فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۶

مقاله تحقیقی

بررسی بیان ژن *ZEB1* در بافت سرطانی و خوش خیم پروستات انسان

بهناز کریمی[۱]، فهیمه باغبانی آرانی*[۲]، آزاده شجاعی[۳]

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحدورامین- پیشوا، دانشگاه آزاداسلامی، ورامین، ایران
۲. گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

* **مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، بیمارستان شهید اکبر آبادی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۹۷/۴/۲۳ تاریخ پذیرش:۹۷/۶/۱۰

چکیده

سرطان پروستات متاستاتیک یک بیماری کشنده است، اما متاسفانه هنوز علل زیادی در مورد مکانیسم های مولکولی متاستاز این سرطان شایع ناشناخته مانده است. در مراحل پیشرفته سرطان پروستات، سلولهای سرطانی ممکن است از پروستات به سایر قسمتهای بدن به خصوص استخوان ها و گره های لنفاوی متاستاز بدهند .یکی از مکانیسم های مهم در تهاجم و متاستاز تومورها، فرآیند انتقال از اپی تلیال به مزانشیم (EMT) می باشد که افزایش بیان *ZEB1* به عنوان یک فاکتور کلیدی تنظیمی، فرایند EMT را در بسیاری از سرطان ها پیش می برد. در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی بیان ژن *ZEB1* و مقایسه آن در حالت خوش خیم و بدخیم سرطان پروستات، ۱۶ نمونه بافت هایپر پلازی خوش خیم (BPH) و ۱۷ نمونه سرطان پروستات (Pca)، جمع آوری شدند، سپس استخراج RNA و تبدیل آن به mRNA انجام گردید. نهایتا بیان ژن *ZEB1* در سطح mRNA با تکنیک ریل تایم پی سی آر بر روی cDNAهای سنتز شده ، بررسی گردید. نتایج ما در این پژوهش نشان داد که بیان ژن *ZEB1* در نمونه های بدخیم سرطان نسبت نمونه های خوش خیم افزایش یافته بود (P=0.047). بطور کلی می توان نتیجه گرفت بر اساس این یافته ها احتمالا بتوان از بررسی بیان ژن *ZEB1* به عنوان یک بیومارکر پیش آگهی دهنده برای تشخیص زودهنگام تومورهای پروستات استفاده کرد. همچنین به سبب نقش کلیدی *ZEB1* در رشد سرطان از طریق تنظیم سایر مارکرهای EMT، می توان با سرکوب بیان این ژن از پیشرفت و متاستاز سرطان جلوگیری کرد.

واژه های کلیدی: سرطان پروستات،انتقال از اپی تلیال به مزانشیم،ژن *ZEB1*

مقدمه

سرطان پروستات شایع ترین نوع سرطان در میان مردان سراسر جهان و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه می باشد (۱). میزان شیوع و نفوذ سرطان پروستات در قسمت های مختلف دنیا با بیشترین میزان در آمریکای شمالی و کمترین میزان در جنوب آسیا، متفاوت است (۲). اگر چه شیوع این سرطان در ایران بسیار کمتر از کشورهای غربی است، اما میزان آن در طول سالهای اخیر افزایش یافته است. عوامل خطر ابتلا به این سرطان شامل سن بالا، نژاد آفریقایی، آمریکایی و سابقه فامیلی مثبت می باشد (۳). اگر چه در حال حاضر شاخص های کلینو پاتولوژیکی مثل رنگ آمیزی، رتبه گلیسون و میزان PSA، مارکرهای

تشخیصی خوبی بوده و برای تصمیم گیری نوع درمان بکار میروند، اما با این وجود دقت کافی قادر به تفکیک تومورهای اولیه و تومورهایی متاستاتیک را ندارند. به همین علت، تحقیقات بر روی بیومارکرهای مولکولی گسترش یافته است که به تشخیص و پیش بینی رفتار سرطان کمک می کند (۴).

