

Evaluating the Expression of Oct-4, NANOG, Sox2 and Nucleostemin in Colon Cancer Cell Lines (Caco-2 and HT-29)

Sabrieh Amini, M.Sc.^{1*}, Fardin Fathi, Ph.D.^{2*}, Kazem Parivar, Ph.D.¹,
Homa Mohseni Kucheshfahani, Ph.D.¹, Mohammad Jafar Rezaie, Ph.D.²,
Bahram Nikkhoo, M.D.²

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

* Corresponding Addresses: P.O.Box: 14155-4933, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
P.O.Box: 66177-13446, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
Emails: amini.biology@gmail.com
farfath@yahoo.com

Received: 17/Sep/2009, Accepted: 4/Nov/2009

Abstract

Objective: Evaluating the expression of Oct-4, NANOG, Sox2 and Nucleostemin in colon cancer cell lines (Caco-2 and HT-29).

Materials and Methods: Caco-2 and HT-29 human colon cancer cell lines were cultured in Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) and Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) respectively, containing 10% fetal bovin serum (FBS) with 1% peniciline and streptomycinen in 37°, 5% CO₂ incubator. Total RNA was isolated using the ISOGEN method. RNA integrity was checked with the use of agarose gel electrophoresis and spectrophotometry. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examin the samples. The expression of Oct-4 and Nucleostemin at the protein level was further determined using immunocytochemistry.

Results: RT-PCR analysis of Caco2 and HT-29 colon cancer cell lines showed expression of Oct-4, NANOG, Sox2 and Nucleostemin genes . Also immunocytochemical analysis confirmed the cytoplasmic and nuclear expression of the Oct-4 protein and Nucleostemin proteins.

Conclusion: Collectively, our data confirmed the expression of Oct-4, NANOG, Sox2 and Nucleostemin in colon cancer cells and suggested that their expression can be used as potential tumor markers in diagnosis and /or prognosis of colon tumors. These results confirm the potential value of the cancer stem-cell theory in cancer therapy.

Keywords: Cancer Stem Cell, Self-Renewal, Adenocarcinoma, Colorectal

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 223-230

بیان ژن‌های خودبازسازی Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 در رده‌های سلولی سرطان کولون Caco2 و HT-29

صبریه امینی M.Sc.*، فردین فتحی Ph.D.*، کاظم پریور Ph.D.، هما محسنی کوچصفهانی Ph.D.، محمدجعفر رضایی Ph.D.، بهرام نیکخو M.D.

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
 ۲. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، سنندج، ایران

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی ایران، سنندج، صندوق پستی: ۱۳۴۴۶-۶۶۱۷۷، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی

پست الکترونیک: Emails: amini.biology@gmail.com

farfath@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۸/۶/۲۶، پذیرش مقاله: ۸۸/۸/۱۳

چکیده

* **هدف:** بررسی بیان ژن‌های خودبازسازی Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 در رده‌های سلولی Caco2 و HT-29 از سرطان کولون

* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های Caco2 و HT-29 در فلاسک‌های T25 کشت داده شدند. سپس بیان ژن‌های مسئول خودبازسازی Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 با استفاده از تکنیک‌های Reverse Transcriptase (RT-PCR) Polymerase Chain Reaction و بیان ژن‌های Oct-4 و Nucleostemin در سطح پروتئین با استفاده از ایمونوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** نتایج ارزیابی‌های RT-PCR نشان داد که در هر دو دودمان سلولی مذکور، ژن‌های Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 بیان می‌شوند، همچنین بیان سیتوپلاسمی و هسته‌ای پروتئین Oct-4 و بیان هستکی و سیتوپلاسمی Nucleostemin با ارزیابی ایمونوسیتوشیمی تایید شد.

* **نتیجه‌گیری:** سلول‌های سرطانی کولون، ژن‌های خودبازسازی Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 را که در سلول‌های بنیادی جنینی بیان می‌شوند، بیان می‌کنند که این مساله نشان می‌دهد در جمعیت سلول‌های سرطانی مذکور، تعدادی از سلول‌ها ویژگی‌های بن‌یاخته‌های جنینی را دارا بوده و به احتمال در تکثیر سلول‌های سرطانی نقش اساسی را ایفا می‌کنند. بنابراین نتایج این تحقیق به تایید نظریه Cancer Stem Cell کمک می‌کند چون کاربردهای درمانی زیادی از آن مورد انتظار است.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی سرطانی، ژن‌های خودبازسازی، آدنو کارسینوما، کولورکتال

