

مقاله پژوهشی

بررسی سطح بیان ژن VE-cadherin در سرم زنان ایرانی مبتلابه سرطان سینه

نرجس اصغری^۱، وجیهه زرین پور^{۱*}، عبدالرضا دارائی^۲، زهرا حاج ابراهیمی^۳، داریوش مسلمی^۴

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۲- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳- پژوهشکده تحقیقات هوافضا، وزارت تحقیقات و فناوری علوم، تهران، ایران

۴- گروه رادیولوژی انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۰۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان زنان در جهان هم در کشورهای توسعه‌یافته و هم در کشورهای درحال توسعه است. مولکول VE-cadherin، مولکول اندوتلیالی مخصوص اتصال است که در محل‌های اتصال سلول‌های اندوتلیال قرار دارد و ارتباط آن با سرطان‌های مختلف اثبات شده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان بیان ژن VE-cadherin در سرم بیماران ایرانی مبتلابه سرطان سینه به منظور شناسایی بیومارکری در پیش‌آگاهی آن بود.

مواد و روش‌ها: بعد از جداسازی سرم از ۴۰ زن مبتلا به سرطان سینه و ۴۰ زن سالم، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. بیان ژن با تکنیک Real-time PCR اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بیان ژن VE-cadherin در نمونه‌های بیمار در مقایسه با کنترل در سطح معنی‌داری افزایش یافته است؛ اما ارتباطی بین میزان بیان و درجه تومور به دست نیامد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، بررسی بیان این فاکتور می‌تواند به‌عنوان مارکری جهت بررسی و فالوآپ بیماران مبتلابه سرطان سینه باشد. همچنین با توجه به نقش این فاکتور در رگ زایی و متاستاز تومورها، می‌توان از آن به‌عنوان هدفی برای مداخله‌ی درمانی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سرطان سینه، بررسی بیان ژن، ژن VE-cadherin، بیومارکر سرمی

مقدمه

سینه در طول چندین دهه‌ی اخیر به‌طور قابل‌توجهی تغییر کرده است و علاوه بر جراحی و پرتودرمانی، درمان‌های کمکی (هورمون درمانی- شیمی‌درمانی) و تخریب تخمدان‌ها از جمله راه‌های درمانی دیگر در سرطان سینه است (۹). از آنجاکه سیر بالینی سرطان اولیه سینه در هر بیمار، متفاوت از سایر مبتلایان است، تعیین سرنوشت نهایی هر بیمار مشخص نیست، لذا شناخت عواملی که بتوانند سرنوشت نهایی بیماران را پیش‌بینی کنند، در تصمیم‌گیری بالینی و انتخاب درمان، مفید است (۲). از مارکرهای بیولوژیک در تعیین پیش‌آگهی و پیش‌بینی این بیماری می‌توان به پروتئین VE-Cadherin اشاره کرد. مولکول VE-cadherin یک پروتئین غشایی است که در لایه اندوتلیوم رگ‌ها بیان می‌شود و اصلی‌ترین مولکول درگیر در اتصالات

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان ایرانی و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان است که از تکثیر بدخیم و بی‌رویه سلول‌های اپیتلیال پوشاننده مجاری یا لوبول‌های موجود در سینه به وجود می‌آید (۱، ۲). این بیماری به‌شدت ناهمگن بوده و در اثر تأثیر متقابل عامل‌های خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیش‌رونده تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سلول‌های سینه منجر می‌شود (۲-۸). چشم‌انداز درمان سرطان

*نویسنده مسئول: وجیهه زرین پور، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
Email: Zarrinpour_v@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-5257-9443>

*نویسنده مسئول دوم: عبدالرضا دارائی، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
Email: a.daraei@mubabol.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0002-2106-835X>

ایرانی مبتلا به سرطان سینه با توجه به درجه^۱ و مرحله^۲ بیماری به منظور شناسایی بیومارکری در پیش‌آگاهی این سرطان است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

