

مقایسه پروتئوم بافت سرطانی پستان با بافت سالم مجاور آن در زنان مبتلا به سرطان پستان

مریم امیری شعار^{۱*}، معصومه حسینی^{۲*}، علی اوسط ملتی^{۳*}

(۱) مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
(۲) گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۶

چکیده

مقدمه: سرطان پستان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است که فرآیند پیچیده‌ای از عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز آن دخالت دارند. هنوز مکانسیم‌های مولکولی دخیل در بروز و پیشرفت سرطان پستان به طور کامل شناخته نشده است. در مطالعه حاضر، پروتئوم بافت سرطانی پستان و بافت سالم مجاور مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه همگروهی، بافت سرطانی به همراه بافت سالم مجاور از ۵ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان دریافت و محتوای پروتئینی آن‌ها استخراج شد. سپس، با استفاده از ژل الکتروفورز دو بعدی و به کمک نرم افزار Image Master 2D Platinum سطح بیان پروتئین‌ها و در مرحله بعد با اسپترومتری جرمی MALDI-TOF MS/MS ماهیت پروتئین‌های مورد نظر شناسایی شد.

یافته‌های پژوهش: ناحیه ثابت (C) زنجیره Ig gamma-1 فقط در بافت سرطانی و زیر واحد بتاهموگلوبین فقط در بافت سالم مجاور بیان شده بودند. بیان آلبومین سرمی و یک پپتید منفرد شبیه به زنجیره alpha-3 کلاژن (VI) در بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم مجاور کاهش معنی داری داشت ($P < 0.05$). در مقابل، بیان یک پپتید منفرد مشابه به کراتین نوع I و II اسکلت سلولی در بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم مجاور افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: پروتئوم بافت سرطانی پستان در مقایسه با بافت سالم مجاور به طور قابل توجهی متفاوت است. به نظر می‌رسد بررسی تغییرات در محتوای پروتئینی سلول‌های سرطانی پستان بتواند رویکرد مناسبی جهت شناسایی عوامل دخیل در پاتوژنز این بیماری باشد. با این حال، بهتر است مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود.

واژه‌های کلیدی: بیومارکر، پاتوژنز، پروتئوم، سرطان پستان

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران-گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

Email: mellati3000@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سرطان پستان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در جهان است که در ایران نیز ۲۱/۴ درصد سرطان های زنان را شامل می شود (۱). با این حال، شیوع سرطان مهاجم پستان HER-2 مثبت در ایران بین ۲۳/۳ تا ۸۱ درصد متغیر می باشد (۲). مشخص شده است که در پاتوژنز و پیشرفت سرطان پستان فرآیند پیچیده ای از عوامل مختلف از قبیل؛ هورمون ها، سابقه ژنتیکی، جهش های ژنتیکی جدید و فاکتورهای محیطی فیزیکی و شیمیایی دخالت دارند (۳-۵). هر چند طی دهه های اخیر، سرطان پستان از جنبه های مختلفی موضوع تحقیقات گسترده ای در اغلب مراکز پژوهشی سرطان در جهان بوده است، با این حال، هنوز مکانیسم های مولکولی دخیل در بروز این بیماری ناشناخته مانده است (۶).

