شناسایی بیوانفورماتیکی ژن NKAIN1 به عنوان یک بیومارکر بالقوه مرتبط با سرطان پستان و بررسی بیان آن با استفاده از تکنیک Real Time PCR

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۱ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷

محمد علی‌حسن‌زاده[۱]، علی گلستان[۲،۳]، احمد طهماسبی[٤]، امین رمضانی[۳،۵*]

۱. استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، جیرفت، ایران ۲. دانشجوی زیست فناوری پزشکی، گروه زیست‌فناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران ۳. مرکز تحقیقات سرطان‌شناسی شیراز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران ۴. پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران ۵. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان ها در زنان در سراسر جهان است. در سال‌های اخیر، شناسایی بیومارکرهای بالقوه مرتبط با سرطان پستان و ترکیبات درمانی جدید منجر به پیشرفت‌های امیدوار کننده‌ای در درمان سرطان پستان شده است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی بیومارکرهای بالقوه‌ی مرتبط با سرطان پستان است که با استفاده از دیتابیس‌ها و آنالیزهای بیوانفورماتیکی انجام می شود.

روش کار: در این مطالعه از یک روش In silico برای شناسایی بیومارکرهای مرتبط با سرطان پستان بر اساس داده‌های ترانسکریپتوم استفاده شد. سپس از روش کمی Real Time PCR (qRT-PCR) برای تجزیه و تحلیل بیان متفاوت بیومارکر شناسایی‌شده استفاده شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل با پایگاه‌های اطلاعاتی موجود مرتبط با سرطان، ارتباط بین افزایش بیان ژن NKAIN1 و سرطان پستان را نشان داد و تکنیک qRT-PCR افزایش سطح بیان این ژن را در بافت‌های سرطان پستان در مقایسه با بافت‌های طبیعی تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج آنالیز In silico و کمی سازی با RT-PCR، ژن NKAIN1 می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه در تشخیص سرطان پستان در سطح mRNA استفاده شود

کلیدواژه‌ها: سرطان پستان،NKAIN1، بیومارکر

* **نویسنده مسئول:** استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

ایمیل: aramezani@sums.ac.ir **تلفن:** ۰۷۱۳۲۳۰۴۳۹۲ **نمابر:** ۰۷۱۳۲۳۰۳۶۸۷

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است و جنبه‌های روانی، عاطفی و کیفیت زندگی فرد بیمار را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). سرطان پستان می‌تواند هم در مردان و هم در زنان رخ دهد، اما در زنان بسیار شایع‌تر است. تشخیص و درمان این بیماری بر اساس گروه‌بندی سرطان پستان به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (ERBB2) مثبت، گیرنده هورمونی (Hormone Receptor: HR) مثبت و سه‌گانه منفی سرطان پستان (Triple Negative Breast Cancer: TNBC) است (۲). در حال حاضر روش استاندارد طلایی برای تشخیص سرطان پستان، ماموگرافی است (۳). با این‌حال، غربالگری به روش ماموگرافی محدودیت‌هایی در تشخیص سرطان در مراحل اولیه و تشخیص مثبت کاذب (۸–۱۰٪) در موارد بافت متراکم پستان یا وجود کلسیفیکاسیون دارد (۴). اگرچه پیشرفت‌هایی در درمان و تحقیقات دارویی سرطان پستان انجام شده اما به دلیل عدم درک پاتوژنز این بیماری پیچیده، در حال حاضر هیچ درمان مؤثری وجود ندارد و عود و مرگ بیماران سرطان پستان هنوز به‌طور مؤثر کنترل نشده است. به‌رغم سالها تحقیق، میزان بقای ۵ ساله بیماران مبتلا به سرطان پستان پایین می‌باشد و لذا شناسایی بیومارکرهای قابل‌اعتماد در تشخیص زودهنگام، پیش‌آگهی دقیق و درمان هدفمند یک ضرورت می‌باشد. با تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با روش‌های بیوانفورماتیک، می‌توان ژن‌ها و مسیرهایی را که ممکن است در پیشرفت سرطان پستان دخیل باشند شناسایی کرد (۵). در سال‌های اخیر با توسعه ایمونولوژی، زیست‌شناسی مولکولی و فن‌آوری ژنومیک، روش بیوانفورماتیک به یک ابزار مهم برای مطالعه پاتوژنز بیماری‌ها و شناسایی بیومارکرهای با ارزش تبدیل‌شده است (۶). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز داده‌ها به روش‌های بیوانفورماتیکی و شناسایی مکانیسم‌های مولکولی جدید، می‌توان بیومارکرهای بالقوه مرتبط با سرطان را شناسایی کرد (۷–۹). لذا غربالگری با استفاده از بیومارکرهای مرتبط با سرطان می‌تواند در شناسایی، تشخیص، درمان به موقع و مدیریت بهتر سرطان حیاتی باشد. پیش از این، استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک برای کشف ژن‌های با الگوی بیان متفاوت در سرطان پانکراس، سرطان معده، سرطان روده، سرطان پروستات و دیگر بیماری‌ها استفاده شده‌اند (۱۰، ۱۱). ایجاد و پیشرفت سرطان پستان فرآیندی است که شامل عملکرد سینرژیک ژن‌های متعدد در مراحل مختلف می‌باشد (۱۲). پروتئین NKAIN1 متعلق به خانواده جدیدی از پروتئین‌های غشایی است که با زیر واحد β1 پمپ Na,K-ATPase بر هم کنش دارد. زیر واحد C ترمینال این پروتئین نیز با زیر واحد β1 پمپ Na,K-ATPase از کانال یونی بر هم کنش دارد. پروتئین NKAIN1 انسانی با پروتئین Nkain دروزوفیلا ارتولوگ می‌باشد (۱۳). NKAIN یک خانواده از چهار پروتئین غشایی شامل NKAIN1-4 می‌باشد که در طی تکامل محافظت شده‌اند و به‌عنوان زیر واحدهای ساختاری منافذ و یا کانال‌ها در نورون عمل می‌کنند و یا بر عملکرد سایر پروتئین‌های غشایی تأثیر می‌گذارند (۱۴، ۱۵). اعضای خانواده NKAIN در چندین منطقه از مغز موش بیان می‌شوند، اگرچه بیان آنها یکنواخت نمی‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که به‌منظور عملکرد صحیح پروتئین NKAIN1، ارتباط و همبستگی آن با پروتئین MoNaKa ضروری می‌باشد (۱۵، ۱۶). این پروتئین در اتصال پروتئین NKAIN1 به زیر واحد β1 پمپ Na,K-ATPase کانال یونی نقش دارد (۱۶). در یک مطالعه گسترده ژنومی Genome-wide association studies (GWAS) که در افراد وابسته به الکل و افراد نرمال (غیرالکلی) انجام شد نقش NKAIN1 در وابستگی افراد به الکل مشخص گردید که به دلیل عملکرد این پروتئین در سیستم‌های انتقال‌دهنده عصبی و مسیرهای متابولیک می‌باشد (۱۷).

