

Association between miR-152/148a polymorphisms and age of onset and progression of breast cancer in Isfahan population

Majid Motovali-Bashi*, Farzane Amirmahani, Zahra Ghatre Samani

Department of Biology, Division of Genetics, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran.

(Received:2016/06/5

Accept:2016/12/31)

Abstract

Background: Breast cancer is the most common cancer among women. Polymorphisms of micro RNA genes such as microRNA 152 and microRNA 148a, which are involved in cell proliferation, angiogenesis and apoptosis could be a potential factor for increasing risk of breast cancer and its development. Therefore, the aim of this study is to investigate the association between polymorphisms of these micro-RNAs and age of onset and progression of breast cancer.

Methods: This case-control study was conducted on 100 patients of breast cancer and 100 healthy women. The routine clinical tests were performed in studied patients regularly. After genotyping using RFLP-PCR and Tetra primer ARMS-PCR techniques, subjects of this study were categorized into three genotypes including AA, AG and GG for the miR-148a polymorphism and TT, TC and CC for the miR152 polymorphism. The collected data through the SISA website and chi-square tests were analyzed.

Results: The results show that the miR-148a and miR152 polymorphisms reduce the age of onset of cancer, but this is not statistically significant (miR152: OR=2.16, P=0.06), (miR-148a: OR=2.54, P=0.06). There is also no significant association between these polymorphisms and stages of cancer progression (miR148a: OR=1.16, P=0.09), (miR152: OR=0.47, P=0.13).

Conclusion: It seems that the G and T alleles can be as a risk factor for the reduction of age of onset and breast cancer progression in Isfahan population. However, to determine the alleles as biology risk factors further studies are needed.

Keywords: Breast cancer, microRNA148a, microRNA152, Polymorphism

* Corresponding authors: Majid Motovali-Bashi
E-mail: mbashi@sci.ui.ac.ir

ارتباط بین پلی مورفیسم های miR-152 و miR-148a با سن شروع و مراحل پیشرفت سرطان پستان در جمعیت اصفهان

مجید متولی باشی*، فرزانه امیر ماهانی، زهرا قطره سامانی

بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۳/۱۶

چکیده:

سابقه و هدف: سرطان پستان رایج ترین سرطان در بین زنان است. پلی مورفیسم ژن های کدکننده میکرو RNA های دخیل در تکثیر سلولی، رگرایی و آپوپتوز مانند *microRNA148a* و *microRNA152* عوامل بالقوه ای هستند که ممکن است در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان و پیشرفت آن موثر باشند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارتباط بین پلی مورفیسم های *miR-148a* و *miR-152* با سن شروع و مراحل پیشرفت سرطان پستان در جمعیت اصفهان است.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر از نوع مورد-شاهدی روی ۱۰۰ بیمار حامل سرطان پستان و ۱۰۰ زن سالم انجام شد. این بیماران پس از تعیین ژنوتیپ به وسیله تکنیک های *RFLP-PCR* و *Tetra primer ARMS-PCR*، برای پلی مورفیسم *miR-148a* به سه دسته *AA, AG, GG* و برای پلی مورفیسم *miR-152* به سه دسته *TT, CC, CT* تقسیم شدند. ارتباط ژنوتیپ هر گروه با سن شروع سرطان و درجه پیشرفت سرطان بررسی و سپس داده های به دست آمده از سوی پایگاه اینترنتی *SISA* و آزمون مربع کای تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: پلی مورفیسم های *miR-152* و *miR-148a* سبب کاهش سن شروع سرطان شده اما این ارتباط معنادار است ($miR-148a: OR=2.54, P=0.06; miR152: OR=2.16, P=0.06$). همچنین پلی مورفیسم $miR148a: OR=1.16, P=0.09$ با مراحل پیشرفت سرطان ارتباط دارد، ولی پلی مورفیسم $miR152: OR=0.47, P=0.13$ ارتباطی با پیشرفت سرطان ندارد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد آلل های *T* و *G* می توانند به عنوان یک فاکتور خطر برای کاهش سن شروع و پیشرفت سرطان پستان در جمعیت اصفهان در نظر گرفته شوند، ولی تعیین آلل ها به عنوان یک ریسک فاکتور بیولوژی به مطالعه های گسترده تر و تحقیق های بیشتری نیاز دارد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، پلی مورفیسم، *microRNA148a*، *microRNA152*

مقدمه:

