

Study of down regulation of *IL-37* expression in breast cancer tumoral tissues and its association with grade 3 tumor

Marzieh Ghafari Farsani¹, Somayeh Reisi², Maryam Peymani³

1.M.Sc Student in Genetics, Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

2.Assistant Professor, Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, tel:038-3232440, E-mail: s.reisi@sku.ac.ir

3.Assistant Professor, Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Nowadays, breast cancer is the most common cancer among women in the world. Considering the high prevalence, identification of diagnostic markers can be useful for early diagnosis and cancer management. In recent years many studies have been conducted to determine the role of cytokines in cancers, but role of *IL-37* in breast cancer has not been determined, yet. The aim of this study was to investigate *IL-37* expression in tumor tissues from breast cancer patients and its relationship with pathologic and clinical symptoms.

Material and Methods: In this case-control study we examined 50 formalin-fixed paraffin embedded tumoral tissues from breast cancer patients and 50 non-tumoral adjacent tissues. After informed consent, clinical information of the samples were recorded. Total RNA was extracted and complementary DNA (cDNA) was synthesized. Then, the relative gene expression was determined by using quantitative real-time RT PCR (qRT-PCR) and evaluated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Finally, the expression pattern was analyzed by statistical analysis.

Results: The results of this study indicated that, the mean relative expression of *IL-37* in tumor tissues was significantly lower than that in adjacent healthy tissues and there was statistically a significant difference between them with a 95% confidence level ($P = 0.003$). The results also indicated a significant decrease in the expression of this cytokine in the tumoral tissues with sizes of $>3\text{cm}$ ($P = 0.02$). The reduction in gene expression was clearly observed in the tumors of grade 2 and 3, which showed a significant relationship between gene expression and grade 3 tumors ($P = 0.0001$).

Conclusion: The results of this study revealed *IL-37* can be regarded as a potentially sensitive and valuable biomarker for diagnosis of breast cancer and also tumor size determination. The results of this study can also be used in clinical and diagnostic studies on breast cancer.

Key Words: Breast cancer, *IL-37*, Gene expression, Real time PCR

Received: Dec 26, 2017

Accepted: July 23, 2018

بررسی کاهش بیان IL-37 در بافت های توموری سرطان سینه و همراهی آن با درجه 3 توموری

مرضیه غفاری فارسانی¹، سمیه رئیسی²، مریم پیمانی³

1. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

2. استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، تلفن ثابت: 038-3232440، s.reisi@sku.ac.ir

3. استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: امروزه سرطان سینه شایع ترین سرطان در میان زنان دنیا است. علیرغم شیوع بالا، شناسایی مارکرهایی که بتواند در تشخیص به موقع بیماری کمک کنند، بسیار مفید خواهد بود. با این وجود که در سالهای اخیر تحقیقات بسیاری در جهت تعیین نقش سایتوکاین ها در سرطان ها صورت گرفته است، نقش فاکتور IL-37 در سرطان سینه مشخص نشده است. ازاینرو در این مطالعه به بررسی میزان بیان IL-37 در بافت توموری سرطان سینه و ارتباط آن با علائم پاتولوژی بالینی، پرداخته شده است.

روش بررسی: در این مطالعه، 50 بافت پارافینه سرطان سینه و 50 بافت سالم مجاور آن وارد شدند. بعد از تکمیل رضایت نامه، اطلاعات بالینی مربوط به تمام نمونه ها گرفته شد. پس از استخراج RNA تام و سنتز DNA مکمل (cDNA)، بیان نسبی ژن با استفاده از روش کمی Real-time PCR (qRT-PCR) سنجیده و بوسیله روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ارزیابی شد. نهایتاً الگوی بیانی توسط آنالیزهای آماری بررسی شد.

یافته ها: نتایج حاصل از بررسی اخیر نشان دادند که میانگین بیان نسبی ژن IL-37 در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور دارای کاهش مشخصی می باشد و با درجه اطمینان 95 درصد اختلاف بسیار معناداری بین آنها وجود دارد ($P=0/003$). نتایج همچنین حاکی از کاهش بیان قابل توجهی در اندازه تومور بزرگتر از 3 سانتی متر هستند و ارتباط معناداری برای این اختلاف میزان بیان مشاهده شد ($P=0/02$). در این بررسی کاهش بیان ژن در درجه توموری 2 و 3 به طور واضح مشاهده شد که ارتباط بسیار معناداری بین میزان بیان ژن و درجه توموری 3 مشخص شد ($P=0/000$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از مطالعه حاضر IL-37 را به عنوان بیومارکری حساس و ارزشمند در تشخیص ابتلا به سرطان سینه و بیومارکر جهت تشخیص اندازه تومور معرفی کرده است. به طوری که IL-37 دارای پتانسیل کاربرد در آزمایشگاه های بالینی جهت تشخیص سرطان سینه است، همچنین یافته های حاصل از این بررسی می تواند در پژوهش های بالینی و تشخیصی مربوط به سرطان سینه به کار گرفته شوند.

