

The Relationship between Gastric Carcinogenesis Susceptibility and Some SNPs in MicroRNA Genes in General Population of Ardabil Province

Akhavan Aghghaleh H, Ranji N*, Habibollahi H

Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

* *Corresponding author.* Tel: +981333424080, Fax: +981333447060, E-mail: n_ranji@iaurasht.ac.ir

Received: Aug 26, 2021

Accepted: Feb 19, 2022

ABSTRACT

Background & Objectives: Gastric cancer is the fourth most common cancer in the world and Ardabil province is in the top ranks in the world. MicroRNAs are non-coding RNA molecules with a length of 18 to 21 nucleotides and due to their regulatory role in post-transcriptional gene expression; single nucleotide polymorphisms (SNPs) could affect their function on target genes regulation.

Methods: Genomic DNA was extracted from peripheral blood of 150 healthy volunteers, which were born and living in Ardabil province, 30 SNPs in microRNA genes have been detected by the Whole Exome Sequencing assay. Then, the obtained results were evaluated using Sanger-based PCR-Sequencing method. The Pearson correlation test was used for finding significant relationships.

Results: After confirming the WES results, the population frequency of the selected variants was compared with the general populations of Iran, Europe and the world. Based on the age-standardized rate (ASR), six variants with significant differences, including rs10061133, rs12220909, rs12983273, rs2292832, rs2505901 and rs6505162 were observed.

Conclusion: According to the previous case-control studies which indicate the association between the variants rs10061133, rs12220909, rs12983273, rs2505901, and rs6505162 and gastric carcinogenesis in various populations, the observed significant differences in our population could imply on the presence of the cancer susceptibility in Ardabil province.

Keywords: Gastric Cancer; Ardabil; MicroRNA; SNPs; WES

ارتباط میان استعداد ابتلا به سرطان معده و برخی واریانت‌های تک‌نوکلئوتیدی میکروRNAها در جمعیت عمومی استان اردبیل

هما اخوان آق قلعه، نجمه رنجی*، هادی حبیب‌اللهی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۴۲۴۰۸۰ فاکس: ۰۱۳۳۳۴۴۷۰۶۰ پست الکترونیک: n_ranji@iaurasht.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان بوده و استان اردبیل از نظر شیوع سرطان معده در رده‌های بالای جهانی قرار دارد. میکروRNAها ملکول‌های RNA غیر کد کننده با طول ۱۸ تا ۲۱ نوکلئوتید بوده و به علت دارا بودن نقش تنظیمی در سطوح پس از بیان ژنی، دچار تغییرات عملکردی ناشی از تغییرات تک‌نوکلئوتیدی می‌گردند. تغییرات توالیابی ژنی miRNAها می‌تواند منجر به اعطای استعداد سرطانی‌گری گردد.

روش کار: پس از استخراج DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی ۱۵۰ فرد سالم، ساکن و متولد استان اردبیل، وجود ۳۰ واریانت تک‌نوکلئوتیدی مستعدکننده به سرطان در ژن‌های miRNAها با روش Whole Exome Sequencing (WES) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده توسط روش Sanger-based PCR-Sequencing مورد ارزیابی قرار گرفتند. روش آماری همبستگی پیرسون جهت بررسی اختلاف آماری فراوانی جمعیتی استفاده گردید.

یافته‌ها: پس از تایید نتایج WES، مقایسه فراوانی جمعیتی واریانت‌های منتخب با جمعیت‌های عمومی ایران، اروپا و جهان انجام و بر اساس نرخ استاندارد شده بر اساس سن (ASR)، شش واریانت واجد اختلاف معنی‌دار شامل rs10061133، rs12220909، rs12983273، rs2292832، rs2505901 و rs6505162 مشاهده گردیدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به وجود گزارشات متعدد مبنی بر ارتباط میان واریانت‌های rs10061133، rs12220909، rs12983273، rs2292832، rs2505901 و rs6505162 با سرطان معده در مطالعات مورد-شاهدی در نقاط مختلف جهان و جمعیت‌های متفاوت، اختلاف آماری بدست آمده می‌تواند بیانگر وجود استعداد ژنومی جمعیت استان اردبیل برای ابتلا به سرطان معده باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، اردبیل، میکروRNA، تغییرات تک‌نوکلئوتیدی، WES

دریافت: ۱۴۰۰/۶/۴ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

مقدمه

سرطان‌های دستگاه گوارش به عنوان شایع‌ترین سرطان‌های کشنده در نواحی مختلف ایران گزارش شده‌اند [۱،۲]. علاوه بر آن مطالعات مختلف بیانگر نرخ بالای سرطان‌های دستگاه گوارش در ایران

می‌باشند [۳،۴]. سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جهان می‌باشد [۵]. جمعیت‌های غرب آسیا و آمریکای لاتین واجد فراوانی بالایی برای سرطان معده می‌باشند. شیوع سرطان معده در مردان ژاپنی، کره‌ای و ایرانی به ترتیب ۶۶/۷، ۶۴/۶ و

تغییرات تک نوکلئوتیدی (SNP) موجود در miRNA ها با سبب شناسی و اعطای استعداد سرطانزایی می‌باشند. تغییرات تک نوکلئوتیدی در بسیاری از بخش‌های شبکه miRNA شامل ژن‌های miRNA، نقاط اتصال miRNA و نیز ژن‌های دخیل در پردازش miRNA رخ می‌دهند. تغییرات SNP رخ داده در ژن‌های miRNA قادر به تغییر عملکرد فرایندهای رونویسی و پردازش miRNA در مراحل فراوری رونوشت اولیه، pri-miRNA و pre-miRNA می‌باشند [۱۱].

با توجه به اختلاف فراوانی جمعیتی سرطان معده در استان اردبیل، گروه حاضر با هدف بررسی امکان وجود استعداد ژنومی ابتلا به سرطان معده، مطالعه SNP های موجود در ژن miRNA های مرتبط با سرطان را در جمعیت عمومی استان اردبیل شامل ۱۵۰ فرد سالم به انجام رساند.

