

## ***Relationship between P16 Expression and Breast Cancer Using Histology and Immunohistochemistry***

Rahim Golmohammadi<sup>1</sup>,  
Hossein Elyasi<sup>2</sup>,  
Motahaerh Golmohammadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

<sup>3</sup> BA Student in English Language and Literature, Faculty of Literature and Humanities, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

(Received November 6, 2016, Accepted April 10, 2017)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Studying the expression of P16 gene which is a tumor suppressor in breast cancer is beneficial for clinical and pathological studies. The purpose of this study was to determine the expression of P16 gene in breast cancer samples using histological and immunohistochemical analyses.

**Materials and methods:** This descriptive analytical research was conducted in 100 breast cancer samples obtained from Eemdad Shhid Beheshti Hospital in Sabzevar, Iran. The samples were fixed in formalin and sections were processed, then, the slides were stained. The diagnosis was made by two pathologists. Data analysis was done in SPSS V16 using Chi- square test.

**Results:** A total of 100 specimens was studied in which the overexpression of P16 gene was detected in 82 (82%), while in 18 (18%) malignant samples no overexpression was found. Overexpression of the gene was not found in normal samples too. There were significant relationships between high grade tumors and stage of tumors with overexpression of P16 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.46$ , respectively).

**Conclusion:** In current study, the P16 overexpression was observed more in patients with high grade tumors. Therefore, the overexpression of this gene indicates a poor prognosis in breast cancer.

**Keywords:** breast cancer, P16 expression, immunohistochemistry, histochemistry

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(149):181-186 (Persian).

## بررسی ارتباط بیان ژن P16 با سرطان پستان به دو روش هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی

رحیم گل محمدی<sup>۱</sup>

حسین الیاسی<sup>۲</sup>

مطهره گل محمدی<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** بررسی بیان ژن P16 که یک مهار کننده تومور است، از نظر بالینی و آسیب‌شناسی در سرطان پستان اهمیت دارد. هدف از این مطالعه، تعیین میزان بیان ژن P16 با شاخص‌های بافتی و پاتولوژی با دو روش هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه توصیفی تحلیلی بر روی تعداد ۱۰۰ نمونه سرطانی پستان که به بیمارستان امداد شهید بهشتی شهر سبزوار مراجعه کرده بودند، انجام شد. بعد از ثابت کردن نمونه‌ها در فرمالین، پاساژ بافتی، مقطع‌گیری و رنگ آمیزی انجام شد. تشخیص آسیب‌شناسی توسط دو پاتولوژیست انجام گرفت. داده‌ها با نرم افزار SPSS16 با آزمون کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** از تعداد ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۸۲ نمونه بدخیمی (۸۲ درصد) با بیان بالای ژن P16 همراه بود. ۱۸ مورد (۱۸ درصد) از نمونه‌های بدخیمی فاقد بیان ژن P16 بود. در نمونه‌های غیرسرطانی (نمونه‌های سالم) بیان بالای ژن P16 مشاهده نشد. بین بیان بالای ژن P16 با گرید بالایی تومور ارتباط معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/001$ ) هم‌چنین بین مرحله ی (Stage) تومور و بیان ژن P16 ارتباط معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/46$ ).

**استنتاج:** در مطالعه حاضر، بیان ژن P16 در بیمارانی که در گرید بالای بافتی قرار داشتند، بیش‌تر مشاهده شده است، بنابراین بیان بالای ژن P16 را در نمونه‌های سرطانی می‌توان نشانه‌ای از پیش‌آگهی بد قلمداد نمود.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، بیان ژن P16، ایمونوهیستوشیمی، هیستوشیمی

### مقدمه

روند کاهشی را نشان می‌دهد (۲). میزان شیوع سرطان پستان به طور متوسط ۲۲/۶ در ۱۰۰۰۰۰ زن در ایران می‌باشد (۳). ژن‌هایی که در سرطان پستان فعال می‌شوند در دو دسته مهار کننده و یا تسریع کننده تومور قرار

سرطان پستان دومین سرطان کشنده در خانم‌ها محسوب می‌شود. در آسیا میزان بروز این بدخیمی در سال‌های اخیر روند افزایشی را نشان می‌دهد (۱). در ضمن میانگین سن ابتلا به سرطان پستان در ایران نیز

