مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٤١/هفته‌ی اول مهر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۹

بررسی بیان Vascular Endothelial Growth Factor Messenger RNA (VEGF mRNA) و Cytokeratin-19 mRNA (CK19 mRNA) و نشانگر زیستی پروتئینی Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان سینه

حسنا خبره[۱]، عبدالرضا محمدنیا[۲]، مجتبی فلاحتی[۳]، نغمه بهرامی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان سینه، یک بیماری چند عاملی و دارای پتانسیل کشندگی است که علاوه بر ژنتیک، عوامل محیطی زیادی در آن نقش دارند. هدف از انجام این تحقیق، بررسی بیان دو نشانگر زیستی Vascular endothelial growth factor messenger RNA (VEGF mRNA) و Cytokeratin-19 mRNA (CK19 mRNA) و نیز نشانگر زیستی پروتئینی VEGF در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان سینه بود.

روش‌ها: ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه (گروه مورد) با ۴۰ فرد سالم (گروه شاهد) مقایسه شدند. از روش Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) برای تعیین میزان بیان دو نشانگر زیستی CK19 mRNA و VEGF mRNA استفاده شد. همچنین، پروتئین VEGF به روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: مثبت شدن نشانگر VEGF mRNA در گروه مورد در ۳۰ نفر از ۴۰ بیمار مشاهده شد. در گروه شاهد، ۶ نفر از ۴۰ نفر مثبت گزارش گردید. نشانگر CK19 mRNA در گروه مورد در ۲۵ نفر از ۴۰ نفر مثبت گردید و در گروه شاهد، در ۷ نفر از ۴۰ نفر مثبت گزارش شد. همچنین، سطح سرمی VEGF در ۲۷ نفر از افراد گروه مورد مثبت بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، می‌توان نتیجه‌ی این تحقیق در زمینه‌ی نشانگرهای سرطان سینه را به عنوان یک آزمایش تشخیصی غربالگری برای کشف زودرس بیماری در مراحل اولیه در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: سرطان سینه، Cytokeratin-19، Vascular endothelial growth factor، Messenger RNA

ارجاع: خبره حسنا، محمدنیا عبدالرضا، فلاحتی مجتبی، بهرامی نغمه. **بررسی بیان Vascular Endothelial Growth Factor Messenger RNA (VEGF mRNA) و Cytokeratin-19 mRNA (CK19 mRNA) و نشانگر زیستی پروتئینی Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان سینه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۱): ۹۳۹-۹۳۴

مقدمه

سرطان، گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه‌ی آن‌ها، رشد سلولی تنظیم نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی به نقاط دیگر بدن می‌باشد (۱). سرطان سینه، یک بیماری چند عاملی و دارای پتانسیل کشندگی است که علاوه بر ژنتیک، عوامل محیطی زیادی در آن نقش دارند (۲). این سرطان، یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ و میرهای فراوانی در بین زنان می‌شود (۴-۳). مصرف الکل نیز عامل دیگری است که مورد توجه قرار گرفته است (۵).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم سلولی- مولکولی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری و گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه علوم سلولی- مولکولی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات جراحی‌های فک و صورت و مرکز تحقیقات بانک فراورده‌های پیوندی و گروه جراحی فک و صورت، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: نغمه بهرامی
Email: n-bahrami@sina.tums.ac.ir

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

	CK19mRNA	VEGF mRNA	18s rRNA
آغازگر F	TCCGAACCAAGTTTGAGAC	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	GTAACCCGTTGAACCCCATT
طول پرایمر	۱۹	۲۰	۲۰
آغازگر R	AATCCACCTCCACACTGA	ATCTGCATGGTGATGTTGGA	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
طول پرایمر	۱۸	۲۰	۲۰
طول قطعه‌ی تکثیری	۲۲۲	۲۲۶	۱۵۲
(°C) Annealing	۵۸/۴	۶۱/۶	۵۳/۵

VEGF mRNA: Vascular endothelial growth factor messenger RNA; CK19 mRNA: Cytokeratin-19 mRNA; 18s rRNA: 18s ribosomal RNA

بیشترین خطر برآورد شده در زمینه‌ی ابتلا به سرطان سینه، در ارتباط با جهش‌هایی است که در ژن‌های Breast cancer 1 (BCRA1) و BCRA2 رخ داده است (۶). زنان و به میزان کمتر، مردانی که دارای سابقه ی فامیلی ابتلا به سرطان سینه هستند، در خطر بالایی برای ابتلا به سرطان سینه قرار دارند (۸-۷).