پیشرفت سرطان وابسته به پدیده انتقال از اپی تلیال به مزانشیم (EMT) است که در طی آن سلول های سرطانی قادر به مهاجرت به نقاط دیگر بدن و نهایتا متاستاز می باشند. به عبارتی سلول هایی که در طول متاستاز تومور متحمل EMT می شوند ویژگی هایی نظیر از دست دادن اتصال سلول به سلول ، قطبیت و باز آرایی اسکلت سلولی و افزایش تحرک سلولی را کسب می کنند (۵). EMT همچنین می تواند یک نقش فعال در طول گسترش متاستاز، با پیشبری سایر ویژگی های بدخیمی مثل وارد شدن سلول های توموری به داخل رگ را ایفا کند (۶). یک لیست از تنظیم کننده های EMT شامل فاکتورهای خارج سلولی (مثل HGF،TGFβ ، FGF، IGF و لیگاندهای NOTCH) فاکتورهای رونویسی (مثل *TWIST*، *SNAIL*، *SLUG* و *ZEB1*) و microRNA ها (مثل *mir-9* و *mir205*) و ریزمحیط شناسایی شده است (۷-۱۱). فرایند EMT با یک فاکتور رونویسی کلیدی میانجگری می شود که بیان ژن های اپی تلیالی مثل *E*کادهرین را سرکوب کرده و ژن های مزانشیمی مثل *Vimentin* و *N-cadhein* را القا می کند. در میان فاکتورهای دخیل در فرایند EMT، پروتئین *ZEB1* (پروتئین اتصالی افزایش دهنده انگشتان روی) یک عامل مرکزی است که نه تنها از عوامل ریز محیطی تاثیر می پذیرد بلکه توسط سایر فاکتورهای دخیل در EMT مثل ژن *SNAIL* القا می شود (۸). *E*کادهرین یک مولکول بزرگ چسباننده سلول به سلول است که مدت زیادی است به عنوان یک پروتئین سرکوبگر تومور شناخته شده است (۱۲). فقدان *E*کادهرین منجر به جدایی سلول های تومور شده و توانایی آنهارا برای مهاجرت، تهاجم و متاستاز افزایش می دهد. این ویژگی ها با پیش آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان همراه است (۷, ۱۳-۱۵).به علت نقش اساسی *ZEB1* در کاهش بیان *E*کادهرین ،*ZEB1* به عنوان یک محرک EMT و پیشرفت سرطان عمل می نماید(۱۱, ۱۶-۱۹) .بیان نابجای *ZEB1* در بسیاری از سرطان های انسانی مثل سرطان رحم(۲۰) ، پانکراس(۲۱, ۲۲)، استخوان(۲۳)، ریه(۲۴, ۲۵) ، کبد (۲۶)، معده (۲۷, ۲۸)، کلون (۲۹)و پستان (۳۰، ۳۱) مشاهده شده است. اما هنوز مطالعه ای در سطح کلینیکی در این زمینه روی سرطان پروستات انجام نشده است. لذا مطالعه حاضر به منظور تعیین نقش ژن *ZEB1* در نمونه های بالینی سرطان پروستات صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه۱۶ نمونه بافت خوش خیم (BPH) و۱۷ نمونه بدخیم سرطان پروستات (PCa) توسط پزشک متخصص با جراحی پروستاتکتومی گرفته شد .نمونه ها با کسب رضایت از بیماران بیمارستان لبافی نژاد ، در مدت 6 ماه جمع اوری و در همان لحظه به تانک ازت منتقل شد. اطلاعات بیماران مانند ،سن ،رتبه گلیسون، گرید بیماری و میزان آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) نیز از پزشک معالج دریافت شد .نمونه ها تا زمان استخراج RNA در فریز ۸۰- دانشگاه علوم پزشکی ایران نگهداری شدند.

