

## Expression Levels of Key Components of the Hedgehog Pathway and an Investigation of the Correlation of this Pathway with Expression Levels of Claudin-1 in Invasive Breast Carcinoma

Marzieh Salehi<sup>1</sup>, Sadeh Babashah<sup>2\*</sup>, Sirous Zeinali<sup>3</sup>

- 1- M.Sc. Students, Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: babashah@modares.ac.ir

Received: 22/Feb/2016, Accepted: 01/Jun/2016

### Abstract

**Objective:** Breast cancer is considered a heterogeneous disease, characterized by different biological and phenotypic features which make its diagnosis and treatment challenging. We have sought to investigate the expression levels of key components of the Hedgehog signaling pathway, correlation between the signal transducer Smo, and clinicopathologic features (lymph node metastasis and metastasis stage) in invasive breast carcinoma. Also, we examined the inverse correlation between expression levels of Smo and Claudin-1 (an important gene involved in cell tight junctions).

**Methods:** In this case-control study, we assessed 36 pairs of tumor and adjacent normal tissue specimens obtained from patients with invasive ductal breast carcinoma. The expression levels of key components of Hedgehog signaling (Smo, Gli1 and Ptch), Claudin-1, E-cadherin, and MMP2 were measured by qRT-PCR. The correlations between Smo expression with some clinicopathologic parameters were also analyzed.

**Results:** We found up-regulation of Hedgehog signaling in invasive breast carcinoma samples compared to normal adjacent tissues. Upregulation of the signal transducer Smo correlated with tumor stages and lymph node metastasis of the breast tumors. Interestingly, this correlation was affected by the expression of Her2. A significant correlation existed between expression levels of the signal transducer Smo and Claudin-1, E-cadherin as an epithelial cell marker, and MMP2 as a metastasis-related gene in advanced metastatic tumor samples.

**Conclusion:** Taken together, our study revealed a new layer of molecular complexity which should be considered in the management of patients with invasive breast carcinoma. The results suggested a key role for Hedgehog signaling in invasive breast carcinoma. In terms of the inverse correlation between expression levels of Claudin-1 and Hedgehog signaling, Claudin-1 could serve as a candidate gene in diagnostic studies. Thus, its clinical significance should be further clarified.

**Keywords:** Breast cancer, Hedgehog signaling pathway, Claudin-1, Prognosis

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.1, Pages: 45-57

# الگوی بیانی اعضای کلیدی مسیر Hedgehog و بررسی ارتباط این مسیر با بیان ژن Claudin-1 در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان

مرضیه صالحی<sup>۱</sup>، صادق باباشاه<sup>۲\*</sup>، سیروس زینلی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

Email: babashah@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۳/۱۲

دریافت مقاله: ۹۴/۱۲/۰۴

## چکیده

**هدف:** سرطان پستان به عنوان بیماری هتروژن با ویژگی‌های زیستی و فنوتیپی متفاوت همراه است که این ویژگی‌ها تشخیص و درمان بیماری را چالش برانگیز کرده است. این مطالعه به بررسی سطوح بیانی اعضای کلیدی مسیر پیام‌رسانی Hedgehog و همراهی بیان‌گیرنده انتقال پیام Smo با برخی ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناختی نظیر وضعیت بیان Her-2، متاستاز به عروق لنفی و مرحله متاستاز در کارسینومای تهاجمی پستان می‌پردازد. همچنین ارتباط معکوس بیانی بین ژن Smo و Claudin-1 (یکی از ژن‌های مهم اتصالات محکم سلولی) بررسی می‌شود.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه مورد-شاهد حاضر، در بین ۳۶ جفت نمونه بافتی تومور و بافت سالم مجاور از بیماران مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجاری پستان، سطوح بیانی اعضای کلیدی مسیر پیام‌رسانی Hedgehog (Smo، Gli1، Ptc) و Claudin-1، E-cadherin و MMP2 توسط Q-RT-PCR سنجیده شد. همچنین همراهی بیان‌گیرنده انتقال پیام Smo با برخی ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناختی بررسی شد.

**نتایج:** نتایج بیش‌تنظیمی مسیر پیام‌رسانی Hedgehog در نمونه‌های کارسینومای تهاجمی پستان در مقایسه با بافت سالم مجاور را نشان داد. همچنین بیش‌تنظیمی ژن انتقال پیام Smo با مراحل پیشرفته تومور و متاستاز به عروق لنفی تومورهای پستان در ارتباط بود و این ارتباط متأثر از وضعیت بیانی ژن Her-2 بود. علاوه بر این؛ ارتباط محسوسی بین سطوح بیانی Smo و ژن‌های Claudin-1 (ژن دخیل در اتصالات سلولی)، E-cadherin (ژن نشانگر سلول اپی‌تلیال) و MMP2 (ژن کلیدی ماتریکس خارج سلولی و مرتبط با متاستاز) در نمونه‌های توموری با مراحل پیشرفته متاستاز ملاحظه شد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه سطح جدیدی از پیچیدگی مولکولی که باید در مدیریت بیماران مبتلا به کارسینومای تهاجمی پستان مورد لحاظ واقع شود را نشان داد. نتایج بر نقش کلیدی مسیر پیام‌رسانی Hedgehog در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان اشاره دارد. همچنین با توجه به ارتباط بیانی معکوس ژن Claudin-1 با مسیر Hedgehog، به‌نظر می‌رسد ژن Claudin-1 می‌تواند به‌عنوان کاندیدایی برای بررسی‌های بیشتر در مطالعات تشخیصی مورد ملاحظه قرار گیرد؛ بنابراین اهمیت بالینی این مسئله نیاز به تحقیقات بیشتر در آینده دارد.