E-mail: Rahimgolmohammadi@Yahoo.com

**مؤلف مسئول:** رحیم گل محمدی - سبزوار، مجتمع پردیس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

۱. دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۲. استادیار گروه میکوبیولوژی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی. رشته زبان و ادبیات انگلیسی دانشکده ادبیات و علوم انسانی دانشگاه حکیم سبزواری، ایران

© تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۸/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۲۱

نمونه‌ها از میکروویو و بافرسیترات با درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. برای مهار فعالیت اندوژناز، پراکسیداز به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۳ درصد آب اکسیژنه قرار داده شد و مجدداً ۳ بار با بافر فسفات سالین، لام‌ها شستشو داده شدند (۱۳، ۱۴). با آنتی‌بادی اولیه (Primary Specific rabbit P16 antibody monocholonal) و نونوکلونال P16 antibody (Novocastra) روی لام با غلظت ۵۰/۱ ها چکانده شد و سه بار با بافر فسفات سالین (PBS) شستشو داده شد. سپس از آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. از استرپتوآویدین متصل به HRP که قادر است دی‌آمینوبنزییدین (DAB) را اکسید کند، برای رنگ آمیزی سلول‌ها استفاده شد (۱۵، ۱۶). بر اساس میزان رنگ پذیری، اسلایدهای مثبت به درجات (Scor) ۱، ۲ و ۳ تقسیم بندی شدند. شیوه درجه بندی آن‌ها به ترتیب زیر می باشد: اسلایدهایی که بین یک تا ۲۵ درصد رنگ گرفته بودند درجه ۱، بین ۲۵ تا ۷۵ درصد درجه ۲ اسلایدهایی که بیش از ۷۵ درصد سلول‌ها رنگ قهوه‌ای گرفته بودند، درجه ۳ تقسیم بندی شدند (۱۷). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16. با اطمینان ۹۵ درصد و سطح معنی دار کم‌تر از ۵ درصد با استفاده از آزمون‌های کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

## یافته‌ها و بحث

تعداد ۸۲ نمونه (۸۲ درصد) بدخیمی با بیان بالای ژن P16 همراه بود. ۱۸ مورد (۱۸ درصد) از نمونه‌های بدخیمی فاقد بیان ژن P16 بود و تمام نمونه‌های غیرسرطانی (نمونه‌های سالم) بیان بالای ژن P16 مشاهده نشد. بین بیان بالای ژن P16 با مرحله (Stage) تومور، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ( $p < 0/046$ )، به طوری که از تعداد ۸۲ نمونه مثبت که بیان بالای ژن P16 داشتند، ۲۱ مورد در مرحله صفر، ۳۸ مورد در مرحله یک، ۱۳ نمونه در مرحله ۲، ۶ نمونه در مرحله ۳ بیماری و ۴ نمونه در مرحله چهار بیماری قرار داشتند.

می‌گیرند (۴، ۵). یکی از ژن‌هایی که مطالعات جدید بر روی آن متمرکز شده است، ژن p16 می باشد. این ژن بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 9p21 انسان قرار دارد. محصول این ژن پروتئین P16 است که نقش مهار کننده‌گی در تومورهای بدخیم را دارد (۶). گزارشات جدید نشان می‌دهد که عدم بیان ژن p16 با کاهش رسپتورهای استروژنی و مقاومت درمانی در سرطان پستان همراه است (۷). بالعکس بعضی مطالعات جدید در سال ۲۰۱۵ نشان می‌دهد که بیان بالای ژن P16 با سرطان پستان همراه است (۸). بنابراین در مورد نقش بیان ژن P16 در سرطان پستان اطلاعات ضد و نقیضی گزارش شده است که مطالعات بیش تری را در این حوزه می‌طلبد (۹). از طرفی مشخص نیست که بین مرحله (Stage) یا درجه (Grade) یعنی تمایز تومور با بیان بالای ژن p16 ارتباطی وجود دارد یا خیر؟ (۱۰، ۱۱). با توجه به اهمیت بالینی و تشخیص زود هنگام سرطان پستان با استفاده از نشانگرهای جدید که بتوانند در فرآیند بیماری کمک کنند، این مطالعه طراحی شد تا بیان ژن p16 در سرطان پستان با شاخص‌های هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی تحلیلی بر روی ۱۰۰ نمونه سرطان پستان که به بیمارستان امداد شهید بهشتی شهر سبزوار مراجعه کرده بودند، انجام شد. بعد از ثابت کردن نمونه‌ها در فرمالین، پاساژ بافتی و مقطع گیری انجام شد و نمونه‌ها رنگ آمیزی شدند (۱۲، ۱۳). تشخیص آسیب شناسی توسط دو پاتولوژیست انجام گرفت.

