

## **Association between miR Let-7g gene expression and the risk of cervical cancer in human papillomavirus-infected patients**

**Barazandeh F<sup>1</sup>, Onsory Kh<sup>1\*</sup>, Mohseni-Meybodi A<sup>2</sup>**

1- Department of Biology, Faculty of Science, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, I. R. Iran.

2- Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, I. R. Iran.

Received February 19, 2017; Accepted December 11, 2017

### **Abstract:**

**Background:** The miR Let-7g expression has been investigated in several cancers but no report is available on cervical cancer patients. The aim of this study was to evaluate the association between miR Let-7g expression and the risk of cervical cancer in human papillomavirus (HPV)-infected patients.

**Materials and Methods:** In this case-control study, 20 paraffin-embedded tissue samples were collected from HPV-infected cervical cancer patients, 20 samples from patients with no infection and 20 healthy women referred to the Mirzakochak Khan Jangali Hospital in Tehran in 2015. Then, the miR Let-7g gene expression was measured by the real-time polymerase chain reaction method.

**Results:** The results showed that miR Let-7g expression was decreased in HPV-infected and non-infected cervical cancer patients compared to the control group ( $P=0.0001$  and  $P=0.03$ , respectively). There was a significant decrease in miR Let-7g expression in HPV-infected patients compared to non-infected ones ( $P=0.0001$ ). Also, a positive correlation was observed between decreased miR Let-7g expression and the stage of the disease, but no significant correlation was found between age of the patients and the level of gene expression in the studied population.

**Conclusion:** According to the results of the present study, the miR Let-7g expression in cervical cancer patients is significantly decreased compared to the control group. Therefore, evaluation of the microRNA expression can be used as a valuable prognostic marker for early diagnosis of cervical cancer.

**Keywords:** Cervical cancer, Human papillomavirus, MicroRNA Let7g gene expression, Real-time PCR

**\* Corresponding Author.**

**Email:** onsory@gmail.com

**Tel:** 0098 919 102 0890

**Fax:** 0098 218 336 7000

**Conflict of Interests: No**

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2018; Vol. 21, No 6, Pages 569-576*

**Please cite this article as:** Barazandeh F, Onsory Kh, Mohseni-Meybodi A. Association between miR Let-7g gene expression and the risk of cervical cancer in human papillomavirus-infected patients. *Feyz* 2018; 21(6): 569-76.

## ارتباط میان بیان ژن miR Let-7g و خطر ابتلا به سرطان دهانه رحم در بیماران آلوده به پاپیلوماویروس انسانی

فاطمه برازنه، خدیجه عنصری، آناهیتا محسنی میبدی

## **خلاصه:**

**سابقه و هدف:** اگرچه تغییر بیان 7g-miR در بسیاری از انواع سرطان‌ها بررسی شده، اما تاکنون مطالعه‌ای روی تغییر بیان آن در سرطان دهانه رحم صورت نگرفته است. در این مطالعه ارتباط بیان ژن مذکور در زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم آشوده به HPV (Human papillomavirus) بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد شاهدی ۲۰ نمونه بافت پارافینه از بیماران آلوده به HPV، ۲۰ نمونه از بیماران فاقد آلودگی و ۲۰ فرد سالم مراجعت کننده به بیمارستان میرزاکوچک خان جنگلی تهران طی سال ۱۳۹۴ بررسی گردید. بیان 7g Let-7 miR توسط Real Time PCR نسبی سنجیده شد.

**نتایج:** بیان miR-Let-7g در بافت‌های سرطانی آلوده به ویروس و بیماران فاقد آلودگی به ترتیب نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ( $P=0,0001$ ) و ( $P=0,0001$ ). ارتباط معنی داری بین کاهش بیان این ژن در گروه بیماران آلوده به HPV نسبت به بیماران غیرآلوده نیز مشاهده شد ( $P=0,0001$ ). همچنین، ارتباط مستقیمی بین کاهش بیان miR-Let-7g با مرحله بیماری وجود داشت و ارتباطی بین بیان ژن مذکور و گروه‌های مختلف سمت، مشاهده نگردید.

**نتیجه گیری:** میزان بیان miR-7g در نمونه های سرطانی نسبت به گروه کنترل به شدت کاهش می یابد. بنابراین، اندازه گیری بیان آن ممکن است ارتباط مستقیم با افزایش خطر ابتلا به سرطان دهانه رحم داشته باشد.

