

Prohibitin 2 mRNA Downregulation in Breast Cancer Tumor Tissues

Shaghghi Torkdari Z¹, Khalaj-Kondori M^{1*}, Hosseinpour Feizi MA¹

¹Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Receive: 28/12/2020
Accepted: 14/2/2021

*Corresponding Author:
khalaj@tabrizu.ac.ir

Ethics Approval:
IR.TABRIZU.REC.1398.016

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most important cause of cancer mortality among women, therefore the study of its causative or aggravating factors seems necessary. In this study, the mRNA levels of the *PHB2* gene were evaluated in tumor and adjacent non-tumor tissues of 50 women diagnosed with invasive ductal carcinoma of the breast.

Methods: RNX-Plus solution was used to isolate total RNA from tumor and adjacent non-tumor tissues of breast cancer patients. Thereafter, total RNA was converted to cDNA using PrimeScript™ RT reagent kit. The mRNA levels of *PHB2* were quantified by qRT-PCR and data were analyzed with a paired-samples *t* test. Furthermore, ROC curve analysis was performed to evaluate the diagnostic capacity of *PHB2* expression in breast cancer tumor tissues.

Results: A significantly lower level of *PHB2* mRNA was observed in tumor tissues of breast cancer patients compared with adjacent non-tumor tissues ($P < 0.0001$). *PHB2* mRNA levels showed an approximately 2.5-fold reduction in tumor tissues compared with normal tissues ($P = 0.001$). Roc cure analysis showed that *PHB2* mRNA level can discriminate tumors from non-tumor tissues with 91.3% specificity and 64.3% sensitivity ($AUC = 0.712$, $P < 0.001$).

Conclusion: Downregulation of *PHB2* in breast cancer patients shows that its mRNA levels can possibly discriminate tumors from non-tumor tissues.

Keywords: Breast Cancer, *PHB2*, Ductal Carcinoma, Biomarker

کاهش بیان mRNA پروهیپتین ۲ در بافت توموری سرطان پستان

زینب شقاقی ترکداری^۱، محمد خلج کندی^{۱*}، محمدعلی حسین پور فیضی^۱^۱گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

تاریخ ارسال: ۹۹/۱۰/۷

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۵

* نویسنده مسئول:

khalaj@tabrizu.ac.ir

مقدمه: سرطان پستان مهم‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است که بررسی عوامل ایجاد کننده یا تشدید کننده آن ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه، سطح mRNA *PHB2* در بافت تومور و بافت غیرتوموری مجاور مربوط به ۵۰ زن مبتلا به کارسینوم داکتال غیرتهاجمی پستان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: محلول RNX-Puls برای استخراج RNA کل از بافت توموری و غیرتوموری مجاور بیماران مبتلا به سرطان پستان استفاده شد. سپس با استفاده از کیت PrimeScriptTM RT برای تبدیل mRNA به cDNA استفاده شد. سطح mRNA *PHB2* توسط qRT-PCR مورد بررسی کمی قرار گرفته و داده‌ها با آزمون تی زوجی مورد آنالیز قرار گرفت. علاوه بر این، بررسی منحنی ROC برای ارزیابی پتانسیل بیومارکری *PHB2* در بافت‌های توموری سرطان پستان انجام شد.

یافته‌ها: سطح پایینی از *PHB2* mRNA در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با بافت غیرتوموری مجاور مشاهده شد ($P < 0.0001$). به عبارت دیگر، سطح *PHB2* mRNA در بافت توموری نسبت به حالت نرمال تقریباً ۲/۵ برابر کاهش داشته است ($P = 0.001$). آنالیز منحنی ROC نشان داد که سطح mRNA *PHB2* می‌تواند بافت‌های توموری و غیرتوموری را با اختصاصیت ۹۱/۳٪ و حساسیت ۶۳/۳٪ تشخیص دهد ($AUC = 0.712$, $P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: کاهش سطح mRNA *PHB2* در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان می‌دهد که سطح mRNA این ژن احتمالاً بافت توموری را از بافت‌های غیرتوموری مجاور می‌تواند تمایز دهد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، *PHB2*، کارسینومای داکتال، بیومارکر

