

## دراسة العلاقة بين مقاومة الخلايا MDA-MB-231 لمركب السيسبلاتين والتحول الظهاري الميزانشيمي

يمان الغميان\*      د. شادي سكرية\*\*      د. حسام مراد\*\*\*

### الملخص

يعد سرطان الثدي السبب الرئيسي للوفاة لدى النساء في جميع أنحاء العالم. ويعد من الأورام غير المتجانسة على المستوى الجزيئي وبقابلية استجابتها للعلاج الكيميائي. وجدت الدراسات أن مقاومة السرطانات للعلاج الكيميائي هي السبب الرئيس لفشل العلاج وارتفاع معدل الوفيات. وترتبط الأدلة الحديثة بين عملية التحول الظهاري الميزانشيمي Epithelial to Mesenchymal EMT-Transition واكتساب المقاومة للعلاج الكيميائي. قمنا في هذا البحث بدراسة مقاومة الخطين الخلويين المشتقين من سرطان الثدي MDA-MB-231 و MCF7 للسيسبلاتين وتحديد الحالة الظهارية/الميزانشيمية لهذه الخلايا على المستوى المورفولوجي والجزيئي. حسبت قيمة المقاومة للسيسبلاتين بطريقة اللونية (XTT) بعد معالجة الخطين MDA-MB-231 و MCF7 بتركيز متزايدة من السيسبلاتين. درست الفروقات ما بين الخلايا على المستوى الشكلي

\* طالبة دكتوراه - قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة دمشق.

\*\* الأستاذ المشرف - قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة دمشق.

\*\*\* الأستاذ المشرف المشارك - قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية.

باستخدام المجهر الضوئي وعلى المستوى الجزيئي بدراسة التعبير الجيني لأهم الجينات النازمة لهذه الآلية بتقانة Real time PCR (qPCR)، كما حسبت قيمة مؤشر Snail/E-cadherin لاستخدامها في مقارنة الحالة الظهارية/الميزانثيمية للخلايا MDA-MB-231 وتحديدها. أشارت النتائج إلى أن المعالجة بالسيبلاتين أدت إلى انخفاض في قيمة الحيوية الخلوية لكلا الخطين المدروسين، حيث أظهرت الخلايا MDA-MB-231 مقاومة أكبر بالمقارنة مع الخلايا MCF7. وأظهرت صور المجهر الضوئي الشكل المورفولوجي الشبيه بالمغزل للخلايا MDA-MB-231. بلغت قيمة مؤشر Snail/E-cadherin للخلايا MDA-MB-231 5.2 بالمقارنة مع الخلايا MCF7. بينت نتائج التعبير الجيني أن هناك انخفاضا معنويا في تعبير الجينات E-cadherin و EPCAM المنظمة للحالة الظهارية. ترافق هذا الانخفاض مع زيادة معنوية في التعبير الجيني للجينات المحفزة لآلية EMT مثل SNAIL و ZEB1 و TWIST2. نستنتج أن مقاومة الخط الخلوي MDA-MB-231 للعلاج بالسيبلاتين ترافق بحالة خلوية أقرب للحالة الميزانثيمية منه للحالة الظهارية، لذا من الممكن أن يكون استهداف الجينات المسؤولة عن EMT طريقة فعالة في عكس صفة المقاومة وزيادة فعالية العلاج الكيميائي.

**الكلمات المفتاحية:** سرطان الثدي، السيبلاتين، المقاومة الخلوية للعلاج الكيميائي، التحول الظهاري الميزانثيمي.

## **Studying the Relationship between Cisplatin-Resistant of MDA-MB-231 Cell Line and Epithelial-Mesenchymal Transition**

**Y. Alghamian\***    **Dr. Ch.Soukkarieh\*\***    **Dr. H. Murad\*\*\***

### **Abstract**

Breast cancer is the main cause of death in women worldwide. Breast cancer is heterogeneous at the molecular level and in their response to chemotherapy. Chemoresistant is an essential reason for treatment failure and the high mortality. Emerging evidence associates Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and acquisition of chemoresistance in cancer. Here we investigate the response of MDA-MB-231 and MCF7 cell lines to cisplatin and we determine the epithelial/ mesenchymal status of these cells at the morphological and molecular level.

MDA-MB-231 and MCF7 cells were treated with increased concentrations of cisplatin. Cell viability and resistance fold change were determined by XTT. The EMT features were studied at morphological and molecular levels under microscope and mRNA expression studying. Snail/E-cadherin index was

---

\* PhD degree Student- Department of Animal Biology-Faculty of Sciences-Damascus University.

\*\* Supervisor- Department of Animal Biology-Faculty of Sciences-Damascus University.

\*\*\* Associated supervisor - Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic energy Commission of Syria (AECS).

determined to compare and identify the epithelial/mesenchymal status of the studied cell lines.

Our results indicated that cisplatin treatment reduced the cell viability for both studied cell lines. MDA-MB-231 cells were more resistant to cisplatin than MCF7 cells. The spindle-like morphology was documented for MDA-MB-231 cells using light microscope, and the value of the Snail /E-cadherin index for MDA-MB-231 cells was 5.2 compared to MCF7 cells. The expression of *E-cadherin* and *EPCAM* genes that regulate epithelial status were decreased. These decreases were associated with upregulation of EMT- genes such as *SNAIL*, *ZEB1* and *TWIST2*.

We conclude that the resistance of MDA-MB-231 cell line to cisplatin is associated with a mesenchymal like cellular status, so targeting EMT genes may be a novel approach that reverses chemoresistance and increases the effectiveness of chemotherapy.