گرید بافتی بر اساس میتوز، پلی مورفیسم و وجود یاعدم وجود غدد در نمونه‌ها به گرید ۱ تا ۳ تقسیم بندی شدند (۱۰). بیان ژن P16 به ترتیب ذیل در نمونه‌ها انجام شد:

مراحل انجام کار ایمونوهیستوشیمی به شرح زیر است: برای ماسک‌زدایی محل شاخص‌های آنتی‌ژنی ک

بدین معنی که بدخیمی‌هایی که در گرید بالاتر قرار داشتند، تجمع سیتوپلاسمی پروتئین P16 که ناشی از افزایش بیان بالای این ژن در آن‌ها بود، افزایش را نشان داد ( $p < 0/001$ ).

مطالعه حاضر نشان داد که افزایش تجمع سیتوپلاسم پروتئین P16 که ناشی از افزایش بیان بالای ژن P16 در سرطان پستان است، با گرید بالای هیستولوژی همراه است. این احتمال داده می‌شود که این افزایش بیان، با بدخیمی و تسریع تومور در سرطان پستان همراه باشد.

مطالعه Shan و همکارانش نشان می‌دهد که اختلال عملکردی P53 با افزایش بیان P16، موجب پیشرفت تومور مجرای غیر مهاجم در جا (non-DCIS) به تومور مهاجم (invasive ductal carcinoma in situ) می‌شود (۱۷). این گزارش با مطالعه حاضر همخوانی دارد. مطالعه Schwarz و همکارانش در مورد بیان ژن P16 در سرطان گردن رحم در بیمارانی انجام شد که سه ماه تحت درمان رادیو-تراپی FDG-PET (Fluorodeoxyglucose positron emission tomography) قرار داشتند. پس از دوره درمان، بیمارانی که سرطان گردن رحم با بیان P16 همراه بود، شرایط بهتر نسبت به بیمارانی داشتند که در تومور ژن P16 بیان نشده بود (۱۸). این گزارش با مطالعه حاضر تفاوت دارد، این تفاوت در بیان ژن P16 احتمالاً می‌تواند مربوط به دو موقعیت مکانی (پستان و گردن رحم) در دو مطالعه باشد.

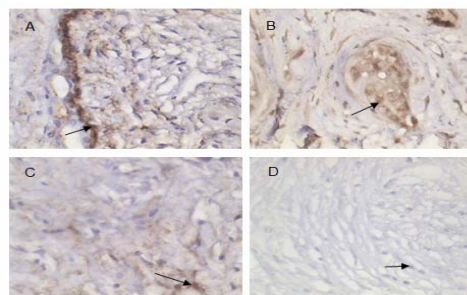
گزارش‌های دیگر نشان می‌دهد که یکی از دلایل عدم موفقیت در درمان بیمارانی مبتلا به سرطان پستان، تبدیل سریع تومورهای اولیه بدخیم به تومورهای مهاجم و متاستاتیک است و کلید این فرآیند هم ناشی از رگ زایی در تومورهای بدخیم و مهاجم می‌باشد که از طریق بیان فاکتورهای رشد اندوتلیال (vascular VEGF) endothelial growth factor این عمل انجام می‌شود و

بیمارانی که در مرحله پیشرفته بیماری (مرحله ی ۴) قرار داشتند، بیان ژن P16 در تمام نمونه‌ها مثبت بود. هم چنین بین بیان بالای ژن P16 با گرید تومور ارتباط معنی‌داری وجود داشت ( $p < 0/001$ ) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی درجه تمایز تومور (گرید) با بیان ژن P16 در سلول‌های سرطانی بافت پستان