مقدمه

در حال حاضر سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر انسان ها در سرتاسر جهان می باشد. یکی از شایع ترین نوع بدخیمی در بین زنان، سرطان پستان می باشد که سومین سرطان شایع در جهان پس از سرطان ریه و معده به حساب می آید. مطالعه شیوع و مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورها، هزینه های فزاینده ای برای سیستم های بهداشتی، به ویژه در کشورهای با درآمد کم و متوسط ایجاد می کند (۱، ۲). به این ترتیب با پیر شدن جمعیت و اتخاذ سبک زندگی غربی، سرطان پستان به یک چالش مهم اقتصادی در این کشورها تبدیل خواهد شد (۳). ۵ الی ۱۰ درصد از سرطان های پستان به دلیل جهش های مستعدکننده در سلول های زایشی می باشد که بیش از ۵۰٪ این موارد در ژن های BRCA1 و BRCA2 اتفاق می افتد. میزان بروز استاندارد شده (ASR) در ایران برای جمعیت مردان ۰/۸۲ در هر صد هزار و برای جمعیت زنان تعداد ۲۴ در هر صد هزار به دست آمده است (۴). سالانه افراد زیادی در اثر ابتلا به سرطان پستان در کشورهای مختلف جهان از جمله ایران جان خود را از دست می دهند که در صورت تشخیص به موقع این بیماری، کنترل و درمان آن سریع تر بوده و موفقیت آن نیز بیشتر خواهد بود. مطالعات مختلفی در جهت شناسایی عوامل انکوژنی و فاکتورهای مهارکننده توموری در سرطان ها به ویژه سرطان پستان صورت گرفته است که می تواند در جهت شناسایی روش های درمانی بهتر کمک کننده باشد (۵، ۶). از جمله این عوامل می توان به خانواده ژن های PHB (پروهیپیتین ها) اشاره کرد. PHB ها در ابتدا به عنوان یک عامل ضد تکثیر در سلول های کبد موش صحرایی شناخته شدند (۷). این خانواده ژنی دارای دو ژن مجزا می باشد که یکی از آن ها بر روی کروموزوم ۱۷ (PHB1) و دیگری بر روی کروموزوم ۱۲ (PHB2) قرار دارد و دو ایزوفرم پروتئینی متفاوت به نام های PHB1 و PHB2 را تولید می کند که از نظر تکاملی حفاظت شده هستند (۸). میانکنش این دو پروتئین در غشای میتوکندری برای پایداری میتوکندری ضروری می باشد (۹). این پروتئین ها در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با تومورزایی نیز نقش دارند (۱۰). مطالعات نشان داده است که تغییر در سطح mRNA ژن PHB2 می تواند منجر به متاستاز

سلول های سرطانی و یا آپوپتوز شود (۱۱، ۱۲). یکی از دلایل عملکردهای چندگانه این مولکول انتقال آن از میتوکندری به هسته و سیتوپلاسم سلول می باشد بر اساس مطالعات اخیر، PHB2 در سرطان های مختلف به طور متفاوت بیان می شود که این موضوع نشان دهنده این است که این ژن می تواند به عنوان بیومارکر جدید در تشخیص و درمان سرطان ها به حساب بیاید (۱۳). به این ترتیب هدف مطالعه حاضر، بررسی و مقایسه سطح mRNA ژن PHB2 در بافت توموری و بافت غیرتوموری مجاور در زنان مبتلا به سرطان پستان و نیز تعیین میزان قدرت بیومارکری این ژن در بافت توموری این بیماری می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه نمونه های بافتی تومور و نیز بافت غیرتوموری مجاور از ۵۰ نفر زن مبتلا به کارسینومای داکتال غیرتهاجمی پستان که در سال های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ به بیمارستان نورنجات تبریز مراجعه کرده اند با روش نمونه گیری تصادفی به دست آمده است. حجم نمونه با ضریب اطمینان ۹۵٪ و قدرت ۹۰٪ و effect size (میزان اثر) ۰/۵ (۱۴)، ۴۴ نمونه برآورد شده است که با در نظر گرفتن ریزش احتمالی نمونه ها، ۵۰ نفر به عنوان شرکت کننده در نمونه گیری شرکت کرده اند. به این ترتیب که نمونه های بافتی در طی جراحی به داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری استریل انتقال داده شده و سپس در فریزر ۸۰- نگهداری گردید. این مطالعه بر اساس مجوز IR.TABRIZU.REC.1398.016 مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه تبریز قرار گرفته و از تمامی بیماران شرکت کننده در مطالعه، رضایت نامه آگاهانه اخذ گردیده است.