امروزه بر همگان مبرهن است که ژن ها به عنوان عوامل اصلی کنترل کننده ویژگی های بیولوژیکی سلول ها، نقش خود را از طریق تغییر مداوم سطوح پروتئین های مربوطه اعمال می کنند. در واقع، هر گونه تغییر در محتوای پروتئینی یک سلول منعکس کننده تغییر در رفتار و عملکرد آن سلول می باشد. همانند سایر سرطان ها، در سرطان پستان نیز به دلیل این که ساختار و عملکرد سلول های سرطانی با سلول های سالم فرق می کند، محتوای پروتئینی سلول های سرطانی نیز با سلول های سالم تفاوت دارد (۷). هم چنین، با بررسی محتوای پروتئینی بافت سرطانی در مقایسه با محتوای پروتئینی یک رده سلولی بهتر می توان به ویژگی های سلولی و رفتار تومور پی برد. از طرفی دیگر، پروتئین های بافت علاوه بر پروتئین های داخل سلولی، پروتئین های مترشح به خارج سلول را نیز شامل می شوند که این پروتئین ها ممکن است از سلول های سرطانی پستان و یا غیر سرطانی ترشح شوند (۷). میزان رشد و پیشرفت سلول های توموری در سرطان پستان نه تنها به پتانسیل بدخیمی آن ها بستگی دارد، بلکه به عوامل حاضر در ریز محیط تومور نیز وابسته است (۸).

در راستای روشن شدن مکانیسم های مولکولی درگیر در بروز و پیشرفت سرطان پستان و نیز جهت

کشف مارکرهای تشخیصی و درمانی جدید بیماری، در سال های اخیر با استفاده از روش پروتئومیکس تلاش های زیادی برای بررسی افتراقی بیان پروتئین ها در سلول های سرطان پستان نسبت به سلول های طبیعی در افراد سالم نرمال صورت گرفته است (۹،۱۰). هم چنین، جهت دستیابی به اطلاعات جامع در مورد پروتئین های مرتبط با سرطان پستان، از نمونه های مختلفی از قبیل؛ بافت، سرم، مایع آسپیره نوک پستان (nipple aspirate fluid) و غیره در آنالیزهای پروتئوم سرطان پستان، استفاده شده که هر یک از آن ها نتایج متفاوتی را ارائه داده اند (۷،۱۱).

تکنیک الکتروفورز دو بعدی (2D-PAGE) در مطالعات پروتئومیکس از نظر قابلیت تمیز و تشخیص ایزوفرم های مختلف یک پروتئین از یکدیگر بر سایر روش های رایج برتری دارد (۱۲). استفاده روزافزون از اسپکترومتری جرمی جهت تعیین و شناسایی ماهیت پروتئین ها نیز نقش بسیار مهمی در مطالعات پروتئومیکس سرطان ها از جمله سرطان پستان داشته است (۱۳). بر همین اساس و به دلیل ضرورت و اهمیت شناسایی عوامل دخیل در پاتوژنز سرطان پستان، ما در مطالعه حاضر برای اولین در ایران پروتئوم بافت سرطانی پستان و بافت سالم مجاور آن را با استفاده از تکنیک های 2D-PAGE و اسپکترومتری جرمی مورد مطالعه و مقایسه قرار دادیم.

مواد و روش ها

بیماران: ۵ بیمار زن غیر یائسه مبتلا به مرحله ۳ سرطان پستان که بین بهمن سال ۱۳۹۳ تا اردیبهشت ۱۳۹۴ تحت عمل جراحی برداشت پستان قرار گرفته بودند، به طور تصادفی وارد مطالعه شدند. بیمارانی که تحت دارو درمانی، رادیوتراپی و... قرار گرفته بودند، از مطالعه خارج شدند.

آماده سازی بافت ها: در شرایط کاملاً استریل و به روش بیوپسی در اتاق عمل، به میزان ۵۰ میلی گرم بافت سرطانی از بیماران و نیز به میزان ۵۰ میلی گرم از بافت سالم مجاور از همان افراد برداشت گردید. سپس، در دمای اتاق، هر بافت جهت زدودن خون اضافی و ممانعت از تداخل آن ها با پروتئین های بافت، با استفاده از محلول بافر نمکی فسفات (PBS) شستشو

