

Evaluation of miR-143 and miR-338 Expression Profiles in Tumor Tissue and Margin in Patients with Gastric Cancer

Amini M¹, Golestani Imani B², Baradaran B*³

1. Department of Biotechnology- microbiology, Islamic Azad University of Urmia, Urmia, Iran

2. Department of biology, Islamic Azad University of Urmia, Urmia, Iran

3. Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +989144030526, +984113364665; E-mail: behzad_im@yahoo.com

Received: Feb 19, 2017 Accepted: Sep 21, 2017

ABSTRACT

Background & objectives: Micro-RNAs are non-coding RNAs with a length of approximately 22 nucleotides, which, by binding to the target gene's mRNA, regulate its expression and play an important role in tumor suppression. Changes in the expression level of microRNAs play a crucial role in the pathobiology of multiple cancers. In this study, the expression levels of miR-143 and miR-338 were compared in gastric cancer and its margin.

Methods: This case-control study was performed on 35 biopsy samples of gastric cancer and adjacent tissue of the patients who were admitted to Imam Reza Hospital. Total RNA was extracted from the tissue using Trizol reagent and based on the company's instructions. Then, the acquired microRNAs were used to synthesize cDNA. Expression of microRNAs was measured by RT-PCR. U6 was used as a house keeping gene. Statistically, the obtained results were analyzed using Graph pad Prism software.

Results: According to the results obtained in this study, the expression levels of miR-143 ($p \leq 0.1244$) and miR-338 ($p \leq 0.0059$) in tumor tissue, compared to the adjacent tissue, were down-regulated. Reduced expression of miR-143 and miR-338 in the tumor tissue, in comparison to margin tissue, was about four folds.

Conclusion: This study showed that the average expression level of miR-143 and miR-338 was significantly decreased in gastric cancer tissues compared to adjacent non-tumor tissues, and these results strongly suggest that miR-143 and miR-338 may play a key role in gastric cancer progression; therefore, they may be considered tumor markers.

Keywords: Gastric Cancer; micro RNA; miR-143; miR-338

بررسی میزان بیان miR-143 و miR-338 در بافت توموری و حاشیه تومور بیماران مبتلا به سرطان معده

مهسا امینی^۱، بهرام گلستانی^۲، بهزاد برادران^{۳*}

۱. گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد ارومیه، ارومیه، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد ارومیه، ارومیه، ایران

۳. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. همراه: ۰۹۱۴۴۰۳۰۵۲۶. تلفن ثابت: ۰۴۱۱ ۳۳۶۴۶۶۵. پست الکترونیک: behzad_im@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: میکروRNAها، RNAهای غیر کدکننده به طول تقریباً ۲۲ نوکلئوتید بوده که با اتصال به mRNA ژن هدف، بیان آن را تنظیم و نقش برجسته خود را به عنوان انکو میر یا میکروRNA سرکوبگر تومور، اعمال مینمایند. تغییرات بیان میکروRNAها نقش اساسی در پاتوبیولوژی سرطانهای متعدد دارد. در این مطالعه میزان بیان miR-143 و miR-338 در تومور معده و حاشیه آن مورد مقایسه قرار گرفته است.

روش کار: این مطالعه یک مطالعه مورد-شاهد بود که بر روی تعداد ۳۵ نمونه از بافت سرطانی معده و بافت مجاور آن انجام شد. نمونه ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا (ع) تبریز، که تحت عمل جراحی معده قرار گرفته اند جمآوری گردید. RNA تام با استفاده از محلول تراپزول و بر اساس دستورالعمل شرکت استخراج شد. سپس سنتز cDNA بر روی microRNAها صورت گرفت. سطح بیان microRNAها با qRT-PCR اندازه گیری شد. از U6 بعنوان House keeping استفاده شد. نتایج با استفاده از نرم افزار Graph pad Prism مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

