

ارزیابی اهمیت تشخیصی میزان تغییرات بیان ژن آرگونات ۲ در مبتلایان به سرطان روده بزرگ

وحید اعیانی^۱، *سعید قریبان^۲، محمد بصیر ابوالقاسمی فخری^۳

چکیده

مقدمه: محصول پروتئینی ژن آرگونات ۲ (*AGO2*) در فرآیند بیوسنتز و پردازش میکروRNAها نقش حیاتی دارد. ژن *AGO2* به عنوان *Onco-miR* و یا *Tumor Suppresor-miR* در شکل‌گیری سرطان‌ها نقش دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن *Argonaute 2* در مبتلایان به سرطان روده بزرگ خواهد بود.

روش بررسی: مطالعه مورد-شاهدی حاضر روی ۱۰۰ نمونه بیوپسی (۵۰ نمونه بافت توموری و ۵۰ نمونه بافت مارژینال) افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ که در طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴ به بیمارستان‌های شهید محلاتی و امام رضا (ع) تبریز جهت تشخیص و درمان مراجعه کرده بودند، انجام شد. بعد از استخراج RNA کامل و سنتز cDNA، با روش *Real Time-PCR* میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنوا و تی زوجی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی ما اختلاف معناداری را در میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های مارژینال نشان داد و این تفاوت با افزایش میزان بیان ژن *AGO2* همراه شده بود ($p=0/033$).

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که افزایش میزان بیان *AGO2* در پیشرفت سرطان روده بزرگ نقش دارد و ممکن است که به عنوان بیومارکری در تشخیص و ارزیابی سرطان روده بزرگ کاربرد داشته باشد.

کلمات کلیدی: آرگونات، سرطان روده بزرگ، بیان ژن

مقدمه

سرطان روده بزرگ از بدخیمی شدن سلول‌های اپیتلیوم روده بزرگ و یا مقعد منشاء می‌گیرد. این سرطان، از شایع‌ترین ناهنجاری‌ها در انسان به شمار می‌رود که تقریباً ۵/۸٪ از کل سرطان‌ها را شامل شده و دومین علت عمده مرگ‌های مرتبط با سرطان در کشورهای غربی با درگیری یکسان زنان و مردان حادث می‌گردد [۱]. سالانه نزدیک به ۱۵۰۰۰۰ آمریکایی با تشخیص سرطان روده بزرگ مواجه می‌شوند که نهایتاً یک‌سوم از این افراد به خاطر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند [۲]. خطر ابتلا به این بیماری در آمریکا ۶٪ و سن متوسط ابتلا به این بیماری ۶۶ سال است [۳].

بر اساس آخرین آمار ثبت سرطان در ایران، شیوع سرطان روده بزرگ در بین سرطان‌های مربوط به زنان و سرطان‌های مربوط به مردان به ترتیب رتبه‌های سوم و پنجم را به خود اختصاص داده است [۴]. بر اساس پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۳۰ تعداد ۸۹۲۱ مورد جدید و ۶۴۱۵ مورد مرگ سالانه ناشی از این سرطان خواهد رسید [۵].

عوامل و فرآیندهای بیماری‌زایی که منجر به سرطان روده بزرگ می‌شوند پیچیده و ناهمگن هستند. عواملی که رشد بیماری سرطان روده بزرگ را تحت تأثیر قرار می‌دهند شامل، رژیم غذایی، سبک زندگی، تغییرات جسمی و عوامل وراثتی هستند. خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ با رژیم‌های غنی از چربی‌های اشباع نشده، زیاده‌روی در مصرف گوشت قرمز، مصرف بیش از حد الکل و کاهش فعالیت‌های فیزیکی افزایش می‌یابد [۶].

مکانیسم بیماری‌زایی سرطان روده بزرگ روند پیچیده‌ای است که در نتیجه رخدادهای ژنتیکی و اپی ژنتیکی حادث می‌گردد [۷]. یافته‌های اخیر نشان داده است که ۳۰-۱۵٪ از سرطان‌های روده بزرگ دارای علل ارثی‌اند و احتمال ابتلا به سرطان روده بزرگ را در بستگان درجه یک و یا دو افزایش می‌دهند [۸، ۹]. در یک‌چهارم از موارد فامیلی، در افرادی با سابقه و علائم بالینی شکل می‌گیرد که این بیانگر آن است

که الگوی توارث مندلی زمینه ابتلا به سرطان روده بزرگ را فراهم می‌سازد [۷، ۱۰، ۱۱].