داده شده و به میکروتیوب های استریل ۱/۵ میلی لیتری انتقال و در دمای ۸۰- درجه ذخیره شد. استخراج پروتئین ها: ابتدا نمونه ها به طور جداگانه درون هاون با ازت مایع کوبیده و خرد شدند. سپس به ۱۵۰ میلی گرم از هر نمونه، ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز (حاوی: اوره ۶ مولار، تیواوره ۲ مولار، تریس ۵۰ میلی مولار، بیوتیوتریتول (DTT) ۵۰ میلی مولار و کلامیدوپروپیل دی متیل آمونیو پروپانولفونیک (CHAPS) ۲ درصد) به همراه فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) ۱۰ میلی مولار با نسبت ۱ به ۵۰ و کوکتل ممانعت کننده پروتئاز (P8340) با نسبت ۱ به ۲۰ افزوده شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از آن، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۴۰۰۰×g سانتریفیوژ شده و مایع رویی حاوی پروتئین جمع آوری گردید. در نهایت غلظت پروتئین در هر نمونه به روش برادفورد تعیین شد (۱۴). سپس، جهت کاهش خطای اندازه گیری، ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون پروتئین سرطانی برداشت شده و در داخل یک میکروتیوب های استریل ۱/۵ میلی لیتری مخلوط گردید (مخلوط سرطانی). در مورد پروتئین های بافت سالم نیز به همین روش مخلوط سالم تهیه شد.

ژل الکتروفورز دو بعدی (2D-PAGE): ژل الکتروفورز دو بعدی روش قدرتمندی برای تفکیک سریع و هم زمان محتوای پروتئین های یک پروتئوم می باشد. تفکیک پروتئین ها توسط این روش با دو ویژگی مجزای آن ها صورت می گیرد. در بعد اول با استفاده از تفاوت بار الکتریکی آن ها بر اساس IEF و در بعد دوم بر اساس جرم یا وزن مولکولی، که به طور معمول از SDS-PAGE استفاده می شود، جداسازی صورت می گیرد (۱۲). به منظور تأیید نتایج حاصل از تعیین غلظت پروتئین ها، بررسی صحت لیز سلولی و استخراج مناسب پروتئین ها و تعیین غلظت مناسب جهت به کارگیری در مراحل بعدی نمونه ها بر روی ژل SDS-PAGE آنالیز گردیدند (شکل شماره ۱). سپس، جهت انجام ژل الکتروفورز دو بعدی، با توجه به غلظت نهایی نمونه ها، ۱۰۰ میلی لیتر از مخلوط سالم

یا سرطانی با ۱۵۰ میلی لیتر بافر آب دهی به حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسانیده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۴۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. پس از انکوباسیون ۱۷ ساعته به همراه نوارهای IPG ۱۱ سانتی متری حاوی pH ۳-۱۰ غیر خطی، نمونه ها در درون دستگاه Ettan IPGphor 3 قرار گرفته و محتوای پروتئینی آن ها بر اساس pH تفکیک شدند (بعد اول). سپس، محتویات نوارهای IPG به روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد انتقال داده شده و تحت جریان ۱۵ میلی آمپر به مدت یک ساعت و سپس جریان ۲۵ میلی آمپر تا زمانی که رنگ برموفنیل بلو به انتهای ژل برسد (بین ۷-۶ ساعت) با استفاده از دستگاه الکتروفورز صفحه ای SDS-PAGE الکتروفورز شدند (۱۵).

رنگ آمیزی ژل ها: پس از الکتروفورز، ژل ها به مدت ۳-۴ ساعت درون محلول رنگ آمیزی بر روی شیکر قرار گرفتند. به علت سازگاری بیشتر با اسپکترومتری جرمی، از رنگ آمیزی کوماسی بلو G250 استفاده شد. پس از رنگ آمیزی، ژل ها دو بار به مدت ۲۰ دقیقه با محلول رنگبر شستشو و نیز به مدت یک شب درون محلول رنگبر بر روی شیکر قرار داده شدند تا رنگ زمینه ژل کاملاً خارج شده و شفاف شوند.