نشانگرهای زیستی، مولکول‌های زیستی هستند که در خون یا سایر مایعات بدن و یا بافت وجود دارند و نشانه‌ی یک فرایند طبیعی یا غیر طبیعی و یا یک وضعیت خاص یا بیماری می باشند (۱۲-۹). چالش امروزه در تشخیص سرطان، در ایجاد یک ارتباط دقیق بین نشانگر زیستی و علایم بالینی بیماری و داشتن یک روش تشخیص غیر تهاجمی در مراحل اولیه ی بیماری است (۱۵-۱۳). همچنین، نشانگرهای زیستی جهت پایش پاسخ بیماری به درمان استفاده می‌شوند (۱۸-۱۶). بررسی چندین نشانگر زیستی در کنار هم، می‌تواند نتایج دقیق‌تر و قابل اعتمادتری را جهت تشخیص سرطان‌ها در اختیار کادر درمانی قرارد دهد (۲۱-۱۹). در انواع کارسینوما، تغییرات در بیان سیتوکراتین ها نظیر افزایش رونویسی از این ژن، ممکن است در زمان پیشرفت تومور اتفاق بیفتد (۲۳-۲۲). Cytokeratin-19 (CK19)، مؤثرترین ژن نشانگر PCR برای سرطان پستان است (۲۴). خانواده‌ی Vascular endothelial growth factor (VEGF) شامل مقادیر زیادی از عوامل رشدی است که به طور مستقیم روی سلول‌های اندوتلیال عروقی اثر می‌گذارد و تکثیر و مهاجرت کموتاکسی سلول‌های اندوتلیال را تحریک می‌کند (۲۵).

روش‌ها

۴۰ نفر از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری پس از تشخیص توسط متخصص (گروه مورد) و ۴۰ نفر از افراد سالم پس از معاینه‌ی پزشکی (گروه شاهد)، به طور داوطلبانه در این مطالعه شرکت کردند. تشخیص قطعی بیماری با تأیید پاتولوژیک انجام و بیماران و افراد سالم در این بررسی، در گروه های سنی یکسانی در نظر گرفته شدند. از کلیه‌ی افراد مشارکت کننده در تحقیق، ۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته و به دو قسمت ۸ و ۲ میلی‌لیتری تقسیم شد. سپس، سرم به دست آمده از نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری جهت اندازه‌گیری سطح سرمی VEGF در فریزر ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. قسمت ۸ میلی‌لیتری غیر منعقد نیز بلافاصله وارد مرحله‌ی استخراج RNA شد.

استخراج RNA با استفاده از RNeasy Midi Kit (QIAGEN Cat no.75144) انجام شد. همچنین، ساخت DNA complementary (cDNA) با استفاده از Viva 2-steps RT-PCR Kit (RTPL12. Cat no) انجام شد.

پرایمرهای اختصاصی هر نشانگر، به کمک نرم افزار AlleleID6 طراحی و جهت ساخت، سفارش داده شد. جدول ۱ پارامترها و میزان مورد استفاده‌ی آن‌ها در واکنش نهایی Real-time را نشان می‌دهد.

انجام Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) با استفاده از کیت Cinna Green qPCR Mix (Cat.No:MM2041) و با استفاده از دستگاه BioRad CFX96 C1000 Real-time Thermal cycler انجام گردید. اجزای واکنش Real-time RT-PCR شامل توالی الگو به میزان ۲ میکرولیتر، Master mix به میزان ۴ میکرولیتر، پرایمر ۱ میکرولیتر و آب مقطر دیونیزه به میزانی بود که حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر برسد. دماها و زمان‌های واکنش مطابق دستورالعمل کیت تنظیم گردید (جدول ۲).

