

مقاله پژوهشی

ارزیابی تزیاید ژن *Cyclin E* به عنوان یک نشانگر زیستی در بیماران مبتلابه سرطان پستان استان اصفهان

گوهریک طوروسیان^{۱*}، منصور صالحی^۲، مسعود هوشمند^۳

۱- مؤسسه آموزش عالی نوردانش میمه، میمه، ایران

۲- گروه ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- آزمایشگاه تشخیصی ژنتیک، مرکز ژنتیک مندل، اربیل، عراق

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان سراسر جهان است. چرخه سلولی توسط پروتئین‌هایی بنام سیکلین‌ها و کینازهای وابسته به آن‌ها تنظیم می‌گردد و اختلال در فعالیت آن‌ها نقش مهمی در ایجاد سرطان دارد. ژن *Cyclin E* با نام *CCNE1* یا *pCCNE1* یکی از چهار گروه سیکلین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلول، در انواع سرطان‌ها و همچنین سرطان پستان گزارش شده و در تحقیقات سرطان هدفی قابل توجه است. در این راستا تزیاید ژن *Cyclin E* در بیماران مبتلابه سرطان پستان بررسی شد و ظرفیت آن به عنوان یک بیومارکر مولکولی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها: نمونه بافت‌های سرطانی و سالم مجاور آن از بیماران تحت جراحی در بیمارستان الزهرا اصفهان جدا و جمع‌آوری گردید. DNA ژنومی به روش فنول-کلروفرم استخراج شد و پس از نرمال کردن غلظت آن‌ها در تکنیک Real-time PCR استفاده شدند. با محاسبه Ct ها به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تزیاید ژن مذکور تعیین شد و با استفاده از آزمون آماری ویلکاکسون بررسی شدند.

نتایج: مقدار تزیاید ژن *Cyclin E* در بافت‌های سرطانی به طور معنی‌داری بیشتر از بافت‌های سالم پستان بود ($p = 0.002$). علاوه بر این، جهت ارزیابی تزیاید ژن به عنوان یک بیومارکر سرطان پستان، از منحنی راک استفاده شد. پس از بررسی مشخص شد سطح زیر منحنی نزدیک به ۷۰ درصد است.

نتیجه‌گیری: در نتیجه، تزیاید ژن *Cyclin E* در سرطان پستان به طور چشمگیری افزایش می‌یابد و از آن می‌توان به عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص و پیش‌آگهی سرطان پستان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، *Cyclin E*، تزیاید ژن، Real – Time PCR، بیومارکر

مقدمه

از آن به دلیل افزایش و بهبود راهکارهای پیش‌آگهی و درمان، رو به کاهش است (۱). به طوری که میزان زنده‌مانی زنان مبتلابه این سرطان به ۹۰ درصد رسیده است (۵).

فئوتیپ سلول‌های سرطانی، در نتیجه کسب ژنوتیپ ویژه‌ای بوده که به طور وراثتی و یا بر اثر عوامل محیطی در گذر زمان به دست آمده است. این ژنوتیپ می‌تواند نتیجه تغییرات اپی‌ژنتیکی یا تغییرات ژنتیکی شامل جهش‌های نقطه‌ای، تزیاید ژن، انواع حذف‌ها، جابجایی‌ها و آنیپلوئیدی‌ها باشد (۶، ۷). سه گروه عمده ژنی که در سرطان‌ها دچار این تغییرات می‌شوند

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان سراسر جهان است (۱). به طوری که احتمال ابتلای هر فرد به آن، یک نفر در هر ۸-۱۰ نفر است (۲). در ایران نیز این بیماری شایع‌ترین در بین زنان ایرانی است. با این تفاوت که سن ابتلای آن در زنان ایران کمتر از زنان سراسر دنیا است (۳، ۴). میزان بروز این سرطان در جهان رو به افزایش است، در حالی که میزان مرگ ناشی

*نویسنده مسئول: گوهریک طوروسیان، مؤسسه آموزش عالی نوردانش میمه، میمه، ایران
Email: torosian.goharik@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-5033-0564



عملکرد پروتئین p53 و نامتعادلی های کروموزومی حاصل می شود (۱۴، ۱۷ و ۱۸).

طبقه بندی سنتی سرطان پستان بیشتر بر اساس ویژگی های کلینوپاتولوژی بوده و از بیومارکرهای مولکولی کمتر استفاده شده است (۲۷). بیومارکرها عواملی هستند که توسط سلول های سرطانی، پاسخ بدن به سرطان و یا اختلالات غیر سرطانی تولید شده و از آن ها می توان برای اهدافی چون غربالگری، تشخیص، پیش آگهی و یا بهبود راهکارهای درمانی استفاده کرد (۲۸). در سال های اخیر بررسی تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی ژنوم به عنوان بیومارکر مولکولی مورد توجه قرار گرفته است (۲۹). پیش از این، ظرفیت تغییر بیان ژن، بیان بیش از حد ژن و میزان پروتئین Cyclin E به عنوان بیومارکر سرطان پستان جهت تشخیص درجه و مرحله پیشرفت بیماری، پیش آگهی و پیش بینی روند درمان گزارش شده است (۳۰-۳۳). با این وجود، در کنار گزارش های مبنی بر تغییر بیان ژن، ظرفیت تولید ژن Cyclin E به عنوان بیومارکر مولکولی سرطان پستان مشاهده نشد. از آنجا که بیان بیش از حد این ژن ناشی از تولید این ژن است (۳۴)، بررسی سریع و اختصاصی تولید ژن Cyclin E در سرطان پستان ضروری به نظر می رسد. در این راستا، تولید ژن Cyclin E بررسی شد و ظرفیت آن به عنوان بیومارکر مولکولی سرطان پستان ارزیابی شد. در این پژوهش، جهت بررسی تولید ژن Cyclin E از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. طبق گزارش های گذشته، این روش نسبت به سایر روش های پیچیده از جمله FISH و ساترن بلات حساسیت و سرعت عمل بالاتری داشته و قابل اعتمادتر است (۳۵). در این راستا، تولید ژن Cyclin E در بافت های سرطانی و سالم پستان در بیماران مبتلا به سرطان پستان در استان اصفهان با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی و مقایسه شد و ظرفیت آن به عنوان بیومارکر مولکولی سرطان پستان ارزیابی شد.

