

ESR1 Could be a Novel Target of miR-15a-3p and lncRNA OIP5-AS1 in the Breast Cancer Patients, Regulating by rs2234693 Polymorphism: Integrated Bioinformatics and Experimental Approach

Pardis Mirzaeyan¹
 Mohammad Shokrzadeh^{2,3}
 Ali Salehzadeh⁴
 Farzam Ajamian⁵

¹ PhD Student in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
² Professor, Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
³ Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
⁴ Associate Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
⁵ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received December 27, 2023; Accepted February 12, 2024)

Abstract

Background and purpose: after heart diseases and accidents, cancer is considered the third cause of death in Iran (1), and is a major health problem not only in Iran but also in many developed and developing countries. (2). Breast cancer is a disease in which breast cells grow out of control. This disease has different types based on the type of breast cells that become cancerous. Breast cancer accounts for about one-third of all types of cancer in the female population and is the main cause of cancer-related deaths in women worldwide (3). Estrogen receptor- α is one of the isoforms of estrogen receptor encoded by the ESR1 gene. ESR- α is a nuclear receptor that acts as a ligand-dependent transcription factor (4). After binding of estrogen, ESR- α binds to the estrogen response regions in the promoter of the target genes and causes changes in the expression of the target genes (5). The present study investigates the expression level of the estrogen receptor gene (ESR1) and long non-coding RNAs (lncRNAs) related to It investigates the allele frequency and genotype of single nucleotide polymorphism (SNP) rs2234693 in ESR1 gene in patients with breast cancer.

Materials and methods: In this case-control study, the expression of ESR1 and related coding and non-coding RNAs were investigated by microarray (17 control samples and 104 patient samples), TCGA RNAseq (on 113 normal samples, 1102 primary tumors and seven Metastatic tumor samples) and data analysis was done by R Studio and limma, and ENCORI and GEPIA2 databases. Evaluation of microRNA interaction was done by miRWalk and lncRNA interaction finding was done by lncBase 3. Protein-protein interaction was analyzed by STRING and survival and correlation analysis by GEPIA2 and ENCORI. Pathway enrichment and gene ontology (GO) analyses were performed by KEGG and Enrichr and SNP analysis was performed by RFLP test.

Results: ESR1 gene expression was increased in breast cancer and miR-15a-3p gene had a significant interaction with ESR1 and lncRNA OIP5-AS1. OIP5-AS1 and ESR1 had significant positive expression in patient samples. The frequency of TC, TT, and CC genotypes in healthy people was 65%, 15%, and 20%, respectively, and in the patient group it was 38.5%, 38.5% and 23%. There was a significant difference in the prevalence of ESR1 gene genotypes between patients and controls.

Conclusion: ESR1 polymorphism may be associated with an increased risk of breast cancer and rs2234693 T>C SNP can be considered a strong marker for breast cancer screening. OIP5-AS1 may regulate breast cancer progression by altering ESR1 expression regulation.

Keywords: single nucleotide polymorphism, breast cancer, ESR1 gene, RFLP-PCR, rs2234693, miRNA, ceRNA network

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (230): 50-69 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Shokrzadeh - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail:mslamuk@yahoo.com) and Ali Salehzadeh- Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (E-mail:salehzadeh@iaurasht.ac.ir)

***ESR1* هدف جدیدی برای *miR-15a-3p* و *lncRNA OIP5-AS1* تحت تنظیم پلی مورفیسم *rs2234693* در بیماران مبتلا به سرطان پستان: ادغام رویکرد بیوانفورماتیک و تجربی**

پردیس میرزاییان^۱محمد شکرزاده^{۲و۳}علی صالحزاده^۴فرزام عجمیان^۵

چکیده

سابقه و هدف: پس از بیماری‌های قلبی و تصادفات، سرطان به عنوان سومین عامل مرگ و میر در ایران و به عنوان یک مشکل عمده بهداشتی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه در نظر گرفته می‌شود. در سرطان پستان، سلول‌های پستان بدون کنترل رشد می‌کنند. این بیماری بر اساس نوع سلول‌های پستان که سرطانی می‌شوند انواع مختلفی دارد. این سرطان حدود یک سوم انواع سرطان را در جمعیت زنان تشکیل می‌دهد و علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. گیرنده استروژن- α یکی از ایزوفرم‌های گیرنده استروژن است که توسط ژن گیرنده استروژن (*ESR1*) کدگذاری می‌شود. *ESR- α* یک گیرنده هسته‌ای است که به عنوان یک فاکتور رونویسی وابسته به لیگاند عمل می‌کند. پس از اتصال استروژن، *ESR- α* به نواحی پاسخ استروژن در پروموتور ژن‌های هدف متصل شده و سبب تغییر در بیان ژن‌های هدف می‌شود. مطالعه حاضر به بررسی سطح بیان ژن گیرنده استروژن (*ESR1*) و RNAهای طولانی غیر کدکننده (*lncRNAs*) مرتبط با آن و بررسی فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (*rs2234693* (SNP) در ژن *ESR1* در بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداخت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موردی-شاهدی، بررسی بیان *ESR1* و RNAهای کدکننده و غیر کدکننده مربوط به آن توسط میکروآرایه (۱۷ نمونه کنترل و ۱۰۴ نمونه بیمار)، TCGA RNAseq (بر روی ۱۱۳ نمونه نرمال، ۱۱۰۲ تومور اولیه و ۷ نمونه تومور متاستاتیک) انجام شد. آنالیز داده‌ها توسط R Studio و *limma* و پایگاه داده‌های *ENCORI* و *GEPIA2* صورت گرفت. ارزیابی تعامل *miRNA*ها توسط *miRWalk* و یافتن برهمکنش *lncRNA* توسط *lncBase 3* انجام شد. برهمکنش پروتئین-پروتئین توسط *STRING* و آنالیز بقا و همبستگی توسط *GEPIA2* و *ENCORI* بررسی شدند. آنالیزهای غنی‌سازی مسیر و آنولوژی ژنی (*GO*) توسط *KEGG* و *Enrichr* و بررسی SNP توسط آزمایش *RFLP* انجام شد.

یافته‌ها: بیان ژن *ESR1* در سرطان پستان افزایش داشت و ژن *miR-15a-3p* تعامل قابل توجهی با *ESR1* و *lncRNA OIP5-AS1* داشت. *ESR1* و *OIP5-AS1* در نمونه‌های بیمار بیان مثبت معنی‌داری داشتند. فراوانی ژنوتیپ‌های *TC*، *TT* و *CC* در افراد سالم به ترتیب ۶۵، ۱۵ و ۲۰ درصد و در گروه بیمار ۳۸/۵، ۳۸/۵ و ۲۳ درصد بود. تفاوت معنی‌داری در شیوع ژنوتیپ‌های ژن *ESR1* بین بیماران و کنترل وجود داشت.

استنتاج: پلی مورفیسم *ESR1* ممکن است با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط باشد و *rs2234693* T>CSNP می‌تواند یک نشانگر قوی برای غربالگری سرطان پستان در نظر گرفته شود. *OIP5-AS1* ممکن است پیشرفت سرطان پستان را با تغییر در تنظیم بیان *ESR1* تنظیم کند.

واژه های کلیدی: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، سرطان پستان، ژن *ESR1*، RFLP-PCR، *rs2234693*، *miRNA* شبکه *ceRNA*

E-mail: mslamuk@yahoo.com

E-mail: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

مؤلف مسئول: محمد شکرزاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

و علی صالحزاده - رشت: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت

۱. دانشجوی دکتری زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات دارویی، گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۵. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳

مقدمه

پس از بیماری‌های قلبی و تصادفات، سرطان به عنوان سومین عامل مرگ و میر در ایران (۱) و به عنوان یک مشکل عمده بهداشتی نه تنها در ایران بلکه در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه در نظر گرفته می‌شود (۲).

در سرطان پستان، سلول‌های پستان بدون کنترل رشد می‌کنند. این بیماری بر اساس نوع سلول‌های پستان که سرطانی می‌شوند انواع مختلفی دارد. سرطان پستان حدود یک سوم انواع سرطان را در جمعیت زنان تشکیل می‌دهد و علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است (۳). همچنین این بیماری، به عنوان شایع‌ترین بدخیمی در بین زنان، اخیراً در زنان ایرانی افزایش یافته است. سرطان پستان ۷۶ درصد از موارد بروز سرطان در زنان ایرانی را تشکیل می‌دهد و تعداد موارد ابتلای آن تا ۴۰۰۰۰ مورد گزارش شده است. به بیان دیگر میزان بروز سرطان پستان در زنان ایرانی ۲۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰ زن و با ۶۰۰۰ مورد جدید در سال است (۴).

ژن‌های دخیل در تنظیم چرخه سلولی، مسیرهای انتقال سیگنال سلولی و هورمون‌های استروئیدی ممکن است ارتباط قابل توجه با توسعه سرطان پستان داشته باشند (۵). گیرنده استروژن- α یکی از ایزوفرم‌های گیرنده استروژن است که توسط ژن *ESR1* کدگذاری می‌شود. *ESR- α* یک گیرنده هسته‌ای است که به عنوان یک فاکتور رونویسی وابسته به لیگاند عمل می‌کند (۶). پس از اتصال استروژن، *ESR- α* به نواحی پاسخ استروژن در پروموتور ژن‌های هدف متصل شده و سبب تغییر در بیان ژن‌های هدف می‌شود (۷). در طول هر دوره قاعدگی، استروژن از تخمدان‌ها به خون آزاد می‌شود و بر چرخه سلولی در فاز G1 تأثیر می‌گذارد و باعث تقسیم سلولی می‌شود. در نتیجه، چندین تقسیم سلولی ممکن است باعث افزایش خطر جهش ژنی شود (۸). گزارش شده است که *ESR- α* در ۷۰ درصد

بیماران مبتلا به سرطان پستان بیش از حد بیان می‌شود و بنابراین، تجزیه و تحلیل ژنومی ژن *ESR- α* می‌تواند در ارزیابی بالینی سرطان پستان مفید باشد (۹). ژن گیرنده استروژن ۱ (*ESR1*)، که رمز کننده *ESR- α* است، روی بازوی بلند کروموزوم ۶ قرار دارد و دارای هشت اگزون است. پلی مورفیسم‌های تکنوکلوتیدی (SNPs)، یعنی تفاوت یک نوکلئوتید در توالی ناحیه خاصی از ژنوم شایع‌ترین شکل تنوع ژنومی در انسان است. SNP‌ها به عنوان عامل اصلی تفاوت‌های فنوتیپی درون گونه‌ای در نظر گرفته می‌شوند. با توجه به مطالعات، بررسی جهش‌ها و پلی مورفیسم ژن‌های مرتبط با سرطان پستان ابزار امیدوار کننده‌ای برای پیش‌آگهی، تشخیص و درمان گسترش تومور است. مشخص شده است که تنوع آللی *ESR1* با افزایش خطر سرطان پستان در سفید پوستان و همچنین سابقه خانوادگی سرطان پستان و متاستاز غدد لنفاوی سرطانی مرتبط است (۱، ۱۰، ۱۱).