روش کار

پس از اخذ کد اخلاق در دانشگاه آزاد اسلامی رشت (شناسه IR.IAU.RASHT.REC.1398.057)، مطالعه موردی^۱ و نمونه‌گیری خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA از ۱۵۰ فرد داوطلب سالم ساکن و متولد استان اردبیل انجام و DNA ژنومی از لوکوسیت‌ها با استفاده از کیت QIAamp® DNA Blood Mini Kit (شرکت Qiagen) و طبق دستورالعمل کیت استخراج گردید. پس از ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ برای OD 260/280 و OD 260/230، DNA استخراج شده جهت انجام تست WES^۲ به شرکت ماکروژن در کشور کره جنوبی ارسال گردید. نمونه مورد بررسی توسط کیت Agilent SureSelect Human All Exon V4 Capture (Agilent Tech., USA) غنی‌سازی

۳۰/۴ درصد است [۶]. استان اردبیل دارای بالاترین نرخ بروز در کشور ایران بوده و نرخ استاندارد شده بر اساس سن (ASR) در جمعیت استان اردبیل معادل ۴۹/۱ و ۲۵/۴ در مردان و زنان است [۳،۷]. علاوه بر آن سرطان معده مسئول حدود ۳۳ درصد از مرگ‌های مرتبط با سرطان در این جمعیت است [۸]. بر اساس نتایج مطالعه مروری اخیر، گستره بروز سرطان معده در استان اردبیل مابین ۰/۲ تا ۱۰۰ نفر در ۱۰۰۰۰ بدست آمد. نتایج همچنین حاکی از نرخ مرگ در ۱۰۰۰۰ نفر از ۱۰/۶ تا ۱۵/۷۲ و نیز نرخ مرگ و میر استاندارد شده بر اساس سن (ASMR) معادل ۴/۲ تا ۳۲/۲ درصد بود. نرخ شیوع سرطان معده در مردان بیش از زنان (۷۴/۹ در مقابل ۴/۶ درصد) و ریسک ابتلا به سرطان در افراد مسن ۸ برابر بیشتر از افراد جوان بدست آمد [۹].

در سرطان معده miRNA ها با فرایندهای متاستاز و مقاومت به شیمی‌درمانی ارتباط گسترده‌ای دارند. در اکثر موارد miRNA های مرتبط با سرطان معده باعث تنظیم مسیرهای بیوشیمیایی Wnt/β-catenin، RAS/RAF/ERK/MAPK، PI3K/AKT/mTOR، NF-κB، TGF-β و JAK/STAT می‌شوند. به علت تاثیر miRNA ها بر ژن‌های متعدد و یا ژن‌های مرتبط با مسیرهای بیوشیمیایی متعدد، miRNA ها قادر به ایفای عملکرد خود به صورت شبکه‌ای می‌باشند. در اغلب موارد miRNA های مرتبط با متاستاز با مسیر Wnt/β-catenin میانکنش دارند. حال آنکه این امر در مورد miRNA های مرتبط با مقاومت به شیمی‌درمانی بر روی مسیر PI3K/AKT/mTOR است [۱۰].

میکروRNA ها (miRNAs) ملکول‌های RNA کوچک و فاقد استعداد رمزگذاری پروتئین هستند. این ملکول‌ها نقش مهمی را در فرایند تنظیم بیان ژنی ایفا می‌کنند. بسیاری از مطالعات بیانگر ارتباط مستقیم میان miRNA ها و آغاز، پیشرفت، تشخیص و پروگنوز سرطان بوده‌اند. مطالعات اخیر حاکی از نقش

^۱ Case Study

^۲ Whole Exome Sequencing

بررسی فراوانی آن‌ها در جمعیت مورد مطالعه و نیز دیتابیس‌های جهانی و ایرانی در دستور کار قرار گرفت.

ارزیابی نتایج

به منظور تایید نتایج حاصل از روش WES، سه واریانت rs12983273، rs2505901 و rs6505162 انتخاب و با روش تعیین توالی بر اساس روش سنکر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

طراحی و انتخاب آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ناحیه ژنی شامل واریانت مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار آنالاین (<http://primer3.org>) و یا بهره‌گیری از مقالات پیشین انجام پذیرفت (جدول ۱).

روش‌های آماری

به منظور بررسی ارتباط آماری میان فراوانی جمعیتی ال‌ها و نرخ استاندارد شده بر اساس سن در مورد سرطان معده در میان جمعیت‌های جهانی و اروپا (بر اساس دیتابیس 1000G)، ایران (بر اساس دیتابیس ایرانوم) و اردبیل (مطالعه حاضر) از روش آزمون همبستگی پیرسون و نیز رسم نمودار نقطه‌ای^۷ با استفاده از نرم افزار SPSS-26 مورد استفاده قرار گرفتند. ضرایب همبستگی بین ۰/۷ تا ۱ (و ۰/۷- تا -۱) و p -value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان نتایج معنی‌دار مدنظر قرار گرفتند.

^۷ Scatter Plot

گردیده و سپس کتابخانه DNA مربوط به آن توسط دستگاه (Illumina) Hiseq 2000 Platform و با عمق خوانش حداقل 100X تعیین توالی گردید. خوانش‌های توالیابی توسط نرم افزار BWA^۱ با ژنوم مرجع UCSC hg19^۲ با استفاده از نرم افزار SAMTOOLS^۳ و نیز GATK^۴ مرتب سازی گردید. واریانت‌های تک نوکلئوتیدی (SNVs) و حذف‌ها و اضافه‌ها (Indels) توسط HaplotypeCaller و GenotypeGVCFs (v4.1.4.1) تعیین گردیدند. از دیتابیس‌های 1000Genomes، PopFreq و Iranome جهت بررسی فراوانی‌های جمعیتی واریانت‌ها و مقایسه با فراوانی آلل‌ها در جمعیت مورد مطالعه حاضر استفاده گردید. آسیب‌زایی احتمالی و اثرات بالینی واریانت‌های مورد بررسی توسط نرم افزارهای آنالاین VarSome^۵ و Franklin^۶ مورد بررسی قرار گرفت.

از میان واریانت‌های متعدد موجود در ژنوم ژن‌های کدکننده میکروRNAها، ۳۰ واریانت واجد پیشینه گزارش‌های متعدد ارتباط با سرطان‌های دستگاه گوارشی (علی‌الخصوص سرطان معده) انتخاب و

^۱ <http://bio-bwa.sourceforge.net>

^۲ <http://genome.ucsc.edu>

^۳ <http://samtools.sourceforge.net>

^۴ Genome Analysis Toolkit

^۵ <https://varsome.com>

^۶ <https://franklin.genoox.com/clinical-db/hom>

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای رفت و برگشت برای واریانت‌های منتخب

Variant (Gene)		Primer sequence	Reference
rs12983273 (hsaMIR373)	Forward	CCAAGGGGCTGTATGCACAA	*
	Reverse	TCTGGCCAAACCCACTTCAA	
rs6505162 (hsaMIR423)	Forward	TTTAAATGCGCTGGAAGTGAAG	12
	Reverse	CCTATATGCCTACCCTTTTCTGTG	
rs2505901 (hsaMIR938)	Forward	GTGTATGTAATACCTCTGAGCCTTTGGGGG	13
	Reverse	AACATGCCGTACCTGCTTAACCTGCCTT	

*Designed by Primer3 Software and BLAST

یافته‌ها

تعداد افراد شرکت‌کننده در مطالعه ۱۵۰ نفر متولد و ساکن استان اردبیل (شهرهای اردبیل، مشکین‌شهر، گرمی، خلخال، سرعین، بیله سوار، کیوی و روستاهای تابعه) بودند. تمام افراد، فاقد پیشینه ابتلا به سرطان بودند. توزیع جنسی به صورت ۸۵ فرد مونث و ۶۵ فرد مذکر بود. گستره سنی افراد شرکت‌کننده در مطالعه معادل ۱۰ تا ۳۵ سال با میانگین $25/2 \pm 5/3$ بود.

