

# شناسایی بیان RNA غیرکدکننده طویل جدید IncUSMycN در بافت‌های پستان و بیش‌بیان آن در زنان مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجاری پستان در استان آذربایجان شرقی

ریحانه روانبخش گاوگانی<sup>۱</sup>، اسماعیل بابائی<sup>۲\*</sup>، محمدعلی حسینپور فیضی<sup>۳</sup>، وحید منتظری<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳. استاد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۴. استاد گروه جراحی قفسه سینه، بیمارستان نورنجات، تبریز، ایران.

## چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۷  
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۰۸

**زمینه:** سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان جهان است. مطالعات گروه جدیدی از RNAهای غیرکدکننده به نام RNAهای غیرکدکننده طویل را شناسایی کرده‌اند که نقش مهمی در ایجاد، گسترش و متاستاز سرطان ایفا می‌کنند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر شناسایی و ارزیابی بیان RNA غیرکدکننده طویل جدید IncUSMycN در سرطان پستان است.

**روش کار:** در این مطالعه، ۴۰ بافت توموری کارسینومای تهاجمی مجاری پستان و ۴۰ بافت سالم اطراف تومور جمع‌آوری شد و پس از استخراج RNA تام با استفاده از کیت ترايزول، سنتز cDNA صورت گرفت. با استفاده از روش qRT-PCR سطح بیان IncUSMycN در نمونه‌ها به دست آمد. برای بررسی ارتباط بیان در بافت‌های توموری نسبت به اطراف سالم آن‌ها، از نرم‌افزار REST استفاده شد. توان بیومارکری آن نیز به کمک نرم‌افزار SigmaPlot و با رسم منحنی ROC ارزیابی شد. علاوه بر این، ارتباط بیان IncUSMycN با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از نرم‌افزار REST افزایش معنادار بیان IncUSMycN را در بافت‌های توموری نسبت به حاشیه سالم مجاور آن‌ها نشان داد ( $p = 0/001$ , CI ۹۵٪). آنالیز منحنی ROC توان بیومارکری IncUSMycN را ثابت کرد ( $p = 0/001$ , ROC AUC = ۰/۷۲). نتایج بررسی بیان IncUSMycN با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نشان داد که بین بیان این IncRNA با مراحل اولیه تومور ( $p = 0/005$ , CI ۹۵٪) و تومورهای با درجه تمایز بهتر ( $p = 0/046$ , CI ۹۵٪) ارتباط معناداری وجود دارد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش بیان IncUSMycN در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان، بیان این RNA غیرکدکننده طویل می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی بالقوه جدید در سرطان پستان مطرح شود.

## کلیدواژه‌ها:

کارسینومای تهاجمی مجاری پستان، RNA غیرکدکننده طویل، IncUSMycN، بیومارکر.

## ۱. مقدمه

تشخیص داده شده و عامل منجر به مرگ ناشی از سرطان در زنان جهان است. سالیانه تقریباً ۲۵٪ تشخیص‌های مرتبط به سرطان و ۱۵٪ مرگ ناشی از آن به سرطان پستان اختصاص

باوجود سال‌ها تحقیق، سرطان پستان فراوان‌ترین سرطان

\* نویسنده مسئول: اسماعیل بابائی

نشانی: گروه علوم زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

دورنگار: ۰۴۱۳۳۳۵۶۰۲۶

تلفن: ۰۴۱۳۳۳۹۲۶۸۶

رایانه: babaei@tabrizu.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0002-1603-5166

