward 5'-CTACTCTCTTTCTGGCCTG-3'   | ۱۹۱                  |
|            | Reverse 5'-GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3'  |                      |

### یافته‌ها

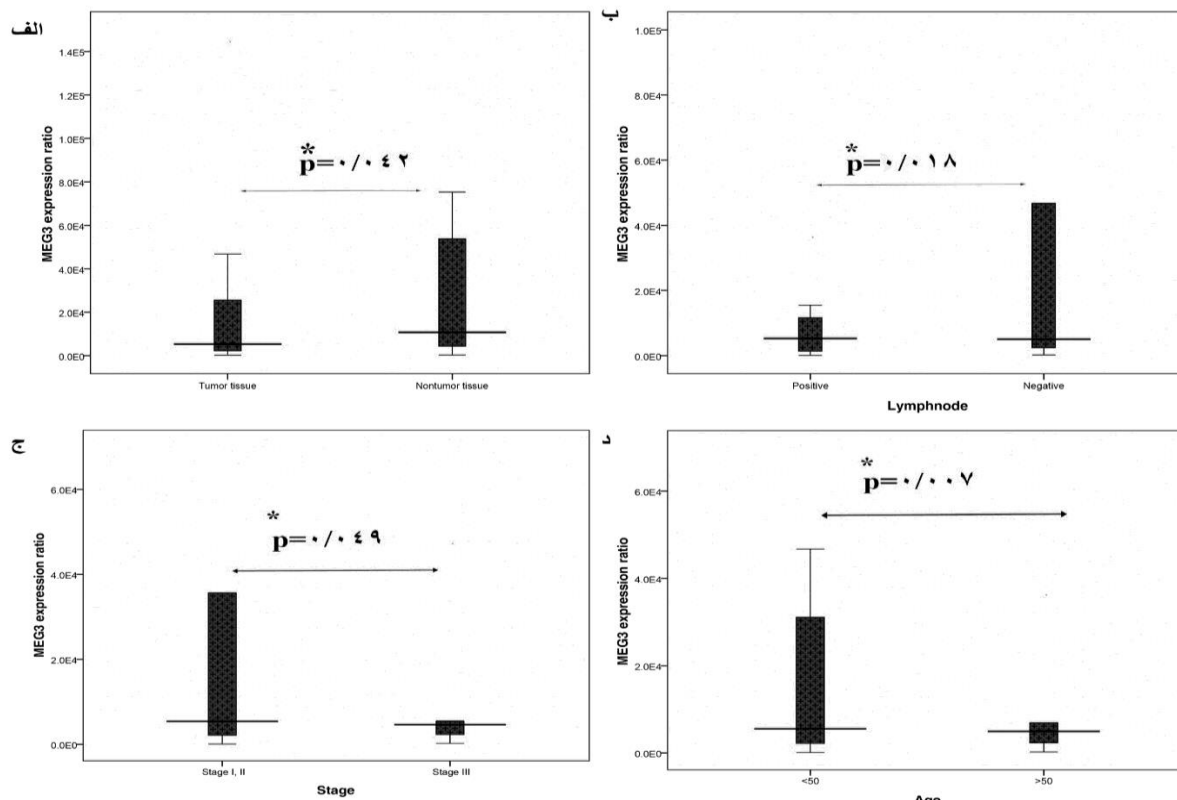
تغییرات بیان RNA غیر کدکننده MEG3 در نمونه‌های بافت توموری (۴۰ نمونه) در مقایسه با بافت نرمال حاشیه تومور (۴۰ نمونه) کاهش ۳/۳۵۵ برابری را در نمونه‌های توموری نشان داد که در بازه اطمینان ۹۵٪،  $p=0/042$  گزارش شد که بیانگر کاهش معنی‌دار بیان MEG3 در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های نرمال حاشیه تومور می‌باشد (شکل ۱ الف). ارتباط معنی‌داری بین کاهش سطح بیان MEG3 و اندازه تومور مشاهده نشد. ارتباط معنی‌داری بین کاهش سطح بیان MEG3 و درگیری گره‌های لنفاوی دیده شد (شکل ۱ ب). ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان MEG3 و شدت تهاجمی بودن تومور مشاهده شد ( $p=0/049$ ) (شکل ۱ ج).