پس از بررسی متون و دیتابیس‌های مرتبط با سرطان معده، تعداد ۳۰ واریانت واجد پیشینه گزارش و یا واجد تخمین ارتباط با سرطان معده انتخاب گردید (جدول ۲). پس از بررسی فراوانی این واریانت‌ها در نتایج WES افراد شرکت‌کننده در مطالعه و تعیین هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی (در مورد واریانت‌های موجود در کروموزوم X، همی‌زیگوسیتی) تغییر نوکلئوتیدی رخ داده، فراوانی واریانت‌های مورد نظر در جمعیت ۱۵۰ نفری مورد مطالعه تعیین گردیدند.

جدول ۲. فراوانی ال‌های منتخب در مطالعه حاضر

db SNP	Gene(s)	Nt. change	Zygosity* (n=150)		Allele Freq.
			Hom/Hem	Het	
1. rs10061133	MIR449B/MIR449A	A>G	6	28	0.13
2. rs10509577	MIR107	A>G	0	3	0.01
3. rs11090909	MIRLET7BHG/MIRLET7A3	C>A, C>T	0,0	0,0	0,0
4. rs11134527	MIR218-2	G>A	17	41	0.25
5. rs11671784	MIR27A/MIR24-2/ MIR23A	G>A	0	6	0.02
6. rs12220909	MIR4293	G>C	0	1	0.003
7. rs12983273	MIR371B/MIR373	C>T	3	26	0.11
8. rs12983508	MIR371A/MIR371B/MIR372/MIR373	C>G	1	28	0.1
9. rs17276588	MIR98/MIRLET7F2	G>A	1/3	6	0.047
10. rs174538	MIR611	G>A	13	52	0.26
11. rs2043556	MIR605	T>C	6	60	0.24
12. rs2289030	MIR492	G>C	0	21	0.07
13. rs2292832	MIR149	T>C	59	36	0.051
14. rs2292832	MIR149	T>A	0	0	0
15. rs2296616	MIR107	G>A	45	75	0.55
16. rs2505901	MIR938	T>C	27	42	0.32
17. rs2620381	MIR627	A>C	0	2	0.007
18. rs2839698	MIR675	G>A	30	56	0.39
19. rs2910164	MIR146A/MIR3142HG	C>G	78	63	0.73
20. rs3746444	MIR499A/MIR499B	A>G	7	62	0.25
21. rs3825569	MIR136/MIR432	T>C	68	58	0.65
22. rs3859501	MIR371A/MIR371B/MIR372/MIR373	A>C	54	33	0.47
23. rs4919510	MIR608	C>G	8	34	0.17
24. rs4928	MIR25	G>C	1	10	0.04
25. rs6505162	MIR423/MIR3184	A>C	54	67	0.58
26. rs6513497	MIR646/MIR646HG	T>G	1	27	0.1
27. rs6575805	MIR127/MIR432	A>G	71	64	0.69
28. rs7372209	MIR26A1	T>C	85	39	0.7
29. rs895819	MIR23A/MIR24-2/MIR27A	T>C	23	47	0.31
30. rs9589207	MIR17HG/ MIR19A/MIR19B1/MIR20A/ MIR92A1	G>A	0	0	0

*Hom/Hem: Homozygous/Hemizygous for the mutant allele; Het: Heterozygous

پس از بررسی اختلاف موجود میان فراوانی الی بدست‌آمده (مرتبط با جمعیت عمومی اردبیل) با جمعیت ایران، اروپا و جهان با استفاده از آزمون

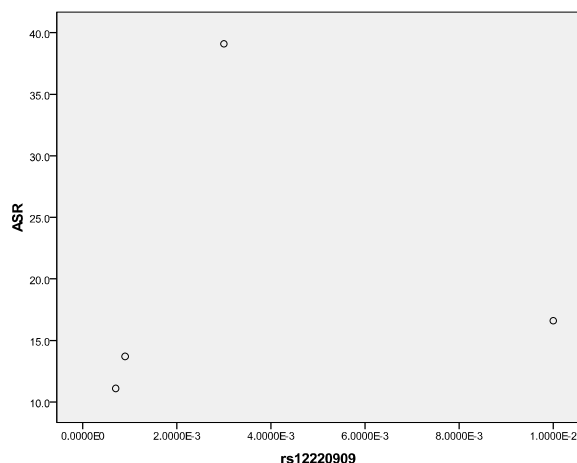
همبستگی پیرسون و رسم نمودار نقطه ای بر اساس نرخ استاندارد شده بر اساس سن (ASR) گزارش‌شده برای سرطان معده در سه جمعیت

ذکرشده، بر اساس معنی‌دار بودن اختلاف آماری (p-value)، شش واریانت مورد انتخاب قرار گرفتند (جدول ۳ و اشکال ۱-۶).
 کلیه نتایج بدست آمده توسط روش NGS با استفاده از روش Sanger-based PCR-Sequencing مورد تایید قرار گرفتند (اشکال ۷-۹).

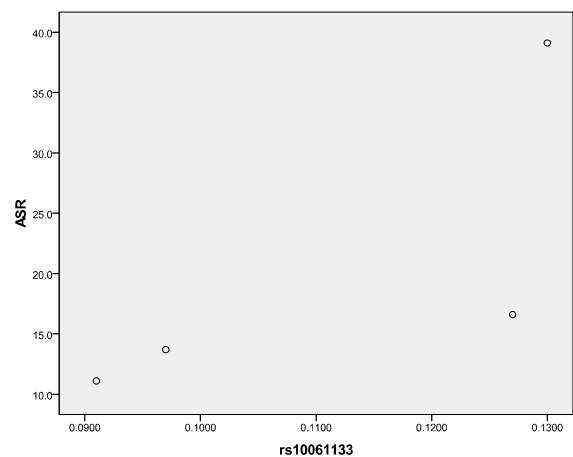
جدول ۳. ارتباط آماری میان فراوانی آلل‌های منتخب در جمعیت مورد مطالعه و جمعیت‌های ایران، اروپا و جهان بر اساس ASR
 (برای اردبیل ۳۵/۶، ایران ۱۶/۶، اروپا ۱۳/۷ و جهان ۱۱/۱)

