

## بررسی بیان نسبی ژن *BIF-1* در تومور سرطان پستان و بافت های نرمال مجاور با استفاده از Real Time PCR

کزاله محمدی<sup>۱</sup>، مهدیه سلیمی<sup>۳\*</sup>، سید عبدالحمید انگجی<sup>۱</sup>، فروزنده محجوبی<sup>۲</sup>، طیبه مجید زاده<sup>۲</sup>

(۱) گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه نورزومی، کرج، ایران  
(۲) گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۹

### چکیده

**مقدمه:** سرطان پستان یک بیماری پیچیده به دلیل چندین تغییر ژنتیکی و اپی ژنتیکی است که نهایتاً به تغییر فرآیند های سلولی از جمله تکثیر، آپوپتوز، آنژیوژنز (رگ زایی) و اکتساب یک فنوتیپ مهاجم منجر می شود. *BIF-1* (BAX interacting factor) که یک ژن سرکوب گر تومور است، در تنظیم خمیدگی های غشای میتوکندری نقش دارد و حاوی دمنین BAR است که به واسطه آن با BAX تعامل می یابد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تفاوت بیان نسبی ژن *BIF-1* در بافت انسانی تومور مبتلایان به سرطان پستان در مقایسه با بافت نرمال اطراف تومور به روش Real-Time PCR می باشد.

**مواد و روش ها:** این مطالعه مورد شاهدهی بر روی ۵۰ نمونه ی حاصل از زنان مبتلا به سرطان پستان و ۵۰ نمونه کنترل نرمال اطراف تومور که در سال ۱۳۹۳ به بیمارستان های میلاد و خاتم الانبیاء مراجعه کرده بودند، انجام شد. بعد از جمع آوری نمونه ها، استخراج RNA از بافت با استفاده از کیت استخراج TriPure RNA Isolation انجام شد. سپس سنتز cDNA از RNA های استخراج شده با استفاده از کیت Revert AID First strand cDNA synthesis Kit انجام گرفت. در نهایت بیان ژن *BIF-1* در ۵۰ بافت تومور سرطان پستان و ۵۰ بافت نرمال پستانی با استفاده از تکنیک SYBR Green Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته های پژوهش:** نتایج ما نشان داد که ژن *BIF-1* در ۳۴ نمونه (۶۸ درصد) از بافت توموری مبتلایان به سرطان پستان نسبت به بافت نرمال مجاور تومور دچار کاهش بیان می باشد که این اختلاف از منظر آماری معنی دار تلقی می گردد ( $P=0.001$ ). این پایین بودن میانگین بیان در بافت توموری نسبت به بافت نرمال اطراف تومور تایید کننده عملکرد سرکوبگری تومور ژن *BIF-1* است.

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه به کاهش بیان ژن *BIF-1* در بافت های تومور در مقایسه با بافت نرمال پستانی می توان این ژن را به عنوان یک کاندید زیست نشانگر احتمالی مرتبط با سرطان پستان جهت بررسی های آتی معرفی نمود.

**واژه های کلیدی:** سرطان پستان، *BIF-1*، بیان ژن، Real-Time PCR

\* نویسنده مسئول: گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

Email: [salimi@nigeb.ac.ir](mailto:salimi@nigeb.ac.ir)

Copyright © 2017 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 معمولا در لوبول‌ها یا مجراهای یک یا هر دو پستان تومورهای بدخیم ایجاد می‌کند. این سرطان بعد از سرطان ریه معمول‌ترین سرطان و دومین عامل مرگ و میر در زنان در ایالت متحده معرفی شده است (۱). سرطان‌های پستان یک گروه ناهمگن از تومورها هستند که رفتار و پاسخ به درمان متنوع دارند (۲). آمار دقیقی از تعداد مبتلایان به سرطان پستان در ایران وجود ندارد، اما به طور مسلم سرطان پستان، شایع‌ترین نوع سرطان زنان در کشور است (۳). بر اساس مطالعات متعدد، وجود سابقه خانوادگی سرطان سینه و وضعیت فرزندآوری دو عامل مهم تاثیرگذار در بیماران ایرانی بر شمرده شده اند (۴). ژن‌ها از یک سو دلیلی برای وقوع سرطان و از سوی دیگر ابزاری برای درمان آن محسوب می‌شوند بنا بر این، اگر وقایع محیطی سبب ایجاد خطاهایی در ژن‌های کنترل‌کننده رشد شوند، سلول‌های آسیب‌دیده ممکن است تکثیر شده و منجر به ایجاد سرطان گردند (۵).

