

بررسی بیان ژن‌های Beclin1 و LC3 در بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه

معصومه اکبری-کلیشمی^۱، شهره زارع کاریزی^۱، مرتضی کریمی پور^{۲*} Ph.D.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۲- انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mortezakarimi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۵

چکیده

هدف: در مطالعه حاضر میزان بیان ژن‌های مذکور در ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه بررسی گردیده است.

مواد و روش‌ها: استخراج RNA از بافت توموری و بافت مجاور ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه انجام شد. پس از سنتز cDNA، با روش Real time-PCR بیان ژن‌های Beclin1 و LC3 ارزیابی گردید. همچنین میزان بیان این ژن‌ها با یافته‌های بالینی و پاتولوژی بیماران مقایسه شد.

نتایج: در مطالعه حاضر میزان بیان دو ژن Beclin1 ($p < 0.0001$) و LC3 ($p < 0.0001$) افزایش قابل توجهی داشت. همچنین ارتباط معنی‌داری بین افزایش بیان LC3 بانوع زیرگروه بافتی مشاهده شد ($p = 0.0171$).

نتیجه‌گیری: افزایش بیان دو ژن Beclin-1 و LC3 ممکن است باعث افزایش فرآیند اتوفآژی شود و افزایش فرآیند اتوفآژی می‌تواند باعث توسعه‌ی تومورزایی گردد که تایید این نتیجه نیاز به تحقیقات بیش‌تر دارد.

کلمات کلیدی: اتوفآژی، Beclin1، LC3، سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه

مقدمه

سرطان ریه علت اصلی مرگ در اثر سرطان در جهان است (۱). در سال ۲۰۱۶، ۲۲۴۳۹۰ مورد جدید سرطان ریه (۱۱۷۹۲۰ مرد و ۱۰۶۴۷۰ زن) در ایالات متحده آمریکا شناسایی شده است. همچنین، تخمین زده شده است حدود ۱۵۸۰۸۰ (۸۵۹۲۰ مرد و ۷۲۱۶۰ زن) مورد مرگ و میر در اثر این بیماری رخ داده است. پر اهمیت‌ترین سرطان‌ها در ایران سرطان معده، سرطان ریه و سرطان پستان هستند و در سال ۲۰۱۲ در ایران ۴۳۶۱ مرگ بر اثر سرطان ریه گزارش شده است (۲). سازمان بهداشت جهانی (WHO) World Health Organization سرطان ریه را از نظر بافت‌شناسی به دو کلاس بزرگ (سرطان سلول‌های کوچک ریه و سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه) تقسیم می‌کند (۳). در سرطان سلول‌های کوچک ریه (SCLC) (Small Cell Lung Cancer) یاخته‌های سرطانی نوع کوچک در زیر میکروسکوپ به شکل جوی دو سر دیده می‌شوند و به‌همین دلیل به آن سرطان جو شکل (Oat-shaped) نیز گفته می‌شود. سرطان سلول‌های کوچک ریه حدود ۱۳ درصد از سرطان‌های ریه را شامل می‌شود. SCLC یک بیماری منحصر به فرد است که از نظر گرایش برای متاستاز و حساسیت شدید به شروع شیمی‌درمانی از NSCLC متمایز می‌شود (۴). سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه (NSCLC) بیش از ۸۵ درصد از سرطان‌های ریه را شامل می‌شود (۵). سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه از نظر بافت‌شناسی به سه نوع کارسینوما سلول‌های سنگفرشی (SCC) (Squamous Cell Carcinoma)، آدنوکارسینوما (ADC) (Adenocarcinoma) و کارسینوما سلول بزرگ تقسیم می‌شود (۶). با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در معرفی داروهای جدید و عمل جراحی، پیش‌آگاهی برای سرطان ریه هنوز ضعیف است و تنها ۱۵ درصد از بیماران مبتلا به سرطان ریه ۵ سال پس از تشخیص زنده می‌مانند، بنابراین تشخیص زودهنگام

NSCLC اهمیت بسیاری دارد (۷). در طول دوره شکل‌گیری و پیشرفت NSCLC فاکتورهای زیادی از جمله غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌گر تومور، اختلال در همئوستازی سلول، موانع حذف اندامک‌های سلولی آسیب دیده، موانع آپوپتوزیس و اتوفازی (Autophagy) درگیر هستند (۸).

اتوفازی یک مسیر داخل سلولی عمده برای تخریب و بازیافت پروتئین‌هایی با عمر طولانی و اندامک‌های آسیب دیده است که از طریق مسیرهای مختلف شامل ماکرواتوفازی، میکرواتوفازی و اتوفازی به‌واسطه‌ی چاپرون‌ها اتفاق می‌افتد (۹، ۱۰، ۱۱). در ماکرواتوفازی (که به‌عنوان اتوفازی شناخته می‌شود) بخشی از سیتوپلاسم سلول داخل یک واکوئل تخصصی به نام اتوفاگوزوم فرو می‌رود که در نهایت با وزیکول‌های لیزوزوم برای تخریب مواد مصادره شده ادغام می‌شود (۱۰). اتوفازی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژی مثل رشد سلول، پیری، مرگ سلولی، پاسخ استرس و پاسخ ایمنی همچنین در سرطان درگیر است (۱۰، ۱۲). تقریباً ۳۰ ژن فرآیند اتوفازی را تنظیم می‌کنند که همه‌ی آن‌ها در مخمر کشف شده‌اند و ۱۶ همولوگ آن‌ها در انسان شناسایی شده‌اند (۱۳). در این میان ژن‌های Beclin-1 و LC3 نقش محوری در اتوفازی دارند (۱۰).