Variant	Ardabil*	Iran	Europe	World	P-Value**	P-Value***
rs10061133	0.13	0.12	0.097	0.091	0.242	0.030
rs10509577	0.01	0.01	0.07	0.06	0.307	0.161
rs11090909	0	0	0	0	-	-
rs11134527	0.25	0.36	0.26	0.25	0.806	0.728
rs11671784	0.02	0.025	0.018	0.017	0.812	0.151
rs12220909	0.003	0.01	0.0009	0.0007	0.919	0.012
rs12983273	0.107	0.136	0.138	0.136	0.02	0.098
rs12983508	0.1	0.11	0.17	0.17	0.218	0.062
rs17276588	0.047	0.03	0.029	0.041	0.335	0.516
rs174538	0.26	0.22	0.29	0.29	0.725	0.062
rs2043556	0.24	0.32	0.21	0.22	0.929	0.274
rs2289030	0.07	0.08	0.05	0.05	0.506	0.062
rs2292832	0.51	0.64	0.7	0.7	0.015	0.062
rs2296616	0.55	0.57	0.54	0.56	0.817	0.938
rs2505901	0.32	0.45	0.5	0.49	0.014	0.093
rs2620381	0.007	0.019	0.001	0.02	0.663	0.805
rs2839698	0.39	0.45	0.5	0.46	0.117	0.296
rs2910164	0.73	0.75	0.77	0.75	0.197	0.395
rs3746444	0.25	0.29	0.2	0.2	0.602	0.062
rs3825569	0.65	0.55	0.63	0.62	0.573	0.151
rs3859501	0.47	-	0.53	0.51	-	0.274
rs4919510	0.17	0.22	0.19	0.2	0.298	0.151
rs4928	0.04	0.04	0.04	0.04	-	-
rs6505162	0.58	0.56	0.46	0.45	0.205	0.018
rs6513497	0.1	0.11	0.07	0.06	0.414	0.093
rs6575805	0.69	0.62	0.76	0.75	0.679	0.146
rs7372209	0.7	0.83	0.72	0.72	0.686	0.062
rs895819	0.31	0.32	0.32	0.33	0.101	0.272
rs9589207	0.002	0.002	0.0002	0.004	0.878	0.919

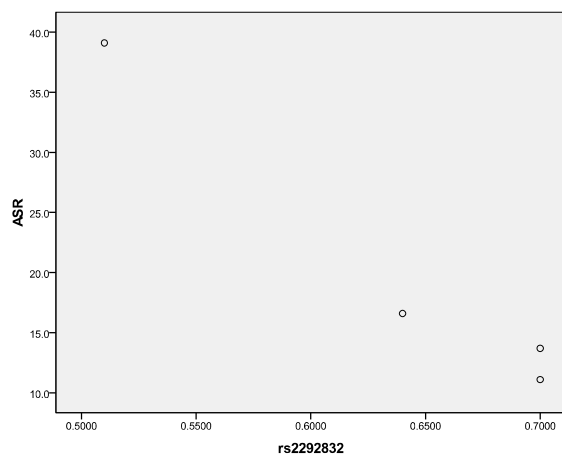
* Our results; **Comparing our results with Iran, Europe, and World; *** Comparing our results with Europe and World



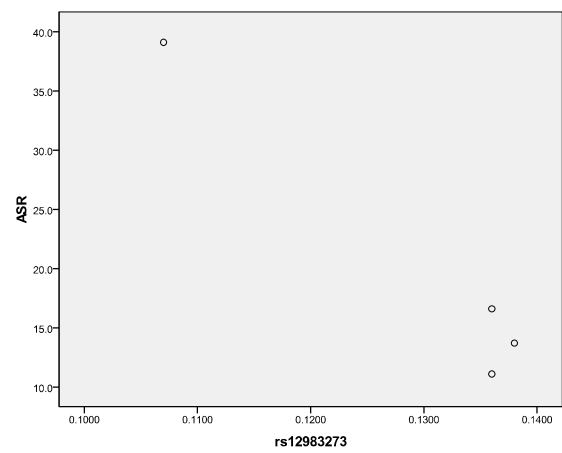
شکل ۲. نمودار نقطه ای ارتباط فراوانی واریانت rs12220909 با ASR



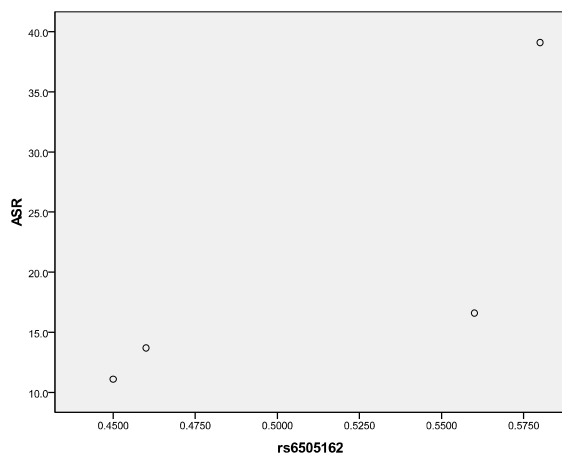
شکل ۱. نمودار نقطه ای ارتباط فراوانی واریانت rs10061133 با ASR



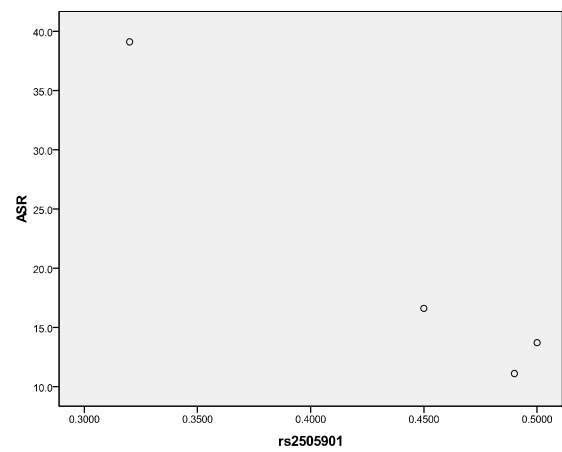
شکل ۴. نمودار نقطه ای ارتباط فراوانی واریانت rs2292832 با ASR



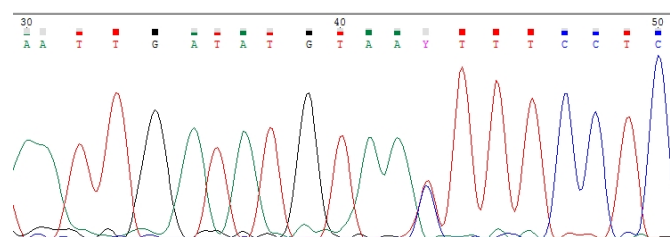
شکل ۳. نمودار نقطه ای ارتباط فراوانی واریانت rs12983273 با ASR



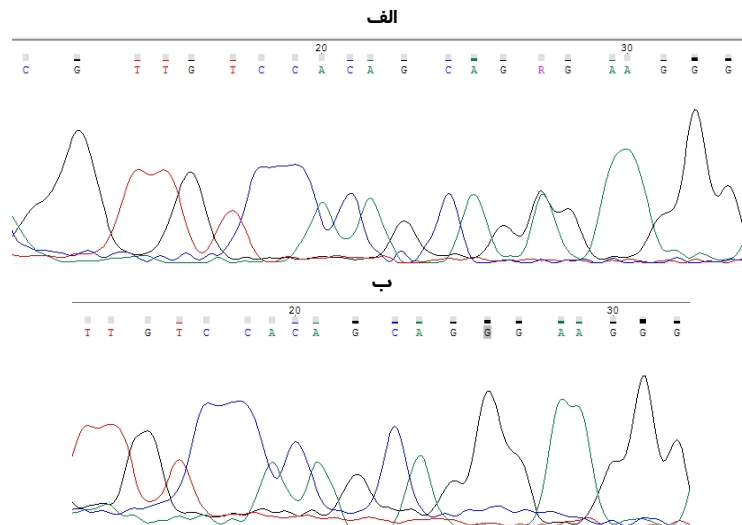
شکل ۶. نمودار نقطه ای ارتباط فراوانی واریانت rs6505162 با ASR