از جمله ژن‌های عامل ایجاد سرطان، ژن *BIF-1* انسانی است که روی کروموزوم 1p22 واقع شده و غالبا در بسیاری از تومورها حذف شده است (۶). ژن *BIF-1* انسان، کدکننده یک پلی‌پپتید ۳۶۵ آمینو اسیدی است که شامل یک دومین (N-ترمینال BAR) (Bin/Amphiphysin/Rvs) که به چربی‌ها متصل شده و سبب انحنای غشاء می‌شود (۷)، یک دومین کوئیل-کوئیل مرکزی و یک دومین C (carboxy-terminal) -terminal) (Src-homology3) SH3 است (۸). دومین SH3، که شامل ۶۰ اسید آمینه است، به توالی غنی از پرولین در بسیاری از پروتئین‌های داخل سلولی متصل می‌شود (۹).

بخش N-ترمینال (۲۷-۱ اسید آمینه) *BIF-1*، برای اتصال آن به *BAX* مورد نیاز است. علاوه بر این، تعامل بین *BIF-1* و *BAX* در سلول‌های پستانداران به وسیله یک تغییر ساختاری در پروتئین *BIF-1* در طول آپوپتوز افزایش یافته است (۸). از آنجا که سرطان پستان به عنوان دومین سرطان شایع و مهم‌ترین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان جهان می‌باشد (۷) و

پیشرفت‌های علمی در پیشگیری از سرطان پستان، تشخیص و درمان هنوز فاقد توانایی موثر در درمان این بیماری مخرب مخصوصا سرطان سینه از نوع سه‌گانه منفی یا Triple Negative فاقد هر سه گیرنده استروژن، پروژسترون و فاکتور رشد انسانی اپیدرمال هستند (۷). لذا یافتن راه‌کارهایی جهت تشخیص زود هنگام، اقدامات پیشگیرانه و روش‌های درمانی مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است.

لذا بررسی و شناسایی زیست‌نشانگرهای مرتبط با مقوله‌های تشخیصی، پیش‌آگهی یا پروگنوز، درمان و یا پیش‌بینی پاسخ به درمان از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعه حاضر با توجه به عملکرد ژن *BIF-1* و نقش متصور سرکوب‌گری تومور آن بیان این ژن در بافت توموری و نرمال سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت هدف از این بررسی کاندید نمودن مارکری زیستی مرتبط با سرطان پستان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

پنجاه بافت توموری پستان به همراه پنجاه نمونه نرمال مجاور تومور با کسب رضایت نامه کتبی از بیماران و با رعایت قوانین اخلاق در مطالعات تجربی پزشکی Helsinki و تبعیت از دستورالعمل‌های مربوطه از بیمارستان‌های میلاد و خاتم‌الانبیاء دریافت و با رعایت اصول انتقال و نگه‌داری بافت تازه به پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری انتقال داده شد. روند نمونه‌گیری با انتقال نمونه به کرایو تیوپ‌های استریل آغاز و با انتقال کرایو تیوپ‌ها به تانک حاوی ازت مایع جهت انتقال به پژوهشگاه در مدت زمان کمتر از دو ساعت و نگه‌داری در فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. تمامی دستورالعمل‌های اخلاقی بانک‌های زیستی برای نگه‌داری و استفاده از نمونه‌های انسانی رعایت گردید.

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** جهت استخراج RNA، ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم از هر یک از بافت‌ها بر روی یخ خشک بریده شد و با کوبیدن در هاون چینی با استفاده از ازت مایع به صورت پودر درآمد و در ۱ میلی‌لیتر از محلول (TriPure Isolation Reagent شرکت Roche) همگن و براساس دستورالعمل شرکت

**کنترل داخلی و ژن مورد نظر:** ژن خانه دار بتا

اکتین که به طور معمول در مطالعات بیان ژن در در سرطان پستان استفاده می شود، به عنوان کنترل داخلی انتخاب گردید. پایداری بیان آن نرمال کردن بیان ژن *BIF-1* مورد بررسی قرار گرفت.