استخراج RNA از نمونه های بافت جمع آوری شده توسط کیت RNXPLUS مطابق دستور العمل شرکت پارس توس انجام شد.کیفیت RNA های استخراج توسط دو روش الکتروفورز و اسپکتروفوتومتری ارزیابی شد و نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ بررسی گردید. cDNA با کیت EasyTM cDNA synthesis kit, Pars tous، به روش رونویسی معکوس و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده سنتز شد.

جهت انجام واکنش PCR پرایمرهای اختصاصی ژن هدف *ZEB1* و ژن رفرنس *GAPDH* طبق جدول ۱ طراحی و صحت آن با ابزارBLAST تایید شد.

اندازه گیری بیان ژن های *ZEB1* و *GAPDH* توسط واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه Rotor gene بر مبنای اندازه گیری افزایش تشعشع فلئورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین انجام گرفت. اجزای واکنش تکثیر در حجم نهایی ۱۵µl شامل ۷,۵µl سایبرگرین، ۱µl (۱۰pmol) آغازگرهای واکنش، ۳µl (۱۰ngr) از cDNA های سنتز شده و۳,۵ µl آب مقطر بوده است. برنامه حرارتی تکثیر ژن های *ZEB1* و *GAPDH* به شرح مقابل است: ۱ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته سازی

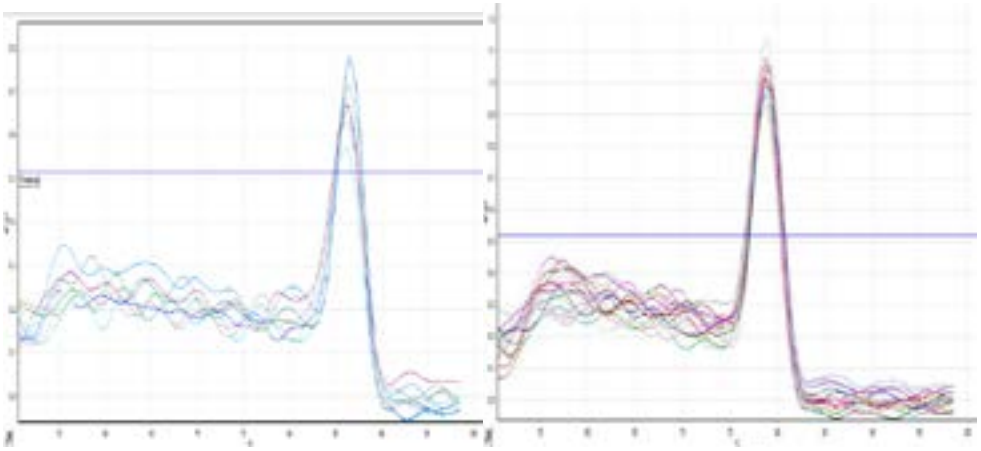
اولیه، ۴۰ چرخه در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۵ ثانیه برای اتصال پرایمرها و ۴۰ چرخه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد برای تکثیر. بمنظور بررسی آماری بیان ژن *ZEB1* با داده های کلینکو پاتولوژیکی بیماران سرطان پروستات از آزمون آماری independent T test و همبستگی اسپیرمن و پیرسون استفاده شد. همچنین برای بررسی نتایج بیان این ژن بین بیماران مبتلا به نوع خوش خیم و بدخیم سرطان از نرم افزار REST بر مبنای فرمول $2^{-\Delta\Delta}$ استفاده شد .

به سبب عدم اختصاصیت رنگ فلئورسنس سایبرگرین، برای اطمینان از تولید قطعات اختصاصی و عدم وجود باندهای غیر اختصاصی و برای محصولات Real Time PCR منحنی ذوب رسم شد. وجود تنها یک قله در منحنی ذوب برای آغازگرهای طراحی شده نشان داد(نمودار شماره۱) که هر دو جفت آغازگر بصورت اختصاصی عمل نموده و فاقد هر گونه قطعات غیر اختصاصی و پرایمر دایمر بودند. همچنین نمودار شماره ۲ منحنی تکثیر ژن هدف و رفرنس را که بیانگر تکثیر موفق ژن می باشد را ارایه می کند.