Beclin-1 هم در مسیرهای سیگنالینگ و هم در مرحله‌ی شروع تشکیل اتوفاگوزوم که در آن تعامل با PI3PK و hvp34 ضروری است درگیر است (۱۰، ۱۴، ۱۵).

LC3 شامل یک فرم محلول LC3I (با وزن مولکولی 18Kb) و فرم لیپیدی به نام LC3II (با وزن مولکولی 16Kb) است و به‌صورت ۳ ایزوفرم (LC3A, LC3B, LC3C) در بافت پستانداران بیان می‌شود که از این میان LC3B با اتوفازی مرتبط است (۱۴، ۱۵). انواع مختلفی از عوامل استرس‌زا LC3 را به شدت تنظیم می‌کنند و آن را به فرم سیتوزولیک تبدیل

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA توسط تریزول (Qiagen, USA) از بافت براساس دستورالعمل شرکت انجام شد. سپس توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر غلظت RNA با اندازه‌گیری میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. همچنین کیفیت RNA استخراج شده نیز توسط اندازه‌گیری نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ سنجیده شد. سپس RNA تا زمان استفاده در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

سنتز cDNA توسط کیت فرمنتاز انجام شد. بر این اساس ابتدا با توجه به غلظت RNA استخراج شده مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم از آن وارد واکنش شد. سپس مقدار ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر (120ul, Fermentas, USA) اضافه شد و با DEPC-treated water (Fermentas, USA) به حجم ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ سانتی‌گراد انکوبه شد و روی یخ سرد شد. در مرحله بعد میزان ۴ میکرولیتر بافر 5X و ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم Ribo Lock RNase inhibitor (10000u, Fermentas, USA)، ۲ میکرولیتر dNTP Mix 10mM (Fermentas, USA) و ۰/۵ میکرولیتر RevertAidReverse (Fermentas, USA) Transcriptase (2500u) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و بعد ۶۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت، cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

واکنش real-time PCR کمی: مطالعه میزان بیان ژن‌های Beclin-1 و LC3 با استفاده از روش real-time PCR نسبی و مسترمیکس سایبرگرین 2X (شرکت امپلیکون) انجام شد. در مطالعه حاضر از ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. اطلاعات مربوط به پرایمرها در

می‌کنند و تعامل فرم سیتوزولیک (LC3I) را با فسفاتیدیل اتانول آمین برای تشکیل فرم LC3II که به‌طور اختصاصی روی اتوفاگوزوم قرار می‌گیرد افزایش می‌دهند، همچنین LC3II تاکنون به‌عنوان قابل اعتمادترین مارکر اتوفاژی نیز در نظر گرفته شده است (۱۵،۱۴).

بررسی بیان ژن‌های اتوفاژی در بافت‌های سرطان محدود و دارای نتایج بحث برانگیز است، اگرچه بیش‌تر مطالعات نشان داده‌اند که اتوفاژی به سرکوب تومور کمک می‌کند (۱۲). در مطالعه حاضر بیان دو ژن Beclin-1 و LC3 در سطح mRNA در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه: نمونه‌ها از بیماران با تشخیص ابتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه که هیچ درمانی روی آن‌ها صورت نگرفته بود، توسط پاتولوژیست از بهمن ۱۳۹۴ لغایت مهر ۱۳۹۵ از بیمارستان مسیح دانشوری تهیه شدند و وارد مطالعه شده‌اند. از هر بیمار در اتاق عمل توسط جراح، نمونه توموری و مجاور توموری جدا شد و پس از قرار دادن در کرایوتیوب بلافاصله به تانک ازت منتقل شد و سپس در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. تعداد نمونه بیماران در مطالعه حاضر، بر اساس روش pilot study (مطالعه با مقیاس کوچک) در نظر گرفته شد. بر این اساس، حدود ۵۰ نمونه وارد این مطالعه شدند که ۲۰ نمونه در بررسی پاتولوژی، توموری بودن بافت ریه‌ی آن‌ها تایید نشد و از مطالعه خارج شدند و در نهایت با تایید پاتولوژیست ۳۰ نمونه باقی ماند. همچنین از بیماران فرم رضایت نامه دریافت شده است و روند پژوهش نیز به تصویب بورد دانشگاه رسیده است.

جدول ۱ آورده شده است، در این مطالعه طراحی پرایمر نیز توسط نرم افزار Gene runner انجام گرفته است.