**Key words:** Breast cancer, cisplatin, chemoresistant, epithelial to mesenchymal transition.

### المقدمة:

يعد سرطان الثدي أكثر أنواع السرطانات انتشارا بين النساء. وهو سرطان غير متجانس بطبيعته، ولخلافه أشكال مورفولوجية وخصائص جزيئية مختلفة، كما أنها تستجيب للعلاج استجابات متباينة [1]. ويعد مركب السيسبلاتين cisplatin علاجا كيميائيا مشتقا من البلاتين، ويستخدم لعلاج أنواع مختلفة من السرطانات. يشكل مركب السيسبلاتين داخل الخلية معقدا بلاتينيا يرتبط بالحمض النووي، محدثا أضرارا لجزيئة DNA ومفعلا آليات إصلاح الحمض النووي DNA repair [2]. وعندما تفشل آليات الإصلاح في عملها تموت الخلية بعد تفعيل سبيل الموت الخلوي المبرمج apoptosis [3]. تعد المقاومة الخلوية للعوامل المضادة للسرطان بما في ذلك مركبات paclitaxel، و docetaxel، و doxorubicin إحدى محددات فعالية العلاج الكيميائي في سرطان الثدي [4, 5]. توصف الأورام غير المستجيبة للأدوية الكيميائية بأنها مقاومة للعلاج الكيميائي، وتعود هذه الصفة لاحتوائها على خلايا سرطانية مقاومة تعرف باسم الخلايا السرطانية المقاومة للعديد من الأدوية (MDR) multidrug resistance، وتعد من الأسباب الرئيسية لفشل العلاج الكيميائي للسرطان [6-8]. إن الفهم الدقيق للآليات الجزيئية الكامنة وراء مقاومة العلاج الدوائي قد يسهم في تحسين معدلات البقاء ويحسن من نوعية حياة المرضى. بينت الدراسات وجود العديد من الآليات التي تتطور بواسطتها الخلايا السرطانية المقاومة للعوامل السامة للخلايا، التي تتضمن تغيرات في العديد من السبل الحيوية مثل: خفض مستويات الدواء داخل الخلايا من خلال زيادة إخراج الدواء بناقلات ABC مثل MDR1/Pglycoprotein [9]، [10]، وخفض تحويل الدواء إلى شكل نشط [11]، وتعزيز إصلاح الأضرار الناجمة عن المعالجة بالأدوية [12، 13]، وتغير تعبير الجينات المنظمة للموت الخلوي المبرمج أو المنظمة

لسبل الحفاظ على الحيوية [14]. ركزت الدراسات الحديثة في السنوات القليلة الماضية على دور التحول الخلوي للخلايا من الشكل الظهاري إلى الشكل الميزانشيمي Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) كآلية رئيسية في مقاومة العلاج الكيميائي [15-17]. وتعد EMT إحدى الآليات الرئيسية في التنامي الجنيني وفي تطور بعض الأحداث المرضية مثل نشوء الأورام وانتقالها [18-20]. تفقد الخلايا الظهارية في أثناء حادثة EMT قطبيتها وقدرتها على الالتصاق بعضها ببعض وتكتسب القدرة على الهجرة وغزو أنسجة مختلفة [21]؛ إذ تتفصل بهذه الحادثة الخلايا الظهارية عن الخلايا المجاورة وتنتقل إلى الأنسجة الأخرى بعد تخريب الغشاء القاعدي والعبور من خلال المطرق خارج خلوي Extracellular Matrix (ECM) [22]. ويؤدي تنشيط برنامج EMT إلى تغييرات في جوانب أساسية متعددة في الخلية تشمل: تعديلات في تنظيم الهيكل الخلوي الذي يؤدي إلى تغييرات في مورفولوجيا الخلية حيث تتحول أشكال الخلية من الشكل الحرشي أو المكعب أو العمودي إلى أشكال منطولة تشبه المغزل، كما يحدث حل وصلات الخلايا الظهارية، وتفقد الخلية القطبية القمية القاعدية لتصبح ذات قطبية أمامية خلفية، إلى جانب ذلك تكتسب الخلية القدرة على الحركة والقدرة على تحطيم مكونات المطرق خارج خلوي وإعادة تنظيمها، كما يحدث إعادة تنظيم لأنماط التعبير الجيني لما لا يقل عن 400 جين [23].

وتتصف البصمة الجزيئية لعملية EMT بخسارة واسمات الخلايا الظهارية مثل E-cadherin، وزيادة التعبير عن واسمات الخلايا الميزانشيمية مثل Vimentin، ويتوافق ذلك بارتفاع التعبير عن عوامل انتساخ عديدة مثل: SNAI1 (SNAIL) و SNAI2 (SLUG) و TWIST [24, 25]. أظهرت العديد من الأبحاث وجود علاقة بين التعبير عن واسمات EMT والمخرجات السيئة

للمرضى في العديد من أنواع السرطانات، بما في ذلك، على سبيل الذكر لا الحصر، المصابين بسرطان البروستات أو الرئة أو البنكرياس أو الكبد أو القولون والمستقيم أو المثانة [26-30]. وتميز حالة التحول الشكلي الجزئي (الحالة الهجينة- E/M) بوجود تعبير مشترك لكل من واسمات الشكل الظهاري واسمات الشكل الميزانشيمي [24]، هذه الحالة الهجينة لوحظت في السرطانات الأولية، وتكون مسؤولة عن تشكيل xenograft الطعوم السرطانية في الخطوط الخلوية السرطانية المشتقة من سرطانات المبيض [31]، والرئة [32]، والثدي [33] وغيرها. وقد ارتبطت الحالة الهجينة بالعدوانية والمخرجات السيئة للعلاج في سرطان الثدي والمبيض والرئة وغيرها من السرطانات [31-33]. بينت العديد من الدراسات أن مقاومة الأدوية المضادة للسرطان كالسيسبلاتين و 5-fluorouracil و gemcitabine وغيرها تتوافق بشكل متكرر مع EMT، وذلك في أنواع مختلفة من السرطانات، على سبيل الذكر ترتبط المقاومة للسيسبلاتين و 5-fluorouracil و gemcitabine بحالة EMT، التي تتوافق بانخفاض التعبير عن الواسم الظهاري E-cadherin نتيجة ارتفاع التعبير عن عامل الانتساح المثبط ZEB1 في سرطان البنكرياس [34]. ولوحظ وجود تغيرات على المستوى الجزيئي في الجينات المنظمة لآلية EMT عند اكتساب خطوط خلوية مشتقة من سرطان الثدي للمقاومة اتجاه 5-fluorouracil و paclitaxel و docetaxel و doxorubicin [35، 36]. وربطت الحساسية الخلوية للأدوية المضادة للسرطان مع الحالة الميزانشيمية/الظهارية في العديد من الخطوط الخلوية المشتقة من سرطان المبيض [37].

يتضح مما سبق وجود صلة بين كل من المقاومة للأدوية المضادة للسرطان وحادثة EMT، لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى تحري العلاقة المحتملة بين اكتساب المقاومة للسيسبلاتين في الخط

الخلوي MDA-MB-231 وحدوث EMT؛ إذ درس أثر المعالجة بالسيسبلاتين في الحيوية الخلوية لتحديد المقاومة للسيسبلاتين، ودرس التعبير الجيني للجينات المرتبطة ب EMT في الخط الخلوي MDA-MB-231 بالمقارنة مع الخط الخلوي MCF7.

#### المواد والطرائق:

#### أولاً: الزراعة الخلوية:

زرع الخطان الخلويان المشتقان من سرطان الثدي MCF7 و MDA-MB-231 (Sigma, USA) ضمن فلاسكات زراعة خلوية في وسط RPMI-1640 (Sigma, USA) حاو على 10% مصّل البقر الجنيني (Sigma, USA, FBS, fetal bovine serum) و 2mM غلوتامين (Gibco, USA)، بوجود الصادين الحيويين البنسيلين والستريبتومايسين بتركيز 1% (Gibco, USA)، عند درجة الحرارة 37°C وجو نصف رطب مزود بغاز CO<sub>2</sub> بتركيز 5% في حاضنة CO<sub>2</sub> (Binder, USA).

