مقاله پژوهشی

ارزیابی تزاید ژن *Cyclin E* به‌عنوان یک نشانگر زیستی در بیماران مبتلابه سرطان پستان استان اصفهان

گوهریک طوروسیان[1*]، منصور صالحی[2]، مسعود هوشمند[3]

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* بانام *CCNE1* یا *pCCNE1* یکی از چهار گروه سیکلین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلول، در انواع سرطان‌ها و همچنین سرطان پستان گزارش‌شده و در تحقیقات سرطان هدفی قابل‌توجه است. در این راستا تزاید ژن *Cyclin E* در بیماران مبتلابه سرطان پستان بررسی شد و ظرفیت آن به‌عنوان 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 Ctها به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تزاید ژن مذکور تعیین شد و با استفاده از آزمون آماری ویلکاکسون بررسی شدند.

نتایج: مقدار تزاید ژن *Cyclin E* در بافت‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری بیشتر از بافت‌های سالم پستان بود ($p = ۰/۰۰۲$). علاوه بر این، جهت ارزیابی تزاید ژن به‌عنوان یک بیومارکر سرطان پستان، از منحنی راک استفاده شد. پس از بررسی مشخص شد سطح زیر منحنی نزدیک به ۷۰ درصد است.

نتیجه‌گیری: درنتیجه، تزاید ژن *Cyclin E* در سرطان پستان به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد و از آن می‌توان به‌عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص و پیش‌آگهی سرطان پستان استفاده کرد.

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

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان سراسر جهان است (۱). به‌طوری‌که احتمال ابتلای هر فرد به آن، یک نفر در هر ۱۰-۸ 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، درحالی‌که میزان مرگ ناشی از آن به دلیل افزایش و بهبود راهکارهای پیش‌آگهی و درمان، رو به کاهش است (۱). به‌طوری‌که میزان زنده‌مانی زنان مبتلابه این سرطان به ۹۰ درصد رسیده است (۵).

فنوتیپ سلول‌های سرطانی، درنتیجه کسب ژنوتیپ ویژه‌ای بوده که به‌طور وراثتی و یا براثر عوامل محیطی درگذر زمان به‌دست‌آمده است. این ژنوتیپ می‌تواند نتیجه تغییرات اپی‌ژنتیکی یا تغییرات ژنتیکی شامل جهش‌های نقطه‌ای، تزاید ژن، انواع حذف‌ها، جابجایی‌ها و آنیوپلوئیدی‌ها باشد (۶، ۷). سه گروه عمده ژنی که در سرطان‌ها دچار این تغییرات می‌شوند

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

شامل: ژن‌های سرکوبگر تومور، ژن‌های محافظت‌کننده از ژنوم و پروتوانکوژن‌ها هستند. پروتوانکوژن‌ها ژن‌های طبیعی هستند که پس از تغییر و کسب عملکرد جدید به انکوژن تبدیل‌شده و محصول آن‌ها واجد قابلیت ترانسفورم کردن سلول و یا القای سرطان است (۸، ۹). یکی از این تغییرات ژنتیکی که می‌تواند انکوژن را از پروتوانکوژن مربوطه تولید کند تزاید ژن است. تزاید ژن یعنی افزایش تعداد کپی یک ناحیه از ژنوم که موجب تولید تعداد زیادی نسخه از ژن‌های موجود در آن ناحیه شده و درنهایت موجب بیان بیش‌ازحد پروتئین‌های کد شونده می‌گردد (۱۰، ۱۱).