یک تومور مارکر ایده‌آل می‌بایستی حساسیت و ویژگی بالایی داشته باشد و با روش‌های ساده و ارزان قابل‌شناسایی باشد. هدف از مطالعه حاضر در ابتدا شناسایی بیومارکرهای بالقوه‌ی مرتبط با سرطان پستان است که با استفاده از دیتابیس‌ها و آنالیزهای بیوانفورماتیک انجام شد و سپس جهت تأیید تغییرات بیان بیومارکر انتخاب شده در بافت توموری سرطان پستان و بافت نرمال مجاور آن از تکنیک دقیق qRT-PCR استفاده گردید. در مرحله آخر ارتباط و همبستگی این ژن با فاکتورهای بالینی–آسیب شناسی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

بررسی و شناسایی ژن‌های دارای افتراق بیان (Differentially Expressed Genes: DEGs)

برای این منظور داده‌های بیان ژن و داده‌های بالینی از پایگاه داده‌ی TCGA (https://portal.gdc.cancer.gov/)

دانلود شدند. به‌منظور بررسی و شناسایی ژن‌های دارای افتراق بیان میان نمونه‌های سالم و سرطانی، از روش edgeR در محیط برنامه‌نویسی R استفاده شد. مراحل پیش پردازش و نرمال‌سازی داده‌های بیوانفورماتیک در راستای افزایش کیفیت پژوهش در پکیج edgeR انجام گردید. ژن‌هایی با – Fold Change (FC)> |1| و < False Discovery Rate (FDR) 0.01 به‌عنوان ژن‌هایی با بیان افتراقی در نظر گرفته شدند. از میان ژن‌های معرفی‌شده ژن NKAIN1 جهت انجام سایر مراحل آنالیز انتخاب گردید.

بررسی بیوانفورماتیکی بیان ژن NKAIN1 به‌عنوان بیومارکر بالقوه مرتبط با سرطان پستان

به‌منظور تأیید افزایش بیان ژن NKAIN1 در سلول‌های توموری پستان نسبت به سلول‌های سالم از پایگاه داده GEPIA (http://gepia.cancer-pku.cn) استفاده گردید. به منظور تأیید افزایش بیان در پایگاه داده GEPIA پروفایل بیانی ژن NKAIN1 در بافت توموری پستان نسبت به بافت سالم و مقایسه‌ی تفاوت بیان این ژن در دیگر بافت‌های توموری ارزیابی شد و تغییرات بیان ژن NKAIN1 در ۱۰۸۵ نمونه توموری پستان و ۲۹۱ نمونه سالم به‌صورت Boxplot نشان داده شد. سپس تفاوت بیان این ژن در Stage های مختلف سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه همبستگی بیان ژن NKAIN1 با بیومارکرهای شناخته شده MKI67،ERBB2، ESR1 و PGR مرتبط با کارسینومای پستان بررسی شد.

بررسی جایگاه بیان، مسیرها، عملکرد و ساختار ژن NKAIN1

پایگاه داده ژن انسانی GeneCards (https://www.genecards.org/) یک پایگاه داده یکپارچه قابل جستجو، سریع و پیچیده است که اطلاعات تمام ژن‌های انسانی شناسایی‌شده و پیش‌بینی‌شده را ارائه می‌دهد. با استفاده از این پایگاه داده، جایگاه ژنومی ژن NKAIN1، عملکرد مولکولی، جایگاه درون‌سلولی، پروتئین‌هایی که این ژن با آنان برهم کنش دارد، همچنین ارتولوگ و پارالوگ این ژن مشخص شد.