در این مطالعه، به بررسی ترکیبی بیوانفورماتیکی و تجربی الگوی بیان *ESR1* در بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداخته شد. یافتن RNAهای غیر کدکننده تنظیمی (ncRNAs) برای *ESR1* و اثرات احتمالی ncRNAها بر روی سطح بیان *ESR1*، هدف اساسی این مطالعه است. همچنین، توزیع پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن ۱ (rs2234693) در بین بیماران مبتلا به سرطان پستان در شمال ایران و ارتباط عوامل اپیدمیولوژیک با خطر ابتلا به سرطان در بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی از فروردین تا ماه دی سال ۱۳۹۷، در مجموع ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان بین سنین ۳۰ تا ۶۵ سال برای این پژوهش از بیمارستان امام خمینی ساری انتخاب شدند. پس از تشخیص پاتولوژیک، وجود سرطان پستان در بیماران مشخص شد. گروه

شاهد شامل ۶۰ فرد سالم بدون سابقه سرطان پستان در خانواده خود بود. فرم رضایت از افراد قبل از شرکت در این مطالعه اخذ شد و اطلاعات دموگرافیک آنان شامل سن، وزن، سابقه سرطان در اعضای خانواده، سابقه زایمان و سقط جنین و مصرف قرص‌های ضد بارداری ثبت شد. ضمناً تأییدیه اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد: IR.MAZUMS.REC.1397.3228) اخذ شد. نمونه‌های خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه در $3000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی با استفاده از DNG-PLUS برای لیز لکوسیت‌ها تیمار شد. DNA کل از لکوسیت‌های لیز شده با استفاده از روش نمک‌زدایی استخراج شد. با اندازه‌گیری نسبت OD $260/280$ و الکتروفورز ژل، کیفیت و مقدار نمونه‌های DNA استخراج شده، ارزیابی شد (۱۲).

پرایمرها

برای طراحی پرایمرهای اختصاصی، توالی ژن از بانک ژنی (NCBI) تهیه شد و با ژن‌های پایگاه داده ژن هم ردیف سازی شد. در نهایت پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gen Runner طراحی و ویژگی آن‌ها با استفاده از ابزار BLAST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در نهایت سنتز پرایمر توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

پرایمر	توالی (۵' - ۳')	Tm (°C)	طول محصول (جفت باز)
ESR1-F	CACGCAGTCTGGAGTTGTCAT	۶۰/۵	۷۰۷
ESR1-R	CGTCTGTGTCAGCAAAAGGTG		

تکثیر قطعات

تکثیر توالی هدف با استفاده از مستر میکس PCR (TakapouZist) و طبق دستور سازنده کیت انجام شد. آزمایش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، که حاوی ۱۰ pmol از هر پرایمر و ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو بود،

انجام شد. شرایط چرخه به صورت زیر برنامه ریزی شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۳ چرخه دناتوره سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، انیلینگ در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

محصولات ۷۰۷ جفت بازی PCR تحت اثر آنزیم اندونوکلاز محدود الاثر PvuII با توالی هضم ۵- CAGCTG-3 قرار گرفتند. سپس قطعات با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شدند. هضم آنزیمی محصولات PCR باعث ایجاد سه الگوی هضم شد که شامل یک باند ۷۰۷ جفت باز به عنوان ژنوتیپ CC، دو باند ۴۴۸ و ۲۵۹ جفت بازی به عنوان ژنوتیپ TT و سه باند ۷۰۷، ۴۴۸ و ۲۵۹ جفت بازی به عنوان ژنوتیپ TC در نظر گرفته شد (۱۳).

بررسی پلی مورفیسم ESR1

بررسی ژنوتیپ T>C rs2234693 با استفاده از روش RFLP-PCR انجام شد (۱۳، ۱۴). در این روش، محصولات PCR با اندونوکلازهای محدود الاثر بریده می‌شوند و تنوع ژنتیکی بین افراد بر اساس تفاوت در طول قطعات تولید شده قابل ارزیابی است.

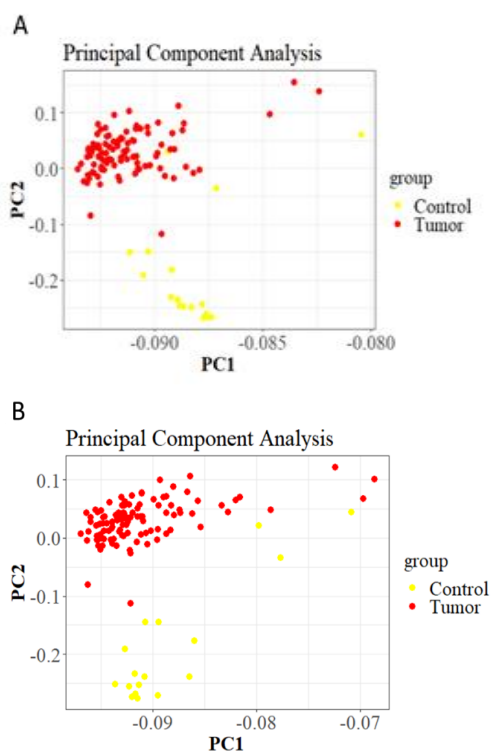
تجزیه و تحلیل ریز آرایه

مجموعه داده GSE42568 (HG-U133 Plus 2) برای Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (۱۵) برای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) در نمونه‌های سرطان پستان در مقایسه با نمونه‌های کنترل انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. این مجموعه داده با استفاده از پایگاه داده GEO تعیین شد. تجزیه و تحلیل DEG با استفاده از بسته GEOquery (۱۶) و Limma (۱۷)، که از Bioconductor (bioconductor.org) دانلود شد، انجام شد. بسته‌های ggplot2 و pheatmap برای ساخت تصاویر و نمودارها برای تجزیه و تحلیل ریز آرایه

limma و edgeR، TCGAbiolinks (روش Voom) به دست آمدند. نرمال سازی، حذف اثر دسته‌ای، آنالیزهای آماری و تجزیه و تحلیل بیان افتراقی نیز انجام شد. داده‌های خام با استفاده از روش TMM (میانگین بریده شده M-values) نرمال سازی شدند (تصویر شماره ۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های RT-PCR، RFLP

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار Medcalc و SPSS انجام شد. برای بررسی شیوع ژنوتیپ‌های مختلف در گروه مورد و شاهد از آزمون کای اسکوتر (χ^2) و برای تعیین ارتباط هر ژنوتیپ با خطر ابتلا به سرطان پستان از مدل رگرسیون لجستیک استفاده شد. هم چنین ارتباط عوامل اپیدمیولوژیک با خطر ابتلا به سرطان پستان با استفاده از آزمون رگرسیون لجستیک و آزمون t مستقل مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی داری تحلیل‌های آماری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



تصویر شماره ۱: تجزیه و تحلیل مؤلف‌های اصلی (PCA) داده‌های بیان خام و نرمال شده (GSE42568). (A) تجزیه و تحلیل PCA مجموعه داده بیان خام. (B) تجزیه و تحلیل PCA مجموعه داده بیان نرمال شده

استفاده شدند. تابع NormalizeR Quantiles، برای استانداردسازی داده‌های خام استفاده شد. در مجموع ۱۲۱ نمونه (۱۷ نمونه شاهد و ۱۰۴ نمونه سرطان پستان) مورد بررسی قرار گرفتند. ژن‌های با logFC بیش از ۳ به عنوان افزایش بیان در نظر گرفته شدند، در حالی که ژن‌هایی با logFC کم‌تر از ۳- به عنوان کاهش بیان در نظر گرفته شد. مقدار $\text{adj.p} = 0.05$ به عنوان آستانه معنی داری انتخاب شد.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

بررسی تعاملات miRNA-mRNA با استفاده از miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) نسخه ۲ انجام شد (۲۰-۱۸) انجام شد. miRNA‌های تنظیمی جدید بالاترین امتیاز را داشتند (امتیاز = ۱). روابط بین miRNA و lncRNA توسط lncBase (نسخه ۳) (<https://diana.e-ce.uth.gr/lncbasev3>) مورد بررسی قرار گرفت (۲۱). شبکه تعامل با استفاده از Cytoscape (نسخه ۳٫۸٫۰) مشاهده شد (۲۳، ۲۲). مطالعات آنولوژی ژن و غنی‌سازی مسیر KEGG (Kanehisa & Goto)، (۲۴، ۲۵) با استفاده از برنامه آنالیز Enrichr (Enrichr) (<https://maayanlab.cloud/Enrichr>) انجام شد (۲۷، ۲۶). تعاملات پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING (<https://STRING-db.org>) مورد بررسی قرار گرفت (۲۸). پایگاه داده‌های آنالای ENCORI (۲۹) (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) و برای انجام آنالیز بیان، بیان مشترک و بقا استفاده شد. (۳۰) (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)

تجزیه و تحلیل داده‌های TCGA RNAseq

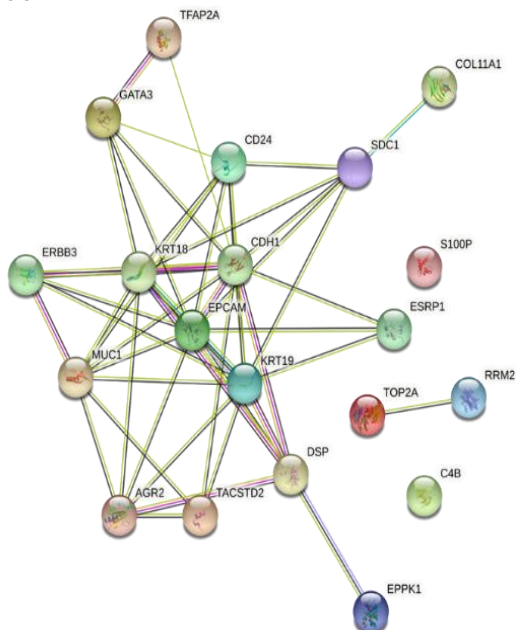
داده‌های اطلس ژنوم سرطان (TCGA) مرتبط با پایگاه داده NGS (نسل بعدی توالی‌یابی) به دست آمد (<https://portal.gdc.cancer.gov>). این مجموعه داده شامل ۱۱۰۹ نمونه سرطان پستان (۱۱۳ نمونه بافت طبیعی، ۱۱۰۲ نمونه تومور اولیه و ۷ نمونه تومور متاستاتیک) بود. داده‌ها با استفاده از بسته‌های

یافته ها

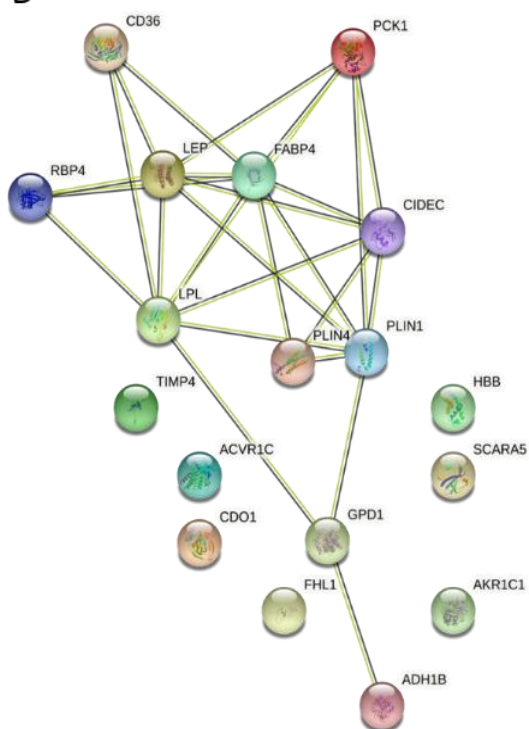
تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه

تجزیه و تحلیل PCA برای تعیین نمونه‌های با کیفیت پایین در تصویر شماره ۲ بر اساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم داده‌های تومور و شاهد استفاده شد. با توجه به تجزیه و تحلیل PCA، هیچ نمونه‌ای با کیفیت پایین وجود نداشت. تعداد RNA۲۵ با بیان بالا و پایین در مجموعه داده ریزآرایه GSE42568 در جدول شماره ۲ و ۳ ارائه شده است. بر اساس تجزیه و تحلیل ریزآرایه، LEP کم‌ترین بیان را در این مجموعه داده دارد ($\log FC: -7/34328$, $\text{adj. } P < 0/0001$) بیش‌ترین افزایش بیان را در مجموعه داده ریزآرایه دارد ($\log FC: 5/5192$, $\text{adj. } P < 0/0001$). ارزیابی سطح بیان *ESR1* نشان می‌دهد که *ESR1* به طور قابل توجهی در تومورها بیان می‌شود ($\log FC: 0/907$, $\text{adj. } P < 0/0001$) (تصویر شماره ۳).

A

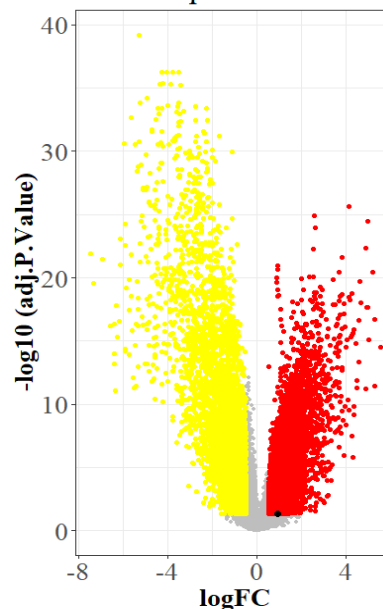


B



تصویر شماره ۳: تجزیه و تحلیل تعامل پروتئین- پروتئین ژن‌های با افزایش و کاهش بیان در مجموعه داده ریزآرایه GSE42568. الف) آنالیز برهمکنش پروتئین- پروتئین ژن‌های با بیان بالا GSE42568. ب) آنالیز برهمکنش پروتئین- پروتئین ژن‌های با کاهش بیان در نمونه‌های سرطان پستان

Volcano plot



تصویر شماره ۲: نمودار آتش فشان یا ز ۵۴۶۷۵ ژن در مجموعه داده ریزآرایه GSE42568. نقطه سیاه نشان دهنده *ESR2* به عنوان یک ژن با بیان بالا در نمونه‌های سرطان پستان است. رنگ قرمز نشان دهنده ژن‌هایی است که به طور قابل توجهی تنظیم شده اند و رنگ زرد نشان دهنده ژن‌های با بیان کم است

جدول شماره ۲: ۲۵ ژن برتر با کاهش بیان در

GSE42568. LEP بیشترین میزان کاهش بیان را در نمونه‌های

سرطان پستان دارد

ژن	logFC	سطح معنی داری	adj.P.Val
LEP	-۳.۳۴۳۲۷۶۵۶	2.12E-22	2.95E-20
FABP4	-۷.۲۸۷۰۰۸۱۳۲	5.50E-25	1.14E-22
RBP4	-۶.۹۳۸۵۰۳۹۶۹	1.82E-24	3.49E-22
ADH1B	-۶.۶۰۴۶۹۷۰۵۶	8.48E-19	6.76E-17
ADH1B	-۶.۴۲۷۰۲۸۵۸۵	1.45E-15	6.83E-14
CD36	-۶.۴۲۲۰۲۰۵۸۷	1.77E-16	9.46E-15
LPL	-۶.۴۰۱۸۴۵۶۳	5.74E-19	4.72E-17
FABP4	-۶.۳۴۳۰۰۷۹۶۷	2.42E-13	8.26E-12
HBB	-۶.۳۰۵۱۲۱۲۵۵	1.49E-20	1.55E-18
CD36	-۶.۲۶۸۵۲۸۳۴	7.61E-18	5.09E-16
PLIN1	-۶.۱۷۸۴۶۴۴۷۵	3.47E-19	2.97E-17
CIDEA	-۶.۱۳۲۳۳۹۴۴۷	5.14E-24	9.30E-22
TIMP4	-۶.۱۲۲۴۶۴۴۱۸	3.39E-26	8.43E-24
PCK1	-۵.۹۷۶۰۲۵۶۳	2.25E-34	2.51E-31
FHL1	-۵.۹۲۵۰۸۳۸۴	1.89E-27	5.77E-25
GPD1	-۵.۹۱۹۹۲۴۷۷	1.25E-25	2.81E-23
AKR1C2	-۵.۹۱۴۶۸۰۳۵	1.03E-16	5.68E-15
LPL	-۵.۹۰۵۲۴۵۶۷	7.46E-17	4.20E-15
HBB	-۵.۸۶۷۲۸۸۷۸۳	4.39E-22	5.90E-20
PLIN4	-۵.۷۵۵۵۳۳۹۳	3.87E-20	3.75E-18
AKR1C1	-۵.۷۳۱۰۶۹۷۲۵	2.32E-16	1.22E-14
HBB	-۵.۷۲۴۸۱۷۳۴	9.53E-23	1.43E-20
CDO1	-۵.۶۶۶۹۱۹۸۳۶	7.68E-25	1.56E-22
ACVR1C	-۵.۶۵۸۲۶۲۰۵۴	9.54E-37	2.09E-33
SCARA5	-۵.۶۳۳۲۳۳۹۰۹	2.70E-21	3.11E-19

جدول شماره ۳: ۲۵ ژن برتر با کاهش بیان در مجموعه داده

KRT19. ریزآرایه در نمونه سرطان پستان در مقایسه با نمونه‌های

شاهد، بیشترین افزایش بیان را دارد

ژن	logFC	سطح معنی داری	adj.P.Val
KRT19	۵.۵۱۹۱۷۸۶	5.74E-17	3.29E-15
COL11A1	۵.۲۹۸۵۹۷۸۴	9.91E-14	3.60E-12
EPPK1	۵.۲۵۳۰۰۱۹۶۵	2.40E-19	2.10E-17
EPCAM	۵.۱۷۵۴۷۳۱۵۲	2.34E-23	3.84E-21
EPPK1	۵.۱۱۵۴۶۱۸۷	1.19E-17	7.70E-16
DSP	۴.۹۷۰۵۱۶۸۵۱	1.17E-27	3.63E-25
KRT18	۴.۹۶۳۵۹۰۵۸۷	2.19E-20	2.22E-18
CDH1	۴.۹۳۶۸۷۹۶۹۴	2.20E-20	2.23E-18
COL11A1	۴.۸۷۲۱۶۷۵۱	1.64E-13	5.74E-12
ESRP1	۴.۸۵۴۹۴۹۴۶	2.01E-25	4.45E-23
TFAP2A	۴.۶۳۶۴۳۵۵۷	8.74E-21	9.41E-19
SDC1	۴.۶۲۷۳۶۷۷۵۲	1.32E-22	1.91E-20
ERBB3	۴.۵۸۳۹۴۹۶۹	2.75E-19	2.39E-17
TACSTD2	۴.۵۷۰۷۶۸۱۸۹	8.70E-16	4.21E-14
MUC1	۴.۴۷۶۳۰۳۰۷۳	1.39E-13	4.92E-12
CD24	۴.۴۵۸۵۵۸۹۴	3.15E-14	1.23E-12
TOP2A	۴.۴۳۷۶۶۶۲۶۱	2.77E-17	1.69E-15
GATA3	۴.۳۵۷۰۹۰۴۷۸	5.08E-12	1.40E-10
RRM2	۴.۳۳۱۹۵۹۶۶۱	1.77E-18	1.32E-16
C4B	۴.۳۳۱۸۱۴۲۰۰۶	2.76E-11	6.85E-10
CD24	۴.۳۰۶۰۹۳۷۷	3.29E-18	2.36E-16
AGR2	۴.۲۹۵۵۸۳۴۳	1.27E-07	1.60E-06
S100P	۴.۲۶۷۱۸۳۵۰۵	1.85E-09	3.31E-08
SDC1	۴.۲۵۸۹۴۴۳	1.40E-21	1.71E-19
	۰/۰۰۶۳۷۰۹۸	۰/۰۰۱۲۹۸۰۱۹	۰/۵۰۰۱۲۰۹۹۴

آنالیز برهم کنش پروتئین-پروتئین برای یافتن

ژن‌هایی با بیان افتراقی بالا و پایین

تجزیه و تحلیل برهم کنش پروتئین توسط STRING

برای یافتن DEG های برتر با برهم کنش قابل توجه

انجام شد (تصویر شماره ۴). لیست پروتئین‌های دارای

تعامل در جدول شماره ۴ و ۵ ارائه شده است.