تمامی پرایمرها توسط نرم افزارهای طراحی *Primer Express 3.0* و *Generunner v.3.05* توسط نرم افزار *Primer Express 3.0* تأیید شد (جدول ۱).

بازده تکثیر هر پرایمر با استفاده از تهیه ی منحنی استاندارد از رقت های سریال یک دهم از cDNA و با استفاده از نرم افزارهای *SPSS LinReg*, *REST*, (Statistical Package for Social Science IL, USA, V.16, SPSS Inc, Chicago) مورد بررسی قرار گرفت.

سازنده، RNA از بافت ها استخراج گردید. حاصله جهت سنجش کیفیت و کمیت به ترتیب درون ژل آگارز ۱ درصد ران شد و کیفیت RNA استحصال شده با بررسی کیفیت دو باند 18s RNA و 28s ریوزومی (rRNA) مورد بررسی قرار گرفت. سپس کمیت RNA با استفاده از روش کمی طیفسنجی جذبی اشعه ماوراء بنفش با سنجش غلظت و خلوص نمونه RNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. غلظت RNA استخراج شده از نمونه ها در محدوده ی 1000-4000 ng/ $\mu$ l اندازه گیری شد.

۱ میکرو لیتر از این RNA با استفاده از کیت *Revert AID First Strand cDNA synthesis kit* (Fermentase) به cDNA تبدیل گردید.

جدول ۱، مشخصات پرایمر های استفاده شده در واکنش *Time PCR*

پرایمر	توالی	طول bp	محتوی GC %	اندازه محصول PCR(bp)
<i>BIF-1</i>	F:5'CTAGAGGGAATCAGCAGTACACATG3'	۲۵	٪۴۸	174 bp
	R:5'AGGTGTCACAGAAGTCTGATTGTTG3'	۲۵	٪۴۴	
$\beta$ -actin	F:5' GAGACCTCAACACCCCAGCC 3'	۲۱	٪۶۱	161bp
	R:5' AGACGCAGGATGGCATGGG 3'	۱۹	٪۶۳	

**میزان بیان و وضعیت بیان ژن *BIF-1***

در جدول ۲، میزان بیان ژن *BIF-1* در بافت تومور در مقایسه با میانگین بیان در بافت نرمال مجاور و هم چنین وضعیت بیان ژن *BIF-1* در بافت تومور در مقایسه با میانگین بیان در بافت نرمال مجاور آن آمده است.

جدول ۲، مقایسه میزان بیان و وضعیت بیان ژن *BIF-1* در بافت تومور و بافت نرمال مجاور

ردیف	میزان بیان ژن <i>BIF-1</i> در بافت تومور در مقایسه با میانگین بیان در بافت نرمال مجاور	وضعیت بیان ژن <i>BIF-1</i> در بافت تومور در مقایسه با میانگین بیان در بافت نرمال مجاور	ردیف	میزان بیان ژن <i>BIF-1</i> در بافت تومور در مقایسه با میانگین بیان در بافت نرمال مجاور	وضعیت بیان ژن <i>BIF-1</i> در بافت تومور در مقایسه با میانگین بیان در بافت نرمال مجاور
۱	+/۱۱	Down regulation	۲۶	+/۴۱	Down regulation
۲	+/۱۲	Down regulation	۲۷	+/۶۴	Normal
۳	+/۰۰۰۱	Down regulation	۲۸	+/۴۱	Down regulation
۴	+/۴۱	Down regulation	۲۹	+/۰۷	Down regulation
۵	+/۰۰۴	Down regulation	۳۰	+/۹۶	Normal
۶	۱/۸۸	Normal	۳۱	+/۴۱	Down regulation
۷	+/۰۰۳	Down regulation	۳۲	+/۲۶	Down regulation
۸	+/۱	Down regulation	۳۳	+/۰۰۰۸	Down regulation
۹	+/۱۹	Down regulation	۳۴	۳/۱۴	Over exp.
۱۰	+/۴۱	Down regulation	۳۵	۳/۲۱	Over exp.
۱۱	+/۴۱	Down regulation	۳۶	+/۲۶	Down regulation
۱۲	+/۴۱	Down regulation	۳۷	+/۷	Normal
۱۳	+/۰۷	Down regulation	۳۸	+/۶۶	Normal
۱۴	+/۵۷	Normal	۳۹	۱/۰۳	Normal