مواد و روش ها

گردآوری نمونه و استخراج DNA

مجموع ۱۰۰ نمونه بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن از ۵۰ فرد مبتلا به سرطان پستان، پس از کسب رضایت از آن ها، در حین جراحی در بیمارستان الزهرا اصفهان در طی سال های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶، توسط پزشک متخصص جدا و جمع آوری گردید و تا زمان استفاده در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

شامل: ژن های سرکوبگر تومور، ژن های محافظت کننده از ژنوم و پروتئین ها هستند. پروتئین ها ژن های طبیعی هستند که پس از تغییر و کسب عملکرد جدید به انکوژن تبدیل شده و محصول آن ها واجد قابلیت ترانسفورم کردن سلول و یا القای سرطان است (۸، ۹). یکی از این تغییرات ژنتیکی که می تواند انکوژن را از پروتئین ها مربوطه تولید کند تولید ژن است. تولید ژن یعنی افزایش تعداد کپی یک ناحیه از ژنوم که موجب تولید تعداد زیادی نسخه از ژن های موجود در آن ناحیه شده و در نهایت موجب بیان بیش از حد پروتئین های کد شونده می گردد (۱۰، ۱۱).

پروتئین ها به گروه های مختلفی دسته بندی می شوند. گروهی از آن ها که در انواع سرطان ها دچار تولید ژن شده و به انکوژن تبدیل می شوند، سیکلین ها هستند که به همراه کیناز های وابسته به آن ها در تنظیم چرخه سلول نقش دارند (۱۲، ۱۳). اختلال در فعالیت سیکلین ها و کیناز های وابسته نقش مهمی در ایجاد سرطان دارند. به طوری که عدم تعادل بین سیکلین ها، کیناز های وابسته و مهار کننده های آن ها در سلول های بدخیم، منجر به تقسیم سلولی کنترل نشده می شوند (۱۴، ۱۵). سیکلین هایی که به طور مستقیم چرخه سلولی را تنظیم می کنند به چهار گروه A، B، D و E طبقه بندی می شوند (۱۶). سیکلین E، نقش کلیدی در تنظیم چرخه سلول از مرحله G₁ به فاز S دارد (۱۷). ژن سیکلین E (Cyclin E) در انسان بانام های CCNE1 و pCCNE1 نیز خوانده شده و با طول ۲۰۴۳ جفت باز و ۱۲ اگزون بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۱۹ واقع شده است (۱۸). همچنین این ژن دارای ۶ ایزوفرم بوده که ایزوفرم اصلی آن پروتئینی به طول ۴۱۰ اسید آمینه تولید می کند (۱۹). پژوهش های گذشته نشان می دهند، Cyclin E در انواع سرطان ها از جمله سرطان دستگاه گوارش، سرطان خون، سرطان ریه، سرطان پوست و همچنین سرطان پستان تولید یافته و بیش از حد بیان می شود (۱۴، ۲۲-۲۰). Cyclin E در سرطان پستان نیز نقش مهمی داشته و در برخی از موارد سرطانی بیش از حد بیان می شود (۲۳، ۲۴). همچنین یک همبستگی قوی بین بیان بیش از حد آن با متاستاز و بقای ضعیف بیمار مشاهده می شود (۲۵). علاوه بر اینکه این ژن نقش مهمی در شروع و پیشرفت سرطان پستان دارد به شیمی درمانی نیز واکنش نشان می دهد (۲۶). پژوهش ها نشان می دهند، علت عمده بیان بیش از حد این ژن تولید ژن است که یکی از دلایل آن جهش از دست رفتن

ژن هدف به همراه آغازگرهای ژن مرجع با سه بار تکرار در دستگاه
Corbett rotor gene 6000 انجام شد. منحنی تکثیر مربوط به هر
واکنش رسم شد و مقدار Ct مربوط به هر دو ژن در نمونه‌های
سالم و سرطانی محاسبه گردید. به منظور بررسی یافته‌های Real-
time PCR از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد (۳۸). مقدار Ct ژن‌های
Cyclin E و *Tbp* در نمونه‌های سالم و سرطانی محاسبه شده و با
استفاده از معادله ۱، تزیاید ژن *Cyclin E* در نمونه‌ها محاسبه شد.

$$\text{معادله ۱: } 2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{2^{-[Ct(Cyclin E) - Ct(Tbp), \text{Tumor}]} }{2^{-[Ct(Cyclin E) - Ct(Tbp), \text{Normal}]}}$$

بررسی‌های آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (IBM) نسخه
۲۴ انجام شد. بررسی توزیع داده‌های حاصل از تزیاید ژن با استفاده
آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov)
انجام شد. بررسی تزیاید ژن بین بافت‌های سرطانی و بافت‌های
سالم پستان با استفاده از آزمون آماری ناپارامتری ویلکاکسون
(Wilcoxon signed-rank test) انجام شد. بررسی حساسیت و
اختصاصیت تزیاید ژن به عنوان یک بیومارکر با استفاده از منحنی
ROC (Receiver Operating Characteristics) انجام شد. سطح
۵ درصد برای معنی‌داری آزمون‌ها در نظر گرفته شد.