و به سایر نقاط پستان پخش نمی شوند. خطر بروز این نوع سرطان در بین زنان پس از دوران یائسگی در حال افزایش است. نبود تجهیزات پرتونگاری ویژه برای تشخیص LCIS تعیین میزان واقعی بروز آن را با مشکل مواجه کرده است. (۲؛ ۳) کارسینوم مجرای درجا (DCIS): در این نوع از سرطان، سلول های اپیتلیال پوشاننده سطح مجاری شیری تغییر کرده و از حالت طبیعی خود خارج و ظاهری بدخیم پیدا می کنند، اما تنها در محدوده طبیعی خود گسترش یافته و غشای پایه را درگیر نمی کنند. حدود ۱۵ تا ۳۰ درصد سرطان های پستان از نوع DCIS هستند. این نوع از سرطان پستان در زنان ۴۹ تا ۶۹ سال بیشترین بروز را دارد (۳؛ ۴). کارسینوم مهاجم پستان نیز انواع مختلفی از ضایعات را شامل می شود. سرطان های تهاجمی پستان می توانند از مجاری یا غدد شیری منشأ بگیرند

سرطان پستان به تکثیر غیر طبیعی سلول های بافت پستان گفته می شود که به طور عمده در مجاری انتقال دهنده شیر و غدد سازنده شیر رخ می دهد. سرطان پستان شایع ترین بیماری بدخیم در زنان بوده و یک سوم از سرطان های مربوط به زنان را شامل می شود. این بیماری در صورت تشخیص در مراحل اولیه، درمان پذیر است. براساس تحقیق های انجام شده در ایران این سرطان از نظر شیوع سومین سرطان بوده و ۱۰ درصد کل سرطان ها را تشکیل می دهد (۱).

به طور کلی می توان سرطان پستان را به سه دسته تقسیم بندی کرد: (۱) کارسینوم لوبولار درجا (Lobular Carcinoma In situ (LCIS): در این نوع از سرطان، سلول های سازنده غدد شیری از حالت طبیعی خود خارج شده ولی محدود به منطقه خود هستند

نویسنده مسئول: مجید متولی باشی

پست الکترونیکی: mbashi@sci.ui.ac.ir

پرایمرها بابرنامه آنالین PRIMER1 طراحی و سپس توسط نرم افزار OLIGO7 از نظر دمای اتصال و تشکیل دایمر کنترل شدند. برای بررسی اختصاصیت و عدم اتصال آن به قسمت‌های دیگر ژنوم، از نرم‌افزار BLAST سایت NCBI استفاده شد و در نهایت از سوی شرکت سیناژن ایران ساخته شدند. توالی پرایمرها، دمای اتصال پرایمر و اندازه محصول PCR در جدول زیر آورده شده است.

برای تکثیر منطقه حاوی پلی مورفیسم با استفاده از تکنیک RFLP-PCR قطعه‌ای از DNA واجد ناحیه پلی مورفیسم با استفاده از پرایمرهای بالادست و پایین دست تکثیر شد. مواد و بافرهای واکنش PCR از شرکت سیناژن ایران تهیه شد. شرایط واکنشی این تکثیر شامل ۲۵۰ نانوگرم نمونه DNA ژنومی، ۲٫۵ میکرولیتر بافر X PCR ۱۰، ۰٫۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰٫۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، پرایمر بالادست ۱۰ پیکومولار، پرایمر پایین دست ۱۰ پیکومولار، Taq پلیمرز ۰٫۳ میکرولیتر و dH₂O تا رسیدن به ۲۵ میکرولیتر بود. پس از واکنش PCR، برای انجام هضم آنزیمی محصولات PCR، توسط آنزیم DdeI خریداری شده از شرکت فرمانتاز طبق پروتکل هضم آنزیمی موردهضم قرار گرفتند. سپس با الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز (خریداری شده از شرکت سیگما) ۳ درصد باندهای ۷۰ و ۱۰۰ جفت بازی برای آلل T و ۱۷۰ جفت بازی برای آلل C مشاهده شد. در تکنیک Tetra-primer ARMS PCR توسط ۴ پرایمر ژنوتیپ پلی مورفیسم مورد نظر تعیین شد. پرایمرهای IF و OR برای پلی‌مورفیسم miR 148a باعث تکثیر آلل A و ایجاد باندهای به طول ۴۷۵ جفت باز روی ژل آگارز می‌شود. همچنین آلل G توسط پرایمرهای OF و IR تکثیر می‌شود و باندهای به طول ۲۵۷ جفت باز ایجاد می‌کند. از این طریق افراد هتروزیگوت و هموزیگوت قابل شناسایی می‌شوند. پرایمرهای OF و OR به عنوان شاهد مثبت باندهای به طول ۷۳۲ جفت باز ایجاد می‌کنند. برای تکثیر و تعیین ژنوتیپ آلل‌های تکنیک Tetra-primer ARMS PCR از پرایمرهای طراحی شده استفاده شد. شرایط واکنشی این تکثیر شامل ۲۵۰ نانوگرم نمونه DNA ژنومی، ۲٫۵ میکرولیتر بافر X PCR ۱۰، ۱٫۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰٫۷۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، هر کدام از پرایمرها به میزان ۱۰ پیکومولار، Taq پلیمرز ۰٫۳ میکرولیتر و dH₂O تا رسیدن به ۲۵ میکرولیتر بود. تکثیر دمایی شرایط PCR در هر دو تکنیک شامل: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ سیکل: ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه جفت شدگی در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه‌های مختلف افراد بیمار و کنترل از آزمون مربع کای بهره گرفته شد. نسبت افزایشنده (OR) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان پلی مورفیسم‌ها و خطر ابتلا به سرطان پستان استفاده شد. در تمامی محاسبات سطح احتمال $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار فرض شد. بررسی تحلیل‌های آماری از طریق پایگاه داده SISA انجام شد.