کلمات کلیدی: سرطان سینه، IL-37، بیان ژن، Real time PCR

وصول مقاله: 96/10/5 اصلاحیه نهایی: 97/4/10 پذیرش: 97/5/1

مقدمه

امروزه سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در میان زنان دنیا است و مرگ ناشی از آن بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان را در زنان تشکیل می‌دهد (1). براساس آمار منتشر شده در سازمان بهداشت جهانی در سال 2014 سرطان سینه پس از سرطان ریه و برونش فراوانترین نوع سرطان در میان زنان جهان است. این درحالی است که سرطان سینه در ایران شایع‌ترین و خطرناک‌ترین سرطان زنان می‌باشد (2). این سرطان سالانه 10٪ از کل سرطان‌های جدید شناسایی شده در جهان را شامل شده است (3). در ایران نیز این سرطان عامل حدوداً 21 درصد کل بدخیمی‌ها در زنان می‌باشد و نکته قابل توجه در اینجا این است که زنان ایرانی حدوداً یک دهه زودتر دچار این بیماری می‌شوند و مطابق با بررسی‌های انجام شده در میان زنان ایرانی، نشان داده شده است که نوع سرطان در آنها به صورت خانوادگی و ژنتیکی بوده و این فاکتور خطر در آنها بیشتر می‌باشد (4). علیرغم شیوع بالا، اگر بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، درمان پذیر است. بنابراین هدف از غربالگری، تشخیص بیماری در زمانی است که هنوز به مرحله‌ی متاستاتیک نرسیده است. غربالگری به کمک ماموگرافی، سونوگرافی و تصویربرداری رزونانس مغناطیسی¹ میسر می‌شود (5). پس از آن مشخص شدن اساس مولکولی فرآیندهای درگیر در شروع و پیشرفت تومورهای سینه در درمان موثر آن، ضروری است (6). از طرف دیگر علاوه بر شناسایی مکانیسم بیماری، شناسایی مارکرهایی که بتواند در تشخیص زودتر بیماری کمک کند، بسیار مفید خواهد بود (7). تحقیقات بسیاری در جهت تعیین نقش سایتوکاین‌ها در سرطان‌ها از جمله سرطان سینه صورت گرفته است، به طوری که سایتوکاین‌های گوناگون به عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی در بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. IL-37 از جمله سایتوکاین‌هایی است که در بیماری‌های

خودایمنی و التهابی به عنوان سایتوکاین تنظیم‌گر التهابی مورد توجه قرار گرفته است (8).

اینترلوکین 37 (IL-37)، یکی از اعضای خانواده اینترلوکینی 1 می‌باشد که قبلاً به عنوان IL-1F7 شناخته می‌شد (9). این اینترلوکین برای اولین بار در سال 2000، توسط بررسی در پایگاه داده‌های ژنومی مورد شناسایی قرار گرفت. ژن IL-37 بر روی کروموزوم شماره 2 قرار گرفته است و یک پروتئین 17 تا 26 کیلودالتونی را کد می‌کند (10). پنج واریانت مختلف برای IL-37 وجود دارد که به ترتیب از a تا e نامگذاری شده‌اند. انواع a، -b و d به عنوان ایزوفرم‌های عملکردی برای IL-37 شناخته شده‌اند (11). IL-37 به عنوان یک مهارکننده طبیعی ایمنی ذاتی و پاسخ‌های التهابی شناسایی شده است و مطالعات مختلفی اثر ضدالتهابی آن را در کولیت، زخم‌های التهابی کبدی، حساسیت‌های تماسی و دیگر بیماری‌ها گزارش کرده‌اند (12 و 13 و 8). مشخص شده است که IL-37 تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را مهار کرده، اما سایتوکاین‌های ضد التهابی را مهار نمی‌کند. این اینترلوکین همچنین فعال شدن سلول‌های دندریتیک را مهار کرده و در ایمنی اکتسابی نقش دارد (14). عملکرد اولیه IL-37، کاهش التهاب اضافی توسط یک مکانیسم فیدبک منفی است که به این صورت هم در ایمنی ذاتی و هم اکتسابی نقش دارد (15). طبق بررسی‌هایی که بر روی عملکرد بیولوژیکی IL-37 در سرطان دهانه رحم انجام گرفته است، مشخص شد که این سایتوکاین به عنوان یک مهارکننده ایمنی ذاتی و اکتسابی عمل می‌کند (16). همچنین در مطالعه‌ای بر روی سرطان کبد نشان داده شد که بیان IL-37 در بافت توموری سرطان کبد کاهش می‌یابد و سطح بیان با اندازه تومور ارتباط منفی دارد و از طرفی سطح بالای IL-37 با بهبود بقای کلی از بیماری در ارتباط بوده است (17). در سرطان ریه‌ی سلول‌های غیر