سن یکی از مهم‌ترین فاکتورهای افزایش دهنده ریسک ابتلا به سرطان پستان است. از لحاظ سنی، بیماران در دو گروه سنی کمتر از ۵۰ سال (۴۵٪) و بزرگ‌تر یا مساوی ۵۰ سال (۵۵٪) دسته‌بندی شدند. نتایج حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار بین کاهش بیان MEG3 با افزایش سن بیماران بود ( $p=0/007$ ) (شکل ۱ د) (جدول ۲).

به منظور بررسی پتانسیل تشخیصی MEG3، به عنوان بیومارکر اختصاصی جهت تشخیص سرطان پستان، منحنی ROC رسم شد. سطح زیر نمودار (AUC) برای MEG3، ۰/۶۷ ( $p=0/037$ ) محاسبه شد که نشان می‌دهد، MEG3 از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت استفاده به عنوان بیومارکر تشخیصی برخوردار می‌باشد (شکل ۲).

به منظور بررسی ارتباط بین تغییرات بیان MEG3 با اندازه تومورها، نمونه‌های توموری مورد مطالعه، از نظر سایز در دو گروه کوچک‌تر از ۲/۵ سانتی متر (۵۰٪) و بزرگ‌تر یا مساوی ۲/۵ سانتی متر (۴۷/۵٪) تقسیم‌بندی شدند. تومورها همچنین از نظر درگیری گره‌های لنفاوی به دو گروه مثبت (۵۲/۵٪) و منفی (۴۷/۵٪) دسته‌بندی شدند. گروه منفی به معنی عدم حضور سلول‌های سرطانی و گروه مثبت به معنی حضور سلول‌های سرطانی در گره‌های لنفاوی می‌باشد. نمونه‌های توموری از لحاظ درجه تمایز (stage)، براساس سیستم TNM (سایز تومور- تعداد گره‌های لنفاوی درگیر- متاستاز) در سه دسته I، II و III تقسیم‌بندی می‌شوند (۱۶). در مطالعه حاضر، تومورهای با درجه تمایز I و II در یک گروه (۵۷/۵٪) و تومورهای تهاجمی با درجه تمایز III (۴۲/۵٪) در گروه دیگری دسته‌بندی شدند. داده‌های حاصل از تغییرات بیان با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و با استفاده از نرم افزار REST، به منظور بررسی میزان تغییرات بیانی در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های نرمال حاشیه تومور، آنالیز شدند.

سایر آنالیزهای آماری مربوط به بررسی خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی نمونه‌های توموری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و با آزمون T-test تجزیه و تحلیل شدند و  $p<0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین، از نرم‌افزار SPSS برای بررسی دقت تشخیصی، توان بیومارکری و میزان حساسیت و اختصاصیت MEG3 جهت رسم منحنی ROC استفاده شد. هرچه محیط زیر منحنی ROC به یک نزدیک‌تر باشد، ژن مورد بررسی دقت تشخیصی بالاتری خواهد داشت (۱۷ و ۱۸).



شکل ۱. بررسی تفاوت بیان MEG3 با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی نمونه‌های بافت توموری پستان. الف) MEG3 در نمونه‌های توموری پستان کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های نرمال حاشیه تومور نشان می‌دهد. همچنین این کاهش بیان با (ب) متاستاز به گره‌های لنفاوی، (ج) درجه تمایزی بالای تومور و (د) سن بالای بیماران، ارتباط مستقیم و معنی‌داری دارد. \* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و  $P<0/05$  می‌باشد.

می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی در سرطان دهانه رحم مورد توجه قرار گیرد (۷). آنها در مطالعه دیگری نشان دادند که این کاهش بیان MEG3 به علت هایپرمتیلاسیون پروموتور MEG3 می‌باشد و سطح پایین MEG3 با عود بیماری و طول عمر کوتاه بیماران ارتباط دارد (۲۰).

در بررسی‌های انجام شده در سرطان ریه، Lu و همکارانش گزارش کردند که از بیان MEG3 در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های نرمال کاسته می‌شود و این کاهش بیان با درجه تمایزی تومور و سایز تومور مرتبط بود (۲۱). به علاوه آن‌ها نشان دادند که افزایش بیان MEG3 نه تنها تکثیر سلول‌های NSCLC را کاهش و باعث القای آپوپتوز می‌شود، بلکه با افزایش سطح بیان P53 و MDM2، تومورزایی را مهار می‌کند (۲۱). همچنین در سرطان دستگاه گوارش، کاهش MEG3 مشاهده شد که این سطح پایین بیان با تاثیر بر Bcl-2 و miR-181، باعث تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۲). کاهش بیان MEG3 همچنین در سایر سرطان‌ها از قبیل سرطان‌های مثانه (۹)، گلیوما (۲۳)، سرطان سلول‌های کبدی (۲۴)، سرطان کلورکتال (۲۵) و استئوسارکوما (۲۶) نیز گزارش شد (۲۷).

