

## بررسی بیان miR-520d در سرطان پستان

### چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۵

**زمینه و هدف:** ریز RNAها ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتید دارند و بیان بعضی از آنها در بین بافت نرمال و توموری متفاوت است. در این مطالعه ما بیان miR-520d را در بین گروه‌های توموری سرطان پستان با نمونه نرمال کنار آن مورد بررسی قرار دادیم.

**روش بررسی:** ۵۹ نمونه تومور سرطان پستان در سه گروه مختلف قرار داده شدند. در گروه اول نمونه‌های دارای رسپتور استروژن مثبت و یا رسپتور پروژسترون مثبت قرار گرفتند. در گروه دوم نمونه‌های مثبت گیرنده شماره دو فاکتور رشد اپیدرمی انسان Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) قرار گرفتند و در گروه سوم نیز نمونه‌های توموری منفی هر سه گیرنده قرار داده شدند. سپس بررسی بیان با واکنش زنجیره پلی‌مراز با زمان واقعی (Real Time PCR) انجام شد.

**یافته‌ها:** نسبت بیان miR-520d در گروه I و II و III به ترتیب ۰/۱۹۳، ۰/۱۶۷ و ۰/۲۱ به دست آمد. اما تنها در گروه دوم این مقدار از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P=0/017$ ). از طرف دیگر نمونه‌هایی که متاستاز به غدد لنفاوی نشان می‌دادند و هم‌چنین نمونه‌هایی که سرطان آنها در Stage III بود، هر دو کاهش بیان معنی‌دار به ترتیب ۰/۲۵۶/ $P=0/019$  و ۰/۲۸۱/ $P=0/036$  را نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** miR-520d به احتمال یک سرکوبگر تومور است. از طرفی miR-520d در گروه HER2 مثبت کاهش بیان معنی‌دار را نشان داد، پس ممکن است بتوان از این ریز RNA در کنار فاکتورهای دیگر برای تشخیص زودتر نمونه‌های HER2 مثبت از سایر نمونه‌ها استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** سرطان پستان، miR-520d، Real Time PCR، SYBR Green I Dye.

شهرام سواد<sup>۱</sup>، پروین مهدیپور<sup>۲</sup>  
هدی شیردست<sup>۳</sup>، لادن نکوهش<sup>۴</sup>  
لیلی نکوهش<sup>۴</sup>، رضا شیرکوهی<sup>۵</sup>  
وحید نیکویی<sup>۶</sup>، محمد میریونسی<sup>۷</sup>  
محمد حسین مدرس<sup>۲\*</sup>

۱- گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، البرز، ایران. ۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. ۴- پزشک عمومی. ۵- گروه ژنتیک و ژنومیک، مرکز تحقیقات انستیتو کانسر، تهران، ایران. ۶- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۷- مرکز تحقیقات ژنومیک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی.

تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۵۳۰۰۵

E-mail: modaresi@tums.ac.ir

### مقدمه

۱۲-۸ خانم در جوامع مختلف متفاوت است.<sup>۱</sup> حدود ۳۰٪ از کل سرطان‌های تک ژنی پستان به علت جهش در ژن‌های سرطان پستان (Breast Cancer Genes (BRCA) است که در نهایت منجر به سرطان پستان با الگوی توارث غالب خواهد شد. البته به علت نفوذ ناکامل این ژن‌ها ممکن است با وجود داشتن الل معیوب، فرد به سرطان پستان مبتلا نشود.<sup>۲</sup> در گذشته بیش‌تر تمرکز پژوهش‌گران سرطان بر روی ژن‌های کد کننده پروتئین نظیر انکوژن‌ها، مهارکننده‌های تومور و هم‌چنین ژن‌هایی که محصول آنها در تعمیر ژنوم دخالت داشت،

موتاسیون‌های متعدد درون ژنوم سلول‌های بافت‌های سرطانی یافت می‌شوند، در نتیجه سرطان‌ها جزو بیماری‌های ژنتیکی محسوب می‌شوند. از طرف دیگر تنها در درصد کمی از خانواده‌ها سرطان از یک نسل به نسل دیگر به صورت جهش تک ژنی منتقل می‌شود، بیش‌تر سرطان‌ها تحت تاثیر محیط هستند.<sup>۱</sup> سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در خانم‌ها است. شیوع سرطان پستان حدود یک نفر مبتلا در

یا هر دو گیرنده آن‌ها در تومور مثبت بود.