مطالعات در سال‌های گذشته نشان داده است که فرآیندهای متعددی از قبیل، تنظیم بیان ژن‌ها، تنظیم رشد و نمو، شکل‌زایی بافتی و حفظ سلول باواسطه RNA‌های غیررمز کننده کوچک (Micro RNA) انجام می‌گردد [۱۲]. miRNA گروهی از RNA‌های غیر رمز کننده کوچکی هستند که حدود ۱۸-۲۵ نوکلئوتید طول دارند و پس از رونویسی، روی تنظیم بیان ژن‌ها اثر می‌گذارند. عملکرد تنظیمی این مولکول‌ها، از طریق اتصال به توالی مکملی که اغلب در ناحیه 3'-UTR مربوط به mRNA هدف واقع شده، انجام می‌شود [۱۳]. miRNA در شرایط خاص سلولی، بیان ژن‌ها را از طریق تجزیه mRNA نهایی و یا از طریق سرکوب آغاز فرآیند ترجمه تنظیم می‌کنند [۱۲، ۱۴]. مطالعات نشان داده است که miRNA در رشد و گسترش سرطان‌ها نیز دخالت دارند [۱۷-۱۵].

در بیوسنتز miRNA‌ها، ریونوکلازهایی از قبیل *Dicer*، *Drosha* و آرگونات-۲ (*AGO2*) نقش دارند [۱۲، ۱۴]. مطالعات متعددی نقش و عملکرد آنزیم‌های *Drosha*، *Dicer* و *AGO2* را در خطوط سلولی مختلف و در بعضی از نمونه‌های سرطان روده بزرگ مورد ارزیابی قرار داده‌اند. نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که بی‌نظمی در بیان ژن‌های *Dicer*، *Drosha* و *AGO2* در بیماری‌زایی سرطان روده بزرگ نقش دارند و ممکن است در رشد این سرطان‌ها تا مراحل پیشرفته‌تر بیماری مؤثر باشد [۱۹، ۱۸].

محصول رمزدهی شده ژن *AGO2* به‌عنوان یکی از اجزای کمپلکس خاموشگر (RISC) به شمار می‌روند که از نظر جایگاه سیتوژنتیکی بر روی کروموزوم 3q24.8 واقع شده است [۱۷]. بسیاری از عوامل دخیل در بیوسنتز مولکول‌های

1. Argonaute 2
2. RNA-induced silencing complex

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن های *AGO2* و *GAPDH* استفاده شده در

Real-Time PCR			
ژن	موقعیت	توالی پرایمرها	اندازه باند (جفت باز)
AGO2	Forward	5'-TTACAAGTCGGACAGGAGCAGA-3'	۱۲۱ جفت باز
	Reverse	5'-AGTCGCTCTGATCATGGTTGAG-3'	
GAPDH	Forward	5'-TGGATGAAGTTGGTGGTGGAG-3'	۸۷ جفت باز
	Reverse	5'-CAGCATCAGGAGTGGACAGA-3'	

بدون احراز هویت بیماران دریافت گردید. لازم به ذکر است که کلیه نمونه‌های دریافتی تا زمان تشخیص قطعی و دقیق بدخیمی توسط متخصصین آسیب‌شناسی و تعیین Stage بیماری در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کامل از نمونه‌های بافتی با محلول تریزول^۲ طبق پروتکل کمپانی سازنده کیت انجام شد. سپس RNA استخراج شده به جهت کمی با دستگاه نانودراپ^۳ و کیفی با ژل الکتروفورز ۲٪ آگارز مورد بررسی قرار گرفت. نهایتاً RNA استخراج شده تا قبل از سنتز cDNA در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنتز cDNA با استفاده از کیت رپورت اید^۴ مطابق با پروتکل شرکت سازنده کیت، مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد.