اطلاعات دموگرافیکی بیماران از پرونده آن‌ها استخراج شد و
اطلاعات کلینوپاتولوژیکی از آزمایشگاه پاتوبیولوژی به دست آمد.
DNA ژنومی از حدود ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه بافتی پس از
هضم مکانیکی در مجاورت با نیتروژن مایع به روش معمول فنول-
کلروفرم استخراج شد (۳۶). جهت انتخاب نمونه مطلوب برای
مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، نمونه‌ها با استفاده از
نانودراپ اسپکتوفتومتری و همچنین ژل آگارز ۰/۰۸ درصد
مورد بررسی قرار گرفتند (۳۶).

طراحی آغازگرها و تنظیم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی، توالی ژن‌های *Cyclin E*
(NC_000019.10) و *TBP* (NC_000006.12) از پایگاه‌های
اطلاعاتی NCBI به صورت FASTA استخراج شد و پس از
انتخاب ناحیه موردنظر، آغازگرها توسط نرم‌افزار اولیگو نسخه ۷
طراحی شدند (جدول ۱). یکتا بودن آغازگرها جهت اتصال به
جایگاه موردنظر در ژنوم با استفاده از ابزارهای BLAST در سایت
NCBI و Epcr مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین بهترین دما
برای اتصال آغازگرها، واکنش PCR با اعمال شیب دمایی از ۵۵
تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد
به عنوان دمای بهینه اتصال آغازگرها برای ژن هدف *Cyclin E* و

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده و استفاده شده در واکنش Real-time PCR

ژن	نوع آغازگر	توالی آغازگرها	طول قطعه
<i>Cyclin E</i>	رفت	5'-GCAAAGTTGGGCTCTCGGCCTTG-3'	۲۳۲ جفت باز
	برگشت	5'-GCAGGAAATTTGGCAGGAAGT-3'	
<i>Tbp</i>	رفت	5'-AATTAGCCAGGTGTTGTGG-3'	۱۱۵ جفت باز
	برگشت	GCTCTGAGTCACCCAGGCTGG-3'-5'	

نتایج

پس از جمع‌آوری نمونه‌های بافتی، اطلاعات دموگرافیکی و
کلینوپاتولوژیکی مربوط به آن‌ها تهیه و تنظیم شد (جدول ۲).
DNA ژنومی بافت‌های سرطانی و سالم مجاور آن استخراج شد و
پس از بررسی، نمونه‌های استخراجی مطلوب در مراحل بعدی
پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. پس از تکثیر ژن با استفاده از
واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده و اعمال شیب دمایی،
محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. واکنش
PCR بدون قطعه غیراختصاصی انجام شده بود و بهترین دمای

ژن مرجع *Tbp* انتخاب گردید. ژن مرجع *Tbp* (TATA-binding protein)
از ژن‌های خانه گردان (Housekeeping gene) بوده و
جهت نرمال کردن غلظت نمونه‌ها توسط Real-Time PCR و
بررسی بیان ژن مناسب است (۳۷). بر این اساس برای نرمال
کردن غلظت نمونه‌ها و بررسی تزیاید ژن با استفاده از واکنش
Real-time PCR از آن استفاده شد.

واکنش Real-time PCR و محاسبه تزیاید ژن *Cyclin E*

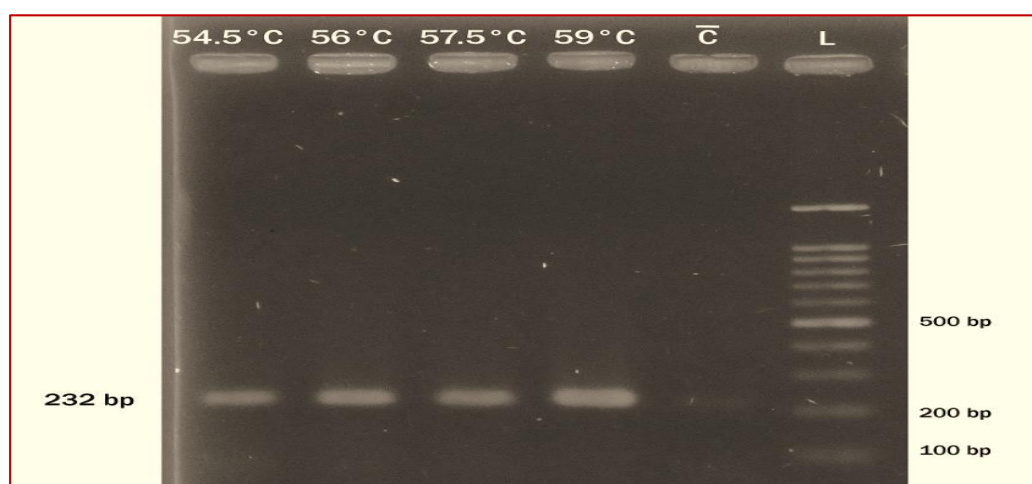
پس از نرمال کردن غلظت نمونه‌ها، به منظور بررسی تزیاید ژن
Cyclin E، واکنش Real-time PCR با آغازگرهای طراحی شده