یافته ها: طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه، بیان miR-143 در بافت تومورال در مقایسه با بافت مجاور با $p \leq 0/0124$ و بیان miR-338 در بافت تومورال در مقایسه با بافت مجاور با $p \leq 0/0059$ کاهش پیدا نمود. کاهش بیان miR-143 و miR-338 در بافت تومور نسبت به بافت مارژین E برابر بوده است.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که بیان miR-143 و miR-338 در بافت سرطانی معده در مقایسه با بافت نرمال کاهش بیان می یابد و کاهش miR-143 و miR-338 در سرطان معده می تواند با گسترش تومور ارتباط داشته و بعنوان یک تومور مارکر مطرح گردد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، micro RNA، miR-143، miR-338

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۱

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۳۰

مقدمه

سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان است [۱] این سرطان جزو بیماری های چند عاملی دسته بندی می شود و دلیل آن هم ایجاد سرطان بر اثر وجود عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی در افراد می باشد [۲]. بر اساس گزارش انستیتو کانسر و مرکز مبارزه با بیماری های

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، سرطان معده دارای رتبه یک در مردان و رتبه سه در زنان، بعد از سرطان پستان و روده بزرگ، می باشد که این رتبه بندی در مقالات انتشار یافته اخیر نیز به تایید رسیده است [۳-۷].
بروز سرطان معده در ۳۰ سال گذشته در ایران افزایش داشته است [۸-۴]. سلول های سرطان معده

miRNAهای خاص با بقای بیماران. نقش miRNAها به عنوان بیومارکرهای تشخیصی درلوسمی لنفوسیتی مزمن^۲، سرطان ریه، پانکراس، نوروبلاستوما و سرطان کولون شناسایی شده است [۱۸،۱۹]. بر اساس مطالعات اخیر بین بیان microRNAها و پیشرفت سرطان معده ارتباط وجود دارد [۲۰-۲۲]. microRNAها می توانند به عنوان انکوومیر^۳ و یا مهارکننده تومور، از طریق مهار ژنهای هدف وابسته به سرطان عمل کنند. لذا مطالعه آنها به عنوان نشانگرهای مناسب جهت تشخیص سرطان می تواند مفید باشند. مطالعات متعددی در رابطه با نقش miR-143 و miR-338 در انواع تومورها انجام شده است. این microRNAها به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور در سرطان معده و تنظیم آپوپتوز سلولهای سرطانی عمل میکنند [۲۳،۲۴]. هدف محققین در این مطالعه بررسی بیان miR-143 و miR-338 در نمونههای توموری و نرمال حاشیه تومور معده بود و هدف نهایی امکان استفاده از آنها به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص سرطان می باشد.

روش کار

مطالعه حاضر یک مطالعه مورد-شاهد^۴ بود که بر روی ۳۵ بیمار مبتلا به سرطان معده مراجعه کننده به بخش جراحی بیمارستان امام رضا(ع) تبریز، که براساس معیارهای پاتولوژی تشخیص قطعی داده شده بودند و تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند انجام پذیرفت.

تمام نمونههای سرطان در مرحله ۲ و از نوع آدنوکارسینوم بودند. نوع سرطان با استفاده از یافتههای پاتولوژی و توسط پاتولوژیست مشخص شده و مرحله بیماری توسط اسکن مشخص می گردد (جدول ۱). بدین صورت که نمونه گیری در اتاق عمل