جدول شماره ۴: لیست ژن‌های پروتئین‌های با افزایش بیان

دارای برهم کنش پروتئینی قابل توجه. در میان ۲۵ پروتئین با

افزایش بیان، ۲۳ پروتئین تعامل قابل توجهی در این مجموعه

داده دارند

ژن	logFC	سطح معنی داری	adj.P.Val
KRT19	۵.۵۱۹۱۷۸	5.74E-17	3.29E-15
COL11A1	۵.۲۹۸۵۹۷۸۴	9.91E-14	3.60E-12
EPPK1	۵.۲۵۳۰۰۱۹۶۵	2.40E-19	2.10E-17
EPCAM	۵.۱۷۵۴۷۳۱۵۲	2.34E-23	3.84E-21
EPPK1	۵.۱۱۵۴۶۱۸۷	1.19E-17	7.70E-16
DSP	۴.۹۷۰۵۱۶۸۵۱	1.17E-27	3.63E-25
KRT18	۴.۹۶۳۵۹۰۵۸۷	2.19E-20	2.22E-18
CDH1	۴.۹۳۶۸۷۹۶۹۴	2.20E-20	2.23E-18
COL11A1	۴.۸۷۲۱۶۷۵۱	1.64E-13	5.74E-12
ESRP1	۴.۸۵۴۹۴۹۴۶	2.01E-25	4.45E-23
TFAP2A	۴.۶۳۶۴۳۵۵۷	8.74E-21	9.41E-19
SDC1	۴.۶۲۷۳۶۷۷۵۲	1.32E-22	1.91E-20
ERBB3	۴.۵۸۳۹۴۹۶۹	2.75E-19	2.39E-17
TACSTD2	۴.۵۷۰۷۶۸۱۸۹	8.70E-16	4.21E-14
SDC1	۴.۵۵۸۹۴۴۳	1.40E-21	1.71E-19

جدول شماره ۵: ژن پروتئین‌های با کاهش بیان دارای

برهم کنش پروتئینی قابل توجه. در میان ۲۵ پروتئین دارای

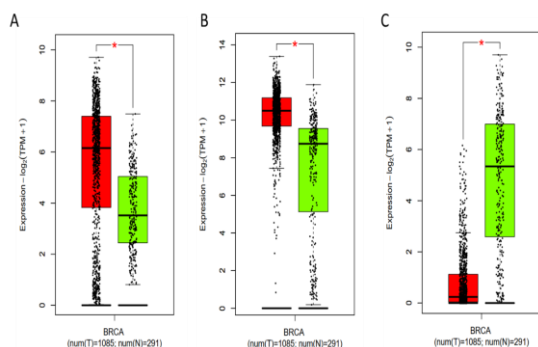
افزایش بیان، ۱۰ پروتئین تعامل قابل توجهی در این مجموعه

داده دارند

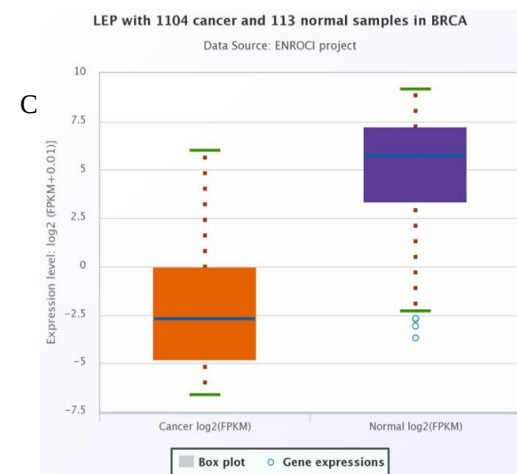
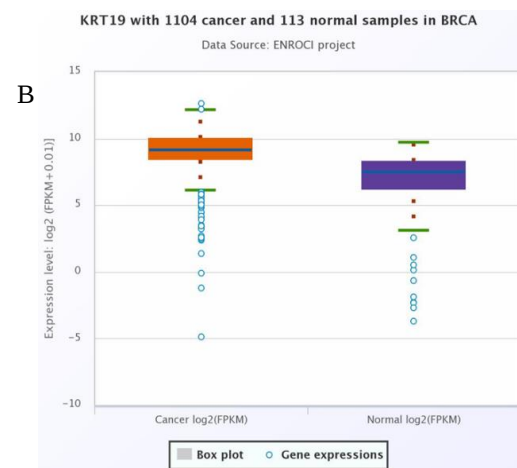
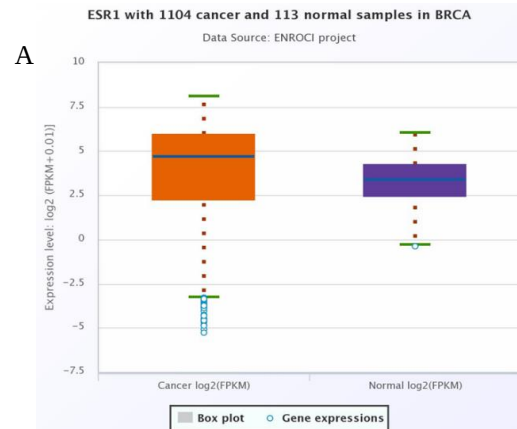
ژن	logFC	سطح معنی داری	adj.P.Val
LEP	-۷.۲۸۷۰۰۸۱۳۲	2.12E-22	2.95E-20
RBP4	-۶.۹۳۸۵۰۳۹۶۹	1.82E-24	3.49E-22
ADH1B	-۶.۴۲۷۰۲۸۵۸۵	1.45E-15	6.83E-14
CD36	-۶.۴۲۲۰۲۰۵۸۷	1.77E-16	9.46E-15
FABP4	-۶.۳۴۳۰۰۷۹۶۷	2.42E-13	8.26E-12
CD36	-۶.۲۶۸۵۲۸۳۴	7.61E-18	5.09E-16
PLIN1	-۶.۱۷۸۴۶۴۴۷۵	3.47E-19	2.97E-17
CIDEA	-۶.۱۳۲۳۳۹۴۴۷	5.14E-24	9.30E-22
LPL	-۵.۹۰۵۲۴۵۶۳	5.74E-19	4.72E-17
PLIN4	-۵.۷۵۵۵۳۳۹۳	3.87E-20	3.75E-18

آنالیز بیان، بقا و بیان همزمان RNA های بایان بالا و پایین تجزیه و تحلیل بیان توسط GEPIA2 و ENCORI و نرم افزارهای آنلاین (براساس مجموعه داده های TCGA (RNAseq نشان داد که *ESR1* دارای افزایش بیان غیر معنی دار در تومورها است (FDR: ۰/۱۸، FC: ۳/۱۴) (تصویر شماره A۴، A۵). آنالیزهای ذکر شده نشان داد که *KRT19* بیان بسیار بالایی در نمونه های سرطان پستان دارد (FDR < ۰/۰۰۰۱، FC: ۳/۴۸) (تصویر شماره B۵ و B۶). همچنین، مشاهده شد LEP که یک ژن با کاهش بیان معنی دار در نمونه های سرطان پستان است (تصویر شماره C۵، C۶). تجزیه و تحلیل داده های TCGA نشان داد که *ESR1* (adj. $p < 0.0001$, log FC: ۷/۰۰) و *KRT19* (adj. $p < 0.0001$, log FC: ۷/۸۷) بیان بالایی در نمونه های سرطان پستان در مقایسه با شاهد دارند.

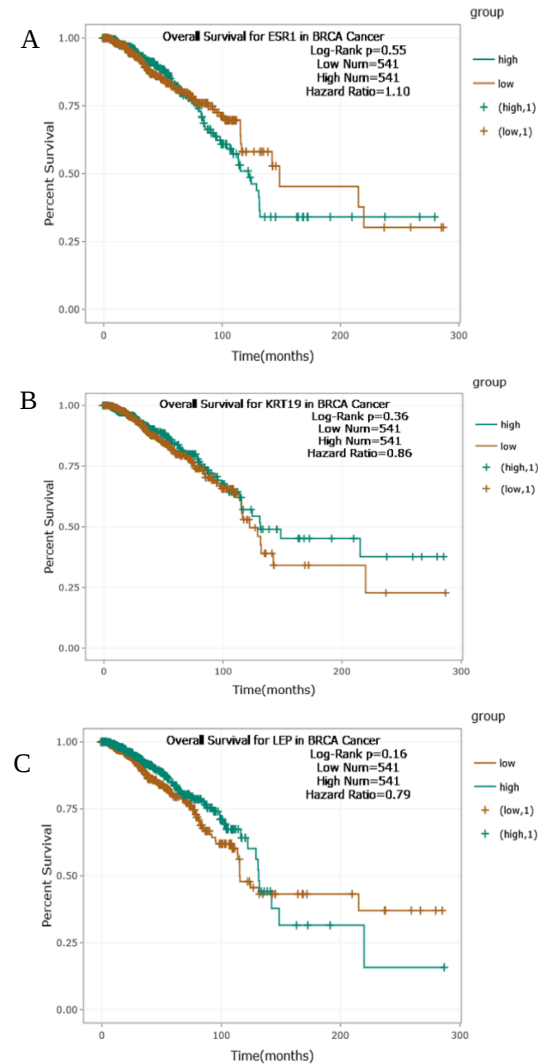
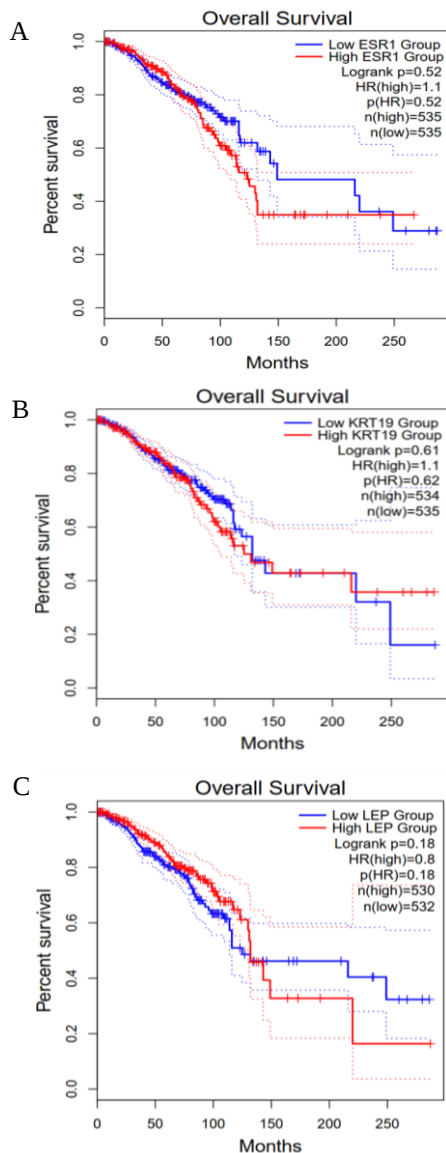
آنالیز بقا هیچ ارتباط معنی داری را بین *ESR1* و میزان بقای بیماران نشان نداد (تصویر شماره A۶، A۷). همچنین، یک همبستگی غیر معنی داری بین بیان کم *KRT19* (ضریب: -۰/۱۵، HR: ۰/۸۶، P: ۰/۵۶) و نرخ بقای پایین بیماران (تصویر شماره B۶) وجود دارد. علاوه بر این، همبستگی غیر معنی داری بین بیان بالاتر LEP (ضریب: ۰/۲۳، HR: ۰/۸۶، P: ۰/۱۶) و نرخ بقای کم تر افراد دارای تومور وجود دارد (تصویر شماره C۷، C۸).



تصویر شماره ۵: تجزیه و تحلیل بیان (A) *ESR1* GEPIA2، (B) *KRT19* و (C) LEP. بر اساس تجزیه و تحلیل ذکر شده، *ESR1* و *KRT19* دارای بیان بالا و LEP دارای بیان پایین قابل توجهی در نمونه های سرطان پستان هستند.

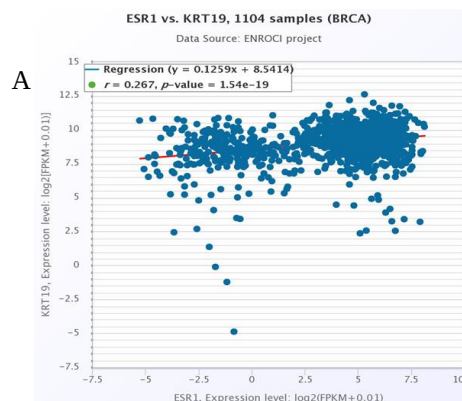


تصویر شماره ۴: تجزیه و تحلیل بیان ENCORI ژن های *ESR1*، *KRT19* و LEP. بر اساس این تجزیه و تحلیل، *ESR1* و *KRT19* بیان بالایی دارند و LEP بیان پایینی در نمونه های سرطان پستان دارد. (A) تجزیه و تحلیل *ESR1* DEG نشان داد که *ESR1* دارای یک افزایش بیان غیر معنی داری در نمونه سرطان پستان است. (B) تجزیه و تحلیل داده های ENCORI نشان داد که *KRT19* بیان بالایی معنی داری در نمونه های سرطان پستان دارد. (C) LEP بیان پایین قابل توجهی در نمونه های سرطان پستان دارد.