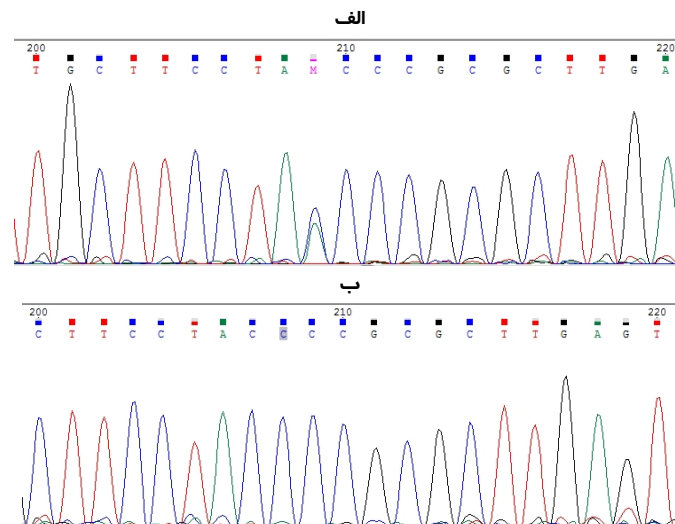
شکل ۵. نمودار نقطه ای ارتباط فراوانی واریانت rs2505901 با ASR



شکل ۷. تایید ژنوتیپ CT در واریانت rs12983273 در ژن hsaMIR373 با روش Sanger-Sequencing



شکل ۸. تایید ژنوتیپ AG (الف) و GG (ب) در واریانت rs2505901 در ژن hsaMIR938 با روش Sanger-Sequencing



شکل ۹. تایید ژنوتیپ AC (الف) و CC (ب) در واریانت rs6505162 در ژن hsaMIR423 با روش Sanger-Sequencing

بحث

حاضر را جهت بررسی استعداد آسیب‌زایی ناشی از فراوانی واریانت‌های مستعدکننده سرطان در ژن‌های مربوط به میکرو RNA در جمعیت عمومی استان اردبیل ترغیب نمود.

میکرو RNAها ملکول‌های RNA غیرکدکننده با طول ۱۸ تا ۲۱ نوکلئوتیدند و نقش تنظیمی در سطوح پس از بیان ژنی سلول‌ها دارند. ملکول‌های miRNA عملکرد خود را از طریق سرکوب بیان ژن‌های هدف انجام می‌دهند. این امر منجر به ایفای نقش تنظیمی در گستره وسیعی از فرایندهای زیست‌شناختی نظیر

سرطان معده به عنوان چهارمین بدخیمی شایع در جهان، دومین علت مرگ ناشی از سرطان می‌باشد [۱۵، ۱۴]. کشور ژاپن واجد بالاترین نرخ استانداردشده بر اساس سن (ASR) برای سرطان معده با میزان ۷۹ در ۱۰۰۰۰ مرد و ۳۰ در ۱۰۰۰۰ زن می‌باشد [۱۶]. این نرخ برای ایران معادل ۲۶/۱ در مردان و ۱۱/۱ در زنان و نیز در مورد جمعیت استان اردبیل معادل ۴۹/۱ برای مردان و ۲۵/۴ برای زنان است [۱۷]. شیوع بالای سرطان معده در استان اردبیل گروه

نمو اولیه، تمایز سلولی، تکثیر و نیز مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) می‌گردد [۱۸]. بنابراین تغییرات نوکلئوتیدی موجود در ژنوم miRNAها با ایجاد تغییرات در میزان اتصال و نیز عملکرد miRNAها در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط، نقش مهمی را در بروز بیماری‌هایی نظیر سرطان معده ایفا می‌کنند.

در مطالعه حاضر شش واریانت تک‌نوکلئوتیدی موجود در miRNAهای مرتبط با سرطانزایی معده واجد اختلاف معنی‌دار در فراوانی جمعیتی استان اردبیل در قیاس با دیگر نقاط جهان (بر اساس ASR) بودند. واریانت rs10061133 جایگزینی نوکلئوتیدی G به جای A در ژن‌های میکروRNAهای MIR449A و MIR449B است. کاهش بیان miR-449 در سرطان معده مکرراً گزارش گردیده است [۲۳-۱۹]. تاثیر کاهش بیان ژن MIR449 بر فرایند سرطانزایی از طریق اتصال آن به تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی تشریح گردیده است [۲۴].

در مطالعه ای انجام پذیرفته بر روی افراد مبتلا به سرطان هیپاتوسلولار در جمعیت اسپانیایی، افراد واجد الل G واجد ریسک افزایش یافته نسبت به الل A بودند [۲۵]. در حالی که ریسک ابتلا به ALL در افراد واجد الل G کاهش یافته بود [۲۶]. در جمعیت چینی مبتلا به سرطان شاخی مری (ESCC) نیز ژنوتیپ GG باعث کاهش ریسک ابتلا گردید [۲۷]. علیرغم عدم مشاهده ارتباط میان این واریانت و ریسک ابتلا به سرطان ریه در یک مطالعه [۲۸]، ژنوتیپ GG باعث افزایش ریسک سقط مکرر (RPL) می‌گردد [۲۹]. با توجه به وجود گزارش‌های متعدد از ارتباط میان miR449 و سرطانزایی معده، مشاهده اختلاف معنی‌دار میان وجود این واریانت در جمعیت عمومی استان اردبیل نسبت به دیگر نقاط جهان ($p=0.03$) می‌تواند نشان‌دهنده وجود استعداد بالاتر جمعیت استان اردبیل برای ابتلا به سرطان معده باشد.

تغییر نوکلئوتیدی G به C در ژن MIR7293 موسوم به واریانت rs12220909 تنها SNP یافته شده در ناحیه سید (ناحیه seed توالی محافظت شده‌ای است که اغلب در موقعیت ۲ تا ۷ از انتهای 5' میکروRNA قرار داشته و جهت اتصال بهینه miRNA به mRNA ضروری است) miR-4293 می‌باشد. بر اساس نتایج آنالیز Gene ontology و KEGG، این واریانت نه تنها باعث تغییر در توانایی اتصال این miRNA با ژن‌های هدف خود می‌گردد، بلکه موجب اعمال تغییر در کیفیت و نوع عملکرد ژن‌های هدف می‌شود [۳۰]. در متاآنالیز منتشرشده بر روی ۳۸۲۰ فرد مبتلا به سرطان معده در قیاس با ۴۵۷۴ فرد سالم، عدم ارتباط میان این واریانت و وجود استعداد ابتلا به سرطان معده مشاهده گردید [۳۱]. علاوه بر آن مطالعات دیگری نیز نشان‌دهنده عدم وجود ارتباط میان واریانت مورد نظر با سرطان‌های ریه، سرطان ریه غیرسلول کوچک، سرطان شاخی مری و کارسینومای نازوفارنکس بود [۳۳، ۳۲، ۲۷]. مشاهده اختلاف فراوانی جمعیتی این واریانت میان اردبیل و جهان ($p=0.012$) نشانگر احتمال ایفای نقش واریانت rs12220909 در اعطای استعداد سرطانزایی بوده و حصول اطمینان از این عملکرد نیازمند انجام مطالعات مورد-شاهدی و متعاقب آن آینده‌نگر (کوهورت) می‌باشد.