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-9644-6204

ناحیه ۱۳۰ کیلوبازی است که شامل انکوژن MYCN نیز می‌باشد. توان IncUSMycN به‌عنوان بیومارکر پیش‌آگهی و نیز نقش آن در تکثیر سلولی و ایجاد تومور در رده‌های سلولی نوروبلاستوما به‌طور واضح آشکار شده است [۱۵]. به‌علاوه IncUSMycN می‌تواند بیان N-Myc را از طریق میان‌کنش با پروتئین NonO افزایش دهد [۱۶]. طبق مطالعات، بیش‌بیین N-myc منحصر به نوروبلاستوما نبوده و در سرطان‌های دیگری همچون سرطان پستان نیز گزارش شده است [۱۷]. بنابراین با توجه به این یافته‌ها و نبود مطالعات در مورد بیان IncUSMycN و نقش آن در دیگر سرطان‌ها، در این مطالعه برآن شدیم به شناسایی بیان و همچنین ارزیابی آن در سرطان پستان بپردازیم.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. جمع‌آوری نمونه‌های انسانی و بررسی نتایج پاتولوژی آن‌ها

نمونه‌های بافتی انسانی بلافاصله پس از برش در اتاق عمل، داخل ازت مایع به محل آزمایشگاه انتقال یافت و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- ذخیره شد. پس از بررسی نتایج آسیب‌شناسی بیماران بستری در بیمارستان نورنجات تبریز، ۴۰ نمونه بافت توموری با آسیب‌شناسی کارسینومای تهاجمی مجاری پستان به‌همراه نمونه‌های بافت سالم اطراف تومور مربوطه انتخاب شد. رضایت‌نامه کتبی از بیماران قبل از جمع‌آوری نمونه‌ها به‌دست آمد. مشخصات بیماران از نظر سن، سمت درگیر، اندازه تومور، درگیری گره‌های لنفاوی و درجه تمایز تومور در جدول ۱ آورده شده است. میانگین سنی بیماران مورد بررسی (۱۹۲/۱ ± ۵۲/۴۲) ۳۵-۸۰ است. بافت‌های تومور براساس سیستم TNM دسته‌بندی شد.

### ۲.۲. استخراج RNA

استخراج RNA تام سلولی از نمونه‌های بافتی انسانی جمع‌آوری شده با استفاده از کیت تریزول (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) و طبق پروتکل شرکت انجام گرفت. کیفیت RNAهای استخراج‌شده با الکتروفورز داخل ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین شد. نمایان شدن باندهای 5S، 18S و 28S حاکی از کیفیت زیاد RNAهای استخراجی است. تعیین غلظت و درجه خلوص RNAهای استخراجی با اندازه‌گیری جذب آن‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، توسط دستگاه پیکودراپ صورت گرفت.

دارد [۱]. از این رو بهبود راهکارهای تشخیصی و درمانی توسط روش‌های درمانی بالقوه باید از اولویت‌های تحقیقاتی باشد که در این میان، به‌کارگیری بیومارکرهای ژنتیکی می‌تواند مفید واقع شود. برای نیل به این هدف، فهم عمیق مسیرهای ژنتیکی و مولکولی که بتواند ایجاد، پیشرفت و گسترش سرطان را کنترل کند، بسیار سودمند خواهد بود.

استفاده از تکنولوژی‌های توالی‌یابی RNA کل سلول، منجر به شناسایی RNAهای غیرکدکننده طویل شده است (lncRNA) که به‌علت نقش آن‌ها در تنظیم بیان ژن‌ها مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است [۲]. این RNAها معمولاً رونوشت‌های طویل‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشند که عمدتاً ژن‌های آن‌ها طی تکامل محافظت‌شدگی ضعیفی دارند [۳]. شواهد زیادی نشان می‌دهد که lncRNAها به‌طور مستقیم و غیرمستقیم نقش مهمی در مسیرهای سلولی متعددی، از جمله تهاجم و متاستاز [۴]، تکثیر سلولی و آپوپتوز [۵-۶]، خاموشی ژن‌ها [۷] و متابولیسم لیپید [۸]، ایفا می‌کنند. بنابراین اختلال در تنظیم بیان lncRNAها با تأثیر بر فرایندهای بیولوژیکی، موجب بروز بیماری‌های متعدد به ویژه انواع مختلف سرطان می‌شود که از جمله می‌توان به سرطان استخوان [۹]، تومور مغزی با منشأ سلول‌های گلیال [۱۰]، ریه [۱۱] و کبد [۱۲] اشاره کرد. برای مثال براساس مطالعات صورت‌گرفته، ثابت شده است که برخی از RNAهای غیرکدکننده طویل همچون MEG3 و HOTAIR در ایجاد و گسترش تومور درگیرند [۱۳]. همچنین مشخص شده که بیان بالای HULC که برای اولین بار در سرطان کبد گزارش شده [۱۴]، با پیش‌آگهی ضعیف این سرطان همراه است. علاوه بر این، مطالعات بعدی ثابت کرد که این RNA غیرکدکننده باعث افزایش تکثیر سلولی در گلیوما [۱۰] و القای تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم در سرطان استخوان می‌شود [۹]. در مجموع این یافته‌ها اهمیت RNAهای غیرکدکننده طویل را برای معرفی به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی، پیش‌آگهی یا اهداف درمانی بالقوه بیش از پیش آشکار می‌کنند.