مطالعه حاضر از نوع موردی-شاهدی و نمونه‌گیری در آن به صورت تصادفی ساده انجام پذیرفت. جمعیت تحت مطالعه شامل ۴۰ زن مبتلا به سرطان سینه و ۴۰ زن سالم بود. بررسی‌های مولکولی این تحقیق در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان از تاریخ ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ به انجام رسید. نمونه‌های بالینی شامل میزان ۵ سی‌سی خون اخذ شده از ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه مراجعه‌کننده به مرکز شیمی‌درمانی بیمارستان شهید رجایی بابلسر و همچنین ۴۰ فرد سالم از نظر بالینی به عنوان کنترل بود که با رضایت افراد اهداکننده به دست آمد. از ویژگی‌های افراد بیمار، عدم دریافت هیچ‌گونه درمان مانند شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی بود. اطلاعات مربوط به بیماران شامل سن و درجه و مرحله از داخل پرونده آن‌ها استخراج و در فرم‌های اطلاعاتی مربوطه درج گردید. در مورد افراد کنترل سالم معیارهای خروج شامل عدم ابتلا به سرطان سینه و دیگر سرطان‌ها و همچنین هرگونه بیماری زمینه‌ای بود که بعد از انتخاب آن‌ها، اطلاعات دموگرافیک نیز جمع‌آوری گردید. پس از گرفتن خون، نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در محیط آزمایشگاه در دمای محیط قرار داده شد تا لخته تشکیل شود. سپس نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند تا سرم جدا گردد. سرم جدا شده تا زمان آنالیزهای بعدی در فریزر -۷۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

آنالیز بیان ژن توسط تکنیک Real-time PCR^۳

برای بررسی بیان ژن موردنظر با استفاده از تکنیک Real-time PCR، ابتدا RNA تام از سرم با استفاده از کیت استخراج RNA (Cinna Pure-RNA Purification Kit, Cat No: PR891620 و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. برای از بین بردن DNA ژنومی، RNA استخراج شده با استفاده از آنزیم DNase I موجود در کیت RNase-Free DNase (Cat #79254) Quiagen تیمار گردید. پس از اطمینان از

چسبندگی محسوب می‌شود. این مولکول مسئول اتصالات هموفیلیک با واسطه کلسیم است و در عملکرد لایه اندوتلیوم به عنوان یک سد دفاعی عمل کرده و نیز در فرایند رگ زایی و مسیرهای سیگنالی نقش دارد. کاهش و یا از دست رفتن بیان آن از طریق مکانیسم‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی باعث ایجاد فنوتیپ تهاجمی در سرطان می‌شود. ژن CDH5 کدکننده پروتئین VE-Cadherin است که در ناحیه ۱۶q۲۲.۱ قرار دارد. این ناحیه در کروموزوم ۱۶ اغلب همراه با حذف‌های هتروزیگوزیتی در سرطان سینه در انسان است. در نتیجه تغییراتی که در ژن CDH5 رخ می‌دهد، می‌تواند منجر به کاهش بیان VE-Cadherin و به دنبال آن کاهش یکپارچگی بافت و نهایتاً پیشرفت تومور شود. مطالعات نشان داده است که در سرطان سینه از دست رفتن بیان VE-Cadherin با از دست رفتن تمایز، افزایش درجه‌ی تومور، متاستاز و از دست رفتن ریسپتورهای استروژن (ER) و پروژسترون (PR) همراه است (۱۰ و ۱۱). پروتئین VE-Cadherin در سطح جانبی سلول‌های اپیتلیال در ناحیه‌ای که تماس دو سلول برقرار می‌شود به نام Cadherens Junction قرار دارد و ایجاد دیم‌های جانبی می‌کند. این فرآیند دیم‌ریزاسیون برای چسبندگی هموفیلیک لازم است. این مولکول مهاجرت ترانس اندوتلیالی را به طور منفی تنظیم می‌کند (۱۲). در بسیاری از تومورهای اپیتلیال، شامل آدنوکارسینوم‌های کولون و سینه، کاهش بیان VE-Cadherin وجود دارد. احتمالاً این کاهش بیان باعث نقص در توانایی سلول‌ها در اتصال به یکدیگر می‌گردد و جدا شدن از تومور اولیه و اتصال به اجزاء بستر و پیشروی به بافت‌های اطراف را تسهیل می‌کند (۱۳-۱۷). سلول‌های تومور جهت انجام متاستاز می‌بایست از یکدیگر جدا گشته و اجزای غشای پایه و ماتریکس بین سلولی را تجزیه کنند تا بتوانند از غشای پایه بافت پوششی، ماتریکس بین سلولی و غشای پایه عروق عبور نمایند و وارد گردش خون شوند. افزایش تعداد سلول‌های اندوتلیال در حال گردش و نیز سلول‌های پیش ساز اندوتلیال در مدل‌های سرطان مانند سرطان سینه و لنفوم به دنبال کاهش بیان آن گزارش شده است (۲۵-۱۸). با توجه به مطالب گفته شده، هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان بیان VE-cadherin در سرم خون بیماران

