



## Investigation of p53 and p27 expressions in the N-nitroso-N-methylurea-induced breast cancer in female Wistar Albino rats

Mahshid Azizian<sup>1</sup>, Seyede Zahra Bathaei<sup>1\*</sup>, Mahboobeh Ashrafi<sup>2</sup>, Reyhaneh Hoshyar<sup>3</sup>

1. Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2. Dept. of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3. Dept. of Biochemistry, Birjand University, Birjand, Iran

Received: 24 May 2014

Accepted: 3 Aug 2014

### Abstract

**Introduction:** N-nitroso-N-methylurea (NMU) is a carcinogen from nitrosamines family, which has been used to induce breast cancer in rodents. This model of breast cancer is very similar to the estrogen dependent breast cancer in human. As a continuation of our recent works, in the present study, the expressions of both p53 and p27 were investigated in NMU-induced breast cancer in Wistar Albino rats.

**Methods:** Breast cancer was induced by intraperitoneal injection of NMU in Wistar Albino rats, while, normal saline was injected in the control group. After the tumors were formed and reached a proper size, the rats in both groups were sacrificed under anesthesia and samples were obtained from mammary tumors as well as normal breast tissue. Expressions of p53 and p27 genes were investigated by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**Results:** NMU injection induced breast cancer in rats. RT-PCR data showed that p53 expression was increased ( $p > 0.05$ ), while p27 expression was decreased in rat mammary tumors compared with the normal tissue of normal rats ( $p > 0.05$ ). This study is being continued to confirm the results, but these findings are compatible with our previous data about cyclin D1 and p21 expressions in tumor tissue.

**Conclusion:** The results indicate opposite changes in the expression of p53 and p27 in cancerous breast tissue in comparison with the normal breast tissue.

**Key words:** Breast Cancer, N-Nitroso-N-Methylurea (NMU), p53, p27

\* Corresponding author e-mail: bathai\_z@modares.ac.ir  
Available online at: www.phypha.ir/ppj

## بررسی بیان ژنهای P53 و P27 در تومورهای سرطان پستان القا شده توسط ان- نیتروزو ان- متیل یوریا (NMU) در موش صحرایی نژاد ویستار آلبنو

مهشید عزیزیان<sup>۱</sup>، سیده زهرا بطحائی<sup>۱\*</sup>، محبوبه اشرفی<sup>۲</sup>، ریحانه هوشیار<sup>۳</sup>  
۱. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز  
۳. گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند

پذیرش: ۱۲ مرداد ۹۳

دریافت: ۳ خرداد ۹۳

### چکیده

**مقدمه:** ان- نیتروزو ان- متیل یوریا (NMU) از جمله سرطانزهای شیمیایی از گروه نیتروزآمین هاست که در القای سرطان پستان در جوندگان (مانند رت) به کار می‌رود. این مدل سرطان پستان بسیار مشابه با سرطان پستان وابسته به استروژن در انسان می‌باشد. به دنبال پژوهش‌های قبلی ما و دیگران، در این مطالعه بیان دو ژن p53 و p27 در تومورهای سرطان پستان القا شده توسط NMU در رت بررسی شد.

**روش‌ها:** القای سرطان پستان در رت به واسطه ۳ تزریق درون صفاقی NMU انجام شد؛ ولی به رت‌های گروه کنترل، سرم فیزیولوژی تزریق گردید. پس از ایجاد تومورها و رسیدن آنها به اندازه مورد نیاز، رت‌های هر دو گروه فوق بیهوش، سپس تومورها و بافت‌های طبیعی پستان خارج شد و بیان دو ژن p53 و p27 با روش RT-PCR در آنها بررسی گردید.

**یافته‌ها:** تزریق NMU منجر به القای سرطان پستان در نمونه‌ها گردید. نتایج RT-PCR حاکی از تغییر روبه افزایش بیان ژن p53 ( $p > 0.05$ ) و تغییر رو به کاهش بیان ژن p27 ( $p > 0.05$ ) در تومورهای سرطان پستان القا شده در رت نسبت به بافت طبیعی پستان بود. این مطالعه برای اثبات تغییرات مشاهده شده با روش‌های دیگر ادامه دارد. ولی این تغییرات با نتایج قبلی ما مبنی بر تغییرات بیان ژن‌های سیکلین D1 و p21 هم‌خوانی دارد.

**نتیجه‌گیری:** مشاهدات این مطالعه بیانگر تغییرات متضاد بیان ژن‌های p53 و p27 در تومورها نسبت به بافت سالم پستان بود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، ان نیتروزو ان متیل یوریا، p53، p27

### مقدمه

انجام شد [۱۸، ۲۱، ۳۰].

سرطان‌های پستان از سلول‌های اپی‌تلیال که در انتهای واحدهای لوبولار مجاری شیری هستند منشأ می‌گیرند. در سلول‌های اپی‌تلیالی سرطانی در سرطان پستان، استرادیول نقش میتوژنیک خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های استروژن ( $ER\alpha$  و  $ER\beta$ ) ایفا می‌کند. حداقل ۷۰٪ از موارد سرطان پستان دارای گیرنده‌ی استروژن هستند ( $ER+$ ) و اساساً گیرنده‌ی نوع آلفا را بیان می‌کنند [۳۱].

