نقش بیان ژن یوبیکوئیتین D (UBD) در پیش‌آگهی سرطان پستان

طیبه باقری
الهام مسلمی *

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران.

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۱ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۵/۱۰

زمینه و هدف: در ایران سرطان پستان دومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان پوست می‌باشد. یوبیکوئیتین و پروتیین‌های شبه یوبیکوئیتین ناقلان سیگنال رسانی هستند که عملکردهای سلولی مختلفی برعهده داشته به طوری‌که در بسیاری موارد باعث تسریع پیشرفت سرطان می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن یوبیکوئیتین D (UBD) در زنان مبتلا به سرطان پستان و همچنین بررسی ارتباط پیشرفت بیماری با میزان بیان این ژن بود.

روش بررسی: این مطالعه به‌صورت موردی- شاهدی است که در آن ۳۰ نمونه بلوک پارافینه بافت (۲۰ نمونه بیمار و ۱۰ نمونه ماموپلاستی) مربوط به اردیبهشت سال ۱۳۸۹ تا فروردین ۱۳۹۱ پس از بررسی پاتولوژیست از آزمایشگاه بیمارستان‌های پارسیان و کسری واقع در تهران جمع‌آوری گردید. استخراج RNA با استفاده از RNX-plus و سنتز cDNA به کمک آنزیم Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) انجام شد. بیان ژن بر روی تمام نمونه‌ها با روش Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) نسبی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان ژن UBD به صورت میانگین، در حدود ۱۱ برابر نسبت به گروه نرمال افزایش یافت که با مراحل (Stage) بیماری نیز افزایش یافت. به‌طوری که در گروه بیماران مرحله ۱، بیان ژن UBD ۲/۷۳ برابر نسبت به گروه نرمال (P=۰/۰۰۱) افزایش یافت و در مرحله ۴ بیماری این عدد به ۱۹/۴ برابر نسبت به نرمال (P=۰/۰۰۰۵) افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان بیان نمود بررسی میزان بیان UBD می‌تواند نقش مهمی در تشخیص سرطان پستان، به‌عنوان یک مارکر به عهده داشته باشد. به‌علاوه با توجه به افزایش بیان این ژن با مراحل بیماری، بررسی تغییرات در بیان این ژن می‌تواند در شناسایی و تشخیص مراحل اولیه بیماری موثر باشد.

کلمات کلیدی: پروتیین UBD، نئوپلاسم پستان، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی، بیان ژن.

* نویسنده مسئول: تهران، اتوبان خاوران، شهرک قیامدشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق
تلفن: ۳۳۵۸۴۹۱۴-۰۲۱
E-mail: elham_moslemi60@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان یکی از سرطان‌های شایع در جهان است و به عنوان اولین علت مرگ و میر ناشی از سرطان، بین زنان شناخته شده است. سرطان پستان دومین سرطان شایع در کل جمعیت زن و مرد، پس از سرطان پوست در ایران می‌باشد.[۱] همچنین شایعترین سرطان در زنان ایرانی محسوب می‌شود. بیشترین سن بروز آن در زنان ۵۵-۴۵ سال می‌باشد. میزان بروز سرطان در سال ۲۰۰۹ در زنان ۲۸/۲۵ و در مردان ۰/۷۵٪ در ۱۰۰/۰۰۰ نفر بوده است. بر اساس گزارش رسمی سرطان کشور منتشره توسط وزارت بهداشت و درمان، روند رشد سرطان پستان در ایران سالیانه حدود ۱۰٪ می‌باشد.[۱و۲]

سرطان پستان یک بیماری چند عاملی است که عوامل ژنتیکی و محیطی نقش مهمی در بروز آن دارند. اگر چه فاکتورهای شناخته شده هورمونی و شیوه زندگی نقش مهمی در ابتلا به سرطان دارند، اما سابقه خانوادگی یکی از مهمترین عوامل بروز بیماری محسوب می‌شود. احتمال ابتلا به سرطان پستان در زنان را با سابقه بیماری در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-08]