^۳ Gene Expression Analysis By Real-Time Polymerase Chain Reaction

^۱ Grade
^۲ Stage

استفاده شد. قابل ذکر است که قبل از تعیین میزان سطح بیان ژن‌های هدف و کنترل، کارایی پرایمرهای اختصاصی آن‌ها سنجیده شد که برابر با ۱۰۰ درصد یا نزدیک به آن بود. بیان نسبی با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 (Version 2.0.13) اندازه‌گیری شد. پرایمرهای اختصاصی با نرم‌افزار OLIGO7 طراحی شد.

آنالیز آماری

آنالیز اطلاعات به‌دست‌آمده، توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY و همچنین آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney به‌وسیله نرم‌افزار SPSS version 15 انجام گرفت. سطح معنی‌دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه میانگین سنی جمعیت بیماران مورد مطالعه ۴۶/۵ سال بوده و دامنه‌ای از ۲۸ تا ۶۵ سال را تشکیل دادند. همچنین توزیع فراوانی سن بیماران نشان داد که بیشترین افراد (۴۰٪) مربوط به رده سنی ۴۵-۵۵ سال بودند (جدول ۲). بررسی فراوانی تومور از نظر درجه مشخص کرد که ۲۷٪ از

کیفیت RNA استخراج‌شده، واکنش رونویسی معکوس با استفاده از یک میکروگرم از RNA تام برای سنتز cDNA و با استفاده از کیت (Takara, Reagent Prime Script TM RT reagent (Cat No :K1622) Japan, در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر و مطابق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. جهت تکثیر ژن‌های VE-cadherin و ژن کنترل داخلی، واکنش Real time PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر از محصول cDNA، پرایمرهای مخصوص هر ژن (جدول ۱)، کیت SYBR Green qPCR SYBR PremixEx TaqII (TliRNase H Plus) Master Mix (Takara StepOnePlus Real-Time PCR دستگاه و دستگاه (Bio Inc., Japan (Applied Biosystems, USA) انجام شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در ادامه ۴۰ سیکل به‌صورت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای دناتوراسیون و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس برای گسترش هم‌زمان بود. برای اطمینان از اختصاصی بودن محصولات، منحنی ذوب برای ژن‌ها بعد از انجام واکنش Real time PCR رسم گردید. میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین $\Delta\Delta CT$ و استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی

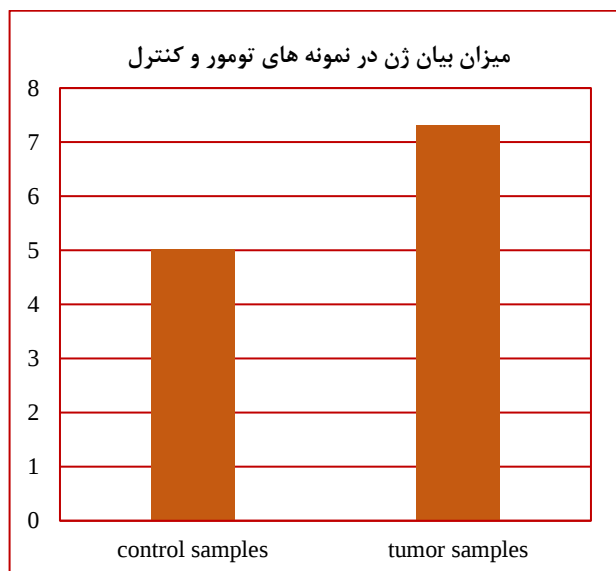
جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR مربوط به ژن هدف و کنترل

نام ژن	شماره Ref seq	توالی پرایمرها	طول محصول PCR (bp)
GAPDH	NM_002046.7	Forward: 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' Reverse: 5'-TCATTGATGGCAACAATATCCACT-3'	100
VE-cadherin	NM_001795.5	Forward: 5'- TTCCAGCAGCCTTCTACCAC-3' Reverse: 5'-TTGTGACTCGGAAGAACTGGC-3'	154