واژگان کلیدی: سرطان دهانه رحم، پاپیلوما ویروس انسانی، بیان Real Time PCR .microRNA Let7g

این عفونت در اوایل سنین جوانی و بعد از شروع ارتباط جنسی ایجاد می‌گردد، ولی بروز آن به سرعت کاهش یافته و فقط در ۱۰ درصد زنان بالای سن ۳۰ سال باقی می‌ماند. سلطان دهان رحم در درصد کمی از زنان (۱۲ درصد) که عفونت با انواع پرخطر HPV را دارند، رخ می‌دهد [۵]. microRNAs زیرگروه بزرگی از RNAs غیرکدکننده هستند که روی بیان ژن‌ها تاثیر گذاشته و تغییر در بیان آنها می‌تواند روی فرایندهای زیستی مهم از جمله Let-7 تکثیر، تمایز و آپوپتوز تاثیرگذار باشد [۶]. خانواده microRNA گروهی از Hsntnd که هم به عنوان Let-7 انکوژن و هم به عنوان مهار کننده تومور عمل می‌کنند. این خانواده در انسان دارای ۱۳ عضو بوده که شامل Let-7a-1, Let-7a-2, Let-7d, Let-7e, Let-7f-1, Let-7a-3, Let-7b, Let-7c, Let-7f-2, Let-7g, Let-7i, mir-202, mir-98 در اغلب سرطان‌ها کاهش بیان Let-7 مشاهده می‌شود که نقش مهار-کننده توموری آن را می‌رساند. Let-7 در بسیاری از ژن‌ها در نقاط شکننده مرتبط با سرطان قرار دارد و گزارش Boyerinas و همکاران اویلین ارتباط Let-7 با سرطان‌های انسانی را آشکار کرده است [۷]. بیان بالای پنج عدد از هفت Let-7 miR انسانی در سلول‌های A549 همزمان با کاهش سلول‌های تکثیر شونده به دلیل که مهار همنین بنج microRNA موح افزایش،

مقدمه ۴۰ سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع زنان در جهان می باشد و رتبه هفتم در کل سرطان های زنان را به خود اختصاص داده است. میزان کلی شیوع این سرطان در جهان در حال حاضر در رتبه هشتم می باشد [۱]. شیوع سرطان دهانه رحم در ایران در سال ۲۰۰۹، رتبه یازدهم در بین کل سرطان های زنان را داشته که نسبت به رتبه سیزدهم در سال ۲۰۰۸ افزایش نشان می دهد. علت ۹۰ تا ۹۵ درصد موارد سرطان دهانه رحم را به عفونت ویروس پاپیلومای انسانی (Human papillamavirus; HPV) نسبت می دهند [۳،۲]. انواع پرخطر این ویروس باعث ایجاد عفونت در ۸۰ درصد زنان در طول زندگی شان می گردد [۴].

۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

**گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشگاه رویان، تهران، ایران**

\***دانشگاه نویسندۀ مسئول،**  
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند،  
ایران

تلفن: ٩١٩١٠٢٠٨٩٠ دوّرنویس: ٠٢١٨٣٣٦٧٠٠٠

پست الکترونیک: onsory@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۹/۲۰ تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱

مجذور کای و برای مقایسه گروه‌ها از نظر بیان ژن از آزمون ANOVA استفاده شد.

#### استخراج DNA ویروسی:

با استفاده از کیت اختصاصی تشخیص ویروس HPV18 و HPV16 (DNA-Technology, Russia) بافت گروه بیمار آلووده به HPV و گروه کنترل، استخراج DNA انجام شد. توسط دستگاه Flash PCR Detector وجود و یا عدم- وجود ویروس HPV16 و HPV18 بررسی و توسط نرم‌افزار آنالیز شد. سپس، میزان خلوص DNA v4 Gene Deno vix با دقت ۱:۲۰ در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. نمونه‌هایی که دارای جذب نوری بین ۱/۹ تا ۱/۷ بودند، برای مطالعه و بررسی انتخاب شدند.

#### :PCR

DNA ژنومی استخراج شده هر دو گروه از نظر ابتلا به HPV16 و HPV18 با استفاده از کیت Technology-DNA PCR Amplification Kit (HPV 16 & 18 Iot: 8045) تکثیر شد. در هر آزمایش از نمونه‌های کنترل مثبت و منفی نیز استفاده شد. برنامه زمانی شامل ۵ دقیقه دناتوره شدن اولیه در ۴۵، ۹۴°C چرخه ۳ مرحله‌ای (دناتوره شدن در ۹۴°C، واشرست شدن در دمای ۶۴°C و گسترش یافتن در دمای ۷۲°C هریک به- مدت ۴۵ ثانیه) و دمای نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

#### استخراج RNA و تهیه cDNA:

بعد از پارافین‌زدایی، استخراج RNA توسط ترایازول صورت گرفت. به منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج- شده جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. همچنین، کیفیت cDNA‌ها توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترانس کرپتاز معکوس و با ترکیب شامل ۱ میکرولیتر ۱۰X Random Hegzamer، ۱ میکرولیتر پرایمر dT Oligi ۱۰X، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ mM و ۵ میکرولیتر MMuLV RNA ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ۱۰X DEPC به هر میکروتیوب صورت گرفت. کل واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA و سپس ۱۰ دقیقه