در مطالعه حاضر همچنین ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان MEG3 با متاستاز گره‌های لنفاوی و بدخیمی یا درجه بالای تمایز تومور در سرطان پستان وجود داشت. این یافته‌ها در تایید مطالعات صورت گرفته توسط Zhang و همکارانش در سرطان دهانه رحم (۷) و Shi و همکارانش در سرطان پستان (۱۹) می‌باشد. اما برخلاف یافته‌های حاصل از سرطان دهانه رحم (۷) و ریه (۲۱) مبنی بر ارتباط بین کاهش MEG3 و افزایش سایز تومور، در سرطان پستان، ارتباط معنی‌داری دیده نشد که احتمال دارد به علت تفاوت در تعداد نمونه‌ها یا سایز تومورهای مورد مطالعه باشد. در این مطالعه همچنین ارتباط معنی‌داری بین افزایش سن و کاهش بیان MEG3 گزارش شد که تاکنون گزارش مشابهی در این زمینه ارائه نشده است و می‌تواند مبین نقش کلیدی افزایش سن در بروز و پیشرفت سرطان باشد. بعلاوه، آنالیز منحنی ROC، نشان داد که MEG3 از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت استفاده به‌عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان پستان برخوردار می‌باشد که این یافته همراستا با یافته‌های به دست آمده در سرطان دهانه رحم (۲۰) و تخمدان (۲۸) می‌باشد.

با نظر به داده‌های حاصل از منحنی ROC و با اشاره به تاثیر MEG3 در پیشرفت و بدخیم شدن تومور، MEG3 می‌تواند به‌عنوان مارکر تشخیصی، پیش‌آگهی و همچنین هدف درمانی سرطان، مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرد. به طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان داد که بیان MEG3 در نمونه‌های توموری پستان کاهش می‌یابد و این کاهش بیان نقش مهمی در پیشرفت و بدخیمی تومور بازی می‌کند. با توجه به محدودیت‌های مطالعه حاضر از قبیل بررسی جمعیت آماری محدود، مطالعه در جمعیت آماری بزرگ‌تر با تکیه بر مکانیسم مولکولی عملکرد MEG3 به منظور استفاده از آن به‌عنوان هدف درمانی، پیشنهاد می‌شود.

### تقدیر و تشکر

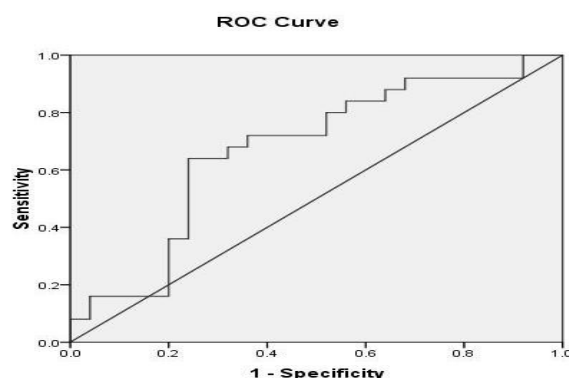
بدینوسیله از پرسنل محترم بیمارستان نورنجات تبریز جهت همکاری در این تحقیق و همچنین از بیمارانی که در انجام این پروژیهار نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

جدول ۲. تعداد و خصوصیات کلینیکوپاتولوژیکی نمونه های توموری پستان

| متغیرها            | تعداد نمونه (درصد) | P-value |
|--------------------|--------------------|---------|
| بافت توموری        | ۴۰(۱۰۰)            | *۰/۰۴۲  |
| بافت حاشیه توموری  | ۴۰(۱۰۰)            |         |
| سایز تومور         |                    |         |
| ≥۵ سانتیمتر        | ۱۹(۴۷/۵)           | ۰/۰۵۹   |
| <۵ سانتیمتر        | ۲۰(۵۰)             |         |
| درجه تمایزی TNM**  |                    |         |
| Stage I ,II        | ۲۳(۵۷/۵)           | *۰/۰۴۹  |
| Stage III          | ۱۷(۴۲/۵)           |         |
| متاستاز گره لنفاوی |                    |         |
| مثبت               | ۲۱(۵۲/۵)           | *۰/۰۱۸  |
| منفی               | ۱۹(۴۷/۵)           |         |
| سن                 |                    |         |
| ≥۵۰ سال            | ۲۲(۵۵)             | *۰/۰۰۷  |
| <۵۰ سال            | ۱۸(۴۵)             |         |