¹ MRI: Magnetic Resonance Imaging

RNA تام سلولی توسط کیت MN (Nucleo Spintotal RNA FFPE-Germany) استخراج و بر اساس دستورالعمل کیت خالص سازی شد. بدین منظور ابتدا پارافین زدایی از برش های بافتی انجام شده و سپس سایر مراحل استخراج بر روی بافت بدون پارافین صورت گرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت RNA های استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد (Nanodrop 2000, Thermo FisherScientific, Wilmington, DE, USA). RNA های بدست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای 70- درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در مرحله بعد سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت مخصوص سنتز DNA مکمل (Takara, Clontech) انجام شد. دستورالعمل کیت شامل دو مرحله است: مرحله اول اضافه کردن پرایمرهای هگزامر تصادفی و oligo-dt همراه با آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Prime Script RT) و مرحله دوم انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه و در ادامه به مدت 5 ثانیه در دمای 85 درجه سانتیگراد. در این مرحله cDNA ساخته شده باید به فریزر منتقل شود، از cDNA ساخته شده برای انجام Real time PCR استفاده شد (19).

کوچک² (NSCLC) که حدود 85٪ از سرطان های ریوی را در بر می گیرد اینترلوکین 37 به عنوان سرکوبگر تومور از طریق مهار رگ زایی عمل می کند (18). IL-37 به دلیل شناسایی جدید، کارهای زیادی بر روی آن انجام نشده است و عملکرد این اینترلوکین در سرطان ها تا حد زیادی ناشناخته مانده است. از جمله این موارد می توانیم به سرطان سینه اشاره کنیم. بنابراین مشخص کردن عملکرد و مکانیسم آن در سرطان می تواند سبب شود این فاکتور به عنوان یه هدف درمانی یا دارویی در نظر گرفته شود. از اینرو هدف این مطالعه بررسی میزان بیان IL-37 در بافت توموری سرطان سینه و ارتباط آن با علائم کلینوپاتولوژی بوده است. با این وجود بررسی در سطوح بالاتر مانند مدل های حیوانی سرطان سینه در آینده ضروری می باشد.

روش بررسی

مطالعه حاضر یک مطالعه مورد-شاهدی می باشد. در این مطالعه برای بررسی بیان ژنی از بافت های پارافینه سرطان سینه استفاده شد. به طوری که برای بررسی 50 بافت توموری سرطان سینه و 50 بافت غیرتوموری مجاور آن انتخاب شدند (نمونه ها به صورت تصادفی و از آزمایشگاه پاتولوژی الزهرا اصفهان تهیه گردید). نمونه ها از بلوک های پارافینه بدست آمدند، که برش های 20 میکرومتری از آنها تهیه و در میکروتیوپ های 2 سی سی استریل قرار داده شد. نمونه ها تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در دمای 20- درجه ی سانتیگراد نگهداری شدند. از تمام بیماران در دسترس فرم رضایت نامه دریافت گردید و علاوه بر سن، اطلاعات پاتولوژی و بالینی بیماران مانند اندازه تومور، متاستاز و درجه توموری نیز برای هر نمونه مشخص شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA:

² Non- Small Cell lung Cancer

جدول 1- توالی های پرایمرهای استفاده شده در مطالعه.

نام ژن	توالی 5'-3'	اندازه محصول
بتا اکتین	F: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	184 جفت باز
IL-37	F: ACATGTACAGTTCCCCTGCC R: AGCGAGGAAGGCGTTCAATG	146 جفت باز

جهت بررسی آماری داده ها، از نرم افزار SPSS نسخه 22 (SPSS v.22 Inc., Chicago, IL) استفاده شد.

آزمون آماری t-test برای تعیین معنی دار بودن میزان بیان ژن ها در نمونه های توموری و غیرتوموری و بررسی گروه های سنی، اندازه تومور و متاستاز استفاده شد. برای بررسی ارتباط میزان بیان ژن و درجه توموری از روش ANOVA استفاده شد (20). سطح معنی داری برای محاسبات آماری کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Graph Pad Prism 7 استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه 50 بافت توموری سرطان سینه به همراه بافت سالم مجاور آن، با میانگین سنی $45/95 \pm 1/42$ سال وارد شدند. در نمونه های مورد بررسی 21 نمونه دارای اندازه تومور 3 سانتی متر و کوچکتر بودند و 29 نمونه اندازه تومور بیشتر از 3 سانتی متر بود. تعداد 27 نمونه دچار متاستاز به گره های لنفی شده بودند و اکثر نمونه ها در درجه 2⁴ توموری قرار داشتند (52/5 درصد). جدول 2 خلاصه ای از اطلاعات کلینوپاتولوژی مربوط به نمونه های مورد بررسی را ارائه می دهد.