شناسایی لکه ها: ابتدا ژل ها توسط دستگاه Image scanner IV اسکن شدند. سپس، تصاویر به دست آمده با استفاده از نسخه ۶ نرم افزار Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) جهت بررسی سطح بیان هر لکه آنالیز شدند. سپس، ۴ تا از لکه های پروتئینی مورد نظر از روی ژل ها بریده شده و در داخل میکروتیوب جهت شناسایی پروتئین با اسپکترومتری جرمی MALDI-TOF MS/MS به دانشگاه یورک انگلیس ارسال شد.

ملاحظات اخلاقی: رعایت اصول اخلاقی پژوهش از طرف کمیته اخلاق مستقر در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان مورد تأیید قرار گرفت. همه بیماران پس از کسب رضایت نامه کتبی و با رضایت و آگاهی کامل خود وارد مطالعه شدند. در طی

مطالعه و پس از آن مشخصات و اطلاعات شخصی بیماران کاملاً محرمانه مانده است. این پژوهش هیچ هزینه مالی به بیماران تحمیل نکرده است.

آنالیز آماری داده ها: برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون Student t test موجود در نرم افزار Image Master 2D Platinum استفاده شد. بیان لکه ها با مقیاس حجم درصد (Vol%) و به صورت میانگین و انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) گزارش شدند. حدود اطمینان ۹۵ درصد بوده و از نظر آماری، اختلاف بیان با P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

یافته های پژوهش

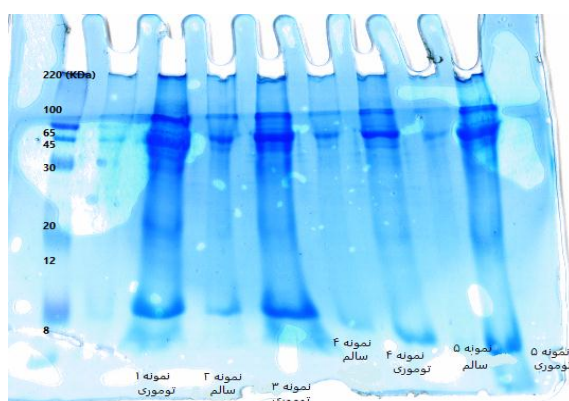
برای پژوهش پروتئومیکس حاضر، بافت سرطانی و بافت سالم مجاور آن در ۵ بیمار زن با میانگین سنی میانگین سنی ۴۷/۰۰ $\pm$ ۱۰/۸۹ سال مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج پاتولوژی همه بیماران در مرحله ۳ (stage 3) بیماری، از لحاظ بافتی در گروه داکتال کارسینوما و از نظر هورمونی و مولکولی در گروه luminal A (ER+, PR+, HER2-) قرار داشتند.

سه ژل مربوط به هر بافت مورد مقایسه قرار گرفت. در مجموع، ۱۳۰۰ لکه در ژل های گروه بافت سرطانی و ۷۵۱ لکه در ژل های گروه بافت سالم شناسایی شد که هر دو گروه ۴۶ لکه مشترک داشتند که از بین

آن ها، ۱۴ لکه بین دو گروه اختلاف معنی دار نشان دادند ($P < 0.05$). جهت شناسایی پروتئین با اسپتکرومتری MALDI-TOF MS/MS، ۱ لکه از بین لکه های منحصر به بافت سرطانی و ۱ لکه از بین لکه های بافت سالم مجاور به طور تصادفی انتخاب شد. هم چنین، از بین لکه های مشترک، دو لکه انتخاب شد که محتوای پروتئینی یکی در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم ۴/۳ برابر افزایش و دیگری ۱۶ برابر کاهش بیان داشت. نتایج اسپتکرومتری MALDI-TOF MS/MS در جدول شماره ۱ آورده شده است. همان طور که دیده می شود، لکه ای که فقط در بافت سالم مجاور بیان داشت، مربوط به زیر واحد بتا هموگلوبین بود. لکه ای که فقط در بافت سرطانی بیان داشت، مربوط به ناحیه ثابت (C) زنجیره Ig gamma-1 بود. از بین لکه هایی مشترک بین هر دو بافت سرطانی و بافت مجاور، لکه ای که کاهش بیان داشت، مربوط به آلبومین سرمی و یک پپتید منفرد شبیه به زنجیره آلفا کلاژن VI و لکه ای که افزایش بیان داشت، مربوط به یک پپتید منفرد مشابه به کراتین نوع I و II اسکلت سلولی بود (شکل شماره ۱).