سرطان پستان یک بیماری هتروژن با ویژگی‌های بیولوژیکی و بالینی متفاوت می‌باشد که یکی از رایج‌ترین بدخیمی‌ها و دومین سرطان کشنده در میان زنان است. سرطان پستان اولین سرطانی است که درمان هدفمند برای آن

\* نویسنده مسئول مکاتبات: bathai\_z@modares.ac.ir

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

متاستاز را از طریق افزایش آنژیوژنز شدت می‌بخشد. مطالعات زیادی در رابطه با p53 و غیر فعال شدن آن به عنوان پیش‌آگهی سرطان پستان انجام شده است [۱۴].  
القاء سرطان پستان با استفاده از NMU قبلاً در آزمایشگاه ما انجام و تغییرات بیان دو ژن p21 و Cyclin D1 در این مدل گزارش شد [۱]، ولی به منظور شناسایی بهتر این مسیر سرطان‌زائی، تحقیق حاضر برای بررسی تغییرات احتمالی بیان ژنهای p53 و p27 در این مدل سرطانی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق ۳۰ سر موش صحرایی ماده، نژاد ویستار آلبنو، ۳۵ روزه از انستیتو پاستور ایران - کرج خریداری و به ۲ گروه ۱۵ تایی تقسیم شد. بعد از گذشت دو هفته به منظور سازگاری با شرایط محیطی، القای سرطان پستان به واسطه ۳ تزریق درون صفاقی (i.p.) NMU با غلظت ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و با فواصل زمانی هر ۲ هفته یکبار در سنین ۵۰، ۶۴ و ۷۸ روزگی در موش‌های گروه سرطانی انجام شد [۱]. به موش‌های گروه کنترل، سرم فیزیولوژی تزریق گردید. موش‌هایی که به دنبال تجویز NMU تومور در آن‌ها ظاهر نشد، از مطالعه خارج شدند. بعد از ظهور تومور و رسیدن آن به میزان مورد نیاز، موش‌های مورد مطالعه با تزریق درون صفاقی زایلانین - کتامین بی‌هوش شدند. تومورها و بافت‌های طبیعی به سرعت خارج شده و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی، درون فویل‌های آلومینیومی قرار داده شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد. جهت اطمینان از نوع سرطان القا شده برش‌هایی از تومورها برای مطالعه به پاتولوژیست داده شد.

استخراج RNA از بافت‌های طبیعی و توموری با استفاده از محلول‌های کیت استخراج RNA (RNA تام، شرکت دنازیست، ایران) با استفاده از پروتکل پیشنهادی این شرکت انجام گرفت: بعد از یکنواخت کردن بافت‌ها و افزودن محلول G1 و کلروفرم، نمونه‌ها سانتریفوژ شد. سپس بخشی از فاز بالای به میکروتیوب عاری از RNAase منتقل، ایزوپروپانول و محلول G2 به آن افزوده شد و پس از چند دقیقه نگهداری روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه در  $g \times 12000$  سانتریفوژ گردید.

نیتروزآمین‌ها (مانند NMU) سرطان‌زاهای شیمیایی هستند که الکتروفیل بوده و از طریق میان‌کنش با بافت، تولید رادیکال‌های آزاد می‌کنند. این رادیکال‌های آزاد با آسیب به DNA منجر به جهش و تشکیل تومور می‌شوند. ایجاد تومور تحت تأثیر سرطان‌زاهای شیمیایی به واسطه عبور از تمامی مراحل سرطان‌زایی می‌باشد. تومورهای پستانی القا شده توسط NMU، در جوندگان از سلول‌های اپی‌تلیال داکت‌های پستان منشأ گرفته، وابسته به هورمون بوده (ER+ و PR+) و درجه و منشأ هیستوپاتولوژیکی مشابهی با تومورهای پستانی در انسان دارند [۱۹، ۲۰]. تکثیر سلولی از طریق سیکل سلولی انجام می‌گیرد. p27 یکی از مهارکننده‌های چرخه‌ی سلولی است که اخیراً نقش آن در سرطان‌هایی چون سرطان معده و سرطان پستان مورد توجه قرار گرفته است و کاهش بیان آن در اکثر سرطان‌های پستان دیده شده است [۱۳]. پروتئین p27 با مهار کردن فسفریله شدن پروتئین رتینوبلاستوما و در نتیجه فعال کردن آن منجر به مهار پیشرفت چرخه‌ی سلولی می‌شود. سطح p27 هنگامی که سلول‌ها برای ورود به چرخه‌ی سلولی تحریک می‌شوند، کاهش می‌یابد [۲۸]. کاهش میزان پروتئین p27 در سرطان‌ها، با افزایش درجه‌ی هیستوپاتولوژیکی تومورها رابطه‌ی قوی دارد. در عین حال در اکثر مطالعات مربوط به سرطان پستان نشان داده شده که کمبود یا فقدان p27 نشانه‌ای از بهبود ضعیف بیمار است [۳]. از طرفی، p53 به وسیله‌ی ژن Tp53 که روی کروموزوم ۱۷p۱۳ واقع شده است، کد می‌شود. پروتئین p53 اساساً یک فاکتور فعال‌کننده‌ی رونویسی است که از طریق اتصال به توالی‌های خاص DNA در ژن‌های هدف خود که در بسیاری از اعمال بیولوژیکی مانند توقف چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز، ترمیم DNA، پیری و مهار آنژیوژنز نقش دارند، اعمال اثر می‌کند. مقادیر سلولی p53 به علت نیمه عمر کوتاه آن (حدود ۲۰ دقیقه) کم می‌باشد. در شرایط استرس سلولی مانند آسیب به DNA، کینازهای ویژه‌ی فعال می‌شوند که p53 را در جایگاه‌های خاص فسفریله می‌کنند. این فسفریله شدن منجر به پایدار شدن p53 و انتقال آن به هسته می‌شود [۲۷]. ژن p53 شایع‌ترین ژن جهش‌یافته در بدخیمی‌های مربوط به انسان می‌باشد [۴]. غیرفعال شدن p53 در سرطان پستان بسیار شایع است و منجر به افزایش تکثیر سلولی و مقاومت به آپوپتوز شده و