اعضاء درجه اول خانواده در مقایسه با کسانی که در آنها سابقه خانوادگی وجود ندارد، دو برابر است.[۱-۵] در سال‌های اخیر، روش‌های تشخیص مولکولی از جمله بررسی بیان چند ژنی، برای مدیریت بهتر سرطان پستان با استفاده از داده‌های بالینی و نتایج هیستوپاتولوژی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است.[۱] با بهره‌گیری از روش‌های مولکولی جدید شناسایی نواحی فراوان در ژنوم که دچار تغییرات، چه در سطح کروموزمی و چه در سطح DNA می‌شوند امکان‌پذیر است.

مطالعات نشان داده است که میزان یوبیکوئیتین D (UBD) که همچنین به عنوان FAT10 نیز شناخته می‌شود، در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. UBD اولین بار در بافت رتیکولو اندوتلیال و سیستم لنفوییدی مخاطی به‌عنوان یکی از ژن‌های لوکوس MHC کلاس ۱ واقع در کروموزوم ۶ انسان شناخته شد.[۶-۸]

UBD نقش مهمی در تخریب پروتیین‌های مختلف بر عهده دارد، منجمله در تمایز سلولی تنظیم چرخه سلولی، امبریوزیس، آپوپتوزیس، انتقال پیام، ترمیم DNA، انتقال عرض سلولی، پاسخ به استرس و پاسخ ایمنی که تمامی این اعمال به وسیله تخریب پروتیین‌ها انجام نمی‌شوند را بر عهده دارد.[۹]

بررسی‌ها نشان داده میزان بیان UBD در ایجاد توده‌ی سرطانی موثر است.[۹-۱۱] کاهش بیان UBD منجر به القای غیرطبیعی آپوپتوزیس، تقسیم سلولی و یا ناپایداری کروموزومی می‌شود که با تغییرات نئوپلازی همراه است.

افزایش بیان UBD در سرطان معده با متاستاز همراه است و سطح mRNA ی یوبیکوئیتین D و همچنین پروتیین آن به‌عنوان یک فاکتور غیروابسته در بیماری شناخته شده است.[۱۲] افزایش UBD با بیان p53 مرتبط بوده که منجر به بیان UBD به‌طور غیرمستقیم و به دنبال آن تسریع پیشرفت سرطان معده می‌شود.[۱۲] ارتباط میان بیان UBD با تمایز سلولی و مراحل پیشرفته تومور بیان می‌کند که به احتمال UBD در پیشرفت کارسینوژنز دخالت دارد.

به‌طور کلی به نظر می‌رسد UBD به‌عنوان یک شاخص مهم در پیش‌بینی، تشخیص، بررسی پیشرفت سرطان روده و همچنین به عنوان یک فاکتور آگاهی دهنده، در مراحل ابتدایی بیماری را می‌توان مورد بررسی قرار داد. تاکنون ارتباط بیان این ژن با احتمال متاستاتیک سرطان پستان در جمعیت ایرانی ارزیابی نشده است. هدف از این مطالعه شناسایی UBD به‌عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص اولیه و زود هنگام در افراد مبتلا به سرطان پستان توسط تکنیک Real-time PCR می‌باشد.

روش بررسی

جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌ها: در این مطالعه‌ی موردی-شاهدی ۲۰ نمونه بلوک پارافینه بافت افراد مبتلا به سرطان پستان پس از بررسی توسط متخصص پاتولوژی و رعایت فاکتورهای یکسان برای نمونه‌ها و ۱۰ نمونه از افراد سالم (ماموپلاستی) از آزمایشگاه بیمارستان‌های پارسیان و کسری از اردیبهشت ۱۳۸۹ تا فروردین ۱۳۹۱ جهت برش‌گیری انتخاب و جمع‌آوری گردید. افراد انتخاب شده از نظر سنی در طیف ۶۸-۲۱ ساله قرار داشتند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال داده شد و مراحل استخراج بلافاصله بر روی آنها انجام گردید. همچنین نمونه‌ها را برای نگهداری در زمان طولانی‌تر در یخچال $4\ ^{\circ}C$ قرار داده شد.