جدول ۲. دماها و زمان‌های واکنش

Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

Real-time step	طول مدت	دما (°C)
Initial activation	۵ دقیقه	۹۵
Denaturation	۱۵ ثانیه	۵۹
Annealing	۶۰ ثانیه	۶۰-۵۶
Extension	۲۰ ثانیه	۷۲

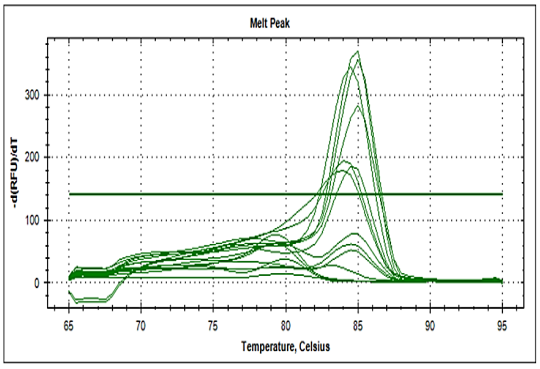
اندازه‌گیری سطح سرمی VEGF به روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) با استفاده از کیت Bioassay Technology Laboratory (Cat No.E0080Hu) انجام شد.

یافته‌ها

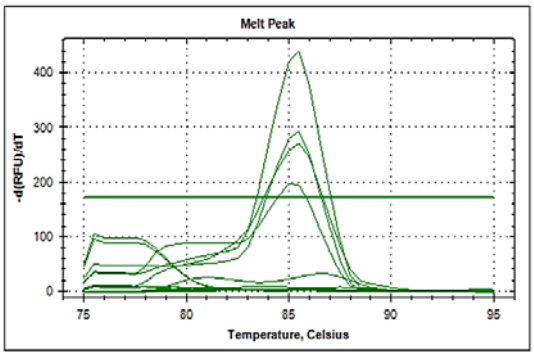
جمعیت مورد مطالعه، شامل دو گروه بیماران (مورد) و افراد سالم (شاهد) بود که در هر گروه، ۴۰ نفر قرار گرفتند. مقایسه‌ی این دو گروه با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. از این رو، می‌توان استدلال کرد که عامل سن در گروه‌های مورد مطالعه، اثر مخدوش کنندگی ندارد (P = ۰/۴۱۶).

نتایج اندازه‌گیری میزان بیان ژن مرجع مطالعه (18s-rRNA یا 18s ribosomal RNA): Cycle threshold value (Ct value) اندازه‌گیری شده، بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در دو گروه بود که تأیید کننده‌ی صحت انتخاب این نشانگر به عنوان ژن مرجع مطالعه می‌باشد (P = ۰/۲۲۸).

آنالیز بیان نشانگرهای مطالعه (Vascular Endothelial growth factor messenger RNA یا VEGF mRNA) و (Cytokeratin-19 mRNA یا CK19 mRNA): جهت آنالیز داده‌ها، پس از پایان هر واکنش، تفسیر نتایج بر اساس منحنی‌های Amplification و منحنی ذوب صورت گرفت. بدین منظور، در انتهای انجام هر نوبت آزمایش، منحنی ذوب مربوط به هر ویال مورد آزمایش بررسی و چنانچه در محدوده‌ی دمایی منطبق بر Amplicon melting temperature نشانگر مورد بررسی قرار داشت، به عنوان جواب مثبت تلقی گردید. پس از تأیید نتایج مثبت، Ct value مربوط به نشانگر یا ژن مرجع مثبت شده ثبت می‌شد تا در مرحله‌ی آنالیز نتایج مورد استفاده قرار گیرد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱. منحنی ذوب حاصل شده از نشانگر Vascular endothelial growth factor messenger RNA (VEGF mRNA)



شکل ۲. منحنی ذوب حاصل از نشانگر Cytokeratin-19 mRNA (CK19 mRNA)