جدول ۱: توالی پرایمرها برای تکثیر ژن های هدف

شماره شناسایی	ژن های هدف	5' → 3'	محل توالی	دما (°C)	اندازه محصول (bp)
NM_003766.4	Beclin1	Forward	CAAGATCCTGGACCGTGTCA	۲۷۹-۲۹۸	۵۹/۳۹
		Reverse	GGCACTTTCTGTGGACATCATC	۴۴۵-۴۶۸	۵۹/۵۸
NM_181509.2	LC3	Forward	TACAGCAGATACGCGACCAG	۱۷۷-۱۹۶	۵۹/۶۲
		Reverse	TTCACCAGCAGGAAGAAGGC	۳۵۰-۳۶۹	۶۰/۲۵
NM_001256799.2	GAPDH	Forward	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	۱۰۸۷-۱۱۰۹	۶۸/۴
		Reverse	TCCACCACCTGTTGCTGTAG	۱۱۷۸-۱۲۰۰	۶۸/۴

USA) انجام شد. پس از تعیین کارایی تکثیر هر یک از پرایمرها توسط نمودار استاندارد، بیان ژن های مورد نظر سنجیده شد.

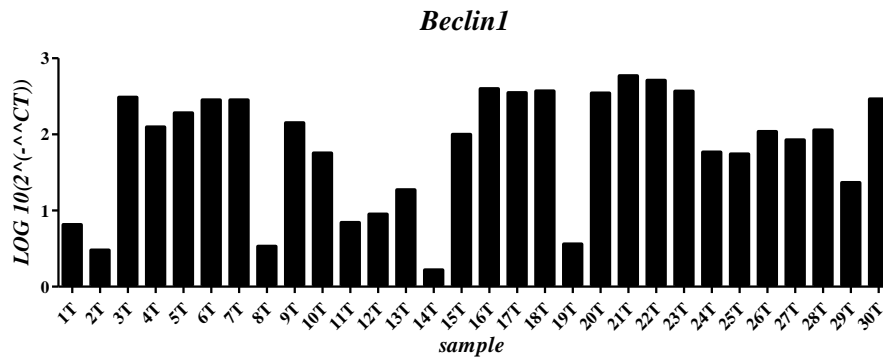
آنالیز آماری

میزان تغییرات بیان ژن ها نیز بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ سنجیده شد. جهت آنالیز آماری داده ها از نرم افزار Graphpad Prism5 استفاده شد. همچنین معنادار بودن داده ها براساس آزمون t-test ($p \leq 0.05$) ارزیابی شد.

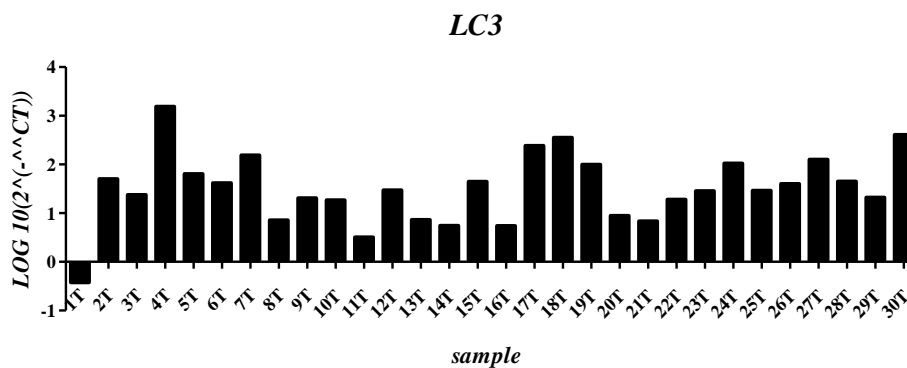
نتایج

در LC3 با همدیگر در بافت توموری NSCLC یافت شد ($p < 0.05$) (نمودار).

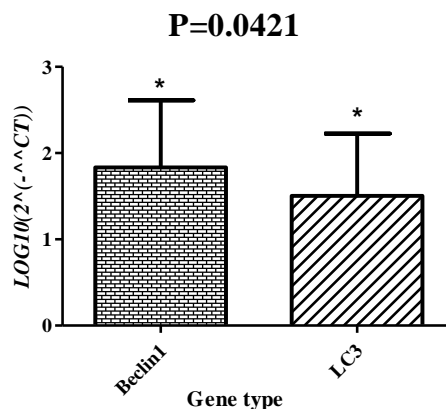
حجم کلی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل مسترمیکس سایبرگرین 2X، پرایمرها (۵ پیکومول)، cDNA و آب تزریقی جهت به حجم رساندن، است. تمام نمونه ها به صورت دوپلیکیت گذاشته شدند. برنامه ی دمایی سیستم شامل دو مرحله بود، در مرحله ی آغاز دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای فعال شدن آنزیم، سپس ۴۰ سیکل شامل دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه و اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. بعد از تکثیر از آنالیز منحنی ذوب نیز برای تعیین اختصاصیت تکثیر انجام شده، استفاده شد. واکنش real-time PCR در دستگاه StepOnePlus (Applied Biosystems,) نمودار ۱ و نمودار ۲ میزان تغییرات بیان هر یک از ژن ها در هر یک از نمونه های توموری به صورت جداگانه ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود بیان ژن Beclin1 در تمامی نمونه ها از حدود ۲ تا ۵۸۷ برابر افزایش بیان معنی داری ($p < 0.0001$) داشته است و بیان ژن LC3 نیز در تمام نمونه ها به جز ۱ نمونه از ۳ تا حدود ۱۵۴۵ برابر افزایش بیان معنی داری ($p < 0.0001$) را نشان می دهد. همچنین، بر اساس آنالیز داده ها ارتباط معنی داری بین میزان افزایش بیان دو ژن، Beclin1 و