به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. برای بهینه کردن روش کار از روش شیب دمایی<sup>۱</sup> برای به دست آوردن دمای مناسب مرحله هیبرید شدن<sup>۲</sup> پرایمرها به ژن‌های مورد مطالعه، و همچنین گرادیان غلظتی برای بدست آوردن غلظت مناسب پرایمرها و cDNA در دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. ۳۰ چرخه به صورت سه مرحله غیرطبیعی سازی (Denaturation) (۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه)، اتصال (Annealing) (۶۰ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه) و طولی سازی (Extention) در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک چرخه طولی سازی نهایی (۷۲ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد و محصول PCR با ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بررسی شد. در این تحقیق، پرایمرها برای ژن‌های p53 و p27 و GAPDH ویژه‌ی موش صحرائی نژاد ویستار آلبینو از مقالات گردآوری شد [۲۵، ۳۲، ۳۳]. و خصوصیات ترمودینامیکی آنها با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo 6 و Generunner مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی‌ها و مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق (p53 و p27 و GAPDH) در جدول ۱ آمده است. همانطور که گفته شد در تحقیق حاضر، PCR به صورت دوتایی انجام شد. بدین صورت که دمای هیبریدی ۶۰ درجه سانتیگراد برای ژنهای p53 همراه با GAPDH و P27 همراه با GAPDH در نظر گرفته شد و هر دو باند GAPDH-p53 و یا GAPDH-P27 روی یک ژل بررسی شد. محصول PCR تحت تابش نور ماورای بنفش و به واسطه حضور اتیدیوم بروماید در ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده و از آن عکس برداری شد. شدت علائم هر باند به کمک نرم افزار Total Lab سنجیده شد و نتایج حاصل با آزمون one-way ANOVA آنالیز آماری شد.

## یافته‌ها

با استفاده از نرم‌افزار آنالیز ژن دانسیته باندها اندازه‌گیری

رسوب حاصل با اتانول ۷۵ درصد شستشو و در آب تیمار شده با دی-اتیل پیروکربونات (DEPC) حل شد. سپس RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی بوسیله نانودراپ (Thermo scientific Nano drop 2000C Spectrophotometer) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

برای تبدیل mRNA به DNA مکمل (cdNA) از کیت سنتز cdNA فرمنتاز استفاده گردید. ابتدا ۲ میکروگرم از RNA استخراجی به یک میکروتیوب استریل و عاری از RNase انتقال داده شده و بعد از افزودن ۱ میکرولیتر اولیگو (dT)<sub>18</sub> (۱۰۰ میکرو مولار به آن، با استفاده از آب عاری از نوکلئاز حجم نهایی به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini personal thermal cycler, Bio Rad, Hercules, CA, USA) قرار داده شد. میکروتیوب را روی یخ گذاشته و به آن ۴ میکرولیتر بافر واکنش دهنده 5x، ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase RibolockTm، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP ۱۰ میلی مولار و ۱ میکرولیتر آنزیم ترانسکریپتاز معکوس H Minus M-MuLV (۲۰۰ u/μl) افزوده و بعد از مخلوط شدن به وسیله میکروفیوژ، برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد و متعاقب آن ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. پس از انجام واکنش رونویسی معکوس و تهیه cdNA به منظور تکثیر قطعه مورد نظر، واکنش PCR انجام گرفت.

در انجام PCR از نمونه‌های cdNA علاوه بر تکثیر cdNA مربوط به ژن‌های مورد مطالعه (p53 و p27)، از ژن کنترل داخلی GAPDH نیز استفاده شد و تکثیر قطعه‌های ژن مورد نظر و ژن کنترل داخلی به صورت Duplex-PCR انجام گرفت. همچنین جهت اطمینان از صحت کار، از نمونه کنترل مثبت موجود در کیت جهت سنتز cdNA و سپس در مرحله تکثیر ژن، استفاده شد. از طرفی کنترل منفی (میکروتیوب حاوی تمامی مواد جهت تکثیر به غیر از cdNA) نیز برای اطمینان از عدم وجود آلودگی به کار برده شد.