واریانت تک نوکلئوتیدی rs12983273 (جایگزینی نوکلئوتید C توسط T) در جایگاه بالادست توالی ژن‌های MIR371B و MIR373 قرار دارد. این میکروRNA متعلق به توده ژنی miR-371-3 است که به رونوشت اولیه Pri-miR-371-373 رونویسی می‌شود. این رونوشت اولیه به سه Pre-miRNA شامل Pre-miR371، Pre-miR372 و Pre-miR373 پردازش می‌گردد. این امر منجر به تولید چهار میکروRNA شامل miR-371، miR-372، miR-373 و miR-373* می‌شود [۳۴].

در سال ۲۰۱۱ گزارش گردید که تنظیم پایین has-miR-373 قابلیت پیشگویی ریسک عود پس از جراحی بیماران مبتلا به سرطان معده را دارا می‌باشد [۳۵]. پس از آن مشخص گردید که بیومارکر ZF4 در سرطان معده توسط miR-373 تنظیم و بیان می‌شود [۳۶]. افزایش بیان miR-373 در بافت آدنوکارسینومای معده و نیز رده‌های سلولی سرطان معده گزارش گردیده است [۳۷]. از سوی دیگر اثرات سرکوب miR-373 بر متاستاز سلول‌های سرطانی معده از طریق تنظیم منفی بیان ویمنتین (پروتئین IF نوع III که در سلول‌های مزانشیمی بیان شده و در تشکیل ساختار اسکلت سلولی دخیل می‌باشد) و نیز راه‌اندازی تکثیر سلولی سرطان معده گزارش گردیده است [۱۴]. در متاآنالیز انجام شده بر روی ارتباط میان این واریانت و نوپلاسماهای زنانه ارتباط معنی‌داری مشاهده نگردید [۴۰-۳۸]. عدم وجود ارتباط معنی‌دار میان وجود این واریانت با کارسینوم سلول سنگفرشی مری، زخم‌های دهانی پیش بدخیمی و نیز سرطان مری گزارش گردیده اند [۴۳-۴۱]. وجود مطالعات متعدد در زمینه بررسی ارتباط میان واریانت rs12983273 با سرطان‌های مختلف نشان از اهمیت بالای این واریانت در سرطان‌زایی دارد. جمعیت استان اردبیل از نظر فراوانی این واریانت اختلاف معنی‌داری با جمعیت ایران و دیگر نقاط جهان دارد ($p=0.022$) و انجام مطالعات فراگیر در زمینه ارتباط میان وجود این واریانت و سرطان معده در استان اردبیل ضروری می‌نماید.

مطالعات متعدد پیشنهادکننده نقش مهم miR-149 در بیماری‌های متعدد نظیر سرطان می‌باشند. واریانت rs2292832 شامل یک تغییر تک نوکلئوتیدی جایگزینی نوکلئوتید C به جای T در این ژن می‌باشد. این میکروRNA در برخی سرطان‌ها نقش سرکوبگر توموری دارد و در برخی از آن‌ها به عنوان انکوژن عمل می‌کند. ملکول miR-149 در سرطان‌های AML، پروستات، گلیوبلاستوما ملانوما دچار افزایش

بیان و در سرطان‌های معده، هپاتوسلولار، کلیه، ریه، کلورکتال، پستان، تیروئید، نوروبلاستوما و... دچار کاهش بیان ژنی می‌شود. افزایش بیان miR-149 در سلول‌های توموری و رده‌های سلولی سرطان معده مانع تکثیر سلولی گردیده و باعث القای توقف G0/G1 سلولی می‌گردد [۴۵، ۴۴].

در مطالعه حاضر فراوانی ال C در جمعیت استان اردبیل نسبت به جمعیت‌های ایرانی، اروپا و جهان پایین‌تر بدست آمده است (۰/۵۱ در مقابل ۰/۶۴، ۰/۷ و ۰/۷ به ترتیب). این اختلاف فراوانی از نظر آماری معنی‌دار است ($p=0.015$). با توجه به اینکه طبق مطالعات مختلف شامل مطالعه ای بر روی ۳۲۰ فرد مبتلا به سرطان معده در مقابل ۳۵۴ فرد سالم در کشور چین، متاآنالیزی انجام گرفته بر روی ۱۳ مقاله مورد-شاهدی شامل ۹۰۴۴ مورد مبتلا به سرطان معده در مقابل ۱۱۷۶۲ فرد به عنوان گروه شاهد و نیز مطالعه دیگری بر روی سرطان معده در جمعیت کره جنوبی، ارتباط میان وجود ال C و کاهش ریسک ابتلا به سرطان معده گزارش گردیده است [۴۸-۴۶]. کمتر بودن فراوانی ال C در جمعیت استان اردبیل می‌تواند با ریسک بالای ابتلا به سرطان معده در ساکنین این استان مرتبط باشد. اگرچه عدم وجود ارتباط معنی‌دار در دو مطالعه دیگر مرتبط با جمعیت کشور چین و نیز مطالعات صورت پذیرفته در کشورهای رومانی و یونان [۵۱-۴۹]، انجام مطالعات مورد-شاهدی و متعاقب آن کوهورت را جهت تعیین دقیق وجود ال T به عنوان ریسک فاکتور سرطان معده در استان اردبیل ضروری می‌سازد.

میکروRNA miR-938 به عنوان انکوژن در سرطان کلورکتال گزارش گردیده است. افزایش بیان این miRNA در سلول‌های اولیه سرطان معده بیانگر نقش انکوژنی آن در این سرطان می‌باشد [۵۲]. واریانت rs2505901 واجد جایگزینی نوکلئوتید T توسط C در این ژن واقع شده است. پیش از این ارتباط معنی‌داری میان وجود واریانتی در ژن