نمودار ۱: میزان بیان ژن Beclin1 در هر یک از نمونه‌های توموری، همان‌طور که در نمودار نشان داده شده است بیان ژن Beclin1 در همه‌ی نمونه‌های توموری افزایش یافته است.



نمودار ۲: میزان بیان ژن LC3 در هر یک از نمونه‌های توموری؛ همان‌طور که در نمودار نشان داده شده است بیان ژن LC3 در همه‌ی نمونه‌های توموری به جز یک نمونه افزایش یافته است.



نمودار ۳: ارتباط بین میزان افزایش بیان ژن های Beclin1 و LC3 در نمونه‌های توموری؛ ارتباط معناداری ($p < 0.05$) بین میزان افزایش بیان دو ژن، Beclin1 و LC3 باهمدیگر در بافت توموری NSCLC وجود دارد. این ارتباط بدین معنا است که افزایش بیان Beclin1 روی بیان LC3 نیز تاثیر می‌گذارد و باعث افزایش بیان آن نیز می‌شود.

بیماری و میزان درگیر شدن غدد لنفاوی نیز بررسی شده است (جدول ۲).

در این مطالعه ارتباط بین میزان بیان هر یک از ژن‌ها با علائم بالینی و پاتولوژیکی بیماران از جمله: نوع زیرگروه بافتی، استعمال یا عدم استعمال دخانیات، مرحله‌ی

جدول ۲: علائم بالینی و پاتولوژیکی بیماران، دسته‌بندی علائم بالینی و پاتولوژیکی بیماران و درصد بیماران موجود در هر گروه.

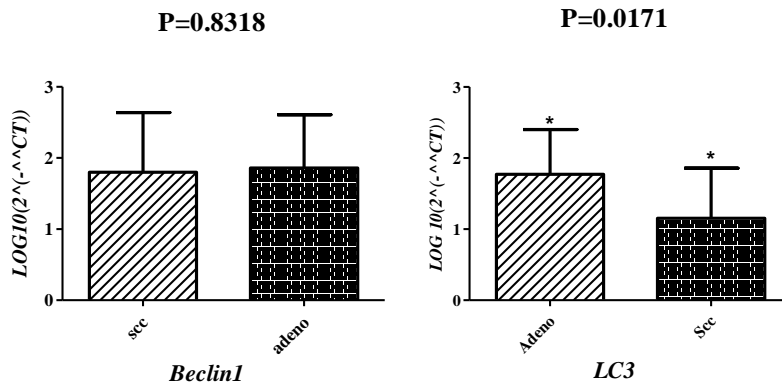
علائم بالینی و پاتولوژیکی بیماران	زیر گروه
زیرگروه بافتی	۵۷٪ بیماران مبتلا به آدنوکارسینوما ۴۳٪ مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی
مرحله‌ی بیماری	۶۶٪ بیماران، بیماری آن‌ها در مرحله‌ی I و II ۳۴٪ بیماران، بیماری آن‌ها در مرحله III
جنسیت	۲۷٪ زن ۷۳٪ مرد
سن	۳٪ زیر ۴۰ سال ۳٪ بین ۴۰ تا ۵۰ سال ۴۷٪ بین ۵۰ تا ۶۰ سال ۴۷٪ بالای ۶۰ سال
استعمال دخانیات	۷۳٪ غیرسیگاری ۲۷٪ سیگاری

همچنین در مطالعه حاضر افرادی که گره‌های لنفاوی آن‌ها درگیر نشده‌اند در یک گروه (negative lymph node) و بیمارانی که گره‌های لنفاوی آن‌ها چه در یک سمت و چه در دو سمت درگیر شده‌اند در یک گروه (positive lymph node) قرار داده شدند. بر طبق نتایج حاصل از آزمون t-test تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان ژن‌های Beclin1 ($p=0.5630$) و LC3 ($p=0.9982$) با درگیری غدد لنفاوی یافت نشد (جدول ۲).

تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان ژن Beclin1 با نوع زیرگروه بافتی نیز یافت نشد ($p=0.8318$) ولی در مقابل تفاوت معناداری ($p=0.0171$) بین میزان بیان ژن LC3 با زیر گروه بافتی یافت شد (جدول ۲).

بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه از نظر مرحله‌ی بیماری به چهار گروه I، II، III و IV تقسیم بندی می‌شوند. در مطالعه حاضر بیماران مرحله‌ی IV مورد بررسی قرار نگرفتند، زیرا این بیماران معمولاً دارای متاستاز به نقاط دور مانند مغز، کبد و استخوان بوده و جراحی نمی‌شوند. علاوه بر این به دلیل تعداد کم نمونه‌ها، نمونه بیمارانی که در مراحل I و II بودند در یک گروه و بیمارانی که در مرحله III بودند در گروه دیگر قرار داده شدند. بر طبق نتایج آزمون t-test تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان ژن‌های Beclin1 ($p=0.3753$) و LC3 ($p=0.7248$) با مرحله‌ی بیماری یافت نشد (جدول ۲).

نمودار (جدول ۲).



نمودار ۴: ارتباط میزان بیان ژن های Beclin1 و LC3 با زیرگروه بافتی، تفاوت معنی داری بین میزان بیان ژن Beclin1 با نوع زیرگروه بافتی نیز یافت نشد (p=0.8318) ولی در مقابل تفاوت معناداری (p=0.0171) بین میزان بیان ژن LC3 با زیر گروه بافتی یافت شد.

توموری حمایت می کند. اتوفاژی می تواند هدف درمانی برای سلول های تومور باشد. ژن های انتخاب شده ژن هایی هستند که در مسیر اتوفاژی نقش کلیدی دارند و اختلال در بیان آن ها در بسیاری از سرطان ها دیده شده است. بنابراین دانستن الگوی بیان این ژن ها در سلول های سرطانی ریه، با توجه به اهمیت بالای این سرطان، می تواند زمینه ای را برای انجام سایر تحقیقات در جهت رسیدن به درمان های هدفمند فراهم کند. بدین منظور در تحقیق حاضر بیان دوزن دخیل در مسیر اتوفاژی شامل Beclin-1 و LC3 در نمونه های توموری ۳۰ بیمار مبتلا به NSCLC بررسی شد.

Beclin-1 اولین ژن اتوفاژی پستانداری است که کشف شده و به طور مستقیم با پروتئین BCL2 تعامل دارد (۱۶). Beclin-1 به طور مثبت اتوفاژی را توسط همکاری با PI3KIII/Vps34 و دیگر کوفاکتورهای مثبت و منفی مثل Vps15, ATG14L/Barkor, UVRAG, Survivin, HMGB1, Ambra1, Rubicon, Bif-1 و Akt و Bcl-2/Bcl-XI تنظیم می کند (۱۶).

در تحقیق حاضر مشاهده شد که میزان بیان Beclin-1 در بافت سرطان سلول های غیرکوچک ریه در مقایسه با بافت نرمال مجاور آن افزایش پیدا کرده است. همچنین در تحقیق حاضر هیچ ارتباط معنی داری بین میزان افزایش بیان Beclin-1 با علائم بالینی و پاتولوژیکی

در مطالعه حاضر ارتباط بین میزان بیان ژن های Beclin1 و LC3 با سیگاری بودن یا نبودن بیماران بررسی شد که ارتباط معنی داری بین میزان بیان ژن های Beclin1 و LC3 (p=0.8293) با سیگاری بودن یا نبودن بیماران یافت نشد (جدول ۲).

بحث

NSCLC بیش از ۸۵ درصد از سرطان های ریه را شامل می شود و شیمی درمانی، گزینه درمانی مناسب برای بیماران NSCLC است. با این حال، حتی در بهترین شرایط نرخ پاسخ تنها ۳۰ تا ۵۰ درصد است. این پاسخ ضعیف در شیمی درمانی به شکست در درمان سرطان ریه منجر می شود. یکی از عوامل موثر در ایجاد سرطان ریه اختلال در فرآیندهای سلولی مثل اتوفاژی است. اتوفاژی در سلول های سرطانی دارای دو عملکرد است، هم به عنوان سرکوب کننده تومور نقش ایفا می کند و هم از بقای سلول های توموری حمایت می کند. قبل از پیشرفت تومور، اتوفاژی پیشرفت تومور را سرکوب می کند. در حالی که، زمانی که تومور شروع به پیشرفت می کند، اتوفاژی از بقای سلول توموری حمایت می کند (۱۵).

مطالعات نشان داده اند اتوفاژی در پاسخ به درمان سرطان توسط کمک به افزایش مقاومت به درمان از سلول های

معنی داری با بافت شناسی و تمایز دارد. همچنین Zhou و همکاران (۲۰) نیز با روش ایمونوهیستوشیمی میزان بیان ژن Beclin-1 را در NSCLC در ۲۴۴ نمونه توموری بررسی کردند و مشاهده کردند که میزان بیان Beclin-1 کاهش پیدا کرده و این کاهش بیان با افزایش تومورزایی نیز ارتباط دارد.