در سال ۲۰۱۴، IncUSMycN (long non-coding Upstream MycN) به‌عنوان یک RNA غیرکدکننده طویل جدید با ۳ اگزون فاقد توانایی کدکنندگی پروتئین شناسایی شد. ژن IncUSMycN ۱۴ کیلوباز فرادست جایگاه رونویسی MYCN بر روی کروموزوم 2p15.9 قرار گرفته است. بیان بالای این lncRNA برای اولین بار در بیماران مبتلا به نوروبلاستوما گزارش شده که ژنوم آن‌ها دارای تکثیر یک

جدول ۱. ارتباط بیان IncUSMycN با ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران مبتلا به کارسینومای مهاجم مجاری پستان

ویژگی‌ها	تعداد بیماران (درصد)	SEM IncUSMycN ± میانگین	ارزش P
گروه سنی			
<۴۵	۱۷ (۴۲/۵)	۱۷/۱۰ ± ۱/۰۳۵	۰/۴۳۷
>۴۵	۲۳ (۵۷/۵)	۱۷/۱۰ ± ۱/۰۳۵	
اندازه تومور			
کمتر از ۲cm	۲۱ (۵۲/۵)	۱۵/۸۲ ± ۰/۷۴۸	۰/۲۲۶
بیشتر از ۲cm	۱۶ (۴۰/۰)	۱۷/۶۲۴ ± ۱/۰۹۸	
مرحله تومور براساس TNM			
مرحله یک	۱۴ (۳۵/۰)	۱۴/۹۰۳ ± ۰/۹۲۱	۰/۰۰۵
مرحله دو	۱۳ (۳۲/۵)	۱۶/۴۲۷ ± ۱/۱۴۹	
مرحله سه	۱۰ (۲۵/۰)	۱۹/۵۱۲ ± ۱/۰۲۷	
متاستاز به گره‌های لنفاوی			
ندارد	۱۴ (۳۵/۰)	۱۵/۳۰ ± ۱/۰۵۴	۰/۱۸۶۶
دارد	۲۴ (۶۰/۰)	۱۷/۶۱ ± ۰/۷۸۴	
درجه تمایز تومور			
ضعیف	۴ (۱۰/۰)	۱۷/۳۴۲ ± ۲/۹۰۲	۰/۰۴۶
متوسط	۳۰ (۷۵/۰)	۱۷/۱۹۴ ± ۰/۶۸۳	
خوب	۴ (۱۰/۰)	۱۲/۹۳۵ ± ۱/۱۸۴	
محل تومور			
پستان راست	۱۷ (۴۲/۵)	۱۶/۳۵ ± ۰/۹۸۵	۰/۴۷۹
پستان چپ	۱۹ (۴۷/۵)	۱۷/۵۶ ± ۰/۸۲۰	

توجه: ارزش عددی ضخیم نوشته شده معنادار است (P &lt; ۰/۰۵). SEM: Standard Error Mean