نتایج

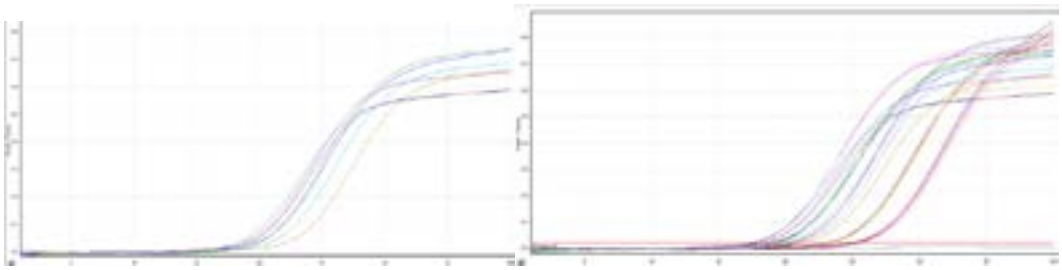
جدول ۱-توالی پرایمرهای واکنش تکثیر.

ژن	توالی پرایمر (۵-۳)	طول قطعه
ZEB1-F	CTTCTCACACTCTGGGTCTTATTC	127bp
ZEB1-R	CGTTCTTCCGCTTCTCTCTTAC	
GAPDH-F	AGTCCCTGCCACACTCAG	123bp
GAPDH-R	TACTTTATTGATGGTACATGACAAGG	



(ب) (الف)

نمودار شماره- ۱-الف -منحنی ذوب مربوط به تکثیر اختصاصی پرایمر ***ZEB1*** -ب- منحنی ذوب مربوط به تکثیر اختصاصی پرایمر *GAPDH*



(ب) (الف)

نمودار ۲-الف -منحنی تکثیر مربوط به ژن ***ZEB1*** -ب- منحنی تکثیر مربوط به ژن *GAPDH*

نتایج ریل تایم توسط نرم افزار REST 2009 مورد آنالیز آماری قرار گرفتند .در این نرم افزار معناداری وابسته به $P\leq0,05$است. با توجه به مقدار *P.Value* تفاوت معناداری در بیان ژن مورد نظر در بافت خوش خیم و بدخیم سرطان پروستات بصورت افزایش وجود دارد. درواقع با انجام محاسبات fold change بر مبنای فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ میزان بیان ژن *ZEB1* در حالت بدخیم سرطان ۳,۱۴ برابر نسبت به بیان در حالت خوش خیم افزایش یافته است (تصویر ۲) که از لحاظ آماری این تفاوت معنی دار است *(P=0.047)*.

ارتباط بین بیان ژن *ZEB1* و داده های پاتولوژیکی همچون سن، آنتی ژن اختصاصی پروستات، رتبه گلیسون و گرید تومو توسط آزمون اسپیرمن و کندلا مورد بررسی قرار گرفت و هیچ ارتباط معناداری (جدول ۲) بین آنها یافت نشد.