آزمایش بود (شکل‌های ۲ و ۳). بررسی داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از آزمون آماری کولموگروف - اسمیرینوف نشان داد، مقادیر تزايد ژن *Cyclin E* از توزیع نرمال پیروی نمی‌کند ($p < 0.05$)؛ بنابراین جهت مقایسه این مقادیر بین دو

اتصال آغازگرها ۵۹ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۱). پس از نرمال کردن غلظت نمونه‌ها، جهت بررسی تزايد ژن *Cyclin E* واکنش *Real-time PCR* انجام شد. ترسیم منحنی ذوب حاصل از واکنش‌ها، حاکی از صحت عملکرد آغازگرها در مراحل انجام

جدول ۲- ویژگی‌های دموگرافیکی و کلینوپاتولوژیکی بیماران

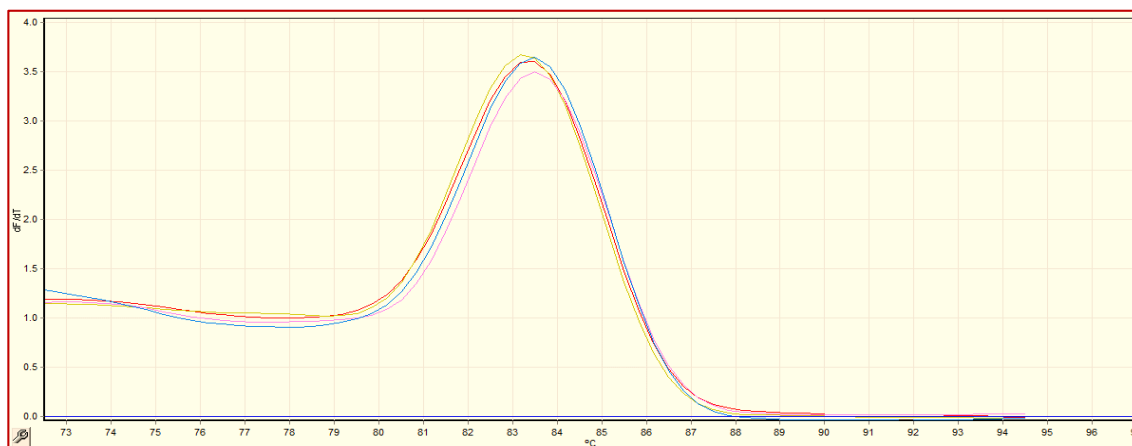
ویژگی‌ها	تعداد (درصد)
سن بیماران	≤ 45 ۲۳ (۴۶)
	> 45 ۲۷ (۵۴)
مرحله (Stage)	مرحله ۲ ۱۶ (۳۲)
	مرحله ۳ ۲۵ (۵۰)
	نامشخص ۹ (۱۸)
درجه (Grade)	درجه ۲ ۲۱ (۴۲)
	درجه ۳ ۱۵ (۳۰)
	نامشخص ۱۴ (۲۸)
سابقه خانوادگی	مثبت ۴ (۸)
	منفی ۴۶ (۹۲)
دخانیات	سیگاری ۲ (۴)
	غیر سیگاری ۴۸ (۹۶)
یائسگی	پیش از یائسگی ۲۳ (۴۶)
	پس از یائسگی ۲۷ (۵۴)



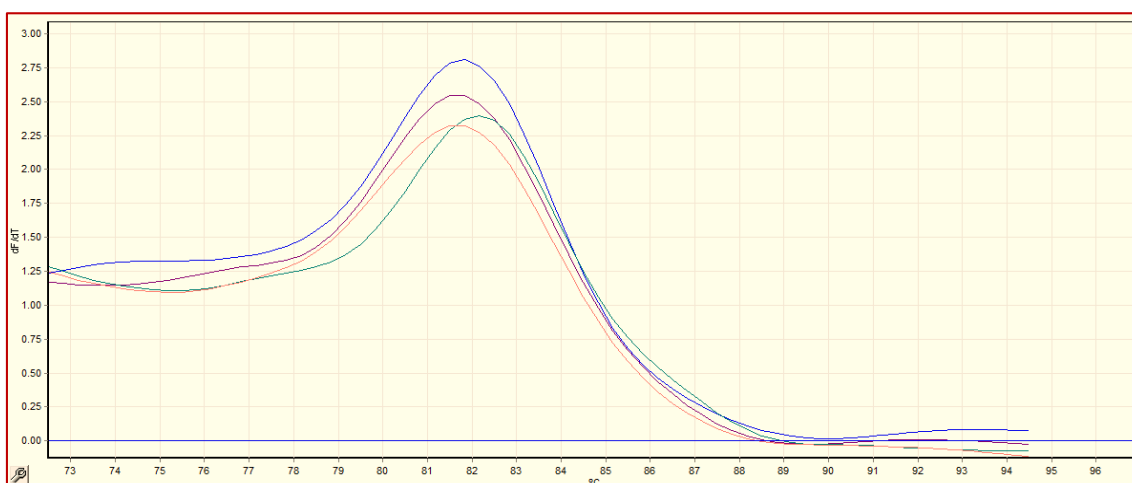
شکل ۱- محصول واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده ژن *Cyclin E* و اعمال شیب دمایی از ۵۴/۵ تا ۵۹ درجه سانتی‌گراد بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

میانگین‌ها با استفاده از آزمون T زوجی نیز نشان داد، میانگین تزايد این ژن در بافت‌های سرطانی ($M = 1/12$, $D = 0/63$) به‌طور معنی‌داری بیشتر از بافت‌های سالم ($M = 1/85$, $D = 1/53$) است ($t = 3/09$, $p = 0/003$) (نمودار ۱) (جدول ۳).