#### ثانياً: المعالجة بمركب السيسبلاتين ودراسة الحيوية الخلوية لتحديد درجة المقاومة الخلوية:

زرعت الخلايا في أطباق زراعة خلوية ذات 96 بئراً (104 خلية/بئر) لمدة 24 ساعة ثم عولجت بمركب السيسبلاتين (Sigma, USA) المحلول بمصل فيزيواوجي بالتركيز 2، 5، 15، 20، 30 µg/ml لمدة 24 ساعة. أضيف محلول الـ XTT (Roche, Germany) حسب تعليمات الشركة المصنعة، وقرئت الامتصاصية للخلايا الشاهدة والخلايا المعالجة بعد 24 ساعة من المعالجة، وحسبت قيم الحيوية الخلوية بنسبها لقيم الخلايا الشاهدة بحيث تعطى قيمة حيوية 100% وذلك بما يشابه العديد من الدراسات [38-40]. كررت التجربة ثلاث مرات وعبر عن النتائج بقيم المتوسطات ± قيم الانحراف المعياري. واستنبطت قيم التراكيز المثبطة لنصف المجتمع



الخلوي، كما حسب مقدار زيادة المقاومة الخلوية لمركب السيسبلاتين، وذلك بنسب قيم التراكيز المثبطة لنمو نصف المجتمع الخلوي ( $IC_{50}$ ) حسب المعادلة الآتية:  
نسبة المقاومة:  $IC_{50}$  للخط الأقل استجابة للسيسبلاتين /  $IC_{50}$  للخط الأكثر استجابة للسيسبلاتين.

#### رابعاً: فحص الخلايا تحت المجهر الضوئي:

زرعت الخلايا MCF7 و MDA-MB-231 بتركيز  $1 \times 10^6$  خلية في فلاسكات زراعة خلوية لمدة 24 ساعة للوصول إلى حالة نمو على شكل تجمع (confluent) يغطي حوالي 70% من مساحة الفلاسك، ومن ثم صورت الخلايا باستخدام المجهر الضوئي المقلوب Olympus CK2 وباستعمال العدسة ذات التكبير 10X.

#### خامساً: دراسة التعبير الجيني بتقانة التفاعل التسلسلي للبوليميراز بالزمن الحقيقي Real Time PCR:

عزل RNA الكلي من الخليين الخلويين MCF7 و MDA-MB-231 باستخدام طاقم العزل RNeasy Mini kit (Germany، Qiagen). حول RNA إلى cDNA باستخدام كيت النسخ العكسي M-MLV reverse transcriptase (USA، Invitrogen) حسب تعليمات الشركة المصنعة؛ إذ حول  $3 \mu g$  من RNA المعزول بواسطة الأنزيم M-MLV وذلك بإضافة oligo dT و dNTPs ويفر الأنزيم 5X First strand ومادة DTT والمثبط لعمل RNase RNaseOUT و recombinant ribonuclease inhibitor. تم التضخيم بالزمن الحقيقي Real Time PCR لـ 40 دورة باستخدام الجهاز StepOne (USA، Applied Biosystems) باستخدام كيت Maxima SYBR Green Master Mix (USA، Thermo). حسب التغير النسبي في التعبير الجيني بطريقة  $\Delta\Delta C_t$  باستخدام الجين *GAPDH* كجين مرجعية. وتستخدم *GAPDH* كجين مرجعية في

العديد من الدراسات لامتلاكها تعبير مرتفع وثابت لا يتغير بتغير الشروط التجريبية في العديد من الخطوط الخلوية السرطانية ومنها سرطان الثدي [41، 42]. حسب التغير النسبي في التعبير الجيني في خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 وذلك للجينات المميزة للشكل الظهاري *EPCAM* و *E-cadherin*، وللجينات التي تتدخل في التحول إلى الشكل الميزانشيمي *N-Cadherin* و *SNAIL*، و *SLUG* و *ZEB1* و *TWIST2*، وأعطيت قيمة تعبير لهذه الجينات تساوي 1 في الخط MCF7، وذلك لأن الخط MCF7 هو العينة المرجعية التي يتم نسب التعبير الجيني إليها، لذا يأخذ التعبير فيها القيمة 1 حسب Pfaffl [43]، أجريت النقايات بثلاثة مكررات. ويوضح الجدول 1 تسلسلات البادئات المستخدمة (بادئات عابرة للإنترونات) في تفاعل Real Time PCR.

الجدول (1) تسلسلات البادئات المستخدمة في تفاعل التضخيم بالزمن الحقيقي في هذه الدراسة

| رمز الجين                        | تسلسل البادئات (5'-3')       | حجم الشدة المضخمة |
|----------------------------------|------------------------------|-------------------|
| <i>E-cadherin</i><br>NG_008021.1 | F- GTGGCCAGGAAATCACATCCT     | 93bp              |
|                                  | R- GTTGGCAGTGTCTCTCCAAATCC   |                   |
| <i>EPCAM</i><br>NG_012352.2      | F-GCCGCAGCTCAGGAAGAATGTG     | 94bp              |
|                                  | R-CAACTGAAGTACACTGGCATTGACG  |                   |
| <i>N-cadherin</i><br>NG_011959.1 | F-TGGACGGTTCGCCATCCAGAC      | 71bp              |
|                                  | R-AGTCGATTGGTTTGACCACGGTG    |                   |
| <i>SNAIL</i><br>NC_000020.11     | F-TGCAGGACTCTAATCCAGAGTTTACC | 71bp              |
|                                  | R- GGTGGGATGGCTGCCAGC        |                   |
| <i>SLUG</i><br>NG_012130.1       | F- CAGCGAACTGGACACACATACAG   | 92bp              |
|                                  | R- AGCTGAGGATCTCTGGTTGTGGT   |                   |
| <i>ZEB1</i><br>NG_017048.1       | F- CCTGCCAACAGACCAGACAGTGTT  | 102bp             |
|                                  | R- CCCAGGATTTCTTGCCCTTCCTTTC |                   |
| <i>TWIST2</i><br>NG_032754.2     | F-CAAGCTGAGCAAGATCCAGACGC    | 97bp              |
|                                  | R-GGTCATCTTATTGTCCATCTCGTCG  |                   |
| <i>GAPDH</i><br>NG_007073.2      | F- ATGACCCCTTCATTGACC        | 131bp             |
|                                  | R- GAAGATGGTGATGGGATTTTC     |                   |

**سادسا: حساب مؤشر Snail/E-cadherin للخط الخلوي MDA-MB-231:**

حسب مؤشر Snail/E-cadherin (S/E index) الذي اعتمد في أدبيات سابقة [44] لتحديد الحالة الشكلية للخط الخلوي MDA-MB-231، وذلك بالاعتماد على التعبير الجيني المقيس بتقانة Real Time PCR حسب المعادلة الآتية:

$$(S/E \text{ index}) = \text{مستوى التعبير عن } Snail / \text{مستوى التعبير عن } E\text{-cadherin}$$

**سابعا: التحليل الإحصائي:**

استخدم البرنامج 7 GraphPad Prism (USA) في التحليل الإحصائي؛ إذ حلت الفروقات بين المجموعات التجريبية باستخدام اختبار Student-t test، واعتبرت الفروقات معنوية عندما تكون قيمة  $P < 0.05$ .