توانایی مهاجرت به تمام بخشهای بدن و در واقع متاستاز به سراسر بدن را دارند [۹]. این بیماری در مراحل اولیه لایه مخاطی معده را درگیر کرده و در صورت عدم درمان به لایه های درونی تر نفوذ می کند. درمان سرطان معده در مراحل اولیه به کمک جراحی بوده و در صورت نیاز، از شیمی درمانی و پرتودرمانی به عنوان درمان های تکمیلی استفاده می شود [۱۰،۱۱]. به علت شباهت های علائم این بیماری با بیماری های دیگر معده، در بیشتر موارد تشخیص سرطان معده در مراحل پیشرفته صورت می گیرد. در ایران ۸۰٪ موارد تشخیص سرطان معده در مراحل پیشرفته بوده که در این زمان اکثر روش های درمانی تاثیر قابل ملاحظه ای بر بقای بیماران ندارند [۱۲]. تلاش های بسیاری برای توسعه غربالگری این سرطان به منظور کاهش نرخ مرگ و میر ناشی از آن انجام شده است. در طی سه دهه اخیر، روش های ژنتیک مولکولی بر پایه آنالیز پروتئین های مدفوع، DNA و RNA در حال توسعه اند [۱۳]. یکی از جدیدترین آنها تحقیقات در زمینه RNA درونی غیرکد کننده کوچک^۱ می باشد. میکرو RNAها زیرگروه بزرگی از RNAهای غیر کد کننده و تک رشته ای، به طول تقریباً ۲۲ نوکلئوتید بوده که از نظر تکاملی حفاظت شده می باشند و در فرآیند تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی عمل می کنند [۱۴]. این مولکولهای تنظیمی کوچک اولین بار در سال ۱۹۹۳ شناسایی شدند، بیشتر آنها در مناطق شکننده کروموزومها قرار دارند که در بیماری های مختلف از جمله سرطان مستعد حذف، اضافه، جابجایی های کروموزومی و تغییرات اپی ژنتیکی هستند [۱۵،۱۶]. miR-143 روی کروموزوم q 532 قرار گرفته است و اولین بار در موش مورد شناسایی قرار گرفت [۱۷]. miRNAها نقش مهمی در تومورها ایفا می کنند از جمله: ۱- دخالت در فرآیندهای تومورزایی ۲- تغییر بیان در پاسخ به شیمی درمانی ۳- ارتباط

¹ Small Non-Coding Endogenous RNA

² CLL

³ Oncomir

⁴ Case-Witness

تمامی RNAهای کوچک cDNA ساخته شد. واکنش مرحله اول در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و واکنش مرحله دوم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه انکوبه شد.

Quantitative RT-PCR

میزان بیان ژن‌ها به وسیله دستگاه Lightcycler 96- Roche اندازه گیری شد. ابتدا cDNAهای سنتز شده را با توجه به توصیه کیت مورد استفاده^۳، ۱ به ۲۰ رقیق شدند. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اقدام به آماده سازی نمونه‌ها برای Real-time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر گردید.

اجزای واکنش شامل ۵ میکرو لیتر مستر میکس سایبر گرین^۴، ۲ میکرو لیتر cDNA رقیق شده، ۲ میکرو لیتر آب مقطر، ۱ میکرو لیتر پرایمر اختصاصی miR-143-5p^۵، miR-338-5p^۶، U6 snRNA^۷ بودند که بعد از آماده شدن محلول‌ها با استفاده از برنامه (جدول ۲) و دستگاه Roche Light Cycler 96 اقدام به بررسی میزان بیان ژن‌ها گردید و سپس با استفاده از فرمول $\Delta\Delta CT$ ، اقدام به بررسی میزان بیان نمونه‌ها گردید:

$$\Delta CT (\text{tumor}) = ct (\text{target}) - ct (\text{control})$$

$$\Delta CT (\text{margin}) = ct (\text{target}) - ct (\text{control})$$

$$CT = \Delta CT (\text{tumor}) - \Delta CT (\text{margin})$$

در این مطالعه برای حصول اطمینان از انجام صحیح سنتز cDNA اقدام به انجام PCR برای housekeeping gene U6 برای نرمال سازی بیان ژن‌ها در نمونه‌های کنترل و تومور با توجه به اینکه پرایمرهای مورد استفاده به صورت کاملاً تجاری بوده و طبق ادعای شرکت سازنده دارای حداکثر بازدهی در طول واکنش هستند از فرمول $\Delta CT = ct (\text{target}) - ct (\text{control})$ استفاده گردید سپس در هر یک از ۲ گروه برای درک

حین جراحی انجام پذیرفت و قسمتی از نمونه تازه (۵/۰ تا ۳ گرم) در یک لوله ایندروف استریل حاوی محلولی از RNA Later (شرکت کیاژن) به همراه چک لیست مربوطه، حاوی اطلاعات دموگرافیک کامل از بیمار، جهت انجام آنالیز مولکولی به مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحویل داده شدند. در آزمایشگاه، ابتدا اقدام به هموژنیزه کردن نمونه‌های مورد نظر جهت استخراج RNA گردید.