بررسی میزان بقا (Overall survival)

ارتباط بین ژن NKAIN1 با میزان بقا با استفاده از ابزار آنلاین Kaplan-Meier Plotter تجزیه‌وتحلیل گردید که یک پایگاه داده برای ارزیابی تأثیرات بیان بیش از ۳۰ هزار رونوشت (mRNA- miRNA و پروتئین) و میزان بقا در ۲۱ نوع سرطان مختلف از جمله سرطان پستان (تعداد نمونه‌ها ۴۹۲۹) می‌باشد.

اندازه‌گیری میزان بیان ژن NKAIN1 با استفاده از تکنیک qRT-PCR

آماده‌سازی نمونه‌ی بافتی

۴۰ بیمار زن مبتلابه سرطان پستان بر اساس گزارش‌های پاتولوژیک آنها انتخاب شدند. بیوپسی از تومور و بافت طبیعی مجاور با جراحی انجام و سپس بر روی نمونه‌ها انجماد فوری انجام و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آن دسته از بیمارانی که شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی دریافت کرده بودند حذف شدند. نمونه‌ها از سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۸ در بیمارستان مرکزی شیراز جمع‌آوری شدند. بیماران قبل از عمل جراحی رضایت کتبی را آگاهانه امضا کردند. پروژه برای انجام تحقیقات پزشکی در ایران مطابق با اصول اخلاقی، استانداردها و هنجارهای ملی بود. اطلاعات بالینی- پاتولوژیک همگی بیماران از گزارش‌های آسیب شناسی به دست آمد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل از بافت‌های منجمد شده با استفاده ازکیت RNX-Plus (CinnaGen)، طبق دستورالعمل سازنده کیت استخراج شد. تیمار DNase با استفاده از کیت DNase I (Fermentas, Lithuania) جهت حذف DNA ژنومی انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از هگزامرهای تصادفی و پرایمرهای Oligo-dT کیت سنتز First strand cDNA synthesis (Fermentas, Lithuania) انجام گردید.

واکنش qRT-PCR

واکنش qRT-PCR با استفاده از دستگاه ABI StepOne (USA، Applied Biosystems) در پلیت-های میکروتیتر ۴۸ چاهکی با استفاده از مخلوط آنزیمی و رنگ سایبرگرین شرکت ABI و پرایمرهای اختصاصی ژن NKAIN1 انجام شد. از ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی

برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. تکثیر تحت شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد- ۱۰ دقیقه، ۴۵ سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد- ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد - ۴۰ ثانیه) انجام و بازده تکثیر ژن بر اساس شیب خط نمودار استاندارد محاسبه و در نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. ویژگی تکثیر با تجزیه و تحلیل منحنی ذوب تأیید شد. نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از فرمول pfaffl انجام گردید (۱۸-۲۰).

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA) مورد آنالیز قرار گرفت. برای بررسی تفاوت میانگین بیان ژن NKAIN1 در دو بافت توموری و نرمال و همچنین تفاوت بیان با در نظر گرفتن ویژگی‌های بالینی-آسیب شناسی جامعه از آزمون تی جفت شده استفاده شد.

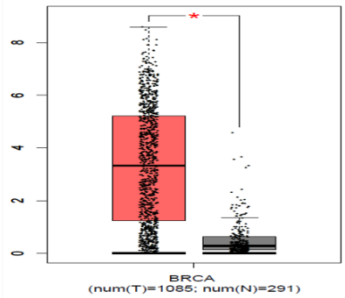
نتایج

به‌منظور شناسایی ژن‌های درگیر در سرطان پستان، مقایسه بین پروفایل بیان ژن در دو گروه بافت‌های طبیعی و بافت‌های سرطانی انجام شد. پس از نرمال‌سازی و پیش‌پردازش داده‌ها، در مجموع ۳۹۸ ژن با بیان افتراقی شناسایی شد. بر طبق نتایج هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology)، این ژن‌ها در فرآیندهای سیستم ایمنی بدن، فعال‌سازی سلولی، سیگنال دهی، فعال‌سازی لکوسیت‌ها، فعال‌سازی لنفوسیت‌ها، تنظیم فرایندهای ایمنی نقش داشتند. از میان این ژن‌ها ژن NKAIN1 که دارای یکی از بیشترین مقادیر افزایش بیان در بافت سرطانی نسبت به بافت نرمال بود، در سطح سلول بیان می‌شود (لذا قابلیت استفاده در روش‌های ایمونوتراپی سرطان را دارا می‌باشد) و تاکنون نیز به‌عنوان بیومارکر سرطان پستان معرفی نگردیده است جهت ادامه آنالیزها انتخاب گردید.