**کلیدواژگان:** سرطان پستان، مسیر پیام‌رسانی Hedgehog، Claudin-1، پیش‌آگهی

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات: ۴۵-۵۷

سرطان پستان فراوان‌ترین سرطان در بین زنان سراسر جهان به‌شمار می‌رود. در زمینه مدیریت تشخیص و درمان این بدخیمی، از عوامل بالینی و آسیب‌شناختی مختلفی یاد می‌شود که دارای اهمیت پیش‌آگهی در زمینه بقای بیماران هستند. این عوامل شامل سن بیمار، اندازه تومور، وضعیت یائسگی، درگیری عروق لنفی، وضعیت گیرنده‌های هورمونی، بیش بیان‌گیرنده عامل رشد اپیدرمال انسانی ( Human epidermal growth factor 2: Her2) و ویژگی‌های بافت‌شناسی نظیر مرحله (Stage) و درجه (Grade) تومور است. اگرچه تعیین این الگوریتم‌های پیش‌آگهی در تشخیص میزان خطر سرطان، باعث بهبود میزان بقای بیماران شده است، یکی از چالش‌های مهم در این زمینه آن است که این رویکرد پیچیدگی‌های مولکولی هر نئوپلازم (Neoplasm) را مد نظر قرار نمی‌دهد. در واقع به نظر می‌رسد پیش‌بینی دقیق پتانسیل متاستازی تومور برای مدیریت تشخیصی و درمانی بیماران مبتلا سرطان پستان ضروری است [۱-۳].

مسیر پیام‌رسانی Hedgehog مسیری از نظر تکاملی حفاظت شده است که از طریق کنترل سرنوشت سلولی، الگودهی، تکثیر، بقا و تمایز در جنین‌زایی مهره‌داران نقشی ضروری بازی می‌کند. این مسیر در بالغین در تنظیم هموستاز بافتی، بازساختی و حفظ سلول‌های بنیادی مشارکت دارد. مسیر پیام‌رسانی Hedgehog با اتصال لیگاندهای پروتئینی [Sonic Hedgehog (Shh)، Indian Hedgehog (Ihh) و Desert Hedgehog (Dhh)] به گیرنده غشایی Ptch فعال می‌شود. گیرنده Ptch تنظیم‌کننده منفی گیرنده غشایی دیگری به نام Smo است. در پی اتصال لیگاندها، اثر مهارتی Ptch روی Smo برداشته می‌شود. این رویداد سبب تغییر شکل Smo و القای متعاقب عوامل رونویسی Gli (Gli1، Gli2 و Gli3) می‌شود. فعالیت این عوامل رونویسی سبب پیشبرد رونویسی ژن‌های پاسخگو به Hedgehog نظیر Gli1، سیکلین D1 و Bcl-2 می‌شود [۴-۷]. بیش‌تنظیمی (Up-regulation) مسیر پیام‌رسانی Hedgehog در تومورزایی و

## ارتباط بیانی ژن Claudin-1 با مسیر Hedgehog در کارسینومای پستان

متاستاز انواع مختلف سرطان گزارش شده است [۸-۱۰]. اهمیت این مسیر پیام‌رسانی در سرطان‌زایی (Carcinogenesis) زمانی بیشتر نمود می‌یابد که بدین نکته توجه شود که بسیاری از ژن‌های درگیر در این مسیر پیام‌رسانی نظیر Smo، Shh، Gli1، Gli2 به‌عنوان سرطان‌زا و گیرنده Ptch به‌عنوان سرکوب‌گر تومور عمل می‌نمایند [۱۰-۱۲].

فرآیند گذار اپی‌تلیال به مزانشیم ( Epithelial to mesenchymal transition: EMT) تغییری فنوتیپی است که با فرآیند متاستاز در ارتباط است و به‌عنوان یک عامل خطر برای سرطان پستان در نظر گرفته می‌شود. طی EMT، تغییر بیانی از E-cadherin (نشانگر اپی‌تلیال) به سوی N-cadherin (نشانگر مزانشیمی) دیده می‌شود و این رویداد سبب تغییر در چسبندگی ماتریکس خارج سلولی می‌شود. کسب فنوتیپ مهاجمی شباهت‌های بسیاری با EMT دارد و این ویژگی‌ها شامل از بین رفتن اتصالات سلول-سلول و افزایش تحرک سلولی است. گزارش شده است که تومورهای همراه با کاهش بیان E-cadherin دارای متاستاز و تهاجم بیشتر به غدد لنفاوی نسبت به تومورهایی با عدم تغییر در سطوح بیانی E-cadherin است [۱۳-۱۵].

ارتباط مستدلی بین نقش پروتئین‌های درگیر در اتصالات محکم (Tight junction) سلولی و تکوین سرطان وجود دارد. تغییرات در ساختار و عملکرد اتصالات محکم در ایجاد کارسینوما در اندام‌های مختلف گزارش شده است. در این راستا مشخص شده است که غیاب یا نقص این اتصالات ارتباط مستقیمی با ایجاد فنوتیپ نئوپلاستیک ( Neoplastic phenotype) در سلول‌های اپی‌تلیال دارد [۱۶]. خانواده Claudinها پروتئین‌های غشایی دخیل در اتصالات محکم است. در این میان Claudin-1 ژنی است که طی تکوین اولیه غدد پستانی بیان زیادی دارد. این بیان طی مراحل مختلف تکوین غدد پستانی طبیعی به‌شدت تنظیم شده است. مطالعات انجام یافته روی سرطان پستان تهاجمی و برخی رده‌های سلولی سرطان پستان اشاره به کاهش یا فقدان کامل بیان ژن

Claudin-1 دارد. همچنین ارتباط متقابلی بین این کاهش بیان و عود (Recurrence) گزارش شده است [۱۷-۲۰].