تناقض بین نتایج مطالعه حاضر و مطالعات فوق الذکر می تواند به دلیل جامعه ی کوچک مورد بررسی در تحقیق حاضر و نوع روش مورد استفاده در تحقیقات فوق الذکر باشد. زیرا در روش ایمونوهیستوشیمی میزان بیان پروتئین بررسی می شود و این احتمال وجود دارد که با اینکه میزان بیان mRNA افزایش یافته است ولی تمامی این mRNAها به دلیل وجود عوامل مهارکننده به پروتئین تبدیل نشده اند، در نتیجه میزان بیان ژن مورد نظر در سطح پروتئین با کاهش مواجه شده است. جالب توجه است که در سرطان روده ی بزرگ، در دو مطالعه ی جداگانه هم کاهش بیان و هم افزایش بیان در Beclin-1 گزارش شده است (۲۱).

چندین مکانیسم وجود دارد که توضیح می دهد چگونه تحریک اتوفاژی توسط Beclin-1 از سرطان جلوگیری می کند.

۱. مرگ سلولی که به واسطه ی اتوفاژی رخ می دهد.
۲. اتوفاژی می تواند ارگان های آسیب دیده را حذف کند بدین وسیله منابع تولید کننده مواد سمی مثل محصولات حاصل از آسیب DNA حذف می شوند. در نتیجه این عملکرد از استرس اکسیداتیو حاصل از آسیب ارگان ها جلوگیری می کند (۲۱).

LC3 شامل یک فرم محلول LC3I و فرم لیبیدی LC3II است (۲۲). زمانی که اتوفاژی رخ می دهد فرم سیتوپلاسمی LC3 (LC3I) به فرم غشایی اتوفاژیک LC3 (LC3II) که روی اتوفاگوزوم قرار می گیرد، تبدیل می شود. این تبدیل به نظر می رسد با فعالیت اتوفاژی مرتبط باشد، در واقع LC3 در مرحله ی طویل سازی

بیماران از جمله نوع زیرگروه بافتی (آدنوکارسینوما یا سلول های سنگفرشی)، استعمال یا عدم استعمال دخانیات (مثل سیگار)، مرحله ی سرطان (مرحله I، II و III) و درگیر شدن غدد لنفاوی بیماران یافت نشد که نتیجه ی حاصل بدین معنا است که در نمونه های مورد بررسی وجود این علائم باعث افزایش میزان بیان ژن Beclin-1 نشده است. سایر محققین نیز در این زمینه مطالعاتی داشته اند. Masuda و همکاران (۱۷) با روش ایمونوهیستوشیمی میزان بیان ژن Beclin-1 را در ۵۱۰ نمونه توموری معده بررسی کردند و مشاهده کردند که میزان بیان Beclin-1 در ۱۲۶ نمونه از ۵۱۰ نمونه افزایش پیدا می کند و بیان نمودند این افزایش بیان ارتباط معنی داری با متاستاز غدد لنفاوی، تهاجم عروقی و متاستاز کبدی دارد. Wu و همکاران (۱۸) نیز با روش ایمونوهیستوشیمی میزان بیان ژن Beclin-1 را در ۲۴۲ نمونه توموری روده ی بزرگ بررسی و مشاهده کردند که میزان بیان Beclin-1 در ۵۰ درصد نمونه ها افزایش پیدا کرده است که ارتباط معنی داری با علائم بالینی نیز ندارد. طبق این مطالعه می توان افزایش بیان Beclin-1 را به چند روش تفسیر کرد: در طول توسعه و پیشرفت سرطان ها، سلول های سرطانی اغلب در معرض استرس متابولیک مثل کمبود مواد مغذی یا اکسیژن به دلیل نرخ تکثیر بالا و کمبود عروق هستند، در نتیجه افزایش بیان Beclin-1 ممکن است اتوفاژی را تحریک کند، در نتیجه بقای سلول ها را از طریق ترویج عروق افزایش می دهد و از سلول های سرطانی در برابر مداخله های درمانی حفاظت می کند. البته در بعضی مطالعات سرطان ریه، کاهش بیان ژن Beclin-1 مشاهده شده است. Jiang و همکاران (۱۹) با روش های ایمونوهیستوشیمی، وسترن بلات و Real-time PCR میزان بیان ژن Beclin-1 را در بافت NSCLC در ۱۴۲ نمونه توموری بررسی کردند و مشاهده کردند که میزان بیان Beclin-1 در سطح پروتئین و mRNA کاهش پیدا کرده است و این کاهش بیان ارتباط

در واقع زمانی که بیان ژن Beclin-1 افزایش می‌یابد، به‌عنوان شروع کننده‌ی فرآیند اتوفاژی، باعث افزایش فرآیند اتوفاژی و همچنین افزایش بیان سایر ژن‌های موجود در این مسیر از جمله LC3 می‌شود. از سویی دیگر در شرایط کمبود مواد مغذی و استرس، mTOR غیرفعال می‌شود، در نتیجه اثر مهاري آن از روی ULK1 برداشته شده و در نتیجه فعالیت ULK1 افزایش می‌یابد و باعث افزایش فرآیند اتوفاژی و افزایش بیان سایر ژن‌های موجود در این مسیر از جمله LC3 می‌شود. همچنین ULK1 با تاثیری که به‌طور غیرمستقیم بر LC3 دارد باعث افزایش تبدیل LC3I به LC3II شده و در نتیجه باعث افزایش فرآیند اتوفاژی می‌شود. به‌همین دلیل افزایش فرآیند اتوفاژی و افزایش بیان ژن‌های درگیر در این مسیر در بافت‌های سرطانی به جهت تامین نیاز سلول در شرایط بحرانی قابل توجه است (۲۷).