جدول ۱. خصوصیات بالینی و دموگرافیک افراد تحت مطالعه

اطلاعات کلینیکی و پاتولوژیکی		بیماران (۳۵ نفر)
جنسیت	مرد	۲۱
	زن	۱۴
سیکاری		۱۱
مرحله بالینی سرطان	II	۳۵
سن		۷۱-۴۱

استخراج RNA

RNA تام با استفاده از محلول ترایزول^۱ و طبق پروتکل کمپانی تولید کننده کیت، استخراج RNA صورت پذیرفت. برای بررسی کیفیت و غلظت RNA استخراج شده از دستگاه نانو دراپ^۲ ساخت شرکت Thermo استفاده شد. RNAها در دمای $C - 80^{\circ}$ تا مرحله سنتز cDNA نگهداری شدند.

سنتز cDNA

برای سنتز cDNA microRNA از کیت شرکت Exiqon استفاده شد. دستورالعمل این شرکت شامل ۲ مرحله است. مرحله اول شامل اضافه کردن polyA و مرحله دوم Reverse transcription می‌باشد. بر طبق پروتکل ابتدا با استفاده از آنزیم Poly A Polymerase به انتهای ۳ تمام miRNAs دم poly A اضافه شد. سپس از پرایمر- Oligo dNTP استفاده شد. وقتی قطعه پرایمر مورد نظر به RNA هیبرید شد، آنزیم Reverse transcription از انتهای پرایمر رشته مکمل را سنتز می‌نماید. با کمک این پرایمر از

¹ Roche Trizol

² Nano Drop

³ LNA™ PCR primer set UniRT (EXIQON)

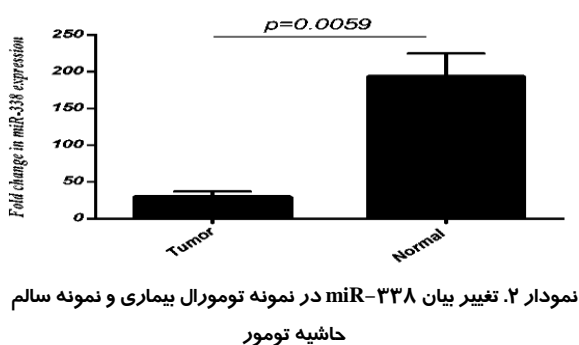
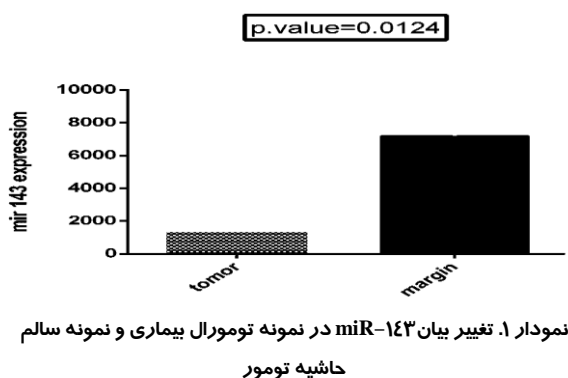
⁴ Master mix Syber Green

⁵ Product No : 204570

⁶ Product No : 204114

⁷ Product No: 203907

نمونه سالم حاشیه تومور، در این مطالعه با استفاده از فرمول ΔCT مورد ارزیابی قرار گرفت. شایان ذکر است که در مطالعه حاضر از $U6$ به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. نتیجه اینکه میزان بیان miR-143 و miR-338 در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم در سرطان معده کاهش یافته بود. به طور میانگین نمونه تومور نسبت به نمونه حاشیه تومور ۴ برابر کاهش بیان داشته و بیان miR-143 با $p=0.0124$ و miR-338 با $p=0.0059$ با سرطان معده دارای ارتباط معنی‌داری است (نمودار ۱ و ۲). برای بررسی اختصاصیت Real time PCR انجام شده، منحنی ذوب نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه برای تمامی روابط P-Value محاسبه شده و $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی می‌شود. منحنی ذوب miR-143 و miR-338 و RNA-U6 به صورت تک قله‌ای به دست آمد که این خود بیانگر وجود تنها یک محصول اختصاصی در PCR است (شکل ۱ و ۲).



