

بررسی ارزش تشخیصی RNA غیرکدکننده طولانی KCNQ1OT1 در تشخیص سرطان پستان

چکیده

دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۰ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۴/۰۴/۰۱

زمینه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان است و همچنان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان محسوب می‌شود. تشخیص زودهنگام این بیماری می‌تواند با مداخلات به‌موقع، احتمال بقا را به‌طور قابل‌توجهی افزایش دهد. با این حال، روش‌های غربالگری فعلی در برخی موارد از دقت کافی برخوردار نیستند. ژن غیرکدکننده KCNQ1OT1 به‌عنوان یکی از lncRNAهای دخیل در پاتوژنز انواع سرطان‌ها، از جمله سرطان پستان، شناخته شده است و ممکن است به‌عنوان بیومارکر بالقوه در تشخیص زودهنگام این بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی: این مطالعه مورد-شاهدی از مهر ۱۴۰۳ تا اسفند ۱۴۰۳ در بیمارستان شفا، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران انجام شد. شامل ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۳۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل بود. سطح بیان سرمی KCNQ1OT1 با استفاده از روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد و گروه‌ها از نظر شاخص‌های دموگرافیک مقایسه شدند.

یافته‌ها: گروه‌های بیمار و کنترل از نظر بیشتر شاخص‌های دموگرافیک همگن بودند، اگرچه در سن و قومیت تفاوت آماری مشاهده شد. بیشتر بیماران در مرحله‌ی اولیه بیماری تشخیص داده شده بودند. بیان سرمی KCNQ1OT1 در بیماران به‌طور معناداری پایین‌تر از گروه کنترل بود ($P=0/0003$) تحلیل ROC نشان داد دقت تشخیصی این نشانگر با $AUC=0/82$ مطلوب است.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها حاکی از آن است که KCNQ1OT1 دارای پتانسیل مناسب به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی در شناسایی زودهنگام سرطان پستان است. با توجه به تشخیص بیشتر بیماران در مراحل اولیه، انجام مطالعات با حجم نمونه بالاتر برای تأیید و تعمیم‌پذیری نتایج توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: بیومارکر، سرطان پستان، رونویس آنتی‌سنس KCNQ1، RNA غیرکدکننده بلند.

ماندانا پولادزاده^۱، فاطمه خزائی^۲، سعید بیطرف^۳، حسین کریم‌پوریان^۴، مهسا ممبینی^۵، محمدرضا محمودیان ثانی^{۶*}

۱- گروه طب اورژانس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲- واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان گلستان، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۳- گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۴- مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، محله گلستان، خیابان شهرک دانشگاه، مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، پژوهشکده سلامت.

تلفن: ۰۶۱-۳۳۷۵۰۴۱۰

E-mail: mohamadsani495@gmail.com

مقدمه

نیز دیده می‌شود.^۲ سالانه حدود ۱,۷ میلیون مورد جدید از آن گزارش می‌شود.^۳ میزان بروز در ایالات متحده یک مورد در هر هشت زن و در آسیا حدود یک مورد در هر ۳۵ زن است.^۴ در ایران نیز نرخ بروز تقریبی ۱۰ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر گزارش شده است.^۵ عوامل خطر بیماری به دو گروه قابل اصلاح مانند چاقی، کم‌تحركی و مصرف هورمون‌های برون‌زا، و غیرقابل اصلاح نظیر افزایش سن و

سرطان پستان گروهی از بدخیمی‌های اپی‌تلیالی غدد شیری است که با تنوع بالینی، مولکولی و آسیب‌شناختی همراه بوده، اما مکانیسم دقیق آغاز آن هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است.^۱ این سرطان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان جهان است و با شیوع کمتر در مردان