بحث

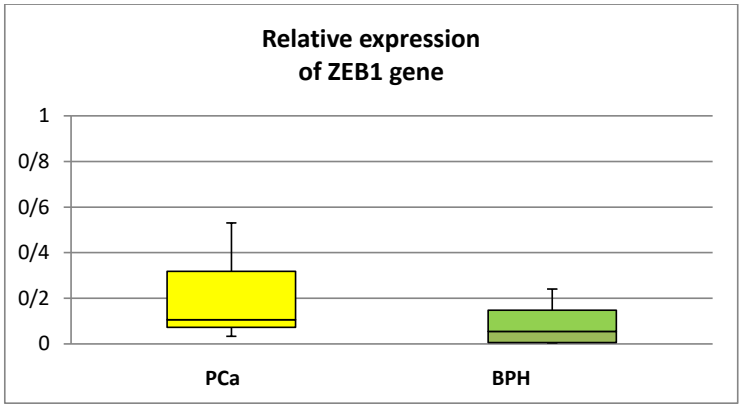
بعد از سرطان معده و ریه، سرطان پروستات در حال حاضر سومین بیماری بدخیم در ایران و پنجمین سرطان رایج در سراسر جهان است(۳۲). انتخاب بهترین روش درمان برای بیماران مبتلا به سرطان پروستات به فاکتور های مختلفی از جمله به میزان PSA در سرم ،فاکتور های خطر، رتبه گلیسون، رنگ آمیزی TNM و میزان امید به زندگی بستگی دارد (۳۳). سلولهای سرطانی اغلب در مراحل پیشرفته سرطان، از پروستات به استخوانها و گره های لنفاوی متاستاز می دهند. یکی از مکانیسم های مهم در رویداد چنین پیشرفتی، فرآیند انتقال از اپی تلیال به مزانشیم (EMT) است (۳۴, ۳۵) . *ZEB1* به عنوان یکی از تنظیم کننده های اصلی فرایند EMT شناسایی شده است و عملکرد آن به عنوان پیشبرنده متاستاز در بسیاری از سرطان های انسانی از جمله سرطان پستان منفی سه گانه (۳۶) سرطان سلول های فلسی ریه (۲۴)، سرطان کبد (۲۹)، سرطان معده(۲۷)، سرطان کولورکتال (۲۱, ۲۹) و سرطان پانکراس شناسایی شده است.اگرچه نقش *ZEB1* در فرایند EMT در سرطان پروستات تا سال 2008 ناشناخته بود.

در سال 2009 Tisheeka R وهمکارانش طی تحقیقات خود توانستند در شرایط *in vitro* فرایند انتقال از اپی تلیال به مزانشیم را به واسطه IGF-1 در سلول های سرطان پروستات القا کنند، و نتیجه گرفتند که *ZEB1* احتمالا در سلول های سرطانی بسیار مهاجم پروستات بیان می شود .آنها همچنین ثابت کردند که بیان این فاکتور با رتبه گلیسون بالا در تومور های سرطان پروستات ($P<0,001$) در ارتباط است .که همه این نتایج ،نقش ژن *ZEB1* را در مسیر EMT و تهاجم و متاستاز تومور مشخص می سازد (۳۱).

در سال 2016 ، Sandy Figiel و همکارانش نیز بیان EMTمارکرهای مختلفی از جمله *ZEB1* را در بافت نرمال سرطان پروستات ،سرطان موضعی پروستات، سرطان مقاوم به اختگی[1](CRPC) و حالت متاستاتیک آن با تکنیک ایمونو هیستوشیمی در سطح پروتیین بررسی کردند.آنها دریافتند که *ZEB1* در بافت نرمال بیان ندارد، بیان در حالت CRPC و متاستاز نیز نسبت به سرطان موضعی بیشتر است. آنها نشان دادند که در متاستاز سرطان پروستات ،بیان *ZEB1* یک

[1] Castration Resistant Prostate Cancer

فاکتور پیش بینی کننده برای کاهش بقا است در حالیکه در CRPCبیان ZEB1 هیچ تفاوتی یا کاهش بقا نداشت(۳۷). با توجه به مطالعات پیشین در تحقیق حاضر در صدد بر آمدیم که میزان بیان ژن *ZEB1* را برای اولین بار در شرایط داخل سلول و در سطح mRNA در نمونه های خوش خیم و بدخیم سرطان پروستات با تکنیک Real Time PCR بسنجیم. نتایج بدست آمده حاکی از یک افزایش بیان ۳,۱۴ برابری در گروه بدخیم در مقایسه با گروه خوش بود که طبق آنالیز آماری انجام شده این تفاوت معنی دار است(P=0.047). همچنین شایان ذکر است که این نتایج تایید کننده و نیز همسو یا مطالعات انجام گرفته پیشین است که نقش ژن *ZEB1* را به عنوان فاکتور کلیدی در تنظیم فرایند انتقال از اپی تلیال به مزانشیم و پیش بردن سرطان به مراحل پیش رفته تر و متاستاز تایید می کند.