مثبت شدن نشانگر VEGF mRNA در افراد مبتلا به سرطان پستان در ۳۰ نفر از ۴۰ مورد مشاهده شد. بنابراین، حساسیت (Sensitivity) این نشانگر ۷۵ درصد تعیین گردید. در گروه افراد سالم، این میزان ۶ نفر در ۴۰ نفر بود که نشان دهنده‌ی ویژگی (Specificity) برابر ۸۵ درصد می‌باشد. مقایسه‌ی آماری میزان مثبت شدن این نشانگر در گروه‌های مورد و شاهد که با استفاده از آزمون Two-sample binomial انجام شد، بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین این دو گروه بود (P = ۰/۰۳۴). نشانگر CK19 mRNA در گروه مورد در ۲۵ نفر از ۴۰ نفر مثبت گردید که نشان دهنده‌ی حساسیتی برابر ۶۲/۵ درصد و در گروه شاهد این میزان ۷ نفر از ۴۰ نفر بود که نشان دهنده‌ی ویژگی برابر ۸۲/۵ درصد می‌باشد. مقایسه‌ی آماری میزان مثبت شدن این نشانگر در گروه‌های مورد و شاهد که با استفاده از آزمون Two-sample binomial انجام شد، بیانگر تفاوت آماری معنی‌داری بین این دو گروه بود (P = ۰/۰۱۲).

بررسی تفاوت میزان بیان نشانگرها در دو گروه مورد مطالعه: ابتدا Ct value مربوط به نشانگر و ژن مرجع در هر نمونه از نتایج آزمون پیش گفته استخراج و این دو عدد از یکدیگر کسر گردید. از اعداد به دست آمده (که Δ Ct هر نمونه نامیده می‌شوند) میانگین گرفته شد. بدین ترتیب، یک میانگین در هر گروه مشخص شد. این دو عدد از یکدیگر کسر شدند و در نهایت، ΔΔ Ct تحقیق به دست آمد. عدد ۲ به توان ΔΔ Ct- رسید و میزان تفاوت بیان نشانگر مشخص گردید.

ΔΔ Ct- برای VEGF-mRNA عدد ۲/۶۱- محاسبه شد. حال، اگر عدد ۲ به توان ΔΔ Ct- برسد، میزان تفاوت بیان نشانگر مشخص می‌گردد. تعداد نسخه‌های اولیه‌ی این نشانگر در گروه مورد به طور متوسط ۶/۲ برابر گروه شاهد بود. ΔΔ Ct برای CK19 mRNA عدد ۶/۶۲- محاسبه شد که از نظر ریاضی، نشان می‌دهد تعداد نسخه‌های اولیه‌ی این نشانگر در گروه مورد به طور متوسط ۹/۴۸ برابر گروه شاهد بوده است.

نتایج روش ELISA سطح سرمی پروتئین VEGF با تکنیک ELISA محاسبه شد. میانگین سطح سرمی این نشانگر زیستی، در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد بود. بیان این نشانگر زیستی در ۲۷ نفر از ۴۰ بیمار گروه مورد گزارش شد که بیانگر حساسیت ۶۷/۵ درصد و در گروه شاهد، در ۵ نفر از ۴۰ نفر مثبت گزارش شد. در نهایت، مقایسه‌ی آماری میزان مثبت شدن این نشانگر زیستی در دو گروه با استفاده از آزمون Two-sample binomial صورت گرفت که نشان دهنده‌ی تفاوت آماری معنی‌دار بین این دو گروه مورد مطالعه بود ($P < ۰/۰۰۱$).

بحث

سرطان یک بیماری پیچیده‌ی چند عاملی است که پس از بیماری‌های قلبی- عروقی، سوانح و حوادث، سومین عامل مرگ و میر در ایران است (۲۶). سرطان، گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه‌ی آن‌ها، رشد سلولی تنظیم نشده و تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی به نقاط دیگر بدن می باشد (۱). زنان و به میزان کمتر مردانی که دارای سابقه ی فامیلی ابتلا به سرطان سینه هستند، در خطر بالایی برای ابتلا به سرطان سینه قرار دارند (۸-۷).