پروتوانکوژن‌ها به گروه‌های مختلفی دسته‌بندی می‌شوند. گروهی از آن‌ها که در انواع سرطان‌ها دچار تزاید ژن شده و به انکوژن تبدیل می‌شوند، سیکلین‌ها هستند که به همراه کینازهای وابسته به آن‌ها در تنظیم چرخه سلول نقش دارند (۱۲، ۱۳). اختلال در فعالیت سایکلین‌ها و کینازهای وابسته نقش مهمی در ایجاد سرطان دارند. به‌طوری‌که عدم تعادل بین سیکلین‌ها، کینازهای وابسته و مهارکننده‌های آن‌ها در سلول‌های بدخیم، منجر به تقسیم سلولی کنترل نشده می‌شوند (۱۴، ۱۵). سیکلین‌هایی که به‌طور مستقیم چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند به چهار گروه A، B، D و E طبقه‌بندی می‌شوند (۱۶). سایکلین E، نقش کلیدی در تنظیم چرخه سلول از مرحله G_1 به فاز S دارد (۱۷). ژن سیکلین E (*Cyclin E*) در انسان بانام‌های *CCNE1* و *pCCNE1* نیز خوانده‌شده و با طول ۲۰۴۳ جفت باز و ۱۲ اگزون بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۱۹ واقع‌شده است (۱۸). همچنین این ژن دارای ۶ ایزوفرم بوده که ایزوفرم اصلی آن پروتئینی به طول ۴۱۰ اسیدآمینه تولید می‌کند (۱۹). پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهند، *Cyclin E* در انواع سرطان‌ها ازجمله سرطان دستگاه گوارش، سرطان خون، سرطان ریه، سرطان پوست و همچنین سرطان پستان تزاید یافته و بیش‌ازحد بیان می‌شود (۱۴، ۲۲-۲۰). Cyclin E در سرطان پستان نیز نقش مهمی داشته و در برخی از موارد سرطانی بیش‌ازحد بیان می‌شود (۲۳، ۲۴). همچنین یک همبستگی قوی بین بیان بیش‌ازحد آن با متاستاز و بقای ضعیف بیمار مشاهده می‌شود (۲۵). علاوه بر اینکه این ژن نقش مهمی در شروع و پیشرفت سرطان پستان دارد به شیمی‌درمانی نیز واکنش نشان می‌دهد (۲۶). پژوهش‌ها نشان می‌دهند، علت عمده بیان بیش‌ازحد این ژن تزاید ژن است که یکی از دلایل آن جهش از دست رفتن عملکرد پروتئین p53 و نامتعادلی‌های کروموزومی حاصل می‌شود (۱۴، ۱۷ و ۱۸).

طبقه‌بندی سنتی سرطان پستان بیشتر بر اساس ویژگی‌های کلینوپاتولوژی بوده و از بیومارکرهای مولکولی کمتر استفاده‌شده است (۲۷). بیومارکرها عواملی هستند که توسط سلول‌های سرطانی، پاسخ بدن به سرطان و یا اختلالات غیر سرطانی تولیدشده و از آن‌ها می‌توان برای اهدافی چون غربالگری، تشخیص، پیش‌آگهی و یا بهبود راهکارهای درمانی استفاده کرد (۲۸). در سال‌های اخیر بررسی تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی ژنوم به‌عنوان بیومارکر مولکولی موردتوجه قرارگرفته است (۲۹). پیش‌ازاین، ظرفیت تغییر بیان ژن، بیان بیش‌ازحد ژن و میزان پروتئین Cyclin E به‌عنوان بیومارکر سرطان پستان جهت تشخیص درجه و مرحله پیشرفت بیماری، پیش‌آگهی و پیش‌بینی روند درمان گزارش‌شده است (۳۳-۳۰). بااین‌وجود، در کنار گزارش‌های مبنی بر تغییر بیان ژن، ظرفیت تزاید ژن *Cyclin E* به‌عنوان بیومارکر مولکولی سرطان پستان مشاهده نشد. ازآنجاکه بیان بیش‌ازحد این ژن ناشی از تزاید این ژن است (۳۴)، بررسی سریع و اختصاصی تزاید ژن *Cyclin E* در سرطان پستان ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا، تزاید ژن *Cyclin E* بررسی شد و ظرفیت آن به‌عنوان بیومارکر مولکولی سرطان پستان ارزیابی شد.

در این پژوهش، جهت بررسی تزاید ژن *Cyclin E* از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. طبق گزارش‌های گذشته، این روش نسبت به سایر روش‌های پیچیده ازجمله FISH و ساترن‌بلات حساسیت و سرعت عمل بالاتری داشته و قابل‌اعتمادتر است (۳۵). در این راستا، تزاید ژن *Cyclin E* در بافت‌های سرطانی و سالم پستان در بیماران مبتلابه سرطان پستان در استان اصفهان با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی و مقایسه شد و ظرفیت آن به‌عنوان بیومارکر مولکولی سرطان پستان ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه و استخراج DNA

مجموع ۱۰۰ نمونه بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن از ۵۰ فرد مبتلابه سرطان پستان، پس از کسب رضایت از آن‌ها، در حین جراحی در بیمارستان الزهرا اصفهان در طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶، توسط پزشک متخصص جدا و جمع‌آوری گردید و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

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 پلیمراز (PCR)، نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ اسپکتوفتومتری و همچنین ژل آگارز ۰/۰۸ درصد موردبررسی قرار گرفتند (۳۶).