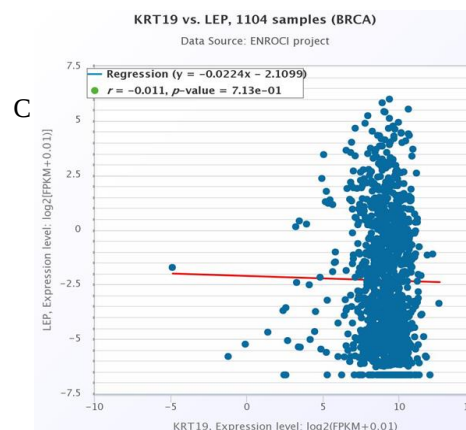
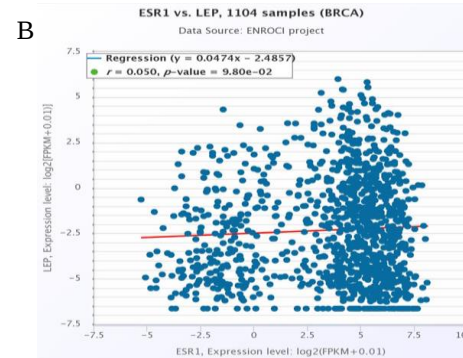
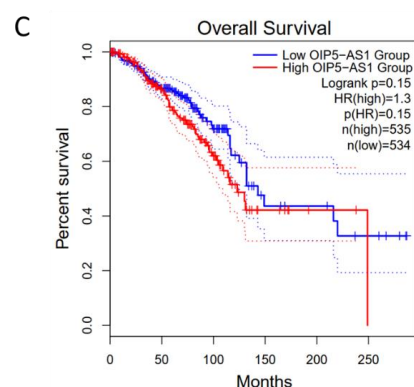
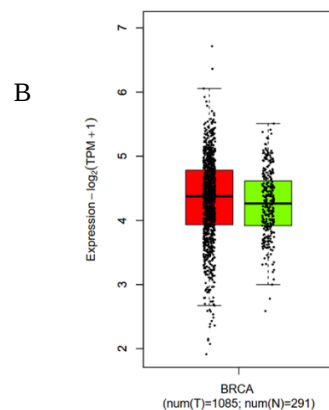
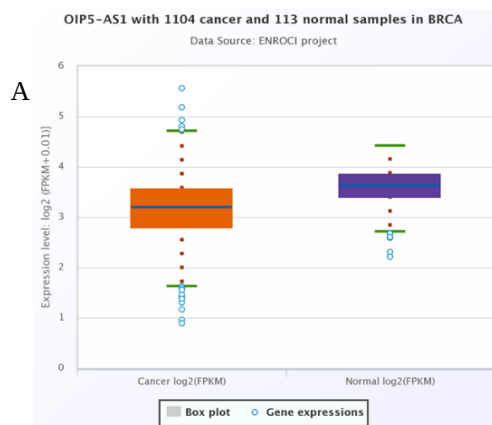
تصویر شماره ۶: تجزیه و تحلیل بقای (A) ESR1، (B) KRT19، و (C) LEP در بیماران سرطان پستان، براساس سطح بیان. براساس تجزیه و تحلیل ذکر شده، بین میزان بالاتر بقای بیماران با بیان بالاتر KRT19 و بیان کم تر LEP همبستگی غیرمعنی داری وجود دارد.

تصویر شماره ۷: تجزیه و تحلیل بقای ESR1، KRT19 و LEP در بیماران سرطان پستان در شکل های A تا C نشان داده شده است. باتوجه به داده های فوق، یک همبستگی غیرمعنی دار بین میزان بقای بیش تر بیماران و سطوح بیان KRT19 و LEP وجود دارد.

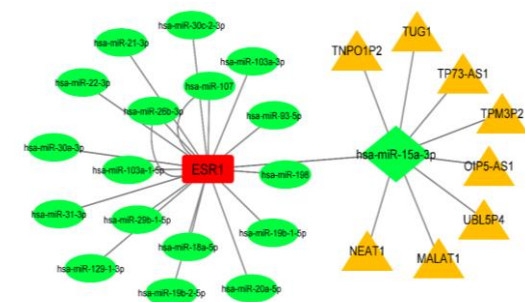


همبستگی معنی دار ESR1 با KRT19
براساس آنالیز همبستگی ESR1، ENCORI یک همبستگی مثبت و معنی دار با KRT19 دارد (تصویر شماره ۸A، $P < 0.0001$ ، $r = 0.267$ ، $n = 1104$). همچنین، یک همبستگی مثبت غیر معنی دار بین ESR1 و LEP در نمونه های سرطان پستان وجود دارد (تصویر شماره ۸B، $P = 9.80 \times 10^{-2}$ ، $r = 0.05$ ، $n = 1104$). در نهایت، یک بیان منفی مشترک غیر قابل توجه بین LEP و KRT19 وجود دارد (تصویر شماره ۸C، $P = 7.13 \times 10^{-1}$ ، $r = -0.05$).

miRNAها و *ESR1* انتخاب شدند (امتیاز: ۱).
 Has-miR-15a-3p قوی ترین تعامل را با *ESR1* دارد
 (امتیاز: ۱، انرژی: ۲۹,۶-، تعداد جفت‌ها: ۱۶، موقعیت:
 3'UTR). تجزیه و تحلیل تعامل miRNA-lncRNA
 (lncBase 3) نشان‌دهنده وجود یک تعامل قوی بین
miR-15a-3p و *lncRNA OIP5-AS1* بود. بنابراین،
AS1 OIP5 سطح بیان *ESR1* را به طور غیر مستقیم در
 یک مسیر تعامل رقابتی ceRNA تنظیم می‌کند (تصویر
 شماره ۱۰، جدول شماره ۶).



تصویر شماره ۸: آنالیز همبستگی ENCORI پیرسون. A) *ESR1* و
KRT19 در نمونه‌های سرطان پستان همبستگی معنی‌داری دارند.
 B) بین بیان *ESR1* و *LEP* در نمونه‌های سرطان پستان همبستگی
 معنی‌داری وجود ندارد. C) بین بیان *KRT19* و *LEP* در نمونه‌های
 سرطان پستان همبستگی معنی‌داری وجود ندارد



تصویر شماره ۹: شبکه تعامل ESR1 ceRNA. برهمکنش
 RNA *ESR1* RNA های غیر کد کننده جدیدی را نشان داد که با
ESR1 همبستگی دارند

شبکه تعاملی رقابتی RNA درون‌زاد (ceRNA)، تنظیم
 شده توسط *hsa-miR-15a-3p*

آنالیز شبکه تعامل miRNA توسط miRWalk 2
 انجام شد. تعداد ۲۰ miRNA برتر براساس انرژی اتصال

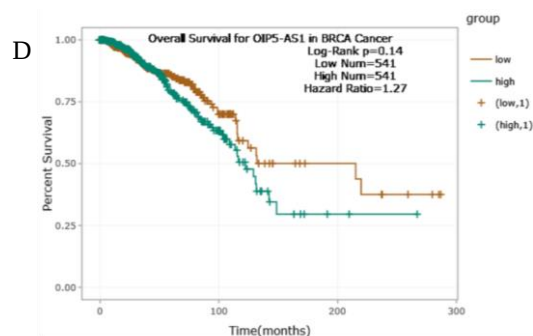
دارد (FC: ۰/۷۸، FDR < ۰/۰۰۰۱، تصویر شماره ۱۰A). هم چنین آنالیز داده های GEPIA2 نشان داد که OIP5-AS1 افزایش بیان غیر معنی داری در نمونه های تومور دارد (تصویر شماره ۹B). تجزیه و تحلیل داده های TCGA هم چنین نشان داد که OIP5-AS1 افزایش قابل توجهی در نمونه های سرطان پستان دارد (logFC: ۷/۲۶، adj. P < ۰/۰۰۰۱). براساس تجزیه و تحلیل بقا توسط ENCORI (ضریب: ۱/۰، ۲۷/۲۴، HR: ۰/۱۴، P: ۰/۰۰۰۱، تصویر شماره ۹C) و GEPIA2 (HR: ۱/۳، P: ۰/۰۱۵، logrank) تصویر شماره ۹D) افزایش بیان OIP5-AS1 دارای یک همسویی غیر معنی دار با نرخ بقای بیماران سرطان پستان است.

همبستگی مثبت معنی دار بیان OIP5-AS1 با سطح بیان ESR1 در نمونه های سرطان پستان

تجزیه و تحلیل همبستگی ENCORI (r: ۰/۳۰۳، P < ۰/۰۰۰۱، تصویر شماره ۱۱A) و GEPIA2 (r: ۰/۳۲، P < ۰/۰۰۰۱، تصویر شماره ۱۱B) نشان داد که OIP5-AS1 lncRNA یک بیان مشترک قابل توجه با ESR1 دارد.

تنظیم روند تمایز سلول های اپی تلایل توسط ژن های با افزایش بیان

غنی سازی مسیر و تجزیه و تحلیل آنتولوژی ژنی نشان داد که ژن های دچار افزایش بیان در مجموعه داده GSE42568 فرآیند اتصال گیرنده کلاس 3-ErbB را در تمایز سلول های اپی تلایل تنظیم می کنند. پروتئین های دچار افزایش بیان به طور قابل توجهی در رشته های کراتین و کمپلکس فلوئیلین قرار دارند. آن ها همچنین در مسیرهای سیگنال دهی زیر نقش دارند: عفونت استافیلوکوکوس اورئوس، سرطان تیروئید، سرطان مثانه، مسیر سیگنال دهی استروژن، و مولکول های چسبندگی سلولی (جدول شماره ۷). هم چنین، بر اساس تجزیه و تحلیل های ذکر شده، ژن های با کاهش بیان در مجموعه



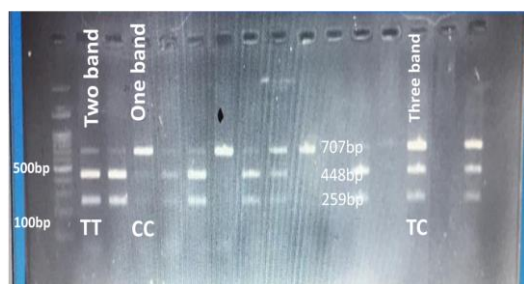
تصویر شماره ۱۰: بیان و آنالیز بقا OIP5-AS1 (A). OIP1-AS1 کاهش معنی داری در سطح بیان در نمونه های سرطان پستان دارد. OIP5-AS1 افزایش غیر قابل توجهی در سطح بیان در نمونه های سرطان پستان دارد. C بیان OIP5-AS1 با میزان بقای بیماران همبستگی غیر معنی داری دارد. D افزایش بیان OIP5-AS1 با نرخ بقای کم تر بیماران مبتلا به سرطان پستان، هم بیان قابل توجهی ندارد