یافته‌ها:

تحقیق روی ۲۰۰ نفر در دو گروه ۱۰۰ نفره انجام شد. سن متوسط افراد دو گروه ۴۸ سال و تعداد حاملگی خانم‌ها ی بررسی شده در دو گروه مشابه بود ($p < 0.05$) ژنوتیپ پلی مورفیسم‌های مطالعه شده در افرادگروه بیماران مبتلا به سرطان پستان به همراه افرادکنترل شناسایی شد (شکل ۱ و ۲) براساس نتایج به دست آمده از نرم افزار POWER MARKER نمونه‌ها و جمعیت مطالعه شده در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشت. در این مطالعه محدوده سنی بیماران بررسی شده ۲۸ تا ۸۰ سال با میانگین سنی ۴۸/۱۳ سال است. میانگین سن شروع یائسگی در زنان ایرانی ۵۱/۴ سال گزارش شده است (۹). بنابراین برای بررسی فراوانی وقوع بیماری در سنین مختلف این محدوده به دو رده سنی کمتر از ۵۰ سال و بیشتر یا مساوی ۵۰ سال تقسیم شد،

اما منشأ بیشتر آن‌ها از واحد لوبولار مجرای انتهایی Terminal duct lobular unit است. کارسینوماهای مجرای تهاجمی بیشترین نوع سرطان پستان را شامل می‌شود و ۷۰ تا ۸۰ درصد از موارد سرطان پستان را به خود اختصاص می‌دهد (نوری دلویی و طبرستانی ۲۰۱۰). پیشرفت و مراحل سرطان پستان را با شاخصی به نام TNM مشخص می‌کنند که در آن، T نشانگر اندازه تومور، Primary Tumour (Lymph Nodes) و M مشخصه وضعیت درگیری گره‌های لنفاوی (Distant Metastasis) است (۵). مطالعه‌های اخیر حاکی از وجود نقش‌های گسترده و اساسی برای microRNAها در تمایز، تکامل، متابولیسم و نقش آن‌ها در بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، دیابت، آلزایمر و ... است (۶). با توجه به اینکه microRNAها از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های بیان ژن بوده و از طرفی بیان آن‌ها در سرطان‌های انسانی از جمله سرطان پستان دستخوش تغییر می‌شود، می‌توان انتظار داشت که پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی آثار بالقوه‌ای بر پیشرفت سرطان داشته باشد (۷). هدف مطالعه حاضر تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم‌های microRNA148a و miRNA152 باسن شروع و پیشرفت سرطان پستان در جمعیت اصفهان است.