طراحی آغازگرها و تنظیم واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی، توالی ژن‌های *Cyclin E* (NC_000019.10) و *TBP* (NC_000006.12) از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI به‌صورت 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 موردبررسی 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 به‌عنوان دمای بهینه اتصال آغازگرها برای ژن هدف *Cyclin E* و 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 تزاید ژن با استفاده از واکنش Real-time PCR از آن استفاده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی‌شده و استفاده‌شده در واکنش Real-time PCR

ژن	نوع آغازگر	توالی آغازگرها	طول قطعه
Cyclin E	رفت	5′-GCAAAGTTGGGCTCTCGGCCTTG-3′	۲۳۲ جفت باز
	برگشت	5′- GCAGGAAATTTGGCAGGAACTG -3′	
Tbp	رفت	5′-AATTAGCCAGGTGTTGTGG -3′	۱۱۵ جفت باز
	برگشت	GCTCTGAGTCACCCAGGCTGG-3′-5′	

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

پس از نرمال کردن غلظت نمونه‌ها، به‌منظور بررسی تزاید ژن *Cyclin E*، واکنش Real-time PCR با آغازگرهای طراحی‌شده 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. به‌منظور 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 محاسبه‌شده و با استفاده از معادله ۱، تزاید ژن *Cyclin E* در نمونه‌ها محاسبه شد.

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

بررسی‌های آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (IBM) نسخه ۲۴ انجام شد. بررسی توزیع داده‌های حاصل از تزاید ژن با استفاده آزمون کولموگروف-اسمیرینوف (Kolmogorov–Smirnov) انجام شد. بررسی تزاید 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 تزاید ژن به‌عنوان یک بیومارکر با استفاده از منحنی ROC (Receiver Operating Characteristics)انجام شد. سطح ۵ درصد برای معنی‌داری آزمون‌ها در نظر گرفته شد.

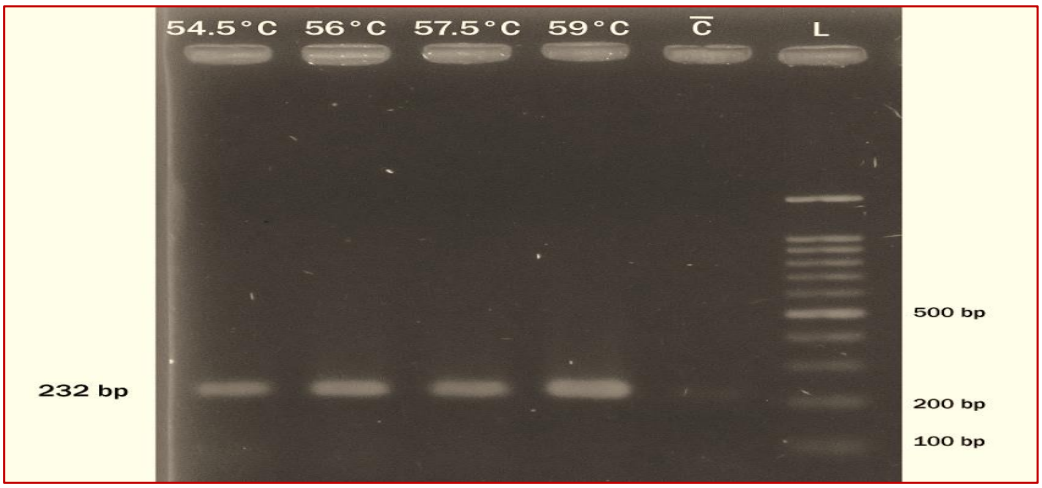
نتایج

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 مورداستفاده قرار گرفت. پس از تکثیر ژن با استفاده از واکنش *PCR* با آغازگرهای طراحی‌شده و اعمال شیب دمایی، محصول *PCR* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. واکنش *PCR* بدون قطعه غیراختصاصی انجام‌شده بود و بهترین دمای