نشانگرهای زیستی تشخیصی و پیش‌آگهی دهنده (غربالگری) به انکولوژیست در اولین مواجهه با بیمار مشکوک به سرطان کمک می کند (۲۸-۲۷). بنابراین، نشانگرهای زیستی به عنوان یک عامل قابل ارزیابی و اندازه‌گیری محسوب می‌شوند (۲۹). مطالعه‌ای روی بیان ژن‌های Mucin1 (MUC1) و VEGF و تأثیر داروی Gefitinib در میزان بقا و بیان ژن ها انجام شد. نتایج این مطالعه، نشان داد که سطح mRNA ژن های MUC1 و VEGF قبل از شروع درمان و ۴ هفته پس از درمان در بیماران بالا بود (۳۰).

در مطالعه‌ی حاضر نیز سطح بیان نشانگرهای VEGF mRNA و CK19 mRNA در بیماران بیشتر از افراد سالم بود. Cesario و همکاران، در مطالعه‌ی مشابهی به مقایسه‌ی VEGF بافتی و سرمی پرداختند. در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین میزان VEGF تمام گروه‌های سرطان وجود داشت (۳۱). در مطالعه‌ی حاضر نیز ارتباط معنی داری در بین دو گروه بیماران و افراد سالم مشاهده شد. در بررسی انجام شده توسط Yan و همکاران، KS1/4، CK19 و LUNX در بیماران Non-small cell lung cancer (NSCLC) بیان بالاتری نسبت به افراد با بیماری غیر بدخیم ریوی داشتند ($P < ۰/۰۵۰$) (۳۲).

Wang و همکاران، بیان دو نشانگر CK19 mRNA و LUNX-mRNA را بر روی نمونه‌ی بافت و گره‌ی لنفی بیماران NSCLC در مقایسه با افراد سالم بررسی و مشاهده نمودند که بیان هر دو نشانگر در بیماران NSCLC به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه‌های بیماران خوش‌خیم ریوی بود ($P < ۰/۰۵۰$) (۳۳). در مطالعه‌ی دیگری توسط Kutun و همکاران، بیان CK19 mRNA و Carcinoembryonic antigen-mRNA (CEA-mRAN) در بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی شد. در این مطالعه، بیان این دو نشانگر زیستی در بیماران سرطان معده نقش پیش‌آگهی دهنده‌ی قوی در تشخیص Major vascular invasion (MVI) داشت (۱۷).

در مجموع، می‌توان نتیجه‌ی این مطالعه را که در زمینه‌ی نشانگرهای سرطان سینه است، معرفی اولیه‌ی یک روش تشخیصی- غربالگری برای کشف زودرس بیماری در مراحل اولیه دانست. برای اثبات بیشتر نتایج تحقیق، توصیه می‌شود مطالعات گسترده‌تری با حجم نمونه‌ی وسیع‌تر صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استادان محترم دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی و همچنین، از تمامی همکاران و بیماران شرکت کننده در پژوهش قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Kagami S, Saeki H, Idezuki T, Yano S, Kawabata Y, Okochi H, et al. Epithelioid sarcoma associated with lung adenocarcinoma. J Dermatol 2005; 32(11): 904-8.
2. American Cancer Society. A Cancer Source Book for Nurses. 8th ed. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Learning; 2004.
3. Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, Rosario I, Gray GE. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. Br J Cancer 1981; 43(1): 72-6.
4. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. JAMA 2000; 283(4): 485-91.
5. Wynder EL, Rose DP, Cohen LA. Diet and breast cancer in causation and therapy. Cancer 1986; 58(8 Suppl): 1804-13.
6. Stevens RG. Electric power use and breast cancer: a hypothesis. Am J Epidemiol 1987; 125(4): 556-61.
7. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 2000; 321(7261): 624-8.
8. Stratton MR, Ford D, Neuhasen S, Seal S, Wooster R, Friedman LS, et al. Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. Nat Genet 1994; 7(1): 103-7.
9. Benlloch S, Galbis J, Peiro F, Alenda C, Rodriguez-Paniagua J, Sanchez-Paya J, et al. Role of CEA,