از آنجا که مسیر پیام رسانی Hedgehog در کارسینومای پستان دچار بیش تنظیمی است، مطالعه حاضر به بررسی ارتباط بیش تنظیمی این مسیر با مراحل مختلف بیماری و مناساز به عروق لنفی می‌پردازد. همچنین از آنجا که ژن Claudin-1 یکی از اعضای کلیدی اتصالات محکم سلولی به‌شمار می‌آید، سطوح بیانی این ژن و گیرنده انتقال‌دهنده پیام (Smo) (The signal transducer Smo) در مسیر Hedgehog در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان (Invasive ductal breast carcinoma) با وضعیت فعالیت متفاوت Her-2 بررسی می‌شود. به‌نظر می‌رسد ارتباط معکوس بیانی بین مسیر Hedgehog و ژن Claudin-1 ممکن است برای پیش‌بینی مناساز به عروق لنفی در سرطان پستان دارای اهمیت باشد.

## مواد و روش‌ها

### بیماران

در مطالعه مورد-شاهد حاضر، ۳۶ جفت نمونه بافتی تومور و بافت سالم مجاور از بیماران مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجاری پستان از بانک تومور انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) دریافت شد. این مطالعه طی نامه به شماره ۹۵/۸۴/ت مورخ ۹۵/۱۰/۲۲ به تأیید کمیته اخلاق پزشکی رسیده و نمونه‌گیری از بیماران با اخذ رضایت‌نامه آگاهانه پیش از جراحی همراه بوده است. گزارش ویژگی‌های بالینی - آسیب‌شناختی بیماران از جمله درجه‌بندی (Grading) و مرحله‌بندی (Staging) (شامل اندازه تومور، وضعیت عروق لنفی، وضعیت گیرنده‌های هورمونی و وضعیت بیان Her-2) برای نمونه‌های بافتی در جدول ۱ خلاصه شده است. نمونه‌های بافتی در نیتروژن مایع تا زمان بررسی مولکولی نگهداری شد.

جدول ۱ ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناختی بیماران مبتلا به سرطان پستان

مشخصات	تعداد	درصد
سن ابتلا		
میانگین (محدوده): ۴۸/۶۵ (۲۹-۷۷)	۳۶	
< ۵۰ سال	۲۰	۵۶
≥ ۵۰ سال	۱۶	۴۴
سن در شروع قاعدگی (میانگین ± SD)	۱۳/۴۴ ± ۱/۲	
سن در اولین زایمان (میانگین ± SD)	۲۰/۷ ± ۳/۷	
وضعیت یائسگی		
قبل از یائسگی	۲۳	۶۳
بعد از یائسگی	۱۳	۳۶
سن در زمان یائسگی (میانگین ± SD)	۵۰/۶ ± ۳/۵	
استفاده قبلی از هورمون		
بلی	۱۹	۵۳
خیر	۱۷	۴۷
اندازه تومور (سانتی‌متر)		
< ۳	۱۶	۴۴
≥ ۳	۲۰	۵۶
تومور اولیه (مرحله T)		
T1: ≥ ۲ سانتی متر	۱۱	۳۱
T2: ۲ < ۵ سانتی متر	۱۶	۴۴
T3: ۵ < سانتی متر	۹	۲۵

ارتباط بیانی ژن Claudin-1 با مسیر Hedgehog در کارسینومای پستان

مشخصات		تعداد	درصد
غدد لنفاوی ناحیه ای (مرحله N)			
NX		۳	۸
N0		۱۰	۲۸
N1		۷	۱۹
N3		۱۱	۳۱
N4		۵	۱۴
متاستاز به فواصل دور (مرحله M)			
MX		۳	۸
M0		۱۴	۳۹
M1		۱۹	۵۳
متاستاز به عروق لنفی			
مثبت		۲۲	۶۱
منفی		۱۴	۳۹
مرحله (Stage) تومور			
I + II		۱۹	۵۳
III + IV		۱۷	۴۷
وضعیت گیرنده استروژن			
منفی		۱۱	۳۱
مثبت		۲۲	۶۱
نامشخص		۳	۸
وضعیت گیرنده پروژسترون			
منفی		۱۲	۳۴
مثبت		۲۱	۵۸
نامشخص		۳	۸
وضعیت Her2			
منفی		۱۶	۴۴
مثبت		۱۸	۵۰
نامشخص		۲	۶

نسخه‌بردار معکوس RTase (Takara) PrimeScript™. ژاین) انجام شد.

### واکنش Real-time PCR کمی

آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی برای ژن‌های Gli1، Smo، Claudin-1، Ptch، E-cadherin، MMP2 و GAPDH مطابق جدول ۲ طراحی شد. ویژگی (Specificity) و یکتا بودن توالی آغازگرها در ژنوم انسان با استفاده از نرم‌افزار Blast (<http://blast.ncbi.nlm.gov/blast.cgi>) ارزیابی شد. مخلوط واکنشی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰

### استخراج RNA بافتی و سنتز cDNA

برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه، RNA تمام از بافت با استفاده از واکنش گر ترایزول (Invitrogen، آمریکا) استخراج شد. به منظور حذف آلودگی احتمالی با DNA ژنومی، RNA استخراج شده با آنزیم DNase تیمار شد. کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز تأیید و غلظت و خلوص آن توسط اسپکتروفتومتری با جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. سنتز cDNA با نسخه‌برداری معکوس ۳ میکروگرم RNA تام استخراج شده توسط هگزامر تصادفی و آنزیم

میکرولیتر SYBR Green I Master Mix (Takara، ژاپن)، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۷ میکرولیتر آب و ۵ نانوگرم cDNA سنتز شده تهیه شد. واکنش Q-RT-PCR برای هر ژن، دو سری و به صورت هم زمان انجام و میانگین Ct (چرخه آستانه) به دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. واکنش در دستگاه ABI StepOne sequence Detection System (Applied Biosystems، آمریکا) تحت شرایط دمایی و زمانی زیر انجام یافت: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله واسرشتگی اولیه در نظر گرفته شد. سپس برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه و مراحل اتصال/ توسعه

در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه. هر مرحله تکثیر کامل توسط یک مرحله تفکیک (Dissociation) که شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه به منظور تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ادامه یافت. مقادیر رونوشت‌های ژن‌های هدف در مقایسه با بیان ژن GAPDH به عنوان ژن خانه دار (Housekeeping) و با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد. کارایی تکثیر ژن‌های مورد مطالعه بر اساس شیب منحنی استاندارد که بر اساس مقادیر لگاریتمی رقت‌های متوالی cDNA در مقابل Ct‌های متناظر ترسیم می‌شود، مطابق فرمول  $E=10^{-1/\text{slope}}$  (Efficiency) محاسبه شد [۲۱].