MIR938 با عنوان rs12416605 با نوع منتشره سرطان معده گزارش شده بود [۵۳]. علیرغم عدم مشاهده ارتباط معنی‌دار میان وجود واریانت rs2505901 و سرطان معده در مطالعه‌ای انجام‌پذیرفته در کشور چین [۵۴]، همراهی نتایج مطالعه حاضر در جمعیت استان اردبیل که بیانگر پایین‌تر بودن فراوانی ال C نسبت به جمعیت‌های دیگر (اردبیل: ۰/۳۲، ایران: ۰/۴۵، اروپا: ۰/۵ و جهان: ۰/۴۹) و کسب اختلاف معنی‌دار آماری ($p=0.015$)، با نتیجه وجود اختلاف معنی‌دار و اثر کاهنده ال C بر ریسک ابتلا به سرطان معده در مطالعه صورت پذیرفته در جمعیت ژاپنی شامل ۳۳۷ بیمار مبتلا به سرطان معده در مقابل ۵۸۷ فرد سالم [۱۳]، می‌تواند با فراوانی بالای سرطان معده در استان اردبیل مرتبط باشد. واریانت rs6505162 با جایگزینی نوکلئوتید C به جای A باعث کاهش عملکرد موثر miR-423 و راه‌اندازی تکثیر سلولی از طریق کاهش بیان ژن PABPC1 می‌گردد [۵۵]. علیرغم مشاهده ارتباط معنی‌دار میان وجود این واریانت با سرطان سلول سنگفرشی مری در دو مطالعه مستقل بر روی جمعیت سیاهپوستان ساکن افریقای جنوبی و نیز مشاهده افزایش ریسک

ابتلا به سرطان تخمدان و پستان در جمعیت یهودی و مثانه و مری در جمعیت آمریکایی [۵۸-۵۶]، هیچگونه ارتباط معنی‌داری با سرطان معده گزارش نشده است [۳۷، ۵۳، ۵۵]. با این وجود فراوانی بالاتر ال C در جمعیت استان اردبیل و کسب اختلاف معنی‌دار، اهمیت انجام بررسی‌های بیشتر بر روی تفاوت میان مبتلایان به سرطان معده و افراد سالم متولد استان اردبیل را نمایان می‌سازد.

نتیجه‌گیری

مشاهده اختلاف آماری بر اساس مقایسه میان فراوانی جمعیتی ال‌های مرتبط با تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژن‌های میکروRNAها با نرخ استاندارد شده بر اساس سن سرطان معده می‌تواند بیانگر وجود استعداد ژنومی جمعیت عمومی استان اردبیل برای ابتلا به سرطان معده باشد. در صورت تایید نتایج بدست‌آمده توسط مطالعات مورد-شاهدی و نیز آینده‌نگر (کوهورت)، از واریانت‌های مورد نظر می‌توان به عنوان معیارهای پیش‌آگهی در جمعیت استان اردبیل بهره‌برداری نمود.

References

- 1- Somi MH, Mirinezhad K, Farhang S, Jazayeri E, Sani A, Seif-Farshad M, et al. Gastrointestinal cancer occurrence in East Azarbaijan: a five year study from North Western Iran. *Asian Pac J Canc Prev*. 2006;7(2):309-12.
- 2- Azadeh S, Moghimi-Dehkordi B, Fatem SR, Pourhoseingholi MA, Ghiasi S, Zali MR. Colorectal cancer in Iran: an epidemiological study. *Asian Pac J Canc Prev*. 2008 Jan;9(1):123-6.
- 3- Kolahdoozan Sh, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five Common Cancers in Iran. *Arch Iran Med*. 2010; 13:143-6.
- 4- Somi MH, Farhang S, Kazem Mirinezhad S, Naghashi S, Seif-Farshad M, Golzari M. Cancer in East Azerbaijan, Iran: results of a population-based cancer registry. *Asian Pac J Canc Prev*. 2008;9(2):327-30.
- 5- Farmanfarma KK, Mahdavi N, Mohammadian-Hafshejani A, Salehiniya H. Testicular cancer in the world: an epidemiological review. *WCRJ*. 2018 Jan;5(4):1-5.
- 6- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016 Jan;25(1):16-27.
- 7- Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: Results of a population-based Cancer Registry from Iran. *Int J Cancer*. 2003 Oct ;107(1):113-8.

- 8- Pourfarzi F, Whelan A, Kaldor J, Malekzadeh R. The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran-a population based study. *Int J Cancer*. 2009 Oct;125(8):1953-60.
- 9- Farmanfarma KK, MahdaviFar N, Hassanipour S, Salehiniya H. Epidemiologic Study of Gastric Cancer in Iran: A Systematic Review. *Clin Exp Gastroenterol*. 2020;13:511.
- 10- Kipkeeva F, Muzaffarova T, Korotaeva A, Nikulin M, Grishina K, Mansorunov D, et al. MicroRNA in gastric cancer development: mechanisms and biomarkers. *Diagnostics*. 2020 Nov;10(11):891.
- 11- Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, et al. SNPs in human miRNA genes affects biogenesis and function. *RNA*. 2009 Sep;15(9):1640-51.
- 12- Pourmoshir N, Motalleb G, Vallian S. hsa-miR-423 rs6505162 Is Associated with The Increased Risk of Breast Cancer in Isfahan Central Province of Iran. *Cell J*. 2020;22(Suppl 1):110.
- 13- Arisawa T, Tahara T, Shiroeda H, Matsue Y, Minato T, Nomura T, et al. Genetic polymorphisms of IL17A and pri-microRNA-938, targeting IL17A 3'-UTR, influence susceptibility to gastric cancer. *Hum Immunol*. 2012 Jul;73(7):747-52.
- 14- Zhang X, Li X, Tan Z, Liu X, Yang C, Ding X, et al. MicroRNA-373 is upregulated and targets TNFAIP1 in human gastric cancer, contributing to tumorigenesis. *Oncol Let*. 2013 Nov;6(5):1427-34.
- 15- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Can J Clin*. 2005 Mar;55(2):74-108.
- 16- Babaei M, Pourfarzi F, Yazdanbod A, Chiniforush MM, Derakhshan MH, Mousavi SM, et al. Gastric cancer in Ardabil, Iran--a review and update on cancer registry data. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010 Jan;11(3):595-9.
- 17- Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric Cancer in Iran: Epidemiology and Risk Factors. *Arch Iran Med*. 2009; 12:576-583.
- 18- Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*. 2019 Jan;25(1):1-6.
- 19- Shinozaki A, Sakatani T, Ushiku T, Hino R, Isogai M, Ishikawa S, et al. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2010 Jun;70(11):4719-27.
- 20- Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg*. 2010 Jul;14(7):1170-9.
- 21- Tie J, Pan Y, Zhao L, Wu K, Liu J, Sun S, et al. MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. *PLoS Gen*. 2010 Mar;6(3):e1000879.
- 22- Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3ζ. *Cancer Res*. 2010 Mar;70(6):2339-49.
- 23- Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New Eng J Med*. 1991 Oct;325(16):1132-6.
- 24- Kheir TB, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, Krogh A, Bardram L, Hother C, et al. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Mol Cancer*. 2011 Dec;10(1):1-2.
- 25- Li W, Ma Y, Zeng D, Zhang J, Wang R, Hu J, et al. Association between microRNA single nucleotide polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma. *Rev Med Chil*. 2016 Apr ;144:508-15.
- 26- Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Piñan MA, Garcia-Miguel P, Sanchez-Toledo J, et al. Noncoding RNA-related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *Pediatr Res*. 2014 Jun;75(6):767-73.
- 27- Zhang P, Wang J, Lu T, Wang X, Zheng Y, Guo S, et al. miR-449b rs10061133 and miR-4293 rs12220909 polymorphisms are associated with decreased esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Tumor Biol*. 2015 Nov;36(11):8789-95.
- 28- Li D, Zhu G, Di H, Li H, Liu X, Zhao M, et al. Associations between genetic variants located in mature microRNAs and risk of lung cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul;7(27):41715.