جهت بررسی میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده با نرم‌افزار پرایمر^۵ (جدول ۱) و مخلوط واکنش در دستگاه روتورژن^۶ به صورت دوتایی^۷ انجام شد. در این واکنش از ژن *GAPDH* به عنوان ژن خانه‌دار^۸ در جهت نرمالیزه کردن بیان ژن استفاده شد. جهت بررسی میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* نمونه‌های cDNA ها به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق و واکنش Real-Time PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرو لیتر انجام شد. مخلوط واکنش از ۹ میکرو لیتر مخلوط آکوپاور^۹، ۲ میکرو لیتر

از قبیل *Xportin-1, TRBP, Droscha, Dicer*، *AGO* و *AGO2* بسته به نوع سرطان، می‌توانند در نقش ژن‌های سرکوبگر توموری و یا انکوژن ایفای نقش کنند. تا به حال مطالعات متعددی مبنی بر ارزیابی بی‌نظمی در بیان ژن‌های miRNAهای مختلفی در سرطان روده بزرگ صورت گرفته است ولی تاکنون کمتر بر روی ژن‌هایی که در فرآیند پردازش این مولکول‌ها نقش داشته‌اند، به ویژه ژن *AGO2* در مبتلایان به این نوع سرطان صورت گرفته است که گاهی نتایج متناقضی گزارش شده است [۱۸]؛ بنابراین، هدف از این مطالعه ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* در نمونه‌های بافتی مبتلایان به سرطان روده بزرگ بود.

روش بررسی

مطالعه مورد-شاهدی حاضر بر روی ۱۰۰ نمونه بیوپسی بافتی (۵۰ نمونه بافت توموری و ۵۰ نمونه بافت مارژینال) مبتلایان به سرطان روده بزرگ که در طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۵ به بیمارستان‌های شهید محلاتی و امام رضا (ع) تبریز جهت تشخیص و درمان مراجعه کرده بودند، انجام شد. تشخیص قطعی بیماری، بر اساس نتایج آزمایش‌های بالینی و آسیب‌شناسی صورت گرفت. معیارهای ورود به مطالعه، مبتلایان به سرطان روده بزرگ که توسط متخصصین گوارش و آسیب‌شناسی تشخیص نهایی داده شده بود و فرآیندهای درمانی تا به حال انجام نشده بود، لحاظ گردید. مبتلایانی که فرآیندهای شیمی‌درمانی بر روی آنها انجام شده بود از مطالعه خارج می‌شدند.

پس از کسب رضایتنامه آگاهانه از تمامی بیماران و با رعایت کامل موازین اخلاقی، از هر فرد یک نمونه بیوپسی بافت توموری و یک نمونه بیوپسی بافت مارژینال توسط متخصص گوارش در یک میکروتیوپ حاوی محلول RNA Later که به صورت کاملاً محرمانه و با کد اختصاری و

2. TRIzol (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)
3. NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)
4. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Ontario, Canada)
5. Primer 3
6. Rottor Gene Q (Qiagen, USA)
7. Duplicate
8. House Keeping Gene
9. AccuPower 2X GreenStar qPCR Master Mix (ROX; Bioneer, Daejeon, Korea)

1. Microprocessor Complex

جدول ۲- ویژگی‌های دموگرافیکی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ

پارامترهای بالینی	تعداد (%)	مقدار p
جنسیت	مرد ۳۳ (۶۶٪)	۰/۰۰۱
	زن ۱۷ (۳۴٪)	
سن (سال)	≤۵۰ ۲۱ (۴۲٪)	۰/۰۶۵
	>۵۰ ۲۹ (۵۸٪)	
موقعیت آناتومیکی تومور	کولون ۲۸ (۵۶٪)	۰/۰۹۶
	رکتوم ۲۲ (۴۴٪)	
اندازه تومور	mm ۵۰< ۳۵ (۷۰٪)	۰/۰۴۹
	mm ۵۰> ۱۵ (۳۰٪)	
گرید بافتی	خوب ۳۸ (۷۶٪)	۰/۰۰۲
	متوسط ۹ (۱۸٪)	
	ضعیف ۳ (۶٪)	
مرحله بندی تومور	T1 ۱۰ (۲۰٪)	۰/۰۲۱
	T2 ۷ (۱۴٪)	
	T3 ۱۳ (۲۶٪)	
	T4 ۲۰ (۵۲٪)	

واکنش تکثیر ترسیم شد و کارایی نزدیک به ۱۰۰٪ به دست آمد (۹۸/۲۳٪). علاوه بر این، منحنی ذوب حاصل از واکنش به صورت یک پیک حاصل شد که بیانگر اختصاصیت واکنش تکثیری است (نمودار ۱). بعد واکنش Real-Time PCR الکتروفورز از محصولات تکثیری بر روی ژل آگارز ۲٪ در تأیید نتایج منحنی ذوب، تک باند حاصل گردید.