یافته‌ها متفاوت است، مطالعه Zhang و همکاران افزایش بیان KCNQ1OT1 را در مراحل اولیه نوع کارسینوم داکت‌های شیری (DCIS) نسبت به بافت طبیعی گزارش کرده‌اند که بیانگر پتانسیل آن به عنوان بیومارکر مراحل اولیه بیماری است.^{۲۲،۲۱} بیان KCNQ1OT1 تحت تأثیر عوامل بالادست مانند NF-Y و پروموتور CCAAT قرار دارد و β - کاتنین با اتصال به پروموتور، بیان آن را تقویت می‌کند.^{۲۴،۲۳} پس از ایفای نقش عملکردی، غیرفعال‌سازی آن از طریق متیلاسیون DNA و تعاملات کروماتینی انجام می‌شود.^{۲۵} شواهد فزاینده‌ای بیانگر نقش کلیدی KCNQ1OT1 در تکثیر، متابولیسم و متاستاز سلول‌های سرطانی است.^{۲۷،۲۶} بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی ارزش تشخیصی KCNQ1OT1 در شناسایی سرطان پستان در مراحل اولیه طراحی و انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه مورد-شاهدی از مهر ۱۴۰۳ تا اسفند ۱۴۰۳ در بیمارستان شفا، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران انجام شد. تشخیص بیماری بر اساس گزارش پاتولوژی و تأیید متخصص مربوطه انجام شد. افراد گروه کنترل از میان داوطلبان سالم بدون سابقه سرطان یا بیماری‌های خودایمنی انتخاب شدند. پژوهش با کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1402.132 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تصویب شد و رضایت‌نامه آگاهانه کتبی از همه شرکت‌کنندگان اخذ گردید. معیارهای ورود در گروه بیمار شامل تأیید پاتولوژیک سرطان پستان، نداشتن بیماری‌های خودایمنی یا مزمن شدید (مانند نارسایی قلبی یا کلیوی) و امضای رضایت‌نامه بود. در گروه کنترل نیز سلامت عمومی، نداشتن سابقه بیماری‌های بدخیم یا خودایمنی، عدم مصرف داروهای سرکوب‌کننده ایمنی و رضایت کتبی الزامی بود. معیارهای خروج شامل عدم تمایل به ادامه همکاری، کیفیت پایین نمونه RNA یا نقص در داده‌های بالینی بود. برای استخراج RNA تام، از ۵۰۰ μ l سرم هر نمونه استفاده شد و استخراج با استفاده از کیت (Total RNA Purification) کد YT9065، شرکت یکتا تجهیز آزما) طبق دستورالعمل سازنده انجام گرفت. خلوص RNA براساس نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ ارزیابی شد. نمونه‌های RNA تا زمان ستنز

زمینه ژنتیکی (جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2) تقسیم می‌شوند. برخی واریانت‌های ژنی خطر ابتلا را تا ۱۰ تا ۳۰ برابر افزایش می‌دهند، هرچند این افزایش به معنای حتمی بودن بیماری نیست.^{۷،۶،۳} شایعترین نوع سرطان پستان، آدنوکارسینوم است که ۸۵٪ منشأ مجرای و ۱۵٪ منشأ لوبولی دارد، انواع نادرتر شامل بیماری پج، سرطان التهابی، نوع پاپیلاری، فیلوئید بدخیم و آنژیوسارکوما هستند.^۶ از نظر مولکولی، سرطان پستان به سه گروه اصلی تقسیم می‌شود: ۱- نوع دارای گیرنده‌های استروژن و پروژسترون مثبت که به درمان‌های هورمونی پاسخ می‌دهد، ۲- نوع HER2 مثبت که به درمان‌های هدفمند مانند تراستوزومب حساس است، ۳- نوع سه‌گانه منفی (TNBC) که فاقد هر سه گیرنده بوده و معمولاً تهاجمی‌تر است.^{۹،۸} روش‌های تشخیص شامل بررسی سابقه خانوادگی، معاینه بالینی، تصویربرداری (سونوگرافی و ماموگرافی) و بیوپسی است. سونوگرافی در شناسایی توده‌ها مفید ولی مستعد نتایج مثبت کاذب است. ماموگرافی روش استاندارد غربالگری با خطای ۱۰ تا ۱۵٪ محسوب می‌شود، در حالی‌که بیوپسی دقیق‌ترین روش تشخیص است و در چارچوب رویکرد سه‌گانه به کار می‌رود.^{۱۰،۹} با وجود پیشرفت‌های درمانی، سرطان پستان همچنان تهدیدی جدی برای سلامت عمومی است.^{۱۱} تشخیص زودهنگام نقش مهمی در بهبود بقاء دارد، به‌طوری‌که نرخ بقاء پنج‌ساله از حدود ۱۰۰٪ در مرحله I به ۲۶٪ در مرحله IV کاهش می‌یابد.^{۱۳،۱۲} در این میان، بیومارکرها به عنوان موادی در خون یا بافت که وضعیت طبیعی یا پاتولوژیک بدن را نشان می‌دهند، در تشخیص زودهنگام، پیش‌آگهی و پایش درمانی اهمیت ویژه‌ای دارند.^{۱۵،۱۴} در سال‌های اخیر، lncRNAها با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید و بدون چارچوب خوانش باز شناخته شده‌اند که نقش‌های متعددی در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کنند.^{۱۶} این مولکول‌ها علاوه بر عملکرد در سطوح رونویسی و پسارونویسی، از طریق تنظیمات اپی‌ژنتیک و تغییر در ساختار کروماتین نیز در کنترل بیان ژن مشارکت دارند.^{۱۸،۱۷} یکی از این مولکول‌ها، KCNQ1OT1 lncRNA است که در ناحیه p15.5 کروموزوم ۱۱ قرار دارد و نخستین بار در ارتباط با سندرم بکویت-ویدمن شناسایی شد.^{۲۰،۱۹} مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مهار KCNQ1OT1 می‌تواند از پیشرفت تومور در سرطان‌های مختلف مانند پروستات، روده و پستان جلوگیری کند.^{۱۹} در سرطان پستان،