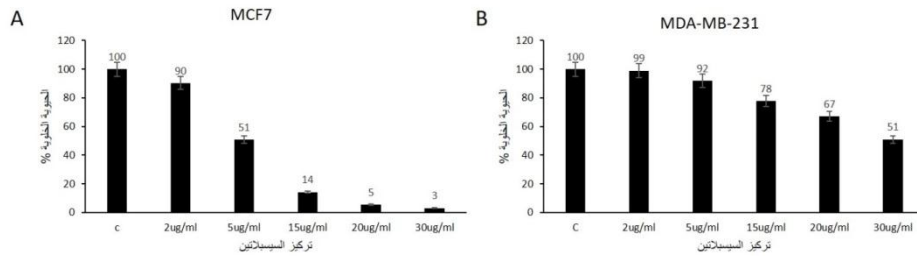
**النتائج:**

**أولا: أثر المعالجة بالسيسبلاتين على الحيوية الخلوية وتحديد درجة المقاومة الخلوية:**

أظهرت نتائج حيوية الخلايا MCF7 المعالجة لمدة 24 ساعة بتركيز متزايدة من مركب السيسبلاتين 2، 5، 15، 20، 30  $\mu\text{g/ml}$  انخفاضا متزايدا في حيويتها مع زيادة التركيز 90، 51، 14، 5، 3 %، على الترتيب (الشكل رقم 1A)، وكان تركيز الجرعة المثبطة لنصف المجتمع الخلوي ( $IC_{50}$ ) مساويا لـ 5  $\mu\text{g/ml}$ ، وهو التركيز الذي يستطيع مركب السيسبلاتين فيه تثبيط نمو نصف المجتمع الخلوي للخلايا MCF7.

كما أظهرت نتائج حيوية الخلايا MDA-MB-231 المعالجة لمدة 24 ساعة بتركيز متزايدة من مركب السيسبلاتين 2، 5، 15، 20، 30  $\mu\text{g/ml}$  انخفاضا متزايدا في حيويتها 92، 99، 51، 67، 78 %، على الترتيب (الشكل رقم 1B)، وكانت قيمة  $IC_{50}$  تساوي 30  $\mu\text{g/ml}$ .

بالاعتماد على هذه النتائج، نلاحظ أن الخلايا MDA-MB-231 كانت أقل استجابة لمركب السيسبلاتين بالمقارنة مع الخلايا MCF7؛ إذ كان الانخفاض في الحيوية قليلا بالمقارنة مع انخفاض حيوية الخلايا MCF7 بعد المعالجة بالجرعة نفسها. ويتعويض قيم  $IC_{50}$  الخاصة بكل خط خلوي في معادلة حساب مقدار المقاومة للسيسبلاتين نجد أن خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 أكثر مقاومة بـ 6 مرات من خلايا الخط الخلوي MCF7.

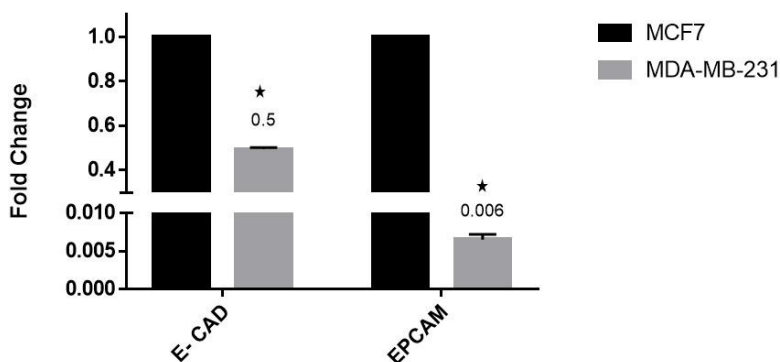


الشكل (1) أثر التراكيز المتزايدة من السيسبلاتين على الحيوية الخلوية للخطين الخلويين MCF7 و MDA-MB-231 بالاعتماد على طريقة XTT

#### ثانياً: دراسة تعبير الجينتين *E-cadherin* و *EPCAM*:

من أجل تحديد الحالة الظاهرية/الميزانشيمية لخلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 بالمقارنة مع خلايا الخط الخلوي MCF7 (دون معالجة بالسيسبلاتين) درس التغير النسبي في التعبير الجيني لجينتين *E-cadherin* و *EPCAM* اللتين تؤديان دوراً في الحفاظ على الشكل الظاهري للخلايا في كلا النمطين الخلويين وذلك باستخدام تقانة qPCR (الشكل 2). حسب قيمة التغير النسبي في التعبير الجيني Relative quantification (Rq) حسب قاعدة  $\Delta\Delta^{Ct}$  [43] للجينتين *E-cadherin* و *EPCAM* في كلا النمطين الخلويين؛ إذ نسبت نتائج التعبير الجيني

للجينتين في الخلايا MDA-MB-231 للتعبير الجيني لنفس الجينتين في الخلايا MCF7، بينت النتائج أن قيمة التغير في التعبير النسبي للجين *E-cadherin* في الخط الخلوي MDA-MB-231 يساوي 0.5 ضعف (fold). وبلغت قيمة التغير في التعبير النسبي للجين *EPCAM* في الخلايا MDA-MB-231 (0.006 ضعف) (الشكل 2).