به منظور اینکه آیا اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن *AGO2* در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ وجود دارد، میزان بیان این ژن در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های مارژینال مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های ما نشان داد که میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های مارژینال

cDNA، ۰/۵ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت ژن‌های *AGO2* و *GAPDH* و ۲ میکرو لیتر آب مقطر تشکیل شده بود. به منظور تکثیر ژن‌های هدف، شرایط دمایی و زمانی به ترتیب دنبال شد؛ در مرحله واسرشت سازی اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ۴۰ سیکل متوالی متشکل از مرحله واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد [۱۸].

با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* محاسبه و جهت اطمینان از صحت سنتز *cDNA*ها، در ابتدا با پرایمرهای *GAPDH* واکنش PCR معمولی صورت گرفت.

$$\Delta CT (\text{بافت توموری}) = ct (\text{Target } (AGO2)) - ct (\text{Control } (GAPDH))$$

$$\Delta CT (\text{بافت مارژینال}) = ct (\text{Target } (AGO2)) - ct (\text{Control } (GAPDH))$$

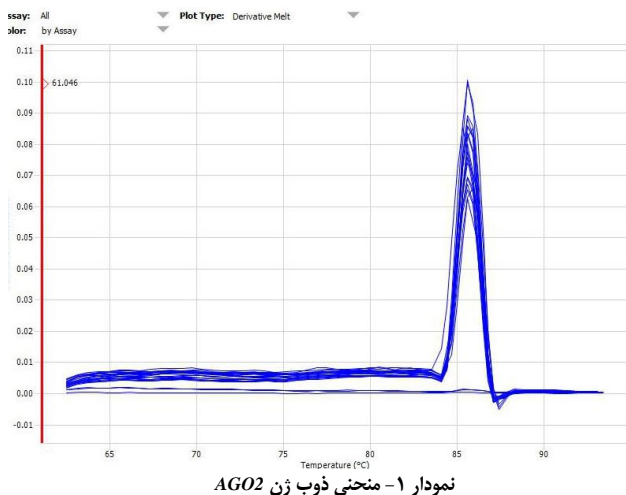
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{بافت توموری}) - \Delta CT (\text{بافت مارژینال})$$

مقادیر محاسبه شده ΔCT ژن‌ها در هر یک از دو نمونه بافتی، در فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ درج و نتایج حاصل با یکدیگر از نظر آماری مقایسه شدند. کلیه اطلاعات بر اساس نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* در نمونه‌های توموری و مارژینال از آزمون‌های آماری آنوا و تی زوجی استفاده شد. برای تمامی موارد مقدار p محاسبه گردید و سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این بررسی از ۵۰ فرد مبتلا به سرطان روده بزرگ که مورد مطالعه قرار گرفته بودند، ۳۳ (۶۶٪) مرد و ۱۷ (۳۴٪) زن با میانگین سنی و انحراف معیار ۶۰/۳۸±۶/۱۲ سال (در محدوده سنی ۷۴-۴۵ سال) تشکیل شده بود که اختلاف معناداری از نظر متغیر سن در بین زنان و مردان مبتلا مشاهده شد (جدول ۲) ($p=0/001$).

نمودار استاندارد برای ژن *AGO2* جهت تعیین کارایی



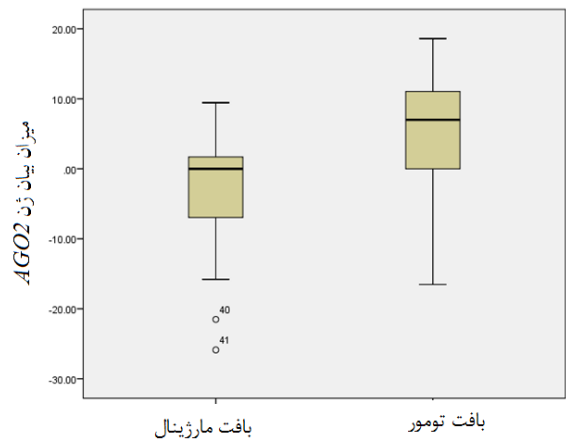
قرار گیرد.