جدول شماره ۶: برهمکنش های ceRNA Hsa-miR-15a-3p و ESR1 و lncRNA OIP5-AS1 را تنظیم می کند.

miRNA ID	refseqid	نماد زن	ارزی	تعداد جفت	موقعیت
hsa-miR-15a-3p			-۲۹/۶	۱۶	3UTR
hsa-miR-18a-5p			-۲۲/۱	۲۱	3UTR
hsa-miR-19b-1-5p			-۲۱/۱	۱۸	3UTR
hsa-miR-19b-2-5p			-۱۷/۳	۱۴	3UTR
hsa-miR-20a-5p			-۱۹/۳	۲۱	3UTR
hsa-miR-21-3p			-۲۰/۳	۱۶	3UTR
hsa-miR-22-3p			-۱۷/۷	۱۵	3UTR
hsa-miR-26b-3p			-۲۴/۵	۲۰	CDS
hsa-miR-26b-3p			-۱۹/۹	۱۷	3UTR
hsa-miR-30a-3p			-۲۰/۶	۲۱	3UTR
hsa-miR-31-3p		ESR1	-۱۸/۳	۲۰	3UTR
hsa-miR-93-5p			-۱۹/۴	۱۴	3UTR
hsa-miR-29b-1-5p			-۲۴	۲۲	3UTR
hsa-miR-103a-3p			-۲۴/۸	۱۷	CDS
hsa-miR-103a-1-5p			-۲۷/۵	۱۸	3UTR
hsa-miR-107			-۲۴/۷	۱۵	CDS
hsa-miR-107			-۲۳/۳	۱۸	3UTR
hsa-miR-198			-۲۲/۲	۱۷	3UTR
hsa-miR-129-1-3p			-۱۹/۲	۱۱	3UTR
hsa-miR-30c-2-3p			-۲۰/۴	۱۴	3UTR
hsa-miR-15a-3p		OIP5-AS1			
hsa-miR-15a-3p		NEAT1			
hsa-miR-15a-3p		MALAT1			
hsa-miR-15a-3p		UBL5P4			
hsa-miR-15a-3p		TUG1			
hsa-miR-15a-3p		TPM3P2			
hsa-miR-15a-3p		TP73-AS1			
hsa-miR-15a-3p		TNPO1P2			

افزایش قابل توجه OIP5-AS1 در نمونه های دارای سرطان پستان

تجزیه و تحلیل داده های ENCORI نشان داد که OIP5-AS1 بیان بسیار پایینی در نمونه های سرطان پستان



تصویر شماره ۱۲: ارزیابی پلی مورفیسم های ژن ESR1 rs2234693 با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ درصد

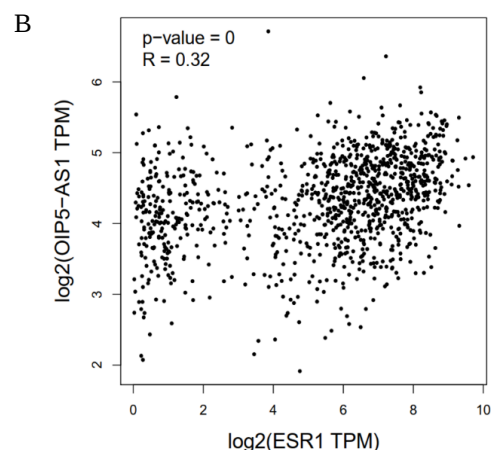
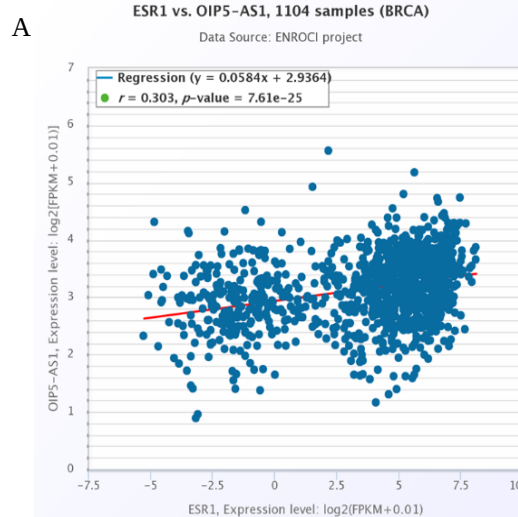
جدول شماره ۹: ژنوتیپ و فراوانی آللی پلی مورفیسم ESR1 rs2234693 در جمعیت مورد مطالعه. براساس این آنالیز، ژنوتیپ ها و آلل های rs2234693 دارای فراوانی متفاوتی در نمونه های شاهد و مودی هستند

ESR1 rs2234693	تعداد ژنوتیپی (درصد)					تعداد آللی (درصد)
	TT	TC	CC	T	C	
شاهد	(۱۵) ۹	(۶۵) ۳۹	(۲۰) ۱۲	(۴۷) ۵۷	(۵۲) ۶۳	
بیمار	(۳۸) ۲۳	(۳۸) ۲۳	(۲۳) ۱۴	(۵۷) ۶۹	(۴۲) ۵۱	
	$\chi^2 = 10.408, P = 0.005$					$\chi^2 = 1.623, P = 0.202$

* تفاوت معنی دار $P < 0.05$

برای ارزیابی ارتباط هر ژنوتیپ با خطر ابتلا به سرطان پستان از مدل کای اسکورور و رگرسیون لجستیک استفاده شد و $P = 0.005$ به ترتیب ۱۰/۴۰۸ و ۰/۰۰۵ محاسبه شد. تجزیه و تحلیل ما تفاوت قابل توجهی را بین شیوع ژنوتیپ گروه بیمار و شاهد نشان داد. بنابراین، محاسبه مقدار OR برای ارزیابی رابطه بین هر ژنوتیپ و خطر ابتلا به سرطان پستان استفاده شد. با مقایسه ژنوتیپ TT هموزیگوت طبیعی با یافته های ما، دریافتیم که ژنوتیپ های CC و CC+TC با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط هستند. علاوه بر این، خطر ابتلا به سرطان پستان با ژنوتیپ CC در مقایسه با ژنوتیپ CC+TC (۰/۰۰۳) مرتبط بود. هم چنین فراوانی آلل های C و T در بین گروه های سرطان پستان و شاهد تعیین شد. تجزیه و تحلیل های آماری تفاوت معنی داری بین دو گروه نشان نداد. جداول شماره ۱۰ و ۱۱، شیوع آلل ها و ژنوتیپ های مختلف و ارتباط آن ها با سرطان پستان را نشان می دهد.

مطالعه ما نشان داد که فراوانی ژنوتیپ های TT، TC و CC در گروه شاهد سالم به ترتیب ۱۵ درصد (تعداد=۹)، ۶۵ درصد (تعداد=۳۹) و ۲۰ درصد (تعداد=۱۲) بود. هم چنین، بیماران مبتلا به سرطان پستان فراوانی ۳۸/۵، ۳۸/۵ و ۲۳ درصد را برای ژنوتیپ های TT، TC و CC نشان دادند. شیوع ژنوتیپ های مختلف در گروه بیمار و شاهد تفاوت معنی داری داشت ($P > 0.05$). نتایج ما اهمیت ژنوتیپ TC ژن ESR1 را در سرطان پستان نشان داد (تصویر شماره ۱۲، جدول شماره ۹).



تصویر شماره ۱۱: آنالیز بیان مشترک lncRNA OIP5-AS1 و ESR1. A) یک بیان مشترک مثبت معنی داری بین OIP5-AS1 و ESR1 دیده شد. B) بیان OIP5-AS1 به طور مثبت و معنی داری همبستگی دارند

جدول شماره ۱۰: ارتباط پلی مورفیسم های rs2234693 ESR1 با خطر

سرطان پستان		شاهد		بیمار		95% CI		سطح	
تعداد (درصد)		تعداد (درصد)		OR		معنی داری		معنی داری	
هومیگزوت تپ وحشی									
TT		۹		۱/۰۰		مرجع		-	
TC		(۶۵) ۲۹		(۳۸/۵) ۲۳		۰/۰۹۱-۱/۵۸		*۰/۰۰۱	
CC		(۲۰) ۱۲		(۲۳) ۱۴		۰/۱۵-۱/۳		۰/۱۵۸	
TC+CC		(۸۵) ۵۱		(۶۱/۵) ۳۷		۰/۱۱-۰/۶۸		*۰/۰۰۵	
هومیگزوت									
CC+TT		(۸۵) ۵۱		(۶۱/۵) ۳۷		مرجع		-	
TC		(۶۵) ۳۹		(۳۸/۵) ۲۳		۱/۱۵۹-۱/۷۰۳		*۰/۰۰۳	

جدول شماره ۱۱: ارتباط ویژگی های اپیدمیولوژیک جمعیت مورد

مطالعه باخطر ابتلا به سرطان پستان		شاهد (تعداد=۶۰)		بیمار (تعداد=۶۰)		95% CI		سطح	
ویژگی		تعداد (درصد)		تعداد (درصد)		معنی داری		معنی داری	
سن (سال)									
۴۹≤		(۴۰) ۲۴		(۶۶) ۴۰					
۵۰-۵۹		(۳۵) ۲۱		(۲۷) ۱۶					
≥۶۰		(۲۵) ۱۵		(۷) ۴					
میانگین		۵۲/۵±۸/۷		۴۵/۳±۹/۰					
سابقه خانوادگی سرطان									
بله		(۳۶/۷) ۲۲		(۶/۷) ۴					
خیر		(۶۳/۳) ۳۸		(۹۳/۳) ۵۶					
استفاده از قرص های ضد بارداری									
بله		(۶۱) ۳۷		(۴۰) ۲۴					
خیر		(۳۸) ۲۳		(۶۰) ۳۶					
شاخص توده بدنی (kg/m ²)									
۲۰-۲۴/۹		(۲۳/۳) ۱۴		(۲۶/۶) ۱۶					
۲۵-۲۹/۹		(۴۱/۷) ۲۵		(۳۶/۷) ۲۲					
۳۰≤		(۳۵) ۲۱		(۳۶/۷) ۲۲					
میانگین		۲۵/۷±۴		۲۸/۳±۴					
زایمان									
۰		(۵) ۰		(۲۷) ۱۶					
۱-۲		(۳۸/۳) ۲۳		(۵۰) ۳۰					
۳-۴		(۳۱/۷) ۱۹		(۲۰) ۱۲					
۵≤		(۲۵) ۱۵		(۳) ۲					
سقط									
بله		(۳۰) ۱۸		(۲۳) ۱۴					
خیر		(۷۰) ۲		(۷۷) ۴۶					

* : تفاوت معنی دار

سابقه سرطان در خانواده مشاهده شد ($P=0/004$). هم چنین بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه شاهد از نظر سن تفاوت معنی داری مشاهده شد ($P=0/001$). نتایج در جدول شماره ۴ ارائه شده است.