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۳۰-۲۲۳

مقدمه

سرطان کولون پس از سرطان ریه در مکان دوم علل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان می‌باشد (۱). بر اساس نظریه جدید Stem Cell Origin of Cancer بسیاری از تومورها از سلول‌های بنیادی بافت‌های تمایز یافته منشا می‌گیرند. بر اساس این تئوری، امروزه عواملی که به مهار فرایند تمایز و یا به تکثیر کنترل نشده سلول‌های بنیادی بافتی منجر می‌شوند، از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل در فرایند سرطان‌زایی به شمار می‌روند (۲، ۳). از شواهد تایید کننده دیگر این تئوری، شباهت جمعیت اندکی از سلول‌های بافت‌های سرطانی به سلول‌های بنیادی می‌باشد. این جمعیت اندک سلولی، دارای توانایی مقاومت در برابر عوامل القا کننده آپوپتوزیس و شیمی درمانی می‌باشد که یکی از عوامل بازگشت سرطان پس از انهدام تومورهای اولیه است (۴، ۵). لاپیدوت و همکاران و نیز بونت و دیک مطالعاتی در مورد سرطان خون انجام دادند و در نتیجه این مطالعات که در محیط *In vivo* با استفاده از موش‌های (NOD/SCID) Non-Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency انجام گرفت، مشخص شد که تنها سلول‌های لوکیمیای خاصی به هنگام انتقال به موش‌ها قابلیت ایجاد سرطان را داشته و این سلول‌ها نیز

تنها جمعیت کمی از سلول‌های سرطانی را به خود اختصاص می‌دهند (۶، ۷). در این اواخر با جداسازی سلول‌های تومورزا و غیرتومورزا از تومورهای پستان و شناسایی آنها بر اساس مارکرهای سطح سلولی، مشخص شد که در جمعیت سلول‌های توموری پستان، فقط تعداد اندکی از سلول‌ها - که دارای آنتی‌ژن‌های CD24⁺، CD44⁺ است - قادر به ایجاد تومور در موش NOD/SCID می‌باشند. در حالی که ده‌ها هزار سلول فاقد این آنتی‌ژن‌های سطحی، توانایی تومورزایی را ندارند (۸).

حضور بن‌یاخته‌های سرطانی در سیستم عصبی توسط سه گروه به طور مستقل تایید شد. این سلول‌ها مارکر سطحی CD133 را بیان نموده و قابلیت ایجاد ساختارهایی شبیه Neurosphere را در محیط *in vitro* دارا می‌باشند. در دودمان‌های سلولی هپاتوسلولار کارسینوما، مارکرهای سلول‌های بنیادی CD133⁺ شناسایی شده و در سرطان میلوما نیز مشخص شده که اغلب سلول‌های سرطانی، آنتی‌ژن سلول‌های پلاسمایی بالغ یعنی CD133 را بیان می‌کنند (۹، ۱۰).

ژن‌های Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2، ژن‌های مهمی جهت ایجاد توانایی خودبازسازی بوده؛ به طوری که سلول‌های بنیادی را فعال و ژن‌های شروع کننده تمایز را مهار می‌کنند و بدین

Nucleostemin به عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی نام برده می‌شود که تا کنون بیان ژن Nucleostemin در سلول‌های بنیادین جنینی و انواع متعددی از سلول‌های بنیادین بالغ گزارش شده است (۲۳). بیان این ژن در تومورهای کبد و معده نیز نشان داده شده است (۲۴). از آنجایی که بیان ژن‌های Sox2، Nanog و Nucleostemin در سرطان کولون بررسی نشده بوده، در این تحقیق بیان این ژن‌ها در رده‌های سلولی سرطان کولون HT-29 و Caco2 مورد ارزیابی قرار گرفت و از تکنیک‌های RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی برای بررسی بیان ژن‌های مذکور استفاده شد. بیان این گروه از ژن‌ها در سلول‌های توموری می‌تواند تایید دیگری بر فرضیه Cancer Stem Cell باشد و خصوصیات سلول‌های سرطانی یک تومور را بازگو کند.

مواد و روش‌ها

روش کشت سلول‌های سرطانی مورد مطالعه
 رده‌های سلولی Caco2 (NCBI Code: C139) و HT-29 (NCBI Code: C466) مشتق از آدنو کارسینومای کولورکتال انسان و رده سلولی U87-MG (NCBI Code: C531) رده سلولی گلیوبلاستوما) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. رده سلولی NT2 که یک رده سلولی کارسینومای جنینی انسانی می‌باشد، از طرف دانشگاه شفیلد (دکتر احمد رضا بهرامی) در اختیار محققان این مطالعه قرار گرفت. رده U87-MG به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Sox2، Nucleostemin و Nanog رده سلولی NT2 به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Oct-4، Nanog استفاده شد. برای کشت این سلول‌ها به ترتیب از محیط کشت (Dulbeccos Modified Eagles Medium; RPMI- 1640: Roswell Park Memorial Institute) و (DMEM) سرم جنین گاوی (Fetal Bovin Serum: FBS) به میزان ۱۵ درصد، اسید آمینه‌های غیر ضروری به میزان یک درصد، پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۵۰ واحد بر میلی‌لیتر استفاده شد. سلول‌ها در فلاسک‌های T25 و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند.