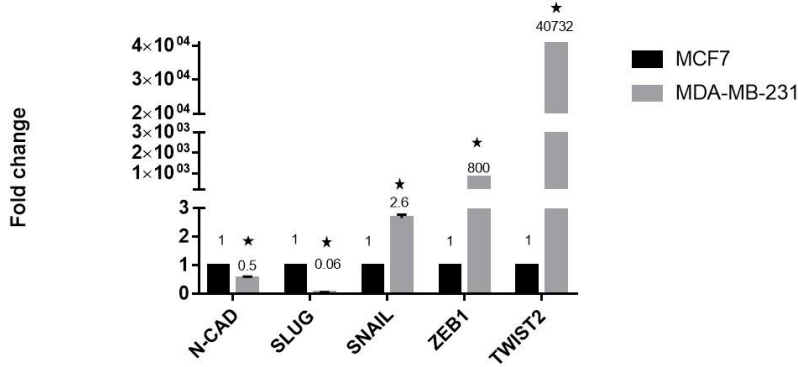


الشكل (2) دراسة التعبير عن الجين *E-Cadherin* والجين *EPCAM* المرزمتين لبروتينين مسؤولين عن الشكل الظاهري في الخط الخلوي MDA-MB-231 بالمقارنة مع MCF7 بتقانة qPCR

### ثالثاً: دراسة التعبير عن الجينات *SNAIL* و *ZEB1* و *TWIST2*:

درس التعبير الجيني للجينات *SNAIL* و *ZEB1* و *TWIST2* و *N-Cadherin* و *SLUG* التي تتدخل في التحول إلى الشكل الميزانشيمي في خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231؛ إذ نسبت نتائج التعبير الجيني للجينات للتعبير الجيني في خلايا الخط الخلوي MCF7 (دون معالجة بالسيسبلاتين)، وحسبت قيمة التغير النسبي في التعبير الجيني Relative

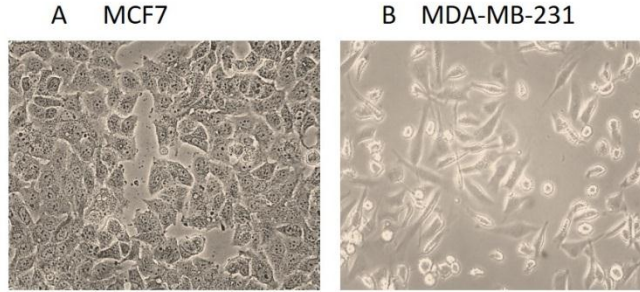
quantification (Rq) حسب قاعدة  $\Delta\Delta^{Ct}$  [43] وذلك بتقانة Real Time PCR. بلغت قيم التغير النسبي في التعبير الجيني للجينات *SNAIL* و *ZEB1* و *TWIST2* في خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 2.6، 800، 40732 ضعف (fold)، على الترتيب. كما بلغت قيمة التغير في التعبير النسبي للجينات *N-Cadherin* و *SLUG* في الخلايا-MDA-MB-231 0.5، 0.06 ضعف (fold)، على الترتيب (الشكل 3).



الشكل (3) دراسة التعبير عن الجينات *SNAIL* و *SLUG* و *ZEB1* و *TWIST2* المرزمة لبروتينات تتدخل في التحول إلى الشكل الميزانشيمي في الخط الخلوي MDA-MB-231 بالمقارنة مع الخط MCF7 بطريقة qPCR

رابعاً: تحديد الحالة الظهارية/ الميزانشيمية لخلايا خطوط الخلايا المشتقة من سرطان ثدي: لأن التغير الشكلي تتدخل فيه عدة جينات اعتمد مؤشر Snail/E-cadherin بوصفه دلالة لتحديد الحالة الظهارية/ الميزانشيمية بين الخلايا ومقارنتها، ولمعرفة حالة الخلايا-MDA-MB-231 تم حساب ومقارنة المؤشر Snail/E-cadherin مع قيمته في الخلايا MCF7 وتساوي 1

لأن كل من قيمة تعبير الجينين Snail و E-cadherin تساوي 1، وذلك لأن الخط MCF7 هو العينة المرجعية التي ينسب التعبير الجيني إليها حسب Pfaffl [43]، أظهرت النتائج أن مؤشر Snail/E-cadherin للخلايا MDA-MB-231 (الأكثر مقاومة للسيسبلاتين) يساوي 5.2؛ أي أن الخلايا أقرب للحالة الميزانشيمية من الخلايا MCF7 (الأكثر حساسية للسيسبلاتين). تتوافق هذه النتائج مع ما تظهره صور كل من الخطين الخليين؛ إذ يبين الشكل 4 أن الخلايا MDA-MB-231 تملك شكل أقرب إلى الشكل الميزانشيمي المتطاول شبيه المغزل ويملك قطبية أمامية خلفية وتنمو بشكل قليل الارتصاص، في حين تبدو الخلايا MCF7 شبيهة بالشكل الظهاري الحرشي وتنمو بشكل مستعمرات خلوية متلاصقة.



الشكل (4) صورة تظهر الاختلافات الشكلية بين الخطين الخليين المستخدمين في هذه

الدراسة مأخوذة بالمجهر الضوئي المقلوب تكبير  $10\times$

A . للخلايا MCF7 شكلا ظاهريا يتميز بتساوي الأبعاد تقريبا؛ إذ تنمو الخلايا بشكل مرتص بجانب بعضها بعضا.

B. للخلايا MDA-MB-231 شكلا ميزانثيميا يتميز بتطاوله بما يشبه المغزل، وتتمو هذه الخلايا بشكل ضعيف الارتصاص بعضها بجانب بعض.

#### المنافشة:

يعد سرطان الثدي السبب الرئيسي لوفيات السرطان بين النساء في جميع أنحاء العالم [45]. وتملك خلايا سرطان الثدي أشكالا مختلفة مورفولوجيا وخصائص جزيئية مختلفة ولها استجابات متباينة للعلاج [46]. ويعالج سرطان الثدي إما بعلاجات سامة للخلايا مثل (باكليتاكس، دوكسوروبيسين، فلورويوراسيل، سيسبلاتين)، أو بعلاجات هرمونية أو بعلاجات مستهدفة، تقوم مجمل هذه العلاجات بتقليل معدل الوفيات وإطالة زمن البقاء [47]. ولكن لا تزال مقاومة العوامل العلاجية عقبة ثابتة فيما يتعلق بنجاح العلاج، ولا تزال الآليات الأساسية الكامنة وراء مقاومة الأدوية غير مفهومة بشكل كامل. يعد الخطان الخلويان MCF-7 و MDA-MB-231 من أكثر الخطوط الخلوية المستخدمة في أبحاث سرطان الثدي. نشأت هذه الخلايا من النقائل الناشئة من ورم ثدي منتشر، ويعد الخط الخلوي MCF-7 نموذجا لسرطان الثدي إيجابي الاستروجين + ER و إيجابي البروجسترون + PR لأن خلاياه تعبر عن مستقبلات هرمون الاستروجين والبروجسترون ولا تعبر عن مستقبل عامل نمو الظهاري البشري 2-HER2، في حين أن خلايا الخط -MDA-MB-231 لا تعبر عن أي من المستقبلات الثلاثة سابقة الذكر، وبالتالي يتم استخدام هذا الخط الخلوي بوصفه نموذجا لسرطان الثدي ثلاثي السلبية (TNBC) [48].