جدول ۲ آغازگرهای الیگونوکلوئیدی به کار رفته در سنجش Real-time PCR

ژن	آغازگر	ترادف	طول قطعه (جفت باز)
Ptch	F	5'-CGGCAGCCGCGAT AAG-3'	۷۵
	R	5'-TTAATGATGCCATCTGCATCCA-3'	
Smo	F	5'-GT GCTGGCCCCAATCG-3'	۱۴۲
	R	5'-GCAGCAT GGTCTCGTTGATCT-3'	
Gli1	F	5'-GTTCACATGCGCAGACACACT-3'	۸۱
	R	5'-TTCGAGGCGT GAGTATGACTTC-3'	
Claudin-1	F	5'-TTGGGCTT CATTCTCGCCTT-3'	۲۱۴
	R	5'-TTGCTTGCAATGTGCTGCTC-3'	
MMP2	F	5'-GGATGCCGCCTTAACTGGA-3'	۲۰۳
	R	5'-AGGCACCCTTGAAGAAGTAGC-3'	
E-cadherin	F	5'-TCATGAGTGTCCCCCGGTAT-3'	۲۴۰
	R	5'-TCTTGAAGCGATTGCCCAT-3'	
GAPDH	F	5'-TCACCACTCCTCCACCTTTG-3'	۱۱۲
	R	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	

## تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از حداقل دو آزمایش مستقل ارائه شد و از آزمون t-test برای تجزیه و تحلیل آماری تغییرات داده‌ها استفاده شد. مقادیر P-value کوچک‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

### کارایی تکثیر و تجزیه و تحلیل منحنی ذوب

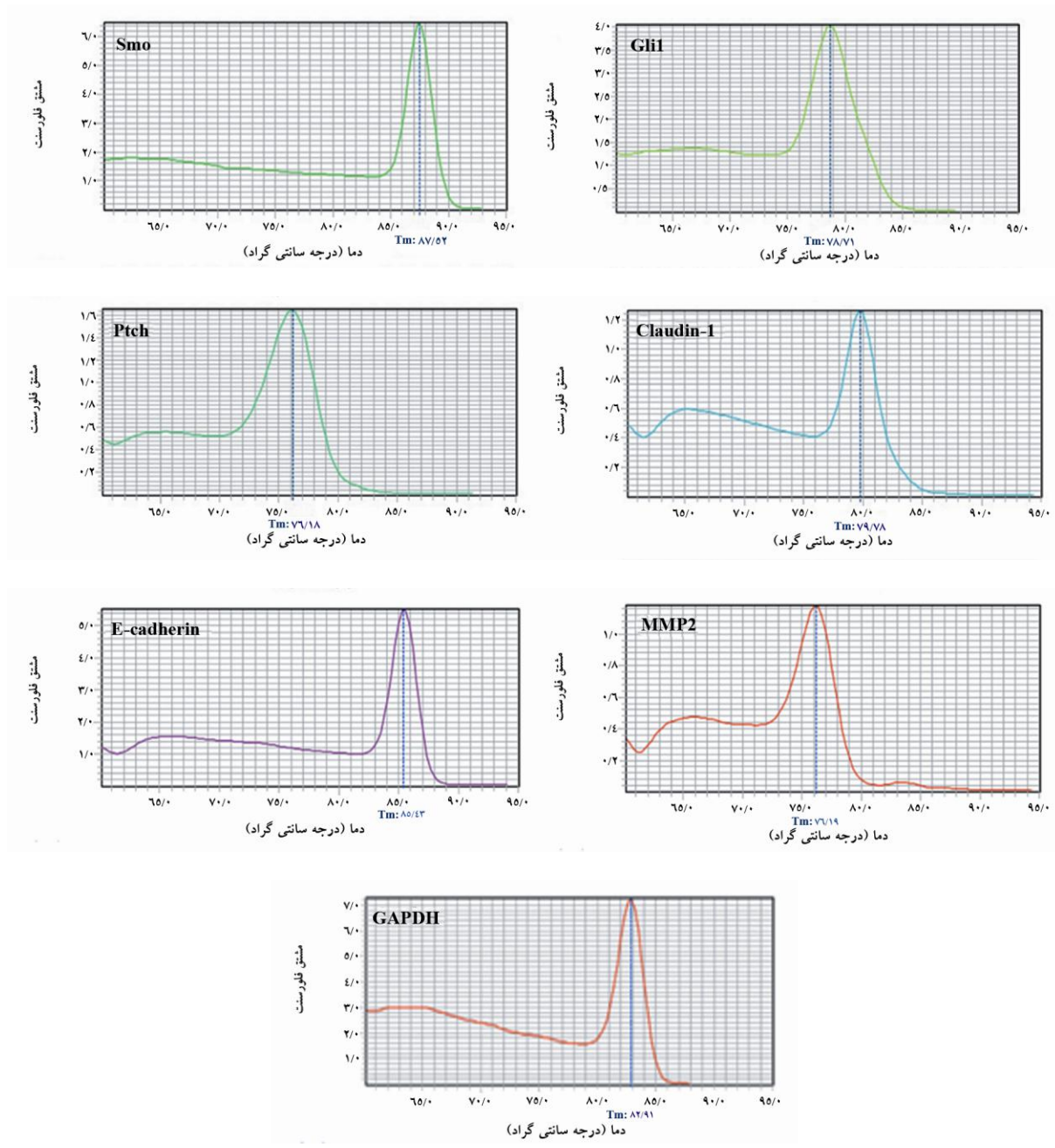
برای تعیین کارایی واکنش تکثیر برای هر یک از ژن‌ها، از