گروه دوم: نمونه‌هایی که گیرنده فاکتور شماره دو رشد اپیدرمی انسانی مثبت داشتند.

گروه سوم: نمونه‌هایی که گیرنده استروژن، پروژسترون یا فاکتور شماره دو رشد اپیدرمی انسانی آن‌ها منفی بود.

بررسی ایمونوهیستوشیمی نمونه‌های سرطان پستان: نمونه‌ها همگی از جهت وضعیت گیرنده به وسیله پادتن‌های تجاری بررسی شدند. گیرنده‌های استروژن و پروژسترون به ترتیب با پادتن‌های ID5 و PGR-1A6 ارزیابی شدند (Dako, Denmark). گیرنده Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) نیز به وسیله پادتن GB11 مورد بررسی قرار گرفت (Dako, Denmark). در بررسی HER2، مواردی که در نمره‌بندی صفر یا یک را دریافت کردند، منفی در نظر گرفته شدند.<sup>۱۱</sup>

استخراج ریز RNA: برای استخراج RNAهای کوچک از کیت Mirvana PARIS (Qiagen, USA) استفاده شد. با این روش RNAهای کوچک با طولی کم‌تر از ۲۰۰ جفت باز (که در میان آن‌ها ریز RNAها نیز وجود دارند) استخراج شدند. سپس اندازه‌گیری غلظت RNAهای کوچک توسط دستگاه نانودراپ (Thermoscientific, USA) انجام و در  $80^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند.

سنتز cDNA از RNAهای کوچک: برای ساخت cDNA از کیت Miscript Reverse Transcription (QIAGEN, USA) استفاده شد. بر طبق پروتکل ابتدا پلی A به انتهای ۳' همه RNAهای کوچک استخراج شده توسط آنزیم پلی A پلیمراز اضافه شد. سپس نسخه‌برداری معکوس با پرایمر Oligo dT VN (Qiagen, USA) (که دارای یک ناحیه اختصاصی برای اتصال پرایمر معکوس به آن می‌باشد) انجام شد.

پلی‌مراز با زمان واقعی (RT-PCR) Real Time PCR (RT-PCR) با کمک دو پرایمر انجام شد. پرایمر مستقیم مشابه سکانس miR-520d است و پرایمر معکوس نیز مکمل ناحیه منحصر به فرد ۵' پرایمر Oligo dT VN است. در هر واکنش از ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر cDNA برای هر نمونه به صورت دوتایی (Duplicate) برای Real Time در دستگاه Rottor Gene Q (Qiagen, USA) استفاده شد. در ضمن برای نرمالیزه کردن بیان، از ژن خانه‌دار (House Keeping Gene) RNU6B استفاده شد. داده‌های نوری از دستگاه وارد نرم‌افزار LinReg PCR ویراست ۱۱ شد. سپس در این نرم‌افزار برای هر نمونه CP (سیکلی که در آن

معطوف بود.<sup>۴</sup> البته محصول ژن‌های کدکننده رسپتور سطح سلولی به جهت تعیین وضعیت پاسخ به درمان در سرطان پستان اهمیت زیادی دارد. تومورهای HER2 (گیرنده شماره دو فاکتور رشد اپیدرمی انسان) مثبت به درمان با هرپستین و تومورهای ER (گیرنده استروژن) و PR (گیرنده پروژسترون) مثبت به درمان‌های هورمونی خوب جواب می‌دهند.<sup>۵</sup> در دو دهه اخیر به نقش تنظیم‌کنندگی ژن‌های غیر کدکننده RNAهای کوچک توجه ویژه‌ای شده است.<sup>۶</sup> ریز RNAها از روی توالی ژن‌های خود که معمولاً درون ایترون ژن‌های دیگر قرار دارند با کمک RNA پلی‌مراز شماره دو رونویسی می‌شوند. پس از پردازش، ریز RNA بالغ با توالی حدود ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتید ایجاد می‌شود. ریز RNAها نقش تنظیمی خود را به صورت مهار در سطح ترجمه به دو روش می‌توانند ایفا کنند. اگر این ریز RNAها به‌طور کامل با توالی RNA هدف مکمل نباشد با اتصال به آن منجر به مهار ترجمه می‌شوند، در صورتی که اگر کاملاً مکمل توالی هدف باشند آن را خواهند شکست.<sup>۸</sup> در حال حاضر مشخص شده است که پروفایل بیان ریز RNAها در بین بافت طبیعی و توموری متفاوت است و با بعضی از آن‌ها می‌توان بافت توموری را از بافت نرمال تمیز داد.<sup>۱۰</sup> با بررسی بیان دو ریز RNA (miR-342 و miR-205) می‌توان تومورهای پستان نوع Triple negative را از دیگر انواع تشخیص داد.<sup>۱۱</sup> هدف ما در این مطالعه بررسی بیان miR-520d در گروه‌های مختلف سرطان پستان به منظور یافتن بیومارکر احتمالی جهت تعیین وضعیت رسپتوری تومور پستان بود.