Mean tumor= 405076.03
Mean margin= 479899.40
Mean tumor/mean margin= 0.84

چگونگی تغییرات بیان ژن‌ها ΔCT محاسبه شده برای هریک از نمونه‌ها در فرمول $2^{-\Delta CT}$ برای هر گروه وارد شده تا بیان دقیق هر نمونه مشخص شود در نهایت داده‌های حاصله در دو گروه با استفاده از روش‌های آماری با هم مقایسه گردید. همچنین با توجه به اینکه در این مطالعه هم برای ژن کنترل داخلی و ژن‌های مورد بررسی از کیت real time ویژه micro RNA ساخت کمپانی Exiqon استفاده شد که مراحل انجام تکنیک و دمای مرحله اتصال پرایمر در این کیت برای تمام ژن‌ها یکسان و برابر با ۶۰ درجه سانتی‌گراد (جدول ۲)، به صورت زیر است:

جدول ۲. شرایط دمایی PCR

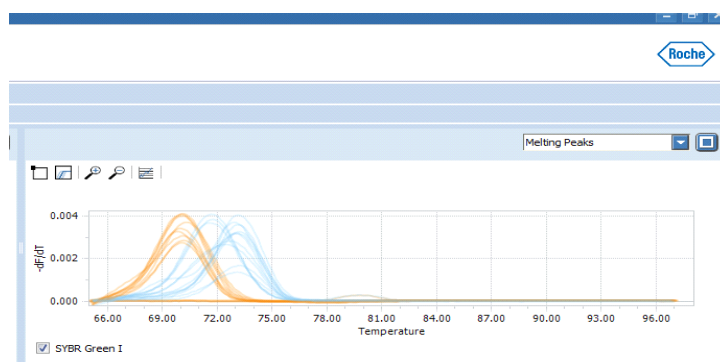
مرحله	زمان	دما
Denaturation	۱۰ دقیقه	۹۵ ⁰ c
Denaturation	۱۰ ثانیه	۹۵ ⁰ c
Annealing & Extension	۶۰ ثانیه	۶۰ ⁰ c
		مرحله تکثیر به تعداد ۴۵ چرخه

آنالیزهای آماری

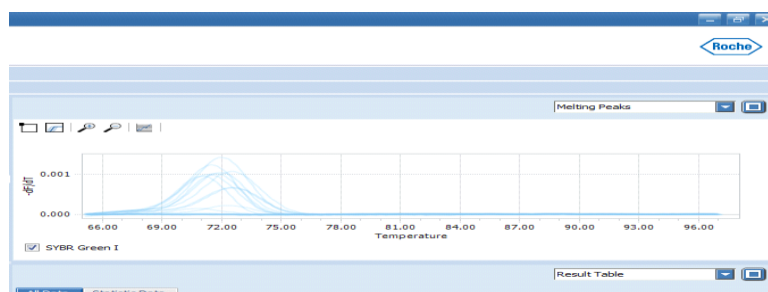
آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism6 انجام شده است و برای نرمال سازی داده‌های پراکنده از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شد. آزمون‌های kruskal-wallis استفاده گردید. CT سیکلی از واکنش تعریف شده که سیگنال فلورسانس از حد آستانه عبور میکند و تفاوت CT بین ژن مورد نظر و ژن مرجع به عنوان ΔCT تعریف شد برای کمی کردن نتیجه حاصل از تغییرات CT نمونه‌ها این اعداد در فرمول $2^{-\Delta CT}$ وارد و نتیجه حاصل در بین ۲ گروه مقایسه گردید [۲۵].