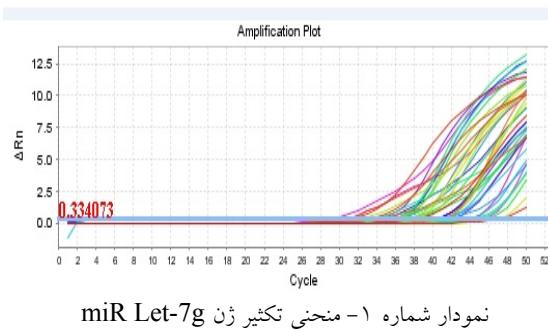
تعداد سلول‌های تکثیرشونده شده است [۸]. از طرف دیگر، Let-7 به شکل اختصاصی کاسپاز ۳ را هدف قرار داده و بدین ترتیب در تنظیم آپوپتوz نیز ایغای نقش اساسی بازی می‌کند [۹]. miR Let-7 در تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوz سلول‌ها نقش اساسی بازی می‌کند [۱۰]. گزارشات متعددی حاکی از کاهش بیان 7 miR Let-7 در اغلب سرطان‌ها از جمله ریه، روده بزرگ، معده و ملانوما می‌باشد که نشان‌دهنده نقش مهارکنندگی توموری آن است. در همین راستا نشان داده شده است که با تزریق Let-7a به موش‌های مبتلا به سرطان‌های سینه، کولون و کبد، روند رشد تومور کاهش می‌یابد [۱۱]. با این حال، در برخی از سرطان‌ها نظیر لنفومای پیشرفته، افزایش بیان Let-7b رخ داده که بر نقش انکوژنی این خانواده در شرایط خاص دلالت دارد [۹]. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی بیان miR Let-7g در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم آلووده به HPV در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

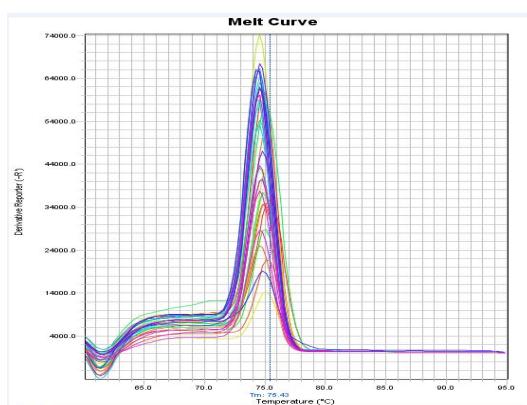
##### جمع‌آوری نمونه:

در این مطالعه مورد-شاهدی، مجموعاً ۱۷۶ نمونه بافت پارافینیه بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم پس از بررسی توسط پاتولوژیست و بعد از تعیین درجه و مرحله بیماری جمع‌آوری گردید. افراد شرکت‌کننده از لحاظ سنی همسان شده و هر دو گروه در محدوده سنی ۲۱ تا ۴۶ سال قرار داشتند. پس از مطالعه دقیق پرونده بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان، پرونده‌هایی که نتایج آزمایش پاتولوژی آن‌ها CIII و IC گزارش شده بود، جهت ورود به مطالعه انتخاب شدند. لازم به ذکر است که در دیسپلازی شدید- (CINIII) تمام ضخامت اپی‌تیلیوم سرویکس را سلول‌های افتراق- نیافنه تشکیل داده و در کارسینوم مهاجم (IC) سلول‌های سرطانی از لگن واقعی بیرون رفته و مخاط مثانه یا رکتوم را نیز درگیر کرده است [۱۲]. بنابراین، نمونه‌های سرطانی در مراحل اولیه بیماری و HPV همچنین نمونه‌هایی که عامل ابتلا به بیماری آنها فاکتور نبودند، از گروه اول مطالعه حذف شدند. تعداد فرزندان و همچنین نمونه‌هایی که عامل ابتلا به بیماری آنها فاکتور HPV وضعيت تا هل در افراد شرکت‌کننده در این مطالعه نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب، ۲۰ نمونه سرطانی آلووده به HPV، ۲۰ نمونه مبتلا به سرطان دهانه رحم بدون ابتلا به این ویروس و ۲۰ نمونه پاپ اسمیر از زنان سالم مراجعه‌کننده به بیمارستان میرزاکوچک خان جنگلی تهران طی سال ۱۳۹۴ بعد از اخذ رضایت‌نامه کتبی آگاهانه با رعایت اصول اخلاق در پژوهش جمع‌آوری گردید. برای مقایسه توزیع سنی، تعداد فرزندان، وضعیت تا هل و مرحله بیماری در سه گروه مورد مطالعه از آزمون