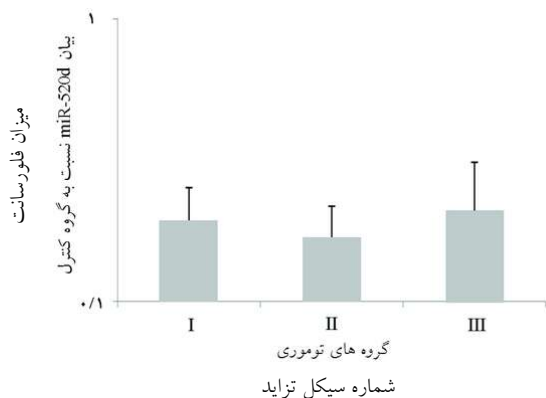
## روش بررسی

بر اساس یک مطالعه مورد-شاهدی، تعداد ۵۹ نمونه تومور پستان و ۵۹ نمونه بافت سالم کنار تومور از بین مراجعه‌کنندگان به انستیتو کانسر دانشگاه علوم پزشکی تهران بین سال‌های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۰ دریافت شد. نمونه‌های انتخاب‌شده هیچ‌کدام پیش‌تر جراحی، شیمی درمانی یا رادیوتراپی انجام نداده بودند. قبل از شروع کار از تمامی بیماران رضایت‌نامه کتبی دریافت شد، در ضمن این مطالعه توسط کمیته اخلاقی انستیتو کانسر مورد تأیید قرار گرفت.

نمونه‌ها در سه گروه زیر قرار داده شدند:

گروه اول: نمونه‌هایی که گیرنده استروژن یا گیرنده پروژسترون

در تومور نسبت به بافت سالم بیان پایین تری دارد (شکل ۲). بررسی بیان miR-520d در هر سه گروه نمونه مورد بررسی کاهش بیان را نشان داد، به طوری که نسبت بیان در نمونه توموری در مقایسه با بافت طبیعی در گروه اول ۰/۱۹۳، در گروه دوم ۰/۱۶۷ و در گروه سوم ۰/۲۱ به دست آمد. البته تنها در گروه دوم (گروه HER2 مثبت) این کاهش بیان به صورت معنی دار ( $P=0/017$ ) بود (نمودار ۱)، اما بررسی بیان miR-520d در سایر وضعیت‌های کلینیکی و پاتولوژیکی نیز مورد بررسی قرار گرفت. تمام تومورها از نظر اندازه به دو دسته تقسیم شدند، گروه تومورهای کوچک‌تر از دو سانتی‌متر و گروه مساوی دو سانتی‌متر یا بزرگ‌تر. هر دو گروه کاهش بیان را نشان دادند به طوری که این نسبت در تومورهای کوچک‌تر از دو سانتی‌متر معادل ۰/۸۴۳ و در تومورهای بزرگ‌تر از دو سانتی‌متر معادل ۰/۲۳۸ به دست آمد. البته هیچ‌کدام از نظر آماری معنی دار نبودند ( $P>0/05$ ). علاوه بر اندازه تومور، تمام نمونه‌ها از نظر متاستاز به غدد لنفاوی در دو گروه مجزا قرار گرفتند: ۱- بیش از دو غده ۲- کم‌تر از دو غده یا بدون متاستاز که نسبت بیان در تومور به نرمال کنار آن به ترتیب ۰/۲۵۶ و هم‌چنین ۰/۷۶۱ به دست آمد که البته تنها مورد اول معنی دار بود. با در نظر گرفتن مرحله بالینی تومور، نمونه‌هایی که در Stage III قرار داشتند، با نسبت بیان ۰/۲۸۱ کاهش بیان را به صورت معنی دار نشان دادند ( $P=0/036$ )، در صورتی که تومورهایی که در مرحله بالینی یک یا دو قرار گرفتند با وجود کاهش بیان، اما کاهش بیان معنی داری را نشان ندادند (جدول ۱).