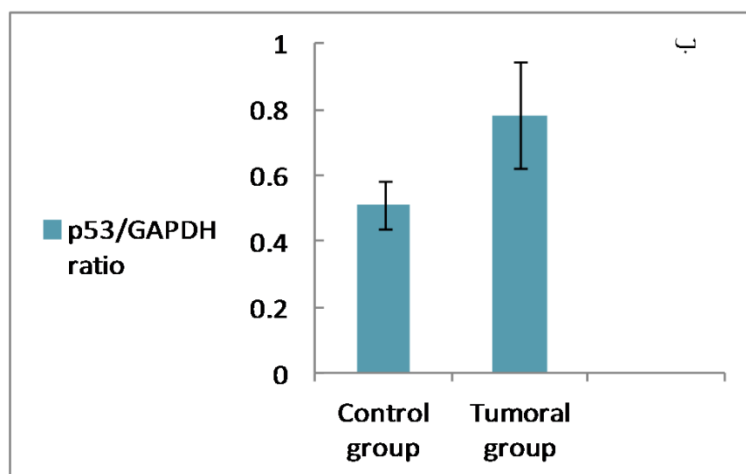
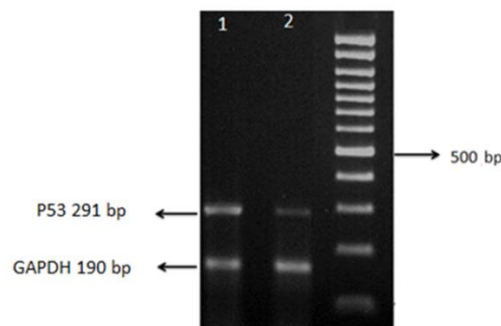
۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (2x) (مربوط به شرکت فرمنتاز) ۰/۷۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، غلظت‌های یکسانی از cdNA (میکروگرم ۱-۳) به میکروتیوب افزوده شد و مخلوط واکنش با آب عاری از نوکلئاز

1. Gradient Temperature  
2. Annealing

جدول ۱. مشخصات و ویژگی‌های پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

| gene  | Primer sequence         | PCR product size (bp) | Annealing temperature (centigrade degree) |
|-------|-------------------------|-----------------------|---|
| GAPDH | F: AACGACCCCTTCATTGAC   | 190                   | 60  |
|       | R: TCCACGACATACTCAGCAC  |                       |   |
| p53   | F:GTGGCCTCTGTCATCTTCCG  | 291                   | 60  |
|       | R:CCGTCACCATCAGAGCAACG  |                       |   |
| P27   | F:GAGGGCAGATACGAGTGGCAG | 238                   | 60  |
|       | R:CTGGACACTGCTCCGCTAACC |                       |   |

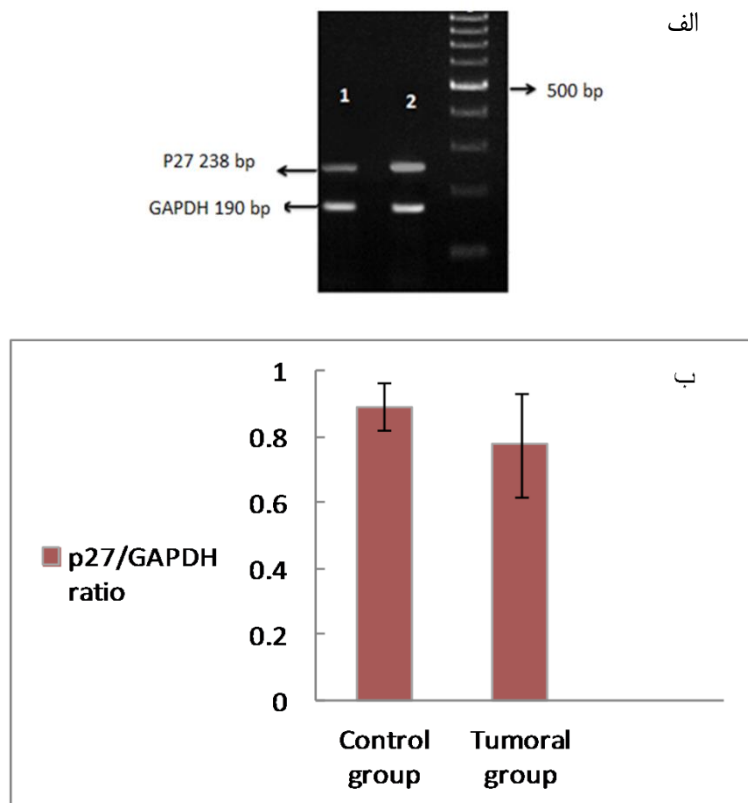
الف



شکل ۱- بیان ژن p53: الف) الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر قطعه‌های ژنی p53 و کنترل داخلی GAPDH روی ژل آگارز. افزایش بیان ژن p53 در بافت توموری، باند ۱، در مقایسه با بافت طبیعی سینه، باند ۲، را نشان می‌دهد. ب) مقایسه نتایج حاصل از بررسی دانسیتومتریک باندهای ظاهر شده در گروه کنترل و توموری القا شده با NMU با استفاده از نرم‌افزار توتال لب از طریق تست one-way ANOVA. ( $p > 0/05$ ). به منظور از بین بردن خطاهای احتمالی در حین انجام PCR، نسبت درصد دانسیته‌ی p53/GAPDH منظور گردیده است.