\*\*TNM= tumor-node-metastasis staging • نشان‌دهنده معنی دار بودن و

$p < 0.05$  می‌باشد



شکل ۲. منحنی ROC، برای MEG3 به منظور بررسی پتانسیل بیومارکری MEG3. سطح زیر منحنی (AUC=۰/۶۷)، نشان‌دهنده حساسیت و اختصاصیت کافی MEG3، جهت استفاده به‌عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان پستان می‌باشد.

### بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر در بررسی تغییرات سطح بیان MEG3 و کاهش بیان معنی‌داری را در نمونه‌های توموری پستان نسبت به نمونه‌های نرمال حاشیه تومور نشان داد. Shi و همکارانش با بررسی ۲۵۷ نمونه بافت توموری پستان با qRT-PCR، نشان دادند که در نمونه‌های توموری پستان، بیان MEG3 کاهش می‌یابد و این کاهش بیان با متاستاز به گره‌های لنفاوی و درجه تمایزی تومور ارتباط معنی‌داری داشت (۱۹).

مطالعه دیگری نشان داد که سطح بیان MEG3 در سرطان پستان پایین است و این کاهش بیان منجر به سوق سلول‌ها به سمت بدخیمی می‌شود (۱۰). همراستا با یافته‌های این مطالعه، Zhang و همکارانش گزارش کردند که در سرطان دهانه رحم بیان MEG3 کاهش می‌یابد که با تنظیم بیان miR-21 تکثیر سلولی و آپوپتوز را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این امر نشان داد که MEG3

## The Study of Long Noncoding RNA, Meg3, Expression Level and Its Association with Clinicopathologic Features in Breast Cancer

E. Soleimanpour (MSc)<sup>1</sup>, M.A. Hosseinpourfeizi (PhD)<sup>1\*</sup>, E. Babaei (PhD)<sup>1</sup>, V. Montazeri (MD)<sup>2</sup>

1. Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R.Iran

2. Noornejat Hospital, Tabriz, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(11); Nov 2017; PP: 14-20

Received: Jul 16<sup>th</sup> 2017, Revised: Sep 23<sup>th</sup> 2017, Accepted: Oct 3<sup>rd</sup> 2017

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Breast cancer is the most common invasive cancer and the second main cause of cancer death in women. Long noncoding RNAs (lncRNAs) play a critical role in different cellular and molecular activities such as carcinogenesis. Maternally Expressed Gene 3 (MEG3), is a long noncoding RNA that deregulates in various types of cancers. The aim of this study is the evaluation of MEG3 expression level and its association with clinicopathological features of breast tumor tissues.

**METHODS:** In this case-control study, 40 fresh-frozen breast tumor specimens and their paired non-tumoral adjacent tissues were collected from breast cancer patients living in the northwestern region of Iran. All tumor samples belonged to the invasive ductal carcinoma. After RNA extraction and cDNA synthesis, the expression level of MEG3 in breast tumor tissues compared to the paired adjacent normal tissues was investigated using specific primers and quantitative real-time PCR (qRT-PCR).  $\beta 2m$  was also used as an internal control for normalization.

**FINDINGS:** MEG3 expression level in all tumor samples significantly downregulated compared to the paired adjacent nontumoral specimens, with an average fold decrease of 3.355 ( $p=0.042$ ). Low level of MEG3 in tumor tissues was also related to the age of patients ( $p=0.007$ ), stage III ( $p=0.049$ ) and lymph node metastasis ( $p=0.018$ ).

**CONCLUSION:** The expression level of MEG3 significantly decreased in breast cancer and this downregulation was related to malignancy state of the tumor.

**KEY WORDS:** Breast Neoplasms, Long noncoding RNAs, Biomarker, Lymph node.

### Please cite this article as follows:

Soleimanpou E, Hosseinpourfeizi MA, Babaei E, Montazeri V. The Study of Long Noncoding RNA, Meg3, Expression Level and Its Association with Clinicopathologic Features in Breast Cancer. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(11):14-20.