۳' AGAGCTACGAGCTGCCTGAC 5' و پرایمر معکوس 5' AGCACTGTGTTGGCGTACAG 3' است. اندازه محصول تکثیرشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای IncUSMycN ۲۱۸ bp و برای Beta-actin ۱۸۴ bp بود. برنامه qPCR انجام گرفته به این ترتیب است: واسرشتگی اولیه ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشتگی ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر ۵۷ °C به مدت ۲۲ ثانیه، گسترش ۷۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی ۷۲ °C به مدت ۳ دقیقه. از آنجایی که بیان ژن Beta-actin در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های نرمال تغییر بیان نداشت، به عنوان کنترل داخلی برای نرمالیزاسیون مورد استفاده قرار گرفت. Real-time PCR در سه تکرار مستقل انجام شد. همچنین به منظور تأیید بیشتر هویت باندهای تکثیرشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای IncUSMycN، چند نمونه از محصولات PCR توالی‌یابی شد. لازم است ذکر شود که پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Gene Runner طراحی شد و اختصاصی بودن پرایمرها برای ژن‌های مربوطه، در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲.۲. سنتز cDNA و RT-PCR

غلظت RNAهای استخراجی که در محدوده ۳۰۰-۶۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (OD) در بازه ۰.۲-۱/۶ قرار داشت، برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور یک میکروگرم از RNA استخراجی با آنزیم رونوشت بردار معکوس و توسط کیت سنتز RT PrimeScript (Takara, China) و طبق پروتکل شرکت به cDNA تبدیل شد. qPCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی برای Beta-actin و IncUSMycN و با استفاده از کیت SYBR® Premix EX (Takara, China) TaqTM II Corbett Rotor- (Gene 6000 QIAGEN Rotor-Gene Q, Corbett Life) توسط دستگاه انجام شد. توالی‌های پرایمر مورد استفاده برای تکثیر IncUSMycN پرایمر مستقیم 5' ACTTGTCCTGCGTGCTTGT 3' و پرایمر معکوس 5' TGTGTGTGCTTTGGTGCTCA 3'، و توالی مورد استفاده برای تکثیر Beta-actin پرایمر مستقیم 5'