استخراج RNA و رونوشت برداری معکوس

RNA تام از نمونه های بافتی بیماران با استفاده از کیت RNX-Plus استخراج گردیده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. سپس رونوشت برداری معکوس (سنتر cDNA) به وسیله کیت PrimeScriptTM انجام شد.

هر چرخه شامل دمای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه. *GAPDH*: مرحله اول شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه واکنش که هر چرخه نیز شامل دمای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه. داده‌های به دست آمده از Real time PCR به کمک نرم‌افزار SPSS 16, Graph Pad Prism و MedCalc مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت.

علاوه بر این، جهت محاسبه حجم نمونه از نرم‌افزار *G Power* استفاده گردید. برای مقایسه میانگین بیان ژن در بین دو گروه از آزمون تی زوجی استفاده گردید. علاوه بر این، از آنالیز منحنی ROC جهت بررسی قدرت بیومارکری *PHB2* در بافت توموری بیماران استفاده گردید. در این داده‌ها *P value* کمتر از ۰/۰۵ به صورت معنی‌دار تعریف شده است.

واکنش Real-time PCR

طراحی پرایمرهای *PHB2* با کمک نرم‌افزار Gene Runner و سایت NCBI انجام شد که در جدول ۱ نشان داده است.

به منظور تکثیر ژن و بررسی کمی بیان، واکنش Real time PCR به روش SYBER Green با استفاده از مسترمیکس AMPLIQON و دستگاه StepOnePlus™ Real-Time بر روی cDNA حاصل صورت گرفت.

در این روش ژن هدف با ژن کنترل داخلی *GAPDH* مورد مقایسه قرار می‌گیرد که سطح mRNA ژن *PHB2* در بافت توموری نسبت به بافت غیرتوموری مجاور با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه می‌گردد. شرایط دمایی واکنش برای ژن *PHB2* و *GAPDH* به شرح ذیل می‌باشد:

PHB2: مرحله اول شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه واکنش که

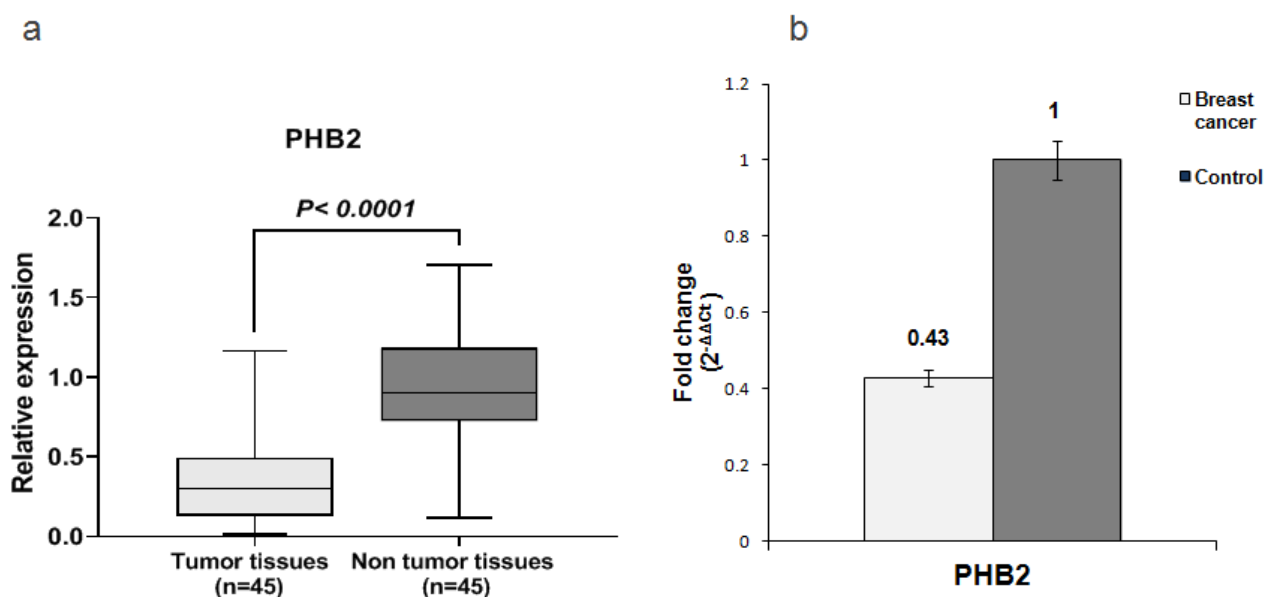
جدول ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در qPCR