طراحی پرایمرها و بررسی بیان ژن با qReal time PCR: طراحی پرایمر برای ژن های بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی واکنش و IL-37 طبق توالی بدست آمده از پایگاه Ensemble توسط نرم افزار Oligo V.7.0 انجام شد (جدول 1). سپس برای اطمینان از اختصاصی بودن محل اتصال پرایمرها از سرور BLAST استفاده شد. بررسی بیان ژن با روش qRT-PCR به وسیله دستگاه Rotor-gene 6000 (Qiagen, Hildn, Germany) انجام شد. واکنش برای ژن IL-37 و ژن رفرنس بتا اکتین در حجم 20 میکرولیتر به صورت SYBR premix Ex taqII (YTA) به مقدار 10 میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و معکوس (10 پیکومولار) هر کدام به مقدار 0/3 میکرولیتر، 2 میکرولیتر از cDNA رقیق شده که در نهایت با آب عاری از نوکلئاز به حجم مورد نظر رسید. دمای انجام واکنش در دستگاه به صورت زیر تنظیم شد: دناتوراسیون اولیه 95 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه، 40 سیکل واکنش تکثیر شامل 15 ثانیه دناتوراسیون در دمای 95 درجه سانتیگراد، 20 ثانیه دمای اتصال پرایمرها در 60 درجه سانتیگراد و دمای طولی سازی قطعات 20 ثانیه در 72 درجه سانتیگراد. مرحله ذوب³ برای محصولات در دمای 95-72 درجه سانتیگراد انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از واکنش، از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$

استفاده شد و سپس الگوی بیانی توسط آنالیزهای آماری بررسی شد.
آنالیزهای آماری:

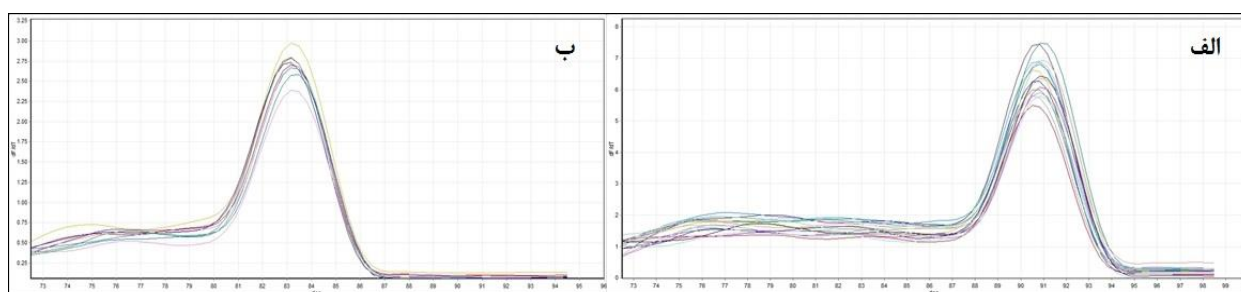
⁴Grade³Melting

جدول 2. خلاصه ای از اطلاعات کلینوپاتولوژی مربوط به نمونه های بررسی شده.

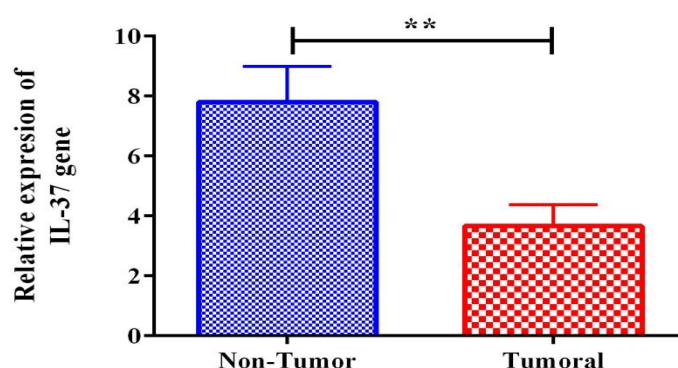
اطلاعات بالینی بیماران		
45/1±95/42	میانگین سنی	
21	3 cm ≥	میانگین اندازه تومور
29	3 cm <	
27	مثبت	متاستاز به گره های لنفی
23	منفی	
13	1	درجه توموری
21	2	
16	3	

بیان نسبی ژن *IL-37* در بافت های توموری نسبت به بافت غیر توموری، توسط آزمون *t* مشخص شد که میانگین بیان نسبی ژن *IL-37* در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور دارای کاهش مشخصی می باشد و با درجه اطمینان 95 درصد اختلاف بسیار معناداری بین آنها وجود دارد ($P=0/003$) (شکل 3).