في هذا البحث، درس أثر المعالجة بمركب السيبلاتين في حيوية الخطين الخلويين -MDA-MB-231 و MCF7 المشتقين من سرطان الثدي، تبين أن خلايا الخط الخلوي -MDA-MB-231 أكثر مقاومة بـ 6 مرات من خلايا الخط الخلوي MCF7. لوحظ الفارق في الاستجابة بين



الخطين لمركب 5 فلوروراسيل في دراسة Zhang وزملائه حيث كانت قيم  $IC_{50}$  للخط MDA-231 أكبر بشكل معنوي من الخط MCF7 [35]. وربطت الدراسات بين EMT وكل من تطور سرطان الثدي والمقاومة للعلاج الكيميائي [49]، وتعرف EMT بأنها آلية بيولوجية تفقد من خلالها الخلايا الظهارية القطبية والالتصاق الخلوي [21]. وتحدث نتيجة EMT تغيرات في مورفولوجيا الخلية تتوافق بتغيرات في تعبير الجينات المنظمة للتحول الشكلي [23]. بين التصوير المجهرى وجود اختلافات شكلية بين خلايا الخطين المدروسين؛ تبدي الخلايا MDA-231، الأكثر مقاومة للسيسبلاتين، شكلا متطاولا شبيها بالمغزل المميز للشكل الميزانشيمي، في حين تبدو الخلايا MCF7، الأقل مقاومة للسيسبلاتين، شبيهة بالشكل الظهاري، الأمر الذي يوحي بوجود علاقة بين ازدياد المقاومة للسيسبلاتين واكتساب الشكل الميزانشيمي. تم تأكيد وجود التحول الظهاري الميزانشيمي في الخط الخلوي MCF7/5-FU المقاوم لـ 5-fluorouraci الذي يملك شكلا مغزليا مع وجود تغيرات على المستوى الجزيئي في الجينات المنظمة لآلية EMT [35]. كما بينت دراسة أخرى اكتساب الخط الخلوي MCF7 صفة المقاومة لعقار tamoxifen عند إحداث التحول الشكلي تجريبيا، وذلك بالمعالجة بـ  $TGF-\beta$ ، وهو عامل يؤدي لتغير الشكل [50].

درس في هذا البحث التعبير الجيني لجينات مفتاحية تنظم التحول الشكلي؛ إذ لوحظ انخفاض التعبير عن الجينتين *E-cadherin* و *EPCAM* المميزتين للشكل الظهاري في الخلايا MDA-MB-231 بالمقارنة مع الخلايا MCF7. وترمز الجينتين السابقتين لبروتينين يعملان كجزيئات التصاق عند الوصلات الخلوية [51]. أظهرت دراسة على خلايا الخط الخلوي MCF7 والخطوط المقاومة للأدوية المشتقة منه (MCF-7/Pac و MCF-7/Doc و MCF-7) و MCF-

(7/ Dox) أن انخفاض التعبير عن الجين E-cadherin يرتبط بازدياد المقاومة وبتفعيل آلية التحول الشكلي الظهاري الميزانشيمي [52]. توافق هذه النتائج نتائج دراسة Zhang وزملائه على الخط MCF7 المقاوم لـ 5 فلورويوراسيل؛ إذ ينخفض التعبير عن الجين E-cadherin وعدة جينات مميزة للشكل الظهاري وبترافق ذلك مع التغير الشكلي الميزانشيمي [35]. كما توافقت دراستنا مع بحث بين أن الخطوط السرطانية التي لا تملك البروتين EPCAM أو تملك تركيز منخفض منه مثل الخط MDA-MB-231 تكون أكثر خباثة وتملك طابع ميزانشيمي [53]. وتتدخل في آلية EMT عوامل انتساح عديدة محفزة للتحول الميزانشيمي منها البروتينات SNAIL و SLUG و Zinc-Finger E-Box-Binding Homeobox1 (ZEB1) و Twist-related protein 2 (TWIST2)؛ إذ تعمل هذه البروتينات بوصفها مثبطات انتساح ترتبط بمحضضات عدة جينات أهمها جين E-Cadherin المسؤولة عن الشكل الظهاري [54-57]. وقد تم في هذا البحث دراسة التعبير الجيني للجينات السابقة بتقانة qPCR، وأظهرت النتائج ارتفاع التعبير عن الجينات SNAIL و ZEB1 و TWIST2، وبترافق هذا الارتفاع مع انخفاض التعبير عن الجين E-cadherin ومع ازدياد المقاومة للسيبلاتين في خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 الأقرب للشكل الميزانشيمي بالمقارنة مع الخلايا MCF7 الظهارية. أظهرت عدة دراسات أن ارتفاع التعبير عن الجينين SNAIL و SLUG يدل على تفعيل EMT وعلى مقاومة العلاج الكيميائي ويمكن أن يكون ذلك مؤشرا على الإنذار السيئ للمرض وعلى إمكانية حدوث نقائل وذلك في عدة أنواع من السرطانات كسرطان الكولون والمعدة والثدي [56، 58-60]. كما أظهرت أبحاث عدة العلاقة الوثيقة بين ارتفاع تعبير البروتين ZEB1 وانخفاض التعبير عن E-cadherin وازدياد المقاومة للعلاج الكيميائي باستعمال السيبلاتين

و 5-FU و Gemcitabine في خطوط خلوية مشتقة من سرطان البنكرياس والرئة [34، 61]. ولاحظ "Li" وزملاؤه أن التعبير عن TWIST2 يرتبط بخبثة الأورام وقدرتها على تشكيل النقائل والمقاومة للسيبيلاتين في سرطان المبيض [55].

درس في هذا البحث تعبير الجينات *N-Cadherin* و *SLUG* التي تتدخل، أيضا، في التحول إلى الشكل الميزانشيمي ولكن، وبشكل معاكس لوحظ انخفاض في تعبير هذه الجينات في الخلايا MDA-MB-231 الأقرب للحالة الميزانشيمية بالمقارنة مع الخلايا MCF7 الأقرب للشكل الظهاري. ولربما كانت الخلايا MDA-MB-231 تملك بعض صفات الحالة الظهارية إلا أنها أقرب إلى الحالة الميزانشيمية. تشير الدراسات إلى وجود حالة هجينة بين الأنماط الظهارية والميزانشيمية وتعرف بحالة التحول الشكلي الجزئي أو الحالة الهجينة E/M، وتتميز بتعبير مشترك لكل من واسمات الشكل الظهاري والشكل الميزانشيمي [24]، وقد ارتبطت الحالة الهجينة بتشكيل النقائل والعدوانية والمخرجات السيئة للعلاج في سرطان الثدي والمبيض والرئة وغيرها من السرطانات [31-33]. ففي بحث أجري على 3,455 عينة من سرطان الثدي تبين أن العينات التي تتميز بتعبير مشترك لواسمات الشكل الظهاري والميزانشيمي تملك إنذارا سيئا [33]. ولكون الحالة الشكلية تتدخل فيها جينات عدة، اعتمد مؤشر Snail/E-cadherin بوصفه دلالة لتحديد الحالة الظهارية/الميزانشيمية للخلايا MDA-MB-231، والذي استخدم في دراسات سابقة على أنواع عدة من الخطوط والعيّنات السرطانية [44، 62]، بلغت قيمة المؤشر Snail/E-cadherin للخلايا MDA-MB-231 بعد مقارنتها مع الخلايا MCF7 تلك التي أعطيت القيمة 1؛ أي أن الخلايا MDA-MB-231 أكثر ميزانشيمية من الخلايا MCF7. وتوافق ازدياد قيمة Snail/E-cadherin مع مورفولوجية الخط الخلوي MDA-MB-231.