۹ انجام گرفت و مقدار $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

توزیع قومیت بین دو گروه به‌طور معناداری متفاوت بود ($P = 0.007$). در گروه بیماران، توزیع قومیتی به‌صورت ۲۹/۲٪ بختیاری، ۶۲/۵٪ عرب، ۴/۲٪ فارس، ۰٪ کرد، ۴/۲٪ لر و ۰٪ ترک گزارش شد، در گروه کنترل این توزیع به‌صورت ۵۴/۱۷٪ بختیاری، ۸/۳٪ عرب، ۲۵٪ فارس، ۴/۲٪ کرد، ۴/۲٪ لر و ۴/۲٪ ترک بود. در بررسی مذهب، ۹۵/۷٪ از بیماران و ۱۰۰٪ از کنترل‌ها پیرو مذهب شیعه بودند و ۴/۳٪ از بیماران سنی‌مذهب بودند ($P = 0.34$) که نشان‌دهنده عدم تفاوت معنادار بین دو گروه از نظر مذهب است. در مورد سابقه خانوادگی سرطان، ۳۷/۵٪ از بیماران و ۵۰٪ از افراد کنترل دارای سابقه خانوادگی بیماری بودند ($P = 0.40$)، بدین معنی که تفاوت معناداری مشاهده نشد. وضعیت آلرژی در بیماران و کنترل‌ها به‌ترتیب ۸/۳٪ و ۳/۳۳٪ گزارش شد ($P = 0.06$). با اینکه این مقدار به آستانه معناداری نزدیک است، تفاوت آماری معنادار نبود. در نهایت، وضعیت تأهل به‌صورت ۱۲/۵٪ مجرد و ۸۷/۵٪ متأهل در گروه بیماران و ۲۵٪ مجرد و ۷۵٪ متأهل در گروه کنترل بود ($P = 0.49$) که تفاوت معناداری نشان نداد.

برای بررسی نرمال بودن داده‌ها، از آزمون‌های Anderson-Darling، D'Agostino-Pearson، Shapiro-Wilk، Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. نتایج نشان داد داده‌های گروه بیماران دارای توزیع نرمال ($P > 0.05$) و داده‌های گروه کنترل فاقد توزیع نرمال ($P < 0.05$) بودند. بر این اساس، برای مقایسه میان دو گروه از آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney U test استفاده شد (جدول ۲).

نتایج آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney U test برای مقایسه میزان Fold change KCNQ1OT1 بین بیماران و افراد کنترل در جدول ۳ آمده است. مقدار $P = 0.003$ نشان‌دهنده تفاوت آماری معنادار بین دو گروه است. مجموع رتبه‌ها در گروه‌های A و B به‌ترتیب ۲۸۲ و ۵۳۸ و مقدار آماره آزمون ۷۲ بود. میانه داده‌ها در بیماران ۰/۰۲۴ و در کنترل‌ها ۰/۰۳۹ محاسبه شد که اختلاف میانگین‌ها جز-له‌مان برابر با ۰/۰۱۳ برآورد گردید. این نتایج بیانگر تفاوت معنادار بیان KCNQ1OT1 بین دو گروه مورد مطالعه است.

جدول ۱: توالی و بلاست پرایمرهای فوروارد و ریورس ژن‌های LncRNA

KCNQ1OT1 و GAPDH

ژن	توالی
^{۳۶} KCNQ1OT1	F: 5'-GACCTGGCAGTCTCAAAAGC-3' R: 5'-CACTGGGGCAGTCACCTAAT-3'
^{۳۶} GAPDH	F: 5'-TCTACATGGCAACTGTGAGGAG-3' R: 5'-CAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAG-3'