استخراج RNA: برای استخراج RNA از بافت پارافینه ابتدا توسط دستگاه میکروتوم برش‌های با اندازه ۱۰ میکرون از بافت تهیه شد. پارافین‌زدایی و استخراج RNA با کمک محلول RNX-Plus (CinnaGen, Iran) انجام گرفت.[۹] خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی و تایید گردید.

سنتز cDNA: مواد لازم برای سنتز cDNA، شامل ۰/۵Mm dNTP، ۰/۲ µg Hexamer Random، ۰/۵ µg Oligo dT، ۱۰۰U آنزیم Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) (CinnaGen Inc., Tehran, Iran) می‌باشد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در $42\ ^{\circ}C$ قرار داده شد.

طراحی پرایمر برای Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR): طراحی پرایمر با استفاده Primer Express software, version 3 (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) و به صورت exon- exon junction طراحی گردید. همچنین به منظور بررسی دقت پرایمرهای طراحی شده در سایت Blast بررسی شد. دمای پیوند پرایمرهای ژن هدف و کنترل داخلی نزدیک به هم طراحی گردید. توالی پرایمرهای طراحی شده به شرح زیر می‌باشد: UBD Forward: GCTGCATGCAAAGTCCTTTTTC و UBD Revers:

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-08]

GAAGCATTGGGAGCCATCTC با وزن مولکولی ۷۲ جفت باز و همچنین پرایمرهای کنترل داخلی GAPDH F: CCCACACACATGCACTTACC و GAPDH R: TGCCTGTCCTTCCTAGCTCT با وزن مولکولی ۸۵ جفت باز در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته شد.

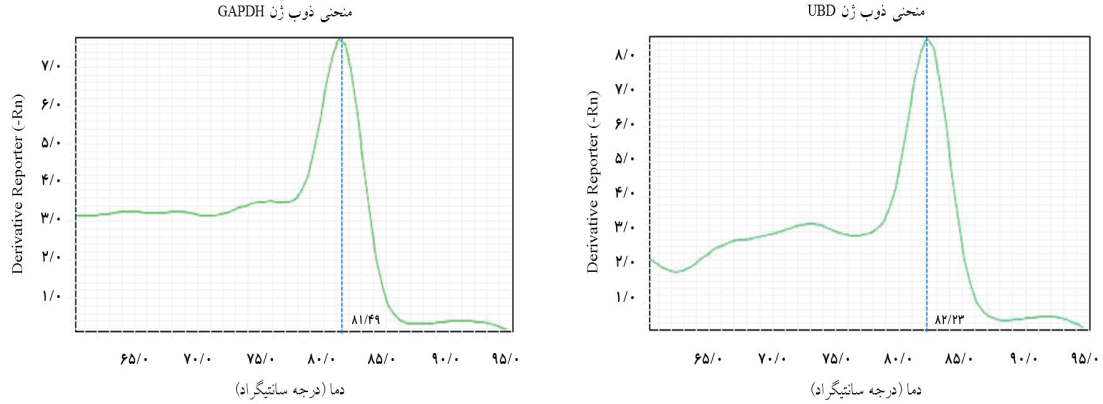
انجام واکنش RT-PCR: تکثیر ژن‌های UBD و GAPDH برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش RT-PCR صورت گرفت و تعیین کمیت نسبی آن با استفاده از دستگاه (Roche Applied Bioscience, Indianapolis, IN) ABI-7500 صورت گرفت. اجزای واکنش RT-PCR در حجم نهایی ۲۰ µl و شامل SYBR TM(2X) Master Mix و Forward and Reverse Primers (0.4 µM) با برنامه دمایی به‌صورت دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت سه دقیقه به دنبال آن ۴۵ سیکل، به‌صورت دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ ثانیه، چسبیدن در دمای ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه، انجام شد.