تتوافق نتائج دراستنا مع بحث تم فيه الربط بين ارتفاع قيمة المؤشر Snail/E-cadherin مع التغير الشكلي الميزانشيمي والمقاومة للسييسبلاتين في خطوط خلوية مشتقة من سرطان المبيض [44]، كما أظهرت الدراسة نفسها أن الخطوط الخلوية التي تملك مؤشر Snail/E-cadherin مرتفع تملك تعبيراً مرتفعاً لواسمات الخلايا الجذعية. وأخيراً تبين نتائج هذا البحث الحاجة للقيام بدراسات مستقبلية تستهدف الجينات المسؤولة عن EMT مثل الجين *SNAIL* عن طريق الإسكات المورثي، الذي من الممكن أن يكون طريقة فعالة في عكس صفة المقاومة. كما أن الفهم الأفضل لـ EMT وغيرها من الآليات الحيوية ودورها في المقاومة الخلوية على المستوى الجزيئي في الخطوط الخلوية وفي العينات السرطانية يمكن أن يسهم في تحسين فعالية العلاج الكيميائي في المستقبل.

**المراجع:**

1. Masood S., 2016. Breast cancer subtypes: Morphologic and biologic characterization. *Womens Health (Lond)*. 12:103-19.
2. Rocha C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., Menck, C. F. M., 2018. DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)*. 73:e478s.
3. Rabik C. A., Dolan, M. E., 2007. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 33:9-23.
4. Gonzalez-Angulo A. M., Morales-Vasquez, F., Hortobagyi, G. N., 2007. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 608:1-22.
5. Moiseenko F., Volkov, N., Bogdanov, A., Dubina, M., Moiseyenko, V., 2017. Resistance mechanisms to drug therapy in breast cancer and other solid tumors: An opinion. *F1000Res*. 6:288.
6. Saraswathy M., Gong, S., 2013. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnol Adv*. 31:1397-407.
7. Kibria G., Hatakeyama, H., Harashima, H., 2014. Cancer multidrug resistance: Mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system. *Arch Pharm Res*. 37:4-15.
8. Gillet J. P., Gottesman, M. M., 2010. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol*. 596:47-76.
9. Harrach S., Ciarimboli, G., 2015. Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. *Front Pharmacol*. 6:85.
10. Fletcher J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., Haber, M., 2016. Abc transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist Updat*. 26:1-9.

11. Michael M., Doherty, M. M., 2005. Tumoral drug metabolism: Overview and its implications for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 23:205-29.
12. Zhao H., Yu, X., Ding, Y., Zhao, J., Wang, G., Wu, X., Jiang, J., Peng, C., Guo, G. Z., Cui, S., 2016. Mir-770-5p inhibits cisplatin chemoresistance in human ovarian cancer by targeting ercc2. *Oncotarget.* 7:53254-68.
13. Silva S. N., Tomar, M., Paulo, C., Gomes, B. C., Azevedo, A. P., Teixeira, V., Pina, J. E., Rueff, J., Gaspar, J. F., 2010. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes xrcc2, xrcc3, nbs1 and rad51. *Cancer Epidemiol.* 34:85-92.
14. Yu C. J., Ou, J. H., Wang, M. L., Jialielihan, N., Liu, Y. H., 2015. Elevated survivin mediated multidrug resistance and reduced apoptosis in breast cancer stem cells. *J BUON.* 20:1287-94.
15. Roxanis I., 2013. Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Clin Pathol.* 66:517-21.
16. Gammon L., Mackenzie, I. C., 2016. Roles of hypoxia, stem cells and epithelial-mesenchymal transition in the spread and treatment resistance of head and neck cancer. *J Oral Pathol Med.* 45:77-82.
17. Dave B., Mittal, V., Tan, N. M., Chang, J. C., 2012. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res.* 14:202.
18. [Nakaya Y., Sheng, G., 2008. Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: An embryological view. *Dev Growth Differ.* 50:755-66.

19. Qin Q., Xu, Y., He, T., Qin, C., Xu, J., 2012. Normal and disease-related biological functions of twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res.* 22:90-106.
20. Lu W., Kang, Y., 2019. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Dev Cell.* 49:361-74.
21. Gloushankova N. A., Zhitnyak, I. Y., Rubtsova, S. N., 2018. Role of epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Biochemistry (Mosc).* 83:1469-76.
22. Thiery J. P., Sleeman, J. P., 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:131-42.
23. Shibue T., Weinberg, R. A., 2017. Emt, cscs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 14:611-29.
24. De Craene B., Berx, G., 2013. Regulatory networks defining emt during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 13:97-110.
25. Heerboth S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., Sarkar, S., 2015. Emt and tumor metastasis. *Clin Transl Med.* 4:6.
26. Gravdal K., Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A., Akslen, L. A., 2007. A switch from e-cadherin to n-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 13:7003-11.
27. Soltermann A., Tischler, V., Arbogast, S., Braun, J., Probst-Hensch, N., Weder, W., Moch, H., Kristiansen, G., 2008. Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 14:7430-7.

28. Rasheed Z. A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., Hong, S. M., Koorstra, J. B., Rajeshkumar, N. V., He, X., Goggins, M., Iacobuzio-Donahue, C., Berman, D. M., Laheru, D., Jimeno, A., Hidalgo, M., Maitra, A., Matsui, W., 2010. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 102:34.51-0
29. Lee T. K., Poon, R. T., Yuen, A. P., Ling, M. T., Kwok, W. K., Wang, X. H., Wong, Y. C., Guan, X. Y., Man, K., Chau, K. L., Fan, S. T., 2006. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res.* 12:5369-76.
30. Spaderna S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T., Brabletz, T., 2006. A transient, emt-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 131:830-40.
31. Strauss R., Li, Z. Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Moller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P., Drescher, C., Urban, N., Bartek, J., Lieber, A., 2011. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One.* 6:e16186.
32. Schliekelman M. J., Taguchi, A., Zhu, J., Dai, X., Rodriguez, J., Celiktas, M., Zhang, Q., Chin, A., Wong, C. H., Wang, H., McFerrin, L., Selamat, S. A., Yang, C., Kroh, E. M., Garg, K. S., Behrens, C., Gazdar, A. F., Laird-Offringa, I. A., Tewari, M., Wistuba, II, Thiery, J. P., Hanash, S. M., 2015. Molecular portraits of epithelial, mesenchymal, and hybrid states in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer Res.* 75:1789-800.