گروه سرطانی و سالم از آزمون ناپارامتری ویلکاکسون استفاده شد. یافته‌های حاصل از این آزمون نشان داد، مقدار تزايد ژن *Cyclin E* در بافت سرطانی به‌طور معنی‌داری بیشتر از بافت سالم مجاور است ($Z = 3/11$, $p = 0/002$). همچنین، بررسی



شکل ۲- منحنی ذوب حاصل از تکثیر ژن *Cyclin E*



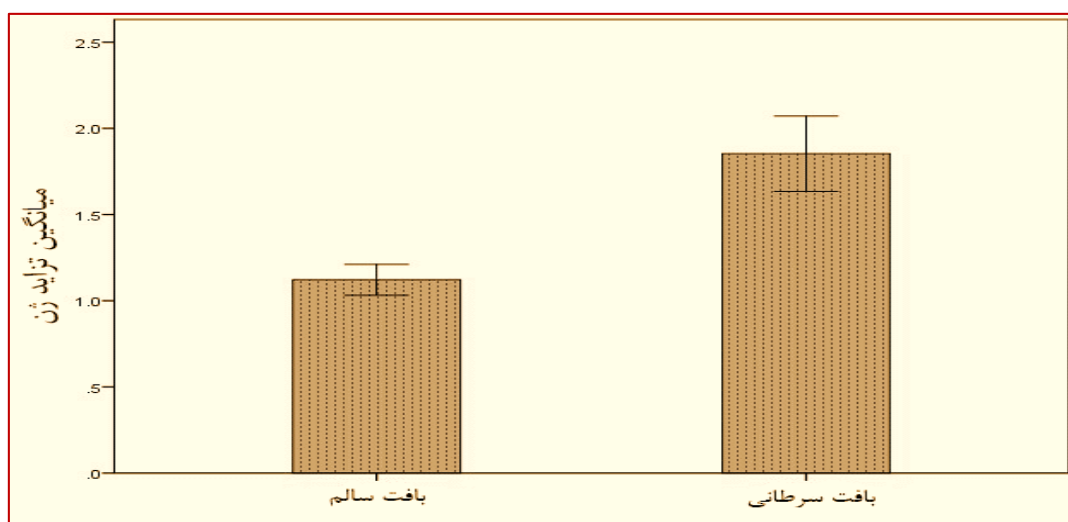
شکل ۳- منحنی ذوب حاصل از ژن مرجع *Tbp*

جدول ۳- شاخص‌های آماری تزايد ژن *Cyclin E* در دو گروه بافت‌های سرطانی و سالم پستان

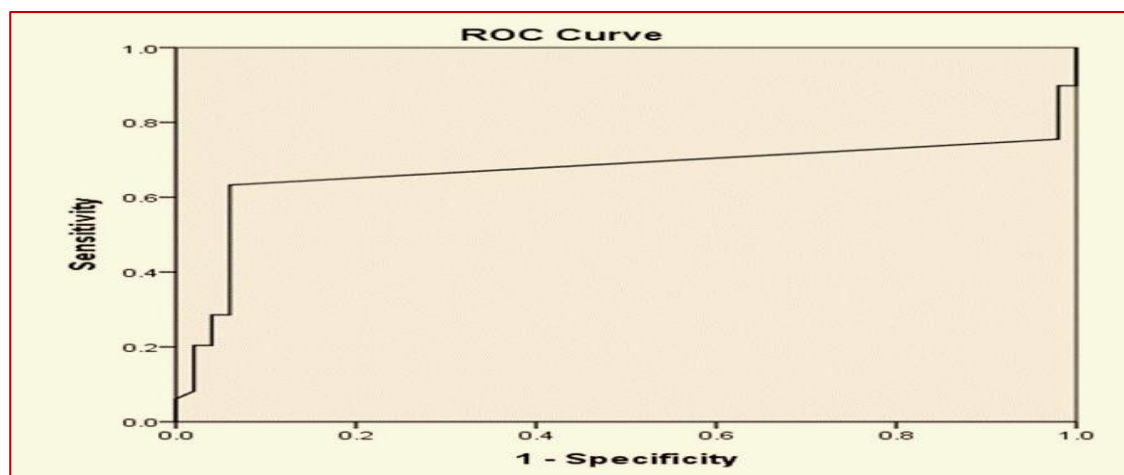
شاخص آماری	بافت سالم	بافت توموری
میانگین	۱/۱۲	۱/۸۵
انحراف معیار	۰/۶۳	۱/۵۳
میانه	۱	۱/۳۲
حداقل	۰/۲۹	۰/۱۷
حداکثر	۴/۹۲	۶/۲۸

معرفی می‌شود اما هنوز این بیماری جان افراد زیادی را تهدید می‌کند. توجه بیشتر به ساختار ریزمولکول‌ها و فرایندهای زیست‌شناسی این بیماری به کسب اطلاعات گسترده در مورد ایجاد، رشد و پیشرفت این سرطان کمک می‌کند (۴۳-۴۱). ژن‌هایی که در پیشبرد چرخه سلولی نقش دارند، در بین

همچنین، بررسی حساسیت و اختصاصیت تزايد ژن *Cyclin E* به‌عنوان یک بیومارکر سرطان پستان با استفاده از منحنی ROC نشان داد، سطح زیر منحنی نزدیک به ۷۰ درصد است و داده‌های حاصل از تزايد بیان این ژن در دو گروه موردبررسی تفکیک‌شده‌اند (شکل ۴).