جدول شماره ۱. وضعیت بیان پروتئین های شناسایی شده در بافت های سرطانی و بافت مجاور آن

کد لکه	وضعیت بیان	پروتئین شناسایی شده
۳۰۴	فقط در بافت سالم مجاور	زیر واحد بتا هموگلوبین
۳۵۲	۱۶ برابر کاهش در بافت سرطانی	آلبومین سرمی و زنجیره آلفا کلاژن VI
۲۹۸	۴/۳ برابر افزایش در بافت سرطانی	پپتید منفرد مربوط به کراتین نوع I و II
۵۰۴	فقط در بافت سرطانی	ناحیه ثابت زنجیره ایمونوگلوبولینی گاما یک



شکل شماره ۱. ژل SDS-PAGE محتوای پروتئینی بافت سرطانی و بافت مجاور

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر که با رویکرد بررسی مقایسه پروتئومیکس بافت سرطانی پستان و بافت سالم مجاور آن انجام گرفت، مشاهده شد که زیر واحد بتاهموگلوبین در بافت سرطانی بیان نشده، ولی در بافت سالم مجاور آن بیان می شود. هم چنین، بیان آلبومین سرمی و یک پپتید منفرد شبیه به زنجیره آلفا کلاژن VI در بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم مجاور آن دچار کاهش شده، در مقابل، بیان یک پپتید منفرد مشابه به کراتین نوع I و II اسکلت سلولی در بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم مجاور آن افزایش می یابد. علاوه بر این، یافته های مطالعه حاضر نشان داد که یک پپتید مربوط به ناحیه ثابت (C) زنجیره Ig gamma-1 فقط در بافت سرطانی بیان داشته است. تا جایی که پژوهشگران اطلاع دارند این اولین مطالعه در ایران و از جمله معدود مطالعات در جهان است که به مقایسه پروتئومیکس بافت سرطانی پستان و بافت مجاور آن پرداخته است. هر چند به عنوان نقطه ضعف، در مطالعه حاضر همه لکه های پروتئینی مشاهده شده متغیر بین دو نوع بافت تعیین هویت نشده است، با این حال، نتایج به دست آمده در مورد چهار لکه انتخابی که پیش تر اشاره شد، قابل تامل بوده که اهمیت آن ها در ادامه مورد بحث قرار می گیرد.

آلبومین سرمی پروتئین اصلی موجود در خون است و در تنظیم فشار اسمزی کلئیدی خون و نقل و انتقالات داخل خون نقش بسیار مهمی ایفا می کند. مطالعات پیشین پیشنهاد کرده اند که کاهش آلبومین سرمی احتمالاً می تواند به عنوان یک فاکتور پیش آگهی مستقل برای بقاء افراد مبتلا به سرطان پستان مورد استفاده قرار بگیرد (۱۶، ۱۷). هموگلوبین خون، ۹۶ درصد وزن گلبول های قرمز خون را تشکیل می دهد و نقش اصلی آن انتقال اکسیژن از ریه ها به بافت های مختلف بدن می باشد (۱۸). یافته مطالعه ما مبنی بر کاهش آلبومین در بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم مجاور با نتایج مطالعه دنگ (Deng) و همکاران هم خوانی دارد (۷). بر اساس شواهد پیشین، کاهش در بیان آلبومین و هموگلوبین در بافت سرطانی در مقایسه

با بافت سالم اطراف ممکن است ناشی از کاتابولیسم آلبومین، هموگلوبین و سایر پروتئین های پلاسمایی توسط تومور بوده باشد (۱۹).