منحنی استاندارد که با استفاده از رقت‌های متوالی از نمونه‌های cDNA سنتز شده تهیه شده بود، استفاده شد و همه کارایی‌های تکثیر رونوشت‌های مورد مطالعه تقریباً برابر است که این نشان‌دهنده اعتبار آزمون کمی برای ارزیابی نسبی بیان ژن‌ها است. از آنجایی که رنگ SYBR Green I که برای شناسایی محصول PCR استفاده می‌شود، به هر نوع DNA دو رشته‌ای متصل شده و توانایی تشخیص محصول اختصاصی از غیر اختصاصی را ندارد، بنابراین وجود مواردی چون دایمر آغازگر یا محصول غیر اختصاصی نیز سبب افزایش در شدت نور فلورسانس می‌شود [۲۲]. از این رو، به منظور تأیید درستی قطعه تکثیر شده و اطمینان

ارتباط بیانی ژن Claudin-1 با مسیر Hedgehog در کارسینومای پستان

(Peak) مشاهده شده برای هر ژن در دمای ذوب منحصر به خودش، اختصاصی بودن محصول PCR مشخص شد (شکل ۱).

از عدم وجود محصول غیر اختصاصی از نمودار ذوب (Melting curve) استفاده شد. در این نمودار با توجه به وجود تنها نقطه اوج

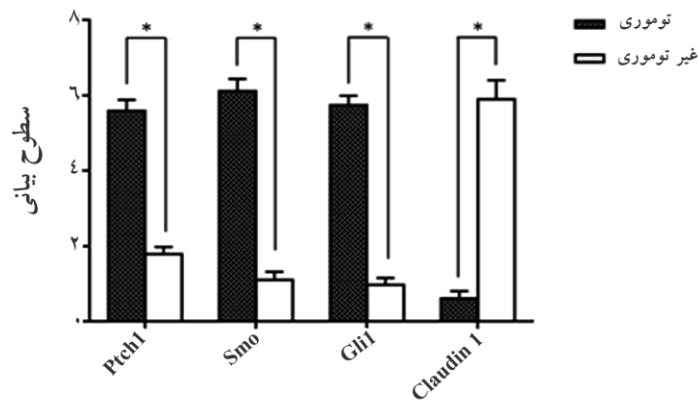


شکل ۱ منحنی‌های ذوب ژن‌های مورد مطالعه؛ وجود تنها یک نقطه اوج برای هر ژن در دمای ذوب ویژه آن، نشان دهنده اختصاصی بودن محصول تکثیر است.

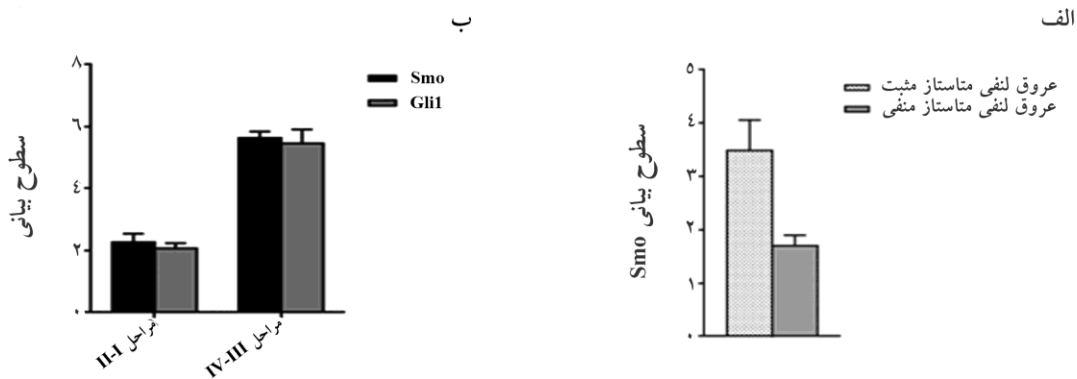
## بیان اعضای کلیدی مسیر Hedgehog و ژن Claudin-1 در نمونه‌های سرطان پستان و بافت‌های سالم مجاور

به منظور بررسی میزان بیان اعضای کلیدی مسیر پیام‌رسانی Hedgehog (Gli1, Smo و Ptch) و بررسی سطوح بیانی ژن اتصال سلولی Claudin-1، از Q-RT-PCR استفاده شد که

برای این منظور ۳۶ جفت نمونه بافت تومور و نمونه بافت غیر توموری حاشیه تومور از بیماران با سرطان پستان بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، سطوح بیانی رونوشت‌های Gli1, Smo و Ptch در نمونه‌های توموری به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از نمونه‌های غیر توموری مجاور بود. میزان بیان Claudin-1 در نمونه‌های توموری به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به بافت‌های غیر توموری مجاور پایین‌تر بود.



شکل ۲ بیان بالای اعضای کلیدی مسیر انکوژنی Hedgehog در نمونه‌های توموری و غیر توموری سرطان تهاجمی پستان. سطوح بیانی رونوشت ژن‌های Smo, Gli1 و Ptch در نمونه‌های توموری به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است. همچنین بیان Claudin-1 در نمونه‌های توموری نسبت به بافت‌های غیر توموری مجاور پایین‌تر است.