نداشتند. بیشترین (۶۵ درصد) تعداد بیماران آلوه بیش از ۲ فرزند داشتند. حداکثر بیماران دارای عفونت و فاقد آلوهگی در مرحله تهاجمی IC بیماری قرار داشتند (۸۰ درصد) و در زنان آلوه به miR Let-7 عفونت HPV تفاوت چشمگیری بین کاهش بیان g (۶۷ در مراحل CIII و IC مشاهده شد. بیشترین آلوهگی بیماران (درصد) با HPV ویرایش ۱۶ بود. تکثیر ژن miR Let-7g در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. تائید اختصاصی بودن عملکرد پرایمرهای طراحی شده و نیز عدم آلوهگی به DNA ژئومی با بررسی پیک منحنی ذوب اختصاصی در دمای ۷۶/۴۳ درجه سانتی گراد انجام پذیرفت (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱- منحنی تکثیر ژن miR Let-7g



نمودار شماره ۲- منحنی ذوب تک باند برای miR Let-7g

نتایج حاصله حاکی از آن است که بیان miR Let-7g در نمونه‌های سرطانی آلوه به ویروس نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است ( $P=0.0003$ ) (نمودار شماره ۳). همچنین، کاهش قابل ملاحظه‌ای میان بیان ژن در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم بدون عفونت ویروسی نسبت به گروه سالم مشاهده گردید ( $P=0.03$ ) (نمودار شماره ۴). ارتباط معنی داری بین کاهش بیان این ژن در بین بیماران آلوه به عفونت پاپیلوما ویروس نسبت به بیماران فاقد آلوهگی نیز مشاهده شد ( $P=0.0001$ ) (نمودار شماره ۵).

در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد برای غیرفعال کردن آنزیم انجام شد. در انتهای این مرحله cDNA تکرشتهای حاصل شد و با خاصیت RNase موجود در آنزیم ترانس کرپتاز معکوس RNAs حذف شدند.

**Real time PCR:**  
پرایمر اختصاصی برای دو ژن GAPDH (ژن مرجع) و miR Let-7g با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی شد (جدول شماره ۱) و بیان ژن توسط Real-Time PCR (ABI StepOne, USA) صورت گرفت. دمای اتصال برای دو ژن miR Let-7 و GAPDH به ترتیب ۵۸ و ۶۷ درجه سانتی گراد DNA در نظر گرفته شد. اختصاصیت پرایمر و عدم آلوهگی به ژئومی توسط پیک منحنی ذوب اختصاصی (۹۰ و ۹۱ درجه) miR Let-7 و GAPDH مشخص گردید. جهت انجام واکنش ۱۰ Real-Time PCR میکرو لیتر از مستر میکس (SYBER TM 2X), ۰/۵ میکرو لیتر میکرو لیتر از میکرو لیتر ۰/۵ میکرو لیتر پرایمر عقبی، ۲ میکرو لیتر cDNA سنتز شده و ۷ میکرو لیتر dH<sub>2</sub>O ترکیب شده و در دستگاه قرار داده شد. پس از واکنش داده‌های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج شد و اندازه گیری میزان بیان miR Let-7g با روشنای Graph pad نمودار  $\Delta\Delta Ct$  انجام شد و با استفاده از نرم افزار Real-Time PCR رسم گردید.

جدول شماره ۱- مشخصات پرایمرهای اختصاصی miR Let-7g و ژن مرجع

Primer	Sequencce 5'→3'	Tm
Let-7g-F	GTTGGTGAGGTAGTAGTTGT	51.11
Let-7g-R	GTGCAGGGTCCGAGGT	51.06
GAPDH-F	ATGGAGAAGGCTGGGCT	62.05
GAPDH-R	ATCTGAGGCTTGTCTACTTCTC	61.62

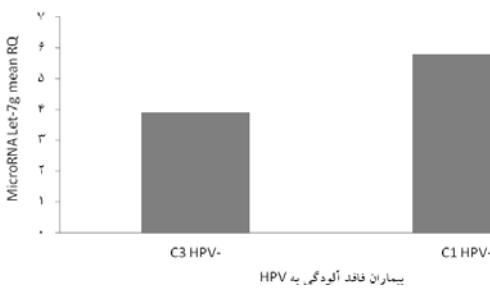
### آنالیز آماری

به منظور بررسی میزان بیان ژن از مقایسه میانگین Ct (چرخه آستانه) در سه بار تکرار استفاده شد. مقایسه میزان بیان ژن در گروه مورد و شاهد بر مبنای آزمون آماری t و با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ صورت گرفت و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

بیشترین (۶۰ درصد) تعداد بیماران آلوه به HPV کمتر از ۳۵ سال سن داشتند. افراد شرکت کننده سابقه مصرف قرص های ضدبارداری (بیش از ۵ سال)، سیگار و هیچ بیماری سیستم ایمنی