یافته‌ها

میزان بیان ژن UBD: با توجه به این نکته که از رنگ فلورسانت سایبرگرین استفاده شده است، در این پژوهش به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها و رنگ فلورسانس سایبرگرین و اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیراختصاصی در محصول PCR، نمودار منحنی ذوب برای ژن UBD و GAPDH (نمودار ۱) به‌صورت جداگانه توسط دستگاه RT-PCR رسم گردید، که این امر تاییدی بر پیوند صحیح پرایمرها به ژن UBD و محصول آمده درست برای ژن مورد نظر می‌باشد. همچنین برای تایید نهایی، این محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ مشاهده شد، که محصول اختصاصی تک باند نیز با وزن مولکولی مورد نظر برای این ژن مشاهده گردید. پس از انجام واکنش تکثیر، Ct نمونه‌ها توسط دستگاه محاسبه و به Relative quantification (RQ) یا میزان بیان تبدیل شد و اندازه گیری میزان بیان ژن با روش ΔΔCt انجام شد. میزان بیان نمونه‌های بیمار به صورت مقایسه‌ای با نمونه‌های نرمال بیان گردید که در این امر نتایج به دست آمده نسبت به میزان بیان همان ژن در بافت نرمال می‌باشد. RQ نمونه‌ها از دستگاه برداشته شد و نتایج به دست آمده توسط GraphPad Prism, version 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) رسم گردید (نمودار ۲).

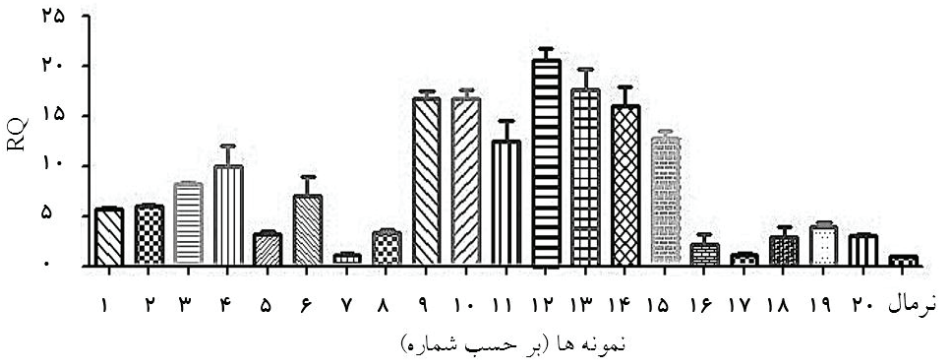
شکل ۲ مقایسه‌ی میزان بیان ژن UBD در نمونه‌های بیمار و سالم (۱۰ نمونه سالم در این نمودار به صورت میانگین به یک نمونه تبدیل شده است و مجموع میزان بیان یک در نظر گرفته شد) را نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار ۳ مشخص است، با افزایش مرحله (Stage) بیماری و اندازه تومور، میزان بیان ژن در مراحل بالاتر آشکارا افزایش می‌یابد. لازم به یادآوری است که از ۲۰ نمونه بیمار تمام نمونه‌ها، دارای افزایش بیان می‌باشد.