۱۵	+۰/۱۹	Down regulation	۴۰	+۰/۱۲	Down regulation
۱۶	+۰/۵۹	Normal	۴۱	+۰/۲۵	Down regulation
۱۷	+۰/۰۲	Down regulation	۴۲	+۰/۴۱	Down regulation
۱۸	+۰/۰۰۰۳	Down regulation	۴۳	+۰/۱	Down regulation
۱۹	+۰/۰۲	Down regulation	۴۴	+۰/۴۳	Down regulation
۲۰	۱/۰۰۰۶	Normal	۴۵	۳/۹۸	Over exp.
۲۱	+۰/۰۰۳	Down regulation	۴۶	+۰/۷۸	Down regulation
۲۲	۳/۸۶	Over exp.	۴۷	+۰/۰۰۶	Down regulation
۲۳	+۰/۰۷	Down regulation	۴۸	+۰/۰۶	Down regulation
۲۴	۲/۷۴	Over exp.	۴۹	+۰/۲۴	Down regulation
۲۵	۲/۳۹	Over exp.	۵۰	۱/۴۷	Normal

شد (جدول ۳). غلظت نهایی هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت ژن های *BIF-1* و بتا اکتین ۰/۳ میکرومولار بود.

### Real Time PCR کمی

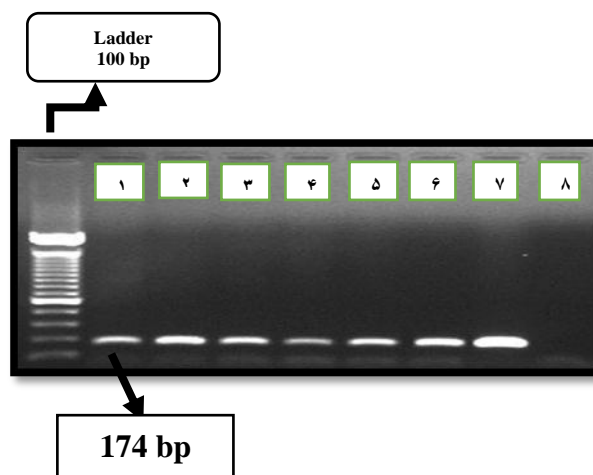
واکنش SYBR Green I با استفاده از کیت Q RT PCR 480 Master mix (Roche Applied Science) شرکت Roche در واکنش های ۱۰ میکرولیتری انجام

جدول ۳، برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش های Real Time RT-PCR برای ژن *BIF-1* و  $\beta$ -ACTIN

مرحله	دما	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی	۹۵	۱۰'	۱
واسرشته سازی	۹۵	۲۰''	
اتصال آغازگرها	۶۲	۱۵''	۴۰
بسط آغازگرها	۷۲	۱۵''	
مرحله تطویل نهایی	۷۲	۵'	۱

۲٪ ارزیابی و صحت اندازه قطعه حاصل از تکثیر توسط نشانگر وزنی M100bp مورد ارزیابی قرار گرفته شد. نتایج تایید تکثیر *BIF-1* در بافت توموری روی ژل آگارز ۲٪ در شکل ۱ به تصویر کشیده شده است.

اندازه گیری میزان فلورسانت توسط دستگاه rotor-gene 6000 ساخت شرکت corbet و آنالیز داده ها توسط نرم افزار های REST, LinReg انجام شد. جهت تایید صحت انجام واکنش PCR و تکثیر قطعات، محصول واکنش Real Time RT-PCR روی ژل آگارز



شکل ۱، نتایج تایید تکثیر *BIF-1* در بافت توموری بر روی ژل آگارز ۲٪ (چاهک اول نشانگر وزنی و ۶-۱ بافت توموری و ۷ بافت سالم و ۸ کنترل منفی) را نشان می دهد.