## ارتباط میان بیان ژن microRNA Let-7g و ...

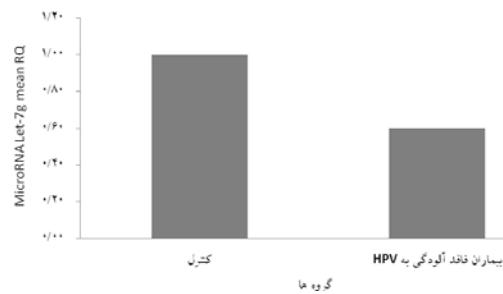


نمودار شماره ۷- مقایسه میانگین بیان miR Let-7g در بیماران فاقد آلودگی به HPV و گروه CIII بیماری آلودگی در دو مرحله CI و CIII بیماری

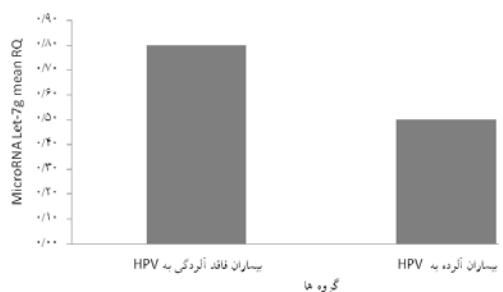
بیشترین تعداد بیماران در مرحله IC بیماری قرار داشتند و مقایسه بیان Let-7g در بیماران آلوده به عفونت ویروسی در دو مرحله IC و CIII بیماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری میان کاهش بیان این ژن بر حسب مرحله بیماری وجود دارد ( $P=0.003$ ) (نمودار شماره ۶). همچنین، رابطه مستقیمی بین کاهش بیان این ژن و مرحله بیماری در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم بدون آلودگی به ویروس پاپیلوما نیز مشاهده گردید که از نظر آماری نیز معنی‌دار بوده است ( $P=0.05$ ) (نمودار شماره ۷). درمجموع نتایج نشان دهنده وجود رابطه مثبت بین تغییر بیان ژن و مرحله بیماری می‌باشد. بیشترین تعداد بیماران در محدوده سنی کمتر از ۳۵ سال قرار داشتند و مقایسه بیان miR Let-7g در زنان آلوده به عفونت HPV با رده سنی نشان داد که ارتباطی بین میانگین بیان miR Let-7g در دو گروه سنی کمتر و بیشتر از ۳۵ سال وجود ندارد ( $P=0.19$ ), همچنان که این رابطه در در زنان فاقد آلودگی نیز مشاهده نگردید ( $P=0.59$ ).



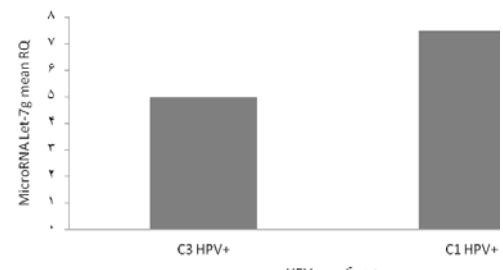
نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین بیان miR Let-7g بین بیماران آلوده به ویروس پاپیلوما و گروه کنترل



نمودار شماره ۴- مقایسه میانگین بیان miR Let-7g بین بیماران فاقد آلودگی و گروه کنترل



نمودار شماره ۵- مقایسه میانگین بیان miR Let-7g بین بیماران آلوده به HPV و گروه فاقد آلودگی



نمودار شماره ۶- مقایسه میانگین بیان miR Let-7g در بیماران آلوده در دو مرحله CI و CIII بیماری

پاپیلوماویروس یکی از عوامل اصلی ایجاد سرطان سرویکس است [۱۳]. عفونت پاپیلوماویروس شامل عفونتهای پوستی و سرطان‌های متعددی از جمله سرویکس می‌باشد که در سرتاسر جهان بهویژه در ایران شایع می‌باشد [۱۴]. پروتئین‌های ویروسی با ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین‌های سلولی باعث تکثیر غیرطبیعی سلول‌ها می‌شوند و با ایجاد اختلال در بیان ژن‌ها باعث پیشرفت سلول به سمت سرطانی شدن می‌شوند [۱۵]. در مطالعه حاضر، میزان کاهش بیان miR Let-7g در بیماران آلوده به عفونت پاپیلوماویروس نسبت به گروه فاقد آلودگی و همچنین گروه کنترل نشان‌دهنده تاثیر انکوپروتئین‌های ویروسی در تغییر بیان این ژن می‌باشد. نتایج تحقیقات اخیر حاکی از آن است که پتانسیل سرطان‌زاوی ژنتیک‌های پرخطر HPV به بیان ژن‌های E7 و E6 بستگی دارد [۱۶]: این دو ژن در مسیر چرخه سلولی تداخل