p27 نتایج بدست آمده از مقایسه دو گروه سرطانی و سالم نشان دهنده کاهش بیان این ژن در بافت توموری سینه در گروه موشهای سرطانی نسبت به بافت سالم سینه در گروه

شد. افزایش بیان ژن p53 در بعضی از نمونه‌های سرطانی کاملاً واضح بود (شکل ۱)، ولی آنالیز آماری نشان داد که تغییرات در مجموع معنی‌دار نیست ( $p > 0/05$ ). در مورد ژن



**شکل ۲- بیان ژن p27 :** الف) الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر قطعه‌های ژنی p27 و کنترل داخلی GAPDH روی ژل آگارز. کاهش بیان ژن p27 در بافت توموری، باند ۱، در مقایسه با بافت طبیعی سینه، باند ۲، را نشان می‌دهد. ب) مقایسه نتایج حاصل از بررسی دانسیتومتریک باندهای ظاهر شده در گروه کنترل و توموری القا شده با NMU با استفاده از نرم‌افزار توتال لب از طریق تست one-way ANOVA. ( $p > 0.05$ ). به منظور از بین بردن خطاهای احتمالی در حین انجام PCR، نسبت درصد دانسیته‌ی p27/GAPDH منظور گردیده است.

بافت‌های توموری ممکن است از طریق مسیر وابسته به p53 یا غیروابسته به آن انجام گرفته باشد. حال با تغییرات افزایشی بیان p53 در مطالعه‌ی حاضر، نشان داده شد که القای بیان p21 در بافتهای توموری از طریق مسیر وابسته به p53 انجام گرفته است و این مستلزم وجود نوع طبیعی p53 و ارتباط مثبت بین بیان این دو ژن می‌باشد [۸، ۱۲]. یک فرضیه برای افزایش بیان p21 در تومورها نسبت به بافت‌های طبیعی، تلاش سلولهای غیرطبیعی برای توقف تکثیر سلولی از طریق نقطه‌ی تنظیمی فاز G1 است [۳۴]. کریست (Crist) و همکاران در سال ۱۹۹۶ افزایش بیان p53 و تجمع آن در تومورهای سرطان پستان القایی توسط NMU در موش صحرایی نژاد اسپراگ دالی، را نشان دادند و افزایش بیان نوع طبیعی p53 و عدم فعالیت سرکوبگری آن را به اتصال p53 طبیعی به سایر پروتئینها، مرتبط دانستند [۱۱]. در مطالعه‌ی دیگری که توسط کیتو و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام شد، نشان داده شد که در سرطان‌های پستان القایی با عواملی

موشهای سالم بود ولی این تغییر نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) (شکل ۲).

## بحث

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، بیان p53 در تومورهای پستانی القا شده توسط NMU در موش صحرایی نژاد ویستار آلبینو، نسبت به بافت‌های طبیعی پستان در موش صحرایی گروه کنترل تغییرات رو به افزایش داشت. نتایج مطالعه ما القاء سرطان در بافت پستان را توسط پاتولوژیست اثبات کرد [۱]. همچنین نتایج بدست آمده از تحقیق قبلی ما تحت شرایط مشابه، تغییرات بیان ژن‌های سایکلین D1 و p21 نشان داده شد، به طوری که بیان p21 در تومورهای القا شده توسط NMU در موش صحرایی، به مقدار قابل توجهی بیشتر از بافت‌های طبیعی غدد پستانی موش صحرایی گروه کنترل بود [۲]. افزایش بیان p21 در

دست آن از جمله Mdm2 و p21 می‌شود و افزایش سطح استروژن با افزایش بیان p53 در سلولهای سرطانی، در شرایط استرس، مرتبط می‌باشد [۵]. با توجه به موارد ذکر شده‌ی فوق، افزایش بیان p53 در بافت‌های توموری مدل حیوانی مورد مطالعه نسبت به بافت‌های طبیعی پستان که در سایر مطالعات هم دیده شده است، ممکن است به دلیل اثر استروژن بر بیان آن باشد چرا که سرطان پستان القا شده با NMU وابسته به استروژن است.