برای بررسی بیان ژن از روش qRT-PCR استفاده شد که منحنی ذوب ژن کنترل داخلی (بتا اکتین) و ژن اختصاصی (*IL-37*) به صورت تک قله بدست آمد. شکل 2، نمودار ذوب مربوط به ژن اختصاصی را نشان می دهد. پس از بدست آوردن اطمینان از اختصاصی بودن محصول و بهینه بودن شرایط واکنش، واکنش های RT-Real time PCR برای تمامی نمونه ها انجام شد. در مقایسه میانگین



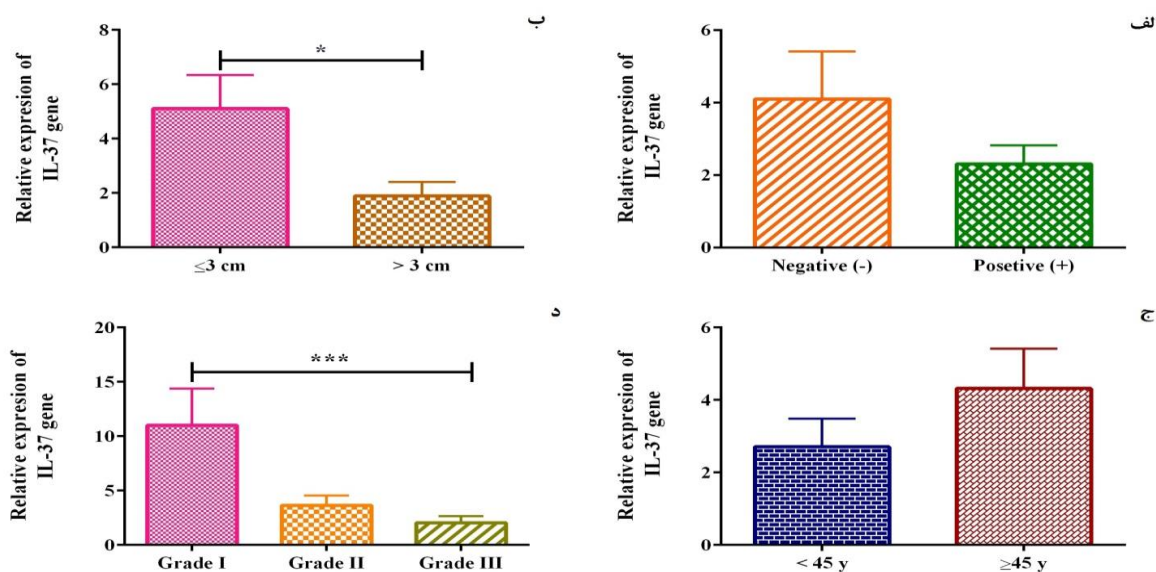
شکل 2. الف) نمودار ذوب ژن بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی. ب) نمودار ذوب ژن *IL-37*. وجود یک قله در نمودار به معنی اختصاصی بودن پرایمرها می باشد.



شکل 3. نمودار مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *IL-37* در بافت های توموری و غیر توموری مجاور آن در سرطان سینه.

معناداری برای این اختلاف در میزان بیان هم مشاهده شد ($P=0/02$) (شکل 4 ب). در بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان ژن *IL-37* در افراد کوچکتر از 45 سال کاهش بیان ژن قابل مشاهده بود، ولی از نظر آماری اختلاف معناداری میان دو گروه سنی زیر 45 سال و بالای 45 سال مشاهده نشد ($P=0/23$) (شکل 4 ج). برای مشخص کردن همراهی بین بیان ژن و درجه توموری از آزمون ANOVA استفاده شد. در این بررسی کاهش بیان ژن در درجه توموری 2 و 3 به طور واضح مشاهده شد که ارتباط بسیار معناداری بین میزان بیان ژن و درجه توموری 3 نشان داده شد ($P=0/001$) (شکل 4 د).

در بررسی ارتباط میان بیان نسبی ژن *IL-37* و میزان متاستاز به گره های لنفی مشخص شد که، بیان ژن در تومورهای متاستاز دهنده نسبت به حالت عدم متاستاز کاهش داشته است، ولی این تفاوت بیان در دو گروه مورد بررسی، از نظر آماری ارتباط معناداری را نشان نداد ($P=0/16$) (شکل 4 الف). از اینرو نتایج نشان دادند که میزان بیان ژن *IL-37* مستقل از پارامتر متاستاز در نمونه های واجد سرطان سینه است. برای مشخص کردن ارتباط بیان ژنی با اندازه تومور، با توجه به میانگین بدست آمده، نمونه ها به دو دسته اندازه تومور برابر 3 یا کوچکتر و دسته بزرگتر از 3 تقسیم شدند. در این بررسی کاهش بیان قابل توجهی در اندازه تومور بزرگتر از 3 مشخص شد و از نظر آماری ارتباط