cDNA در دمای 70°C - نگهداری شدند. برای سنتز cDNA از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کارخانه استفاده شد. واکنش در حجم نهایی ۲۰ μl شامل RNA استخراج‌شده، پرایمر Oligo(dT)، مخلوط dNTP، بافر واکنش و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس بود. واکنش در 70°C جهت دناتوراسیون اولیه و سپس در 42°C به‌مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA انجام شد. در پایان، آنزیم در 70°C به‌مدت پنج دقیقه غیرفعال گردید و محصول تا زمان انجام PCR نگهداری شد. واکنش (qPCR) Real-Time PCR با استفاده از YTA SYBR Green qPCR Master Mix 2X (یکتا تجهیز آزما) انجام شد. واکنش شامل ۱۰ μl مستر میکس، ۰/۴ μl از هر پرایمر اختصاصی (۱۰ میکرومولار)، cDNA الگو و آب بدون نوکلئاز تا رسیدن به حجم نهایی ۲۰ μl بود. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در 95°C و ۴۰ چرخه سه‌مرحله‌ای (دناتوراسیون، اتصال و گسترش) بود. اختصاصیت محصولات با منحنی ذوب بررسی شد. تمام واکنش‌ها در تکرار سه‌گانه انجام و ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی استفاده گردید. توالی پرایمرهای اختصاصی براساس مطالعات پیشین طراحی و به‌کار گرفته شد (جدول ۱).

در مرحله آنالیز آماری، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها بررسی شد. با توجه به نرمال نبودن داده‌ها، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney U test استفاده شد. سطوح بیان ژن‌ها با استفاده از روش‌های ΔCt ، $\Delta\Delta\text{Ct}$ و Fold Change محاسبه گردید. همچنین جهت ارزیابی ارزش تشخیصی ژن KCNQ1OT1، منحنی‌های راک (ROC) رسم شد و مقادیر سطح زیر نمودار راک (AUC)، حساسیت، ویژگی و نقطه برش برای KCNQ1OT1 محاسبه گردید. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پرسم نسخه

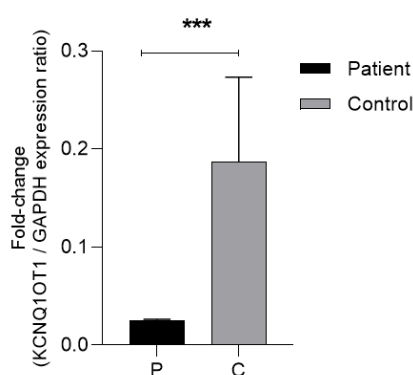
جدول ۲: نتایج آزمون‌های نرمال بودن داده‌های Fold change KCNQ1OT1 برای بیماران و افراد کنترل

آزمون نرمالیتی	آماره آزمون (گروه شاهد)	P (گروه شاهد)	تأیید نرمال بودن (گروه شاهد)	آماره آزمون (گروه بیمار)	P (گروه بیمار)	تأیید نرمال بودن (گروه بیمار)
Anderson-Darling test	$A^2=0/39$	0/30	بله	$A^2=4/62$	0/0001<	خیر
D'Agostino-Pearson test	$K^2=1/35$	0/50	بله	$K^2=27/5$	0/0001<	خیر
Shapiro-Wilk test	$W=0/95$	0/50	بله	$W=0/49$	0/0001<	خیر
Kolmogorov-Smirnov test	$D=0/14$	0/10>	بله	$D=0/43$	0/0001<	خیر

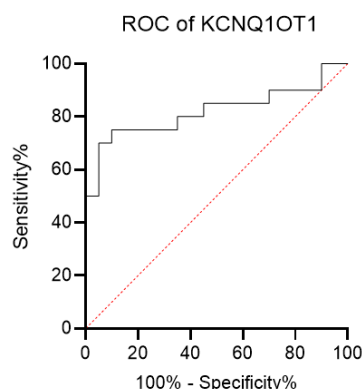
جدول ۳: نتایج Mann-Whitney U test برای مقایسه Fold change در بیان

KCNQ1OT1 بین بیماران و افراد کنترل

پارامتر	مقدار
آزمون	Mann-Whitney U test
مقایسه	بیماران گروه A در مقابل کنترل‌ها گروه B
P	0/0003
P دقیق (Exact)	***
خلاصه P	***
$P < 0/05$ معنادار	بله
نوع تست	دوطرفه (Two-tailed)
مجموع رتبه‌ها (بیماران، کنترل‌ها)	۲۸۲ (A)، ۵۳۸ (B)
مقدار آماره Mann-Whitney U test	۷۲
میان (بیماران)	0/024
میان (کنترل‌ها)	0/039
اختلاف میان (مقدار واقعی)	0/015
اختلاف میان (ه‌ج‌ج‌ز - لمان)	0/013

*** نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین دو گروه است ($P < 0/001$)

نمودار ۱: مقایسه بیان LncRNA KCNQ1OT1 در گروه بیماران و افراد کنترل



نمودار ۲: ارزیابی عملکرد تشخیصی LncRNA KCNQ1OT1 با استفاده از منحنی راک

بررسی منحنی ROC نشان داد که AUC برابر با $0/82 \pm 0/07$ و فاصله اطمینان ۹۵٪ آن بین ۰/۶۷ تا ۰/۹۶ بود ($P=0/0005$). این نتایج نشان‌دهنده عملکرد مطلوب شاخص در تمایز بیماران از افراد سالم

است. حساسیت و ویژگی به ترتیب ۷۰٪ و ۹۵٪ برآورد شد و نقطه برش بهینه مقدار بزرگ‌تر از ۰/۰۳۱ تعیین گردید. همچنین، نسبت درست‌نمایی مثبت (LR^+) برابر با ۱۴/۰۰ محاسبه شد که نشان‌دهنده قدرت تشخیصی بالای مدل است. این یافته‌ها حاکی از دقت مناسب و قابلیت بالای مدل در تفکیک بیماران از افراد سالم می‌باشد. نمودار ۱ سطح بیان lncRNA KCNQ1OT1 را در دو گروه بیماران (P) و کنترل (C) نشان می‌دهد. محور افقی گروه‌های مورد مطالعه و محور عمودی نسبت بیان GAPDH به KCNQ1OT1 را نمایش می‌دهد. میانگین سطح بیان در گروه کنترل به‌طور معناداری بالاتر از بیماران است ($P < 0.001$). این تفاوت بیانگر کاهش معنادار بیان KCNQ1OT1 در بیماران نسبت به افراد سالم می‌باشد. نمودار ۲ منحنی راک مربوط به ارزیابی توان تشخیصی lncRNA KCNQ1OT1 را نشان می‌دهد. محور عمودی حساسیت و محور افقی ۱ منهای ویژگی را نمایش می‌دهد. همان‌گونه که دیده می‌شود، منحنی بالاتر از خط شانس قرار دارد که بیانگر توان مدل در تفکیک بیماران از افراد سالم است. مقدار $AUC = 0.82$ نشان‌دهنده دقت و عملکرد خوب این شاخص در تشخیص سرطان پستان می‌باشد.

بحث

در این مطالعه داده‌های دموگرافیک و سطح سرمی KCNQ1OT1 از طریق نمونه‌برداری و پرسش‌نامه جمع‌آوری شد. بین دو گروه از نظر سن ($P = 0.23$) و قومیت ($P = 0.04$) تفاوت معناداری مشاهده شد، در میان بیماران بیشترین فراوانی مربوط به قوم عرب بود که با یافته‌های برخی مطالعات مشابه در ایران سازگار است.^{۳۰} سطح سرمی KCNQ1OT1 در گروه بیماران به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود ($P = 0.03$). این کاهش با برخی گزارش‌های داخلی درباره بیماری‌های دیگر و نیز مطالعات بین‌المللی در لوسمی مطابقت دارد.^{۳۱-۳۴} اما با گزارش‌هایی که افزایش بیان KCNQ1OT1 در بافت‌های سرطانی را نشان داده‌اند، در تضاد است.^{۳۵،۳۶} از سوی دیگر، تحلیل‌های داده‌های The cancer genome atlas (TCGA) کاهش بیان KCNQ1OT1 در بافت تومور را نیز گزارش کرده‌اند که با نتایج ما همخوانی دارد.^{۳۵} اختلاف نتایج بین مطالعات احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع نمونه (سرم در مطالعه حاضر در برابر بافت در برخی