نمودار ۱- میانگین تزايد ژن *Cyclin E* در دو گروه بافت‌های سرطانی و سالم پستان



شکل ۴- منحنی راک در ارتباط با تزايد ژن *Cyclin E* در بافت‌های سرطانی پستان

سرطان‌های با درجه تمایز متفاوت، تظاهر متفاوتی دارند. تعدادی از این ژن‌ها در سرطان‌های با درجه تمایز بالا، با فعالیت بیش‌ازحد، باعث سرعت رشد این نوع سرطان‌ها می‌شوند (۴۴). بیان بیش‌ازحد و تزايد ژن‌های سیکلین در سرطان پستان بررسی‌شده‌اند و یافته‌ها حاکی از این است که اختلال در بیان ژن‌های سیکلین با ایجاد سرطان مرتبط است (۱۵). با توجه به

بحث

علیرغم پیشرفت‌های صورت گرفته در تشخیص زود بهنگام، پیش‌آگهی و بهبود راهکارهای درمان سرطان پستان، کماکان این سرطان در بین سرطان‌ها شایع‌ترین علل مرگ بین زنان است (۳۹، ۴۰). هرروز راهکارهای جدیدی در مقابله با این سرطان

پیش‌آگهی و پیش‌بینی روند درمان سرطان پستان معرفی شده است (۴۹). با این وجود، گزارشی مبنی بر ارزیابی ظرفیت تزیاید ژن Cyclin E به عنوان بیومارکر سرطان پستان مشاهده نشد. در این راستا، یافته‌های حاصل از بررسی تزیاید ژن، جهت ارزیابی ظرفیت تزیاید ژن Cyclin E به عنوان یک بیومارکر مولکولی سرطان پستان، با استفاده از منحنی ROC بررسی شدند. پس از بررسی داده‌ها، مشخص شد سطح زیر منحنی نزدیک به ۷۰ درصد است که این می‌تواند نشان‌دهنده‌ی ظرفیت تزیاید Cyclin E به عنوان یک بیومارکر سرطان پستان باشد.

در این پژوهش به دلیل محدودیت بودجه و زمان، امکان استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر وجود نداشت. همچنین به دلیل عدم وجود نمونه در همه درجه‌ها (Grades) و مراحل (Stages) متفاوت پیشرفت سرطان، امکان بررسی ارتباط تزیاید ژن Cyclin E با پیشرفت بیماری وجود نداشت که این مسائل می‌تواند از محدودیت‌های این پژوهش تلقی شود. برای تأیید یافته‌های حاصل از این پژوهش، بررسی تزیاید این ژن و ظرفیت آن به عنوان یک بیومارکر مولکولی در انواع مختلف سرطان‌های پستان و همچنین نمونه‌های بیشتر پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد، تزیاید ژن Cyclin E در سرطان پستان به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. از تزیاید ژن Cyclin E می‌توان به عنوان یک بیومارکر مولکولی جهت تشخیص، پیش‌آگهی و پیش‌بینی روند درمان سرطان پستان استفاده کرد. استفاده از تکنیک سریع و حساس Real-time PCR می‌تواند به این مهم کمک کند.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی موسسه آموزش عالی نوردانش میمه با کد ۱۱۸۲۱۵۵ است. از همکاری جناب آقای دکتر غلامرضا مهاجری در فراهم نمودن بافت‌های مورد مطالعه کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند، هیچ‌گونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