- 29- Rah H, Chung KW, Ko KH, Kim ES, Kim JO, Sakong JH, et al. miR-27a and miR-449b polymorphisms associated with a risk of idiopathic recurrent pregnancy loss. *PloS one*. 2017 May;12(5):e0177160.
- 30- Gong J, Tong Y, Zhang HM, Wang K, Hu T, Shan G, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat*. 2012 Jan;33(1):254-63.
- 31- Liu R, Fu H, Yu Y, Xu Q, Fang J, Ge Q, et al. Association of miR-4293 rs12220909 polymorphism with cancer risk: A meta-analysis of 8394 subjects. *Medicine*. 2020 Aug;99(32).
- 32- Fan L, Chen L, Ni X, Guo S, Zhou Y, Wang C, et al. Genetic variant of miR-4293 rs12220909 is associated with susceptibility to non-small cell lung cancer in a Chinese Han population. *PLoS One*. 2017 Apr;12(4):e0175666.
- 33- Qiu F, Yang L, Zhang L, Yang X, Yang R, Fang W, et al. Polymorphism in mature microRNA-608 sequence is associated with an increased risk of nasopharyngeal carcinoma. *Gene*. 2015 Jul;565(2):180-6.
- 34- Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*. 2004 Jun;270(2):488-98.
- 35- Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Ann Oncol*. 2011 Oct;22(10):2257-66.
- 36- Yan Z, Xiong Y, Xu W, Li M, Cheng Y, Chen F, et al. Identification of recurrence-related genes by integrating microRNA and gene expression profiling of gastric cancer. *Int J Oncol*. 2012 Dec;41(6):2166-74.
- 37- Shi Y, Shi H, Zhang B, Yan Y, Han X, Jiang W, et al. miR-373 suppresses gastric cancer metastasis by downregulating vimentin. *Mol Med Rep*. 2018 Mar;17(3):4027-34.
- 38- Bastami M, Choupani J, Saadatian Z, Zununi Vahed S, Ouladsahebmadarek E, Mansoori Y, et al. Evidences from a systematic review and meta-analysis unveil the role of MiRNA polymorphisms in the predisposition to female neoplasms. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan;20(20):5088.
- 39- Chen QH, Wang QB, Zhang B. Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: a HuGE meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014 Jan;35(1):529-43.
- 40- Clague J, Lippman SM, Yang H, Hildebrandt MA, Ye Y, Lee JJ, et al. Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Mol Carcinog*. 2010 Feb;49(2):183-9.
- 41- Zhu J, Yang L, You W, Cui X, Chen Y, Hu J, et al. Genetic variation in miR-100 rs1834306 is associated with decreased risk for esophageal squamous cell carcinoma in Kazakh patients in northwest China. *Int J Clin Exp Path*. 2015;8(6):7332.
- 42- Clague J, Lippman SM, Yang H, Hildebrandt MA, Ye Y, Lee JJ, et al. Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Mol Carcinog*. 2010 Feb;49(2):183-9.
- 43- Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res*. 2008 Nov;1(6):460-9.
- 44- Wang Y, Zheng X, Zhang Z, Zhou J, Zhao G, Yang J, et al. MicroRNA-149 inhibits proliferation and cell cycle progression through the targeting of ZBTB2 in human gastric cancer. *PloS one*. 2012 Oct;7(10):e41693.
- 45- He Y, Yu D, Zhu L, Zhong S, Zhao J, Tang J. miR-149 in human cancer: a systemic review. *Cancer*. 2018;9(2):375.
- 46- Zhang L, Liu Q, Wang F. Association between miR-149 gene rs2292832 polymorphism and risk of gastric cancer. *Arch Med Res*. 2018 May;49(4):270-7.
- 47- Xu Q, Liu JW, Yuan Y. Comprehensive assessment of the association between miRNA polymorphisms and gastric cancer risk. *Mutat Res Rev/ Mutat Res*. 2015 Jan-Mar;763:148-60.
- 48- Ahn DH, Rah H, Choi YK, Jeon YJ, Min KT, Kwack K, et al. Association of the miR-146aC> G, miR-149T> C, miR-196a2T> C, and miR-499A> G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. *Mol Carcinog*. 2013 Nov;52(S1):39-51.

- 49- Jiang J, Jia ZF, Cao DH, Wu YH, Sun ZW, Cao XY. Association of the miR-146a rs2910164 polymorphism with gastric cancer susceptibility and prognosis. *Future Oncol.* 2016 Oct;12(19):2215-26.
- 50- Pu JY, Dong W, Zhang L, Liang WB, Yang Y, Lv ML. No association between single nucleotide polymorphisms in pre-mirnas and the risk of gastric cancer in Chinese population. *Iranian J Basic Med Sci.* 2014 Feb;17(2):128.
- 51- Dikeakos P, Theodoropoulos G, Rizos S, Tzanakis N, Zografos G, Gazouli M. Association of the miR-146aC> G, miR-149T> C, and miR-196a2T> C polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Greek population. *Mol Biol Rep.* 2014 Feb;41(2):1075-80.
- 52- Hwang J, Min BH, Jang J, Kang SY, Bae H, Jang SS, et al. MicroRNA expression profiles in gastric carcinogenesis. *Sci Rep.* 2018 Sep;8(1):1-8.
- 53- Torruella-Loran I, Ramirez Vina MK, Zapata-Contreras D, Muñoz X, Garcia-Ramallo E, Bonet C, et al. rs12416605: C> T in MIR938 associates with gastric cancer through affecting the regulation of the CXCL12 chemokine gene. *Mol Genet Genomic Med.* 2019 Aug;7(8):e832.
- 54- Wu Y, Jia Z, Cao D, Wang C, Wu X, You L, et al. Predictive value of miR-219-1, miR-938, miR-34b/c, and miR-218 polymorphisms for gastric cancer susceptibility and prognosis. *Dis Markers.* 2017 Feb;2017: 4731891
- 55- Stenholm L, Stoecklacher-Williams J, Al-Batran SE, Heussen N, Akin S, Pauligk C, et al. Prognostic role of microRNA polymorphisms in advanced gastric cancer: a translational study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Ann Oncol.* 2013 Oct;24(10):2581-8.
- 56- Alaouna M, Hull R, Penny C, Dlamini Z. Esophageal cancer genetics in South Africa. *Clin Exp Gastroenterol.* 2019;12:157.
- 57- Wang Y, Vogelsang M, Schaefer G, Matejic M, Parker MI. MicroRNA polymorphisms and environmental smoke exposure as risk factors for oesophageal squamous cell carcinoma. *PloS one.* 2013 Oct;8(10):e78520.
- 58- Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med.* 2012 Jan;16(1):8-21.