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

به منظور تعیین غلظت RNA استخراج شده و همچنین حصول اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی نمونه‌ها، OD کلیه نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت RNA‌های استخراج شده در چندین نمونه بررسی شد و نسبت A260/A280 برای کلیه نمونه‌ها به دست آمد که این نسبت برای کلیه نمونه‌ها بین ۱/۸ تا ۲ بوده است و نشان دهنده عدم وجود آلودگی پروتئینی می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: بررسی اسپکتروفتومتری نمونه‌های RNA در رده‌های سلولی مورد مطالعه

نمونه RNA	غلظت RNA (میکروگرم بر میکرولیتر)	نسبت A260/A280
NT2	۱/۱	۱/۹۹
U87-MG	۱/۰	۲/۰۳
Caco2	۰/۹	۱/۸۰
HT-29	۱/۰	۲/۰۱

ترتیب قابلیت خود تجدیدی سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کنند (۱۱)، نقش ژن Oct-4 در مهار تمایز بن‌یافته‌های جنینی و پرتوانی آنها به خوبی مطالعه شده است که بیان آن محدود به سلول‌های پرتوان است. با بیان این ژن در این سلول‌ها، ورود به مسیرهای تمایزی و تولید لایه‌های جنینی مهار شده و سلول‌ها با حالت پرتوان به تکثیر خود ادامه می‌دهند. مطالعات نشان داده است که کاهش بیان این ژن در بن‌یافته‌های جنینی، باعث تمایز سلولی به سمت تروفوکتودرم می‌شود. در عین حال افزایش بیان این ژن تا دو برابر مقدار طبیعی آن در بن‌یافته‌های جنینی باعث القای تمایز مزودرمی - آندودرمی می‌شود (۱۳، ۱۴). Sox2 یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی است که در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادی جنینی نقش دارد. این فاکتور رونویسی، از خانواده پروتئین‌های HMG بوده که در رونویسی بسیاری از ژن‌های هدف Oct-4 نقش فاکتور مکمل را دارد. ژن کدکننده Sox2 فاقد اینترون بوده و درون اینترون ژن دیگری به نام Sox2-OT قرار دارد. جهش در این ژن، منجر به بروز آنوفتالمی دو جانبه می‌گردد که نقص شدید در ساختار چشم‌ها پدید می‌آورد (۱۵). Nanog یک ژن هومئودمین نوع NK-2 است و فعال کننده نسخه برداری می‌باشد. Nanog دارای یک سکانس ۹۶ آمینواسیدی غنی از سرین در پایانه N و ناحیه ۱۵۰ آمینواسیدی در پایانه C می‌باشد. بخش فعال آن در ناحیه حفاظت شده C-terminus قرار دارد. ناحیه C-terminus میزان بالایی از تکرارهای تریتوفان دارد که در حفظ خود تجدیدی سلول‌های بنیادی نقش اصلی ایفا می‌کند (۱۶).

Nucleostemin یکی از تازه‌ترین اعضای خانواده پروتئین‌های متصل شونده به GTP می‌باشد. این پروتئین تک زیر واحدی است که به صورت عمده در داخل هستک و به صورت کم رنگی در شیره هسته حضور دارد. با کمک مکانیسم اتصال به مولکول GTP و هیدرولیز آن بین هستک و نوکلئوپلاسم مهاجرت می‌کند (۱۷).

پروتئین NS، توانایی تنظیم پروتئین P53 را دارد؛ بنابراین باعث تنظیم چرخه سلولی می‌شود. این مولکول دارای چندین دمین مشخص بوده و ترادف آن شباهت بسیار بالایی در بین گونه‌های مختلف از جمله انسان، موش، موش صحرائی، مخمر و وزغ دارد. که این امر حاکی از اهمیت قابل ملاحظه آن در مسیرهای مختلف فعالیت سلولی و تکوین است و همچنین دلیل محفوظ ماندن نسبی ترادف آن در طی تکامل می‌باشد (۱۷). تحقیقات گسترده‌ای در مورد نقش ژن‌های Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 در سلول‌های بنیادی جنینی انجام شده است، در مورد نقش این ژن‌ها در سرطان‌های سوماتیکی نیز در چند سال اخیر، مطالعاتی صورت گرفته است. در تحقیقات پیشین، بیان ژن‌های فوق در انواع بافت‌های توموری مغز و بیان ژن Oct-4 در سرطان مثانه بررسی شده است (۱۷، ۱۸). در این اواخر بیان Oct-4 در سرطان‌های سلول‌های جنسی به خوبی مطالعه و به عنوان مارکر اختصاصی در برخی از انواع تومورها معرفی شده است (۱۹). سوتومایور و همکاران بیان ژن Oct-4 را در سرطان پروستات نشان دادند. همچنین در این بررسی‌ها مشخص شد که میزان بیان ژن مذکور با درجه بدخیمی تومور نیز در ارتباط است؛ به این معنی که با افزایش بیان ژن Oct-4 در نمونه‌های توموری پروستات، درجه بدخیمی آن نیز افزایش می‌یابد (۲۰). Sox2 در سلول‌های بنیادی عصبی در پیش‌سازهای اولیه و در تعدادی از نورون‌های بالغ بیان می‌شود (۲۱). همچنین بیان Sox2 در چندین بافت توموری نشان داده شده است (۲۲).

گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT و PCR از دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf) استفاده شد. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم افزارهای Gene Runner و Prim3 طراحی شدند.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

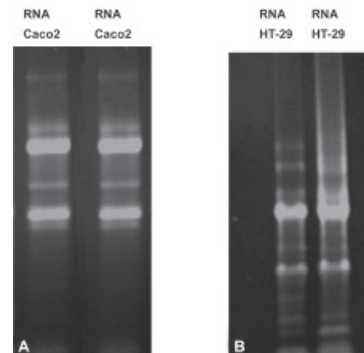
برای بررسی بیان ژن‌های خود بازسازی Oct-4 و Nucleostemin در سطح پروتئین از تکنیک ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. به این منظور سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد ثابت شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه مورد استفاده Oct-4، NS (Santacru, Goat Anti Human)، با غلظت ۱ به ۱۰۰ و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه به سلول‌ها اعمال شدند. آنتی‌بادی ثانویه متصل به Texas red (Santacru, Donkey-Anti Goat) و آنتی‌بادی ثانویه متصل به FITS (Fluorescein isothiocyanate) (Santacru, Donkey-Anti Goat) به ترتیب، جهت اتصال به آنتی‌بادی اولیه Oct-4 و NS با غلظت ۱ به ۲۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه به سلول‌ها اعمال شد. برای اطمینان از صحت عملکرد آنتی‌بادی‌های به کار رفته، به ترتیب سلول‌های NT2 و U87MG به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. برای نمونه‌های کنترل منفی کلیه شرایط مثل نمونه‌های آزمون بود، باین تفاوت که آنتی‌بادی اولیه اضافه نگردد و در نهایت سلول‌ها به کمک میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon TE-300) مطالعه و عکس برداری شدند.

یافته‌ها

ایمونوسیتوشیمی

نتیجه واکنش ایمونوسیتوشیمی علیه نشانگر Oct-4 و Nucleostemin به عنوان نشانگرهای شناخته شده سلول‌های بنیادی، مثبت بود. در این ارزیابی‌ها از آنجایی که نشانگر ثانویه مورد استفاده کوئز و گه به Fluoresceing Isothiocyanate (FITC) و Texas Red بود، بعد از اعمال نشانگرهای اولیه و ثانویه به نمونه‌ها، در نمونه‌های آزمایش با استفاده از فیلترهای FITC و Texas Red به ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز در نمونه‌های با واکنش مثبت مشاهده شدند. در حالی که در نمونه کنترل منفی که از هر نظر شرایط انجام واکنش ایمونوسیتوشیمی بر روی آنها مشابه کنترل مثبت بود و فقط از نشانگر اولیه در آنها استفاده نشده بود، هیچ گونه رنگی که دال بر مثبت بودن نتیجه واکنش باشد، مشاهده نشد (شکل‌های ۵-۲).

RNA رده‌های سلولی Caco2 (شکل ۱A) و HT-29 (شکل ۱B) بر روی ژل آگارز حضور دو باند 18S و 28S دلیلی بر عدم تجزیه RNA بود.



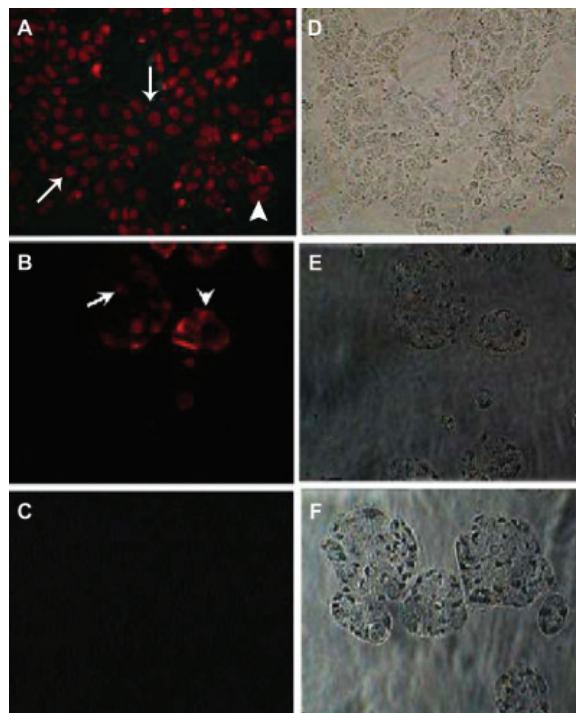
شکل ۱: RNA تام سلولی الکتروفورز شده در ژل آگارز ۱ درصد. شکل A مربوط به RNA رده سلولی Caco2 و شکل B مربوط به RNA رده سلولی HT-29 است. برای هر دو نمونه باندهای RNA ریبوزومی 28S، 18S به وضوح قابل مشاهده هستند.