نام ژن	توالی پرایمرها (5'-3')		طول محصول (bp)
	Forward	Reverse	
<i>PHB2</i>	GCCACATCACAGAATCGTATC	GCTGGCTCCTCAAAACTG	175
<i>GAPDH</i>	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGT	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	204

یافته‌ها

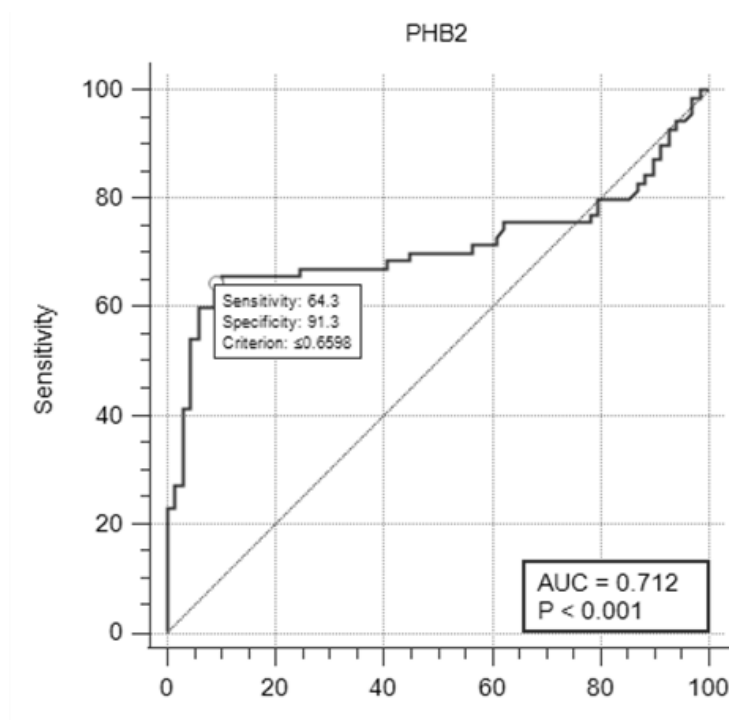
در مجموع ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان در این مطالعه بررسی شدند که سن تشخیص در این بیماران بین ۲۶ و ۷۸ سال بود. اطلاعات پاتولوژیکی بیماران نشان می‌دهد که ۳۸٪ از تومورها در مرحله ۱ بیماری، ۱۸٪ در مرحله ۲، ۲۰٪ در مرحله ۳ و ۲۱٪ در مرحله ۴ قرار دارند. ۹۰٪ از بیماران تومورهایی با ساب تایپ‌های مولکولی لومینال A و B، ۶٪ HER2 مثبت و ۴٪ به حالت سه‌گانه منفی (Triple-Negative) دارند. علاوه بر این، وجود متاستاز در غدد لنفاوی ۲۲٪ از بیماران مشاهده شده است. سطح mRNA ژن *PHB2* در نمونه‌های بافتی توموری و حاشیه تومور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح mRNA ژن *PHB2* در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های غیرتوموری مجاور آن‌ها به صورت معنی‌داری کاهش یافته است.

تغییرات مربوط به mRNA ژن Relative (expression) در شکل ۱ نشان داده شده است. علاوه بر این، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (محاسبه Fold change) نسبت کاهش سطح mRNA ژن *PHB2* در بافت توموری به بافت غیرتوموری مجاور به دست آمد (شکل ۱b). به عبارت دیگر میزان سطح mRNA این ژن در بافت توموری ۲/۵ برابر نسبت به بافت غیرتوموری مجاور کاهش یافته است. تجزیه و تحلیل منحنی ROC به منظور ارزیابی قدرت بیومارکری ژن *PHB2* در بافت توموری سرطان پستان انجام شد. شکل ۲ منحنی ROC AUC (سطح زیر منحنی) مربوطه و نیز مقادیر حساسیت و اختصاصیت را نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل منحنی ROC نشان می‌دهد که *PHB2* می‌تواند به طور قابل توجهی نمونه‌های تومور را از بافت‌های غیرتوموری تشخیص دهد ($P < 0.001$).