اتصال آغازگرها ۵۹ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۱). پس از نرمال کردن غلظت نمونه‌ها، جهت بررسی تزاید ژن *Cyclin E* واکنش *Real-time PCR* انجام شد. ترسیم منحنی ذوب حاصل از واکنش‌ها، حاکی از صحت عملکرد آغازگرها در مراحل انجام آزمایش بود (شکل‌های ۲ و ۳). بررسی داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از آزمون آماری کولموگروف – اسمیرینوف نشان داد، مقادیر تزاید ژن *Cyclin E* از توزیع نرمال پیروی نمی‌کند ($p < ۰/۰۵$)؛ بنابراین جهت مقایسه این مقادیر بین دو

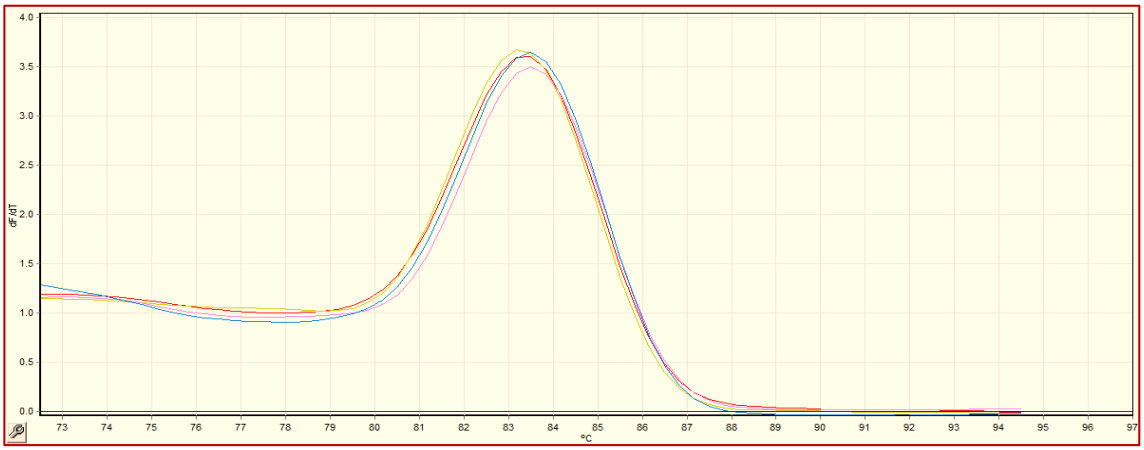
جدول ۲- ویژگی‌های دموگرافیکی و کلینوپاتولوژیکی بیماران

ویژگی‌ها		تعداد (درصد)
سن بیماران	≤ ۴۵	۲۳ (۴۶)
	> ۴۵	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)

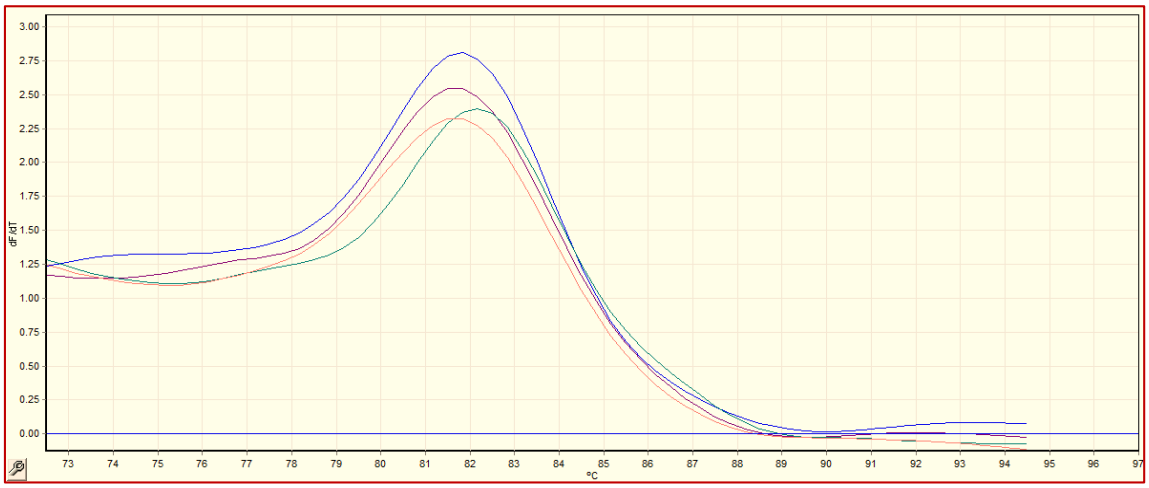


شکل ۱- محصول واکنش PCR با آغازگرهای طراحی‌شده ژن *Cyclin E* و اعمال شیب دمایی از ۵۴/۵ تا ۵۹ درجه سانتی‌گراد بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