یافته‌ها

در مطالعه حاضر بررسی بیان microRNA به روش RT-PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین انجام شد. نتایج به دست آمده از بررسی میزان بیان ژن miR-143 و miR-338 در نمونه‌های توموری و



شکل ۱. منحنی ذوب miR-143 در تومور



شکل ۲. منحنی ذوب miR-338 در تومور

بحث

در سال‌های گذشته ارتباط بین بیان miRNA و ژن‌های هدف آن‌ها در سرطان معده مورد توجه قرار گرفته است [۲۵]. گزارشات مختلف نشان داده است که سرطان معده در ایران از وفور بالایی برخوردار است و چون متأسفانه بیماران مبتلا به سرطان معده در ایران در مراحل بسیار پیشرفته جهت تشخیص و درمان مراجعه می‌کنند، این بیماری از کشندگی بالایی برخوردار است [۲۶]. بنابراین استفاده از روش‌های تشخیصی جدید برای تشخیص زودهنگام سرطان معده دارای اهمیت بسیار می‌باشد. داده‌های در دسترس در مورد بیان میکروRNAها در سرطان نشان می‌دهد که میکروRNAها می‌توانند پتانسیل تشخیصی داشته باشند. میکروRNAها می‌توانند به عنوان انکومیر و یا مهارکننده تومور از طریق مهار ژن‌های هدف وابسته به سرطان عمل کنند. لذا مطالعه آنها به

عنوان نشانگرهای مناسبی جهت تشخیص سرطان می‌تواند مفید باشند. بیان miRNAهای انکوژن در سلول‌های توموری افزایش می‌یابد، این گروه با هدف قرار دادن mRNAهای کدکننده پروتئین‌های تومور ساپرسور می‌توانند عملکرد انکوژنیک داشته باشند مانند miR-221 [۲۷]. در مقابل miRNAهای تومور ساپرسور در سلول‌های توموری کاهش بیان نشان می‌دهند، در حالت عادی این miRNAها با هدف قرار دادن mRNAهای کدکننده پروتئین‌های انکوژنیک آنها را مهار می‌کنند و زمانی که عملکرد خود را از دست می‌دهند، در شروع و یا ایجاد بدخیمی در سلول‌های نرمال نقش دارند، مانند miR-338 [۳۱]. در بیماران با سرطان معده کاهش بیان miR-143 و miR-338 ممکن است به عنوان یک نشانگر تشخیصی عمل نماید.

همچنین کاهش این میکروRNAها باعث افزایش بیان پروتئین‌های بازدارنده تومور و کاهش بیان

پروتئین‌های انکوژن می‌شود [۳۱،۳۳]. در این مطالعه با بررسی میزان بیان میکرو آر ان ای‌ها در نمونه‌های سرطان معده این نتیجه حاصل شد که تغییرات بیان این ۲ ژن دارای ارتباط معناداری با سرطان معده می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان miR-143 و miR-338 در نمونه‌های توموری و نرمال معده بود و هدف نهایی امکان استفاده از آنها به عنوان یک بیومارکر جهت تعیین مرحله و پیش آگهی پاسخ به درمان بود. با توجه به پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه علوم مولکولی و یافتن تست‌ها و تکنیک‌های ساده و کم هزینه ای از قبیل PCR، محققان به دنبال یافتن بیومارکرهای مولکولی هستند که با بررسی آنها بتوان در زمان کمتر و بر پایه آزمون‌های حساس تر و اختصاصی تر، احتمال ابتلا به سرطان معده را مشخص نمود. در ارتباط با این یافته، در یک مطالعه که توسط شباتولی، وو و همکاران، بر روی نقش miR-143 بر مهار رشد سلول‌های سرطان معده و القای آپوپتوز با هدف قرار دادن ژن COX-2 انجام شد، نشان داده شد که miR-143-3p در سلول‌های سرطانی معده نقش کاهش تنظیمی دارند و به عنوان سرکوبگرهای تومور در سرطان معده شناخته شده است [۲۳]. در مطالعه حاضر نیز نتایج مشابهی به دست آمده که تایید کننده ارتباط سرطان معده با تغییرات بیان این ژن و ارتباط آن با بیماری است که نتایج بررسی فوق را در فاز بالینی مورد تایید قرار می‌دهد. برای مثال در مطالعاتی نشان داده شده است که miR-143 به توالی ۳-UTR از mRNA COX-2 انسانی متصل شده و از این طریق باعث کاهش بیان آن می‌شود. miR-143 بطور مستقیم تمام RNAهایی را که در کد کردن پروتئین‌هایی که در تکثیر سلولی درگیر هستند را مورد هدف قرار می‌دهد از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به (PAI1)، (Myo6)، (cox-2)، (KRAS)، (BCL-2) و (MMP-13) اشاره کرد، به همین دلیل یک تنظیم کننده کلیدی بیان ژن می‌باشد. miR-143 باعث