ارزیابی RT-PCR

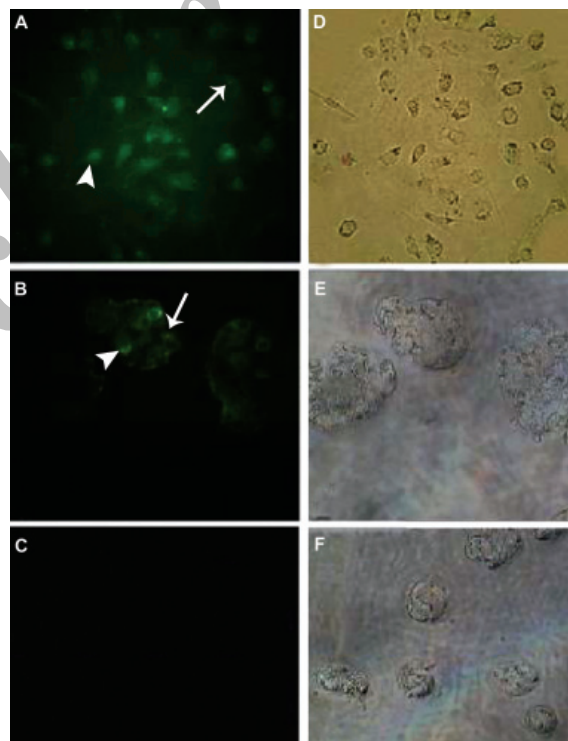
از RT-PCR جهت تایید بیان ژن‌های مورد مطالعه (جدول ۲) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول استخراج RNA (IRAN RNX Plus, Sinagen) کل (Total RNA) از سلول‌های سرطانی استخراج شد و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری (شکل ۱، جدول ۱)، مراحل تهیه cDNA از آن به انجام رسید. RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر (Random Hexamer) و کیت RT (Bioneer) نسخه برداری معکوس شد. واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام و پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر صورت پذیرفت و جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (Bioneer)، آب مقطر استریل و پرایمرهای بالادست (Forward) و پایین دست (Reverse)، با مشخصات مورد اشاره در جدول یک استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط Denaturation ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸-۶۴ (بر اساس نوع پرایمر) و Extension ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام گرفت. تعداد سیکل ۳۵ و یک سیکل Extension نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر

جدول ۲: اسامی ژن‌ها و توالی مربوط به پرایمرهای بالادست (F) و پایین دست (R)

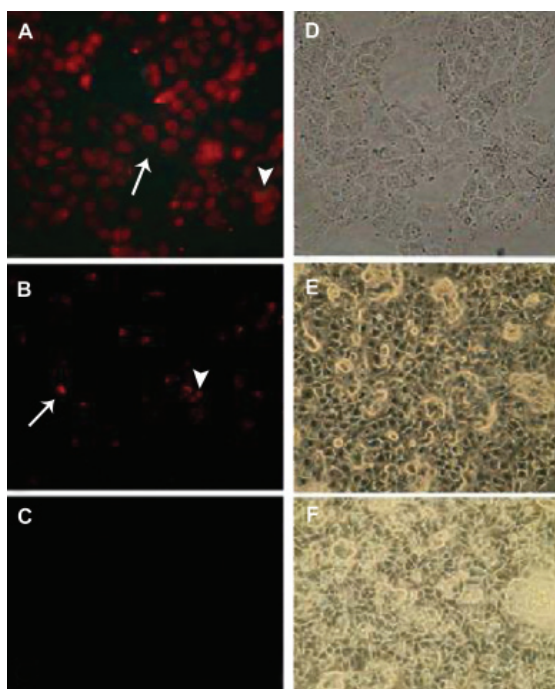
اندازه bp	توالی پرایمر	نام ژن
470	ACCTATGCCTGTGATTTGTGG	F
	AAGAGTAGAGCTGGGGTAGG	R
426	ATGGTTCGGTGGTCAAGTC	F
	GTGGATGGGATTGGTGTCTC	R
470	GAGAATTTGTTCCCTGCAGTGC	F
	GTTCCCAATTCCTTCCTTAGTG	R
747	CAGAGATCCTCTTGTTGCGAG	F
	AATGAGGCACCTGTCCACTC	R
224	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAAC	F
	AGGGTCTCTCCTTCCTCTTGTGCTCA	R