مواد و روش‌ها:

تحقیق به روش موردی -شاهدی انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۰۰ زن (۱۰۰ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد) بودند که هر دو گروه در یک محدوده سنی و از منطقه اصفهان با شرایط یکسان انتخاب شدند. نمونه‌های بیماران از بیمارستان امید اصفهان جمع‌آوری شد و نمونه‌های کنترل از افرادی انتخاب شدند که داوطلبانه و برای تست روزمره به آزمایشگاه مراجعه کرده بودند و سابقه فامیلی سرطان نداشتند. بر اساس پرونده بیماران و ملاقات شفاهی پرسش‌نامه و اطلاعات اولیه شامل سن، تعداد فرزندان، درجه سرطان، مرحله متاستاز و نوع گیرنده استروژنی تکمیل و جمع‌آوری شد. سن بیماران، تعداد حاملگی و سایر موارد در شرایط مشابهی بودند. مقدار ۳ ml خون در آزمایشگاه بیمارستان امید اصفهان از افراد مبتلا و کنترل گرفته و برای جلوگیری از انعقاد خون به لوله‌های حاوی EDTA انتقال یافت. برای استخراج DNA از خون تام، از روش نمکی میلر با مقداری دستکاری و تغییر استفاده شد (۸). سپس برای آنالیز پلی‌مورفیسم‌ها و مشخص شدن ژنوتیپ افراد برای ژن miRNA 148a و miRNA 152 به ترتیب از روش Tetra-primer ARMS PCR و RFLP-PCR استفاده شد.

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵' → ۳')	T _m	طول محصول PCR
	MIR148a		
Inner Forward (A allele)	GGAGTGTCTCAGAACTTTGCCTAAA	۶۰	۴۷۵
Outer Reverse	CAGGGTAAGATGAAGAGATTGGG	۶۰	
Outer Forward	CAGGGTAAGATGAAGAGATTGGG	۵۹	۲۵۷
Inner Reverse (G allele)	AGACAGCACGTTTGGTCGTC	۶۱	
	miR 152		
Forward	TCTGTCATGCACTGACTGCTC	۶۰	۱۷۰
Reverse	GGGCATGCTTCTGGAGTCTA	۵۹	

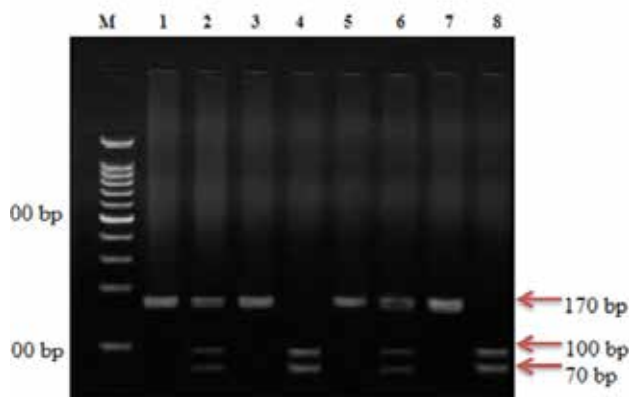
توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های miR 152 و miR148a

ارتباط سرطان پستان با سن شروع بیماری بررسی شد و هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم های مطالعه شده و سن شروع بیماری مشاهده نشد (نتایج در جدول ۱ آورده شده است).

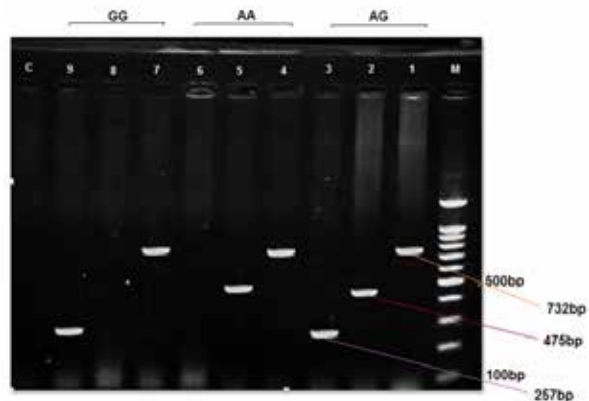
بر اساس آنالیزهای آماری ۵۸ درصد از بیماران بررسی شده برای miR-148a در مرحله I و II و ۴۲ درصد در مرحله III از سرطان پستان قرار داشتند و ۴ درصد از بیماران در مرحله متاستازی بودند. همچنین در بررسی ارتباط پلی مورفیسم miR152 ۳۳ درصد از بیماران در مرحله I و II و ۵۶/۵۲ درصد در مرحله III و IV از سرطان پستان بودند. تمامی بیماران به دو گروه اصلی، مرحله I و II مربوط به مراحل اولیه و مرحله III و IV مربوط به مراحل پیشرفته سرطان تقسیم شدند. بر اساس آنالیزهای آماری و نتایج جدول ۲ ارتباط معناداری بین ژنوتیپ های مطالعه شده و درجه پیشرفت بیماری مشاهده شد. به دلیل فراوانی پایین بیماران متاستازی ارتباط پلی مورفیسم با متاستاز بررسی نشد. از آنجا که در شهرهای بزرگ به دلیل وجود امکانات بهداشتی، سرطان پستان در مراحل اولیه تشخیص داده می شود در نتیجه در جمعیت بررسی شده تعداد بیماران متاستازی بسیار کم بود.