از طرفی یکی از راههای اعمال اثرات سرطان‌زایی عوامل آلیکله‌کننده مانند NMU از طریق افزایش فعال‌سازی NFκB درون سلولی انجام می‌گیرد. کارسینوژن NMU منجر به افزایش بیان NFκB از طریق مسیر PKC در کراتینوسیت‌های بدخیم در انسان می‌شود [۲۹]. در مورد ارتباط p53 و پروتئین کیناز سی (PKC) و اثرپذیری p53 از PKC مطالعاتی صورت گرفته که به برخی از آنها اشاره می‌کنیم. در مطالعه‌ای نشان داده شد که تیمار سلول‌های موشی و انسانی با مهارکننده‌ی PKC منجر به افزایش نیمه عمر p53، انتقال آن به هسته و تجمع آن شده است. p53 وارد شده به هسته به DNA متصل شده اما قادر به القاء رونویسی ژن‌های هدف خود نیست [۹]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که PKC در پاسخ به آسیب به DNA منجر به افزایش بیان p53 در سطح رونویسی می‌شود همچنین PKC قادر به تنظیم مسیرهای مرتبط با p53، فعال کردن پروموتور آن به ویژه در شرایط آسیب به DNA می‌باشد. از طرفی مهارکننده‌های PKC منجر به مهار سنتز p53 نیز می‌شوند [۳۵]. با توجه به مطالب ذکر شده در مورد تأثیرپذیری p53 از PKC می‌توان احتمال داد که افزایش نسبی بیان و فعال شدن p53 که در این مطالعه نیز مشاهده شد، می‌تواند ناشی از فعال شدن PKC تحت تأثیر NMU باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، بیان p27 در تومورهای القا شده توسط NMU در رت نژاد ویستار آلبینو، تغییرات کاهشی نسبت به بافت‌های طبیعی غدد پستانی رت‌های گروه کنترل (سالم) داشت. در بسیاری از بافت‌های اپیتلیالی نرمال، مانند بافت پستان، پروستات، ریه و تخمدان سطح بالایی از پروتئین هسته‌ای p27 وجود دارد اما فقدان و کاهش این پروتئین در بسیاری از تومورهای انسانی مشاهده

همچون NMU و DMBA در موش صحرایی، هیچ نوع جهشی در ژن p53 دیده نشده است، در حالی که جهش در ژن H-Ras در سرطان پستان القاء شده با NMU ایجاد شده بود [۲۲]. تومورهای پستانی القاء شده با NMU وابسته به استروژن بوده و واجد جهش در کدون ۱۲ انکوژن H-Ras در نتیجه فعال شدن این انکوژن هستند [۸].

از آنجا که فعال شدن انکوژن H-Ras پس از تزریق NMU طی مدت زمان کوتاهی رخ می‌دهد (حدود ۲ هفته بعد از تزریق کارسینوژن و حداقل ۲ ماه قبل از آغاز نئوپلازی) فعال شدن و افزایش بیان این انکوژن احتمالاً می‌تواند منجر به افزایش بیان p53 نیز گردد [۱۱، ۲۶]. مکانیزم فعال شدن p53 به وسیله‌ی انکوژن‌هایی مانند Ras، از طریق فعال کردن یک بازدارنده‌ی تومور به نام ARF (کنترل‌کننده‌ی مثبت p53) و جدا کردن p53 از Mdm2 (کنترل‌کننده‌ی منفی آن) پیشنهاد شده است [۶]. اثر استروژن بر میزان p53 و پاسخ‌های وابسته به آن در سوشهای سلولی مختلف از سرطان پستان در سال ۲۰۱۱ توسط فرناندز و همکاران نشان داده شد. بر اساس نتایج این مطالعه، فعالیت و پاسخ‌های p53 در سلول‌های سرطانی به فعالیت گیرنده‌های استروژن  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) وابسته است و هر دو فرم طبیعی و جهش یافته‌ی p53 در ارتباط مستقیم با میزان استروژن هستند [۱۵]. گرچه ژن p53 یکی از غالب‌ترین ژن‌های جهش یافته در تمامی سرطان‌ها در انسان می‌باشد، اما این ژن تنها در حدود ۲۰٪ سرطان‌های پستان جهش پیدا کرده است. حدود ۷۰٪ از سرطان‌های پستان از نوع  $ER^+$  بوده و گیرنده‌ی استروژن را بیان می‌کنند. طبق مطالعات گذشته و مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ بر روی ژن p53 به عنوان ژن هدف  $ER\alpha$  در سرطان پستان در سوش سلولی MCF7 انجام گرفت، به موارد زیر می‌توان اشاره کرد [۵].

p53 به عنوان یک ژن هدف  $ER\alpha$  می‌باشد، استروژن با اتصال به گیرنده خود ( $ER\alpha$ ) منجر به تغییر بنای فضائی، دو زیر واحدی شدن و اتصال آن به عناصر پاسخ دهنده به استروژن در ژنهای هدف، مثل ژن p53 می‌شود. در نتیجه، این ژن فعال شده و افزایش رونویسی p53 مشاهده می‌شود، القاء کاهش با توقف فعالیت ژن (Knockdown) گیرنده استروژن ( $ER\alpha$ ) منجر به کاهش بیان p53 و ژنهای پایین

SKP2 نیز می‌تواند سبب کاهش بیان p27 شود. در مسیر وابسته به SKP2 این پروتئین منجر به تجزیه‌ی p27 هسته‌ای از طریق یوبیکوئیتین-پروتازوم می‌شود. در حالی که در مسیر غیروابسته به SKP2 مکانیزم‌هایی وجود دارند که منجر به خروج p27 از هسته و تجزیه‌ی پروتئولیتیک آن در سیتوپلاسم می‌شوند [۱۷]. SKP2 به خانواده‌ی پروتئینهای F-BOX تعلق دارد. مطالعات نشان داده‌اند که SKP2 در پیشرفت چرخه‌ی سلولی از طریق تنظیم پایداری مهارکننده‌های این چرخه از جمله p27 موثر است [۷]. بنابراین مکانیزم احتمالی تغییرات کاهشی بیان p27 در نمونه‌های توموری این تحقیق نسبت به نمونه‌های سالم، می‌تواند از طریق اثر استروژن به واسطه‌ی مسیر وابسته به SKP2 و یا مسیر غیروابسته به آن نیز باشد.