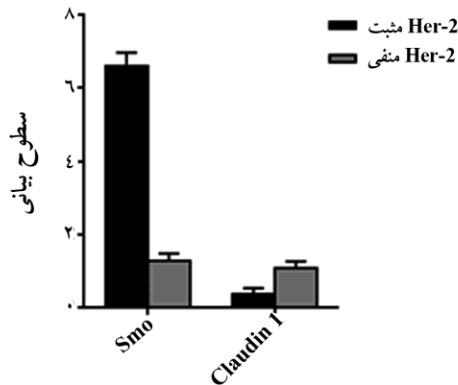


شکل ۳ تفاوت محسوس در سطوح رونوشت‌های اعضای کلیدی مسیر پیام‌رسان Hedgehog در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان با ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناختی متفاوت. (الف): متاستاز به عروق لنفی؛ (ب): مرحله متاستازی تومور



## ارتباط بیانی ژن Claudin-1 با مسیر Hedgehog در کارسینومای پستان

در مسیر Hedgehog) را نمایان می‌کند. همچنین سطوح بیانی ژن Claudin-1 که به‌عنوان یکی از اجزای مهم اتصالات محکم در سلول‌های اپی‌تلیال مطرح است، در نمونه‌های کارسینومای پستان Her-2 مثبت افزایش جزئی در مقایسه با بافت‌های توموری داشت که فاقد بیان ژن Her-2 بودند.



شکل ۴ بررسی بیان ژن‌های Smo و Claudin-1 در سرطان پستان Her-2 مثبت. سطوح بیانی ژن Smo در نمونه‌های Her-2 مثبت نسبت به Her-2 منفی به‌طور قابل توجهی بیشتر است. همچنین سطوح بیانی ژن Claudin-1 در نمونه‌های Her-2 مثبت افزایش جزئی نسبت به نمونه‌های Her-2 منفی دارد.

## بررسی ارتباط بین سطوح بیانی ژن‌های Smo و Claudin-1 و برخی ژن‌های مرتبط با متاستاز (E-cadherin و MMP2)

از آن‌جا که گزارش‌های وجود دارد که نشان می‌دهد بیش تنظیمی مسیر Hedgehog قادر به تغییر توانایی سلول‌های سرطانی به پایبندی به اپی‌تلیوم و حمله از طریق اجزای ماتریکس خارج سلولی است، بررسی سطوح بیانی ژن‌های E-cadherin (به‌عنوان نشانگر شاخص سلول اپی‌تلیال که بیان آن در روند متاستاز کاهش می‌یابد) و MMP2 (متالوپروتیناز کلیدی که بیان آن در روند متاستاز افزایش می‌یابد) در نمونه سرطان پستان مد نظر قرار گرفت. در این راستا افزایش بیان ژن‌های Smo و MMP2 در نمونه‌های توموری پستان در مراحل پیشرفته متاستاز (مراحل III, IV) نسبت به مراحل اولیه

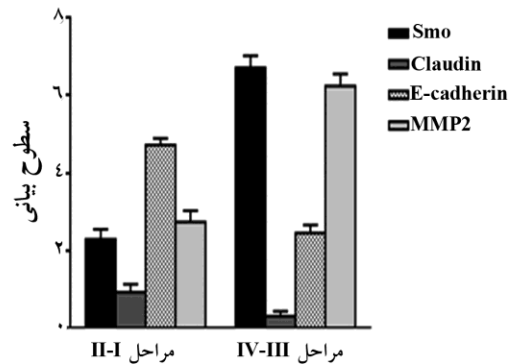
## فعالیت مسیر پیام‌رسانی Hedgehog در بافت‌های توموری سرطان پستان با پارامترهای بالینی آسیب‌شناختی مختلف

به‌منظور بررسی ارتباط مابین سطوح فعالیت مسیر پیام‌رسانی Hedgehog و پارامترهای بالینی - آسیب‌شناختی سطوح بیان دو عضو کلیدی این مسیر (Smo و Gli) بین گروه‌های مختلف بررسی شد. همان‌گونه که در شکل ۳ الف دیده می‌شود، سطوح بیانی ژن Smo در نمونه‌های توموری با متاستاز به عروق لنفی بیشتر است. در این رابطه، اختلاف معنی‌داری نیز بین مراحل II-I و مراحل III-V از بافت کارسینومای پستان وجود دارد (شکل ۳ ب). همچنین به‌منظور تعیین این موضوع که همراهی مابین بیان بالای ژن Smo و متاستاز به عروق لنفی با وضعیت مثبت یا منفی بودن گیرنده‌های استروژنی و پروژستونی در ارتباط است، بیان ژن Smo در بیماران مختلف بررسی شد و مشخص شد همراهی ژن Smo و متاستاز به عروق لنفی با وضعیت بیانی گیرنده‌های هورمونی در ارتباط نیست.

## بررسی بیان ژن‌های Smo و Claudin-1 در سرطان پستان Her-2 مثبت

تحقیقات گذشته نشان داده که تنظیم مثبت مسیر پیام‌رسانی Hedgehog برای تکوین مناسب غدد پستانی و جلوگیری از شکل‌گیری تومور ضروری است [۲۳]. از آن‌جایی که Her-2 به‌عنوان یک نشان‌گر شناخته شده مرتبط با پتانسیل متاستازی در سرطان پستان است، محققان حاضر بررسی نمودند که آیا ارتباط بین Smo و متاستاز به عروق لنفی تحت تأثیر بیان مثبت یا منفی از Her-2 قرار می‌گیرد. در مقایسه با سرطان‌های پستان با بیان Her-2 منفی، در تمام بافت‌های تومور پستان که در آن Her-2 مثبت بود بیان Smo به‌طور قابل توجهی افزایش پیدا کرده است (شکل ۴). این نتایج رابطه مثبت معنی‌داری مابین بیان ژن Her-2 و ژن Smo (به‌عنوان عضو کلیدی و پیام‌رسان

(مراحل I, II) مشاهده شد و همان گونه که انتظار می‌رفت سطوح بیانی ژن Claudin-1 و E-cadherin در مراحل پیشرفته متاستاز نسبت به مراحل اولیه کاهش داشت (شکل ۵).