بحث:

نتایج این مطالعه نشان داد که آلل های G و T در بیماران زیر ۵۰ سال با بدخیمی سرطان پستان در ارتباط هستند (ORmiR-148a:2.54, ORmiR152:2.16). بنابراین وجود این آلل ها احتمال بدخیمی در سنین زیر ۵۰ سال را حدود دو برابر افزایش می دهد اما این ارتباط از نظر آماری معنادار نیست (miR148a: P=0.06; miR152: P=0.06). در مطالعه ای مشابه در سال ۲۰۰۸ بررسی های Shen و همکارانش نشان داد که افراد سرطانی که حداقل یک وارپانت از miR-146a را داشتند در سن پایین تری نسبت به افرادی که این آلل را نداشتند، دچار بیماری می شدند (۱۲). در مقابل مطالعه ای که به وسیله Cattucci و همکارانش روی ۱۸۱۴ خانواده ایتالیایی و آلمانی انجام شد، ارتباطی بین پلی مورفیسم T/C در pre-miRNA196a و سرطان پستان و همچنین سن شروع سرطان مشاهده نشد (۱۳) و این نشان می دهد که علاوه بر تنوعات ژنی، عوامل دیگری همچون سبک زندگی و شرایط محیطی می تواند در سن وقوع سرطان تأثیر داشته باشد که این فاکتورها در جمعیت های مختلف متفاوت هستند. طبق یافته های این مطالعه، بیماران سرطان پستان دارای آلل های G و T برای miR های مورد نظر احتمال بیشتری برای پیشرفت سرطان داشته اما این ارتباط معنادار نبوده و مقدار P بزرگ تر از ۵ درصد به دست آمد (miR148a:OR=1.16,P=0.09) و (miR152:OR=0.47,P=0.13). در مطالعه Chen و همکارانش در جمعیت چین، ژنوتیپ TT از پلی مورفیسم miR152 با پیشرفت سرطان معده و تهاجم لنفاوی ارتباط داشت (۱۴). دلیل هم خوانی نداشتن نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Chen و همکارانش می تواند به این دلیل باشد که سرطان پستان یک بیماری به شدت ناهمگن بوده و عواملی نظیر سن اولین حاملگی، تعداد فرزندان و مدت زمان شیردهی می تواند در این نتایج تأثیرگذار باشد. البته انجام این تحقیق با استفاده از یک نمونه بسیار بزرگ می تواند در تایید نتایج آماری مطالعه



شکل ۱: هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم IDde. محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۳ درصد با ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند. ردیف ۱ و ۳ و ۵ و ۷ فاقد برش و نشان دهنده ژنوتیپ CC، ردیف ۲ و ۶ شامل سه باند ۱۷۰، ۱۰۰ و ۷۰ جفت بازی و نشان دهنده ژنوتیپ CT و ردیف ۴ و ۸ شامل دو قطعه ۱۰۰ و ۷۰ جفت بازی و نشان دهنده ژنوتیپ TT است. M مارکر Gene Ruler 100bp DNA Plus است.



شکل ۲: ژل الکتروفورز ۱ درصد از تکنیک Tetra-primer ARMS PCR برای تعیین ژنوتیپ ۳ نمونه در لوله واکنش های مجزا. ژنوتیپ افراد بر اساس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز مشخص شد. M: مارکر DNA، ۱، ۲، ۳: فرد با ژنوتیپ هتروزایگوت AG، ۴، ۵ و ۶: فرد با ژنوتیپ هموزایگوت غالب AA، ۷، ۸: فرد با ژنوتیپ هموزایگوت مغلوب GG و چاهک C هم کنترل منفی است که فاقد DNA ژنومی است.