مطالعات پیشین نشان داده است که ریز محیط تومور در حفظ رفتار سلولی طبیعی نقش مهمی دارد و استرومای پیرامون سلول های اپی تلیال پستان در ترانسفورماسیون اپی تلیالی، رشد تومور و متاستاز نقش کلیدی ایفا می کند (۲۰، ۲۱). در راستای این فرضیه پیشنهاد شده است که احتمالاً کلاژن VI مشتق از بافت چربی پیرامون تومور رشد تومور را تقویت می کند (۲۲). از طرفی دیگر، شواهد نشان می دهد که در ریز محیط تومورهای با درجه و مرحله بالا بیان ماتریکس متالوپروتئینازهای (MMPs) تجزیه کننده کلاژن افزایش می یابد که به واسطه تجزیه کلاژن، به تخریب ماتریکس خارج سلولی کمک کرده و فرآیند متاستاز را تسهیل می نمایند (۲۳). بنا بر این، شواهد به دست آمده در پژوهش حاضر مبنی بر کاهش بیان کلاژن VI در بافت سرطانی در مقایسه با بافت مجاور آن با شواهد پیشین سازگار (۲۴-۲۲) بوده و پیشنهاد می کند که تغییر در سطح بیان کلاژن احتمالاً یک فاکتور مهم دخیل در پاتوژنز و پیشرفت سرطان پستان می باشد.

کراتین های اسکلت سلولی با تشکیل داربست های فراسلولی از سلول در برابر استرس های مکانیکی محافظت کرده و نیز به عنوان سیستم عامل سینگالینگ سلولی عمل می کنند (۲۵). مطالعات مختلف نشان داده اند که کراتین ها به طور فعال در تهاجم سلول های سرطانی و متاستاز و هم چنین در پاسخ به درمان دخالت دارند. این شواهد پایه و اساس مطالعات گسترده در مورد نقش کراتین ها به عنوان تنظیم کننده های چند منظوره تومورزایی اپی تلیال بوده است (۲۶). هم چنین، امروزه سیتوکراتین ها به عنوان مارکرهای مناسبی برای مونیتورینگ رفتار تومور و تعیین پیش آگهی سرطان ها مطرح شده اند (۲۷). به عنوان مثال، مشخص شده است که افزایش بیان کراتین ۱۸ در ریز محیط تومور در سرطان پستان با پیش آگهی ضعیف بیماری ارتباط دارد (۲۸). بنا بر این، در مطالعه حاضر، افزایش بیان یک پپتید منفرد مشابه

همکاران هم خوانی دارد (۳۴). آنان اعلام کردند که بیان نواحی ثابت زنجیره های Ig gamma-2 و Ig mu در سرطان پستان افزایش می یابد (۳۴). بنا بر این، یافته ما و یافته چو و همکاران همسو با شواهد پیشین از این فرضیه حمایت می کند که احتمالاً حضور IgG در ریز محیط تومور توام با افزایش سایر پروتئین ها از قبیل؛ سیتوکراتین ها و... به پاتوژنز و پیشرفت سرطان پستان کمک می نماید.

مطالعه حاضر پیشنهاد می کند که پروتئومیکس رویکرد مناسبی جهت شناسایی عوامل پروتئینی دخیل در سرطان پستان می باشد. بر اساس یافته های مطالعه ما، به نظر می رسد عدم بیان زیر واحد بتاهموگلوبین، کاهش بیان آلبومین سرمی و پپتید مرتبط با alpha-3 کلاژن، افزایش بیان پپتید مرتبط با سیتوکراتین نوع I و II و نیز بیان انحصاری ناحیه ثابت زنجیره Ig gamma-1 در بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم مجاور اطراف با پاتوژنز و احتمالاً پیشرفت سرطان پستان ارتباط دارد. با این حال، بهتر است مطالعات تاییدی بیشتری در این زمینه انجام شود.