مطالعه حاضر نشان دهنده تغییرات به ترتیب افزایشی و کاهشی بیان ژن‌های p53 و p27 در بافت توموری سرطان پستان‌القاء شده با NMU بود. هر چند که این تغییرات در سطح ژن معنی‌دار نبود ولی با توجه به تغییراتی که قبلاً در سایر ژن‌ها بخصوص p21 مشاهده شده بود، هماهنگی داشت. این تحقیق جهت بررسی محصولات این ژن‌ها در سطح پروتئین و همچنین سایر مسیرهای دخیل در امر سرطان‌زایی، ادامه دارد.

### سپاسگزاری

از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تأمین هزینه این پژوهش و تهیه امکانات قدردانی می‌شود.

شده است. جهش در ژن p27 در سرطان پستان به ندرت دیده شده است، بنابراین پیشنهاد شده است که احتمالاً کاهش سطح p27 می‌تواند ناشی از افزایش تجزیه‌ی آن باشد [۱۰]. در مطالعاتی که در سالهای ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ بر روی بافتهای طبیعی و توموری پستان در سگ انجام شد، افزایش بیان ژن p21 و کاهش بیان ژن p27 مشاهده شد [۲۳، ۲۴]. این نتیجه با نتایج مشاهده شده در کار ما مشابه نتایجی است که در سال ۲۰۰۹ گزارش شد و نشان داد که در سلولهای MCF-7 استروژن از طریق کاهش بیان p27 منجر به رشد و تکثیر سلول‌ها شده است [۱۶]. بر اساس مطالعات انجام شده، استروژن از چند طریق بر بیان p27 و فعالیت آن در سرطان پستان در انسان و سوس‌های سلولی سرطان پستان اثر می‌گذارد. استروژن بیان و عملکرد p27 را در سلول‌های MCF-7 از طریق فعال کردن مسیر Ras/Raf-1/ERK و همچنین هدف قرار دادن فاکتورهای رونویسی مانند c-Myc تنظیم می‌کند. فعال شدن مسیر Ras/Raf-1/ERK منجر به خروج p27 از هسته به سیتوپلاسم، حذف فعالیت مهارتی آن و افزایش تجزیه‌ی آن می‌شود. از طرفی در سیتوپلاسم، p27 تحت اثر استروژن در تشکیل کمپلکس‌های CyclinD-CDK4 و ورود آنها به هسته شرکت می‌کند [۱۷]. بنابراین با توجه به وابسته به استروژن بودن مدل حیوانی مورد مطالعه کاهش دیده شده در بیان p27 در بافتهای توموری در مقایسه با بافتهای طبیعی در تحقیق حاضر، ممکن است به دلیل فوق باشد.

استروژن از طریق مکانیسم‌های وابسته به (S-phase SKP2 kinase associated protein) و غیر وابسته به

## References

- [1] Ashrafi M, Bathaie SZ, Abroun S, High Expression of Cyclin D1 and p21 in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Breast Cancer in Wistar Albino Female Rats. *Cell J* 14 (2012) 193-202.
- [2] Ashrafi M, Bathaie SZ, *Investigation on crocin, crocetin and picrocrocetin effects on cell cycle (cyclin D1 and P21 expression) on NMU-induced breast cancer in rat*. Ph.D. thesis, Tehran, Tarbiat Modares University, 2012.
- [3] Alkarain A, Jordan R, Slingerland J, p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9 (2004) 67-80.
- [4] Bellamy CO, p53 and apoptosis. *Br Med Bull* 53 (1997) 522-538.
- [5] Berger CE, Qian Y, Liu G, Chen H, Chen X, p53, a Target of Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$ , Modulates DNA