نقش سیکلین E در چرخه سلولی و ایجاد سرطان پستان، مطالعه این ژن ضروری به نظر می‌رسد. به طوری که بررسی بیان و تزیاید سایکلین‌های A, B1, D1, D3, E, C و H در سلول‌های آدنوکارسینومای روده بزرگ، به ترتیب با استفاده از تکنیک‌های ایمنوهیستوشیمی و Real-time PCR نشان می‌دهد، تزیاید ژن سیکلین E در ۱۹ درصد از موارد سرطانی وجود دارد (۴۵). در سرطان پستان نیز، بررسی میزان پروتئین Cyclin E با استفاده از تکنیک وسترن بلات و ارتباط آن با شانس بقای بیماران نشان می‌دهد، میزان بیان آن بالا بوده و این میزان با شانس بقای بیماران مرتبط است (۴۶). همچنین بررسی تزیاید و بیان این ژن در سرطان پستان نوع HER2-مثبت نشان می‌دهد، بیان Cyclin E بیش از حد بوده و با وجود محدودیت در این نوع سرطان، واجد ظرفیت تشخیص و پیش‌آگهی سرطان است (۴۷). در این پژوهش، تزیاید ژن Cyclin E در افراد مبتلابه سرطان پستان در استان اصفهان بررسی شد و ظرفیت آن به عنوان بیومارکر مولکولی جهت تشخیص و پیش‌آگهی سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت. در بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده، بررسی بیان و تزیاید ژن Cyclin E با استفاده از روش‌هایی همچون ایمنوهیستوشیمی، وسترن بلات، FISH (fluorescence in situ hybridization) و CGH (Comparative Genomic hybridization) انجام شده است (۲۲). در پژوهش حاضر، به دلیل سرعت بالاتر و حساسیت بیشتر تکنیک Real-time PCR نسبت به سایر تکنیک‌ها (۳۵)، از تکنیک Real-time PCR استفاده شد و میزان تزیاید ژن Cyclin E با استفاده از مقدار Ct محاسبه شده به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین گردید. پس از بررسی داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ویلکاکسون، تزیاید ژن در بافت‌های سرطانی به طور معنی‌داری مشاهده شد ($p = 0/002$). این یافته با یافته‌های حاصل از بررسی تزیاید ژن Cyclin E در سلول‌های سرطان پستان که تزیاید ۸ برابری ژن را نشان می‌دهند (۱۵) همسو بود. بررسی میانگین تزیاید ژن بین بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن با استفاده از آزمون T زوجی نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p = 0/003$).

مطالعه تزیاید و بیان بیش از حد ژن Cyclin E در انواع سرطان‌ها پیشنهاد می‌کند، این ژن نقش مهمی در زیست‌شناسی سرطان دارد (۲۲). نقش این ژن در ایجاد و پیشرفت سرطان پستان نیز، گزارش شده است (۴۸). به طوری که تغییر بیان این ژن و بیان بیش از حد آن به عنوان بیومارکر جهت تشخیص پیشرفت بیماری،



References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(2):87-108.
2. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1995;87(22):1681-5.
3. SeyyedHosseini S, Asemi A, Shabani A, CheshmehSohrabi M. An infodemiology study on breast cancer in Iran: Health information supply versus health information demand in PubMed and Google Trends. The Electronic Library. 2018;36(2):258-69.
4. Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: a review article. Iranian journal of public health. 2018;47(3):309. [Article in persian].
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2018;68(6):394-424.
6. Berk A, Kaiser CA, Lodish H, Amon A, Ploegh H, Bretscher A, et al. Molecular Cell Biology. 8nd ed. New York: Macmillan Learning; 2016. P.1135-1168.
7. Weinberg RA. The Biology of Cancer. 3rd ed. New York: Taylor & Francis; 2014. P.24-29.
8. Croce CM. Oncogenes and cancer. New England journal of medicine. 2008;358(5):502-11.
9. Berk A, Kaiser CA, Lodish H, Amon A, Ploegh H, Bretscher A, et al. Molecular Cell Biology: Macmillan Learning; 2016.
10. Stark GR, Wahl GM. Gene amplification. Annual review of biochemistry. 1984;53(1):447-91.
11. Wu G-J, Sinclair CS, Paape J, Ingle JN, Roche PC, James CD, et al. 17q23 amplifications in breast cancer involve the PAT1, RAD51C, PS6K, and SIGMA1B genes. Cancer research. 2000;60(19):5371-5.
12. Alitalo K. Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. Medical biology. 1984;62(6):304-17.
13. Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics: Oxford university press; 2012.
14. Buckley MF, Sweeney K, Hamilton J, Sini R, Manning D, Nicholson R, et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. Oncogene. 1993;8(8):2127-33.
15. Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993;90(3):1112-6.
16. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature reviews cancer. 2009;9(3):153.
17. Lew DJ, Dulić V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. Cell. 1991;66(6):1197-206.
18. Etemadmoghadam D, George J, Cowin PA, Cullinane C, Kansara M, Gorringer KL, et al. Amplicon-dependent CCNE1 expression is critical for clonogenic survival after cisplatin treatment and is correlated with 20q11 gain in ovarian cancer. PLoS one. 2010;5(11):e15498.
19. Loeb KR, Kostner H, Firpo E, Norwood T, Tsuchiya KD, Clurman BE, et al. A mouse model for cyclin E-dependent genetic instability and tumorigenesis. Cancer cell. 2005;8(1):35-47.
20. Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. Cell. 1991;66(6):1217-28.
21. Keyomarsi K, Conte JD, Toyofuku W, Fox MP. Deregulation of cyclin E in breast cancer. Oncogene. 1995;11(5):941-50.
22. Schraml P, Bucher C, Bissig H, Nocito A, Haas P, Wilber K, et al. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 2003;200(3):375-82.
23. Nielsen N, Arnerlöv C, Emdin S, Landberg G. Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. British journal of cancer. 1996;74(6):874.
24. Nielsen NH, Arnerlöv C, Cajander S, Landberg G. Cyclin E expression and proliferation in breast cancer. Analytical Cellular Pathology. 1998;17(3):177-88.

25. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27 Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature medicine*. 1997;3(2):222-5.
26. Sgambato A, Doki Y, Schieren I, Weinstein IB. Effects of cyclin E overexpression on cell growth and response to transforming growth factor beta depend on cell context and p27Kip1 expression. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1997;8(4):393-405.
27. Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology*. 2017;49(2):111-9.
28. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(10):1134.
29. Dehdari H. The effect of Diazinon Pesticide and the inhibitory effect of Sambucus ebulus (L.) leaf extract on CYP1A1 gene Enhancer methylation frequency in Breast Cancer Cell line. Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; 2017. [Thesis in Persian].
30. Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer research*. 1994;54(2):380-5.
31. Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, Sweep CF. Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer. *Oncogene*. 2003;22(31):4898.
32. Yasmeen A, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. E-and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert review of molecular diagnostics*. 2003;3(5):617-33.
33. Caruso JA, Duong MT, Carey JP, Hunt KK, Keyomarsi K. Low-Molecular-Weight Cyclin E in Human Cancer: Cellular Consequences and Opportunities for Targeted Therapies. *Cancer research*. 2018;78(19):5481-91.
34. Giraldez S, Tamayo P, Wineinger N, Kim W, Reed SI. Cyclin E overexpression in human mammary epithelial cells promotes epithelial cancer-specific copy number alterations. *Iscience*. 2019;19:850-9.
35. Bièche I, Olivi M, Champème MH, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *International journal of cancer*. 1998;78(5):661-6.
36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
37. Spanier KI, Leese F, Mayer C, Colbourne JK, Gilbert D, Pfrender ME, et al. Predator-induced defences in *Daphnia pulex*: Selection and evaluation of internal reference genes for gene expression studies with real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 2010;11(1):50.
38. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*. 2001; 25 (4): 402-8. 2001.
39. Varangot M, Barrios E, Sónora C, Aizen B, Pressa C, Estrugo R, et al. Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Oncology reports*. 2005;14(2):537-45.
40. Futreal P, Wooster R, Stratton M, editors. *Somatic mutations in human cancer: insights from resequencing the protein kinase gene family*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology; 2005: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
41. Domchek SM, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Current opinion in oncology*. 2002;14(6):589-93.
42. Murphy N, Millar E, Lee CS. Gene expression profiling in breast cancer: towards individualising patient management. *Pathology*. 2005;37(4):271-7.
43. Dehdari H, Moradian F, Barzegar A, Ebrahimzadeh M-A. DNA methylation pattern of CYP1A1 5'- regulatory promoter region as a potential biomarker for Breast cancer, 3rd National conference of new Cellular and Molecular and First International Symposium of Genomics and Proteomics; 2017; Islamic Azad University of Ardabil Branch: civilica; 1396. P. NCNCMB03_014. [Article in persian].
44. Lønning P. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Annals of Oncology*. 2007;18(suppl_8):viii3-viii7.
45. Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland J, Bakka A, Bukholm I. Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *Journal of clinical pathology*. 2005;58(5):509-14.



46. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(20):1566-75.
47. Luhtala S, Staff S, Tanner M, Isola J. Cyclin E amplification, over-expression, and relapse-free survival in HER-2-positive primary breast cancer. *Tumor Biology*. 2016;37(7):9813-23.
48. Wingate H, Puskas A, Duong M, Bui T, Richardson D, Liu Y, et al. Low molecular weight cyclin E is specific in breast cancer and is associated with mechanisms of tumor progression. *Cell Cycle*. 2009;8(7):1062-8.
49. Lundgren C, Ahlin C, Holmberg L, Amini R-M, Fjällskog M-L, Blomqvist C. Cyclin E1 is a strong prognostic marker for death from lymph node negative breast cancer. A population-based case-control study. *Acta Oncologica*. 2015;54(4):543-9.



Original Article

Assessment of Cyclin E Gene Amplification as a Biomarker in Isfahan Province Breast Cancer Patients

Torosian G^{1*}, Salehi M², Houshmand M³

1. Nouredanesh Institute of Higher Education, Meymeh, Iran

2. Department of Genetics and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3. Genetic Diagnosis Lab, Mendel Genetic Center, Erbil, Iraq

Received: 02 Apr 2020

Accepted: 14 July 2020

Abstract

Background & Objective: Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. Cell-cycle is controlled by regulatory proteins called cyclins and Cyclin-Dependent Kinases. Aberrant activity of cyclins plays an important role in cancer development and progression. The *Cyclin E* gene, called *CCNE1* or *pCCNE1*, is one of the four cyclins groups of the cell cycle, reported in a variety of cancers as well as breast cancer, and is a notice target in cancer research. In this regard, *Cyclin E* gene amplification in breast cancer patients was evaluated and investigated and its capacity as a molecular biomarker was assessed.

Materials & Methods: Tumor tissue samples as well as adjacent healthy tissues, were excised and collected from breast cancer patients undergoing surgery in Al-Zahra hospital. Genomic DNA was extracted using phenol-chloroform method. The extracted products concentration was normalized and applied in Real-time PCR technique. Amplification of aforementioned gene was determined by calculating Cts using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and was evaluated by Wilcoxon statistical test.

Results: The *Cyclin E* gene amplification in breast cancer tissue was significantly higher than healthy tissue ($p = 0.002$). Furthermore, the amplification of *Cyclin E* gene was investigated as a breast cancer biomarker by the ROC curve statistical analysis.

Conclusion: The results revealed, the area under the ROC curve (AUC) was close in 70 percent. As a result, the *Cyclin E* gene amplification in neoplasm dramatically increases and can be used as a biomarker for the diagnosis and prognosis of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, Cyclin E, Real-Time PCR, Gene amplification, Biomarker

*Corresponding Author: Torosian Goharik, Nouredanesh Institute of Higher Education, Meymeh, Iran

Email: torosian.goharik@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-5033-0564>