### ۲.۴. آنالیز آماری نتایج

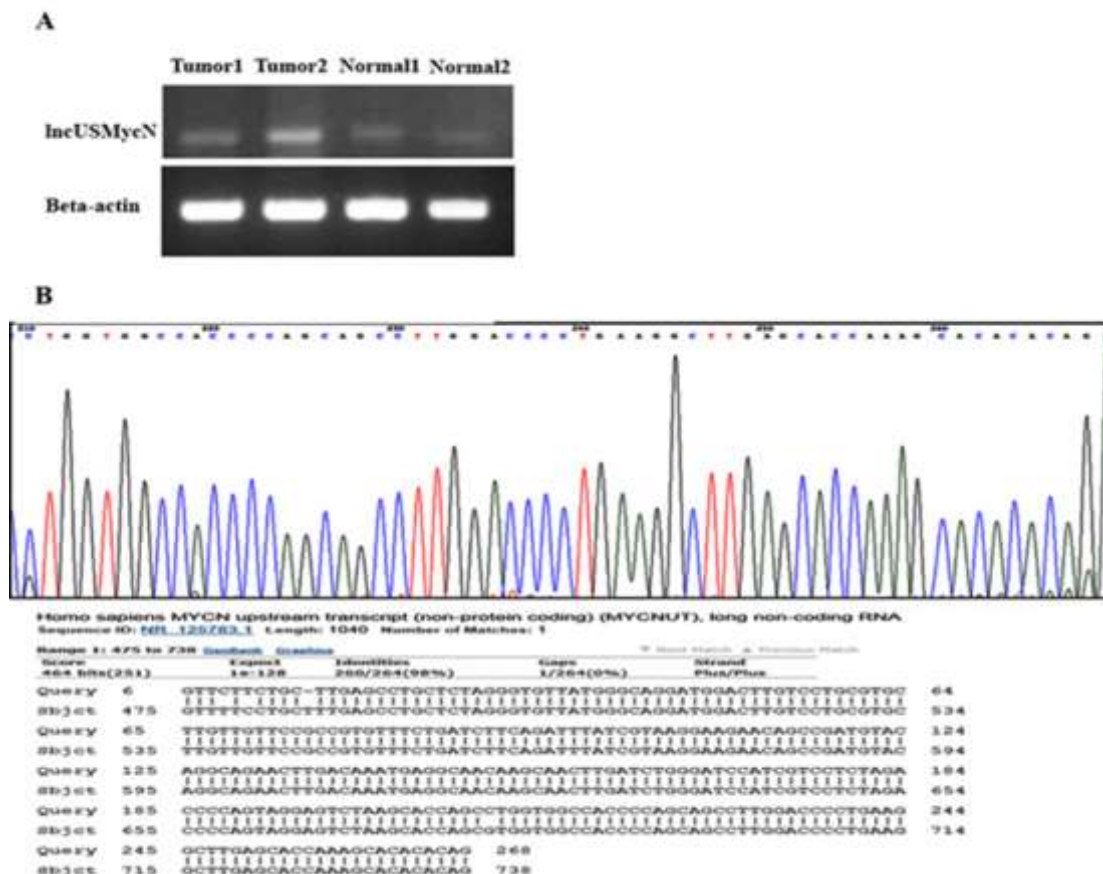
نرم‌افزار REST 2009 (Relative Expression Software Tool) برای بررسی بیان IncUSMycN در بافت‌های توموری پستان در مقایسه با بافت‌های حاشیة سالم مجاور مورد استفاده قرار گرفت. برای محاسبه بیان نسبی از فرمول  $2^{-\Delta Ct}$  استفاده شد. در این فرمول،  $\Delta Ct = Ct$  (IncUSMycN) - Ct (Beta-actin) است. آنالیز آماری بین دو گروه توسط Student's t-test و در بیش از دو گروه توسط one-way ANOVA انجام شد. داده‌ها از طریق نرم افزار SPSS v.22.0 مورد آنالیز قرار گرفت و  $p < 0/05$  از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. همچنین در این مطالعات، سطح اطمینان (CI) ۹۵٪ تعیین شد. جهت ارزیابی پتانسیل بیومارکری RNA غیرکدکننده IncUSMycN، از نرم‌افزار Sigma Plot (ROC Curve) استفاده شد. در واقع این نرم‌افزار آنالیزهای لازم برای بررسی پتانسیل یک

ژن یا تست را برای مطرح شدن به‌عنوان بیومارکر بررسی می‌کند. در این مطالعه، مقادیر ارائه‌شده در نمودارها و جداول به‌صورت میانگین سه تکرار مستقل  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean) است.

### ۳. یافته‌ها

#### ۳.۱. افزایش بیان IncUSMycN در بافت‌های توموری پستان در مقایسه با بافت‌های حاشیة سالم مجاور

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



شکل ۱. بیان ژن IncUSMycN. شکل A: تصویر باندهای تکثیر شده B-actin و IncUSMycN که در ژل آگارز ۲٪ بارگذاری شده است؛ شکل B: تأیید هویت باندهای تکثیرشده IncUSMycN توسط توالی‌یابی

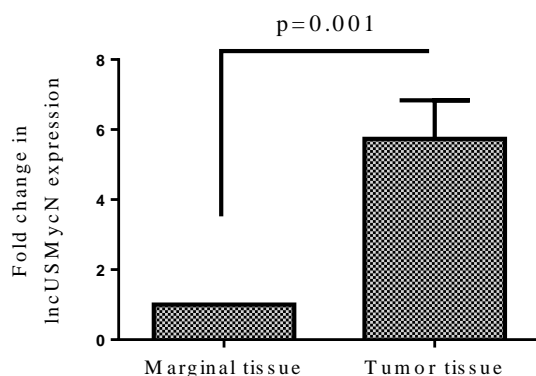
نتایج نرم‌افزار REST تفاوت معنادار بیان ژن IncUSMycN در نمونه‌های توموری نسبت به حاشیة تومور را نشان داد. طبق