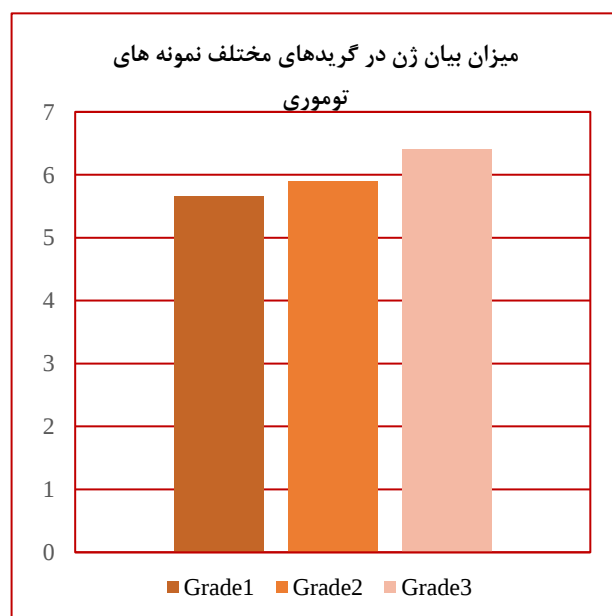
جدول ۲- توزیع فراوانی سن بیماران در مطالعه حاضر

متغیر (سن)	تعداد (فراوانی)	درصد
سن ۲۵-۳۵	۵	۱۲٪
سن ۳۵-۴۵	۱۱	۲۸٪
سن ۴۵-۵۵	۱۶	۴۰٪
سن ۵۵-۶۵	۸	۲۰٪

۱ و ۲ افزایش نشان می‌دهد، در صورتی که این افزایش از نظر آماری دارای سطح معنی داری نبودند (به ترتیب با سطوح آماری برابر با $P=0.477$ و $P=0.763$) (نمودار ۲). همچنین بیان آن



نمودار ۱- نمودار مقایسه میزان بیان ژن VE-Cadherin در نمونه‌های سرم افراد دارای تومور با افراد کنترل سالم. نتیجه نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار سطح بیان این ژن در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های افراد سالم است ($P=0.001$).



نمودار ۲- نمودار میزان بیان ژن در گریدهای مختلف نمونه‌های توموری. اگرچه سطح بیان ژن VE-Cadherin روند افزایشی را با افزایش گرید تومور نشان می‌دهد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نشد ($P>0.05$).

بیماران در گرید I، ۶۳٪ از افراد بیمار مورد مطالعه در گرید II و ۱۰٪ آن‌ها در گرید III بودند. همچنین بررسی تومور از لحاظ مرحله نشان داد که بیشترین بیماران (۴۳٪) در مرحله IIA بیماری بودند (جدول ۳). با استفاده از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف^۴ مشخص گردید که متغیرهای گرید و مرحله تومور از توزیع نرمالی برخوردار بوده؛ بنابراین از آزمون‌های آماری پارامتریک برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

جدول ۳- توزیع فراوانی افراد بیمار بر اساس ویژگی‌های درجه و مرحله تومور

ویژگی تومور	نوع	تعداد (فراوانی)	درصد
مرحله تومور	I	۲	۲۷٪
	II	۲۴	۶۳٪
	III	۱۴	۱۰٪
درجه تومور	I	۳	۸٪
	IIA	۱۷	۴۳٪
	IIB	۹	۲۳٪
	IIIA	۳	۸٪
	IIIC	۸	۱۸٪

نتایج مطالعه نشان داد که بیان ژن CDH5 کد کننده VE-cadherin در نمونه‌های تومور نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش‌یافته است ($P=0.001$) (نمودار ۱). از ۴۰ بیمار، تمامی موارد برای CDH5 مثبت بودند که از این تعداد ۲۱ مورد Fold change بیش از دو برابر داشتند. از نظر آماری نیز نشان داده شد که بیان این ژن بین نمونه‌های کنترل و تومور اختلاف معنی‌دار دارد ($P < 0.05$) (نمودار ۱). در ارتباط با متغیرهای پاتوفیزیولوژیک، نتایج حاکی از آن بود که سطح بیان ژن CDH5 در نمونه‌های تومور با گرید ۳ نسبت به نمونه‌های تومور با گرید