همچنین همان‌طور که گفته شد براساس آنالیز داده‌ها ارتباط معنی‌داری ($p < 0.05$) بین میزان افزایش بیان دو ژن، Beclin1 و LC3 باهمدیگر در بافت توموری NSCLC یافت شد (نمودار). این ارتباط بدین معنا است که افزایش بیان Beclin1 روی بیان LC3 نیز تاثیر می‌گذارد و باعث افزایش بیان آن نیز می‌شود، به این دلیل که Beclin1 شروع کننده‌ی مسیر اتوفاژی است در نتیجه زمانی که میزان بیان آن افزایش می‌یابد، فرآیند اتوفاژی آغاز می‌شود. انتظار می‌رود میزان بیان LC3 نیز به‌عنوان یکی از مهره‌های کلیدی در میانه‌ی این مسیر افزایش یابد. در نهایت، با استفاده از بررسی میزان بیان سایر ژن‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند. بررسی عوامل موثر مانند microRNAها بر این ژن‌ها می‌توان زمینه را برای درمان‌های هدفمند فراهم کرد. همچنین با بررسی میزان بیان Beclin-1 و LC3 در سطح پروتئین می‌توان به‌طور قطع بیان کرد که بیان آن‌ها در فرآیند اتوفاژی افزایش یا کاهش می‌یابد.

تشکیل اتوفاگوزوم نقش دارد (۲۳). تغییرات در بیان LC3 در سرطان‌های مختلف با نوع تومور و مرحله‌ی سرطان مرتبط است (۲۴). در تحقیق حاضر مشاهده شد که میزان بیان LC3 در بافت سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه در مقایسه با بافت نرمال مجاور آن افزایش پیدا کرده است. ارتباط معنی‌داری ($p = 0.0171$) بین میزان افزایش بیان LC3 با نوع زیرگروه بافتی (آدنوکارسینوما یا سلول‌های سنگفرشی) یافت شد که این بدین معنی است که بیان LC3 در نمونه‌هایی با NSCLC نوع آدنوکارسینوما نسبت به نوع سلول سنگفرشی افزایش بیش‌تری می‌یابد. گروهی از محققین بیان نموده‌اند که افزایش بیان LC3 با متاستاز غدد لنفاوی، رگ‌زایی و متاستاز کبدی در ارتباط است و افزایش بیان LC3 باعث پیش‌آگهی ضعیف در سرطان پانکراس و ملانوما بوده است (۲۵). سایر محققین نیز در این زمینه مطالعاتی داشته‌اند از جمله: Masuda و همکاران (۱۷) با روش ایمونوهیستوشیمی میزان بیان ژن LC3 را در ۵۱۰ نمونه تومورری معده بررسی کردند و مشاهده کردند که میزان بیان این ژن در ۷۹ نمونه از ۵۱۰ نمونه افزایش یافته است و همچنین دریافتند که این افزایش بیان با متاستاز غدد لنفاوی، تهاجم عروقی و متاستاز کبدی مرتبط است. Huang و همکاران (۲۶) با روش ایمونوهیستوشیمی میزان بیان ژن LC3 را در کارسینومای غدد بزاقی در ۷۴ بیمار مبتلا به کارسینوم غدد لنفاوی و ۱۲ آدنومای پلئومورفیک و ۱۸ نمونه ترمال بررسی کردند و افزایش بیان قابل توجهی را در این ژن مشاهده کردند و همچنین مشاهده کردند که این افزایش بیان با سرطان زایی و پیشرفت سرطان مرتبط است. Wu و همکاران (۱۸) نیز با روش ایمونوهیستوشیمی میزان بیان ژن LC3 را در سرطان روده‌ی بزرگ در ۲۴۲ نمونه مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که میزان بیان این ژن در ۲۰ درصد نمونه افزایش می‌یابد. این افزایش بیان با تمایز سلولی مرتبط است.