شکل ۵ بیان ژن‌های Smo و Claudin-1 و ژن‌های مرتبط با متاستاز (MMP2 و E-cadherin) در بافت‌های کارسینومای پستان در مراحل مختلف متاستازی. بیان ژن‌های Smo و MMP2 در مراحل پیشرفته متاستاز (مراحل III, IV) نسبت به مراحل اولیه (مراحل I, II) افزایش بیشتری دارد. در مقابل سطوح بیانی ژن‌های Claudin-1 و E-cadherin در مراحل پیشرفته متاستاز نسبت به مراحل اولیه کاهش دارد.

## بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین علل مرگ در اثر سرطان در زنان سراسر جهان است که به‌عنوان بیماری‌ای هتروژن با ویژگی‌های زیستی و فنوتیپی متفاوت همراه است و این ویژگی‌ها تشخیص این بیماری را چالش برانگیز کرده است. حدود ۹۰ درصد از مبتلایان به سرطان پستان بر اثر متاستاز و تهاجم دچار مرگ می‌شوند. بنابراین شناسایی مسیرهای مولکولی درگیر در این فرآیند می‌تواند فرصت‌های جدیدی را در زمینه تشخیص و درمان این بدخیمی فراهم آورد [۲۴، ۲۵]. نقش مسیر پیام‌رسانی Hedgehog به‌عنوان عاملی مهم در رشد و توسعه تومور در سرطان‌های مختلف به‌ویژه کارسینومای پستان به اثبات رسیده است؛ به‌طوری که از بیش بیان این مسیر پیام‌رسانی به‌عنوان پیش‌نیازی برای تکثیر سلول‌های سرطان

پستان یاد می‌شود. در این راستا کاسپر (Kasper) و همکاران [۲۶] در سال ۲۰۰۹ دریافتند که مهار مسیر پیام‌رسانی Hedgehog در تومورهای پستان ممکن است سبب این دو نتیجه شود؛ اول این که با تغییر در استرومای تومور باعث تداخل در پیشرفت سرطان می‌شود و دیگری این که قدرت حفظ سلول‌های بنیادی سرطانی در بافت توموری را کاهش می‌دهد.

به دلیل نقش کلیدی مسیر Hedgehog در تنظیم متاستاز سرطان پستان، این مطالعه به بررسی سطوح بیانی اعضای کلیدی این مسیر پیام‌رسانی در بیماران کارسینومای تهاجمی مجاری پستان پرداخت. همچنین بیان ژن‌های درگیر در فرآیند متاستاز شامل Claudin-1 (ژن مهم درگیر در اتصالات محکم بین سلولی)، E-cadherin (به‌عنوان نشانگر شاخص سلول اپی‌تلیال) و MMP2 (متالوپروتیناز کلیدی در روند فرآیند متاستاز) بررسی شد. افزون بر این، در مطالعه حاضر ارتباط مابین بیش تنظیمی Smo و بیان کاهش‌یافته ژن Claudin-1 با پتانسیل متاستازی افزایش یافته در کارسینومای پستان بررسی شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی Hedgehog شامل Ptch, Smo و Gli1 به‌طور معنی‌داری در بافت‌های سرطان پستان افزایش یافته است و نیز بیان ژن Claudin-1 در این بافت‌ها کاهش معنی‌دار نشان داد. این یافته سازگار با مطالعات پیشین بود به‌طوری که در سال ۲۰۱۳، لو (Lu) و همکاران [۲۰] با مقایسه سطوح بیانی Claudin‌ها در انواع سرطان پستان دریافتند که سطوح بیانی پایین Claudin قویاً با پدیده متاستاز و عود بیماری در ارتباط است و از بیان این ژن به‌عنوان یک عامل پیش‌گو (Predictor) برای عود بیماری یاد کردند. همچنین کوبو (Kubo) و همکاران با گزارش سطوح بیانی افزایش یافته مسیر Hedgehog در بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان از این مسیر به‌عنوان هدفی نوین در درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان یاد کردند [۲۷]. بنابراین با توجه به درگیری مسیر پیام‌رسانی Hedgehog و Claudin-1 در فرآیند متاستاز، این

## ارتباط بیانی ژن Claudin-1 با مسیر Hedgehog در کارسینومای پستان

پیام‌رسانی Hedgehog باعث تغییر توانایی سلول سرطانی در اتصال به اپی‌تلیوم و تهاجم به ماتریکس خارج سلولی می‌شود، سطوح بیانی ژن‌های Claudin-1 (ژن مهم درگیر در اتصالات محکم بین سلولی)، E-cadherin (به‌عنوان نشانگر شاخص سلول اپی‌تلیال) و MMP2 (متالوپروتئیناز کلیدی در روند فرآیند متاستاز) بررسی شد. مطابق انتظار ارتباط مثبت معنی‌داری بین سطوح بیانی ژن‌های Smo و MMP2 در نمونه‌های توموری با مراحل پیشرفته متاستاز دیده شد. شایان ذکر آن که سطوح بیانی اندک ژن‌های E-cadherin و Claudin-1 در نمونه‌های توموری با مراحل پیشرفته متاستاز با سوح بیانی افزایش یافته از Smo همراه بود.