⁴ Kolmogorov-Smirnov

در نمونه‌های تومور با گرید ۲ در مقایسه با نمونه‌های تومور با گرید ۱ افزایش یافته بود، اما مقدار P-value برای آن بیشتر از ۰/۰۵ بود ($P=0.828$)؛ بنابراین باینکه بیان این ژن با افزایش گرید تومورها در افراد بیمار افزایش می‌یابد، اما این اختلاف معنی‌دار نبود (نمودار ۲). در مورد سایر ویژگی‌های تومور از جمله مرحله و همچنین دیگر زیرگروه‌های متغیرهای افراد بیمار اختلاف معنی‌داری از نظر سطح بیان این ژن یافت نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان سینه در زنان هر ساله بیشترین آمار مرگ‌ومیر ناشی از سرطان را به خود اختصاص می‌دهد (۱، ۲). تومورها در سرطان سینه در بسیاری از موارد بعد از شروع مرحله اول درمان تغییر رفتار می‌دهند و دچار متاستاز شده و حتی با جراحی کامل نیز نمی‌توان ادعا کرد که دیگر خطر بیماری، بیمار را تهدید نمی‌کند. از این رو یک پیگیری طولانی‌مدت بعد از بیماری می‌تواند برای بررسی نتیجه درمان و مهار بستر این بیماری مفید باشد (۹). به همین دلیل امروزه یافتن مارکرهایی که برای ردیابی و پیگیری وضعیت درمان مفید باشد برای دانشمندان به عنوان یک هدف مطرح است (۲، ۹). سلول‌های تومور جهت انجام متاستاز می‌بایست از یکدیگر جدا گشته و اجزای غشای پایه و ماتریکس بین سلولی را تجزیه کنند تا بتوانند از غشای پایه بافت پوششی، ماتریکس بین سلولی و غشای پایه عروق عبور نمایند و وارد گردش خون شوند (۱۰، ۱۱). مولکول VE-Cadherin پروتئین غشایی است که در اندوتلیوم رگ‌ها بیان می‌شود و اصلی‌ترین مولکول درگیر در اتصالات چسبنده محسوب می‌شود و مسئول اتصالات هموفیلیک با واسطه کلسیم است و در عملکرد اندوتلیوم به عنوان یک سد دفاعی و نیز در فرایند رگ زایی و مسیرهای سیگنالی نقش دارد (۱۲). این مولکول همچنین در آنژیوژنز تومور مهم است و بیان آن سبب افزایش کارسینومای سینه می‌شود (۱۵-۱۸). مهار عملکرد VE-Cadherin با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در مدل‌های توموری موش سبب مهار رگ زایی تومور و رشد آن شده است (۱۱). لذا این مارکر به تنهایی یا به همراه سایر استراتژی‌های درمانی، می‌تواند در پیشگویی پاسخ به داروهای آنتی‌آگونیست مفید واقع شود که این مسئله باعث خواهند شد دانشمندان بتوانند طراحی منطقی‌تر و آگاهانه‌تری را برای داروهای آنتی‌نئوپلاستیک داشته باشند (۱۵-۲۳). به عنوان مثال، در مورد پروتئین VE-cadherin،

مطالعات مختلفی مانند Harigopal و همکاران (۱۴)، Rakha و همکاران (۱۵)، Howard و همکاران (۱۶)، Jeschke و همکاران (۱۷)، Qureshi و همکاران (۱۸)، Swiatoniowski و همکاران (۱۹)، Robles-Frias و همکاران (۲۰)، Li و همکاران (۲۱) و Jalali و همکاران (۲۲) نشان داده‌اند که بیان ناهنجار آن در بیماران مبتلا به سرطان سینه، نقش مهمی در ایجاد آنژیوژنز تومورها دارد. قابل ذکر است که تمامی این مطالعات بر روی میزان پروتئین در سرم خون بوده است. همچنین مطالعات مختلفی کمبود این فاکتور را در ایجاد برخی از تومورهای مرتبط با عروق مثل آنژیوسارکوماها نشان داده‌اند. این اثر احتمالاً با واسطه‌ی Beta-catenin به دنبال و افزایش N-Cadherin در اتصالات سلولی میانجیگری می‌شود (۱۵-۲۰).