\*Corresponding author: M.A. Hosseinpourfeizi (PhD)

Address Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R.Iran

Tel: +98 41 33362280

E-mail: pourfeizi@eastp.ir

## References

1. Miglioretti DL, Walker R, Weaver DL, Buist DS, Taplin SH, Carney PA, et al. Accuracy of screening mammography varies by week of menstrual cycle. *Radiol.* 2011;258(2):372-9.
2. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(6):90.
3. Da Sacco L, Baldassarre A, Masotti A. Bioinformatics tools and novel challenges in long non-coding RNAs (lncRNAs) functional analysis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(1):97-114.
4. Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S, Shiroishi T, Nomura M, Aisaka K, et al. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cell.* 2000;5(3):211-20.
5. Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol.* 2012;48(3):45-53.
6. Zhang X, Rice K, Wang Y, Chen W, Zhong Y, Nakayama Y, et al. Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinol.* 2010;151(3):939-47.
7. Zhang J, Yao T, Wang Y, Yu J, Liu Y, Lin Z. Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21. *Cancer Biol Ther.* 2016;17(1):104-13.
8. Sun M, Xia R, Jin F, Xu T, Liu Z, De W, et al. Downregulated long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2014;35(2):1065-73.
9. Ying L, Huang Y, Chen H, Wang Y, Xia L, Chen Y, et al. Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer. *Mol Biosyst.* 2013;9(3):407-11.
10. Sun L, Li Y, Yang B. Downregulated long non-coding RNA MEG3 in breast cancer regulates proliferation, migration and invasion by depending on p53's transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;478(1):323-9.
11. Zhu J, Liu S, Ye F, Shen Y, Tie Y, Zhu J, et al. Long Noncoding RNA MEG3 Interacts with p53 Protein and Regulates Partial p53 Target Genes in Hepatoma Cells. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139790.
12. Zhang CY YM, Li X, Zhang Z, Han CR, Yan B. Overexpression of long non-coding RNA MEG3 suppresses breast cancer cell proliferation, invasion, and angiogenesis through AKT pathway. *Tumour Biol.* 2017;39(6).
13. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15(3):532-4.
14. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
15. Zuker M MN. The UNAFold Web Server. The RNA institute, college of arts and sciences, state university of new york at albany.1995-2017. Available From: <http://unafold.rna.albany.edu/>.
16. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med.* 1978;8(4):283-98.
17. Pepe MS, Thompson ML. Combining diagnostic test results to increase accuracy. *Biostatistics.* 2000;1(2):123-40.
18. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-4.
19. Shi W, SX, YY, XQ, CX. Decreased expression of lncRNA MEG3 in breast cancer is associated with poor prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016;9(5): 5327-33.
20. Jun Zhang ZL, Yali Gao ,Tingting Yao. Downregulation of long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promoter hypermethylation in cervical cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(5):5.
21. Lu KH, Li W, Liu XH, Sun M, Zhang ML, Wu WQ, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer.* 2013;13:461.

22. Peng W, Si S, Zhang Q, Li C, Zhao F, Wang F, et al. Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34(1):79.
23. Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *J Cell Biochem*. 2012;113(6):1868-74.
24. Li Y, Ren M, Zhao Y, Lu X, Wang M, Hu J, et al. MicroRNA-26a inhibits proliferation and metastasis of human hepatocellular carcinoma by regulating DNMT3B-MEG3 axis. *Oncol Rep*. 2017;37(6):3527-35.
25. Yin DD, Liu ZJ, Zhang E, Kong R, Zhang ZH, Guo RH. Decreased expression of long noncoding RNA MEG3 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(6):4851-9.
26. Tian Z-Z, X-JG, Y-MZ, YF. Decreased expression of long non-coding RNA MEG3 acts as a potential predictor biomarker in progression and poor prognosis of osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11): 15138-42.
27. Wang Y, R-WL, X-TL, Yan X. Decreased long non-coding RNA MEG3 expression is associated with survival outcome and lymph node metastasis: a meta-analysis *Int J Clin Exp Med*. 2017;10 (4):5913-21.
28. Xiu YL, Sun KX, Chen X, Chen S, Zhao Y, Guo QG, et al. Upregulation of the lncRNA Meg3 induces autophagy to inhibit tumorigenesis and progression of epithelial ovarian carcinoma by regulating activity of ATG3. *Oncotarget*. 2017;8(19):31714-25