نمودار ۱: نسبت بیان miR-520d در گروه‌های توموری I, II, III به گروه کنترل. \* تفاوت معنی دار با گروه کنترل ( $P\leq 0/05$ ).

منحنی تریاید خط آستانه را قطع می‌کند) و هم‌چنین Mean PCR efficiency مشخص شد.<sup>۱۳</sup> در نهایت براساس فرمول زیر نسبت بیان (Expression ratio) برای miR-520d در نمونه توموری نسبت به نمونه نرمال کنار تومور با نرم‌افزار REST-2009 تعیین شد.<sup>۱۴</sup> در ضمن نوع تست آماری در این نرم‌افزار Pair wise fixed reallocation randomization test می‌باشد.

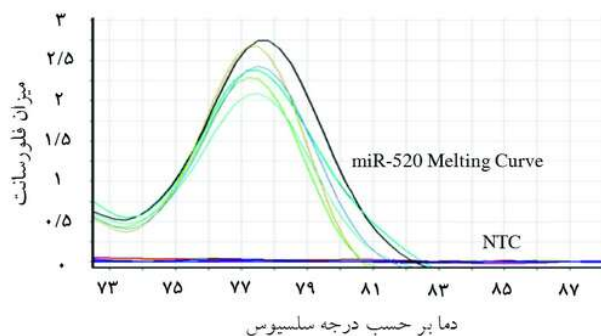
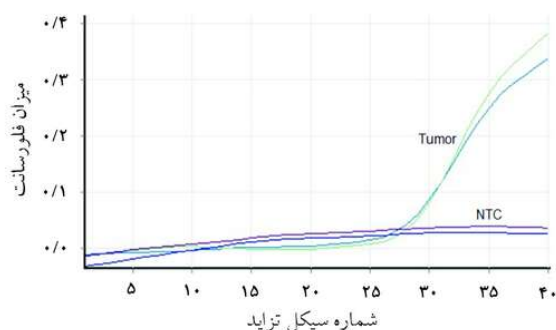
## یافته‌ها

بررسی بیان miR-520d به روش RT-PCR با استفاده از رنگ SYBR Green I انجام شد. منحنی ذوب miR-520d و RNU6B به صورت تک قله به دست آمد که این خود بیان‌گر تنها یک محصول خاص در PCR است (شکل ۱). در ضمن محصول PCR نیز بر روی ژل قرار گرفت و مشاهده شد که در هر کدام از واکنش‌های انجام شده با پرایمرهای miR-520d و RNU6B تنها یک باند اختصاصی وجود دارد که این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه‌های ما را تأیید کرد. miR-520d در نمونه توموری Crossing Point (CP) بالاتری نسبت به نمونه سالم کنار آن دارد، (در مقایسه با CP کنترل داخلی در نمونه توموری نسبت به نمونه سالم کنار آن) نتیجه این که miR-520d

جدول ۱: نسبت بیان miR-520d در گروه‌بندی با توجه به شاخص‌های کلینیکی و پاتولوژیک تومور.

P*	نسبت بیان MiR-520d	تعداد نمونه‌ها (درصد نمونه‌ها)	ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی
			اندازه تومور (بر حسب سانتی‌متر)
۰/۵۳۱	۰/۸۴۳	۲۵(۴۲/۲)	کوچک‌تر از دو
۰/۰۷۲	۰/۲۳۸	۳۴(۵۷/۶)	مساوی یا بزرگ‌تر از دو
			متاستاز به غدد لنفاوی
۰/۶۲۸	۰/۷۶۱	۳۸(۶۴/۴)	کم‌تر از دو یا بدون متاستاز
۰/۰۱۹	۰/۲۵۶	۲۱(۵۳/۶)	دو یا بیش‌تر
			مرحله بالینی سرطان
۰/۱۵۳	۰/۶۶۲	۴۶(۷۸)	I, II
۰/۰۳۶	۰/۲۸۱	۱۳(۲۲)	III

\* آزمون آماری: Pair wise fixed reallocation randomization test.  $P\leq 0/05$  معنی دار.