شکل 4. نمودار ستونی مقایسه میزان بیان نسبی ژن *IL-37* در (الف) بافت های با متاستاز منفی و مثبت، (ب) اندازه توموری در تومورهای با اندازه مساوی 3 یا کوچکتر و اندازه بزرگتر از 3، (ج) گروه های سنی زیر 45 یا برابر 45 سال و بالای آن، (د) درجه توموری.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر تغییرات بیان ژن *IL-37* در بیماران مبتلا به سرطان سینه و ارتباط بیان آن با فاکتورهای سن، متاستاز، اندازه تومور، درجه و مرحله تومور در نمونه های سرطانی و سالم بررسی شده است. نتایج بررسی تغییرات بیان ژن *IL-37* در نمونه های توموری و غیر توموری نشان دادند که، در نمونه های توموری بیان ژن *IL-37* به صورت معناداری کاهش یافت. از طرفی در مطالعه حاضر، کاهش بیان ژن در درجه توموری 2 و 3 به طور واضح مشاهده شد که ارتباط بسیار معناداری بین میزان بیان ژن و درجه توموری 3 نشان داده شد. درجه بندی تومور، برای توصیف وسعت و شدت سرطان در یک شخص به کار می رود، به طوری که شناخت درجه بیماری به طرح درمان و تخمین پیش بینی درمان فردی، کمک می کند. سیستم های درجه بندی تومور بر اساس نوع سرطان متفاوت است. سلول و بافت های توموری با درجه 3 مانند سلول و بافت های طبیعی به نظر نمی رسند و سرعت رشد و گسترش آنها نسبت به درجه های پایین تر، بیشتر است (21).

بررسی مطالعات گذشته بر روی تغییرات بیان ژن *IL-37* در انواع مختلف سرطان نشان می دهد که نتایج مطالعات حاضر در توافق کامل با نتایج به دست آمده از سایر پژوهش های بالینی می باشد به طوری که مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققین مؤید نقش *IL-37* به عنوان یک مارکر تشخیصی در سرطان سینه هستند. برای نمونه تحقیقات Impellizzeri و همکاران در سال 2015 با توجه به فعالیت ضد توموری *IL-37* در سرطان، نشان دادند که بیان ژن *IL-37* به طور قابل توجهی در سرم بیماران مبتلا به کارسینومای سلول کلیوی⁵ کاهش می یابد، از سوی دیگر بررسی اثر فاکتور سن فرد بیمار بر روی میزان بیان *IL-37* در نمونه های توموری نشان می دهد که میزان بیان ژن *IL-37* در افراد بالای 45 سال و افراد دارای سن زیر 45 سال اختلاف معناداری ندارد. از طرفی بررسی آماری ارتباط بیان ژن *IL-37* با متاستاز نشان داد که بیان این ژن در نمونه های متاستاز مثبت و متاستاز منفی دارای اختلاف

⁵ RCC: Renal Cell Carcinoma

سلول‌های سرطانی می‌گردد. از طرفی آزمایشات انجام گرفته در محیط *in vivo* نشان دادند که IL-37 باعث سرکوب رشد تومور و همچنین بیان ژن IL-6 و HIF-1A می‌گردد (26). در طی تحقیقات گذشته نشان داده شده است که بین بیان IL-37 و رگ زایی در تومور یک همبستگی منفی وجود دارد و در نمونه‌های انسانی مشخص شد که IL-37 یک نقش مهاري در رگ زایی تومور ایفا می‌کند اما مکانسیم‌های دقیق که توسط آن IL-37 منجر به توقف رگ زایی می‌شود هنوز مشخص نمی‌باشد (14). علاوه بر این مقایسه‌ی آماری ارتباط بیان ژن IL-37 با اندازه تومور در این پژوهش نشان داد که بیان ژن IL-37 در نمونه‌های توموری با سایز بزرگ‌تر از 3 سانتی‌متر به صورت معناداری کمتر از نمونه‌های توموری با سایز کوچک‌تر از 3 سانتی‌متر است. طی پژوهش‌های انجام شده توسط Sharma و همکارانش در سال 2008 و همچنین Ding و همکارانش در سال 2016 نشان داده شد که سطح بیان ژن IL-37 به طور قابل توجهی به صورت منفی با اندازه تومور در کارسینومای سلول کبدی (HCC) ارتباط دارد (27-29). مطابق با این پژوهش، نتایج بررسی ارتباط بیان ژن IL-37 با درجه تومور نشان داد که بیان ژن IL-37 ارتباط معناداری با درجه تومور ندارد و مستقل از درجه تومور است. در مطالعه‌ی Wang و همکارانش در سال 2017 نشان دادند که IL-37 تکثیر سلولی و متاستاز سرطان دهانه رحم را سرکوب کرده که STAT3 در این فرآیند نقش دارد. نهایتاً در این مطالعه، IL-37 به عنوان یک سایتوکاین ضدسرطان نشان داده شده است که یک پتانسیل مولکولی درمانی برای سرطان دهانه رحم پیشنهاد کرده است. به طوری که در این پژوهش مشخص گردید که IL-37 تکثیر سلولی را سرکوب می‌کند و به سرطان دهانه رحم انسان از طریق مهار مسیر STAT3 حمله می‌کند (30). علاوه بر مطالعات صورت گرفته بر روی نقش IL-37 در تومورهای انسانی، مطالعات متعدد نشان می‌دهد