PLUNC and CK19 mRNA expression in lymph nodes from resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) as markers of occult micrometastasis. A pilot study. J Clin Oncol 2005; 23(16Suppl): 9654.
10. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. Nat Rev Cancer 2011; 11(8): 597-608.
11. Karimi S, Mohamadnia A, Nadji SA, Yadegarazari R, Khosravi A, Bahrami N, et al. Expression of two basic mRNA biomarkers in peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer detected by real-time rt-PCR, individually and simultaneously. Iran Biomed J 2015; 19(1): 17-22.
12. Jamaati H, Bahrami N, Abniki M, Tabarsi P, Farzanegan B, Doroudinia A, et al. Real-time RT-PCR detection of HCN4 and ADAM8 genes in ventilator-associated pneumonia patients Hospitalized in intensive care unit. Journal of Cellular and Molecular Anesthesia 2016; 1(4): 163-7.
13. Tollefsbol T. Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics. San Diego, CA: Academic Press; 2010.
14. Mohamadnia A, Karimi S, Yadegar Azari R, Naji S A, Khosravi A, Bahrami N et al . Expression of CK19 gene in patients with lung cancer and its comparison with carcinoembryonic antigen in peripheral blood. Payavard Salamat 2016; 9(5): 459-68. [In Persian].
15. Moshref Behzad N, Bahrami N, Farzanegan B, Fathi M, Zareh Karizi S, Mohamadnia A. Expression of CK19-mRNA and CEA-mRNA biomarkers in pleural fluid of patients with non-small cell lung cancer. Minerva Pneumol 2017; 56(2): 78-83.
16. Benedikova A, Srovnal J, Szkorupa M, Skalicky P, Chudacek J, Bohanes T, et al. Biomarkers in the detection of minimal systemic dissemination in lung cancer patients. Rozhl Chir 2012; 91(4): 209-15. [In Czech].
17. Kutun S, Celik A, Cem KM, Erkorkmaz U, Eroglu A, Cetin A, et al. Expression of CK-19 and CEA mRNA in peripheral blood of gastric cancer patients. Exp Oncol 2010; 32(4): 263-8.
18. Karimi S, Bahrami N, Sharifi K, Daustany M, Baghbani-Arani F, Kazempour M, et al. Investigating gene expression level of MUC1 and CEA in pleural fluid of NSCLC lung cancer patients with real-time RT-PCR method. Minerva Pneumol 2017; 56(1): 18-24.
19. Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, et al. Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. Clin Chem 2002; 48(8): 1225-31.
20. Bahrami N, Gholami M, Jamaati HR, Mohamadnia A, Dargahi H, Kazempour Dizaji M, et al. Expression of two essential mRNA biomarker in the peripheral blood as possible biomarkers for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. Minerva Pneumol 2016; 55(3):31-6.
21. Ghadimi K, Bahrami N, Fathi M, Farzanegan B, Naji T, Emami M, et al. Diagnostic value of LunX mRNA and CEA mRNA expression in pleural fluid of patients with non-small cell lung cancer. Minerva Pneumol 2017; 56(2): 90-5.
22. Alvero AB, Burtness BA, Ercan AG, Sapi E. Improved method for the detection of cytokeratin 19-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients. Lab Invest 2004; 84(5): 658-61.
23. Bilchik A, Miyashiro M, Kelley M, Kuo C, Fujiwara Y, Nakamori S, et al. Molecular detection of metastatic pancreatic carcinoma cells using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. Cancer 2000; 88(5): 1037-44.
24. Andergassen U, Kolbl AC, Hutter S, Friese K, Jeschke U. Detection of circulating tumour cells from blood of breast cancer patients via RT-qPCR. Cancers (Basel) 2013; 5(4): 1212-20.
25. Luo M, Hou L, Li J, Shao S, Huang S, Meng D, et al. VEGF/NRP-1axis promotes progression of breast cancer via enhancement of epithelial-mesenchymal transition and activation of NF-kappaB and beta-catenin. Cancer Lett 2016; 373(1): 1-11.
26. Akbari A, Razzaghi Z, Homaee F, Khayamzadeh M, Movahedi M, Akbari ME. Parity and breastfeeding are preventive measures against breast cancer in Iranian women. Breast Cancer 2011; 18(1): 51-5.
27. Bhatt AN, Mathur R, Farooque A, Verma A, Dwarakanath BS. Cancer biomarkers - current perspectives. Indian J Med Res 2010; 132: 129-49.
28. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet 2002; 3(6): 415-28.
29. Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. Cell Cycle 2007; 6(12): 1455-9.
30. Li J, Hu YM, Du YJ, Zhu LR, Qian H, Wu Y, et al. Expressions of MUC1 and vascular endothelial growth factor mRNA in blood are biomarkers for predicting efficacy of gefitinib treatment in non-small cell lung cancer. BMC Cancer 2014; 14: 848.
31. Cesario A, Ferri L, Galetta D, Cardaci V, Biscione G, Pasqua F, et al. Pre-operative pulmonary rehabilitation and surgery for lung cancer. Lung Cancer 2007; 57(1): 118-9.
32. Yan L, Yao Y, Wang LH, Wang ML, Fu XH. Detection of CK19, LUNX, and KS1/4 mRNA expression in the peripheral blood for diagnosis of micrometastases in patients with non-small cell lung cancer and their clinical implications. Genet Mol Res 2015; 14(4): 15090-5.
33. Wang WB, Cui YG, Yao SY. Message RNA expression of LUNX, CK19 and CEA genes in NSCLC with micrometastasis in lymph nodes. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2008; 30(2): 121-4. [In Chinese].