جدول ۱: ارتباط بین سن وقوع بیماری با پلی مورفیسم های miR152 و miR148a

P value	OR (CI95%)	OR	< ۵۰		> ۵۰		ژنوتیپ ها
			درصد	تعداد	درصد	تعداد	
a=۰,۴۵ b=۰,۰۶	a=۴۵,۸۹-۰,۱۶ b=۶,۹۹-۰,۰۹	a=۲,۷۶ b=۲,۵۴	۸۳,۶	۶۱	۷/۶۶	۱۸	AA
			۱۵	۱۱	۲۹,۶	۸	AG
			۱,۴	۱	۳,۷	۱	GG
c=۰,۳۸ d=۰,۰۶	c=۱۱,۳۲-۰,۳۸ d=۴,۹۵-۰,۹۴	c=۲,۰۸ d=۲,۱۶	۲۴,۲۱	۲۳	۲۰	۱۹	CC
			۱۷,۹	۱۷	۳۰,۵۳	۲۹	CT
			۲,۱	۲	۵,۲۶	۵	TT

a: ژنوتیپ GG در مقایسه با ژنوتیپ AA، b: ژنوتیپ AG+GG در مقایسه با ژنوتیپ c، c: ژنوتیپ AA، d: ژنوتیپ TT در مقایسه با ژنوتیپ d، CC+CT: ژنوتیپ CT+TT در مقایسه با ژنوتیپ CC

جدول ۲: ارتباط بین درجه پیشرفت بیماری با پلی مورفیسم‌های miR152 و miR148a

P value	OR (CI95%)	OR	بیماران در مرحله VI و III		بیماران در مرحله I و II		ژنوتیپ‌ها
			درصد	تعداد	درصد	تعداد	
a=۰/۸	a=۲۲,۸۷-۰,۰۸	a= ۱,۳۹	۷۸,۶	۳۳	۸۱,۰۴	۴۷	AA
b = ۰/۷	b=۳,۱۲-۰,۴۳	b=۱/۱۶	۱۹	۸	۱۷,۲۴	۱۰	AG
			۲,۴	۱	۱,۷۲	۱	GG
c=۰,۴	c=۳۱,۴۴-۰,۲۳	c=۲,۷۱	۲۱,۷۴	۱۵	۲۴,۶۴	۱۷	CC
			۳۳,۳۳	۲۳	۱۵,۹۴	۱۱	CT
d=۰,۱۳	d=۱,۲۵-۰,۱۸	d=۰,۴۷	۱,۴۵	۱	۲,۹	۲	TT

a: ژنوتیپ GG در مقایسه با ژنوتیپ b AA+AG، ژنوتیپ AG+GG در مقایسه با ژنوتیپ c AA، ژنوتیپ TT در مقایسه با ژنوتیپ d CC+CT، ژنوتیپ CT+TT در مقایسه با ژنوتیپ CC

انجام شده است. بنابراین از حمایت‌های مالی معاونت‌های تحصیلات تکمیلی و پژوهشی دانشگاه اصفهان و همچنین از بیمارستان امید اصفهان و سرکار خانم دکتر سیمین همتی برای در اختیار قرار دادن نمونه های خون و اطلاعات پزشکی صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

و استفاده از این پلی مورفیسم‌ها به عنوان یک تست تشخیصی در مشاوره ژنتیک و شناسایی افراد مستعد، سودمند باشد.

تقدیر و تشکر:

تمامی مراحل تحقیقاتی این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک دانشگاه اصفهان

منابع:

1. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991; 64(2): 235-248.
2. Tavassoli FA, Devillee P, (Eds). Pathology and genetics: tumors of the breast and female genital organs. World Health Organization classification of tumors: 2003; Published by IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, F-69008 Lyon, France.
3. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 2008; 8th Ed Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
4. Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy*. 1992 3rd Ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
5. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 15: 4-9.
6. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of physiology and biochemistry*, 2011; 67(1): 129-139.
7. Iuliano R, Vismara MM, Dattilo V, Trapasso, F, Baudi F, Perrotti N. The role of microRNAs in cancer susceptibility. *BioMed research international*. 2013.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for

- extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16: 1215.
9. Mohammad K, Hashemi SMS, Farahani FKA. Age at natural menopause in Iran. *Maturitas*. 2004; 49(4): 321-326.
10. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J*. 2007; 13(4): 383-91.
11. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in. *J Cell Mol Med*. 2005; 9(1): 208-21.
12. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*. 2008; 29(10): 1963-1966.
13. Catucci I, Yang R, Verderio P, Pizzamiglio S, Heesen L, Hemminki K, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR- 499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Human mutation*. 2010; 31(1): E1052-E1057.
14. Chen X, Wang G, Lu X, Gao P, Song Y, Sun J et al. Polymorphisms and haplotypes of the miR-148/152 family are associated with the risk and clinicopathological features of gastric cancer in a Northern Chinese population. *Mutagenesis*. 2014; 29(6): 401-407.