نتایج نشان داد که سطح زیر نمودار (AUC) برای IncUSMycN ۰/۷۲ است ( $p = ۰/۰۰۰۶$ , CI ۰/۹۵) که این میزان در سطح خوب و قابل قبولی است؛ بنابراین بیان این ژن بیومارکر مناسبی برای تشخیص سرطان پستان در نمونه‌های بافتی محسوب می‌شود. حساسیت و اختصاصیت به دست آمده به ترتیب ۰/۶ و ۰/۸۵، و مقدار Cut off محاسبه شده ۱۷/۵ است (شکل ۳).

این نتایج، بیان ژن IncUSMycN در نمونه‌های توموری ۵/۸ برابر بیشتر از نمونه‌های حاشیة سالم مربوطه است ( $p = ۰/۰۰۱$ , CI ۰/۹۵) (شکل ۲).

### ۳.۲. توانایی IncUSMycN به عنوان بیومارکر تشخیصی بالقوه

به منظور ارزیابی پتانسیل بیومارکری IncUSMycN، آنالیز منحنی ROC با استفاده از نرم افزار SigmaPlot صورت گرفت.

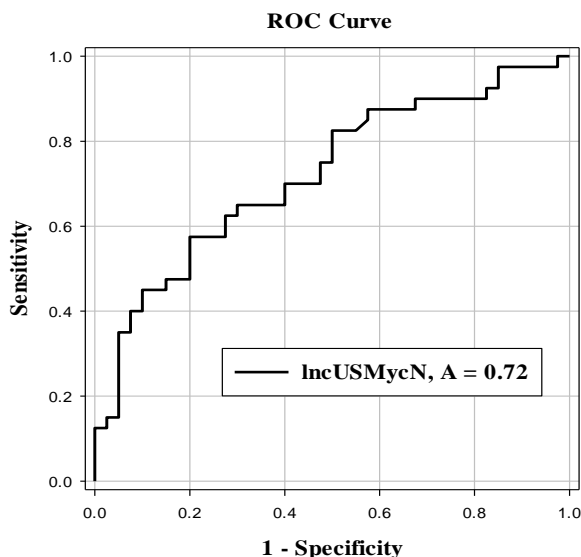


شکل ۲. نمودار افزایش معنادار بیان ژن IncUSMycN در نمونه‌های توموری نسبت به حاشیة آن

با مراحل اولیه تومور (Stage I) ( $p = ۰/۰۰۵$ , CI ۰/۹۵) و تومورهای با درجه تمایز بهتر ( $p = ۰/۰۴۶$ , CI ۰/۹۵) ارتباط معناداری وجود دارد. با سایر ویژگی‌ها ارتباط معناداری یافت نشد ( $p > ۰/۰۵$ , CI ۰/۹۵) (جدول ۱).

### ۳.۳. ارتباط بیان IncUSMycN با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی

نتایج بررسی بیان IncUSMycN با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نشان داد بین افزایش بیان این lncRNA



شکل ۳. منحنی ROC برای ژن IncUSMycN

سطح زیر نمودار نشان دهنده توان بیومارکری بیان IncUSMycN در بافت‌های توموری سرطان پستان است.

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

معناداری وجود دارد؛ ولی با سایر ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی، از قبیل سن بیماران مبتلا، درگیری گره‌های لنفاوی، درجه تمایز تومور و اندازه تومور، رابطه‌ای یافت نشد. مطالعه لیو و همکاران [۱۵] درباره بیماران مبتلا به نوروبلاستوما به وضوح نشان می‌دهد که بیان IncUSMycN می‌تواند به عنوان یک مارکر پیش‌آگهی ضعیف معرفی شود. در واقع بیماران با سطوح بیان بالای این lncRNA، میزان اندک بقا را دارند. همچنین مطالعات بر روی موش‌های مبتلا به نوروبلاستوما ثابت کرد که افزایش بیان این RNA با افزایش اندازه تومور و مراحل پیشرفته آن ارتباط معناداری دارد [۱۵]. در مجموع با توجه به نبود اطلاعات کافی در مورد بیان این lncRNA در سرطان، نمی‌توان دلیل معینی برای این مغایرت‌ها یافت. بنابراین ارزش پیش‌آگهی lncRNA‌ها در سرطان نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