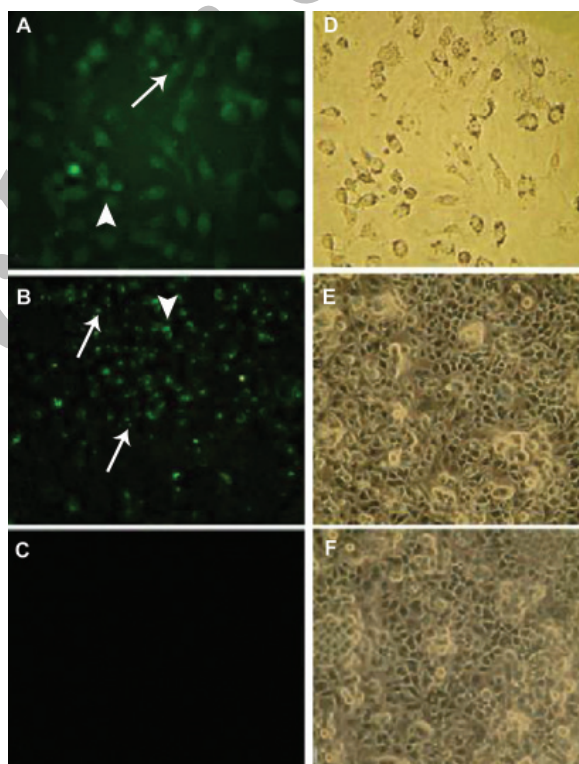
شکل ۲: بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن Oct-4 در سلول‌های سرطان کولون HT-29. شکل‌های A, B, C به ترتیب مربوط به تصاویر فلورسانس نمونه‌های NT2 (کنترل مثبت)، HT-29 و کنترل منفی و شکل‌های D, E, F نیز تصاویر فاز کنتراست مربوط به آنها می‌باشند. بزرگ‌نمایی (× ۴۰۰) در شکل A و B پیکان، نشان دهنده سیگنال هسته‌ای و نوک پیکان، نشان دهنده سیگنال سیتوپلاسمی Oct-4 است.



شکل ۳: بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن Nucleostemin در سلول‌های HT-29 (آدنوکارسینوما کولورکتال). تصاویر فلورسانس A, B, C به ترتیب مربوط به نمونه‌های U87 (کنترل مثبت)، HT-29 و کنترل منفی و تصاویر D, E, F نیز به ترتیب تصاویر فاز کنتراست آنها می‌باشند. بزرگ‌نمایی (× ۴۰۰) در شکل A و B پیکان، نشان دهنده سیگنال هسته‌ای و نوک پیکان، نشان دهنده سیگنال سیتوپلاسمی Nucleostemin است.



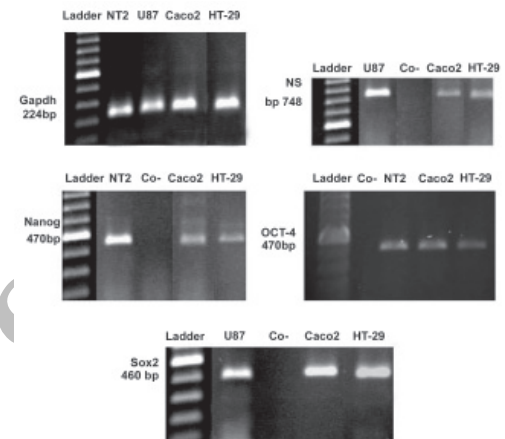
شکل ۴: بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن Oct-4 در سلول‌های سرطان کولون Caco2. تصاویر فلورسنت A, B, C به ترتیب مربوط به نمونه‌های (NT2 کنترل مثبت) Caco2 و کنترل منفی و تصاویر D, E, F نیز تصاویر فاز کنتراست آنها می‌باشند. بزرگ‌نمایی (۴۰۰×). در شکل A و B پیکان، نشان دهنده سیگنال هسته‌ای و نوک پیکان، نشان دهنده سیگنال سیتوپلاسمی Oct4 است.



شکل ۵: بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن Nucleostemin در سلول‌های Caco2 (آدنو کار سینوما کولورکتال). تصاویر فلورسنت A, B, C به ترتیب مربوط به نمونه‌های (U87 کنترل مثبت)، Caco2 و کنترل منفی و شکل‌های D, E, F نیز تصاویر فاز کنتراست آنها می‌باشند. بزرگ‌نمایی (۴۰۰×). در شکل A و B پیکان، نشان دهنده سیگنال هسته‌ای و نوک پیکان، نشان دهنده سیگنال سیتوپلاسمی Nucleostemin است.

RT-PCR

علاوه بر ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی در سلول‌های مورد مطالعه، به روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن‌های Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 در سلول‌های سرطانی HT-29 و Caco2 مشاهده شد و اندازه باند‌های مربوط به ژن‌های مورد مطالعه مطابق با الگوی پرایمر طراحی شده بود (شکل ۶).