مقایسه نتایج نشان می‌دهد ژن UBD در نمونه‌های دارای مرحله پایین‌تر بیان کمتری نسبت به نمونه‌های دارای مرحله بالاتر می‌باشند. همانطور که نتایج نشان می‌دهد میزان بیان ژن UBD در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم افزایش بیان داشته و این افزایش بیان

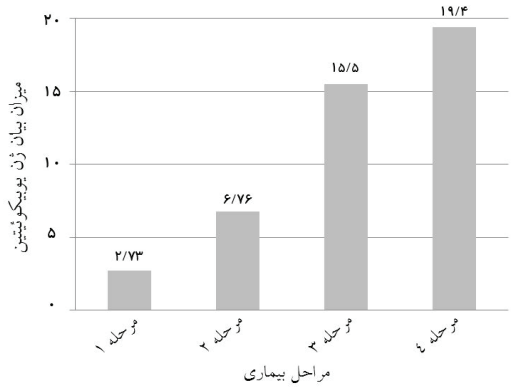


نمودار ۱: نمودار منحنی ذوب ژن‌های UBD, GAPDH.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-08]



نمودار ۲: آنالیز بررسی بیان ژن UBD در نمونه‌ها بیمار نسبت به کنترل. RQ: میزان بیان ژن UBD را نسبت به نمونه نرمال نشان می‌دهد. اعداد نشان‌دهنده شماره نمونه می‌باشند.



نمودار ۳: بررسی میزان بیان ژن UBD در بیماران دارای سرطان پستان بر اساس مرحله بیماری به صورت میانگین

بر اساس نمودار بالا که به وسیله برنامه آنالیزکننده دستگاه RT-PCR انجام شد که در نمونه ۱۲ بیشترین افزایش و در نمونه هفت کمترین افزایش بیان وجود داشت. در مراحل ۲ و ۳ (P=۰/۰۰۱) این افزایش بسیار زیاد بود و در مرحله ۴ (P=۰/۰۰۰۵) نیز این میزان افزایش قابل مشاهده داشت. همچنین ۷۰٪ از افراد مورد مطالعه دارای سابقه بیماری خانوادگی در سنین کمتر از ۵۰ سال داشتند.

بحث

سرطان پستان پس از سرطان ریه، دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و پس از سرطان غیرملانومی پوست، شایعترین سرطان زنان است. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی (World health organization, WHO)، هر ساله بیش از ۱/۲ میلیون بیمار مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده شده و بیش از ۵۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری فوت می‌کنند و میزان ابتلا بر خلاف ایالات متحده، در کشورهای در حال رشد رو به افزایش است.[۱۳]

کشور ایران نیز از این امر جدا نیست. چنانکه این سرطان عامل ۲۱/۴٪ از کل بدخیمی‌ها و شایعترین سرطان در زنان ایرانی است. افزون بر شیوع بالای سرطان پستان در ایران، توجه به این موضوع که زنان ایرانی در مقایسه با کشورهای توسعه یافته، حداقل یک دهه زودتر به این بیماری گرفتار می‌شوند، اهمیت آن را دو چندان می‌کند.[۲]

در این مطالعه برای اولین بار اقدام به شناسایی mRNA ژن UBD در نمونه‌های پارافینه بافت پستان می‌باشد. بلوک‌های پارافینه سرچشمه داده‌های ارزنده‌ای را در بخش پاتولوژی بیمارستان‌ها برای انجام مطالعات گسترده، فراهم می‌نماید. Yan و همکارانش میزان پروتیین UBD در بافت مبتلایان به سرطان روده را با کمک

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-08]

تکنیک‌های qPCR و Tissue microarray (TMA)، وسترن بلات و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که افزایش میزان سیتوپلاسمی UBD به‌طور مستقیم با مراحل بیماری و ایجاد متاستاز بستگی دارد. آنها همچنین بیان نمودند که میزان طول عمر در افراد مبتلا به سرطان روده UBD منفی به مراتب بیشتر از افراد UBD مثبت می‌باشد.[۱۶] نتایج مطالعه Ren و همکاران نشان داد که میزان بیان FAT10 از طریق گیرنده TNF(TNFR1) و مسیر NF-kβ افزایش می‌یابد. بنابراین درمان با TNF-α می‌تواند بیان FAT10 را نیز مهار کند.[۱۷]