شکل ۲: منحنی تزیاید miR-520d در تومور HER2 مثبت (منحنی بالا). محور افقی شماره سیکل تزیاید و محور عمودی میزان فلورسانس می‌باشد. در پایین، منحنی Non Template Control (NTC) دیده می‌شود که نمونه کنترلی است که فاقد DNA می‌باشد.

شکل ۱: منحنی ذوب miR-520d در تومور. محور افقی دما بر حسب °C و محور عمودی میزان فلورسانس است. در پایین، منحنی Non Template Control (NTC) دیده می‌شود که نمونه کنترلی است که فاقد DNA می‌باشد.

پاتولوژیکی نشان داد،<sup>۱۱</sup> به طوری که بیان این دو ریز RNA ارتباط معنی داری با وضعیت اندازه تومور را نشان نداده بودند، ولی هر دو ارتباط معنی داری با وضعیت متاستاز به غدد لنفاوی و هم‌چنین نمونه‌هایی که Stage III داشتند را نشان دادند.

همان‌طور که در مطالعه قبلی ذکر شد، پایین بودن بیان هر دو miR-250 و miR-342 به عنوان بیومارکر احتمالی در تشخیص زودرس وضعیت رسیپتوری نمونه سرطانی، به صورت Triple negative مطرح شد.<sup>۱۱</sup> کاهش بیان miR-520d نیز به صورت یک مارکر احتمالی برای تشخیص وضعیت HER2 در نمونه سرطان پستان می‌تواند مطرح شود. اما از آنجایی که این ریز RNA در هر سه گروه بیان کاهش یافته دارد پس نمی‌تواند به تنهایی تشخیص وضعیت رسیپتوری سرطان پستان را مشخص کند، لذا انجام مطالعات دیگر به منظور یافتن یک پانل بیانی miRNA (در کنار miR-205, miR-342, miR-520d) می‌تواند در نهایت به تشخیص زودرس وضعیت رسیپتور یک نمونه سرطان پستان کمک کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی چهار miRNA (miR-205, miR-342, miR-520d, miR-21) با ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌های بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان" در مقطع دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی در سال ۱۳۹۱ و کد ۳۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است.

## بحث

در سال‌های اخیر پژوهش‌گران بسیار تمایل به بررسی پروفایل ریز RNAها در بافت‌ها توموری داشته‌اند.<sup>۱۵</sup> هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان miR-520d در نمونه‌های توموری و نرمال پستان است و البته هدف نهایی امکان استفاده از آن به عنوان یک بیومارکر جهت تعیین وضعیت رسیپتوری تومور پستان بود.

یک روش مناسب برای بررسی بیان استفاده از روش Taqman RT-PCR است.<sup>۱۶</sup> در این مطالعه به جای روش Taqman، از رنگ‌های متصل شونده به cDNA دو رشته‌ای (SYBR Green I) استفاده شد. روش اخیر، به نسبت روش استفاده از پروب Taqman ارزان‌تر است ولی به علت اتصال به هر DNA دو رشته‌ای ممکن است اختصاصی نباشد. در این مطالعه وجود یک منحنی تک قله در آنالیز ذوب اختصاصی بودن محصول را نشان داد که ناشی از اختصاصی بودن پرایمرها و PCR مربوطه می‌باشد، لذا در این مطالعه نشان داده شد که می‌توان روش استفاده از SYBR Green I را جایگزین روش گران-قیمت Taqman و استفاده از پروب برای بررسی بیان MiRNA کرد.