تصویر ۲- نمودارهای جعبه ایBPH و PCa بیان ژن *ZEB1* را نسبت به ژن خانه دار *GAPDH* در دوگروه خوش خیم و بدخیم سرطان پروستات با یک افزایش بیان ۳,۱۴ برابری نشان می دهد.

جدول ۲- ارتباط بین یافته های پاتولوژیکی با بیان ژن *ZEB1*

متغیر	کلاس متغیرها	درصد	P value
سن	50-60	36.3%	0.06
	60-70	30%	
	>70	33.3%	
آنتی ژن اختصاصی			0.4
رتبه گلیسون	<7	70.56	0. 3
	>7	29.411	
گرید تومور	T2a	11.7%	0.5
	T2b	17.64%	
	T2c	29.41%	
	T3b	23.5%	
	T3c	17.64%	

از طرفی نیز علی رغم یافته ها در خصوص افزایش بیان *ZEB1* در سطح پروتئین نمونه های خوش خیم در مقایسه با نمونه های بدخیم پروستات، تاکنون هیچ ارتباط معناداری بین میزان بیان این ژن و مراحل مختلف بیماری گزارش

نشده است (۳۱, ۳۸). همچنین مطابق نتایج تحقیقات گزارش شده توسط Hosny M و همکارانش در سال 2012 (۳۹) ، ما نیز هیچ ارتباط معناداری بین بیان ژن *ZEB1* در بیماران مبتلا به سرطان پروستات با فاکتورهای تشخیصی مرسوم در این نوع بیماری برای مثل سن،مقدار PSA ،مرحله پاتولوژیکی و رتبه گلیسون مشاهده نکردیم.

نتیجه گیری

یافته های ما در این پژوهش ارتباط معناداری بین میزان بیان *ZEB1* در حالت خوش خیم و بدخیم آن نشان داد که احتمال داده می شود به علت عدم توانایی در تشخیص زودهنگام پیشرفت سرطان پروستات در مراحل اولیه بیماری یک تشخیص مولکولی مبتنی بر سنجش بیان فاکتور کلیدی ژن *ZEB1* نه تنها در پیش آگهی این بیماری بلکه در مدیریت درمان هم می تواند تاثیر بسزایی داشته باشد. از طرفی دیگر گمان می شود به منظور جلوگیری از پیشرفت و متاستاز سرطان می توان افزایش بیان ژن *ZEB1* را از طریق تنظیم سایر مارکرهای مسیر EMT، تنظیم نمود. اما بطور کلی شناسایی نقش ژنتیکی واقعی این ژن در تهاجم و متاستاز تومورهای پروستات مستلزم انجام تحقیقات بیشتری می باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه ژنتیک پزشکی بیمارستان اکبرآبادی کمال تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

1. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. New England Journal of Medicine. 2012;366(11):981-90.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(2):87-108.
3. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. Front Biosci. 2006;11(5):1388-413.
4. Katz B, Reis ST, Viana NI, Morais DR, Moura CM, Dip N, et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. PloS one. 2014;9(11):e113700.
5. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis ,plays an essential role in tumor metastasis. cell. 2004;117(7):927-39.
6. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature reviews Cancer. 2002;2(6):442.
7. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. Nature reviews Cancer. 2013;13(2):97.
8. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. Nature reviews Molecular cell biology. 2014;15(3):178.
9. Jung H-Y, Fattet L, Yang J. Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial–mesenchymal transition in metastasis. Clinical Cancer Research. 2015;21(5):962-8.
10. Zhang J, Ma L. MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. Cancer and Metastasis Reviews. 2012;31(3-4):653-62.
11. Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. Nature cell biology. 2014;16(9):864.
12. Okegawa T, Li Y, Pong R-C, Hsieh J-T. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. The Journal of urology. 2002;167(4):1836-43.
13. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nature reviews Cancer. 2004;4(2):118.
14. Derksen PW, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, et al. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. Cancer cell. 2006;10(5):437-49.
15. Onder TT ,Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. Cancer research. 2008;68(10):3645-54.
16. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance

against the epithelial phenotype? Nature reviews Cancer. 2007;7(6):415.
17. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, et al. The transcription factor ZEB1 (δEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. Oncogene. 2007;26(49):6979.
18. Funahashi J-i, Sekido R, Murai K, Kamachi Y, Kondoh H. Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. Development. 1993;119(2):433-46.
19. Ren J, Chen Y, Song H, Chen L, Wang R. Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line. Journal of cellular biochemistry. 2013;114(6):1395-40.٣
20. Spoelstra NS, Manning NG, Higashi Y, Darling D, Singh M, Shroyer KR, et al. The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. Cancer research. 2006;66(7):3893-902.
21. Bronsert P, Kohler I, Timme S, Kiefer S, Werner M, Schilling O, et al. Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. Surgery. 2014;156(1):97-108.
22. Wellner U, Brabletz T, Keck T. ZEB1 in pancreatic cancer. Cancers. 2010;2(3):1617-28.
23. Shen A, Zhang Y, Yang H, Xu R, Huang G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. Journal of surgical oncology. 2012;105(8):830-4.
24. Zhang J, Lu C, Zhang J, Kang J, Cao C, Li M. Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. Molecular biology reports. 2013;40(2):949-56.
25. Matsubara D, Kishaba Y, Yoshimoto T, Sakuma Y, Sakatani T, Tamura T, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. Pathology international. 2014;64(11):560-8.
26. Zhou Y-M, Cao L, Li B, Zhang R-X, Sui C-J, Yin Z-F, et al. Clinicopathological significance of ZEB1 protein in patients with hepatocellular carcinoma. Annals of surgical oncology. 2012;19(5):1700-6.
27. Okugawa Y, Toiyama Y, Tanaka K, Matsusita K, Fujikawa H, Saigusa S, et al. Clinical significance of zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) in human gastric cancer. Journal of surgical oncology. 2012;106(3):280-5.
28. Jia B, Liu H, Kong Q, Li B. Overexpression of ZEB1 associated with metastasis and invasion in patients with gastric carcinoma. Molecular and cellular biochemistry. 2012;366(1-2):223-9.
29. Zhang G-J, Zhou T, Tian H-P, Liu Z-L ,Xia S-S. High expression of ZEB1 correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. Oncology letters. 2013;5(2):564-8.
30. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. Oncogene. 2005;24(14):2375.
31. Graham TR, Zhau HE, Odero-Marah VA, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, et al. Insulin-like growth factor-I–dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. Cancer research. 2008;68(7):2479-88.
32. Pakzad R, Rafiemanesh H, Ghoncheh M, Sarmad A, Salehiniya H, Hosseini S, et al. Prostate cancer in Iran: trends in incidence and morphological and epidemiological characteristics. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17(2):839-43.
33. HOSSEINI M, Jahani Y, MAHMOUDI M, Eshraghian M, Yahyapour Y, KESHTKAR AA. The assessment of risk factors for prostate cancer in Mazandaran province, Iran. 2008.
34. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. cell. 2009;139(5):871-90.
35. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. The Journal of clinical investigation. 2009;119.١٤٢٠:(٦)
36. Jang MH, Kim HJ, Kim EJ, Chung YR, Park SY. Expression of epithelial-mesenchymal transition–related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. Human pathology. 2015;46(9):1267-74.
37. Figiel S, Vasseur C, Bruyere F, Rozet F, Maheo K, Fromont G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. Human pathology. 2017;61:26-32.
38. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. 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. Clinical Cancer Research. 2007;13(23):7003-11.

39. Behnsawy HM, Miyake H, Harada KI, Fujisawa M. Expression patterns of epithelial–mesenchymal transition markers in localized prostate cancer: Significance in clinicopathological outcomes following radical prostatectomy. BJU international. 2013;111(1):30-7.