References

1. Babu GR, Samari G, Cohen SP, Mahapatra T, Wahbe RM, Mermash S, et al. Breast cancer screening among females in Iran and recommendations for improved practice a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:1647-55.
2. Keyhani E, Muhammadnejad A, Karimlou M. Prevalence of HER-2-positive invasive breast cancer a systematic review from Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:5477-82.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
4. Singh RR, Kumar R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J Cell Biochem* 2005;96:490-505.
5. Amani D, Khalilnezhad A, Ghaderi A, Niikawa N, Yoshiura K. Transforming growth factor beta1 polymorphisms and breast cancer risk. *Tumour Biol* 2014;35:4757-64.
6. Matsumoto A, Jinno H, Ando T, Fujii T, Nakamura T, Saito J, et al. Biological

به کراتین نوع I و II اسکلت سلولی در بافت سرطانی در مقایسه به بافت سالم مجاور از شواهد پیشین موجود مبنی بر نقش سیتوکراتین ها در پاتوژنز سرطان پستان حمایت می کند.

هوبر (Huber) و همکاران نشان دادند که حضور IgG در سرم مدل های حیوانی آدنوکارسینوم پستان باعث القاء نوعی سلول های سرکوبگر می شود که این سلول ها فعالیت سیتولیتیک لنفوسیتی ضد توموری را تضعیف می کنند (۲۹). هم چنین، اریک (Eric) و همکاران نشان دادند که در انسان حضور IgG سرمی که با استرومای تومور واکنش می دهد توام با افزایش بیان کالرتیکولین (Calreticulin) توسط سلول های سرطانی، با افزایش متاستاز در سرطان پستان مرتبط می باشد (۳۰). اخیراً، مشخص شده است که کارسینوم ها و سلول های سرطانی نیز قادرند IgG تولید کنند که به افزایش تکثیر سلولی، پیشرفت بیماری و متاستاز کمک می نماید (۳۱-۳۳). نتایج مطالعه حاضر حاکی از حضور پپتید مربوط به ناحیه ثابت (C) زنجیره Ig gamma-1 فقط در بافت سرطانی (و نه در بافت سالم مجاور) بود. این یافته ما با مطالعه چو (Cho) و

- markers of invasive breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2015;2:41-6.
7. Deng SS, Xing TY, Zhou HY, Xiong RH, Lu YG, Wen B, et al. Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. *Genom Proteom Bioinform* 2006;165-72.
 8. Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. Protease activated receptor-2 is essential for factor VIIa and xa-induced signaling migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:307-14.
 9. Somiari RI, Sullivan A, Russell S, Somiari S, Hu H, Jordan R, et al. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* 2003;3:1863-73.
 10. Pucciminfra I, Fontana S, Cancemi P, Alaimo G, Minafra S. Proteomic patterns of cultured breast cancer cells and epithelial mammary cells. *Ann NY Acad Sci* 2002;963:122-39.