گروه سرطانی و سالم از آزمون ناپارامتری ویلکاکسون استفاده شد. یافته‌های حاصل از این آزمون نشان داد، مقدار تزاید ژن *Cyclin E* در بافت سرطانی به‌طور معنی‌داری بیشتر از بافت سالم مجاور است (Z = ۳/۱۱ ،p = ۰/۰۰۲). همچنین، بررسی میانگین‌ها با استفاده از آزمون T زوجی نیز نشان داد، میانگین تزاید این ژن در بافت‌های سرطانی (D = ۰/۶۳، M = ۱/۱۲) به‌طور معنی‌داری بیشتر از بافت‌های سالم (D = ۱/۵۳، M = ۱/۸۵) است (t = ۳/۰۹ ،p = ۰/۰۰۳) (نمودار ۱) (جدول ۳).



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



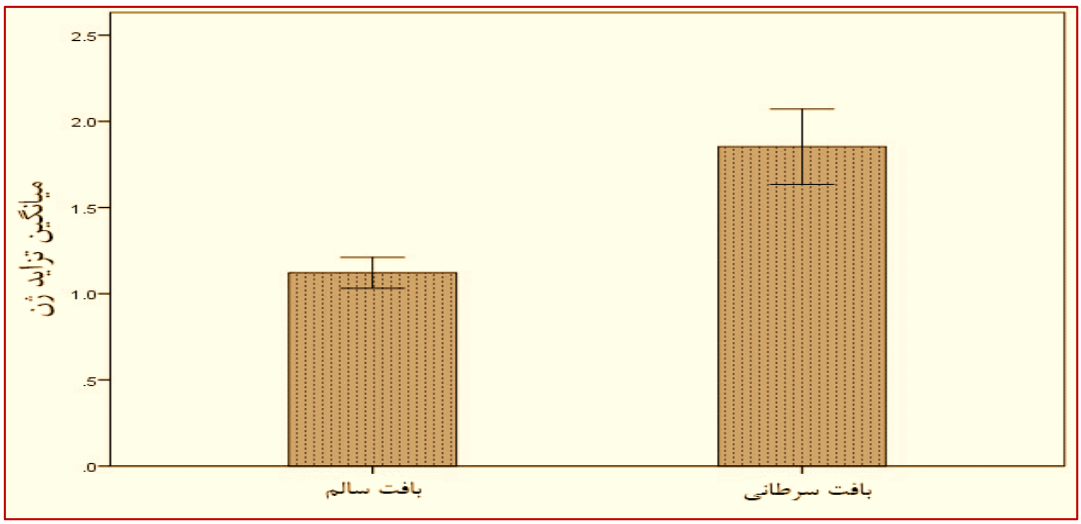
شکل ۳- منحنی ذوب حاصل از ژن مرجع *Tbp*

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

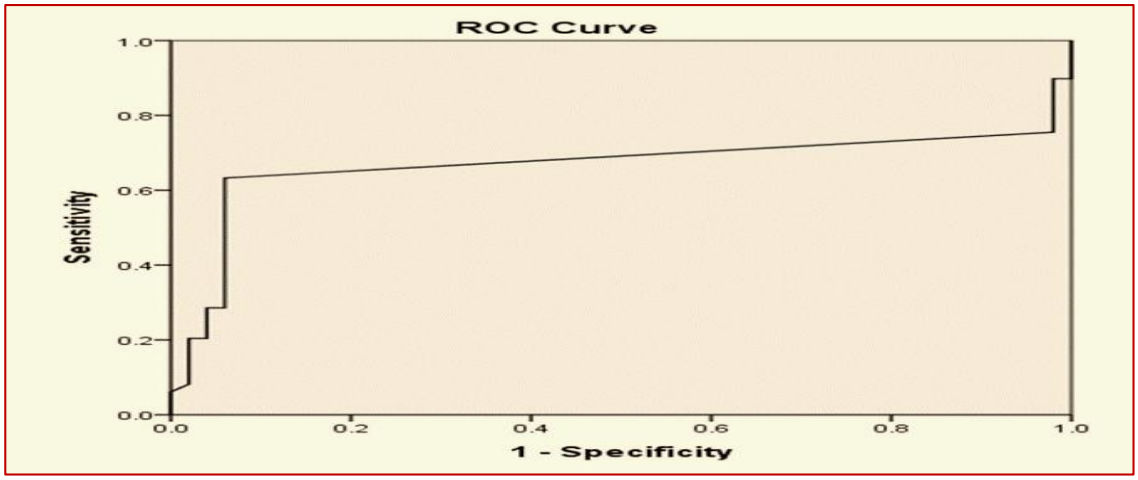
شاخص آماری	بافت سالم	بافت توموری
میانگین	۱/۱۲	۱/۸۵
انحراف معیار	۰/۶۳	۱/۵۳
میانه	۱	۱/۳۲
حداقل	۰/۲۹	۰/۱۷
حداکثر	۴/۹۲	۶/۲۸