سرطان روده بزرگ، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه است. برنامه‌های سلامت عمومی در کشورهای توسعه یافته و از طرفی در نتیجه پیشرفت در روش‌های درمانی و تشخیصی سرطان، نرخ رخداد سرطان تثبیت یا حتی کاهش یافته است؛ این درحالی‌که در اغلب کشورهای در حال توسعه این نرخ به سرعت در حال افزایش است [۲۱، ۲۲].

سرطان روده بزرگ یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سرتاسر جهان است که جزء بیماری‌های چندعاملی دسته‌بندی می‌شود. عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی در شکل‌گیری این سرطان دخالت درند [۵].

در سال‌های اخیر مطالعه بر روی میکرو RNAها و نقش آن‌ها در ایجاد و پیشرفت سرطان‌های مختلف به‌طور گسترده انجام شده که نتایج قابل توجهی را به همراه داشته است [۱۶]. داده‌ها نشان داده‌اند که miRNAها در فرآیند تومورزایی نقش مهمی دارند. پروتئین *AGO2* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده کلیدی در عملکرد و بلوغ miRNAs در سرطان‌های متعددی، از جمله روده بزرگ [۲۳]، سر و گردن [۲۴]، مثانه [۲۵]، تخمدان [۲۶]، معده [۲۷] بیش‌ازحد بیان شده است. در بررسی‌ها نشان داده شده بود که بیان بیش از حد *AGO2* با جنبه‌های مختلف سرطان از جمله، رشد سلول‌های توموری و بقای کلی بیماران سرطانی ارتباط معناداری دارد [۱۸، ۲۸].

علاوه بر این، نشان داده شده بود که بیان بیش از حد *AGO2* مکرراً در بافت‌ها و سلول‌های سرطانی هیپاتوسلولار حادث شده که بیان بیش‌ازحد *AGO2* منجر به القای miRNAهای انکوژنیک مانند *miR-21* شده و منجر به سرکوب ژن هدف می‌گردد. این درحالی‌که است که برخلاف آن miRNAهای مهارکننده توموری مانند *let-7* بدون تغییر خواهد ماند [۲۹، ۳۰]. همچنین، بررسی‌ها نشان داده است که *AGO2* با بسیاری از جنبه‌های سرطان از جمله آنژیوژنز، متاستاز و مکانیسم‌های تنظیم‌کننده این فرآیندها همراهی



نمودار ۲- میانگین میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* در نمونه‌های بافتی تومور نسبت به مارژینال در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ

($p=0/033$) نشان داده است، بدین صورت که میزان بیان این ژن در بافت‌های توموری نسبت به مارژینال افزایش ۲ برابری را نشان داده بود (نمودار ۲).

به طور کلی، از نظر موقعیت برداشت نمونه‌های بیوپسی بافتی، از ۵۰ نمونه ۲۸ (۵۶٪) مورد مربوط به بخش کولون و ۲۲ (۴۴٪) مورد مربوط به قسمت رکتوم بودند که اختلاف معناداری از لحاظ موقعیت آناتومیک در گیر در بدخیمی با میزان بیان ژن *AGO2* نشان داده نشد ($p=0/096$)، (جدول ۲).

علاوه بر این، ویژگی‌های دموگرافیکی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ از قبیل مراحل پاتولوژیکی مختلف^۱، اندازه تومور، سن و گرید بافتی^۲ مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان روده بزرگ بیماری پیچیده و چندعاملی است که در نتیجه تعامل بین عوامل محیطی و ژنتیکی شکل می‌گیرد [۲۰]. دانش کنونی در رابطه با سرطان روده بزرگ، از مطالعات انجام شده بر روی جمعیت‌های غربی به دست آمده است؛ درحالی‌که در جمعیت‌های آسیایی، الگوهای اجتماعی-اقتصادی، زمینه‌های ژنتیکی، شیوه زندگی و فرهنگی متفاوتی دارند؛ بنابراین، لازم است در جوامع آسیایی استعدادهای ژنتیکی و ارتباط عوامل خطر محیطی با سرطان روده بزرگ مورد مطالعه

1. T staging
2. Histological Grade

داشته و بسته به نوع و مراحل مختلف سرطان، ناهمگنی وجود دارد [۳۱].