## آنالیز داده ها

داده های خام حاصل از Real Time RT-PCR با استفاده از نرم افزار لینرگ تجزیه و تحلیل شد و کارایی تکثیر و اعداد CT برای هر واکنش به دست آمد.  $CT$  (cycle threshold) به تعداد سیکل هایی اطلاق می شود که لازم است تا سیگنال فلورسنت از سطح سیگنال زمینه یا threshold گذر کند. سطح  $CT$  با میزان نوکلئیک اسید هدف در نمونه نسبت عکس دارد، به عبارتی هر چه سطح  $CT$  کمتر باشد نمایانگر بالاتر بودن میزان اسید نوکلئیک هدف در نمونه است و برعکس. سپس تغییرات بیانی ژن های مورد مطالعه با استفاده از خروجی لینرگ توسط نرم افزار REST بررسی شد. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و  $P < 0.05$  معنی دار محسوب گردید.

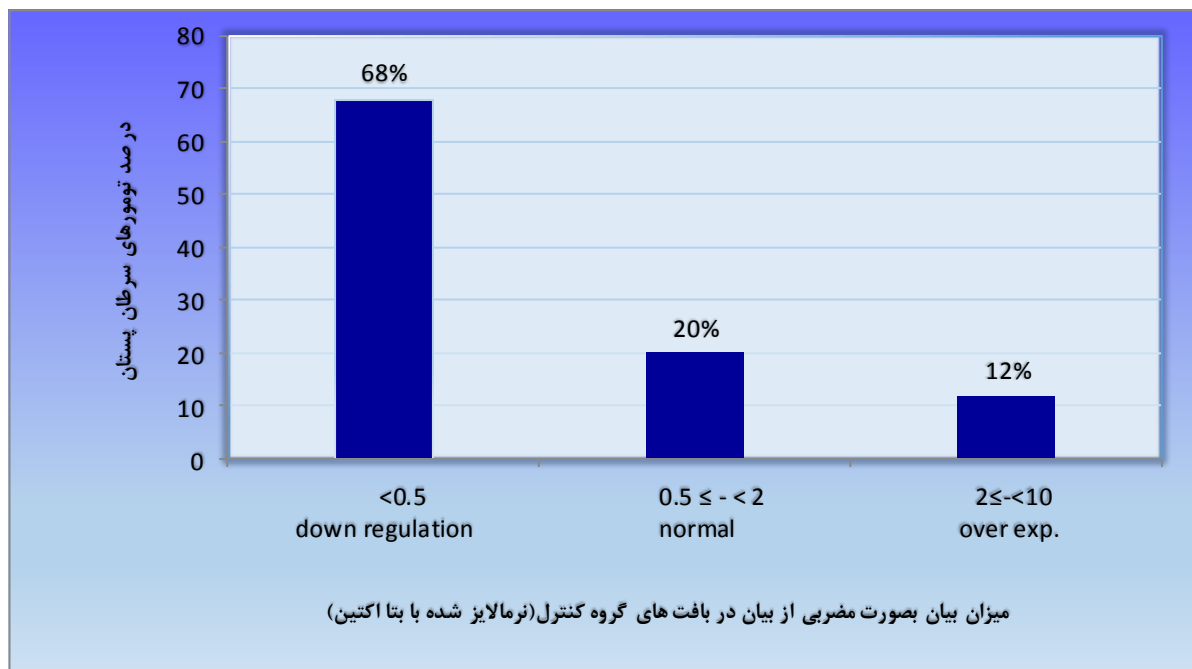
**نسبت میزان بیان ژن ها:** با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  داده ها به صورت مضربی از میزان بیان ژن درج شده و توسط ژن کنترل داخلی  $\beta$ -ACTIN و در مقایسه با مجاور نرمال متوازن و تفسیر گردید. بیان

RNA با میزان دو برابر و یا بیشتر به عنوان افزایش بیان و بین ۰/۵ و ۲ برابر به عنوان نرمال و ۰/۵ برابر و کم تر به عنوان کاهش بیان منظور گردید.

$$\Delta\Delta CT = [(CT_{BIF-1(tumor)} - CT_{\beta-ACTIN(tumor)}) - (CT_{BIF-1(normal)} - CT_{\beta-ACTIN(normal)})]$$

## یافته های پژوهش:

همان طور که در نمودار ۱ مشخص است، نتایج حاکی از آن است که ژن  $BIF-1$  در ۳۴ نمونه (۶۸ درصد) از مبتلایان به سرطان پستان در مقایسه با بافت نرمال کاهش بیان داشته این در حالی است که ۱۶ نمونه (۳۲ درصد) نمایانگر میزان بیان طبیعی این ژن و تنها ۶ نمونه (۱۲ درصد) افزایش بیان را نشان دادند. این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ( $P=0.001$ ). پایین بودن میانگین بیان در بافت توموری نسبت به بافت نرمال اطراف تومور تایید کننده عملکرد سرکوب گری تومور ژن  $BIF-1$  می باشد.