همچنین، بررسی حساسیت و اختصاصیت تزاید 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 تزاید بیان این ژن در دو گروه موردبررسی تفکیک‌شده‌اند (شکل ۴).

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



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



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

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

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 تزاید 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

نقش سیکلین E در چرخه سلولی و ایجاد سرطان پستان، مطالعه این ژن ضروری به نظر می‌رسد. به‌طوری‌که بررسی بیان و تزاید 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، تزاید 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 وسترن‌بلات 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 تزاید و بیان این ژن در سرطان پستان نوع HER2-مثبت نشان می‌دهد، بیان *Cyclin E* بیش‌ازحد بوده و باوجود محدودیت در این نوع سرطان، واجد ظرفیت تشخیص و پیش‌آگهی سرطان است (۴۷). در این پژوهش، تزاید ژن *Cyclin E* در افراد مبتلابه سرطان پستان در استان اصفهان بررسی شد و ظرفیت آن به‌عنوان بیومارکر مولکولی جهت تشخیص و پیش‌آگهی سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت. در بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده، بررسی بیان و تزاید ژن *Cyclin E* با استفاده از روش‌هایی همچون ایمنوهیستوشیمی، وسترن بلات، FISH (fluorescence in situ hybridization) و CGH (Comparative Genomic Hybridization) انجام‌شده 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 تزاید ژن *Cyclin E* با استفاده از مقدار Ct محاسبه‌شده به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین گردید. پس از بررسی داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ویلکاکسون، تزاید ژن در بافت‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری مشاهده شد ($p = ۰/۰۰۲$). این یافته با یافته‌های حاصل از بررسی تزاید ژن *Cyclin E* در سلول‌های سرطان پستان که تزاید ۸ برابری ژن را نشان می‌دهند (۱۵) همسو بود. بررسی میانگین تزاید ژن بین بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن با استفاده از آزمون T زوجی نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p = ۰/۰۰۳$).

مطالعه تزاید و بیان بیش‌ازحد 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، گزارش‌شده است (۴۸). به‌طوری‌که تغییر بیان این ژن و بیان بیش‌ازحد آن به‌عنوان بیومارکر جهت تشخیص پیشرفت بیماری، پیش‌آگهی و پیش‌بینی روند درمان سرطان پستان معرفی‌شده است (۴۹). بااین‌وجود، گزارشی مبنی بر ارزیابی ظرفیت تزاید ژن *Cyclin E* به‌عنوان بیومارکر سرطان پستان مشاهده نشد. در این راستا، یافته‌های حاصل از بررسی تزاید ژن، جهت ارزیابی ظرفیت تزاید ژن *Cyclin E* به‌عنوان 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 تزاید *Cyclin E* به‌عنوان 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 تزاید ژن *Cyclin E* با پیشرفت بیماری وجود نداشت که این مسائل می‌تواند از محدودیت‌های این پژوهش تلقی شود. برای تائید یافته‌های حاصل از این پژوهش، بررسی تزاید این ژن و ظرفیت آن به‌عنوان یک بیومارکر مولکولی در انواع مختلف سرطان‌های پستان و همچنین نمونه‌های بیشتر پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد، تزاید ژن *Cyclin E* در سرطان پستان به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. از تزاید ژن *Cyclin E* می‌توان به‌عنوان 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 موردمطالعه کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند، هیچ‌گونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

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.3nd 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, Gorringe 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− ΔΔCT method. methods. 2001; 25 (4): 402–8. 2001.
39. Varangot M, Barrios E, Sóñora 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 M[2], Houshmand M[3]

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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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

Journal of Fasa University of Medical Sciences 10 (2020): 2625-2635