در این ارتباط، Lampugnani و همکاران نشان دادند که بیان VE-Cadherin سبب ایجاد مهار رشد تماسی سلول-سلول می‌شود (۲۳). Parker و همکاران در سال ۲۰۰۴ ثابت کردند که VE-Cadherin نقش بسیار حیاتی در کنترل یکپارچگی و نفوذپذیری عروقی دارد (۲۴).

Rabascio و همکاران در سال ۲۰۰۴ چندین فاکتور مربوط به رگ زایی را در خون افراد سالم، زنان باردار و افراد مبتلا به سرطان سینه بررسی کردند. آن‌ها افزایش قابل توجهی را در میزان VE-cadherin در سرم افراد مبتلا به سرطان سینه نسبت به افراد کنترل مشاهده کردند (۲۵).

Martin و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی اثر VE-Cadherin در رگ زایی و میکرو رگ‌ها در سرطان سینه پرداختند. در این مطالعه رنگ‌آمیزی VE-Cadherin تفاوت معنی‌داری را در تعداد میکرو رگ‌ها در تومور در مقایسه با قبل آن نشان داد (۲۶).

Labelle و همکاران مشاهده کردند که VE-Cadherin ممکن است از طریق مشارکت در آنژیوژنز تومور و همچنین تکثیر این سلول‌ها از طریق مسیر سیگنالینگ TGF-B سبب افزایش پیشرفت تومور شود (۲۷). این موارد نشان می‌دهند که میزان بیان VE-Cadherin می‌تواند با ایجاد تومور و یا افزایش رشد آن و آنژیوژنز، افزایش یابد که این مسئله همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر است. در افزایش میزان این فاکتور در خون افراد مبتلا هیچ ارتباط منطقی با درجه تومور مشاهده نشد، باین‌حال بیشترین میزان بیان VE-Cadherin در تومورهای درجه ۲ مشاهده گردید. شایان ذکر است که در این مطالعه درجه‌بندی

این روش بسیار کارآمدتر باشد.

در این مطالعه مشاهده شد که میزان mRNA مربوط به VE-cadherin در سرم خون افراد مبتلا ۵/۲۵٪ افزایش داشته است و آنالیز آماری نشان داد که این افزایش معنی‌دار بوده است. با توجه به نتایج سایر مطالعات، به نظر می‌رسد بررسی بیان این ژن، عامل مؤثری در پیش‌آگهی سرطان سینه است؛ بنابراین بررسی بیان این فاکتور نه تنها می‌تواند به عنوان مارکری با پتانسیل بالا جهت بررسی و حتی فالوآپ بیماران مبتلا به سرطان سینه برای تشخیص عود مجدد تومور مطرح باشد، بلکه با توجه به نتایج مطالعات صورت گرفته که بیانگر نقش این فاکتور در افزایش رگ زایی و خاصیت متاستاتیک تومورها است، می‌توان از آن به عنوان هدفی برای مداخله درمانی استفاده کرد. با این وجود، قابل ذکر است که مطالعات بیشتری در این زمینه با حجم نمونه‌ی بیشتر مورد نیاز است تا قابلیت استفاده‌ی این فاکتور را به عنوان یک مارکر مطمئن برای سرطان سینه به اثبات برسانند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج حاصل از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد خانم نرجس اصغری با کد ۱۵۰۳۹۳۲۰۱۵/۱۴۲۳۰۵ که در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه زیست دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شده است؛ نگارش شد. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم پژوهشی بیمارستان علوم پزشکی بابل جهت تهیه نمونه‌های خون بیماران ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

تومورها بر اساس سیستم^۵ TNM انجام گردید. در مطالعه‌ای که توسط Martin و گروه تحقیقاتی در سال ۲۰۰۵ صورت گرفت، نشان داده شد که میزان بیان این فاکتور در تومورهای لوبولار^۶ نسبت به کارسینومای داکتال^۷ کاهش معنی‌داری دارد که تا حدی نشانگر وجود برخی ارتباطات میان میزان بیان این فاکتور با ویژگی‌های تومور دارد (۲۶). در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده شد که در تومورهای کم‌تر تهاجمی، در مقایسه با موارد تهاجمی‌تر، ارتباط معنی‌داری بین حجم توده‌ی عروق توموری و میزان VE-Cadherin وجود دارد (۲). علت عدم وجود ارتباط بین میزان VE-Cadherin و درجه تومور در این مطالعه، می‌تواند تعداد کم نمونه‌ی مورد بررسی باشد.