در مجموع نتایج مطالعه حاضر با توجه به افزایش بیان IncUSMycN در سرطان پستان و همچنین ارزش بیان این lncRNA به عنوان بیومارکر تشخیصی، علاوه بر اینکه پیشنهاد می‌کند IncUSMycN می‌تواند به عنوان یک مارکر مولکولی بالقوه برای سرطان پستان مطرح شود، بر اهمیت نقش RNAهای غیرکدکننده طویل در سرطان تأکید بیشتری می‌کند.

#### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر در دانشگاه تبریز و تحت حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری (شماره طرح: ۹۳۰۴۵۰۰۱) و با تأیید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد (شماره تأیید: IR.TBZMED.REC.1392.249). بر خود فرض می‌دانیم از تمامی مسئولان و کارکنان محترم اتاق عمل بیمارستان نورنجات تبریز که در تهیه نمونه‌های بافتی با ما همکاری کردند و نیز کارکنان دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی نماییم.

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان جهان شناخته شده که حدود ۸۰٪ آن از نوع کارسینومای تهاجمی مجاری پستان است [۱۸]. اگرچه این سرطان در کشورهای توسعه یافته شایع‌تر است، تقریباً ۶۴٪ مرگ ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد [۱۹]. به رغم تلاش‌های بسیار برای یافتن راهکارهای درمانی برای تشخیص و درمان سرطان پستان، مکانیسم‌های ژنتیک مولکولی درگیر در پاتوژنز این بیماری همچنان ناشناخته باقی مانده است. با توجه به نقش lncRNAها در برخی از سرطان‌ها، در تحقیق حاضر الگوی بیان IncUSMycN در سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج مطالعه افزایش معنادار بیان IncUSMycN در بافت‌های توموری کارسینومای مهاجم مجاری پستان نسبت به بافت‌های سالم حاشیه آن را نشان داد و IncUSMycN را به عنوان بیومارکر تشخیصی بالقوه در سرطان پستان پیشنهاد کرد. علاوه بر آن، نتایج ارتباط معنادار بیان این lncRNA را در مراحل اولیه تومور ثابت کرد.

در راستای این یافته‌ها، مطالعه حاضر علاوه بر اینکه بیان IncUSMycN را در سرطان پستان شناسایی کرد، بیش‌باین این lncRNA را نیز در بافت‌های توموری پستان نسبت به بافت‌های سالم حاشیه آن‌ها به اثبات رساند.

از اهداف دیگر این مطالعه، ارزیابی توان بیومارکری (به عنوان بیومارکر تشخیصی) بیان IncUSMycN در سرطان پستان بود. به همین منظور، آنالیز منحنی ROC جهت بررسی پتانسیل تشخیصی آن انجام گرفت. نتایج حاصل از منحنی ROC، سطح زیر منحنی (AUC) را ۰/۷۰ نشان داد. این میزان از AUC، بیانگر توان بیومارکری IncUSMycN در تشخیص بافت‌های توموری از نمونه‌های سالم است.