پروتئین‌های *AGO* در مسیر پردازش مولکول‌های *miRNA* و *siRNA* نقش مهمی دارد. پروتئین *AGO2* یکی از اجزای کمپلکس *RISC* است که نقش کاتالیتیکی را در برش مولکول‌های *RNA* تداخلی ایفا می‌کند. در انسان هشت نوع پروتئین شبه آرگونات شناسایی شده که چهار خانواده از این پروتئین‌ها، در گروه‌های *AGO1*، *AGO2*، *AGO3* و *AGO4* و مابقی در گروه‌های *PIWIL1*، *PIWIL2*، *PIWIL3* و *PIWIL4* دسته‌بندی شده‌اند. پروتئین‌های خانواده *AGO* در حیوانات، گیاهان و مخمر یافت می‌شوند. این مولکول‌ها از طریق شناسایی توالی‌های راهنما در مولکول‌های *siRNA* و *miRNAs* در فرآیندهای تنظیمی در سطوح رونویسی و بعد از رونویسی نقش دارند. بر اساس این که برش مولکول *RNA* هدف یکی از بارزترین عملکرد این پروتئین‌ها به شمار می‌رود، از این رو به پروتئین‌های خاموش‌کننده شناخته شده‌اند [۲۳]. بنابراین، تغییرات در میزان بیان ژن‌های رمز کننده این دسته از پروتئین‌ها ممکن است در سرطان زای نقش داشته باشد.

لی و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان پروتئین آرگونات، بیومارکری مؤثر در سرطان روده بزرگ به شمار می‌رود، با روش ایمنو‌هیستوشیمی بر روی ۷۵ نمونه بافتی سرطانی و سالم انجام شده بود، نشان دادند که میزان بیان پروتئین آرگونات در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های سالم مجاور افزایش بیان نشان داده بود که دال بر نقش این ژن در بروز سرطان روده بزرگ است [۲۳]. نتایج مطالعه حاضر مشابه نتایج مطالعه قبلی که بر روی نمونه‌های بافتی سرطان روده بزرگ انجام شده بود، افزایش میزان بیان ژن *AGO2* را در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم نشان داد.

یونگ و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان افزایش بیان *AGO2* در سلول‌های اوروتلیال کارسینومای مثانه که با روش‌های *qRT-PCR* و وسترن بلات بر روی ۱۰۶ نمونه

بافتی سرطانی و سالم مثانه مورد ارزیابی قرار داده بودند، نشان داده شد که میزان بیان این ژن در بافت سرطانی افزایش چشمگیری نشان داده است [۲۵].

واکسمن و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان افزایش بیان ژن‌های *Drosha*، *Dicer* و *AGO2* با پیشرفت سرطان تخمدان که با روش *qRT-PCR* بر روی ۱۱۴ نمونه سرطانی انجام شده بود، نشان دادند که میزان بیان ژن *AGO2* بر اساس فاصله متاستاز سرطان از محل اولیه همبستگی معناداری دارد و از این رو می‌توان از آن به عنوان مارکری برای ارزیابی میزان تهاجم سرطان تخمدان در ارزیابی‌های بالینی مورد بررسی قرار داد [۲۶]. نتایج این مطالعه نیز با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت داشت.

ژانگ و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان افزایش بیان ژن *AGO2* در سرطان معده که با روش‌های ایمنو‌هیستوشیمی و میکروآرای بر روی ۳۶۳ فرد مبتلا به سرطان معده انجام شده بود، نشان دادند که میزان بیان این ژن افزایش یافته بود و ممکن است به عنوان بیومارکر تشخیصی در فرآیند تومورزایی و پیشرفت بدخیمی نقش داشته باشد [۲۷]. مطابقت نتایج این بررسی و مطالعات قبلی با پژوهش حاضر، نشان از ارتباط مستقیم سرطانی شدن سلول با افزایش میزان بیان ژن *AGO2* دارد. اختلال در میزان بیان میکروRNAها همیشه به دلیل تغییرات مربوط در سطح رونویسی این ژن‌ها حادث نمی‌شود که گاهی در اثر اختلال در ژن‌های دخیل در فرآیندهای پردازشی و بلوغ این مولکول‌ها، تغییراتی را در میزان بیان میکروRNA رخ می‌دهد. با این حال، تمام میکروRNAهای موجود در یک خوشه ژنی بیان نمی‌شوند چرا که فرآیند پردازش آن‌ها نیز متفاوت خواهد بود. در بسیاری از موارد کاهش غیرمعمول میکروRNAها ارتباطی با تغییرات میزان بیان ژن اصلی ندارند که در برخی از سرطان‌ها، تغییرات در بیان آنزیم‌های درگیر در مراحل بلوغ میکروRNAها از قبیل *Dicer*، *Drosha* و *AGO2* مشاهده شده است که اثر مستقیم بروی میکروRNAها دارند [۱۸]. نتایج حاصل از