Qing و همکارانش وابستگی افزایش بیان FAT10 و مرحله سرطان روده را بررسی کردند. آنها از مقایسه سلول‌های مختلف با سلول‌ها در فازهای مختلف سرطان استفاده کردند و تکنیک‌های مورد استفاده آنها ایمونوهستوشیمی و میکروسکوپ فلورسنت بود. مطالعات آنها نشان داد که افزایش بیان FAT10 از مرحله آدنومای دندانه دار آغاز می‌شود و تا مراحل Villous و Villotubular و آدنوکارسینومای مهاجم ادامه می‌یابد.[۱۸]

Izadi و همکارانش مشخص نمودند که ژن UBD در مراحل ۲ و ۳ سرطان روده در تکنیک RT-PCR تغییرات بسیار زیادی دارد و مطالعات آنها نشان داد که ژن UBD در افراد بیمار ۹۷٪ بیان می‌شود در حالی که این عدد در افراد سالم به ۵٪ کاهش می‌یابد.[۹]

در مطالعه‌ای که توسط Fan و همکاران صورت گرفت افزایش بیان FAT10 در سلول‌های کارسینومای کولون نسبت به سلول‌های مخاط طبیعی کولون با استفاده از ریزتشریح لیزری و ریزآرایه‌های cDNA به اثبات رسید. نتایج مطالعات آنها نشان داد که بیان FAT10 در مکانیسم پیشرفت از پلیپ‌های خوش‌خیم به کارسینومای تهاجمی نقش موثری دارد.[۱۹]

Oliva و همکارانش مهار افزایش بیان UBD توسط TNFα و INFγ را مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان نمودند که درمان توام با TNFα و INFγ باعث کنترل بیشتر روند پیشرفت بیماری می‌شود.[۲۰] بر اساس پژوهش‌های پیشین بیان شده UBD توسط P53 تنظیم می‌گردد و کارکردن و یا حذف نکردن آن را P53 تعیین می‌کند و همچنین افزایش بیان UBD به کاهش بیان P53 نسبت داده شده است.[۲۱]

نتایج نشان داد که میزان mRNA مربوط به UBD در بافت‌های سرطانی و بافت‌های اطراف تومور افزایش یافته است. افزایش بیان UBD به ویژه در نمونه‌های افراد در مرحله ۲ و ۳ بیماری دیده شد.[۹] از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم دسترسی به برخی داده‌ها از جمله تعداد غدد لنفاوی برداشته شده، متاستاز به کبد، ریه، نوع عمل جراحی و ... اشاره نمود که می‌توانند تأثیر مهمی در بقای بیماران مبتلا به سرطان پستان داشته باشند.

اگرچه تاکنون وضعیت غدد لنفاوی بین مرحله ۲ و ۳ و متاستاز بیشتر به‌عنوان یک عامل پیش‌آگهی برای سرطان پستان در نظر گرفته شده است، اما این امر که باید غدد لنفاوی همیشه مورد بررسی قرار گیرند موضوعی است که قابل بحث باقی مانده است.[۲۲و۲۳]

مطالعات ما نشان می‌دهد، افزایش بیان ژن UBD ارتباط مستقیمی با مرحله بیماری و اندازه تومور دارد و این امر به طور کامل به استنباط رسیده است که هرچه مرحله بیماری افزایش داشته باشد، میزان بیان UBD نیز افزایش می‌یابد (شکل ۳-۵).

این اولین گزارشی است که در جهان با شناسایی mRNA ژن UBD بیان این ژن را در بافت پستان افراد مبتلا به سرطان پستان در ایران نشان داده و نقش آن را در سلول‌های بافت پستان مورد بررسی قرار می‌دهد.