بحث

در این مطالعه، سیستم های بیوانفورماتیک و مطالعات تجربی به منظور ارزیابی نقش بالقوه *ESR1* (بیان، بقا، بیان مشترک، تعامل و SNP) در توسعه سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه، *ESR1* یک نشانگر زیستی بالقوه با افزایش بیان در سرطان پستان است که توسط *hsa-miR-15a* و *OIP5-AS1* و *lncRNA* در بیماران مبتلا تنظیم می شود. *OIP5-AS1* یک ncRNA بالقوه و با افزایش بیان در بیماران سرطان پستان است که می تواند بیان *ESR1* را به طور غیرمستقیم (دریک مسیر *ceRNA*) کنترل کند. علاوه بر این، *OIP5-AS1* بیان مثبت معنی داری با *ESR1* در نمونه های سرطان پستان دارد. *OIP5-AS1* یک *lncRNA* مهم مرتبط با تومور است که در فرآیندهای سلولی پیچیده ای که در طول توسعه تومورهای بدخیم رخ می دهند، شرکت می کند. به عنوان مثال، تکثیر سلولی و آپوپتوز را در بدخیمی های مختلف، مانند آدنوکارسینوم ریه، پستان، گلیوما و هپاتوبلاستوما کنترل می کند. همچنین بیان کیناز مرتبط با سیکلین *GAK*، را که بر میتوز تأثیر می گذارد، سرکوب می کند (۳۱). قرار گرفتن مزمن در معرض کادمیوم به طور قابل توجهی بیان *OIP5-AS1* را در سلول های سرطان پروستات *PC3* و *DU145* افزایش داد. رشد سلولی و فروپتوز ناشی از کادمیوم توسط اختلال در تنظیم بیان *OIP5-AS1* رخ می دهد. با نشان دادن مکانیسم های درگیر، *OIP5-AS1* بیان *SLC7A11*، که یک نشانگر برای فروپتوز است، را با عمل مهار می کند. *miR-128-3p* کنترل کرد. با پیشروی فروپتوز، *miR-128-3p* سبب کاهش زنده ماندن سلولی

ارتباط ویژگی های اپیدمیولوژیک بیماران با خطر سرطان پستان، ارتباط شاخص توده بدنی (*BMI*)، استفاده از داروهای ضد بارداری خوراکی، زایمان قبلی و سقط جنین و هم چنین سابقه سرطان در اعضای خانواده، با خطر ابتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، هیچ ارتباطی بین مصرف قرص های ضد بارداری ($P=0/07$)، سابقه سقط قبلی ($P=0/5$)، سابقه زایمان ($P=0/22$) و شاخص توده بدنی ($P=0/2$) با خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد. با این حال، افزایش خطر ابتلا به سرطان در بین بیماران با

نیز شد (۳۲). در قلب موش‌های مبتلا به ایسکمی میوکارد/آسیب خون‌رسانی (MI/R) و سلول‌های H9c2 تحت درمان با OGD/R، بیان OIP5-AS1 کاهش یافت. بیان بیش از حد Oip5-as1 باعث کاهش آسیب میتوکندریایی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه کاهش آپوپتوز در موش‌های MI/R و سلول‌های H9c2 در معرض OGD/R شد. از طریق اعمال یک نقش RNA درون‌زاد رقابتی، Oip5-as1 به طور مکانیکی بیان miR-29a را کاهش داد (۳۳). بر خلاف miR-216a-5p، که دچار کاهش شد، OIP5-AS1 و GLO1 به طور قابل توجهی در بافت‌های توموری و رده‌های سلولی بیان شدند. تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطان پستان با ناک‌داون OIP5-AS1 مهار شد، اگر چه آپوپتوز آن‌ها تسریع شد (۳۴).

مطالعات قبلی نشان داد که با مهار بیان N-استیل ترانسفراز ۲، miR-15a-3p از آسیب کبدی ناشی از ایزوونایزید محافظت می‌کند (۳۵). miR-15a در مقاومت سلول‌های سرطانی غیر کوچک ریه به سیس پلاتین نقش دارد (۳۶). همچنین، این miRNA می‌تواند آپوپتوز را در رده‌های سلولی سرطان پستان انسان القا کند (۳۷). همبستگی انواع ESR1 و ESR2 و سرطان پستان و ویژگی‌های مرتبط در جمعیت زنان تونس، از جمله ۲۰۷ مورد سرطان پستان و ۲۸۴ فرد سالم، قبلاً مورد مطالعه قرار گرفت (۳۸). نتایج آن‌ها نشان داد که فراوانی آللی مینور (MAF) پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی rs2234693 و rs3798577 ژن ESR1 به طور قابل توجهی در بیماران مبتلا به سرطان پستان بالاتر بود که این نتایج مطابق با یافته‌های ما بود. برای روشن کردن ارتباط تنوع ژن ESR و خطر ابتلا به سرطان پستان، ارتباط سه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، rs2234693، rs1801132 و rs2046210 با سرطان پستان در یک مطالعه متاآنالیز، توسط Hu و همکاران (۳۹) بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که برای SNP rs2234693، ژنوتیپ CC در مقایسه با ژنوتیپ‌های TC و TT با خطر بالاتر

سرطان پستان همراه بود. همچنین برای rs2046210 SNP، خطر ابتلا به سرطان پستان برای ژنوتیپ‌های AA، GA و GA+GG بیشتر از ژنوتیپ GG گزارش شد. علاوه بر این، هیچ ارتباطی بین خطر سرطان پستان و SNP rs1801132 مشاهده نشد. همچنین گزارش شد که ارتباط SNP rs2234693 با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان به قومیت جمعیت‌ها بستگی دارد. بنابراین، این نتایج با یافته‌های ما مغایرتی نداشت.

در مطالعه مورد-شاهدی دیگری بر روی یک جمعیت چینی، روی ۶۱۴ بیمار سرطان پستان، ۴۶۷ فرد مبتلا به بیماری و ۸۷۹ زن سالم، ارتباط خطر ابتلا به سرطان پستان و شرایط فیروکیستیک پستان با ESR1 (rs2234693)، PvuII (rs9340799) و XbaI پلی مورفیسم‌های تکرار ((CAG)n) و تکرار ((GGC)n) بررسی شد (۴۰). بر اساس یافته‌ها، تنها ژنوتیپ‌های ((CAG)n) و ((GGC)n) با بیماری‌های پستان مرتبط بودند. گروه ژنوتیپی >(CAG) 24 >(CAG) 24 وقتی ((CAG)n) AR به شش گروه تقسیم شد و گروه >(CAG) 24 >(CAG) 24 به عنوان مرجع انتخاب شد، با افزایش خطر بیماری فیروکیستیک پستان (OR: ۱/۸، CI: ۹۵٪، ۱/۳-۳/۰)، مرتبط بود. علاوه بر این، در مقایسه با ژنوتیپ 17/(GGC) AR، ژنوتیپ 14/(GGC) GGC با خطر بیشتر سرطان پستان (OR: ۲/۶، CI: ۹۵٪، ۱/۳-۵/۴) و بیماری فیروکیستیک پستان (OR: ۲/۳، CI: ۹۵٪، ۱/۱-۴/۵) مرتبط بود. گزارش شده است که هاپلوتیپ‌های پلی‌مورفیک ESR1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط هستند (۴۱). این مطالعه ارتباط چهار SNP ESR1، rs746432، rs2234693، rs9340799 و rs1801132 را با خطر ابتلا به سرطان پستان در بین ۳۹۳ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۷۹۰ فرد سالم در ۱۱۸۳ زن قفقازی بالای ۶۵ سال ارزیابی کرد. نتایج آن‌ها نشان دهنده وجود یک اثر محافظت آللی برای SNP rs9340799 با میزان ۰/۸۲: OR بود (CI: ۹۵٪، ۰/۶۸-۱/۰۰)، همچنین،

آن ها هیچ ارتباط معنی داری بین سایر SNP های *ESR1* و سرطان پستان پیدا نکردند (۴۱). نتایج پژوهش حاضر با نتایج این مطالعه مطابقت داشت. ارتباط چندین عامل اپیدمیولوژیک با خطر ابتلا به سرطان پستان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیماران به طور قابل توجهی مسن تر از گروه شاهد بودند که نشان دهنده ارتباط افزایش سن با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان است. همچنین هیچ ارتباطی بین استفاده از داروهای ضدبارداری خوراکی و سرطان پستان مشاهده نشد. مطالعات قبلی هیچ ارتباطی را بین داروهای ضدبارداری خوراکی و خطر ابتلا به سرطان پستان گزارش نکردند که با یافته های ما مطابقت داشت (۴۲). گزارش شده است که هیچ ارتباطی بین خطر ابتلا به سرطان پستان با تعداد زایمان وجود ندارد. با این حال، محققان قبلی دریافتند که افزایش سن مادر در زایمان اول و دوم می تواند خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهد. همچنین، فاصله زیاد بین زایمان ها نیز با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط بود (۴۳). اگرچه ما هیچ ارتباطی بین سابقه زایمان قبلی با خطر ابتلا به سرطان پستان پیدا نکردیم، اما مطالعات بیشتر به منظور تعیین ارتباط تاریخیچه زایمان و خطر سرطان با توجه به سن تولد اول و دوم، فواصل زایمان و تعداد زایمان ممکن است مورد نیاز باشد. به طور مشابه، هیچ رابطه ای بین سابقه سقط جنین با خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد. مطالعات قبلی فقدان اثرات نامطلوب سقط جنین القایی یا خود به خودی را بر خطر ابتلا به سرطان پستان گزارش کردند که با نتایج ما مطابقت داشت (۴۴). نتایج بحث برانگیزی برای ارتباط بین شاخص توده بدنی (BMI) و خطر ابتلا به سرطان پستان وجود دارد. Zhu و همکاران (۴۵) گزارش کردند که BMI بالاتر می تواند با افزایش خطر ابتلا به تومورهای پستان قبل یا بعد از یائسگی مرتبط باشد. درمقابل، برخی از مطالعات نه تنها هیچ اثر نامطلوب BMI بالا بر سرطان پستان پیدا نکردند، بلکه یک اثر محافظتی BMI بالاتر برای سرطان پستان در

زنان پیش از یائسگی را گزارش کردند (۴۶). با این حال، ما هیچ ارتباطی بین BMI و خطر ابتلا به سرطان پستان پیدا نکردیم. این اختلاف می تواند با تفاوت جمعیت، سن، قومیت و غیره جمعیت های مورد مطالعه مرتبط باشد.

در این مطالعه، ارتباط قابل توجهی بین خطر سرطان پستان و سابقه سرطان در اعضای خانواده بیماران مشاهده شد که نقش عوامل ژنتیکی شناخته شده و ناشناخته را در ایجاد سرطان پستان نشان می دهد. د رتوافق با یافته های ما، Colditz و همکاران (۲۰۱۲) (۴۷) دریافتند زنانی که در اعضای خانواده آن ها قبل از ۵۰ سالگی سرطان پستان تشخیص داده شده بود، در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان پستان بودند.