معنی داری نمی‌باشد (22). علاوه بر این مطالعات Cavalli و همکاران در سال 2016 نشان داد که سطح بیان IL-37 در بیماران مبتلا به سرطان کلیه به طور معناداری کاهش یافت. این کاهش با پیشرفت بیماری در ارتباط است چرا که IL-37 به عنوان یک مهار کننده ایمنی در سرطان کلیه پیشرفته با استفاده از مسیر پیام رسانی IL6/STAT3 عمل می‌کند (17). از طرف دیگر چنین دیدگاهی در مورد سرطان ریه نیز ایجاد شد و مانند مطالعه حاضر کاهش بیان آن در سرطان ریه نیز تأیید شد. Ge و همکارانش در مطالعه‌ای در سال 2016 نشان دادند که IL-37 به عنوان سرکوبگر تومور در سرطان نقش دارد و عمل ضد توموری خود را از طریق مهار آنژیوژنز در سرطان ریه انجام می‌دهد. در حقیقت یافته‌های این پژوهش نقش محافظتی IL-37 را در توسعه سرطان ریه، نشان داد که می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی امیدوارکننده برای سرطان ریه مورد استفاده قرار گیرد (18).

در سال 2003، Gao و همکارانش گزارش کردند که رشد فیبروسارکوما با تزریق IL-37 در موش سرکوب شد (23). Zhao و همکارانش در سال 2014 گزارش کردند که سطح بیان IL-37 به صورت منفی به طور قابل توجهی با اندازه تومور در کارسینومای سلولهای کبدی⁶ در ارتباط است؛ این نشان می‌دهد که IL-37 می‌تواند رشد تومور را مهار نماید (24). در مطالعه‌ای که توسط He و همکارانش در سال 2015 انجام گرفت، گردش بالایی از IL-37 در سرم خونی به عنوان یک عامل پیش آگهی در بیماران مبتلا به سرطان سینه قبل از سن 50 سالگی نشان داده شد، به ویژه هنگامی که سلول‌های تومور مانند گیرنده‌های استروژن باشند (25). Chen و همکارانش در سال 2015 در مطالعه‌ای *in vitro* نشان دادند که IL-37 آپوپتوز را تحریک می‌کند، همچنین باعث مهار مهاجرت و تکثیر

⁶ HCC: Hepato Cellular Carcinoma

بیمار، متاستاز، درجه تومور تفاوت معناداری میان نمونه های توموری و سالم دیده نشد. از اینرو با توجه به کاهش معنادار سطح IL-37 در بیماران دارای تومورهای با قطر بالاتر از 3 سانتی متر می توان از IL-37 به عنوان مارکر آگهی دهنده جهت تشخیص اندازه تومور استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در به انجام رساندن این مطالعه، حمایت و کمکشان را دریغ نکردند، ابراز می دارند، به خصوص افرادی که با دادن نمونه به انجام رساندن مطالعه را ممکن ساختند. این مطالعه مربوط به نتایج حاصل از پایان نامه نویسنده نفر اول می باشد.

که اثرات IL-37 انسانی روی سلول های موشی قابل مقایسه با سلول های انسانی هستند. به منظور بررسی بیشتر اثرات ضد توموری IL-37 بر روی مدل های موشی RCC، آنها را با IL-37 تیمار کردند. نتایج نشان داد که IL-37 منجر به مهار قابل توجه رشد تومور در مقایسه با موش های سالم می شود (26). اخیراً نشان داده شده است که IL-37 در مدل های موش نه تنها در پاسخ ایمنی ذاتی، بلکه نقش مهمی در ایمنی اکتسابی بازی می کند (15).