کاهش بقا و افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده می‌شود [۲۳]. کاهش بیان miR-143 در سرطان معده نشان می‌دهد که این microRNA دارای اثرات ضد تکثیری است. جهت آزمون این نظریه اثرات گذرای انتقال با miR-143 روی رده‌های سلولی MKN-1، BGC-823 معده بررسی شد. تکنیک MTT نشان داد که بعد از انتقال با miR-143 کاهش قابل ملاحظه ای در بقای سلول‌های سرطانی معده وجود دارد. همچنین با استفاده از بررسی PARP¹ افزایش قابل توجهی در آپوپتوز سلولی بعد از انتقال با miR-143 مشاهده شد [۲۴]. لی و همکارانش در سال ۲۰۱۳، بر روی تاثیر miR-338 بر خاموشی اپی ژنتیک سرطان معده با هدف قرار دادن ژن SSX2IP مطالعه ای انجام دادند و گزارش کردند که بیان miR-338-3p در سلول‌ها و بافت سرطان معده نقش تنظیمی پایینی دارد و ممکن است از آن بتوان به عنوان زیست نشانگر استفاده کرد [۲۸]. در مطالعات انجام شده توسط جیانگ و همکاران برای تعیین نقش miR-338-3p در تومور سرطان معده، گزارش کردند که miR-338-3p بطور معنی‌داری باعث کاهش بیان سلول‌های سرطان معده در مقایسه با سلول‌های GES-1 می‌شود [۲۹]. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که میزان بیان miR-143 و miR-338 در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های طبیعی کمتر است. این تحقیق توسط چنگ اس و همکاران روی miR-143، واسطه ضد تکثیری و با اثر تنظیم گر ژن D3 توسط هدف قرار دادن مستقیم E2F3 در سلول‌های سرطان معده انجام گرفت.

نتایج بدین صورت بود که mi-143 دارای عملکرد ضد تکثیر بوده و تنظیم گر ویتامین D3 در سلول‌های سرطان معده می‌باشد و به عنوان تشخیص و اهداف درمانی سرطان معده کاربرد دارد [۳۰]. نتایج تحقیقات حاضر در این مطالعه با بسیاری از تحقیقات انجام شده در این زمینه همسو است. در مطالعات