نمودار ۱، بیانگر میزان بیان ژن  $BIF-1$  در تومور های پستانی مورد بررسی است. نمودار ۱، بررسی نتایج سنجش بیان ژن  $BIF-1$  در تومور های پستان: نتایج با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  با ژن کنترل داخلی  $ACTIN$  نرمالایز گشته و در مقایسه با میانگین میزان بیان در بافت های نرمال کنترل محاسبه گردید.

## بحث و نتیجه گیری

سرطان، رشد کنترل نشده سلول‌هایی است که قادر به دریافت پیام توقف رشد نیستند؛ بنا بر این، مهم ترین هدف سلول‌های سرطانی تکثیر شدن است. سلول‌های نرمال دارای یک چرخه ی تقسیم، پیری و در نهایت انتخاب شدن برای مرگ هستند اما سلول‌های سرطانی قادرند این چرخه ی نرمال را کنار گذاشته و به رشد خود ادامه دهند. مکانیسم‌های زیادی وجود دارند که می‌توانند به رشد کنترل نشده ی سلول‌ها کمک کنند. یکی از این مکانیسم‌ها وراثت می‌باشد (۱۰).

برخی از افراد به دلیل اختلالات ژنتیکی مستعد ابتلاء به سرطان هستند. با این حال، وراثت تنها دلیل ایجاد این ناهنجاری‌های ژنتیکی نمی‌باشد. از آن جا که شرایط و محیط زندگی انسان‌ها به صورت استریل و عاری از هر گونه عوامل بیماری‌زا و حمله‌های محیطی نمی‌باشد، ممکن است ساختار ژنتیکی سلول‌ها در اثر عوامل محیطی نظیر تابش پرتو، مواد شیمیایی، مصرف الکل و غیره تحت تاثیر قرار گیرد (۱۱).

اختلال بیان ژن BIF-1 در سلول‌های سرطانی، در مقایسه با بافت سالم مجاور، در بسیاری از انواع سرطان از جمله سرطان کولورکتال (۸)، پروستات (۱۲)، سرطان لوزالمعده (۱۳)، سرطان مهاجم مثانه (۱۴) و سرطان معده (۱۵) مشاهده شده است.

نتایج ما نشان داد که ژن BIF-1 به طور معنی داری در ۶۸ درصد از نمونه‌های بافت تومور پستانی در مقایسه با بافت نرمال پستان دچار کاهش بیان می‌باشد.

برخی از محققین به نتایجی شبیه نتایج مطالعه حاضر دست پیدا کرده اند، به عنوان مثال در مطالعه ای برای اولین بار گزارش شد که پروتئین BIF-1 در ۱۷٪ (۳۳/۱۹۲ بیمار) از کل مبتلایان به سرطان پروستات مورد بررسی از نظر بیان خاموش گزارش شد. این یافته‌ها نشان دهنده فعالیت سرکوب‌گری تومور و طرفدار آپوپتوز بودن BIF-1 است (۹). کاهش بیان BIF-1 در سلول‌های اپیتلیال در سرطان معده بدخیم در مقایسه با سلول‌های مخاط نرمال نشان می‌دهد که از دست رفتن بیان BIF-1 ممکن است در تومور زای معده به

وسیله مهار آپوپتوز به واسطه BIF-1 نقش بازی کند (۱۶).

از طرفی تاکاهاشی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در یک مطالعه نشان دادند که سرکوب BIF-1 در موش باعث ترویج پیشرفت تومور می‌شود (۱۶). هم چنین کاپولا و همکاران در مطالعه بررسی بیان BIF-1 در سرطان کولون، نشان دادند که ژن BIF-1 در ۲۲/۵٪ از مبتلایان به سرطان کولون بیان نشده بود اما در همه نمونه‌های نرمال، بیان ژن BIF-1 مشهود بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P=0.002) (۱۷). این یافته‌ها تایید کننده نتایج مطالعه حاضر است و در نهایت فعالیت سرکوب‌کنندگی BIF-1 به وسیله افزایش آپوپتوزیس را تایید می‌کند.

یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر نیز همسو با نتایج به دست آمده از مطالعه بررسی تغییر بیان این ژن بر روی بافت‌های سرطانی مختلف از جمله پروستات، معده و کولون می‌باشد.

با این حال نقش پیش‌آگهی دهنده‌گی کاهش بیان BIF-1 در بسیاری از سرطان‌های حاد هنوز در حاله ای از ابهام است. علاوه بر این، فن و همکاران گزارش کردند که بیان BIF-1 در سلول‌های سرطانی کبد نسبت به بافت نرمال اطراف تومور بالا تر بوده و این با درجه پایین تمایز و بقاء (Survival) مرتبط گزارش شد (۶).

در مطالعه بیان BIF-1 در سلول‌های سرطانی کبد نسبت به بافت نرمال اطراف تومور در بیماران مبتلا به سرطان کبد توسط فن و همکاران، مشاهده شد که بیمارانی که دارای شدت بالای بیان BIF-1 بودند در مقایسه با بیمارانی که بیان BIF-1 در آنها پایین گزارش شده بود، مدت زمان زنده ماندنشان کوتاه‌تر است و این خود بیانگر این موضوع است که میزان بیان BIF-1، با زمان بقاء در ارتباط است (۱۸). این نتایج متناقض ممکن است به دلیل پیچیدگی عملکردهای بیولوژیک ناشی از BIF-1 باشد (۹).

متأسفانه مطالعات محدودی در زمینه بررسی کمی میزان بیان BIF-1 انجام شده است. در مطالعاتی هم که در رابطه با فعالیت BIF-1 انجام شده است بعضاً همه‌ی گزارشات در یک راستا نبوده و نتایج ضد و نقیضی گزارش شده است. در رابطه با نقش بیان ژن

حساس استفاده شود، زیرا بیان ژن ها در نمونه های بالینی کمتر از رده های سلولی می باشد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، تغییرات بیانی ژن *BIF-1* را می توان به عنوان یک بیو مارکر احتمالی مرتبط با سرطان پستان معرفی کرد. مطالعات آتی در جهت بررسی ارتباط میزان بیان این ژن با خصوصیات هیستوپاتولوژی و بالینی بیمار در ادامه تحقیقات حاضر انجام خواهد شد.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری کلیه بیمارانی که از نمونه بافتی آنان در انجام این تحقیق استفاده شد و از سرکار خانم دکتر نفیسی جهت تامین نمونه های بافتی بیماران تقدیر و تشکر به عمل می آید.

### References

1. Alberg AJ, Singh S, May JW, Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Current Opinion Oncol* 1997; 9:505-11.
2. Fonseca Sanchez MA, Rodriguez Cuevas S, Mendozahernandez G, Bautista Pina V, Arechaga Ocampo E, et al. Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade. *Int J Oncol* 2012; 41:670-80.
3. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran a review of 903 case records. *Public Health* 2000; 114:143-5.
4. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran an epidemiological review. *Breast J* 2013; 13:383-91.
5. Artandi SE, Depinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31:9-18.
6. Ko YH, Seokcho Y, Won HS, An HJ, Sun DS, Hong SU, et al. Stage stratified analysis of prognostic significance of bax interacting factor-1 expression in resected colorectal cancer. *Biomed Res Int* 2013; 2013:329839-46.
7. Runkle KB, Meyerkord CL, Desai NV, Takahashi Y, Wang HG. Bif-1 suppresses breast cancer cell migration by promoting EGFR endocytic degradation. *Cancer Biol Therapy* 2012; 13:10,956-66.
8. Coppola D, Khalil F, Eschrich SA, Boulware D, Yeatman T, Wang HG. Down regulation of bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 2008; 113:2665-70.