غیرفعال شدن Ras تایید نمودند. تحقیقات این گروه، نقش انکوژنی miR Let-7 را در تمایز سلولی و سرطان غدد درونریز نشان داد [۷]. در انسان کاهش چشم‌گیر بیان خانواده Let-7 در بسیاری از سرطان‌ها از جمله ریه، روده بزرگ، معده و ملانوما گزارش شده و در سرطان ریه کاهش بیان Let-7 با بقا رابطه عکس داشته است [۲۱]. در اغلب سرطان‌ها میزان بیان miR Let-7 کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده نقش مهارکنندگی توموری این ژن می‌باشد؛ با این حال، در برخی از سرطان‌ها نظیر لنفومای پیشرفته افزایش بیان Let-7b و Let-7i و رخ داده که بر نقش انکوژنی این خانواده در شرایط خاص دلالت دارد [۸]. بیان شده است که تخریب و سرکوب HMGA2 توسط miR Let-7 منجر به رشد بیشتر سلول‌های سرطانی می‌شود و نقش مستقیم آن در تنظیم بیان mRNA از طریق تاثیر بر ۳'UTR ۳ مولکول mRNA ژن هدف HMGA2 در سطح ترجمه به اثبات رسیده است [۲۲]. ایجاد برخی سرطان‌ها نظیر مزوتلیوم بدخیم، با کاهش بیان Let-7i و همراه Let-7e است [۲۳]. در گزارشی دیگر، کاهش بیان ژن Let-7a با افزایش تومورزایی همراه بوده، درحالی‌که افزایش بیان آن باعث کاهش رشد سلول‌های تومور در محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موجود زنده شده است [۲۴]. از طرفی، تزریق Let-7a به موش‌های مبتلا به سرطان ریه منجر به کاهش رشد تومور می‌شود و بنابراین ژن مذکور می‌تواند یک پتانسیل درمانی برای درمان سرطان ریه به حساب بیاید [۲۵]. Barh و همکاران نشان داده‌اند که با تزریق Let-7a به موش‌های مبتلا به سرطان‌های سینه، کولون و کبد، روند رشد تومور کاهش می‌یابد. Let-7 از طریق سرکوب بیان آنتیپوژنین، فاکتور رشد فیربوپلاستی، متالوپپیداز ماتریکس و IL-6 می‌تواند از رشد تومور، آنتیپوژن و متاستاز جلوگیری کند [۱۱]. Oliveras-Ferraros و همکاران در سال ۲۰۱۱ با انجام یک مطالعه مدل حیوانی (موش مبتلا به سرطان سینه) دریافتند که تزریق Let-7 باعث تنظیم کاهشی انکوژن‌های HMGA2 و Ras می‌گردد [۲۶]. Simon و همکاران در سال ۲۰۰۶ طی مطالعه‌ای که روی اثر دارویی متغورمین در سرطان سینه انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که Let-7 این قابلیت را دارد که به عنوان یک نشانگر درمانی در مداوای برخی از سرطان‌ها به کار گرفته شود [۲۷]. Fendler و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از فناوری Microarray بیان جامع microRNAs را در رده‌های سلولی پروستات به صورت وابسته و مستقل از آنдрوروژن بررسی کردند. ایشان در رده‌های سلولی تمایز یافته با آندروروژن مصنوعی R1881 افزایش بیان miR Let-7g را مشاهده نمودند [۲۸]. نشان داده شده است که خانواده Let-7 در سرطان کبد تاثیرگذار است و-

ایجاد کرده و اختلال در نظم این مسیر منجر به وارد شدن آسیب به DNA و مانع از آپوپتوز شده و در نتیجه سرطانی شدن سلول‌ها می‌گردد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که پروتئین‌های E6 و E7 تیپ HPV16 موجب تغییراتی در سلول DNA عفونی می‌شوند؛ تغییراتی که در روند رونویسی توسط انکوپروتئین‌های HPV صورت می‌گیرد، باعث اتصال انکوپروتئین‌های ویروسی به بعضی از ژن‌ها شده و در نتیجه باعث افزایش رونویسی و سنتز پروتئین‌های سلولی می‌شود. نتایج حاصله از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ۶۷ درصد از نمونه‌های سرطان دهانه رحم آلووده به HPV از تیپ ۱۶ بودند که نشان‌دهنده فراوانی بالای این نوع ویروس در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد و با نتایج حاصله از دو مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ به طور جداگانه صورت گرفته است، هم راستا می‌باشد (به ترتیب ۳۸/۵ و ۴۵/۸ درصد) [۱۸، ۱۷]. از طرف دیگر، مطابق با سایر مطالعات انجام گرفته، در این مطالعه نیز ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان miR Let-7g در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. این کاهش بیان در بین هر دو گروه بیماران آلووده به عفونت HPV و همچنین گروه فاقد آلوودگی به چشم می‌خورد. این نتایج که حاصل اولین تحقیقی است که به بررسی تاثیر بیان miR129-2 روی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم پرداخته است، با تحقیقات انجام شده ب روی دیگر جمعیت‌ها متنطبق می‌باشد؛ به طوری که در مطالعه Lee و Dutta اثر بازدارندگی توموری g به miR Let-7g اثبات رسیده و بیان آن در سلول‌های سرطانی ریه باعث کاهش بیان انکوژن HMGA2 و کاهش تکثیر سلولی شده است [۱۹]. نتایج یک تحقیق دیگر نشان‌دهنده نقش مهاری miR Let-7g در سرطانی شدن سلول‌ها می‌باشد و بیان نموده است که کاهش بیان آن منجر به تومورزایی می‌گردد؛ همچنان که نشان داده شده است که میزان بیان ژن‌های خانواده Let-7 در انواع سرطان‌ها تغییر یافته و می‌تواند در کارسینوژن سلول‌ها تاثیرگذار باشد. Lingjiao و همکارانش در سال ۲۰۱۵ با مطالعه‌ای که روی بیان miR Let-7 در بیماران مبتلا به سرطان کبد انجام دادند، گزارش کردند که miR Let-7i و miR Let-7g به صورت همزمان بر تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوز سلول‌های کبدی تاثیرگذار بوده و این امر توسط پروتئین ژن هدف BCL-XL صورت می‌گیرد [۱۰]. همچنین، مطالعه Qian و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی سرطان سینه نشان داد که کاهش بیان Boyerinas می‌گردد [۲۰]. نتایج به متاستاز بالا در این سلول‌ها شده است [۲۰]. Boyerinas و همکاران نقش انکوژنی miR Let-7g را نشان داده و با استفاده از مدل موشی سرطان ریه، مهار تومورزایی miR Let-7g را با