33. Grosse-Wilde A., Fouquier d'Herouel, A., McIntosh, E., Ertaylan, G., Skupin, A., Kuestner, R. E., del Sol, A., Walters, K. A., Huang, S., 2015. Stemness of the hybrid epithelial/mesenchymal state in breast cancer and its association with poor survival. *PLoS One*. 10:e0126522.
34. Arumugam T., Ramachandran, V., Fournier, K. F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J. L., Gallick, G. E., Logsdon, C. D., McConkey, D. J., Choi, W., 2009. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 69:5820-8.
35. Zhang W., Feng, M., Zheng, G., Chen, Y., Wang, X., Pen, B., Yin, J., Yu, Y., He, Z., 2012. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of snail in mcf7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 417:679-85.
36. Huang J., Li, H., Ren, G., 2015. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (review). *Int J Oncol*. 47:840-8.
37. Beaufort C. M., Helmijr, J. C., Piskorz, A. M., Hoogstraat, M., Ruigrok-Ritstier, K., Besselink, N., Murtaza, M., van, I. W. F., Heine, A. A., Smid, M., Koudijs, M. J., Brenton, J. D., Berns, E. M., Helleman, J., 2014. Ovarian cancer cell line panel (occp): Clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One*. 9:e103988.
38. Karakas D., Ari, F., Ulukaya, E., 2017. The mtt viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol*. 41:919-25.

39. Shahneh F. Z., Valiyari, S., Azadmehr, A., Hajiaghaee, R., Yaripour, S., Bandehagh, A., Baradaran, B., 2013. Inhibition of growth and induction of apoptosis in fibrosarcoma cell lines by echinophora platyloba dc: In vitro analysis. *Adv Pharmacol Sci.* 2013:512931.
40. Orellana-Serradell O., Poblete, C. E., Sanchez, C., Castellon, E. A., Gallegos, I., Huidobro, C., Llanos, M. N., Contreras, H. R., 2015. Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 33:1599-608.
41. Liu L. L., Zhao, H., Ma, T. F., Ge, F., Chen, C. S., Zhang, Y. P., 2015. Identification of valid reference genes for the normalization of rt-qpcr expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. *PLoS One.* 10:e0117058.
42. Shi Y., Ye, P., Long, X., 2017. Differential expression profiles of the transcriptome in breast cancer cell lines revealed by next generation sequencing. *Cell Physiol Biochem.* 44:804-1.6
43. Pfaffl M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
44. Hojo N., Huisken, A. L., Wang, H., Chirshev, E., Kim, N. S., Nguyen, S. M., Campos, H., Glackin, C. A., Ioffe, Y. J., Unternaehrer, J. J., 2018. Snail knockdown reverses stemness and inhibits tumour growth in ovarian cancer. *Sci Rep.* 8:8704.
45. Cai Z., Liu, Q., 2019. Understanding the global cancer statistics 2018: Implications for cancer control. *Sci China Life Sci.*
46. Brooks M. D., Burness, M. L., Wicha, M. S., 2015. Therapeutic implications of cellular heterogeneity and plasticity in breast cancer. *Cell Stem Cell.* 17:260-71.
47. Hernandez-Aya L. F., Gonzalez-Angulo, A. M., 2013. Adjuvant systemic therapies in breast cancer. *Surg Clin North Am.* 93:473-91.

48. Dai X., Cheng, H., Bai, Z., Li, J., 2017. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer*. 8:3131-41.
49. INVALID CITATION !!!
50. Tian M., Schiemann W. P., 2017. Tgf-beta stimulation of emt programs elicits non-genomic er-alpha activity and anti-estrogen resistance in breast cancer cells. *J Cancer Metastasis Treat*. 3:150-60.
51. Biswas K. H., Zaidel-Bar, R., 2017. Early events in the assembly of e-cadherin adhesions. *Exp Cell Res*. 358:14-9.
52. Iseri O. D., Kars, M. D., Arpacı, F., Atalay, C., Pak, I., Gunduz, U., 2011. Drug resistant mcf-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed Pharmacother*. 65:40-5.
53. Sankpal N. V., Fleming, T. P., Sharma, P. K., Wiedner, H. J., Gillanders, W. E., 2017. A double-negative feedback loop between epcam and erk contributes to the regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Oncogene*. 36:3706-17.
54. Barrallo-Gimeno A., Nieto, M. A., 2005. The snail genes as inducers of cell movement and survival: Implications in development and cancer. *Development*. 132:3151-61.
55. Li Y., Wang, W., Wang, W., Yang, R., Wang, T., Su, T., Weng, D., Tao, T., Li, W., Ma, D., Wang, S., 2012. Correlation of twist2 up-regulation and epithelial-mesenchymal transition during tumorigenesis and progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 124:112-8.
56. Peinado H., Olmeda, D., Cano, A., 2007. Snail, zeb and bhlh factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 7:415-28.

57. Stemmler M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., Brabletz, T., 2019. Non-redundant functions of emt transcription factors. *Nat Cell Biol.* 21:102-12.
58. Fan F., Samuel, S., Evans, K. W., Lu, J., Xia, L., Zhou, Y., Sceusi, E., Tozzi, F., Ye, X. C., Mani, S. A., Ellis, L. M., 2012. Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.* 1:5-16.
59. Elloul S., Elstrand, M. B., Nesland, J. M., Trope, C. G., Kvalheim, G., Goldberg, I., Reich, R., Davidson, B., 2005. Snail, slug, and smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer.* 103:1631-43.
60. Huang D., Duan, H., Huang, H., Tong, X., Han, Y., Ru, G., Qu, L., Shou, C., Zhao, Z., 2016. Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with her2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep.* 6:20502.
61. Wu Y., Jin, D., Wang, X., Du, J., Di, W., An, J., Shao, C., Guo, J., 2019. Ube2c induces cisplatin resistance via zeb1/2-dependent upregulation of abcg2 and ercc1 in nscl cells. *J Oncol.* 2019:8607859.
62. Tian Y., Qi, P., Niu, Q., Hu, X., 2020. Combined snail and e-cadherin predicts overall survival of cervical carcinoma patients: Comparison among various epithelial-mesenchymal transition proteins. *Front Mol Biosci.* 7:22.