در مطالعه ما میزان mRNA ژن VE-Cadherin در سرم خون افراد مبتلا به سرطان سینه با استفاده از آنالیز Real time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیزها نشان داد که سطح این نسخه ترانسکریپت اندوتلیالی ویژه در بیمارانی که قبلاً درمانی را دریافت نکرده‌اند افزایش یافته است. مطالعات قبلی نشان داده است که سطح VE-Cadherin در گردش خون بیماران مبتلا به بهبودی نسبی رسیده‌اند، به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (اما هنوز هم بالاتر از افراد شاهد است) و در بیمارانی که به بهبودی کامل دستیابی پیدا کرده‌اند به سطح کنترل برگشته است (۲۶). اندازه‌گیری سطح VE-cadherin با روش Real time PCR نسبت به فلوسایتومتری و یا هیستوشیمی مزایایی دارد. اندازه‌گیری mRNA VE-cadherin می‌تواند در نمونه‌های زیاد و از نمونه‌های فریز شده انجام شود. همچنین استانداردسازی روش آزمایشگاهی آن ساده‌تر است به عبارت دیگر روش Real time PCR نسبت به دو روش فلوسایتومتری و کشت بافت دقیق‌تر بوده و از خطای کمتری برخوردار است. لذا به نظر می‌رسد برای طراحی دقیق داروهای آنتاگونیست و پیگیری میزان پیش‌آگهی

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2019; 69(1): 7-34.
2. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. The Journal of pathology. 2011; 223 (2):307-17.

3. Abdollahzadeh R, Daraei A, Mansoori Y, Sepahvand M, Amoli M.M, Tavakkoly-Bazzaz J. Competing endogenous RNA (ceRNA) cross talk and language in ceRNA regulatory networks: A new look at hallmarks of breast cancer. J Cell Physiol. 2018; 234: 10080-10100.