شکل ۱: بیان ژن PHB2 در زنان مبتلا به سرطان پستان

(a) نمودار جعبه‌ای نرمال شده با *GAPDH* نشان‌دهنده سطح mRNA نسبی *PHB2* بافت توموری در مقایسه با بافت غیر توموری مجاور سرطان پستان / (b) نمودار میله‌ای Fold change نشان‌دهنده میزان تفاوت سطح mRNA ژن *PHB2* در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های غیر توموری



شکل ۲: آنالیز منحنی ROC

این منحنی قدرت بیومارکری ژن *PHB2* در نمونه‌های بافتی زنان مبتلا به سرطان پستان را نشان می‌دهد. (AUC: سطح زیر منحنی)

بحث

PHB2 که با نام‌های BAP37 و REA نیز شناخته می‌شود، یک پروتئین چند عملکردی می‌باشد. این مولکول عمدتاً در هسته سلول، میتوکندری و یا غشای سلولی واقع شده و تغییر سطح mRNA آن می‌تواند به عنوان بیومارکر تشخیصی مهم برای بیماری‌های مختلف به ویژه برای توسعه، تشخیص و پیش‌آگهی سرطان‌ها در نظر گرفته شود. این ژن در چندین مورد بدخیمی انسان، از جمله کارسینومای سلول‌های کبدی (۱۵)، سرطان پروستات (۱۶) کارسینومای سلول سنگفرشی مری (۱۱) و رابدومیوسارکوما (۱۷) افزایش بیان نشان داده است. مطالعات انجام شده در زمینه مکانیسم عمل *PHB2* در تومورزایی نشان می‌دهند که تغییر بیان این ژن با دخالت در مسیرهای سیگنالی متفاوتی می‌تواند در فرآیند تومورزایی نقش داشته باشد. به عنوان مثال، *PHB2* در سرطان پروستات از طریق مهار بیان *AKT2* منجر به افزایش مهاجرت سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۶). در کارسینومای سلول‌های کبدی، افزایش بیان ژن *PHB2* منجر به افزایش توانایی سلول‌های سرطانی برای سازگاری با محیط‌های کم اکسیژن و نیز مقاومت در برابر آپوپتوز ناشی از شیمی‌درمانی می‌گردد (۱۵). برخلاف این مطالعات، چندین گزارش دیگر نشان داده‌اند که کاهش سطح mRNA ژن *PHB2* می‌تواند نقش مهمی در تهاجم و متاستاز آدنوکارسینومای معده (۱۸، ۱۹) و نیز سرطان پستان از نوع گیرنده استروژن مثبت (ER+) داشته باشد (۲۰). مطابق با این گزارش‌ها، در مطالعه حاضر، کاهش ۲/۵ برابری سطح mRNA ژن *PHB2* در بافت توموری سرطان پستان نسبت به بافت غیرتوموری مجاور مشاهده شد.

در سرطان‌های وابسته به استروژن مانند سرطان پستان از نوع گیرنده استروژن مثبت (ER+)، *PHB2* به طور انتخابی فعالیت رونویسی گیرنده استروژنی آلفا در هسته را مهار کرده و به عنوان سرکوبگر گیرنده استروژنی شناخته می‌شود (۲۱). در واقع فاکتوری به نام BIG-3 در سرطان پستان ER+ با اتصال به *PHB2* و فسفریله کردن آن منجر به غیر فعال‌سازی و مهار آن می‌شود (۲۱-۲۳). بنابراین کاهش میزان *PHB2* و عدم اتصال آن به گیرنده

استروژنی آلفا منجر به افزایش رشد سلول‌های سرطانی وابسته به گیرنده استروژنی آلفا و پیشرفت سرطان می‌گردد (۲۰). به عبارت دیگر، در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان پستان از نوع گیرنده استروژن مثبت، *PHB2* دچار کاهش بیان می‌گردد. در مطالعه حاضر ۹۰٪ از افراد مبتلای شرکت کننده در مطالعه به گروه لومینال A و B (گیرنده استروژن مثبت) تعلق دارند. به این ترتیب در مطالعه ما نیز به دلیل بالا بودن درصد افراد گروه لومینال، مطابق با مطالعات اخیر، کاهش سطح mRNA ژن *PHB2* در بافت توموری نسبت به بافت غیرتوموری مجاور مشاهده شده است. تجزیه و تحلیل منحنی ROC در بافت توموری بیماران نشان داد که سطح mRNA ژن *PHB2* می‌تواند بافت توموری را از بافت‌های غیرتوموری تشخیص دهد (حساسیت: ۶۴/۳، ویژگی: ۹۱/۳۶).