6. Larsen JE, Minna, JD. Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. Clin Chest Med. 2011; 32(4): 730-740
7. Wang A, Kubo J, Luo J, Desai M, et al. ACtive and passive smoking in relation to lung cancer incidence in the women's health initiative observational study prospective cohort. Ann Oncol. 2015; 26(1): 221-30.
8. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. Genomics. 1999; 59(1): 59-65.
9. Toton E, Lisiak N, Sawick M, Rybczynska M. Beclin-1 and its role as a target for anticancer therapy. J Physiol Pharmacol. 2014; 65(4): 459-467.
10. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. Biochim Biophys Acta. 2009; 1793(4): 664-73.
11. Yu L, Strandberg L, Lenardo MJ. The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. Autophagy. 2008; 4(5): 567-73.
12. Bialik S, Kimchi A. Autophagy and tumor suppression: recent advances in understanding the link between autophagic cell death pathways and tumor development. Adv Exp Med Biol. 2008; 615: 177-200.
13. Bialik S, Kimchi A. Autophagy and tumor suppression: recent advances in understanding the link between autophagic cell death pathways and tumor development. Adv Exp Med Biol. 2008; 615: 177-200.
14. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. Embo J. 2000; 19(21): 5720-8.
15. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy. 2008; 4(2): 151-75.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر مشاهده گردید که میزان بیان دو ژن Beclin-1 و LC3 در بافت سرطان سلول های غیر کوچک ریه نسبت به بافت نرمال مجاور آن افزایش قابل توجهی می یابند. این افزایش بیان ممکن است باعث افزایش فرآیند اتوفاژی شود و افزایش فرآیند اتوفاژی می تواند باعث توسعه ی تومورزایی گردد که تایید این نتایج نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا به انجام رسیده است، بدین وسیله از کلیه ی افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Boolell V, Alamgeer M, David N, Ganju V. The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer (Basel). 2015; 7(3): 1815-1846.
2. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, Bazhenova LA, et al. . NCCN Guidelines Insights: Non-Small Lung Cancer, Version 4.2016 JNCCN 2016; 14(3): 255-264.
3. Travis D, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. JTO. 2011; 6 (2): 244-285.
4. Pillai RN, Owonikoko TK. Small Cell Lung Cancer: Therapies and Targets. Semin Oncol. 2014; 41(1): 133-142.
5. Boolell V, Alamgeer M, David N, Ganju V. The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer. 2015; 7(3): 1815-1846.

16. Yang Sun, MD, Zhi-Lan Peng. Autophagy, Beclin 1, and Their Relation To Oncogenesis. *LABMEDICIN*. 2008; 39(5): 287-290
17. Masouda G, Yashiro M, Kitayama K, Miki Y, et al. Clinicopathological Correlations of Autophagy-related Proteins LC3, Beclin 1 and p62 in Gastric Cancer. *Anticancer Res*. 2016; 36 (1): 129-136
18. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, et al. Expression and clinical significances of Beclin-1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(4): 3882-3891
19. Jiang L, Liang X, Liu M, Wang W, et al. Reduced expression of liver kinase B1 and Beclin-1 is associated with the poor survival of patients with non-small cell lung cancer. *oncology reports*. 2014; 32(5): 1931-1938.
20. Zhou S, Zhao S, Kuang M, Zhang B, et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?. *Cancer Lett*. 2012; 323(2): 115-127.
21. Won KY, Kim GY, Lim SJ, Kim YW. Decreased Beclin-1 expression is correlated with the growth of the primary tumor in patients with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Human pathology*. 2012; 43:62-68.
22. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*. 2000; 19(21): 5720-5728.
23. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*. 2007; 21(11): 1367-1381.
24. Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, et al. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in atg4c/autophagin-3. *JBiolChem*. 2007; 282(25): 18573-18583.
25. Cao Q, Liu F, Yang Z, Fu X, et al. Prognostic value of autophagy related proteins ULK1, Beclin 1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG9, ATG10, ATG12, LC3B and p62/SQSTM1 in gastric cancer. *Am J Transl Res*. 2016; 8(9): 3831-3847.
26. Huang C, Deng W, Zhang L, Zhang W, et al. Expression of LC3, LAMP2, KEAP1 and NRF2 in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2016; 22(1): 109-114
27. Chen Y, He J, Tian M, Zang Y, et al. UNC51-like kinase 1, autophagic regulator and cancer therapeutic target. *Cell Prolif*. 2014; 47(6): 494-505.

Investigating the expression of *Beclin1* and *LC3* genes in patients with non-small cell lung cancer

Akbari-Kelishomi M, M.Sc.¹, Zare Karizi Sh, Ph.D.¹, Karimipoor M, Ph.D.^{2*}

1. Department of Genetic, Islamic Azad University, Pishva Branch, Varamin,
2. Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran,

* Email corresponding author: mortezakarimi@yahoo.com

Received: 25 Nov. 2017

Accepted: 20 Nov. 2018

Abstract

Aim: In the present study, the expression of *Beclin1* and *LC3* genes has been investigated in 30 patients with non-small cell lung cancer.

Material and methods: RNA was extracted from tumor and adjacent normal tissues of 30 patients with non-small cell lung cancer. After synthesis of cDNA, real time-PCR was exploited for quantitative expression of *Beclin1* and *LC3* genes. Also, the expression of these genes was compared with the clinical and pathological findings of the patients.

Results: the expression levels of *Beclin1* ($P < 0.0001$) and *LC3* ($p < 0.0001$) genes increased significantly. Also, there was a significant correlation between increasing the expression of *LC3* with the subtype of tissue ($P = 0.01$).

Conclusion: The increased expression of *Beclin-1* and *LC3* genes may enhance the process of autophagy and this condition can develop tumorigenesis; however more research is needed to confirm these findings.

Keywords: autophagy, *Beclin1*, *LC3*, non-small cell lung cancer