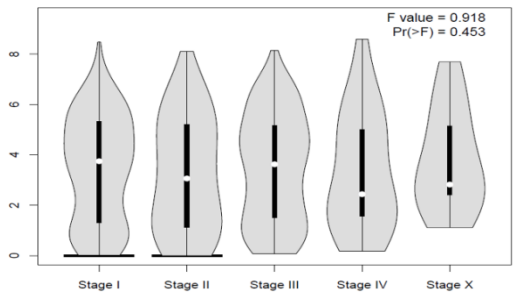
تأیید افزایش بیان ژن NKAIN1 با استفاده از پایگاه داده بیوانفورماتیکی GEPIA

با استفاده از پایگاه داده GEPIA تغییرات بیان ژن NKAIN1 در ۱۰۸۵ نمونه سرطان پستان و ۲۹۱ نمونه سالم به‌صورت Boxplot نشان داده شد. بیان ژن NKAIN1 در بافت توموری نسبت به بافت نرمال در سرطان پستان به‌طور معنی‌داری افزایش دارد (شکل ۱-الف). اگرچه بیان ژن NKAIN1 در سرطان پستان در مراحل مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد (شکل ۱-ب).

۱- الف

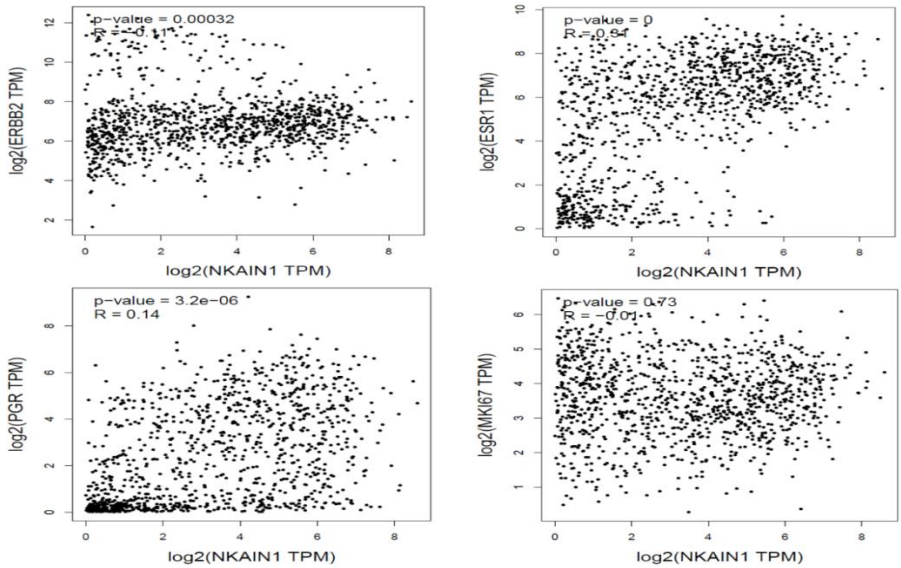


۱- ب



شکل ۱. الف: در این تصویر افزایش بیان ژن NKAIN1 در بافت سرطان پستان (BRCA) نسبت به بافت سالم مشاهده می‌گردد. نمونه‌های توموری به رنگ قرمز و نمونه‌های سالم به رنگ خاکستری نشان داده‌شده است که افزایش بیان معنی‌دار در بافت سرطانی نسبت به بافت نرمال مشخص می‌باشد. شکل۱-ب: در این تصویر تفاوت بیان ژن NKAIN1 در مراحل مختلف سرطان پستان به‌صورت لگاریتمی مشاهده می‌گردد.

با ترسیم نمودار همبستگی بیان ژن NKAIN1 و بیومارکرهای مرتبط با سرطان پستان، ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن NKAIN1 با بیان ژن‌های ERBB2، ESR1، PGR مشاهده شد اما هیچ‌گونه همبستگی بین بیان ژن NKAIN1 با فاکتور هسته‌ای MKI-67 وجود نداشت (شکل ۲).



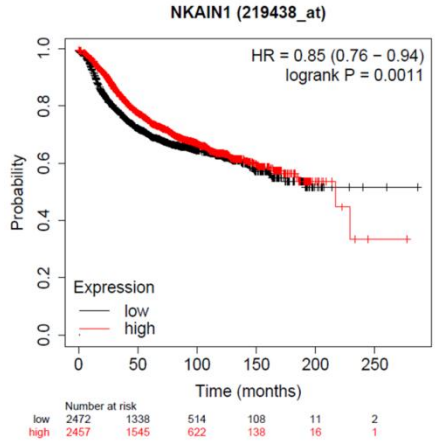
شکل۲. بررسی همبستگی بیان ژن NKAIN1 با گیرنده استروژن (ESR1)، گیرنده هورمون رشد اپیدرمی (ERBB2)، گیرنده پروژسترون (PGR)، و فاکتور هسته‌ای MKI-67.

بررسی جایگاه بیان، مسیرها، عملکرد و ساختار ژن NKAIN1

ژن NKAIN1 بر روی کروموزوم 1p35.2 واقع‌شده است که کد کننده یک پروتئین ۲۰۷ اسیدآمینه‌ای با جرم مولکولی ۲۳۵۵۲ دالتون می‌باشد. عملکرد مولکولی این ژن انتقال یون Na+/K+ که با کانال ATPase برهم کنش دارد می‌باشد. جایگاه درون‌سلولی پروتئین NKAIN1 بر روی غشای پلاسمایی می‌باشد. پروتئین‌هایی که NKAIN1 با آنها برهم‌کنش دارد با استفاده از پایگاه داده STRING ترسیم‌شده است. ارتولوگ این ژن در موش ژن NKain1 و پارالوگ آن ژن NKAIN2 می‌باشد که این ژن نیز با زیر واحد بتا از کانال سدیم- پتاسیم برهمکنش دارد.