گرید	P16	
	مثبت فراوانی (درصد)	منفی فراوانی (درصد)
گرید ۱	۶ (۶)	۱۱ (۱۱)
گرید ۲	۴۵ (۴۵)	۷ (۷)
گرید ۳	۳۱ (۳۱)	۰ (۰)
تعداد کل	۸۲ (۸۲)	۱۸ (۱۸)

بدین ترتیب نمونه‌هایی که گرید ۳ بودند، با بیان بالای ژن P16 همراه بودند، به طوری که در رنگ آمیزی اختصاصی (ایمونوهیستوشیمی) تجمع سیتوپلاسمی بیان ژن P16 در آن‌ها بیش‌تر بود که این تجمع در سلول‌ها رنگ قهوه‌ای را نشان دادند. در بافت‌های غیر سرطانی (نمونه‌های سالم)، سلول‌های زمینه و مجرای غده پستان در رنگ آمیزی اختصاصی بیان بالای ژن P16 مشاهده نشد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: مقاطع عرضی ۵ میکرونی از بافت غده پستان: A- پیکان سلول‌های بدخیم با رنگ پذیری قهوه‌ای ۳+ را نشان می‌دهد. B- سلول‌ها رنگ پذیری ۲+ می‌باشند. C- ۱+ بیان ژن P16 را نشان می‌دهد. D- عدم رنگ پذیری را در سلول‌های سالم بافت پستان نشان می‌دهد. رنگ آمیزی اختصاصی ایمونوهیستوشیمی (بزرگ نمایی ۴۰۰×)

بین بیان بالای ژن P16 و افزایش گرید تومور در بافت بدخیم غده پستان ارتباط معنی‌داری وجود دارد،

اهمیت بیش تری دارد، چون یکی از فاکتورهای که در فرآیند تسریع تومور نقش دارد، دسترسی بافت مهاجم به تغذیه ی خونی است که این محصول (پروتئین P16) این شرایط را فراهم می کند. در گزارش دیگر که در سال ۲۰۱۶ منتشر شده است، بین بیان بالای ژن P16 و p14، برگشت بیماری و پیش آگهی بد بیماری ارتباط وجود دارد (۲۲). بررسی بیان ژن P16 برای پیش آگهی بهتر از بافت های مشکوک غده پستان در فرآیند درمانی و پیش آگهی بهتر بیماری می تواند کمک کننده باشد.

### سپاسگزاری

با تقدیر و تشکر از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار به خاطر تصویب و تامین هزینه های طرح، هم چنین از پاتولوژیست های محترم آقایان دکتر محمد رضا مهاجری و فرشاد معروضی. کارشناس های آزمایشگاه خانم هالندران و محمودی به خاطر انجام بخشی از کارهای بافت شناسی تشکر می شود.

بیان می شود که بین رنگ زایی و بیان ژن P16 ارتباطی وجود دارد که نیاز به مطالعه بیش تر است (۱۹).

در مطالعه حاضر، ۸۲ درصد از تومورهای بدخیمی با بیان ژن و ۱۸ درصد فاقد بیان ژن P16 بودند و بین مرحله ی (Stage) تومور و بیان بالای ژن P16 ارتباط معنی دار آماری وجود داشت. در گزارشی دیگر نشان داده است که بین بیان بالای ژن P16 و هیپرپلازی در سرطان پستان ارتباط وجود دارد (۲۰).

هم چنین در مطالعه که در سال ۲۰۱۵ توسط Siddiqui و Vohra انجام شده است، بیان ژن P16 در نمونه های بدخیم غده پستان که در مرحله بالای بیماری قرار دارند، بیش تر است (۲۱). این گزارش با مطالعه حاضر همخوانی دارد، در مطالعه حاضر تمام نمونه هایی که در مرحله ی بالای بیماری (High stage) قرار داشتند، از نظر بیان ژن P16 مثبت بودند. این احتمال داده می شود که علی رغم این که ژن P16 جزء خانواده مهارکننده های تومور می باشد، ولی بیان این ژن از طریق فعال کردن ژن های دیگر که در رنگ زایی نقش دارند،