نتیجه‌گیری

سطح mRNA ژن *PHB2* در نمونه‌های بافتی توموری بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به بافت غیرتوموری مجاور کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت کاهش سطح mRNA ژن *PHB2* احتمالاً بتواند به عنوان یک بیومارکر قوی برای تمیز بافت تومور از بافت غیرتوموری در بیماران مبتلا به سرطان پستان به حساب آید. با توجه به اهمیت این ژن در سرطان پستان، مطالعات بیشتر در زمینه ارتباط بیان این ژن با میزان بقاء افراد بیمار و همچنین نقش این فاکتور در درمان بیماران و ایجاد روش‌های درمانی موثر ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از تمامی بیماران شرکت کننده در این مطالعه کمال تشکر و سپاس را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

References

1. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2012; 13(8):790-801.
2. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet*. 2011; 378(9801):1461-84.
3. Toriola AT, Colditz GA. Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2013; 138(3): 665-73.
4. Abachizadeh K, Moradi-Kouchi A, Ghanbari-Motlagh A, Kousha A, Shekarriz-Foumani R, Erfani A. Breast cancer in Iran: Levels, variations and correlates. *Community Health (Salāmat-i ijtīmāi)*. 2018; 5(1):11-21.
5. Lee EY, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science*. 1988; 241(4862):218-21.
6. T'Ang A, Varley JM, Chakraborty S, Murphree AL, Fung YK. Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science*. 1988; 242(4876):263-6.
7. McClung JK, Danner DB, Stewart DA, Smith JR, Schneider EL, Lumpkin CK, et al. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989; 164(3): 1316-22.
8. Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, Murphy LJ. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med*. 2005; 11(4): 192-7.
9. Nijtmans LG, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J*. 2000; 19(11):2444-51.
10. Fu P, Yang Z, Bach LA. Prohibitin-2 binding modulates insulin-like growth factor-binding protein-6 (IGFBP-6)-induced rhabdomyosarcoma cell migration. *J Biol Chem*. 2013; 288(41):29890-900.
11. Cai XW, Yu WW, Yu W, Zhang Q, Feng W, Liu MN, et al. Tissue-based quantitative proteomics to screen and identify the potential biomarkers for early recurrence/metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med*. 2018; 7(6):2504-17.
12. Zhang Y, Wang LN, Lin YN, Xing YX, Shi Y, Zhao J, et al. The novel long noncoding RNA C283070 is involved in the transition of LNCaP cells into androgen-independent cells via its interaction with PHB2. *Asian J Androl*. 2018; 20(5):511-7.
13. Kuramori C, Azuma M, Kume K, Kaneko Y, Inoue A, Yamaguchi Y, et al. Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 379(2):519-25.
14. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences: Academic press; 2013.
15. Cheng J, Gao F, Chen X, Wu J, Xing C, Lv Z, et al. Prohibitin-2 promotes hepatocellular carcinoma malignancy progression in hypoxia based on a label-free quantitative proteomics strategy. *Mol Carcinog*. 2014; 53(10):820-32.
16. Shen Y, Gao Y, Yuan H, Cao J, Jia B, Li M, et al. Prohibitin-2 negatively regulates AKT2 expression to promote prostate cancer cell migration. *Int J Mol Med*. 2018; 41(2):1147-55.
17. Egas-Bejar D, Huh WW. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolesc Health Med Ther*. 2014; 5:115-25.
18. Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res*. 2004; 14(10):491-9.
19. Liu T, Tang H, Lang Y, Liu M, Li X. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett*. 2009; 273(2):233-42.
20. Wanjin H, Kim N-H, Yoshimaru T, Chen Y-A, Matsuo T, Komatsu M, et al. BIG3 Inhibits the Estrogen-Dependent Nuclear Translocation of PHB2 via Multiple Karyopherin-Alpha Proteins in Breast Cancer Cells. *Plos One*. 2015; 10(6):e0127707.
21. Chigira T, Nagatoishi S, Tsumoto K. Differential binding of prohibitin-2 to estrogen receptor α and to drug-resistant ER α mutants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 463(4):726-31.
22. Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, Chen Y-A, Murakami Y, Mizuguchi K, et al. Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Nature Communications*. 2013; 4(1).
23. Yoshimaru T, Ono M, Bando Y, Chen YA, Mizuguchi K, Shima H, et al. A-kinase anchoring protein BIG3 coordinates oestrogen signalling in breast cancer cells. *Nat Commun*. 2017; 8:15427.