بررسی میزان بقا با استفاده از نمودار Kaplan-Meier Plotter

میزان ارزش پیش‌آگهی ژن NKAIN1 با استفاده از پایگاه داده Kaplan-Meier Plotter بررسی گردید. میزان بقا در مبتلایان به سرطان پستان بر اساس میزان بیان ژن NKAIN1 (بیان بالا در مقابل بیان پایین) بررسی شد. بر اساس نتایج بیان بالای رونوشت ژن NKAIN1 در مبتلایان به سرطان پستان (Hazardous Ratio: HR=0.85) با میزان بقا ضعیف‌تر همراه بود. نسبت خطر (HR) و مقادیر log-rank P با فاصله اطمینان ۹۵٪ محاسبه و بر روی نمودار نمایش داده شد (شکل ۳).

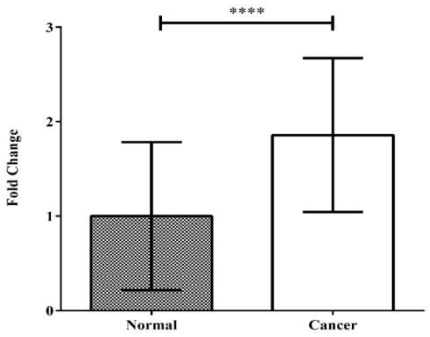


شکل۳. تخمین ارزش پیش‌آگهی ژن NKAIN1 در مبتلایان به سرطان پستان. بیماران مبتلابه سرطان پستان بر اساس میزان بیان ژن NKAIN1 به دو گروه تقسیم شدند (بیماران با بیان ژن بالاتر رنگ قرمز، بیماران با بیان ژن پایین‌تر رنگ مشکی).

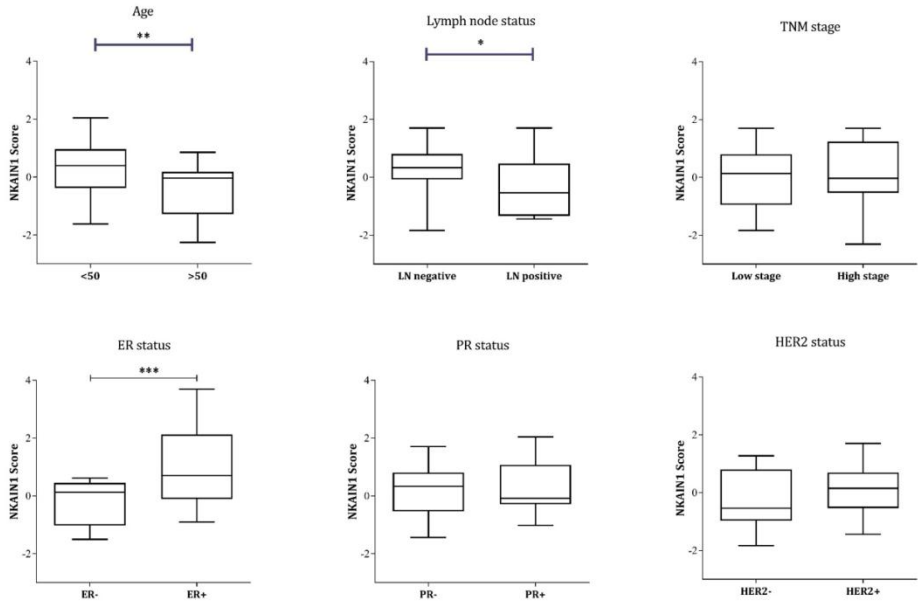
بررسی بیان NKAIN1 در بیماران مبتلابه سرطان پستان

تجزیه و تحلیل نتایج qRT-PCR در ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان نشان داد که بیان NKAIN1 به‌طور معنی‌داری

در بافت سرطانی نسبت به بافت طبیعی مجاور بالاتر است (P<0001). الگوی بیان کمی برای ژن NKAIN1 (شکل ۴) و مقایسه بیان ژن NKAIN1 با استفاده از تست تی جفت شده (Paired T-test) افزایش معنی‌داری در بافت سرطانی پستان نسبت به بافت نرمال نشان داد. از آنجا که یکی از مشکلات رایج در استخراج RNA، آلودگی DNA ژنومی می‌باشد و برای اطمینان از اینکه محصولات PCR از cDNA و نه DNA ژنومی تکثیر شده‌اند واکنش‌های PCR اضافی بر روی نمونه‌های RNA استخراج شده بدون رونویسی معکوس انجام شد. هیچ تکثیری در این واکنش‌ها مشاهده نشد. بررسی ویژگی‌های بالینی- آسیب‌شناسی بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان داد که میانگین سنی شرکت‌کنندگان در مطالعه ۱۰/۲± ۵۰/۹ (۷۹-۳۱) سال بود و ۶۷٪ بیماران در مراحل اولیه بیماری (I و II) بودند. اطلاعات بیشتر در مورد ویژگی‌های بالینی - پاتولوژیک در جدول ۱ نشان داده شده است. رابطه بین الگوی بیان NKAIN1 با تعداد غدد لنفاوی درگیر، اندازه تومور، سنین ابتلا به سرطان و وضعیت گیرنده‌های هورمونی بر روی سلول‌های سرطانی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت، رابطه معنی‌دار آماری بین الگوی بیانی ژن NKAIN1 در سنین مختلف، درگیری غدد لنفاوی و وضعیت گیرنده هورمونی استروژن وجود داشت اما با اندازه تومور و وضعیت گیرنده‌های رشد اپیدرمی و پروژسترون رابطه معنی-داری وجود نداشت (شکل ۵).