11. Alexander H, Stegner AL, Wagnermann C, Bois GC, Alexander S, Sauter ER. Proteomic analysis to identify breast cancer biomarkers in nipple aspirate fluid. *Clin Cancer Res* 2004;10:7500-10.
12. Lenz C, Dihazi H. Introduction to Proteomics Technologies. *Stat Anal Proteom* 2016;3:27.
13. Zou Y, Wang Y. Mass spectrometric analysis of high mobility group proteins and their post-translational modifications in normal and cancerous human breast tissues. *J Proteome Res*. 2007;6:2304-14.
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. Ong SE, Pandey A. An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecul Eng* 2001;18:195-205.
16. Lis CG, Grutsch JF, Vashi PG, Lammersfeld CA. Is serum albumin an independent predictor of survival in patients with breast cancer? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003;27:10-5.
17. Azab BN, Bhatt VR, Vonfrolio S, Bachir R, Rubinshteyn V, Alkaied H, et al. Value of the pretreatment albumin to globulin ratio in predicting long term mortality in breast cancer patients. *Am J Surg* 2013;206:764-70.
18. Weed RI, Reed CF, Berg G. Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes? *J Clin Invest* 1963;42:581-8.
19. Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Stewart JC, Hartung G, et al. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997;26:77-100.
20. Keely PJ, Fong AM, Zutter MM, Santoro SA. Alteration of collagen dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci* 1995;108:595-607.
21. Shekhar MP, Pauley R, Heppner G. Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res* 2003;5:130-5.
22. Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, et al. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* 2005;115:1163-76.
23. Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, et al. Expression of genes encoding type IV collagen degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 1992;7:77-83.
24. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med*. 2008;6:11.
25. Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* 2007;313:2021-32.
26. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 2011 30;30:127-38.
27. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 2004;37:529-40.
28. Vantveer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
29. Huber SA, Bigi G, Lucas ZJ. Tumor-specific suppressor cells induced by immunization with spleen cells from tumor bearing animals. *Cancer Res* 1980;40:3477-83.
30. Eric A, Juranic Z, Milovanovic Z, Markovic I, Inic M, Stanojevic-Bakic N, et al. Effects of humoral immunity and calreticulin overexpression on postoperative course in breast cancer. *Pathol Oncol Res* 2009;15:89-90.
31. Chen Z, Gu J. Immunoglobulin G expression in carcinomas and cancer cell lines. *FASEB J* 2007;21:2931-8.
32. Jiang C, Huang T, Wang Y, Huang G, Wan X, Gu J. Immunoglobulin G expression in lung cancer and its effects on metastasis. *PLOSone* 2014;9: 97359.
33. Liang PY, Li HY, Zhou ZY, Jin YX, Wang SX, Peng XH, et al. Overexpression

of immunoglobulin G prompts cell proliferation and inhibits cell apoptosis in human urothelial carcinoma. Tumour Biol 2013;34:1783-91.

34.Cho W, Jung K, Regnier FE. Sialylated Lewis x antigen bearing glycoproteins in human plasma. J Proteome Res2010;9:5960-8.



Proteomics Comparison of Breast Cancer with Adjacent Normal Tissues in Women with Breast Cancer

Amirishoar M^{1,2}, Hosseini M^{1,2}, Awsatmellati A^{1,2*}

(Received: April 4, 2016

Accepted: February 4, 2017)

Abstract

Introduction: The molecular mechanisms involved in the development and progression of breast cancer have yet to be determined. In the present study, the proteome of cancerous breast and adjacent normal tissues were compared.

Materials & Methods: In a cohort study, the cancer tissues and adjacent normal tissues were obtained from 5 female patients with ductal carcinoma in stage 3. The total protein contents of cancer and adjacent normal tissues were extracted. The protein expression levels were examined by Image Master 2D Platinum software following two-dimensional gel electrophoresis. MALDI-TOF MS/MS mass spectrometry was used for proteins identification.

Findings: The constant region of Ig gamma-1 chain and beta subunit of hemoglobin

were exclusively detected in the cancer and adjacent normal tissues, respectively. The expression of serum albumin and collagen VI alpha chain in the cancer tissue was significantly lower than the normal tissue ($P < 0.05$). In contrast, the expression of a single peptide matching to cytoskeletal type I and II keratin significantly increased in the cancer tissue compared to the normal tissues ($P < 0.05$).

Discussion & Conclusion: As the output of our investigation, it seems that proteome of cancerous tissue is extensively different from the adjacent one. Therefore, proteomic approach might be a promising tool for monitoring breast tumorigenesis. However, this needs to be confirmed in future.

Keywords: biomarker, breast cancer, pathogenesis, proteom

1. Zanjan Metabolic Disease Research Center, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2. Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

* Corresponding author Email: mellati3000@yahoo.com