¹ Poly-ADP-Ribose Polymerase

- 7- Hamano S, Mori Y, Aoyama M, Kataoka H, Tanaka M, Ebi M, et al. Oncolytic reovirus combined with trastuzumab enhances antitumor efficacy through TRAIL signaling in human HER2-positive gastric cancer cells. *Cancer Letters*. 2015 Jan; 356(2PtB):846-54.
- 8- Nourinayer B, Akhondi Sh, Asadzadeh H, Ansari Sh, Behrouz N, Zali MR. Evaluation of gastric cancer related indicators in Tehran and 7 other provinces in, 1999 and 2000. *MEDICAL SCIENCES*. 2005; 15 (1) :15-18. [Full text in Persian]
- 9- Sim F, McKee M. *Issues in public health (Understanding Public Health)*, 2nd ed. Open University Press, 2011: 74. ISBN: 9780335244225.
- 10-Blakely AM, Miner TJ. Surgical considerations in the treatment of gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013 Jun; 42(2): 337-57.
- 11-Sastre J, Garcia-Saenz JA, Diaz-Rubio E. Chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006 Jan; 12 (2): 204-13.
- 12-Malekzadeh R, Derakhshan M, Malekzadeh Z. Gastric Cancer in Iran: Epidemiology and Risk Factors. *Arch Iran Med*. 2009 Nov;12(6):576-83.
- 13-Koga Y, Yamazaki N, Matsumura Y. New molecular diagnosis and screening methods for colorectal cancer using fecal protein, DNA and RNA. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014 Jan;14(1):107-20.
- 14-Bartel DP. MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism and function. *Cell*. 2004 Jan; 116(2): 281–297.
- 15-Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Curr opin pharmacol*. 2010 Oct;10(5):543-50.
- 16-Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*.2007;72(5-6):397-402.
- 17-Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Garajová I, Šachlová M, Smerdova T, et al. Association of miR-21, miR-31, miR-143, miR-145 and let-7a-1 levels with histopathologic features of colorectal cancer. *European Journal of Cancer Supplements*. 2007 Sep ;5(4):78-9.
- 18-Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*. 2006 Mar;9(3):189-98.
- 19-Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*.2005Oct; 353(17):1793-801.
- 20-Zeng Z, Wang J, Zhao L, Hu P, Zhang H, Tang X, et al. Potential Role of microRNA-21 in the Diagnosis of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *PloS one*. 2013 Sep ;8(9):e73278.
- 21-Yao Y, Suo AL, Li ZF, Liu LY, Tian T, Ni L, et al. MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Mol Med Rep*. 2009 Nov-Dec; 2(6):963-70.
- 22-Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab invest*. 2008 Dec;88(12):1358-66.
- 23-Wu XL, Cheng B, Li PY, Huang HJ, Zhao Q, Dan ZL, et al. MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting COX-2. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov ; 19(43): 7758–7765.
- 24-Zhong B, Cai X, Chennamaneni S, Yi X, Liu L, Pink JJ, et al. From COX-2 inhibitor nimesu-lide to potent anti-cancer agent: synthesis, in vitro, in vivo and pharmacokinetic evaluation. *Eur J Med Chem*. 2012 Jan;47(1):432-444.
- 25-Li PF, Chen SC, Xia T, Jiang XM, Shao YF, Xiao BX, et al. Non-coding RNAs and gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 May; 20(18): 5411-5419.
- 26-Roshanaei Gh, Kazemnejad A, Sedighi S. Post operative survival estimation of gastric cancer patients in cancer institute of Tehran, Imam Khomeini hospital and its relative factors. *Sci J Hamadan Univ Med Sci*. 2010;17(3):13-8.
- 27-Liu K, Li G, Fan C, Diao Y, Wu. B, Li J. Increased Expression of MicroRNA-221 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance. *The Journal of International Medical Research*. 2012 Apr;40(2):467-74.
- 28-Li P, Chen X, Su L, Li C, Zhi Q, Yu B, et al. Epigenetic silencing of miR-338-3p contributes to tumorigenicity in gastric cancer by targeting SSX2IP. *PLoS One*. 2013 Jun ;8(6):e66782.

- 29-Chen JT, Yao KH, Hua L, Zhang LP, Wang CY, Zhang JJ. miR-338-3p inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells by targeting ADAM17. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Sep;8(9):10922-10928.
- 30-Chang SE, Gao L, Yang Y, Tong D, Guo B, Liu L, et al. miR-145 mediates the antiproliferative and gene regulatory effects of vitamin D3 by directly targeting E2F3 in gastric cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Apr ;6(10):7675-85.
- 31-Guo B, Li J, Liu L, Hou N, Chang D, Zhao L, Li Z, Song T, Huang C. Dysregulation of miRNAs and their potential as biomarkers for the diagnosis of gastric cancer. *Biomed Rep*. 2013 Nov ;1(6):907-12.