شکل ٤. مقایسه‌ی میانگین بیان ژن NKAIN1 در بافت توموری با بافت نرمال مجاور که به روش Relative qRT-PCR در ۴۰ بیمار مبتلابه سرطان پستان انجام‌شده است. Error Bar نشان‌دهنده‌ی انحراف معیار می‌باشد. **** بیانگر P value کمتر از ۰/۰۰۰۱ می‌باشد.



شکل ۵. بررسی رابطه الگوی بیان NKAIN1 با ویژگی‌های آسیب‌شناسی. میان بیان ژن NKAIN1 با درگیری غدد لنفاوی، سنین ابتلا به کارسینوما و وضعیت گیرنده هورمون استروژن رابطه‌ی آماری معنی‌داری وجود دارد. عبارت Low stage بیانگر بیماران I+II Grade و عبارت High stage بیانگر بیماران III Grade می‌باشد. از آزمون تی جفت شده جهت آنالیز آماری نتایج استفاده شد. Error Bar نشان‌دهنده‌ی انحراف معیار می‌باشد. * بیانگر P value کمتر از ۰/۰۵. ** بیانگر P value کمتر از ۰/۰۱ و *** بیانگر P value کمتر از ۰/۰۰۱ می‌باشد.

جدول ۱. ویژگی‌های بالینی-آسیب‌شناسی بیماران مبتلابه سرطان پستان شرکت‌کننده در مطالعه

Real time PCR			
متغیرها		**تعداد بیماران (درصد)**	**همبستگی با بیان ژن NKAIN1**
سن	≤۵۰	۱۱ (۲۷/۵)	P=۰/۵۱۲
	>۵۰	۲۹ (۷۲/۵)	
درجه	۱+ ۲	۲۳ (۵۷/۵)	P=۰/۵۳۲
	۳	۱۲ (۳۰)	
ER	مثبت	۱۹ (۴۷/۵)	P=۰/۵۲۸
	منفی	۷ (۱۷/۵)	
	نامشخص	۱۴ (۳۵)	
PR	مثبت	۲۰ (۵۰)	P=۰/۵۹۶
	منفی	۵ (۱۲/۵)	
	نامشخص	۱۵ (۳۷/۵)	
HER2	مثبت	۲۰ (۵۰)	P=۰/۳۰۸
	منفی	۷ (۱۷/۵)	
	نامشخص	۱۳ (۳۲/۵)	
درگیری LN	مثبت	۱۸ (۴۵)	P=۰/۰۵۸
	منفی	۲۲ (۵۵)	
مرحله TNM	۱+ ۲	۳۰ (۷۵)	P=۰/۹۰۶
	۳	۱۰ (۲۵)	

بحث

نتایج مطالعه ما نشان داد که یک ارتباط معناداری بین افزایش بیان ژن NKAIN1 و سرطان پستان وجود دارد و تکنیک qRT-PCR افزایش سطح بیان این ژن را در بافت‌های سرطان پستان در مقایسه با بافت‌های طبیعی تأیید نمود.

مهمترین فاکتور در پیش‌آگهی افراد مبتلا به سرطان پستان، مراحل بیماری می‌باشد که شامل اندازه‌ی تومور، تعداد غدد لنفاوی درگیر و شرایط متاستاتیک بیماری می‌باشد. تشخیص در مراحل بالایی با پیش‌آگهی ضعیف‌تر بیماری همراه می‌باشد. بنابراین تشخیص زودهنگام سرطان، نوید بخش کاهش میزان مرگ و میر و بهبودی سریع است. تخمین زده می‌شود با روش‌های ماموگرافی مرسوم، ۱۵ تا ۲۵ درصد از زنان در مراحل اولیه سرطان پستان؛ تشخیص داده نشوند (۲۱). همچنین مارکرهایی که در حال حاضر در تشخیص زودرس سرطان پستان استفاده می‌شوند مثل CA-125 و CEA کارایی پایینی در تشخیص دارند (۲۲). بنابراین شناسایی و ارزیابی بیومارکرهای جدید یک نیاز حیاتی در شناسایی و تشخیص سرطان پستان می‌باشد تا روش‌های درمانی مناسب و مدیریت بهتر سرطان صورت گیرد. شناسایی بیومارکرها می‌تواند در دستیابی به انواع روش‌های تشخیص، درمان، پیشگیری و پیش‌بینی انواع سرطان کمک‌کننده باشد. استفاده از کیت سنجش ۲۱ ژن (The 21-gene Oncotype Dx assay) می‌تواند در شناسایی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مراحل اولیه که دارای گیرنده استروژن هستند استفاده شود. همچنین کیت‌های سنجش ۷۰ ژن و ۱۹ ژن نیز می‌توانند در تشخیص، پیش‌آگهی و درمان افراد مبتلا به سرطان پستان کمک‌کننده باشند (۲۳، ۲۴). استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک برای شناسایی بیومارکرهای با بیان متفاوت، پیشرفت چشمگیری در تشخیص زودرس و درمان به موقع انواع سرطان‌ها و به ویژه سرطان پستان داشته است. فناوری‌های ریزآرایه و توالی‌یابی نسل جدید ابزارهایی کلیدی در ارائه اطلاعات ژنتیکی جامع بر روی نمونه‌های سرطان پستان و آشکار شدن تغییرات در