سرطان روده بزرگ مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد مصوب ۹۳۲۰۰۲ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است. این مطالعه با مشارکت کارکنان محترم بیمارستان‌های شهید محلاتی و امام رضا^(ع) تبریز انجام گرفته است و بدین وسیله از کلیه افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

داده‌های این بررسی بیانگر ارتباط معنادار میان افزایش بیان ژن *AGO2* با پیشرفت سرطان روده بزرگ است. امید است در مطالعات آتی بتوان با کمک مولکول‌های خاموش‌کننده زیستی از افزایش میزان بیان ژن *AGO2* جلوگیری و نتایج درمانی مناسبی را برای بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ به دست آورد.

به طور کلی، نتایج بررسی ما نشان داد که میزان تغییرات بیان ژن *AGO2* در بافت توموری نسبت به بافت سالم اختلاف معناداری را نشان داده است، بنابراین، ممکن است این ژن به‌عنوان یک بیومارکر کاربردی در تشخیص و ارزیابی

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA: a cancer journal for clinicians. 2017; 67(1):7-30.
2. Zarea K, Beiranvand S, Ghanbari S, Tuvevsson H. Incidence of gastrointestinal cancers in Iran: a systematic review. Jundishapur Journal of Chronic Disease Care. 2017; 6(1):1-7.
3. Khosravi Shadmani F, Ayubi E, Khazaei S, Sani M, Mansouri Hanis S, Khazaei S, et al. Geographic distribution of the incidence of colorectal cancer in Iran: a population-based study. Epidemiology and health. 2017; 39:1-6.
4. Montazeri B, Alizadeh K, Zarei S. The frequency of disabling malignancies in air force personnel during 1371-1382. Ebnesina. 2007; 10(2):5-10. [Persian]
5. Mansori K, Solaymani-Dodaran M, Mosavi-Jarrahi A, Motlagh AG, Salehi M, Delavari A, et al. Spatial inequalities in the incidence of colorectal cancer and associated factors in the neighborhoods of Tehran, Iran: Bayesian spatial models. Journal of preventive medicine and public health. 2018; 51(1):33-40.
6. Bailie L, Loughrey MB, Coleman HG. Lifestyle risk factors for serrated colorectal polyps: a systematic review and meta-analysis. Gastroenterology. 2017; 152(1):92-104.
7. Hirsch D, Camps J, Varma S, Kemmerling R, Stapleton M, Ried T, et al. A new whole genome amplification method for studying clonal evolution patterns in malignant colorectal polyps. Genes, chromosomes & cancer. 2012; 51(5):490-500.
8. Samadder NJ, Jasperson K, Burt RW. Hereditary and common familial colorectal cancer: evidence for colorectal screening. Digestive diseases and sciences. 2015; 60(3):734-747.
9. Parfrey PS, Dicks E, Parfrey O, McNicholas PJ, Noseworthy H, Woods MO, et al. Evaluation of a population-based approach to familial colorectal cancer. Clinical genetics. 2017; 91(5):672-682.
10. Kanth P, Grimmer J, Champine M, Burt R, Samadder NJ. Hereditary colorectal polyposis and cancer syndromes: a primer on diagnosis and management. The American journal of gastroenterology. 2017; 112(10):1509-1525.
11. Ballester V, Rashtak S, Boardman L. Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. World journal of gastroenterology. 2016; 22(5):1736-1744.
12. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009; 136(4):642-655.
13. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Biochimica et biophysica acta. 2010; 1803(11):1231-1243.
14. Sun K, Lai EC. Adult-specific functions of animal microRNAs. Nature reviews. Genetics. 2013; 14(8):535-548.