در این مطالعه، ما برای اولین بار یک ceRNA تنظیمی بالقوه جدید (*ESR1*/miR-15a-3p/OIP5-) را در بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان دادیم. هیچ مطالعه قبلی در مورد احتمال بیان هم زمان و تعامل *ESR1* و *OIP5-AS1* در بیماران سرطان پستان وجود نداشت. هر دو *ESR1* و *OIP5-AS1* افزایش قابل توجهی در بیماران داشتند. بنابراین، این مسیر تنظیمی می تواند یک هدف درمانی جدید برای درمان سرطان پستان در نظر گرفته شود. توصیه می شود که تعامل مستقیم و غیرمستقیم *miR-15a-3p*، *OIP5-AS1* و *ESR1* با یک روش تجربی، به عنوان مثال RIP، سنجش لوسیفراز و غیره، برای یافتن اطلاعات دقیق در مورد فرآیندهای تنظیمی برای سطح بیان *ESR1* ارزیابی شود. هم چنین، پیشنهاد می شود که سطح بیان *OIP5-AS1* و *miR-15a-3p* با روش های تجربی (مانند qRT-PCR) در انواع مختلف سرطان (بافت یا رده های سلولی) جمعیت های مختلف برای یافتن الگوهای دقیق بیان RNA های ذکر شده در انواع سرطان انسان ارزیابی شود.

مطالعه ما نشان داد که *OIP5-AS1* lncRNA می تواند سطح بیان *ESR1* را در یک مسیر ceRNA، به

عنوان یک lncRNA دارای افزایش بیان، تنظیم کند. در این مطالعه برای اولین بار بیان مشترک قابل توجهی از lncRNA OIP5-AS1 و ESR1 نشان داده شده است. علاوه بر این، این مطالعه نشان داد که فراوانی SNP ESR1 rs2234693 در بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم به طور معنی داری متفاوت بود و ژنوتیپ‌های CC+TC و CC با خطر بالاتر ابتلا به سرطان پستان مرتبط بودند. همچنین، بین سابقه سرطان پستان در اعضای خانواده با خطر ابتلا به سرطان پستان ارتباط معنی داری مشاهده شد، در حالی که چندین عامل اپیدمیولوژیک از جمله BMI، زایمان و سقط جنین و داروهای ضد بارداری خوراکی با خطر ابتلا به سرطان پستان ارتباطی نداشتند. با این حال، نتایج این پژوهش به جمعیت مورد مطالعه محدود می شود و تحقیقات بیشتر شامل جمعیت های بزرگ تر با قومیت های مختلف برای بررسی ارتباط SNP ESR1 rs2234693 با خطر سرطان پستان مورد نیاز است.

در دسترس بودن داده ها

مجموعه داده های مورد استفاده و یا تجزیه و تحلیل شده در طول مطالعه جاری در صورت درخواست معقول از نویسنده مسئول در دسترس است.

منافع رقابتی

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ منافع رقابتی ندارند.

مشارکت نویسندگان

طراحی مطالعه: AS و MSHL. روش شناسی: MSHL؛ تحلیل و بررسی: MSHL، PM و FA. تهیه پیش نویس اصلی: PM؛ تدوین: AS؛ منابع: PM و MSHL. نظارت: AS، FA و MSHL.

سپاسگزاری

تأییدیه اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد: IR.MAZUMS.REC.1397.3228) دریافت شد. از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران از مطالعه حاضر کمال تشکر را داریم.

References

1. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol* 2009; 20(3): 556-563.
2. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V, et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980–2007. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 3: iii14-20.
3. Wolman I. Berek and Novak's Gynecology 15th Edition: Lippincott Williams and Wilkins, 2012, 1560 pp, Hardcover, Rs. 2659 on www.flipkart.com, ISBN-139788184736106, ISBN-10818473610X. *J Obstet Gynaecol India*. 2014;64(2):150-151. doi:10.1007/s13224-014-0538-z
4. Jarvandi S, Montazeri A, Harirchi I, Kazemnejad A. Beliefs and behaviours of Iranian teachers toward early detection of breast cancer and breast self-examination. *Public Health* 2002; 116(4): 245-249.
5. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PDP, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007; 447(7148):1087-U7.
6. Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids* 2011; 2011: 812540.
7. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19(4): 833-842.

8. Foidart JM, Colin C, Denoo X, Desreux J, Béliard A, Fournier S, et al. Estradiol and Progesterone Regulate the Proliferation of Human Breast Epithelial Cells 1. *Fertil Steril* 1998; 69(5): 963-969.
9. Abbasi S, Yaripour H, Rasouli M. Study of estrogen receptor- α A908G (K303R) mutation with breast cancer risk. *Iran J Breast Dis* 2014; 7(3): 30-42.
10. Roodi N, Bailey LR, Kao WY, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, et al. Estrogen Receptor Gene Analysis in Estrogen Receptor-Positive and Receptor-Negative Primary Breast Cancer. *J Nation Cancer Ins* 1995; 87(6): 446-451.
11. Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, Pereira D, Carrilho S, Palmeira C, Azevedo C, Lopes CS. Analysis of Estrogen Receptor Polymorphism in Codon 325 by PCR-SSCP in Breast Cancer: Association With Lymph Node Metastasis. *Breast J* 2002; 8(4): 226-229.
12. Naeemi S, Ghiam AF, Mojtahedi Z, Dehaghani AS, Amani D, Ghaderi A. Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128(1): 5-9.
13. Allahdini M, Kamalidehghan B, Akbari L, Azadfar P, Rahmani A, Ahmadipour F, et al. Prevalence of the rs7903146C>T polymorphism in *TCF7L2* gene for prediction of type 2 diabetes risk among Iranians of different ethnicities. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 5835-5841.
14. Yoo SS, Choi JE, Lee WK, Choi YY, Kam S, Kim MJ, et al. Polymorphisms in the CASPASE genes and survival in patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(34): 5823-5829.
15. Clarke C, Madden SF, Doolan P, Aherne ST, Joyce H, O'driscoll L, et al. Correlating transcriptional networks to breast cancer survival: a large-scale coexpression analysis. *Carcinogen* 2013; 34(10): 2300-2308.
16. Davis S, Meltzer PS. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics* 2007; 23(14): 1846-1847.
17. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(7): e47.
18. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed inform* 2011; 44(5): 839-847.
19. Dweep H, Gretz N. miRWalk2. 0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 2015; 12(8): 697.
20. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS ONE* 2018; 13(10): e0206239.
21. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Tastsoglou S, Skoufos G, Karavangeli A, Pierros V, Zacharopoulou E, Hatzigeorgiou AG. DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic Acids Res* 2020; 48(D1): D101–D110.
22. Otasek D, Morris JH, Bouças J, Pico AR, Demchak B. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis. *Genome Biology* 2019; 20(1).
23. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13(11): 2498-2504.

24. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1): 27-30.
25. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res* 2021; 49(D1): D545-D551.
26. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013; 128(14).
27. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids Res* 2016; 44(W1): W90-W97.
28. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(suppl_1): D412-D416.
29. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(W1): W556-W560.
30. Wójcik AM. Research Tools for the Functional Genomics of Plant miRNAs During Zygotic and Somatic Embryogenesis. *Int J Mol Sci* 2020; 21(14): 4969.
31. Li Y, Han X, Feng H, Han J. Long noncoding RNA OIP5-AS1 in cancer. *Clin Chim Acta* 2019; 499: 75-80.
32. Zhang Y, Guo S, Wang S, Li X, Hou D, Li H, et al. LncRNA OIP5-AS1 inhibits ferroptosis in prostate cancer with long-term cadmium exposure through miR-128-3p/SLC7A11 signaling. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021; 220: 112376.
33. Niu X, Pu S, Ling C, Xu J, Wang J, Sun S, et al. lncRNA Oip5-as1 attenuates myocardial ischaemia/reperfusion injury by sponging miR-29a to activate the SIRT1/AMPK/PGC1 α pathway. *Cell Prolif* 2020; 53(6): e12818.
34. Wu Z, Liu Y, Wei L, Han M. LncRNA OIP5-AS1 Promotes Breast Cancer Progression by Regulating miR-216a-5p/GLO1. *J Surg Res* 2021; 257: 501-510.
35. Li X, Zhang H, Xu L, Jin Y, Luo J, Li C, et al. miR-15a-3p Protects Against Isoniazid-Induced Liver Injury via Suppressing N-Acetyltransferase 2 Expression. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 752072.
36. Bozok Çetintaş V, Tetik Vardarlı A, Düzgün Z, Tezcanlı Kaymaz B, Açıkgöz E, Aktuğ H, et al. miR-15a enhances the anticancer effects of cisplatin in the resistant non-small cell lung cancer cells. *Tumor Biol* 2016; 37(2), 1739-1751.
37. Druz A, Chen YC, Guha R, Betenbaugh M, Martin SE, Shiloach J. Large-scale screening identifies a novel microRNA, miR-15a-3p, which induces apoptosis in human cancer cell lines. *RNA Biol* 2013; 10(2): 287-300.
38. Ghali RM, Al-Mutawa MA, Al-Ansari AK, Zaied S, Bhiri H, Mahjoub T, et al. Differential association of ESR1 and ESR2 gene variants with the risk of breast cancer and associated features: A case-control study. *Gene* 2018; 651: 194-199.
39. Hu X, Jiang L, Tang C, Ju Y, Jiu L, Wei Y, et al. Association of three single nucleotide polymorphisms of ESR1 with breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *J Biomed Res* 2017; 31(3), 213-225.
40. Sakoda LC, Blackston CR, Doherty JA, Ray RM, Lin MG, Gao DL, et al. Selected Estrogen Receptor 1 And Androgen Receptor

- Gene Polymorphisms In Relation To Risk Of Breast Cancer And Fibrocystic Breast Conditions Among Chinese Women. *Cancer Epidemiol* 2011; 35(1):48-55.
41. Wang J, Higuchi R, Modugno F, Li J, Umblas N, Lee J, et al. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106(2):273-280.
 42. Marchbanks PA, Curtis KM, Mandel MG, Wilson HG, Jeng G, Folger SG, et al. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. *Contraception* 2012; 85(4): 342-350.
 43. Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvåle G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Brit J Cancer* 2005; 92(1): 167-175.
 44. Reeves GK, Kan SW, Key T, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, et al. Breast cancer risk in relation to abortion: Results from the EPIC study. *Int J Cancer* 2006; 119(7): 1741-1745.
 45. Zhu K, Caulfield J, Hunter S, Roland CL, Payne-Wilks K, Texter L. Body mass index and breast cancer risk in African American women. *Ann Epidemiol* 2005; 15(2): 123-128.
 46. Liu K, Zhang W, Dai Z, Wang M, Tian T, Liu X, Kang H, Guan H, Zhang S, Dai Z. Association between body mass index and breast cancer risk: evidence based on a dose-response meta-analysis. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 143-151.
 47. Colditz GA, Kaphingst KA, Hankinson SE, Rosner B. Family history and risk of breast cancer: Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133(3): 1097-1104.