پیشرفت بیماری می‌باشند. در این مطالعه، از ابزارهای بیوانفورماتیک آنلاین برای بررسی بیومارکرهای احتمالی در تشخیص سرطان پستان استفاده شده است. ابتدا داده‌های بیان ژنی سرطان پستان و داده‌های بالینی از پایگاه داده‌ی TCGA بارگذاری شدند. ژن‌هایی با |FC>|1 و FDR<0.01 به‌عنوان ژن‌هایی با بیان افتراقی میان نمونه‌های سالم و سرطانی در نظر گرفته شدند. با آنالیز بیشتر با استفاده از پایگاه‌های آنلاین GEPIAو GeneCards ژن NKAIN1 به‌عنوان ژنی که در میان ژن‌های شناسایی‌شده توسط پایگاه داده TCGA بیشترین اختلاف بیان میان نمونه‌های بافت سرطانی و سالم دارد و همچنین ژنی که در سطح غشای پلاسمایی بیان می‌شود و می‌تواند علاوه بر نقش تشخیصی در ایمونوتراپی سرطان پستان نیز مورداستفاده قرار گیرد، انتخاب شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های میکروآری و مقایسه آن در دو بافت توموری و نرمال پروستات، ۳۹ بیومارکر بالقوه مرتبط با سرطان پروستات را نشان داد؛ در میان این ژن‌ها بیان ژن NKAIN1 در رسوب ادراری مردان مبتلا به سرطان پروستات در مقایسه با مردان سالم افزایش معناداری نشان می‌دهد (۲۵). در مطالعه‌ی دیگر جهت شناسایی بیومارکرهای مرتبط با پیش‌آگهی سرطان پستان نشان داده شد که افزایش بیان ژن NKAIN1 با کاهش میزان بقای افراد مبتلابه سرطان پستان در دو گروه TNBC و Triple-Positive Breast Cancer همراه بود (۲۶). تفسیر همزمان بیان چهار ژن NKAIN1، PANX2، DLL4 و C10orf55 و داده‌های مربوط به TNM، در پیش‌بینی، پیش‌آگهی و درمان بیماران مبتلابه آدنوکارسینومای مری نقش دارد (۲۷). در این مطالعه سطح بیان ژن NKAIN1 در سرطان پستان ارزیابی گردید و نتایج حاصل از تکنیک qRT-PCR بیانگر افزایش بیان در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور می‌باشد. همچنین در این مطالعه مشخص شد که رابطه معنی‌داری بین افزایش بیان ژن NKAIN1 با کاهش بقا در افراد مبتلابه سرطان پستان وجود دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج آنالیز بیوانفورماتیک، تجزیه و تحلیل آماری و نتایج داده‌های qRT-PCR ، ژن NKAIN1 را به‌عنوان یک بیومارکر بالقوه جهت تشخیصی سرطان پستان در سطح ترانسکریپتوم معرفی می‌نماید. اما برای معرفی قطعی این ژن به‌عنوان یک بیومارکر به آزمایش‌های بیشتری نیاز است. پیشنهاد می‌شود مطالعه‌ای با تعداد نمونه‌های بیشتر جهت یافتن یک cut off مناسب و بررسی نقش این ژن در شناسایی و جداسازی بیماران با پیش‌آگهی خوب و ضعیف انجام گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز قرار گرفت (کد اخلاق: IR.SUMS.REC.1397.667).

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Mokhtari-Hessari P, Montazeri A. Health-related quality of life in breast cancer patients: review of reviews from 2008 to 2018. Health and Quality of Life Outcomes. 2020;18(1):338.
2. Gu G, Dustin D, Fuqua SAW. Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. Current Opinion in Pharmacology. 2016;31:97-103.
3. Kotsopoulos J. BRCA mutations and breast cancer prevention. Cancers. 2018;10(12):524.
4. Kayadibi Y, Erginoz E, Cavus GH, Kurt SA, Ozturk T, Velidedeoglu M. Primary neuroendocrine carcinomas of the breast and neuroendocrine differentiated breast cancers: Relationship between histopathological and radiological features. European Journal of Radiology. 2022;147:110148.
5. Wapnir IL, Price KN, Anderson SJ, Robidoux A, Martin M, Nortier JWR, et al. Efficacy of chemotherapy for ER-Negative and ER-Positive isolated locoregional recurrence of breast cancer: final analysis of the CALOR trial. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. 2018;36(11):1073-9.
6. Sahu R, Pattanayak SP. Strategic developments and future perspective on gene therapy for breast cancer: role of mTOR and Brk/ PTK6 as molecular targets. Current Gene Therapy. 2020;20(4):237-58.
7. Tanaka E, Uchida D, Shiraha H, Kato H, Ohyama A, Iwamuro M, et al. Promising gene therapy using an adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 gene for the treatment of biliary cancer. Current Gene Therapy. 2020;20(1):64-70.