در مجموع مطالعه حاضر سطح جدیدی از پیچیدگی مولکولی که باید در مدیریت بیماران کارسینومای تهاجمی مجاری پستان مورد توجه قرار گیرد را آشکار ساخت. بنابراین شناسایی بیشتر نقش محوری مسیر پیام‌رسانی Hedgehog در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان حقایق بیشتری را در زمینه پیشرفت سرطان پستان آشکار خواهد نمود. در این راستا به نظر می‌رسد بیش تنظیمی گیرنده انتقال پیام Smo در مسیر Hedgehog و ارتباط بیانی معکوس آن با ژن کلیدی اتصال محکم سلولی Claudin-1 ممکن است باعث پیش‌آگهی بد در کارسینومای تهاجمی مجاری پستان باشد، اگرچه اهمیت بالینی این مسیر نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

## تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مولکولی است و با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

نتایج می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار بیش تنظیمی مسیر پیام‌رسانی Hedgehog و کاهش بیان Claudin-1 در سرطان پستان تهاجمی باشد. همچنین محققان حاضر دریافتند که سطوح بیانی بالاتر Smo در بیمارانی دیده شد که متاستاز به عروق لنفی دارند و در مراحل پیشرفته‌تری از متاستاز بودند. این داده‌ها سازگار با گزارش‌های قبلی است که پیشنهاد نموده‌اند بیش تنظیمی مسیر Hedgehog با بقای بیماران کارسینومای پستان در ارتباط است.

بیش بیان ژن Her-2 در بیش از ۳۰ درصد سرطان‌های پستان شناسایی شده است که این امر پیش‌آگهی به نسبت ضعیفی را به همراه دارد [۲۸]. از آنجایی که Her-2 نشانگر زیستی شناخته شده با پتانسیل افزایش متاستاز در سرطان پستان است، این مطالعه به بررسی این نکته پرداخت که آیا ارتباط بین بیان ژن Smo و متاستاز به عروق لنفی متأثر از بیان مثبت یا منفی Her-2 است یا خیر. در زمینه بررسی همراهی ممکن بیان Smo و Her-2، مشاهده شد که بافت‌های توموری دارای بیان Her-2 در مقایسه با بافت‌های Her-2 منفی دارای سطوح رونوشت‌های بیشتری از Smo بود. این نتایج پیشنهاد می‌کند که پیام‌رسانی Her-2 در سرطان پستان ممکن است دلیلی برای بیش تنظیمی محسوس ژن Smo باشد.

بیان کاهش یافته E-cadherin اغلب در سرطان‌های مهاجم گزارش شده است و فقدان آن به‌طور محسوسی با روند گذار اپی‌تلیال به مزانشیم (EMT) مرتبط است [۱۳-۱۵]. کسب فنوتیپ تهاجمی دارای شباهت‌هایی با EMT شامل از دست رفتن چسبندگی سلول-سلول و افزایش تحرک سلولی (Cell mobility) است. طی EMT، سوئیچ در بیان ژن E-cadherin به سوی بیان ژن N-cadherin (نشانگر سلول مزانشیمی) سبب تغییر در ماتریکس سلولی می‌شود [۱۴]. از آنجایی که مطالعات گذشته اشاره بر آن داشته‌است که

## منابع

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer

statistics, 2014. CA Cancer J Clin 2014; 64(1):

- 9-29.
- [2] Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009; 20(8): 1319-29.
- [3] Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22(3): 207-19.
- [4] Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 2002; 417(6886): 299-304.
- [5] Nehmé R, Mus-Veteau I. Proteins of the Hedgehog signaling pathway as therapeutic targets against cancer. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7(4): 601-12.
- [6] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog signaling. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 1): 3-6.
- [7] Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene* 2010; 29(4): 469-81.
- [8] Wang F, Ma L, Zhang Z, Liu X, Gao H, Zhuang Y, Yang P, Kormmann M, Tian X, Yang Y. Hedgehog Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *J Cancer* 2016; 7(4): 408-17.
- [9] Hanna A, Shevde LA. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Molecular Cancer* 2016; 15: 24.
- [10] Borah A, Raveendran S, Rochani A, Maekawa T, Kumar DS. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis* 2015; 4: e177.
- [11] Palle K, Mani C, Tripathi K, Athar M. Aberrant GLI1 Activation in DNA Damage Response, Carcinogenesis and Chemoresistance. *Cancers (Basel)* 2015; 7(4): 2330-51.
- [12] Babashah S1, Sadeghizadeh M, Hajifathali A, Tavirani MR, Zomorod MS, Ghadiani M, Soleimani M. Targeting of the signal transducer Smo links microRNA-326 to the oncogenic Hedgehog pathway in CD34+ CML stem/progenitor cells. *Int J Cancer* 2013; 133(3): 579-89.
- [13] Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5): 362-74.
- [14] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172(7): 973-81.
- [15] Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 6): 727-35.
- [16] Martin TA. The role of tight junctions in cancer metastasis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36: 224-31.
- [17] Myal Y, Leygue E, Blanchard AA. Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 956897.
- [18] Zhou B, Moodie A, Blanchard AA, Leygue

- E, Myal Y. Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights. *J Clin Med* 2015; 4(12): 1960-76.
- [19] Kwon MJ. Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci* 2013; 14(9): 18148-80.
- [20] Lu S, Singh K, Mangray S, Tavares R, Noble L, Resnick MB, Yakirevich E. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod Pathol* 2013; 26(4): 485-95.
- [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- [22] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39(1): 75-85.
- [23] Lee MY, Sun L, Veltmaat JM. Hedgehog and Gli signaling in embryonic mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2013; 18(2): 133-8.
- [24] Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 2009; 23(22): 2563-77.
- [25] Wu Y, Sarkissyan M, Vадgama JV. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med* 2016; 5(2). pii: E13.
- [26] Kasper M, Jaks V, Fiaschi M, Toftgard R. Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30(6): 903-11.
- [27] Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64(17): 6071-4.
- [28] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905): 707-12.