بافت و سایر مایعات بدن برای تشخیص، پیش‌آگهی و درمان سرطان یک چشم‌انداز امیدوار‌کننده به‌شمار می‌آیند؛ به‌طوری‌که شاید بتوان با استفاده از این نشان‌گرها به‌نهایی و یا در کنار سایر روش‌ها سرطان را در همان مراحل اولیه فقط با یک آزمایش ساده خون تشخیص داد. یکی از محدودیت‌های این تحقیق حجم کم نمونه‌ها می‌باشد و در مطالعات بعدی بررسی بیان Let-7g در دیگر انواع سرطان‌ها و همچنین بررسی بیان دیگر ژن‌ها و microRNAs دیگر با استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر ضروری به نظر میرسد.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی microRNAs می‌توانند ابزار مهمی در تشخیص زود هنگام بیماری و پیش‌آگهی آن باشند. همچنین می‌توان با استفاده از این مولکول‌ها، در جهت طراحی و گسترش درمان بیماری اقدام نمود. با توجه به نتایج می‌توان از miR Let-7g به عنوان یک نشان‌گر زیستی برای تشخیص و پیش‌بینی سرطان دهانه رحم استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پرسنل بیمارستان میرزاکوچک‌خان جنگلی که در جمع‌آوری نمونه‌ها یاری‌مان نمودند، نهایت امتنان و تشکر به عمل می‌آید.

7g در بافت کبدی سرطانی پایین‌ترین میزان بیان را نسبت به سایر اعضا خانواده خود دارد. همچنین، خانواده Let-7 از جمله Let-7f، Let-7e، Let-7c، Let-7b، Let-7a مداوم در مقایسه با بافت سالم کاهش بیان داشته و نشان داده شد که در مقایسه با بافت سالم کبدی، Let-7g به‌طور قابل توجهی پایین‌ترین میزان بیان را دارد و این امر می‌تواند به‌علت مهار رفتارهای سلول‌های سرطانی HCC در محیط برون‌تنی و سرکوب HCC تومور در مراحل اولیه در داخل بدن باشد. با افزایش بیان Let-7g چرخه سلولی و القا آپوپتوز روند طبیعی در پیش می‌گیرد تا القا آپوپتوز از طریق مهار پروتئین ژن BCL-XL رخ دهد [۲۹]. به‌نظر می‌رسد که miR Let-7g عملکردهای متفاوتی در تنظیم بیان ژن‌های هدف و در نتیجه ایجاد انواع سرطان‌ها از جمله سرطان دهانه رحم دارد و بررسی بیان miR Let-7g می‌تواند کلید تشخیص پاسخ‌های سلولی به داروهای ضد سرطانی باشد. در مجموع، شواهد حاکی از حضور HPVs تیپ پرخطر در بسیاری از انواع سرطان‌های انسانی می‌باشد که باعث ایجاد و گسترش انواع سرطان‌ها می‌گردد. در هر حال نقش اصلی این ویروس و به‌طور اختصاصی نقش انکوپرروتین‌های ویروسی ایجاد کننده این سرطان‌ها نیاز به تحقیقات گسترهای دارد. بنابراین تحقیقات سلولی و مولکولی بیشتری نیاز است تا ارتباط این انکوپرروتین‌ها، به‌خصوص E5 و E6 در اپی‌تیلوم نرم‌النیز و سلول‌های سرطانی مشخص گردد. microRNAs موجود در سرم، داخل