8. Rode MP, Silva AH, Cisilotto J, Rosolen D, Creczynski-Pasa TB. miR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer. Cellular Signalling. 2021;87:110113.
9. Ao C, Yu L, Zou Q. Prediction of bio-sequence modifications and the associations with diseases. Briefings in Functional Genomics. 2021;20(1):1-8.
10. Xu J, Liao K, Fu Z, Xiong Z. Screening differentially expressed genes of pancreatic cancer between Mongolian and Han people using bioinformatics technology. BMC Cancer. 2020;20(1):298.
11. Cheng L, Qi C, Zhuang H, Fu T, Zhang X. gutMDisorder :a comprehensive database for dysbiosis of the gut microbiota in disorders and interventions. Nucleic Acids Research. 2020;48(D1):554-60.
12. Zhang S, Jiang H, Gao B, Yang W, Wang G. Identification of diagnostic markers for breast cancer based on differential gene expression and pathway network. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022;12(9):811585.
13. Leyten GH, Hessels D, Smit FP, Jannink SA, de Jong H, Melchers WJ, et al. Identification of a candidate gene panel for the early diagnosis of prostate cancer. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. 2015;21(13):3061-70.
14. Leyten GH, Hessels D, Smit FP, Jannink SA, de Jong H, Melchers WJ, et al. Identification of a candidate gene panel for the early diagnosis of prostate cancer. Clinical Cancer rResearch. 2015;21(13):3061-70.
15. Gorokhova S, Bibert S, Geering K, Heintz N. A novel family of transmembrane proteins interacting with β subunits of the Na,K-ATPase. Human Molecular Genetics. 2007;16(20):2394-410.
16. Gorokhova S, Bibert S, Geering K, Heintz N. A novel family of transmembrane proteins interacting with beta subunits of the Na,K-ATPase. Human Molecular Genetics. 2007;16(20):2394-410.
17. Zuo L, Wang K, Zhang XY, Krystal JH, Li CS, Zhang F, et al. NKAIN1-SERINC2 is a functional, replicable and genome-wide significant risk gene region specific for alcohol dependence in subjects of European descent. Drug and Alcohol Dependence. 2013;129(3):254-64.
18. Asadi M, Ahmadi N, Ahmadvand S, Jafari AA, Safaei A, Erfani N, et al. Investigation of olfactory receptor family 51 subfamily j member 1 (OR51J1) gene susceptibility as a potential breast cancer-associated biomarker. PLoS One. 2021;16(2):e0246752.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 2001;29(9):e45.
20. Balotf S, Niazi A, Kavoosi G, Ramezani A. Differential expression of nitrate reductase in response to potassium and sodium nitrate: Realtime PCR analysis. Australian Journal of Crop Science. 2012;6(1):130-4
21. Taplin S, Abraham L, Barlow WE, Fenton JJ, Berns EA, Carney PA, et al. Mammography facility characteristics associated with interpretive accuracy of screening mammography. Journal of the National Cancer Institute. 2008;100(12):876-87.
22. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2007;25(33):5287-312.
23. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. The New England Journal of Medicine. 2004;351(27):2817-26.
24. Parker JS ,Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. Journal of clinical oncology : official Journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(8):1160-7.
25. Fujita K, Nonomura N. Urinary biomarkers of prostate cancer. International Journal of Urology : Official jJournal of the Japanese Urological Association. 2018;25(9):770-9.
26. Su J, Miao LF, Ye XH, Cui MS, He XF. Development of prognostic signature and nomogram for patients with breast cancer. Medicine. 2019;98(11):e14617.
27. Zhang D, Yin H, Bauer TL, Rogers MP, Velotta JB, Morgan CT, et al. Development of a novel miR-3648-related gene signature as a prognostic biomarker in esophageal adenocarcinoma. Annals of Translational Medicine. 2021;9(22):1702.

In Silico Identification of NKAIN1 Gene as a Potential Breast Cancer Associated Biomarker and Validation Using Real Time PCR Technique

Received: 21 Apr 2022 Accepted: 28 May 2022

Mohammad Ali-Hassanzadeh [1], Ali Golestan[2,3] Ahmad Tahmasebi[4], Amin Ramezani[3,5*]

1. Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran 2. PhD Student in Medical Biotechnology, Institute of Cancer Research, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran 3. Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran 4. Institute of Biotechnology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran 5. Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the second leading cause of cancer related deaths in women worldwide. Therefore, cancer screening biomarker, for early detection and diagnosis, is urgently required for timely treatment and better cancer management. The aim of this study was to identify potential biomarkers associated with breast cancer using databases and bioinformatics analyses.

Materials and Methods: In this study, an in silico approach was used for the identification of breast cancer associated biomarkers based on transcriptome data. Then, quantitative Real Time PCR technique (qRT-PCR) was used for differential expression analysis of identified biomarker.

Results: Analysis of available cancer related databases revealed an association between increased expression of NKAIN1 gene and breast cancer. Moreover, qRT-PCR technique confirmed the increased expression level of this gene in breast tumor tissues compared to normal tissues.

Conclusion: According to the results of in silico analysis and RT-PCR quantification, the NKAIN1 mRNA level can be used as a potential biomarker in the diagnosis of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, NKAIN1, Biomarker

***Corresponding Author:** Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Email: aramezani@sums.ac.ir Tel: +987132304392 Fax: +987132303687