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 35, No. 441, 1st Week, October 2017

Received: 10.06.2017

Accepted: 19.06.2017

Detection of Vascular Endothelial Growth Factor Messenger RNA (VEGF mRNA), Cytokeratin-19 mRNA (CK19 mRNA), and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Protein Biomarker in the Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer

Hosna Khebreh[1], Abdolreza Mohamadnia[2], Mojtaba Falahati[3], Naghmeh Bahrami[4]

Original Article

Abstract

Background: Breast cancer is a multifactorial potentially lethal disease that is triggered by genetic factors as well as numerous environmental factors. The present research aimed to examine the expression of Vascular endothelial growth factor messenger RNA (VEGF mRNA), cytokeratin-19 mRNA (CK19 mRNA), and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein biomarker in the peripheral blood of patients with breast cancer.

Methods: 40 patients with breast cancer were compared to 40 healthy individuals. The real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) method was used to determine the expressions of the CK19 mRNA and VEGF mRNA biomarkers in the peripheral blood samples of the healthy participants and the patients. The VEGF protein was also compared using the (ELISA) method.

Findings: The positive VEGF mRNA biomarker was observed in 30 of the 40 patients with breast cancer; thus the sensitivity of this marker was 75%. In the healthy participants group, 6 of the 40 participants showed a positive VEGF mRNA biomarker expression. The CK19 mRNA marker was positive in 25 of the 40 patients, which indicated a sensitivity of 62.5%. In the healthy participants group, the positive expression of the CK19 mRNA biomarker was observed in 7 of the 40 participants. VEGF was positive in 27 of the 40 patients. In the control group, 5 of the 40 participants showed the positive expression of this biomarker.

Conclusion: In sum, based on the results of this research, the assessed breast cancer tumor markers can be used as screening tests for the early diagnosis of patients. To further prove the findings of this study, more extensive studies with larger sample sizes are recommended.

Keywords: Breast cancer, Cytokeratin-19, Vascular endothelial growth factor, Messenger RNA

Citation: Khebreh H, Mohamadnia A, Falahati M, Bahrami N. **Detection of Vascular Endothelial Growth Factor Messenger RNA (VEGF mRNA), Cytokeratin-19 mRNA (CK19 mRNA), and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Protein Biomarker in the Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(441): 934-9.

1- MSc Student, Department of Molecular and Cellular Sciences, School of Advance Sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Virology Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Masih Daneshvari Hospital AND Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Molecular and Cellular Sciences, School of Advance Sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4 -Assistant Professor, Craniomaxillofacial Research center AND Iranian Tissue Bank Research Center AND Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Naghmeh Bahrami, Email: n-bahrami@sina.tums.ac.ir