### References:

- [1] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49(6): 1374-403.
- [2] Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B, et al. HPV testing in combination with liquidbased cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10(7): 627-82.
- [3] Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401(1): 70-9.
- [4] Schiffman M, Wentzensen N. A suggested approach to simplify and improve cervical screening in the united states. *J Low Genit Tract Dis* 2016; 20(1): 1-7.
- [5] Adebamowo SN, Olawande O, Famooto A, Dareng EO, Offiong R, Adebamowo CA Persistent Low-Risk and High-Risk Human Papillomavirus Infections of the Uterine Cervix in HIV-Negative and HIV-Positive Women. *Front Public Health* 2017; 5: 178.
- [6] Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 5(15): 563-8.
- [7] Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Related Cancer* 2010; 17(1): F19-36.
- [8] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (24): 15524-29.
- [9] Johnson CD, Esquel-kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 2007; 67(16): 7713-22.
- [10] Wu L, Wang Q, Yao J, Jiang H, Xiao C, Wu F, et al. MicroRNA Let-7g and Let-7i inhibit hepatoma

- cell growth concurrently via down regulation of the anti-apoptotic protein B-Cell lymphoma- extra large. *Oncol Lett* 2015; 9(1): 213-18.
- [11] Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA Let-7: an emerging next- generation cancer therapeutic. *Current Oncol* 2010; 17(1): 70-80.
- [12] Park J, Sun D, Genest DR, Trivijitsilp P, Suh I, Crum CP. Coexistence of Low and High Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix: Morphologic Progression or Multiple Papillomaviruses? *Gynecol Oncol* 1998; 70(3): 386-91.
- [13] Buechner J, Tomte E, Haug BH, Henriksen JR, Lokke C, Flægstad T, et al. Tumour-suppressor microRNAs let-7 and Mir-101 Target the protooncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *Br J Cancer* 2011; 105(2): 296-303.
- [14] Peter ME. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle* 2009; 8(6): 843-52.
- [15] Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 2010; 38(3): 323-32.
- [16] Vousden KH. Interactions between papillomavirus proteins and tumor suppressor gene products. *Adv Cancer Res* 1994; 64: 1-24.
- [17] Hooi DJ, Lissenberg-Witte BI, de Koning MNC, Pinedo HM, Kenter GG, Meijer CJLM, et al. High prevalence of high-risk HPV genotypes other than 16 and 18 in cervical cancers of Curaçao: implications for choice of prophylactic HPV vaccine. *Sex Transm Infect* 2017. 11. pii: sextrans-2017-053109. [Epub ahead of print]
- [18] Tewari D, Novak-Weekley S, Hong C, Aslam S, Behrens CM. Performance of the cobas HPV Test for the Triage of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Cytology in Cervical Specimens Collected in SurePath. *Am J Clin Pathol* 2017; 148(5): 450-7.
- [19] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 2007; 21 (9): 1025-30.
- [20] Qian P, Zuo Z, Wu Z, Meng X, Li G, Wu Z, et al. Pivotal role of reduced Let-7g expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2011; 71(20): 6463-74.
- [21] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64 (11): 3753-56.
- [22] Mayer C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between Let-7 and HMGA2 enhances oncogenic transformation. *Science* 2007; 315(5818): 1576-79.
- [23] Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, et al. CDKN2A, NF2 and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma-A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosome Cancer* 2009; 48(7): 615-23.
- [24] Ross SA, Davis CD. MicroRNA, nutrition and cancer prevention. *Adv Nutr* 2011; 2(6):472-85.
- [25] Esquela- Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, et al. The Let-7 microRNA reduces tumor growth in mous models of lung cancer. *Cell Cycle* 2008; 7(6): 759-64.
- [26] Oliveras-Ferraro C, Cufi S, Vazquez-Martin A, Torres-Carcia VZ, Del Barco S, Martin-Castillo B, et al. Micro(mi) RNA prperssion profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti- diabetic drug metformin: induction of the tumor suppressor miRNA Let-7a and suppression of the TGFB-induced oncomir miRNA- 181a. *Cell Cycle* 2011; 10(7): 1144-51.
- [27] Simon P, Fehrenbach E, Niess AM. Regulation of immediate early gene expression by exercise: short cuts for the adaptation of immune function. *Exerc Immunol Rev* 2006; 12: 112-31.
- [28] Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Jung K. MicroRNAs as regulators of signal transduction in urological tumors. *Clin Chem* 2011; 57(7): 954-68.
- [29] Chen KJ, Hou Y, Wang K, Li J, Xia Y, Yang XY, et al. Re-expression of Let-7g MicroRNA Inhabits the Proliferation and Migration via K-Ras/ HMGA2/Snail AXIS IN Hepato cellular Carcinoma. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 742417.