نتایج این مطالعه می‌تواند در پیشرفت پیش‌آگهی از سرطان موثر واقع گردد. مطالعه‌ی کنونی و نیز گزارش‌های گذشته نشان می‌دهند که پیشگویی صحیح پیامد در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان مشکلی بالینی و پیچیده مطرح می‌باشد. با وجود مطالعات گسترده‌ای که در زمینه سرطان در سراسر جهان صورت گرفته، صحت عوامل تعیین شده همچنان جای تردید دارد. افزون بر آن، پیشرفت بیماری با افزایش خطر مرگ ناشی از این بیماری همراه می‌باشند. انجام مطالعات آتی جهت تعیین نقش عوامل مختلف بالینی و آسیب شناختی در جهت شناخت پیش‌آگهی سرطان پستان ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج این مطالعه نشان داد UBD می‌تواند نقش مهم و موثری در تشخیص اولیه سرطان پستان به عنوان یک مارکر زیستی، مستقل از مرحله تومور، بر عهده داشته باشد. این مطالب اطلاعات اولیه در زمینه نقش UBD بوده و مطالعات گسترده‌تری برای تایید دقیق نقش پیش‌آگهی دهنده این فاکتور مورد نیاز است. همچنین تغییر در بیان این ژن‌ها نقش مهمی را در تمایز سلول‌های سرطان پستان و پیشروی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-08]

تومور ایفا می‌کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی یوبیکوئیتین D در نمونه بلوک پارافینه افراد مبتلا به سرطان سینه" در مقطع کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی در سال ۱۳۹۳ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق اجرا شده است.

References

1. Patani N, Martin LA, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *Int J Cancer* 2013;133(1):1-13.
2. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, et al; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 2002; 87(11):1234-45.
3. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk: where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005;9(1):208-21.
4. Elmasry K, Gayther SA. Ovarian cancer aetiology: facts and fiction. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2006;32(2):82-6.
5. Easton DF. Familial risks of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4(5):179-81.
6. Ren J, Kan A, Leong SH, Ooi LL, Jeang KT, Chong SS, et al. FAT10 plays a role in the regulation of chromosomal stability. *J Biol Chem* 2006;281(16):11413-21.
7. Raasi S, Schmidtke G, Groettrup M. The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276(38):35334-43.
8. Canaan A, Yu X, Booth CJ, Lian J, Lazar I, Gamfi SL, et al. FAT10/diubiquitin-like protein-deficient mice exhibit minimal phenotypic differences. *Mol Cell Biol* 2006;26(13):5180-9.
9. Izadi A, Moslemi E, Poorhosseini SM, Yassaee VR, Kheiri HR, Elikai HR. UBD identify in paraffin tissues in patients with colorectal cancer. *J Isfahan Med School* 2014;32(291):1-10.
10. Lee CG, Ren J, Cheong IS, Ban KH, Ooi LL, Yong Tan S, et al. Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers. *Oncogene* 2003;22(17):2592-603.
11. Lukasiak S, Schiller C, Oehlschlaeger P, Schmidtke G, Krause P, Legler DF, et al. Proinflammatory cytokines cause FAT10 upregulation in cancers of liver and colon. *Oncogene* 2008;27(46):6068-74.
12. Ji F, Jin X, Jiao C-H, Xu Q-W, Wang Z-W, Chen Y-L. FAT10 level in human gastric cancer and its relation with mutant p53 level, lymph node metastasis and TNM staging. *World J Gastroenterol* 2009; 15(18): 2228-33.
13. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 1991;68(10):2142-9.
14. Nilsson KR, Berenholtz SM, Dorman T, Garrett E, Lipsett P, Kaufman HS, et al. Preoperative predictors of blood transfusion in colorectal cancer surgery. *J Gastrointest Surg* 2002;6(5):753-62.
15. Bear HD, MacIntyre J, Burns HJ, Jarrett F, Wilson RE. Colon and rectal carcinoma in the west of Scotland. Symptoms, histologic characteristics, and outcome. *Am J Surg* 1984;147(4):441-6.
16. Yan DW, Li DW, Yang YX, Xia J, Wang XL, Zhou CZ, et al. Ubiquitin D is correlated with colon cancer progression and predicts recurrence for stage II-III disease after curative surgery. *Br J Cancer* 2010;103(7):961-9.
17. Ren J, Wang Y, Gao Y, Mehta SB, Lee CG. FAT10 mediates the effect of TNF-α in inducing chromosomal instability. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 21):3665-75.
18. Qing X, French BA, Oliva J, French SW. Increased expression of FAT10 in colon benign, premalignant and malignant epithelial neoplasms. *Exp Mol Pathol* 2011;90(1):51-4.
19. Fan J, Yang X, Wang W, Wood WH, Becker KG, Gorospe M. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(16):10611-6.
20. Oliva J, Bardag-Gorce F, French BA, Li J, McPhaul L, Amidi F, et al. Fat10 is an epigenetic marker for liver preneoplasia in a drug-primed mouse model of tumorigenesis. *Exp Mol Pathol* 2008;84(2):102-12.
21. Zhang DW, Jeang KT, Lee CG. p53 negatively regulates the expression of FAT10, a gene upregulated in various cancers. *Oncogene* 2006;25(16):2318-27.
22. Johnson PM, Porter GA, Ricciardi R, Baxter NN. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long-term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3570-5.
23. Wang J, Hassett JM, Dayton MT, Kulaylat MN. The prognostic superiority of log odds of positive lymph nodes in stage III colon cancer. *J Gastrointest Surg* 2008;12(10):1790-6.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-08]

TUMJ Tehran University Medical Journal, September 2015; Vol. 73, No. 6: 413-419 Original Article

UBD role of gene expression in patients with breast cancer

Tayebeh Bagheri M.Sc.
Elham Moslemi Ph.D.*

Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Received: 12 Aug. 2014 Accepted: 01 Jun. 2015 Available online: 01 Aug. 2015

***Background*:** Breast cancer is the most common non- skin cancer among women and it's the second leading cause of cancer related death in women. Ubiquitin and ubiquitin like proteins are member of signal transduction pathways which have several cellular functions. It has shown that Ubiquitin like protein D (UBD) has accelerated the cancer progress. The aims of this study is evaluation of UBD gene expression in women suffering from breast cancer and its correlation with disease progression.

***Methods*:** In this study 30 FFPE (Formalin-fixed, paraffin-embedded) samples 20 cases from breast cancer and 10 cases from mammoplasty were collected from Parsian and Kasra Hospitals in Tehran after confirmation by pathologist. For each sample collection characters included ER-positive, lymph node negative, tumor size less than 5 cm in diameter were considered. Samples belonged to May 2010 up to April 2012. At first paraffin was removed by adding xylene then xylene removed with replacing ethanol 98%. After removing ethanol, RNA was extracted from samples by using RNX plus solution and cDNA synthesis were performed by using Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) enzyme. UBD gene expression were examined in all samples cDNA by relative Real Time PCR. In this study GAPDH gene expression was also used as internal control.

***Results*:** UBD gene expression was obtained by calculating ΔΔCT and RQ. The average incensement of UBD gene expression in comparison of normal samples was 11 times. The results have shown that the level of UBD expression was related to the development and extend of the disease. In patients with stage 1 of disease, UBD gene expression had 2.73 times increase (P=0.001) compared to the control samples. However in stage 4 of disease, this number has increased up to 19.4 times (P=0.0005) more than normal.

Conclusion: Considering the results of this study, it could be said that UBD gene expression as useful biomarker has an important role in detection of breast cancer. In addition as UBD gene expression levels increased; stages of disease increased too. So that evaluation of UBD gene expression can be useful in early detection of disease.

Keywords: breast neoplasms, gene expression, Real-time polymerase chain reaction, UBD protein.

* Corresponding author: Islamic Azad University, East Tehran Unite, Ghiamdasht, Khavaran Ave., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 33584914
E-mail: elham_moslemi60@yahoo.com

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-08]