شکل ۶: بیان ژن‌های خودبازسازی Oct-4، NS، Nanog و Sox2 در رده‌های سلولی آدنوکارسینوما کولورکتال Caco2، HT-29، دودمان سلولی U87 به عنوان کنترل مثبت ژن‌های NS، Sox2 و دودمان سلولی NT2 به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Oct-4، Nanog استفاده شدند، همچنین ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

بحث

نتایج این پژوهش از آن جهت حائز اهمیت است که برای اولین بار بیان ژن‌های Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 در سلول‌های سرطانی کولون نشان داده شد. امروزه ژن‌هایی که در کنترل خودبازسازی سلول‌های بنیادی نقش دارند، به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده‌اند که بیان کنترل نشده آنها از اهمیت زیادی در فرایند سرطانی شدن برخوردار است (۱۶، ۲۰، ۲۱). Nanog و Sox2 از مهم‌ترین ژن‌های کنترل کننده فرایند خودبازسازی و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی هستند. در این اواخر بیان این ژن‌ها در سلول‌های بنیادی بافتی نیز نشان داده شده است که نقش مشابه دوران جنینی را در این سلول‌ها بازی می‌کنند (۲۲). Oct-4 در تومورهای خوش خیم و بدخیم پروستات بیان می‌شود و با افزایش درجه بدخیمی فرکانس بیان آن نیز افزایش می‌یابد (۲۰). Sox2 در سلول‌های بنیادی عصبی در پیش‌سازهای اولیه و در تعدادی از نورون‌های بالغ بیان می‌شود (۲۱). همچنین بیان Sox2 در چندین بافت توموری نشان داده شده است (۲۲). Oct-4، Nanog و Sox2 به صورت یک شبکه مرکزی در تنظیم خود بازسازی سلول‌های بنیادی جنینی نقش دارند، به طوری که هر کدام از این سه ژن در تنظیم دو ژن دیگر دخیل است و مجموع این سه ژن نیز به طور هم‌زمان، هم به عنوان فعال کننده رونویسی سایر ژن‌های دخیل در خود بازسازی و هم به عنوان مهارکننده ژن‌های تمایزی عمل می‌کند (۱۲). آوری و همکاران و رودا و همکاران بیان هم‌زمان این سه ژن را در سلول‌های بنیادی جنینی انسان نشان دادند (۱۱، ۱۲). همچنین در سال ۲۰۰۷ کریستل و همکاران نشان دادند که در سلول‌های سرطانی جنینی، سه ژن Oct-4، Nanog و Sox2 به طور هم‌زمان بیان

می‌شوند (۱۶) و در سال ۲۰۰۹ متیو و همکاران نشان دادند که در انواعی از سرطان‌های بدخیم نظیر پروستات، مثانه، مغز و ریه Sox2 و Oct-4 به طور هم‌زمان بیان می‌شوند (۲۵). اسکولا و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان این سه ژن را در سلول‌های بنیادی جنینی و همچنین در سلول‌های سرطانی بیضه نشان دادند (۲۶) که نتایج حاصل از تحقیق ما این موارد را تایید می‌کند و بیان هم‌زمان هر سه ژن در دو رده سلولی مورد مطالعه، مشاهده شد. بررسی الگوی بیان پروتئین Oct-4 با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های سرطانی کولون، توزیع سیتوپلاسمی و هسته‌ای، هر دو را نشان داد. در دودمان سلولی Caco2 بیان آن بیشتر از نوع هسته‌ای اما در HT-29 بیشتر سیتوپلاسمی بود. اطلسی و همکاران بیان سیتوپلاسمی پروتئین Oct-4 را در نمونه‌های توموری مثانه نشان دادند (۱۸) همچنین بیان سیتوپلاسمی Nanog در سرطان پستان از قبل گزارش شده بود. این پروتئین نقشی بسیار شبیه به Oct-4 داشته و از الگوی بیان مشابهی در سلول‌های مختلف برخوردار است (۲۷). بیان سیتوپلاسمی و هسته‌ای پروتئین Oct-4 در رده‌های سلولی سرطان کولون در این تحقیق نشان داده شد که موارد مذکور را تایید می‌کند. بیان ژن Nucleostemin تاکنون در سلول‌های بنیادین جنینی و انواع متعددی از سلول‌های بنیادین بالغ گزارش گردیده است (۲۳، ۲۸). با توجه به این مشاهدات و نیز این واقعیت که بیان آن در حین تمایز سلول‌های بنیادین، در مرحله سلول‌های پیش‌ساز و پیش از وقوع کاهش در بیان ژن‌های دخیل در پیش‌برد تکثیر سلولی خاموش می‌گردد، Nucleostemin به عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی نام برده می‌شود (۱۷، ۲۸). در تحقیق حاضر بیان ژن Nucleostemin در دودمان‌های سلولی سرطان کولون Caco2 و HT-29 با استفاده از روش RT-PCR تایید شد. همچنین بررسی ایمونوسیتوشیمی نشان داد که این پروتئین لوکالیزاسیون هستکی و سیتوپلاسمی دارد. این الگوی توزیع، در سرطان‌های معده و کارسینوما سلول‌های کلیه هم مشاهده شده است (۲۹).