مطالعات)، روش‌های سنجش، و توزیع بیماران از نظر مرحله و زیرگروه مولکولی است. در این پژوهش اکثر بیماران در مراحل ابتدایی قرار داشتند و متاستاز دوردست مشاهده نشد، این امر می‌تواند در تبیین کاهش مشاهده‌شده نقش داشته باشد، چرا که برخی مطالعات افزایش KCNQ1OT1 را در مراحل پیشرفته‌تر گزارش کرده‌اند.^{۳۵} شواهد عملکردی نشان می‌دهد KCNQ1OT1 در فرایندهای تکثیر، مهاجرت و متاستاز نقش دارد، برای مثال خاموش‌سازی آن مهاجرت توموری به ریه را کاهش داده و در برخی زیرگروه‌ها از طریق مسیرهایی مانند تنظیم PTEN تهاجم را تقویت می‌کند.^{۳۷،۳۸} روابط با زیرگروه مولکولی (مثلاً Luminal A) و پاسخ به هورمون نیز گزارش شده است.^{۳۹-۴۱} مکانیسم‌های مولکولی پیشنهادی شامل نقش ceRNA و به‌دام انداختن miRNAهایی مانند miR-103a-3p و miR-15a و miR-145 است، همچنین ارتباط با مقاومت دارویی از طریق محور miR-103a-3p/MDR1 گزارش شده است.^{۴۲،۴۳} در مطالعه حاضر تحلیل این محورها انجام نشد و به‌همین دلیل توصیه می‌شود در پژوهش‌های آتی بررسی هم‌زمان KCNQ1OT1 و miRNAها یا پروتئین‌های هدف انجام شود. از نظر بالینی، KCNQ1OT1 در این مطالعه با $AUC = 0.82$ ، حساسیت ۷۰٪، ویژگی ۹۵٪ و $LR^+ 14$ (نقطه برش ۰/۰۳۱) نشان‌دهنده پتانسیل مناسب به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی در مراحل اولیه است، هرچند دقت گزارش‌شده در مطالعات دیگر متفاوت بوده است.^{۳۵} محدودیت‌های اصلی این مطالعه شامل حجم نمونه نسبتاً اندک، محدود بودن شرکت‌کنندگان به جمعیت زنان، و نبود امکان انجام طبقه‌بندی مولکولی بیماران است. lncRNA KCNQ1OT1 در این نمونه‌های سرمی نشان‌دهنده پتانسیل قابل قبولی برای شناسایی سرطان پستان در مراحل اولیه است. با این حال، به دلیل نتایج متناقض در مقالات و محدودیت‌های نمونه‌گیری، انجام مطالعات تکمیلی بزرگ‌تر و جامع‌تر، به‌ویژه با طبقه‌بندی زیرگروه‌های مولکولی، تحلیل هم‌زمان بافت و سرم و بررسی محورهای miRNA/پروتئینی برای تأیید کاربرد بالینی آن ضروری است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل تحقیقی با عنوان "بررسی ارزش تشخیصی RNA غیرکدکننده طولانی KCNQ1OT1 در تشخیص سرطان پستان" در مقطع پزشکی عمومی و با کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1402.132 می‌باشد. حمایت مالی این تحقیق

توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز فراهم شده و کد گرنت U-03002 می باشد.