### References

- Lam WW, Fielding R, Ho EY. Predicting psychological morbidity in Chinese women after surgery for breast carcinoma. *Cancer*. 2005; 103(3):637-646.
- Golmohammadi R, Pejhan A. The prognostic value of the P53 protein and the Ki67 marker in breast cancer patients. *J Pak Med Assoc*. 2012; 62(9):871-875.
- Jazayeri SB, Saadat S, Ramezani R, Kaviani A. Incidence of primary breast cancer in Iran: Ten-year national cancer registry data report. *Cancer Epidemiol*. 2015;39(4):519-527.
- Golmohammadi R, Namazi MJ, Nikbakht M, Salehi M, Derakhshan MH. Gut Liver. Characterization and Prognostic Value of Mutations in Exons 5 and 6 of the p53 Gene in Patients with Colorectal Cancers in Central Iran. *Gut Liver*. 2013;7(3): 295-302.
- Dastjerdi MN, Salahshoor MR, Mardani M, Rabbani M, Hashemibeni B, Gharagozloo M, et al. The apoptotic effects of sirtuin1 inhibitor on the MCF-7 and MRC-5 cell lines. *Res Pharm Sci*. 2013;8(2):79-89.
- Zhang YB, Lu HX, Zhang XR, Qin LJ, Dong GL, Sun N, et al. The Methylation of p16 Gene Promoter in Carcinogenesis and Development of Breast Cancer. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2015;46(3):409-412.
- Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, et al. Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-

- negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2012; 130(11): 2568-2579.
8. Chen C, Huang Y, Zhang C, Liu T, Zheng HE, Wan S, et al. Circulating antibodies to p16 protein-derived peptides in breast cancer. *Mol Clin Oncol* 2015;3(3):591-594.
  9. Chae SW, Sohn JH, Kim DH, Choi YJ, Park YL, Kim K, et al. Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications. *Yonsei Med J*. 2011;52(3):445-453.
  10. Kumar V, Cortan R, Robbins S. *Robbins Basic Pathology*. 8<sup>th</sup> ed, Philadelphia: Saunders Elsevier. 2007
  11. Luu TH, Michel C, Bard JM, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon Ch. Intestinal Proportion of Blautia sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognostic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Nutrition and Cancer* . 2017;69(2):267-275.
  12. Golmohammadi R, Sabaghzadeh F, Mojadadi MS .Effect of hydroalcoholic extract of Anethum graveolens leaves on the dentate gyrus of the hippocampus in the epileptic mice: a histopathological and immunohistochemical study. *Res Pharm Sci*. 2016; 11(3):227-232
  13. Golmohammadi R, Kamalimanesh B. Protective Effect of Ascorbic Acid on Histology of Purkinje Neurons of Cerebellum in Pentylentetrazol-induced Epileptic Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci*; 2015;25(123)45-53.
  14. Golmohammadi R, Namazi MJ, Relationship between Allelic Polymorphism Codon V57I of AURKA Gene and Breast Cancer. *Mazandaran Univ Med Sci* ; 2016; 26(135):43-50.
  15. Gown AM1, Willingham MC. Willingham .Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50(4): 449-454
  16. Sinn HP, Magener A, Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, et al. Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation. *Br J Cancer*. 1998; 78(12): 1661-1668.
  17. Shan M, Zhang X, Liu X, Qin Y, Liu T, Liu Y, et al . P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer. *PLoS One* 2013 ; 11;8(10):e76408.
  18. Schwarz JK, Lewis JS Jr, Pfeifer J, Huettner P, Grigsby P. Prognostic significance of p16 expression in advanced cervical cancer treated with definitive radiotherapy .*Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 84(1):153-157.
  19. Zhang J, Lu A, Beech D, Jiang B, Lu Y. Suppression of breast cancer metastasis through the inhibition of VEGF-mediated tumor angiogenesis. *Cancer Ther*. 2007; 5: 273-286.
  20. Radisky DC, Santisteban M, Berman HK, Gauthier ML, Frost MH, Reynolds CA, et al. p16(INK4a) expression and breast cancer risk in women with atypical hyperplasia. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011; 4(12):1953-1960.
  21. Vohra LM, Siddiqui T . Metaplastic Breast Cancer and p16 Positivity: What Does It Mean?. *J Carcinog Mutagen* 2015 6(6): 244.
  22. Pare R, Shin JS , Lee CS .Increased expression of senescence markers p14(ARF) and p16(INK4a) in breast cancer is associated with an increased risk of disease recurrence and poor survival outcome. *Histopathology*. 2016; 69(3): 479-491.