لی ران لو و همکاران نشان دادند که ژن Nucleostemin در تکثیر و خودبازسازی سلول‌های سرطانی نقش اساسی دارد، آنها بیان ژن نوکلئوستمین را در سلول‌های سرطانی پروستات نشان دادند، سلول‌های PC-3 از دودمان‌های سلولی سرطان پروستات بیان سیتوپلاسمی و هستکی Nucleostemin، هر دو را نشان دادند اما بیان هستکی آن بیشتر بود (۳۰). تسای و همکاران گزارش کرده بودند که سلول‌های بنیادی نرمال، بیان پروتئین نوکلئوستمین را به طور منحصر در هستک نشان می‌دهد (۳۱). بنابراین با توجه به گزارشات قبلی و نتایج حاصل از تحقیق حاضر، می‌توان چنین نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی نرمال، بیان هستکی پروتئین نوکلئوستمین را نشان می‌دهد اما سلول‌های توموری علاوه بر بیان هستکی، بیان سیتوپلاسمی را هم نشان می‌دهد. اخیراً یک پروتئین اتصالی نوکلئوستمین به عنوان ایزوفرم از پروتئین انسانی PPP2R5A شناسایی شده است. این پروتئین، زیر واحد β تنظیمی از خانواده فسفاتاز 2A است، فسفاتاز 2A نقش مهمی در کنترل رشد سلول، تقسیم سلول و آپوپتوزیس دارد و در سیتوپلاسم قرار گرفته است (۳۲) که ممکن است توزیع احتمالی برای لوکالیزاسیون سیتوپلاسمی Nucleostemin باشد اما یافتن دلیل وجود چنین لوکالیزاسیونی نیاز به مطالعات بیشتر دارد (۳۰).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، بیان ژن‌های خود بازسازی Oct-4، Nucleostemin، Nanog و Sox2 در دو رده سلولی

تقدیر و تشکر

این پژوهش با هزینه و مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شده که بدین وسیله قدردانی می‌شود.

References

1. Leong AF, Seow-Choen F, Tang CL. Diminutive cancers of the colon and rectum: comparison between flat and polypoid cancers. *Int J Colorectal Dis.* 1998; 13(4): 151-153.
2. Gostjeva EV, Thilly WG. Stem cell stages and the origins of colon cancer: a multidisciplinary perspective. *Stem Cell Rev.* 2005; 1(3): 243-251.
3. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell.* 2006; 124(6): 1111-1115.
4. Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Sasaki A, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Hum Cell.* 2006; 19(1): 24-29.
5. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene.* 2004; 23(43): 7274-7282.
6. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994; 367 (6464): 645-648.
7. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3(7): 730-737.
8. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005; 65(13): 5506-5511.
9. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(18): 5821-8.
10. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351(4): 820-824.
11. Avery S, Inniss K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(5): 729-740.
12. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, et al. Transcriptional regulation of nanog by Oct-4 and SOX2. *J Biol Chem.* 2005; 280(26): 24731-24737.
13. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol.* 1994; 166(1): 259-267.
14. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000; 24(4): 372-376.
15. Chambers I, Smith A. Self renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene.* 2004; 23(43): 7150-7160.
16. Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic reprogramming of Oct-4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(5): 1543-1553.
17. Tsai RY, McKay RD. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J*

سرطانی آدنوکارسینوما کولورکتال Caco2, HT-29 تایید می‌شود که این امر به تایید نظریه Cancer Stem Cell کمک می‌کند. اما یافتن دلیل وجود چنین لوکالیزاسیونی نیاز به مطالعات بیشتر دارد (۳۰).

18. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer.* 2007; 120(7): 1598-602.
19. Cheng L. Establishing a germ cell origin for metastatic tumors using OCT4 immunohistochemistry. *Cancer.* 2004; 101(9): 2006-2010.
20. Sotomayor P, Godoy A, Smith GJ, Huss WJ. Oct-4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. *Prostate.* 2009; 69(4): 401-410.
21. Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F, et al. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development.* 2008; 135(3): 541-557.
22. Gangemi RM, Griffero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells.* 2009; 27(1): 40-48.
23. Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. *Stem Cells.* 2006; 24(4): 1113-1120.
24. Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, et al. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(9): 1246-1249.
25. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 383(2): 157-162.
26. Schulz WA, Hoffmann MJ. Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics.* 2007; 2(1): 37-42.
27. Ezech UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes Oct-4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer.* 2005; 104(10): 2255-2265.
28. Lacina L, Smetana K Jr, Dvoránková B, Stork J, Plzánková Z, Gabius HJ. Immunocyto- and histochemical profiling of nucleostemin expression: marker of epidermal stem cells? *J Dermatol Sci.* 2006; 44(2): 73-80.
29. Fan Y, Liu Z, Zhao S, Lou F, Nilsson S, Ekman P, et al. Nucleostemin mRNA is expressed in both normal and malignant renal tissues. *Br J Cancer.* 2006; 94(11): 1658-1662.
30. Liu RL, Zhang ZH, Zhao WM, Wang M, Qi SY, Li J, et al. Expression of nucleostemin in prostate cancer and its effect on the proliferation of PC-3 cells. *Chin Med J (Engl).* 2008; 121(4): 299-304.
31. Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev.* 2002; 16(23): 2991-3003.
32. Yang HX, Jin GL, Meng L, Zhang JZ, Liu WB, Shou CC. Screening and identification of proteins interacting with nucleostemin. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(31): 4812-4814.