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده نشان دادند که میزان بیان IL-37 در نمونه های توموری به شدت کاهش یافته و همچنین بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر میزان بیان این ژن نشان داد که میزان بیان IL-37 با افزایش اندازه تومور کاهش پیدا کرده، با این وجود در سایر پارامترهای مورد بررسی مانند سن

References

1. Enayatrad M, Amoori N, Salehiniya H. Epidemiology and trends in breast cancer mortality in iran. Iran J Public Health 2015; 44: 430-1.
2. Motamedi S, Majidzadeh K, Mazaheri M, Anbiaie R, Mortazavizadeh SMR, Esmaeili R. Tamoxifen resistance and CYP2D6 copy numbers in breast cancer patients. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13: 6101-4.
3. Baselga J, Norton L. Focus on breast cancer. Cancer cell 2002; 1: 319-22.
4. Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. Biomed Res Int 2013; 2013: 928562.
5. Novak E. Berek & Novak's gynecology: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
6. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Mol class breast cancer. Virchows Archiv 2014; 465: 1-14.
7. Dunn BK, Wagner PD, Anderson D, Greenwald P, editors. Molecular markers for early detection. Semin Oncol; Elsevier, 2010.
8. Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, et al. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. J Gastroenterol Hepatol 2012; 27: 1609-16.
9. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunol Rev 2018; 281: 27-8.
10. Quirk S, Agrawal DK. Immunobiology of IL-37: mechanism of action and clinical perspectives. Expert Rev Clin Immunol 2014; 10: 1703-9.
11. Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU. The family of the interleukin-1 receptors. Immunol Rev 2018; 281: 197-232.
12. Song L, Qiu F, Fan Y, Ding F, Liu H, Shu Q, et al. Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus. J Clin Immunol 2013; 33: 111-7.

13. Wu B-w, Zeng Q-t, Meng K, Ji Q-w. The potential role of IL-37 in atherosclerosis. *Die Pharmazie-Int J Pharm Sci* 2013; 68: 857-60.
14. Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol* 2010; 11: 1014-22.
15. Li Y, Zhao M, Guo C, Chu H, Li W, Chen X, et al. Intracellular mature IL-37 suppresses tumor metastasis via inhibiting Rac1 activation. *Oncogene* 2018; 37: 1095-106.
16. Wang S, An W, Yao Y, Chen R, Zheng X, Yang W, et al. Interleukin 37 expression inhibits STAT3 to suppress the proliferation and invasion of human cervical cancer cells. *J Cancer* 2015; 6: 962-9.
17. Cavalli G, Koenders M, Kalabokis V, Kim J, Tan AC, Garlanda C, et al. Treating experimental arthritis with the innate immune inhibitor interleukin-37 reduces joint and systemic inflammation. *Rheumatology* 2016; 55: 2220-9.
18. Ge G, Wang A, Yang J, Chen Y, Yang J, Li Y, et al. Interleukin-37 suppresses tumor growth through inhibition of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35: 13.
19. Nurozpour Mamasani M, Reisi S, Peymani M. Down-regulation of BACH2 in formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissue as transcriptional regulation in cancer. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2017; 20: 105-13.
20. Mehta CR, Patel NR. IBM SPSS exact tests. Armonk, NY: IBM Corporation, 2011.
21. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 539-48.
22. Impellizzeri D, Campolo M, Di Paola R, Bruschetta G, de Stefano D, Esposito E, et al. Ultramicronized palmitoylethanolamide reduces inflammation an a Th1-mediated model of colitis. *Eur J Inflamm* 2015; 13: 14-31.
23. Gao W, Kumar S, Lotze MT, Hanning C, Robbins PD, Gambotto A. Innate immunity mediated by the cytokine IL-1 homologue 4 (IL-1H4/IL-1F7) induces IL-12-dependent adaptive and profound antitumor immunity. *J Immunol* 2003; 170: 107-13.
24. Zhao JJ, Pan QZ, Pan K, Weng D-S, Wang Q-J, Li J-J, et al. Interleukin-37 mediates the antitumor activity in hepatocellular carcinoma: role for CD57+ NK cells. *Sci Rep* 2014;4: 5177.
25. He L, Liang Z, Zhao F, Peng L, Chen Z. Modulation of IL-37 expression by triptolide and triptonide in THP-1 cells. *Cell Mol Immunol*. 2015; 12: 515-8.
26. Chen HM, Fujita M. IL-37: a new player in immune tolerance. *Cytokine* 2015; 72: 113-4.
27. Ding VA, Zhu Z, Xiao H, Wakefield MR, Bai Q, Fang Y. The role of IL-37 in cancer. *Med Oncol* 2016; 33: 68.
28. Ding VA, Zhu Z, Mantz AA, Xiao H, Wakefield MR, Bai Q, et al. The Role of IL-37 in Non-Cancerous Diseases. *Pathol Oncol Res* 2017; 23: 463-70.
29. Rivers-Auty J, Daniels MJ, Colliver I, Robertson DL, Brough D. Redefining the ancestral origins of the interleukin-1 superfamily. *Nat Commun* 2018; 9: 1156.
30. Wang S-T, Ho HJ, Lin J-T, Shieh J-J, Wu C-Y. Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* 2017; 8: e2626.