بررسی ما در هر سه گروه، بیان کاهش یافته را نشان می‌دهد، یعنی می‌توان این MiRNA را به احتمال یک نوع سرکوب‌گر تومور به حساب آورد. وضعیت کاهش بیان miR-520d وضعیتی مشابه با افزایش بیان miR-21 را در گروه‌های مختلف از نظر کلینیکی و

## References

1. Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, et al. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep* 2009;21(3):673-9.
2. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16(3):481-8.
3. Xu J, Wang B, Zhang Y, Li R, Wang Y, Zhang S. Clinical implications for BRCA gene mutation in breast cancer. *Mol Biol Rep* 2012;39(3):3097-102.
4. Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002;84(1):27-47.
5. Gelbfish GA, Davidson AL, Kopel S, Schreiberman B, Gelbfish JS, Degenshein GA, et al. Relationship of estrogen and progesterone receptors to prognosis in breast cancer. *Ann Surg* 1988;207(1):75-9.
6. Arteaga CL. Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003;5(2):96-100.
7. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006;5:24.
8. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 2003;113(6):673-6.
9. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120(1):15-20.
10. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65(14):6029-33.
11. Savad S, Mehdipour P, Miryounesi M, Shirkoobi R, Fereidooni F, Mansouri F, et al. Expression analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in breast cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(3):873-7.
12. Rhodes A, Jasani B, Anderson E, Dodson AR, Balaton AJ. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol* 2002;118(3):408-17.
13. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009;37(6):e45.
14. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(9):e36.
15. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11(3):R27.
16. Lao K, Xu NL, Sun YA, Livak KJ, Straus NA. Real time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *Biotechnol J* 2007;2(1):33-5.

## MiR-520d expression analysis in breast cancer

### Abstract

Received: December 03, 2012 Accepted: February 13, 2013

Shahram Savad M.D., Ph.D.<sup>1</sup>  
 Parvin Mehdipor Ph.D.<sup>2</sup>  
 Hoda Shirdast<sup>3</sup>  
 Ladan Nekoohesh M.D.<sup>4</sup>  
 Leili Nekoohesh M.D.<sup>4</sup>  
 Reza Shirkoohi M.D., Ph.D.<sup>5</sup>  
 Vahid Nikoui Ph.D. Candidate<sup>6</sup>  
 Mohammad Miryounesi M.D.,  
 Ph.D.<sup>7</sup>  
 Mohammad Hossein Modaresi  
 M.D., Ph.D.<sup>2\*</sup>

1- Medical Geneticist, Alborz  
 University of Medical Sciences,  
 Alborz, Iran.

2- Department of Medical Genetics,  
 Tehran University of Medical  
 Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Medical  
 Microbiology, Qazvin University of  
 Medical Sciences, Qazvin, Iran.

4- General Practitioner.

5- Department of Genetics and  
 Genomics, Cancer Research  
 Center, Tehran, Iran.

6- Department of Pharmacology,  
 Tehran University of Medical  
 Sciences, Tehran, Iran.

7- Genomic Research Center,  
 Shahid Beheshti University of  
 Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author: Department of  
 Medical Genetics, School of Medicine,  
 Tehran University of Medical Sciences,  
 Pour Sina St., Qods St., Keshavarz Blvd.,  
 Tehran, Iran.  
 Tel: +98- 21- 88953005  
 E-mail: modaresi@tums.ac.ir

**Background:** Breast cancer is the most common cancer in women. Non-coding RNAs especially miRNAs have important regulatory roles in cancer. MiRNAs are 21-24 nucleotides which have different levels of expression between tumors and normal tissues. In this study, we have analyzed expression level of miR-520d in three different groups of breast cancer.

**Methods:** Fifty nine samples were divided into different groups according to their immunohistochemistry (IHC) classification: estrogen receptor (ER) positive and/or progesterone receptor (PR) positive group (as group I); human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive group (as group II); and Triple negative group (as group III). After small RNA extraction from tissues, cDNAs were synthesized and Real time RT-PCR carried out using DNA binding dye. Expression levels were analyzed by LinRegPCR and REST software.

**Results:** MiR-520d under- expressed in all of three different groups. The expression ratio in groups I, II, and III were 0.193, 0.167, 0.21, respectively, but only the result from group II was significant (P=0.017). According to the different clinicopathological status of breast cancer, miR-520d underexpressed significantly not only in patients with metastatic lymph node (P=0.019) but also in patients which have cancer at stage III (P=0.036).

**Conclusion:** In this study, we found that miR-520d possibly acts as a tumor suppressor. It may be useful for diagnosis of tumor from normal tissue. In addition, miR-520d significantly underexpressed in HER-2 positive group of breast cancers. Therefore, it may be useful as an additional diagnostic test in this group of breast tumors along with other biomarkers.

**Keywords:** Breast cancer, miR-520d, real time RT-PCR, SYBR green I Dye.