BIF-1 در سرطان پستان اکثر مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته محدود به رده های سلولی سرطان پستان و نرمال بوده لذا در تحقیق حاضر بیان این ژن در بافت تومور و نرمال انسانی مورد بررسی قرار گرفت. راه های متعددی برای بررسی بیان ژن ها وجود دارد و اختلاف نظری هم که در گزارش های مختلف وجود دارد شاید به دلیل استفاده از روش های مختلف برای بررسی آن ها باشد. فقدان یک روش کمی مناسب برای تعیین میزان دقیق بیان ژن، مسئله مهمی است که باعث پدید آمدن اشکال در تفسیر داده ها می شود. روش های عمده بررسی بیان ژن ها عبارتند از: وسترن بلات، ایمونو هیستوشیمی، فلو سائتومتری، RT PCR و Real Time RT-PCR. برای بررسی بیان ژن ها در نمونه های بالینی بیماران ضرورت دارد که از یک روش

9. Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, et al. Molecular cloning and characterization of Bif-1 a novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with bax. *J Biol Chem* 2001; 276:20559-65.
10. Bishop MJ. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235:305-11.
11. Coley HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 378-90.
12. Coppola D, Oliveri C, Sayegh Z, Boulware D, Takahashi Y, Pow-Sang J, Djeu JY, Wang HG. Bax-Interacting Factor-1 expression in prostate cancer. *Clin Genit Cancer* 2008; 6:117-21.
13. Coppola D, Helm J, Ghayouri M, Malafa MP, Wang HG. Down-regulation of bax-interacting factor-1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2011; 40:433-7.
14. Kim SY, Oh YL, Kim KM, Jeong EG, Kim MS, Yoo NJ, et al. Decreased expression of bax-interacting factor-1 in invasive urinary bladder and gallbladder cancers. *Pathology* 2008; 40:553-7.
15. Lee JW, Jeong EG, Soung YH, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, et al. Decreased expression of tumour suppressor bax-interacting factor-1 a bax activator in gastric carcinomas. *Pathology* 2013; 38:312-5.
16. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cui HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and

regulates autophagy and tumorigenesis. Nature Cell Biol 2007, 9:1142-51.

17. Coppola D, Khalil F, Eschrich SA, Boulware D, Yeatman T, Wang HG. Down regulation of bax-interacting factor-1 in colon cancer. Cancer 2008;113:2665-70.

18. Fan R, Miao Y, Shan X, Qian H, Song C, Wu G, et al. Bif-1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and correlates with shortened patient survival. Oncol Lett 2012;3:851-4.



## ◆ BIF-1 Relative Gene Expression Study in Breast Cancer Tumor and Normal Adjacent Tissues using Real Time PCR

Mohammadi K<sup>1</sup>, Salimi M<sup>2\*</sup>, Angaji A<sup>1</sup>, Mahjoubi F<sup>2</sup>, Majidzadeh T<sup>2</sup>

(Received: January 9, 2016 Accepted: July 11, 2016)

### Abstract

**Introduction:** Breast cancer is a complex disease due to several biological Levels of genetic and epigenetic changes that ultimately alter the cellular processes including proliferation, apoptosis, angiogenesis and the acquisition of an invasive phenotype results. BIF-1 (BAX interacting factor) is a tumor suppressor gene which is involved in the regulation of mitochondrial membrane bends and containing BAR domains that mediate interaction with BAX. The aim of this study was to investigate the relative gene expression differences of *BIF-1* in human breast tumor compared with normal adjacent tissues using Real-Time PCR method.

**Materials & methods:** This case-control study was implemented on 50 tumour and normal adjacent tissue samples of breast cancer patients. The patients had referred to Milad and Khatam hospitals in 2014. After collecting the samples, total RNA was extracted from tissue by TriPure RNA isolation kit. The cDNA was

synthesized from extracted RNA by Revert AID First strand cDNA synthesis kit. Finally the *BIF-1* gene expression was analyzed in tumor and normal adjacent tissues using SYBR green Real-Time PCR.

**Findings:** Our results indicated that *BIF-1* was down regulated in 34 breast cancer patients which was statically significant (P=0.001). This lower mean of *BIF-1* gene expression in tumor tissues compared with normal adjacent ones confirmed its role as a tumor suppressor gene.

**Discussion & conclusions:** Due to the significant difference in *BIF-1* gene expression in breast tumor and normal tissue, this gene may candidate as a possible biomarker related to breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, Gene expression, BIF-1, Real Time PCR

1. Dept of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Dept of Medical Genetic, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

\* Correspondin author Email:mkajaleh@gmail.com