علاوه بر این، مطالعه حاضر به بررسی توان این بیومارکر در پیش‌آگهی سرطان پستان نیز پرداخت. نتایج این تحقیق در راستای بررسی ارتباط بیان IncUSMycN با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی نشان داد که بین بیان این lncRNA با مراحل اولیه تومور و تومورهای با درجه تمایز بهتر ارتباط

#### References

- [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 2017; 67 (2): 100-21.
- [2]. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet 2011; 12 (12): 861.
- [3]. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. Mol Cancer Biol 2011; 10 (1): 38.
- [4]. Gao Y, Chen G, Zeng Y, Zeng J, Lin M, Liu X, et al. Invasion and metastasis-related long noncoding RNA expression profiles in hepatocellular carcinoma. Tumour Biol 2015; 36 (10): 7409-22.
- [5]. 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.
- [6]. 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.
- [7]. Brockdorff N. Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *RNA*. 2013.
- [8]. Cui M, Xiao Z, Wang Y, Zheng M, Song T, Cai X, et al. 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.
- [9]. 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.
- [10]. 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.
- [11]. 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.
- [12]. Chen W-m, Qi F-z, Xia R, Sun M, Xu T-p, Yin L, et al. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation by epigenetic silencing of KLF2. *J Hematol Oncol* 2015; 8 (1): 57.
- [13]. Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 2013; 152 (6): 1298-307.
- [14]. 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.
- [15]. Liu PY, Erriquez D, Marshall GM, Tee AE, Polly P, Wong M, et al. Effects of a novel long noncoding RNA, lncUSMycN, on N-Myc expression and neuroblastoma progression. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2014; 106-7.
- [16]. Pichler M, Calin GA. Long noncoding RNA in neuroblastoma: New light on the (old) N-Myc story. Oxford University Press 2014.
- [17]. Mizukami Y, Nonomura A, Takizawa T, Noguchi M, Michigishi T, Nakamura S, et al. N-myc protein expression in human breast carcinoma: prognostic implications. *Anticancer research* 1995; 15 (6B): 2899-905.
- [18]. 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.
- [19]. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61 (2): 69-90.

## Detection of Expression of Novel Long Non-coding RNA lncUSMycN in Breast Tissues and its Overexpression in Women with Breast Invasive Ductal Carcinoma in East Azerbaijan Province

Reyhaneh Ravanbakhsh Gavvani<sup>1</sup>, Esmail Babaei<sup>1\*</sup>, Mohammad Ali Hosseinpourfeizi<sup>1</sup>, Ashraf Fakhrajou<sup>2</sup>, Vahid Montazeri<sup>3</sup>

1. Department of Biological Sciences, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3. Department of Thoracic Surgery, Nour-nejat Hospital, Tabriz, Iran.

### Abstract

**Background** Breast cancer is the most common tumor malignancy among women worldwide. Studies have revealed new class of RNA molecules named Long non-coding RNAs that play important role in tumor development, progression and metastasis. Therefore, this study aimed to evaluate long non-coding RNA lncUSMycN expression in breast cancer.

**Materials & Methods** : In this study, 40 breast tumor with invasive ductal carcinoma and 40 normal marginal tissues were collected and after RNA extraction using TRizol kit, cDNA was synthesized. Expression level of lncUSMycN was obtained by applying qRT-PCR method. In order to evaluate association of lncUSMycN expression in tumor compared to normal tissues REST software was used. Biomarker potential of lncUSMycN was evaluated by drawing ROC curve using SigmaPlot. In addition, relationship between lncUSMycN expression and clinicopathological features was analysed.

**Results** Results from REST indicated significant upregulation of lncUSMycN in tumor tissues compared to normal marginal specimens (95% CI,  $p = 0.001$ ). ROC curve analysis demonstrated the biomarker potential of lncUSMycN ( $ROC^{AUC} = 0.72$ ,  $p = 0.0006$ ). Evaluation of the relationship between lncUSMycN expression and clinicopathological features revealed that there are significant association between lncUSMycN expression and early stages (95% CI,  $P = 0.005$ ) and well-differentiated tumors (95% CI,  $P = 0.046$ ).

**Conclusion** Considering upregulation of lncUSMycN expression in invasive ductal carcinoma this lncRNA may be probably considered as a new potential diagnostic biomarker for breast cancer.

**Received:** 2018/09/29  
**Accepted:** 2018/10/30

**Keywords:** Breast invasive ductal carcinoma, Long non-coding RNA, lncUSMycN, Biomarker.