References

- Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast cancer-epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers*. 2022;14(10):2569.
- Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(1):20-6.
- Kolak A, Kamińska M, Sygit K, Budny A, Surdyka D, Kukielka-Budny B, et al. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agric Environ Med*. 2017;24(4):549-53.
- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017;50(1):33.
- Haghighat S, Akbari ME, Ghaffari S, Yavari P. Standardized breast cancer mortality rate compared to the general female population of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(11):5525-8.
- Katsura C, Ogunmwoyoni I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2022;83(2):1-7.
- Sarhangi N, Hajjari S, Heydari SF, Ganjizadeh M, Rouhollah F, Hasanazad M. Breast cancer in the era of precision medicine. *Mol Biol Rep*. 2022;49(10):10023-37.
- Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020;27(1):27-35.
- Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, et al. Breast cancer: Biology ,biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 2020;84:106535.
- Zhang YN, Xia KR, Li CY, Wei BL, Zhang B. Review of Breast Cancer Pathological Image Processing. *Biomed Res Int*. 2021;2021:1994764.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
- El-Ashmawy NE, Hussien FZ, El-Feky OA, Hamouda SM, Al-Ashmawy GM .Serum LncRNA-ATB and FAM83H-AS1 as diagnostic/prognostic non-invasive biomarkers for breast cancer. *Life Sci*. 2020;259:118193.
- Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(5):363-85.
- A MB, R VS, J ME, A AO. Breast cancer biomarkers: risk assessment, diagnosis, prognosis, prediction of treatment efficacy and toxicity, and recurrence. *Curr Pharm Des*. 2014;20(30):4879-98.
- Li M, Zhao Y, Li H, Deng X, Sheng M. Application value of circulating LncRNA in diagnosis, treatment, and prognosis of breast cancer. *Funct Integr Genomics*. 2023;23(1):61.
- Feng W, Wang C, Liang C, Yang H, Chen D, Yu X, et al. The Dysregulated Expression of KCNQ1OT1 and Its Interaction with Downstream Factors miR-145/CCNE2 in Breast Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(2):432-46.
- Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *cell*. 2011;146(3):353-8.
- Luo ZB, Lai GE, Jiang T, Cao CL, Peng T, Liu FE. A competing endogenous RNA network reveals novel lncRNA, miRNA and mRNA biomarkers with diagnostic and prognostic value for early breast cancer. *Technology in cancer research & treatment*. 2020;19:1533033820983293.
- Zhan K, Pan H, Zhou Z, Tang W, Ye Z, Huang S, et al. Biological role of long non-coding RNA KCNQ1OT1 in cancer progression. *Biomed Pharmacother*. 2023;169:115876.
- Gaudet MV, Allain EP, Gallant LM, Arts HH, Ben Amor M. A 132 bp deletion affecting the KCNQ1OT1 gene associated with Silver-Russell syndrome clinical phenotype. *J Med Genet*. 2023;60(2):134-6.
- Cagle P, Qi Q, Niture S, Kumar D. KCNQ1OT1: An Oncogenic Long Noncoding RNA. *Biomolecules*. 2021;11.(11)
- Wu Y, Bi QJ, Han R, Zhang Y .Long noncoding RNA KCNQ1OT1 is correlated with human breast cancer cell development through inverse regulation of hsa-miR-107. *Biochem Cell Biol*. 2020;98(3):338-44.
- Basile V, Baruffaldi F, Dolfini D, Belluti S, Benatti P, Ricci L, et al. NF-YA splice variants have different roles on muscle differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(4):627-38.
- Sunamura N, Ohira T, Kataoka M, Inaoka D, Tanabe H, Nakayama Y, et al. Regulation of functional KCNQ1OT1 lncRNA by β -catenin. *Sci Rep*. 2016;6:20690.
- Al-Imam MJ, Hussein UA, Sead FF, Faqri AMA, Mekkey SM, Khazal AJ, et al. The interactions between DNA methylation machinery and long non-coding RNAs in tumor progression and drug resistance. *DNA Repair (Amst)*. 2023;128:103526.
- Li D, Tong Q, Lian Y ,Chen Z, Zhu Y, Huang W, et al. Inhibition of lncRNA KCNQ1OT1 Improves Apoptosis and Chemotherapy Drug Response in Small Cell Lung Cancer by TGF- β 1 Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Res Treat*. 2021;53(4):1042-56.
- Kang Y, Jia Y, Wang Q, Zhao Q, Song M, Ni R, et al. Long Noncoding RNA KCNQ1OT1 Promotes the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer via Regulating miR-204-5p/ATG3 Axis. *Onco Targets Ther*. 2019;12:10787-97.
- Liu J, Jiang M, Guan J, Wang Y, Yu W, Hu Y, et al. LncRNA KCNQ1OT1 enhances the radioresistance of lung squamous cell carcinoma by targeting the miR-491-5p/TPX2-RNF2 axis. *J Thorac Dis*. 2022;14(10):4081-95.
- Shohan M, Mahmoudian-Sani MR, Saeedi-Boroujeni A, Iranparast S, Nashibi R, Abolnezhadian F, et al. The Effects of Convalescent Plasma Transfusion on Serum Levels of Macrophage-Associated Inflammatory Biomarkers in Patients with Severe COVID-19. *J Interferon Cytokine Res*. 2024;44(7):316-24.
- Karimi B, Ghoreyshvandi A, Cheraghi M. Survival outcomes and contributing factors in oral squamous cell carcinoma patients in Khuzestan province, southwest of Iran. *Front Oncol*. 2024;14:1472190.
- Karimi E, Azari H, Tahmasebi A, Nikpoor AR, Negahi AA, Sanadgol N, et al. LncRNA-miRNA network analysis across the Th17 cell line reveals biomarker potency of lncRNA NEAT1 and KCNQ1OT1 in multiple sclerosis. *J Cell Mol Med*. 2022;26(8):2351-62.
- Tahermanesh K, Hakimpour S, Govahi A, Rokhgireh S, Mehdizadeh M, Minaeian S, et al. Evaluation of expression of biomarkers of PLAGL1 (ZAC1), microRNA, and their non-coding RNAs in patients with endometriosis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2023;52(4):102568.
- Cheng P, Lu P, Guan J, Zhou Y, Zou L, Yi X, et al. LncRNA KCNQ1OT1 controls cell proliferation, differentiation and apoptosis by sponging miR-326 to regulate c-Myc expression in acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2020;67(2):238-48.
- Sun H, Sun Y, Chen Q, Xu Z. LncRNA KCNQ1OT1 contributes to the progression and chemoresistance in acute myeloid leukemia by modulating Tspan3 through suppressing miR-193a-3p. *Life Sci*. 2020;241:117161.
- Ren Z, Xu Y, Wang X, Ren M. KCNQ1OT1 affects cell proliferation, invasion, and migration through a miR-34a / Notch3 axis in breast cancer. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(19):28480-94.