⁷ Ductal Carcinoma

⁵ TNM Staging System

⁶ Tumor Lobular

4. Daraei A, Izadi P, Khorasani G, Nafissi N, Naghizadeh M M, Younosi N, et al. Methylation of progesterone receptor isoform A promoter in normal breast tissue: An epigenetic link between early age at menarche and risk of breast cancer? *J Cell Biochem.* 2019; 120 (8):12393-12401.
5. Daraei A, Izadi P, Khorasani G, Nafissi N, Naghizadeh M.M, Younosi N, et al. Epigenetic Changes of the ESR1 Gene in Breast Tissue of Healthy Women: A Missing Link with Breast Cancer Risk Factors? *Genet Test Mol Biomarkers.* 2017; 21: 464-470.
6. Mansoori Y, Tabei M.B, Askari A, Izadi P, Daraei A, Bastami M, et al. Expression levels of breast cancer-related GAS 5 and LSINCT 5 lnc RNA s in cancer-free breast tissue: Molecular associations with age at menarche and obesity. *The breast journal.* 2018; 24: 876-882.
7. Mansoori Y, Tabei M.B, Askari A, Izadi P, Daraei A, Naghizadeh M.M, et al. A link between expression level of long-non-coding RNA ZFAS1 in breast tissue of healthy women and obesity. *The International journal of biological markers.* 2018; 33: 500-506.
8. Mansoori Y, Zendeabad Z, Askari A, Kouhpayeh A, Tavakkoly-Bazzaz J, Nariman-Saleh-Fam Z, et al. Breast cancer-linked lncRNA u-Eleanor is upregulated in breast of healthy women with lack or short duration of breastfeeding. *J Cell Biochem.* 2019;120 (6): 9869-9876
9. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Frontiers in oncology.* 2018; 8:227. eCollection 2018.
10. Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer.* 2006; 6: 48.
11. Karen A, Knudsen KA, Margaret J. Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem.* 2005; 95(3): 488-96.
12. Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. Disease-Causing Mutations in the Human Genome, *Eur. J. Pediatr.* 2000; 151: 173-171.
13. Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001;97(11): 3658–3661.
14. Harigopal M, Berger AJ, Camp RL, Rimm DL, kluger HM. Automated quantitative analysis of E- cadherin expression in lymph node metastasis is predictive of survival in invasive ductal breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(11): 4083-4089.
15. Rakha EA, Abd EL, Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO. E Cadherin expression in invasive non- lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology.* 2005; 46(6): 685-93.
16. Howard EM, Lau SK, Lyles RH, Bridsong GG, Umbreit JN, Kochhar R. Expression of E-Cadherin in high- risk breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005; 131(1): 14-8.
17. Jeschke U, Mylonas I, Shabani N, Kunert-Keil C, Schindlbeck C, Gerber B, et al. Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. *Anticancer Res.* 2005; 25(3A): 1615-22.
18. Qureshi HS, Linden MD, Divine G, Raju UB. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol.* 2006; 125(3): 377-85.
19. Swiatoniowski G, Matkowski R, Suder E, Bruzewicz S, Setta M, Kornafel J, et al. E-cadherin and fibronectin expressions have no prognostic role in stage II ductal breast cancer. *Anticancer Res.* 2005; 25(4): 2879-83.
20. Robles-Frias A, Gonzalez-Campora R, Martinez-Parra D, Robles-Frias MJ, Vazquez-Cerezuela T, Ota-Salaverri C, et al. Robinson cytologic grading in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin expression and regional lymph node metastasis. *Acta Cytol.* 2006; 50(2): 151-7.
21. Li Q, Wu MF, Song AP, Wei JC, Xu G, Lu YP, et al. Expression of Ezrin and E-cadherin in invasive ductal breast cancer and their correlations to lymphatic metastasis. *Ai Zheng.* 2006; 25(3): 363-6.
22. Jalali Nadoushan MR, Davati A, Akhavan F. Expression of E-cadherin in primary breast cancer and its correlation with prognostic factors. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences.* 2009;11(3). [In persian]
23. Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B, et al. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions. Differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *Cell Biology.* 1995;129 (1): 203-17.
24. Parker BS, Argani P, Cook BP, Liangfeng H, Chartrand SD, Zhang M, et al. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64:7857–66.
25. Rabascio C, Muratori E, Mancuso P, Calleri A, Raia V, Foutz T, et al. Assessing Tumor Angiogenesis: Increased Circulating VE-Cadherin RNA in Patients with Cancer Indicates Viability of Circulating Endothelial Cells. *Cancer Research.* 2004; 64(12):4373-7.
26. Martin TA, Watkins G, Lane J, Jiang WG: Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin.cancer, *Histopathology.* 2005; 46:422–430.
27. Labelle M, Schnittler H j, Aust DE, Friedrich K. Vascular Endothelial Cadherin Promotes Breast Cancer Progression via Transforming Growth Factor B Signaling: *Cancer Res* 2008; 68 (5):1388-97.



Original Article

The Evaluation of VE-Cadherin Gene Expression in Serum of Iranian Women With Breast Cancer

Asghari A¹, Zarrinpour V^{1*}, Daraei A^{2*}, Hajebrahimi Z³, Moslemi D⁴

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2. Department of Genetics, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3. Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran

4. Department of Radiation Oncology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Received: 23 May 2019

Accepted: 02 Jun 2019

Abstract

Background & Objective: Breast cancer is one of the most common cancers and the second leading cause of cancer death in women worldwide, in both developed and developing countries. Vascular endothelial (VE)-cadherin is endothelial specific adhesion molecule located at junctions between endothelial cells and its association with various cancers has been proven. The aim of this study was to evaluate the VE-cadherin gene expression in serum of Iranian women with breast cancer in order to identify a biomarker for its prediction.

Materials & Methods: After serum isolation from blood samples of the patients and controls, extraction of RNA and synthesis of cDNA were done. Gene expression was measured using real-time PCR technique.

Results: Our results showed that the expression of VE-cadherin was increased significantly in patients compared to control samples. However, there was no relationship between its expression and grade of the tumors.

Conclusion: Based on the results of this study, expression of this factor can be used as a marker for study and follow-up of breast cancer patients. Furthermore, considering the role of this factor in angiogenesis and metastasis, it can be used as a target for intervention therapy.

Keywords: breast cancer, evaluation of gene expression, VE-cadherin gene, serum biomarker

***Corresponding Author: Zarrinpour Vajiheh**, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Email: Zarrinpour_v@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-5257-9443>

Daraei Abdolreza, Department of Genetics, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Email: a.daraei@mubabol.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0002-2106-835X>