- Damage-induced Growth Suppression in ER-positive Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* 287 (2012) 30117-30127.
- [6] Boiko AD, Porteous S, Razorenova OV, Krivokrysenko VI, Williams BR, Gudkov AV, A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation. *Genes Dev* 20 (2006) 236-252.
- [7] Chan CH, Lee SW, Wang J, Lin HK, Regulation of Skp2 expression and activity and its role in cancer progression. *Scientific World J* 10 (2010) 1001-1015.
- [8] Chan MM, Lu X, Merchant FM, Iglehart JD, Miron PL, Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis* 26 (2005) 1343-1353.
- [9] Chernov MV, Ramana CV, Adler VV, Stark GR, Stabilization and activation of p53 are regulated independently by different phosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci* 95 (1998) 2284-2289.
- [10] Chiarle R, Pagano M, Inghirami G, The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. *Breast Cancer Res* 3 (2001) 91-94.
- [11] Crist KA, Fuller RD, Chaudhuri B, Chaudhuri P, You M, Brief Communication P53 Accumulation in N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Rat Mammary Tumors. *Toxicol Pathol* 24 (1996) 370-375.
- [12] Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang X-F, Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 92 (1995) 5545-5549.
- [13] Elayat G, Selim AGA, Wells CA, Alterations of the cell cycle regulators cyclin D1, cyclin A, p27, p21, p16, and pRb in apocrine metaplasia of the breast. *Breast J* 15 (2009) 475-482.
- [14] Elledge RM, Allred DC, Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 79-98.
- [15] Fernández-Cuesta L, Anaganti S, Hainaut P, Olivier M, Estrogen levels act as a rheostat on p53 levels and modulate p53-dependent responses in breast cancer cell lines. *Breast cancer Res Treat* 125 (2011) 35-42.
- [16] Filipits M, Rudas M, Heinzl H, Jakesz R, Kubista E, Lax S, Schippinger W, Dietze O, Greil R, Stiglbauer W, Kwasny W, Nader A, Stierer M, Gnant MF, Low p27 expression predicts early relapse and death in postmenopausal hormone receptor-positive breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Clin Cancer Res* 15 (2009) 5888-5894.
- [17] Foster JS, Fernando RI, Ishida N, Nakayama KI, Wimalasena J, Estrogens down-regulate p27Kip1 in breast cancer cells through Skp2 and through nuclear export mediated by the ERK pathway. *J Biol Chem* 278 (2003) 41355-41366.
- [18] Friedenreich CM, Physical activity and breast cancer: review of the epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Recent Results Cancer Res* 188 (2011) 125-139.
- [19] Gulcubuc A, Yesildere T, The association of the carcinogenic effect of N-nitroso-N-methylurea with the blood plasma vitamin E and selenium levels in rats. *Istanbul Univ Vet Fak Derg* 31 (2005) 109-118.
- [20] Hill M, Bausero M, Mazal D, Ménoret S, Khalife J, Anegón I, Osinga E, Immunobiological characterization of N-nitrosomethylurea-induced rat breast carcinomas: tumoral IL-10 expression as a possible immune escape mechanism. *Breast cancer Res Treat* 84 (2004) 107-116.
- [21] Imyanitov EN, Hanson KP. Mechanisms of breast cancer. *Drug Discove Today* 1 (2004) 235-245.
- [22] Kito K, Kihana T, Sugita A, Murao S, Akehi S, Sato M, Tachibana M, Kimura S, Ueda N, Incidence of p53 and Ha-ras gene mutations in chemically induced rat mammary carcinomas. *Mol Carcinog* 17 (1996) 78-83.
- [23] Klopffleisch R, Gruber A, Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Res Vet Sci* 87 (2009) 91-96.
- [24] Klopffleisch R, Schütze M, Gruber A, Loss of p27 expression in canine mammary tumors and their metastases. *Res Vet Sci* 88 (2010) 300-303.
- [25] Kohen R, Neumaier JF, Hamblin MW, Edwards E, Congenitally learned helpless rats show abnormalities in intracellular signaling. *Biol psychiatry* 53 (2003) 520-529.
- [26] Kumar R, Sukumar S, Barbacid M, Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 248 (1990) 1101-1104.
- [27] Martinez-Rivera M, Siddik ZH, Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type

- p53. *Biochem pharmacol* 83 (2012) 1049-1062.
- [28] Minami S, Ohtani-Fujita N, Igata E, Tamaki T, Sakai T, Molecular cloning and characterization of the human p27 Kip1 gene promoter. *FEBS lett* 411 (1997) 1-6.
- [29] Moon KY, N-nitroso-N-methylurea and N-nitroso-N-ethylurea induce upregulation of cellular NF- $\kappa$ B activity through protein kinase C-dependent pathway in human malignant keratinocytes. *Arch Pharm Res* 33 (2010) 133-139.
- [30] Rabiee Hashemi SZ, Rabiee Hashemi S, HER-2, p53 and hormonal receptors protein expression as predictive factors in breast cancer prognosis. *Chin J Clin Oncol* 5 (2008) 413-417.
- [31] Renoir J-M, Marsaud V, Lazennec G, Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochem pharmacol* 85 (2013) 449-465.
- [32] Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y, Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract. *Exp Eye Res* 77 (2003) 51-57.
- [33] Tao L, Kramer PM, Wang W, Yang S, Lubet RA, Steele VE, Pereira MA, Altered expression of c-myc, p16 and p27 in rat colon tumors and its reversal by short-term treatment with chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 23 (2002) 1447-1454.
- [34] Thor AD, Liu S, Moore Li DH, Shi Q, Edgerton SM, p21WAF1/CIP1 expression in breast cancers: associations with p53 and outcome. *Breast cancer Res Treat* 61 (2000) 33-43.
- [35] Yoshida K, Miki Y, The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci* 101 (2010) 831-835.