36. Pavanelli AC, Mangone FR, Barros LRC, Machado-Rugolo J, Capelozzi VL, Nagai MA. Abnormal Long Non-Coding RNAs Expression Patterns Have the Potential Ability for Predicting Survival and Treatment Response in Breast Cancer. *Genes (Basel)*. 2021;12(7).
37. Roda N, Cossa A, Hillje R, Tirelli A, Ruscitto F, Cheloni S, et al. A Rare Subset of Primary Tumor Cells with Concomitant Hyperactivation of Extracellular Matrix Remodeling and dsRNA-IFN1 Signaling Metastasizes in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2023;83(13):2155-70.
38. Shen B, Li Y, Ye Q, Qin Y. YY1-mediated long non-coding RNA *Kcnq1ot1* promotes the tumor progression by regulating PTEN via DNMT1 in triple negative breast cancer. *Cancer Gene Ther*. 2021;28(10-11):1099-112.
39. Fu J, Zhang L, Li D, Tian T, Wang X, Sun H, et al. DNA Methylation of Imprinted Genes *KCNQ1*, *KCNQ1OT1*, and *PHLDA2* in Peripheral Blood Is Associated with the Risk of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(11):2652.
40. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist*. 2018;23(5):556-65.
41. Rodriguez BA, Weng YI, Liu TM, Zuo T, Hsu PY, Lin CH, et al. Estrogen-mediated epigenetic repression of the imprinted gene cyclin-dependent kinase inhibitor 1C in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(6):812-21.
42. Zhou Z, Cao Y, Yang Y, Wang S, Chen F. METTL3-mediated m(6)A modification of lnc *KCNQ1OT1* promotes doxorubicin resistance in breast cancer by regulating miR-103a-3p/MDR1 axis. *Epigenetics*. 2023;18(1):2217033.

Diagnostic value of the long non-coding RNA KCNQ1OT1 in the detection of breast cancer

Mandana Pouladzadeh M.D.¹
 Fatemeh Khazaei M.D.²
 Saeid Bitaraf M.D., Ph.D.³
 Hossein Karimpourian M.D.⁴
 Mahsa Mombeyni M.Sc.⁴
 Mohammad-Reza Mahmoudian-Sani Ph.D.^{4*}

1- Department of Emergency Medicine, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2- Clinical Research Development Unit, Golestan Hospital, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3- Department of Community Medicine, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

4- Thalassemia and Hemoglobinopathy Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author: Thalassemia and Hemoglobinopathy Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Golestan Neighborhood, Shahrake Daneshgah St., Ahvaz, Iran.
 Tel: +98-61-33750410
 E-mail: mohamadsani495@gmail.com

Abstract

Received: 30 Apr. 2025 Revised: 10 May 2025 Accepted: 13 Jun. 2025 Available online: 22 Jun. 2025

Background: Breast cancer is the most prevalent malignancy among women and remains a leading cause of cancer-related mortality worldwide. Early detection can markedly improve patient survival, yet existing screening methods often lack sufficient accuracy and sensitivity. lncRNA KCNQ1OT1 has been implicated in the initiation and progression of tumors in several cancers, including breast cancer. This study aimed to evaluate the diagnostic potential of serum lncRNA KCNQ1OT1 expression as a biomarker for early detection of breast cancer.

Methods: This case-control study was conducted at Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Shafa Hospital, Ahvaz, Iran, between September 2024 and March 2025. Serum samples were obtained from 30 patients with histologically confirmed breast cancer and 30 healthy women serving as controls. Total RNA was extracted from 500 µL of serum, and cDNA was synthesized using oligo (dT) primers. Real-Time PCR was performed in triplicate, with GAPDH as the internal control. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and data were analyzed using the Mann-Whitney U test and ROC analysis.

Results: The patient and control groups were homogeneous for most demographic parameters, but showed significant differences in age ($P=0.023$) and ethnicity ($P=0.004$). Most patients were in stage I of the disease. The median expression of serum KCNQ1OT1 was significantly lower in patients (0.024, IQR 0.013-0.033) than in controls (0.039, IQR 0.027-0.051), indicating marked downregulation in the patient group ($P=0.0003$). The ROC analysis yielded an AUC of 0.82 (95% CI: 0.67-0.96, SE=0.07, $P=0.0005$). At an optimal cutoff value of >0.031 , the sensitivity was 70%, the specificity was 95%, and the positive likelihood ratio (LR^+) $\approx$ was approximately 14, demonstrating strong discriminative ability.

Conclusion: Serum KCNQ1OT1 exhibits promising diagnostic performance for identifying early-stage breast cancer and may serve as a reliable noninvasive biomarker. Larger multicenter studies incorporating molecular subtyping and tissue correlation are required to validate its clinical applicability and strengthen diagnostic accuracy.

Keywords: biomarker, breast cancer, KCNQ1 overlapping transcript 1, long non-coding RNA.