15. Drakaki A, Iliopoulos D. MicroRNA gene networks in oncogenesis. *Current genomics*. 2009; 10(1):35-41.
16. Kian R, Moradi S, Ghorbian S. Role of components of microRNA machinery in carcinogenesis. *Experimental oncology*. 2018; 40(1):2-9.
17. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2015; 15(6):321-333.
18. Papachristou DJ, Korpetinou A, Giannopoulou E, Antonacopoulou AG, Papadaki H, Grivas P, et al. Expression of the ribonucleases Droscha, Dicer, and Ago2 in colorectal carcinomas. *Virchows Archiv*. 2011; 459(4):431-440.
19. Kim B, Lee J-H, Park JW, Kwon TK, Baek SK, Hwang I, et al. An essential microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 is up-regulated in colorectal carcinomas. *Clinical and experimental medicine*. 2014; 14(3):331-336.
20. Zheng C, Xing L, Li T, Li T, Yang H, Cao J, Chen B, Zhou Z, Zhang L. Developing a robust colorectal cancer (CRC) risk predictive model with the big genetic and environment related CRC data. In: 2016 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine. 15-18 Dec. Shenzhen, China 2016.
21. Irandoost II. Monoclonal antibodies. *Ebnesina*. 2006; 9(2):16-19. [Persian]
22. Ebrahimi M, Lalavi R. Aptamers: a new approach to detection of target molecules. *Ebnesina*. 2016; 18(2):48-53. [Persian]
23. Li L, Yu C, Gao H, Li Y. Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC cancer*. 2010; 10:1-8.
24. Chang SS, Smith I, Glazer C, Hennessey P, Califano JA. EIF2C is overexpressed and amplified in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*. 2010; 72(6):337-343.
25. Yang F-Q, Huang J-H, Liu M, Yang F-P, Li W, Wang G-C, et al. Argonaute 2 is up-regulated in tissues of urothelial carcinoma of bladder. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014; 7(1):340-347.
26. Vaksman O, Hetland TE, Trope' CG, Reich R, Davidson B. Argonaute, Dicer, and Droscha are up-regulated along tumor progression in serous ovarian carcinoma. *Human pathology*. 2012; 43(11):2062-2069.
27. Zhang J, Fan X-S, Wang C-X, Liu B, Li Q, Zhou X-J. Up-regulation of Ago2 expression in gastric carcinoma. *Medical oncology*. 2013; 30(3):628.
28. Feng B, Hu P, Lu S-J, Chen J-B, Ge R-L. Increased argonaute 2 expression in gliomas and its association with tumor progression and poor prognosis. *Asian pacific journal of cancer prevention*. 2014; 15(9):4079-4083.
29. Zhang J, Jin H, Liu H, Lv S, Wang B, Wang R, et al. MiRNA-99a directly regulates AGO2 through translational repression in hepatocellular carcinoma. *Oncogenesis*. 2014; 3:e97.
30. Cheng N, Li Y, Han Z-G. Argonaute2 promotes tumor metastasis by way of up-regulating focal adhesion kinase expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013; 57(5):1906-1918.
31. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013; 501(7467):328-337.

Evaluating the diagnostic value of *Argonaute 2* gene expression changes in patients with colorectal cancer

Ayani V¹, *Ghorbian S², Abolghasemi Fakhri MB³

Abstract

Background: The protein encoded by *argonaute 2* gene (*AGO2*) plays a critical role in micro-RNA biogenesis and processing pathway. *AGO2* gene may have an onco-miR or tumor suppressor-miR role in tumor genesis. In this study, we aimed to evaluate *AGO2* gene expression changes in colorectal cancer (CRC) patients.

Materials and methods: In this case-control study, we have analyzed 100 CRC tissue samples (50 cancerous and 50 adjacent non-cancer tissues) in patients with colon cancer who had admitted to Shahid Mahallati and Imam Reza Hospitals in Tabriz city during 2015 to 2016. Total RNA was extracted and cDNA was synthesized and then *AGO2* expression changes were evaluated using Real Time-PCR method by $2^{-\Delta\Delta CT}$. Data were analyzed using ANOVA and paired t-test.

Results: Our findings showed a significant difference in *AGO2* gene expression between cancerous and adjacent non-cancer tissues ($p=0.033$), which was associated with an increase in expression level of *AGO2* gene.

Conclusion: Our findings showed that increased levels of *AGO2* expression may play a significant role in the development of CRC and can be used as a diagnostic biomarker in CRC patients.

Keywords: *AGO2* protein/human, Colorectal Cancer, Gene Expressions

1. MSc in Genetic, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

2. Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran (*Corresponding Author)
ghorbian20@yahoo.com

3. Associate Professor, Department of General Surgery, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran