مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۵, شمـاره‌ی ۱۰۹, خرداد و تیر ۱۳۹۶, صفحات ۷۵ تا ۸۵

بررسی ارتباط پروتئوم بافت توموری پستان در زنان مبتلا به سرطان پستان داکتال مهاجم با شاخص توده بدنی

معصومه حسینی[۱]، دکتر علی ملتی[۲]، دکتر سید سعید موسوی[۳]، دکتر محمد حسین مقیمی[۴]، دکتر علی رمضانی[۵]

نویسنده‌ی مسئول: مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان Mellati@zums.ac.ir

دریافت: ۹۴/۱۰/۳ پذیرش: ۹۵/۶/۱

چکیده

زمینه و هدف: *گزارشات متعدد حاکی از تاثیر چاقی بر افزایش شیوع سرطان پستان در جوامع مختلف است. روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای پی بردن به مکانیسم‌های مولکولی و مارکرهای بیوشیمیایی دخیل در بروز سرطان پستان که اغلب ناشناخته هستند به کار برده شده است. در مطالعه‌ی حاضر، به بررسی ارتباط پروفایل پروتئینی بافت توموری پستان در زنان و شاخص توده‌ی بدنی (BMI) پرداخته شده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی توصیفی- تحقیقی، بیوپسی بافت توموری از ۱۰ زن مبتلا به سرطان پستان داکتال مهاجم برداشته شد. بیماران در دو گروه BMI بالا (میانگین ۳۳/۴۱) و پایین (میانگین ۲۶/۰۴) قرار گرفتند. آنالیز پروتئین‌های هموژنه بیوپسی تومور پستان با فن آوری پروتئومیکس انجام شد. در این روش تفکیک پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی، آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image master 2D platinium6.0، و آزمون t با سطح اطمینان ۹۵ درصد و شناسایی هویت پروتئین‌های موردنظر با اسپکتروفتومتری جرمی MALDI-TOF MS/MS انجام گرفت.*

یافته‌ها: *از بین لکه‌های پروتئینی، بیان گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز در بافت توموری گروه BMI بالا نسبت به گروه BMI پایین افزایش معنی‌داری داشت (P< ۰/۰۱). در مقابل، بیان سیتوکراتین ۱۹ در بافت توموری گروه BMI بالا در مقایسه با گروه دیگر کاهش معنی‌داری نشان داد (P< ۰/۰۱). پروتئین Apo A-1 فقط در بافت توموری گروه BMI پایین و HSP27 فقط در دربافت توموری گروه BMI بالا بیان شده بودند.*

نتیجه گیری: *افزایش گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز در فعال کردن مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT دخیل بوده که همراه با سایر مولکول‌های پروتئینی شناسایی شده در بیوپسی پستان سرطانی زنان با BMI بالا در روند مکانیسم‌های مولکولی گسترش سرطان پستان دخیل هستند که انجام مطالعات بیشتر ضرورت دارد.*

واژگان کلیدی: ***پاتوژنز، پروتئوم، سرطان پستان، شاخص توده‌ی بدنی***

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان
۲- دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، استاد مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان
۳- دکترای تخصصی تغذیه، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، زنجان
۴- متخصص جراحی عمومی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان
۵- دانشیار فراورده‌های بیولوژیک، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین جمعیت زنان و دومین عامل اصلی مرگ و میر بعد از سرطان ریه می‌باشد و حدود ۲۲/۹ درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود (۱). آمارها نشان می‌دهد که بین خطر بروز سرطان پستان و میزان BMI (Body Mass Index) ارتباط قوی موجود است، به‌طوری که در زنان با BMI بیشتر از ۳۰ در مقایسه با زنان با BMI برابر ۲۰ تا ۲۴/۹، خطر بروز سرطان پیشرفته و سرطان پستان موضعی ۲۲ درصد بیشتر است (۲). سرطان پستان به‌عنوان یک بیماری به شدت ناهمگن و چند عاملی شناخته شده است که تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد. مشخص شده است که در پاتوژنز و پیشرفت سرطان پستان عوامل مختلفی از قبیل هورمون‌ها، وراثت، جهش‌های ژنتیکی جدید و فاکتورهای محیطی فیزیکی و شیمیایی دخالت دارند (۳). بخش عمده‌ی بیماری به دلیل فعالیت بیش از حد مسیرهای سیگنالینگ میتوژنیک و سرکوب شدن بیان تومورساپرسورها می‌باشد (۴). مطالعات نشان می‌دهد که بیشتر از دو سوم بیماران زمانی از بیماری خود مطلع می‌شوند که بیماری به شکل بدخیم تبدیل شده است و امکان درمان مشکل است، در حالی که شناسایی بیماری در مراحل اولیه و کنترل آن باعث می شود که شانس بیمار برای بقا به بیش از ۵ سال افزایش یابد (۵). با وجود تحقیقات گسترده در زمینه‌ی سرطان پستان هنوز هم عوامل موثر در بروز و پیشرفت سرطان پستان و مکانسیم‌های مولکولی دخیل در آن کاملا شناخته نشده‌اند (۶). مشخص شده است که در یک موجود زنده ژنوم ماهیت پایداری دارد درحالی که پروتئوم از سلولی به سلول دیگر در پاسخ به عوامل محیطی و دخیل در مکانیسم‌های بیوشیمیایی دائما در حال تغییر است. احتمال داده می‌شود افزایش توده‌ی بدنی و چربی به‌عنوان یکی از عوامل تغییر دهنده‌ی بیان پروتئین‌های بافت پستان مطرح باشد. امروزه با توجه به عملکرد غیر انتخابی و عوارض جانبی شیمی درمانی و پرتو درمانی روش‌های درمانی از قبیل سیگنال ترانس داکشن تراپی (STT) که به منظور هدف قرار دادن مولکول‌های پروتئینی در مسیرهای پیام رسانی که سلول‌های سرطانی برای بقا به آن‌ها وابسته‌اند مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹-۷). با ظهور پروتئومیکس و توسعه‌ی مطالعه پروتئوم و با استفاده از تکنیک‌هایی با وضوح و سرعت بالا از قبیل Mass Spectrometry و بیوانفورماتیک برای دست یابی به پایگاه‌های داده پروتئین و تفسیر آن‌ها، کشف نشانگرهای زیستی و نقش و ماهیت پروتئین‌های دخیل در سرطان ممکن شده است (۱۲-۱۰). اکثر مطالعات انجام شده بر روی سرطان پستان با استفاده ازنمونه سرم بیماران بوده و مطالعات بسیار کمی با استفاده از نمونه بافت توموری بیماران انجام گرفته است که هر یک از آن‌ها نتایج متفاوتی را ارائه داده‌اند (۱۳). با توجه به اهمیت موضوع در مطالعه‌ی حاضر به بررسی ارتباط پروفایل پروتئینی بافت توموری پستان در زنان مبتلا به سرطان پستان داکتال مهاجم با شاخص توده‌ی بدنی با استفاده از تکنیک پروتئومیکس پرداخته شده است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات توصیفی- تحلیلی بوده که پس از تایید معاونت تحقیقات و فن آوری و مجوز کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان با کد ZUMS.REC.1393.74 انجام گرفت.

تهیه‌ی مواد: تمامی مواد مصرفی در این مطالعه از قبیل DTT، اوره، CHAPS، آمفولیت، Glycerol، SDS، Idoacetamide، PMSF، P8340 از شرکت Sigma و نوارهای IPG از شرکت Bio-Rad خریداری شد.

بیماران: در این مطالعه‌ی توصیفی- تحقیقی، پس از کسب رضایت نامه‌ی کتبی آگاهانه از بیماران و تکمیل پرسشنامه شاخص‌های بیماری و متغیرهای لازم، بیوپسی بافت توموری از ۱۰ زن مبتلا به سرطان پستان داکتال مهاجم که بین اسفند

سال ۱۳۹۲ تا بهمن ۱۳۹۳ در بیمارستان‌های ولیعصر و آیت‌اله موسوی شهر زنجان تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، برداشته شد که قسمتی از آن (حدود ۵۰۰ میلی‌گرم) جهت بررسی و مطالعه انتخاب و مابقی برای بررسی پاتولوژی به آزمایشگاه ارسال گردید. پس از دریافت نتایج پاتولوژی بیمارانی که کارسینوم داکتال مهاجم با Stage 3 بیماری بودند، از هیچ دارویی استفاده نکرده و مورد رادیوتراپی قرار نگرفته بودند، همچنین هیچ سابقه‌ی خانوادگی ابتلا به بیماری سرطان پستان نداشتند وارد مطالعه شدند و در دو گروه BMI بالا(میانگین ۳۳/۴۱) و پایین (میانگین ۲۶/۰۴) قرار گرفتند.

آماده‌سازی نمونه‌ها: هر نمونه را به‌طور جداگانه پس از شستشو با بافرفسفوسالین (PBS)، درون میکروتیوپ‌های استریل قرار داده وتا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج پروتئین‌ها: ابتدا نمونه‌ها از دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خارج گردید و هر نمونه به‌طور جداگانه درون هاون با ازت مایع کوبیده وکاملا خرد گردید. به ۱۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های خرد شده ۴۰۰ میکرولیتر لیز بافر (اوره ۶ مولار، تیواوره ۲ مولار، تریس ۵۰ میلی مولار، ۲CHAPS درصد، DTT ۵۰ میلی‌مولار) به‌همراه PMSF ۱۰ میلی‌مولار با نسبت ۱ به ۵۰ و P8340 با نسبت ۱ به ۲۰ افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند تا فرآیند لیز سلولی به خوبی انجام شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور g ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و مایع رویی (سوپرناتانت) جمع‌آوری شده و به روش برادفورد تعیین غلظت شدند. به منظور تایید صحت نتایج غلظت، بر روی نمونه‌ها الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد (۱۴).

الکتروفورز دو بعدی (2D-PAGE): با توجه به غلظت نهایی نمونه‌ها میزان ۱۰۰میکرولیتر از نمونه‌ها (حاوی ۱۵۵ میکروگرم پروتئین) را با ۱۵۰ میکرو لیتر بافر آب دهی (Urea ۶ مولار، CHAPS ۴ درصد، Biolyt 3-10 ۰/۵ درصد، Bromophenol blue ۰/۰۰۰۲ درصد، DTT ۵۰ میلی مولار) مخلوط و به حجم ۲۵۰ میکرولیتر رسانده و مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور g ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مخلوط نمونه و بافر آب دهی به سینی مخصوص آب دهی انتقال داده شده و نوارهای IPG (۱۱ سانتی‌متری با pH ۱۰-۳ غیر خطی) داخل آن‌ها قرار داده شدند. پس از گذشت یک ساعت سطح نوارهای IPG با روغن معدنی پوشانده شده و حدود ۱۶ساعت (یک شب) در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۷ ساعت از زمان آب دهی نوارها، نوارهای IPG از داخل سینی خارج شده و جهت انجام IEF داخل سینی مخصوص IEF و درون دستگاه Ettan IPG Phor 3 قرار گرفتند (۱۵). بعد از اتمام IEF نوارها دو بار هر بار به مدت ۲۰ دقیقه درون بافر متعادل سازی (Tris –HCl ۵۰ میلی‌مولار، Idoacetamide حجمی وزنی ۴ درصد، DTTحجمی وزنی ۱ درصد، ۶ مولار Urea، Glycerol حجمی وزنی ۳۰ درصد، SDS حجمی وزنی ۲ درصد) قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد نوارهای IPG بر روی ژل عمودی SDS-PAGE ۱۲ درصد قرار گرفته و پس از جای دادن در تانک الکتروفورز (16 cm, SE 600 Ruby, Amersham) و اتصال به دستگاه Power supply، طبق برنامه‌ی زیر الکتروفورز شدند (۱۶)

- جریان ۱۵ میلی‌آمپر برای هر ژل به مدت یک ساعت.
- جریان ۲۵ میلی‌آمپر تا زمانی که رنگ برموفنل بلو به انتهای ژل برسد (۷-۶ ساعت).

رنگ‌آمیزی ژل‌ها: ژل‌ها به مدت ۳ تا ۴ ساعت درون محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو G250 قرارگرفتند. سپس با محلول رنگبر شستشو داده (دو بار هر بار ۲۰ دقیقه) به‌مدت یک شب درون محلول رنگبر (استیک اسید ۷ درصد، متانول ۳۰ درصد،

حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) ماندند.

شناسایی لکه‌ها: ژل‌ها توسط Image scanner IV اسکن شده و تصاویر به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Image master 2D platinium6.0 طی مراحل شناسایی لکه، ویرایش و تطبیق، آنالیز شدند. بعد ازآنالیز ژل‌ها و شناسایی پروتئین‌هایی که دچار تغییر بیان شده بودند، لکه‌های پروتئینی مورد نظر جهت تعیین هویت با MALDI TOF MS/MS از روی ژل‌ها بریده شده و داخل میکروتیوب‌ها به دانشگاه یورک انگلیس ارسال شدند.

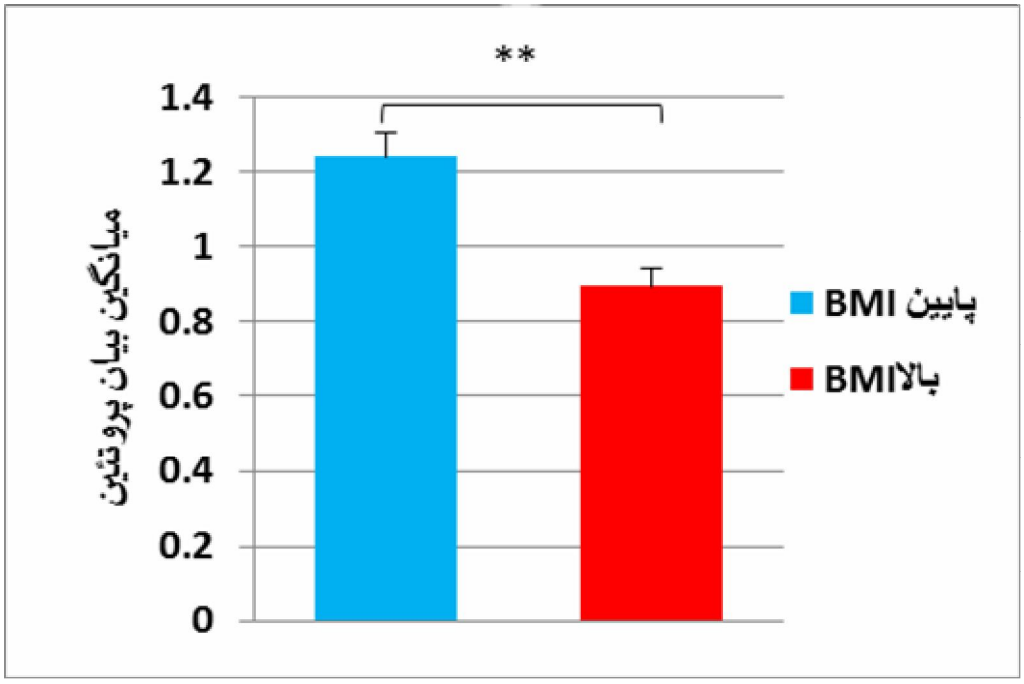
آنالیز آماری داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t-student استفاده شد. داده‌های کیفی به صورت فراوانی و درصد و داده‌های کمی براساس میانگین و انحراف معیار گزارش شدند. حدود اطمینان ۹۵ درصد بوده و از نظر آماری، اختلاف بیان با P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد. لازم به ذکر است جهت اطمینان از تکرار پذیری، آزمایشات به صورت تریپلیکیت انجام گرفت.

ملاحظات اخلاقی: همه‌ی بیماران پس از کسب رضایت نامه‌ی کتبی و با رضایت و آگاهی کامل خود وارد مطالعه شدند. در طی مطالعه و پس از آن مشخصات و اطلاعات شخصی بیماران کاملا محرمانه مانده است.

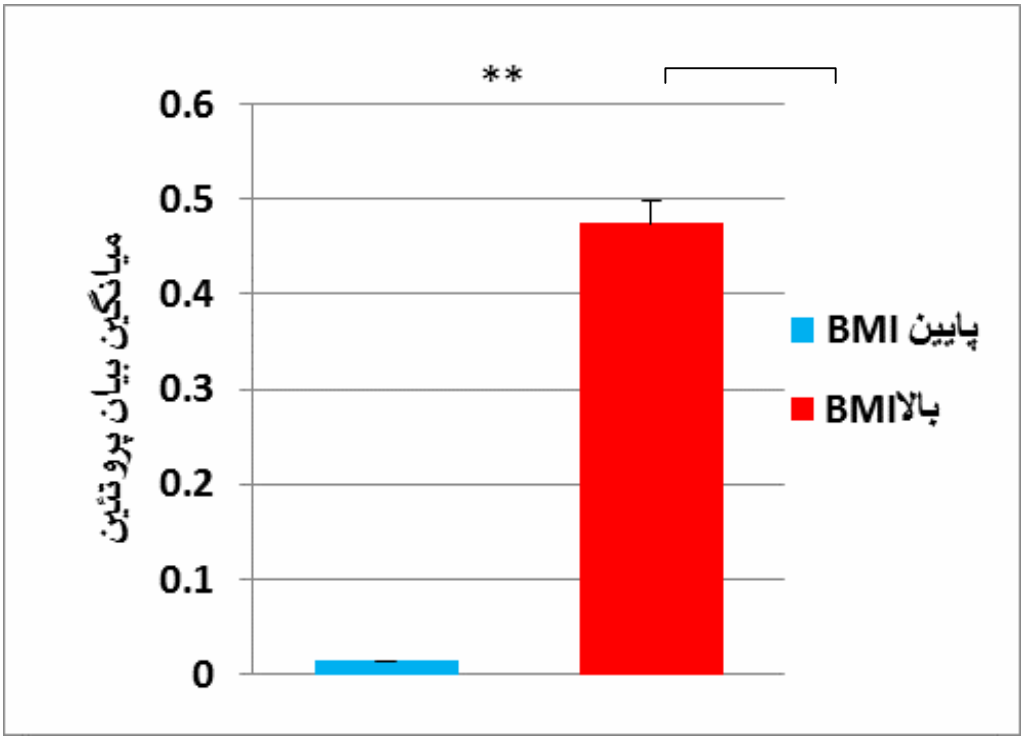
لازم به ذکر است، این پژوهش هیچ هزینه‌ی مالی به بیماران تحمیل نکرده است.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر، بافت توموری پستان در ۱۰ زن مبتلا به سرطان پستان کارسینوم داکتال با میانگین سنی ۹/۸۲ ± ۴۹/۳ سال، در دو گروه با BMI بالا (میانگین ۳۳/۴۱) و پایین (میانگین ۲۶/۰۴) مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین‌های تفکیک شده توسط الکتروفورز دو بعدی که به صورت تریپلیکت انجام گرفته بودند با استفاده از نرم‌افزار Image master 2D Platinum 6.0 در دو سطح بین گروهی و درون گروهی آنالیزگردیدند. تعداد پروتئین‌های بیان شده در گروه BMI بالا ۱۰۰۷ و در گروه BMI پایین، ۸۲۲ لکه بود. در آنالیز بین گروهی، با استفاده از آزمون t و سطح اطمینان ۹۵ درصد، تعداد ۴۵ لکه پروتئینی معنی‌دار بین دو گروه شناسایی شد (P<۰/۰۵). در سطح آنالیز درون گروهی با توجه به محدودیت‌های طرح، ۲ لکه‌ی پروتئینی با شماره‌های ۲۶۴و ۳۵۹ که P value پایین‌تر و نسبت تغییرات بیان بالایی داشتند انتخاب شدند. لکه ۲۶۴ در گروه BMI بالا حدود ۱/۲۵ برابر نسبت به گروه BMI پایین کاهش بیان داشت و لکه ۳۵۹ در گروه BMI بالا حدود ۴۰ برابر نسبت به گروه BMI پایین افزایش بیان داشت و اختلاف هر دو لکه از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱)(نمودارهای ۱و ۲). از بین لکه‌هایی که منحصرا در گروه BMI بالا وجود داشتند ۱ لکه (شماره‌ی ۳۸۵) و از بین لکه‌هایی که منحصرا در گروه BMI پایین وجود داشتند ۱ لکه (شماره‌ی۱۵۰) به طور تصادفی انتخاب شدند (شکل ۱). لکه‌های انتخابی توسط MALDI-TOF MS/MS اسپکترومتری تعیین هویت شدند (جدول ۱). لکه‌های۲۶۴ (سیتوکراتین ۱۹) و ۳۵۹ (گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز) بودند که در گروه BMI بالا به ترتیب کاهش و افزایش بیان داشتند. لکه پروتئینی ۱۵۰ آپولیپوپروتئین A-1 بود که فقط درBMI پایین و لکه ۳۸۵، Hsp27 بود که فقط در BMI بالا وجود داشت.

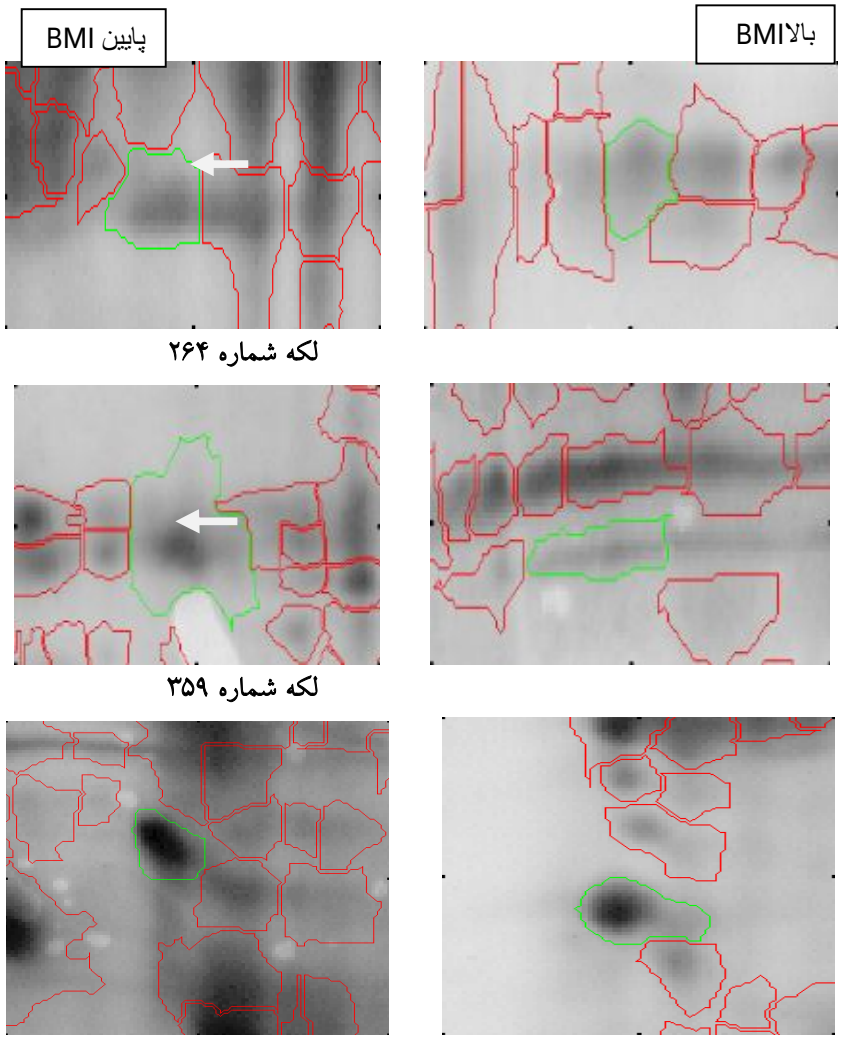


نمودار ۱: مقایسه بیان لکه شماره ۲۶۴ بین بیماران با BMI بالا و پایین



نمودار ۲: مقایسه بیان لکه شماره ۳۵۹ بین بیماران با BMI بالا و پایین

شکل ۱ : تصویر لکه‌های پروتئینی انتخاب شده بر روی ژل ها



جدول ۱: اطلاعات مربوط به پروتئین‌های شناسایی شده توسط ***MOLDI TOF/TOF MS***

کد لکه	وزن مولکولی (دالتون)	PI	AA	نام پروتئین	وضعیت بیان
۱۵۰	۳۰۷۵۹	۵/۵۶	۲۶۴	ApoA-1	فقط در گروه BMI پایین
۲۶۴	۴۴۰۷۹	۵/۰۴	۴۰۰	Cytokeratin 19	۱/۲۵برابر کاهش در گروه BMI بالا
۳۵۹	۳۶۲۰۱	۸/۵۷	۳۳۵	GAPDH	۴۰ برابر افزایش در گروه BMI بالا
۳۸۵	۴۰۰۹۸	۵/۴۳	۳۶۷	HSP27	فقط در گروه BMI بالا

PI= *ایزوالکتریک* ***PH*** ***AA=*** *تعداد اسید امینه*

بحث

امروزه به خوبی ارتباط افزایش توده‌ی بدنی با خطر احتمال ابتلا به سرطان پستان شناخته شده است. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهد که با افزایش شاخص توده‌ی بدنی میزان ابتلا به سرطان پستان افزایش می‌یابد، به‌طوری که در زنان با شاخص توده‌ی بدنی بالاتر از ۳۰ احتمال ابتلا حدود ۱۱ تا ۱۲ درصد بیشتر می‌باشد (۴). ایوانکوویچ و همکاران به وجود ارتباط مثبت بین چاقی و افزایش بروز سرطان پستان اشاره کردند، به‌طوری که ۳۰ درصد مبتلایان چاق بودند (۱۷). افزایش بافت چربی باعث نفوذ ماکروفاژها به این بافت شده و با آدیپوسیت‌ها میانکنش داده و باعث آزاد شدن سایتوکاین‌های التهابی می‌گردد. از طرفی دیگر تولید آدیپوکین‌هایی که می‌توانند واکنش‌های پیش التهابی را تسریع کنند افزایش می‌یابد. مطالعه‌ی کاسر و همکاران افزایش آدیپوکین‌های التهابی را در افراد چاق و افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ را تایید می‌کند (۱۸). براساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر بین پروفایل پروتئینی بیماران با BMI بالا و پایین اختلاف معنی‌دار وجود دارد. از میان پروتئین‌هایی که در دو گروه با هم اختلاف داشتند، پروتئین‌های سیتوکراتین ۱۹ و گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز اختلاف بیشتری نشان دادند. سیتوکراتین ۱۹ در گروه BMI بالا کاهش ولی در گروهBMI پایین افزایش بیان داشت. مطالعات حاکی از آن است که در بیماران مبتلا به سرطان پستان سه گانه منفی TNBC (ER-,PR-,HER2-) پروتئین‌های ساختاری از قبیل: سیتوکراتین‌ها افزایش بیان دارند (۱۹). در گزارش ملین و همکاران سیتوکراتین‌های ۷ و۱۹ در سرطان‌های پستان مهاجم افزایش داشتند (۲۰) که با نتایج مطالعه‌ی ما مطابقت دارد. سیتوکراتین ۱۹ یک پروتئین ۴۰ کیلو دالتونی است که در انسان توسط ژن KRT19 کد گذاری می‌شود. Erg1 (early growth response-1) یک فاکتور رونویسی است که بیان چندین ژن از قبیل PTEN را تنظیم می‌کند (۲۱). Erg1 در ناحیه C ترمینال دارای دومن NTS (nuclear translocation signal) می‌باشد که برای لوکالیزه شدن هسته ای آن لازم است. IMP7 (Importin-7) به دمن NTS در Erg1 متصل شده و آن را فسفریله می‌کند و باعث فعال سازی Erg1 می‌گردد. سیتوکراتین ۱۹ با اتصال به کمپلکس Erg1 IMP7- مانع از فعال شدن Erg1 می‌گردد در نتیجه PTEN بیان نمی‌شود و مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT انجام شده که در نهایت منجر به تکثیر سلولی، مهاجرت وتهاجم سلولی می‌گردد (۲۲). مطالعات نقش سیتوکراتین ۱۹ را در تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی نشان می‌دهند، اما ارتباط بین بیان آن با مقدارBMI بررسی نشده است. با توجه به این که نمونه‌های مورد مطالعه همگی از نوع داکتال مهاجم بودند این پروتئین در تمام آن‌ها بیان داشت ولی ممکن است کاهش بیان این پروتئین در گروه BMI بالا با اندازه‌ی بزرگتر تومور و سرعت بالای تکثیر سلولی در ارتباط باشد. گراون و همکاران گزارش کردند که اندازه‌ی توده‌ی توموری در افزایش مقدار گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) نقش دارد (۲۳). این یافته با نتایج مطالعه‌ی ما مطابقت دارد. در مطالعه‌ی ما در گروه بیماران با BMI بالا، اندازه‌ی توده‌ی توموری در مقایسه با گروه دیگر بیشتر بود، احتمال داده می‌شود که سرعت گلیکولیز افزایش یافته و به تبع آن مقدار GAPDH نیز افزایش می‌یابد. از طرفی دیگر با بزرگتر شدن توده‌ی توموری هیپوکسی بیشتری اتفاق می‌افتد که محرک افزایش بیان GAPDH است. GAPDH مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT را فعال می‌کند و در نهایت باعث افزایش تکثیر سلولی، تشکیل تومور و مقاومت دارویی می‌شود (۲۴). در مطالعه‌ی ما Apo A-1 فقط در گروه BMI پایین بیان شده در حالی که در گروه BMI بالا بیان آن مهار شده بود. برتوسی وگونکالوس بیان آپولیپوپروتئین A-1 را در ۸۳ درصد از بیماران سرطان پستان داکتال مهاجم گزارش کردند (۲۵). این پروتئین قابلیت اتصال و انتقال HDL را

دارد. در واقع Apo A-1 باعث انتقال معکوس کلسترول از بافت‌ها به کبد می‌شود. به نظر می‌رسد در گروه BMI پایین به علت کاهش توده‌ی بافت چربی نسبت به گروه دیگر مقدار HDL بیشتر بوده و تولید Apo A-1 القا شده است. Hsp27 باعث افزایش قابلیت تحمل حرارت در داخل بدن و ثبات پروتئین نیمه دناتوره و تضمین تا شدن مجدد پروتئین شده، از بقای سلول تحت تنش حرارتی حمایت می‌کند (۲۶). Hsp27 همچنین در مسیر سیگنالینگ آپوپتوز نقش دارند و با غشای بیرونی میتوکندری تعامل کرده، با فعال شدن کمپلکس (c / Apaf-1 / dATP سیتوکروم) مداخله می‌کند که در نتیجه فعال شدن procaspase-9 را مهار می‌کند. کاسپازها از عوامل آپوپتوزیس هستند و با مهار شدن آن‌ها سلول‌ها رشد و تکثیر بی رویه خواهند داشت. همچنین Hsp27 با اکتین و رشته‌های حدواسط تعامل دارد و مانع از تخریب رشته‌های اکتین می‌شود (۲۷). Hsp27 از طریق مسیر NF-kB بسیاری از فرآیندها، مانند رشد سلول و پاسخ‌های التهابی و استرس را کنترل می‌کند (۲۸). کاباج و همکاران بیان بالای Hsp27 را در بیماران کارسینومای داکتال مهاجم با اندازه‌ی تومور بزرگتر را گزارش کردند (۲۹) که با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد. گیوسو و همکاران گزارش کردند که برخی از سایتوکین‌های پیش التهابی از قبیل TNFα و IL-1 که در پدیده‌ی بروز التهاب و تخریب سلول نقش دارند باعث القای تولید Hsp27 می‌شوند (۳۰). این پروتئین فقط در گروه BMI بالا بیان شده در حالی که در گروه BMI پایین بیان آن مهار شده است که می‌توان افزایش بیان آن را احتمالا به اندازه‌ی تومور بزرگتر و در نتیجه شرایط تنش حرارتی بیشتر در گروه BMI بالا نسبت داد. از طرفی با افزایش توده‌ی بافت چربی تولید سایتوکین‌هایی از قبیل: TNFα و IL-1 افزایش یافته که این امر نیز به نوبه‌ی خود باعث افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی مانند Hsp27 می‌شود.

نتیجه گیری

به طور کلی بررسی نتایج به دست آمده حاکی از این است که افزایش گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز در بیوپسی سرطان داکتال پستان در زنان با BMI بالا، مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT را فعال کرده که در افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی موثر می‌باشد و سایر مولکول‌های شناسایی شده در این تحقیق، در روند مکانیسم‌های مولکولی گسترش سرطان پستان دخیل هستند. نظر به اهمیت آدیپوسایتوکاین‌ها که از بافت‌های آدیپوز ترشح می شوند و در سیگنال ترانس داکشن تراپی نیز مورد توجه قرار گرفته اند، مطالعات پروتئومی بیشتری با بیوپسی‌های متفاوت سرطان پستان مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی می‌باشد. از گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک زنجان و معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی زنجان به دلیل مساعدت در انجام این طرح صمیمانه تشکر می‌گردد.

References

1- Oqden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowellMA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. JAMA. 2006; 1549-55.

2- Nelson HD, Zakher B, Cantoretal A. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. Ann Inter Med. 2012; 156: 635-48.

3- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al.

Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts oftwins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000; 343: 78-85.

4- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406: 747-52.

5- Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 267-75.

6- Matsumoto A, Jinno H, Ando T, et al. Biological markers of invasive breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2015.

7- Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem*. 2001; 47: 1901-11.

8- Hu Y, Zhang S, Yu J, Liu J, Zheng S. SELDI-TOF-MS: the proteomics and bioinformatics approaches in the diagnosis of breast cancer. *The Breast.* 2005; 14: 250-5.

9- Shin B, Sheu M, Joseph MK, Markey. Guilt-byassociation feature selection: Identifying biomarkers from proteomic profiles. J Biomed Informatic. 2008; 41: 124-36.

10- Yim EK, Park JS. Role of proteomics in translational research in cervical cancer. *Expert Rev Proteomics*. 2006; 3: 21-36.

11- Goufman EI, Moshkovskii SA, Tikhonova OV, et al. Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor conditions. *Biochemistry (Mosc)*. 2006; 71: 354-3.

12- Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, et al. Caprioli RM: Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Cancer Res*. 2005; 65: 7674-81.

13- Zhou C, Simpson KL, Lancashire LJ, et al. Statistical considerations of optimal study design for human plasma proteomics and biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2012; 11: 2103-13.

14- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.

15- Roberts K, Bhatia K, Stanton P, Lord R. Proteomic analysis of selected prognostic factors of breast cancer. *Proteomics.* 2004; 4: 784-792.

16- Maleki A, Ramazani A, Foroutan M, Biglari AR, Ranjzad P, Mellati A. Comparative proteomics study of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats kidneys transfected with adenovirus-mediated fibromodulin gene. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2014; 6: 104-12.

17- Irankovic Allison D, Diana S. Obesity study case: correlation between incidence of breast cancer and BMI in women in anderson county, south carolina. 2013; 1: 1-4.

18-Kaser S.Resistin messenger RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro.biochemical and biophysical research communications.2003;309:286-90

19- Schulz DM, Bollner C, Thomas G, et al: Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE

and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 3430-3438, 2009.

20- Melean WH, Lane EB, Lunny DP, Corden LD, PorterRM, Smith FJ. Cloning of human, murine, and marsupial keratin7 and a survey of K7 expression in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 297: 818-27.

21- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007; 129: 1261-74.

22- Chen J, Liu MY, Parish CR, Chong BH, Khachigian L. Nuclear import of early growth response-1 involves importin-7 and the novel nuclear localization signal serine-proline-serine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; 43: 905-12.

23- Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV, Farber HW. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J Biol Chem*. 1994; 269: 24446-53.

24- Jin-Ying Zhang, Fan Zhang, Chao-Qun Hong. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med*. 2015; 12: 10-22.

25- Bertucci F, Goncalves A: Clinical proteomics and breast cancer: strategies for diagnostic and therapeutic biomarker discovery. *Future Oncol*. 2008; 4: 271-87.

26- Hunt CR, Goswami PC, Kozak CA (October 1997). "Assignment of the mouse Hsp25 and Hsp105 genes to the distal region of chromosome 5 by linkage analysis". Genomics. 45: 462-3.

27- Rui Z, Jian-Guo J, Yuan-Peng T, Hai P, Bing-Gen R. "Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer". *Proteomics.* 2003; 3: 433-9.

28- Sarto C, Binz PA, Mocarelli P. "Heat shock proteins in human cancer". Electrophoresis. 21: 1218-26.

29- Kabbage M, Chahed K, Hamrita B, et al: Protein alterations in infiltrating ductal carcinomas of thebreast as detected by nonequilibrium pH gradient electrophoresis and mass spec trometry. *J Biomed Biotechnol*. 2008; 2008: 564127.

30- Gusev N, Bogatcheva N, Marston S. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. Biochemistry (Moscow). 2002. 67: 511-19.

Relation between Proteome of Women with Invasive Ductal Breast Cancer and Body Mass Index

Hosseini M[1], Mellati A[1], Mousavi SS[2], Moghimi MH[3], Ramezani A[4]

[1] Dept.of Biochemistry, Zanjan Metabolic Diseases Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[2]Agriculture and Natural Resources Research Center of Zanjan, Zanjan, Iran

[3]Dept.of Surgery, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[4]Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Mellati A, Zanjan Metabolic Diseases Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: mellati@zums.ac.ir

Received: 24 Dec 2015 **Accepted:** 22 Aug 2016

Background and Objective: Several reports indicate the effect of obesity on the rise of breast cancer prevalence in different societies. Several laboratory methods have been applied in order to understand molecular mechanisms and biochemical markers associated with breast cancer, many of which are still unknown. In this study, we investigate the relation between protein profile of breast tumor tissue and body mass index (BMI) in women with invasive ductal breast cancer.

Materials and Methods: In this descriptive analytical study, 10 patients diagnosed with invasive ductal breast cancer were chosen and divided into two groups based on their BMI, higher mean (33.41) and lower mean (26.04). Homogenized tumor proteins were analyzed with proteomics system. In this method, two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF MS / MS were used. Statistical analysis was done by t-test and Image master 2D platinum 6.0.

Results: In this study, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression increased significantly in the biopsy of the higher mean BMI group in comparison with the lower mean BMI=26.04 group ($P < 0.05$). In contrast, the expression of cytokeratin 19 in the higher mean BMI group compared to the other group showed a significant reduction ($P < 0.05$). Furthermore Apo A-1 expressed only in the biopsy of the lower mean BMI group and HSP27 expressed only in the higher mean BMI group.

Conclusion: The findings of this study indicate some differences in protein spectrum between the biopsies of lower and higher mean BMI groups of breast cancer patients. Furthermore the four proteins mentioned in the results probably influence molecular mechanisms linking obesity to breast cancer, but more studies are needed.

Key words: Pathogenesis, Proteome, Breast Cancer, Body Mass Index