

بررسی بیان ژن‌های مربوط به زیر گروه‌های A_{2A} و A_{2B} گیرنده‌های آدنوزین در نمونه بافت سرطان پستان انسان

دکتر مجتبی پنجه‌پور^۱، دکتر سید محمد موسوی نسب^۱

چکیده

مقدمه: آدنوزین از طریق چهار زیر گروه مختلف گیرنده‌ی آدنوزین (A_3 و A_{2B} ، A_{2A} ، A_1) نقش مهمی در تنظیم رشد، تکثیر و مرگ سلول‌های طبیعی و سرطانی دارد. دانستن الگوی بیان زیر گروه‌های مختلف گیرنده‌های آدنوزین در بافت توموری و تفاوت آن با بافت طبیعی برای گسترش اهداف درمانی جهت کنترل مؤثرتر رشد تومور ضروری می‌باشد.

روش‌ها: نمونه‌های جمع آوری شده شامل ۱۱ نمونه‌ی سرطانی و ۴ نمونه‌ی طبیعی بود که طبیعی یا پاتوزن بودن تمام نمونه‌ها از نظر پاتولوژیکی تأیید گردید. با استفاده از روش RT-PCR، ابتدا RNA سلول‌ها جدا شد و به توالی cDNA، رونویسی معکوس گردید. برای هر دو زیر گروه و بتا اکتین (شاهد مثبت)، با استفاده از توالی‌های cDNA مربوطه، یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی و سنتز شد. PCR در شرایط مطلوب برای هر زیر گروه انجام گردید. محصولات PCR، روی ژل آگارز با غلظت ۱/۷ درصد الکتروفورز گردید. به وسیله‌ی روش‌های نیمه کمی با استفاده از نرم‌افزار Relative intensity، Photoshop، نمونه‌ها اندازه گیری شد.

یافته‌ها: از بعد کیفی در تمامی نمونه‌های طبیعی و سرطانی بیان هر دو گیرنده‌ی A_{2B} و A_{2A} مشاهده شد. به کمک آنالیزهای تصویری معلوم گردید که بیان گیرنده‌های A_{2B} در بافت تومور ۱/۳۶ برابر بافت طبیعی است، ولی در مورد گیرنده‌های A_{2A} تفاوت چندانی بین آن‌ها در بافت توموری و بافت طبیعی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: مطالعات نیمه کمی انجام شده در این تحقیق، به اهمیت زیر گروه A_{2B} در سرطان پستان انسان اشاره دارد. امید است در آینده برای بررسی دقیق‌تر این گیرنده‌ها به وسیله‌ی RT-PCR یا بررسی کمی به وسیله‌ی PCR به منظور شناسایی بهتر این گیرنده‌ها اقدامات لازم عملی گردد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، گیرنده‌های آدنوزین A_{2B} و A_{2A} ، RT-PCR.

مقدمه

شده‌اند (۱). افزایش غلظت آدنوزین خارج سلولی دارای اثرات بیوشیمیایی، فارماکولوژیک و فیزیولوژیک ویژه‌ای می‌باشد که از طریق گیرنده‌های آدنوزین اعمال می‌شود که شاخص‌ترین آن‌ها عبارت از تنظیم فعالیت عصبی، تنظیم فعالیت قلب و عروق، کلیه، کبد و تنظیم سیستم ایمنی می‌باشد (۵-۲). علاوه بر اثرات متعددی که این گیرنده‌ها در بافت‌های مختلف بدن از نظر فیزیولوژی و فارماکولوژی دارند، نقش برجسته‌ی آن‌ها دخالت در فرآیند رشد و تکثیر سلولی است.

گیرنده‌های آدنوزین (Adenosine receptors) از جمله گیرنده‌های غشایی در سطح سلول هستند که متعلق به خانواده‌ی بزرگ گیرنده‌های وابسته به G- پروتئین‌ها (GPCRs) می‌باشند. دسته‌بندی گیرنده‌های آدنوزین بر اساس یافته‌های فارماکولوژیکی، مطالعات مولکولی، توزیع بافتی، ساختمان بیوشیمیایی و پیام داخل سلولی انجام گرفته است که بر این اساس این گیرنده‌ها به چهار زیر گروه A_3 ، A_{2B} ، A_{2A} ، A_1 تقسیم‌بندی

^۱ گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی داروسازی، مرکز تحقیقات بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

Email: panjehpour@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجتبی پنجه‌پور

آمارهای مربوط به کشور ما نشان می‌دهد که در طی آمارهای به دست آمده از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۵ میلادی، سن شایع برای سرطان سینه بین ۴۹-۴۰ سال بوده و میزان بروز این بیماری در بین زنان ایرانی ۲۲ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است. همچنین سرطان سینه شایع‌ترین نوع تومور را در بین موارد گزارش شده از سرطان‌های مختلف در جنوب ایران دارا بوده است (۱۶-۱۵).

ما به تازگی نقش و اهمیت گیرنده‌های آدنوزین را در رده‌های سلولی سرطان پستان، سرطان پروستات و سرطان ریه‌ی انسان نشان داده‌ایم. مشخص کردن گیرنده‌های آدنوزین در این رده‌های سلولی، به عنوان اولین گام در جهت بررسی مطالعات عملکرد این گیرنده‌ها در سطح سلول است. از طرف دیگر، به منظور بررسی مقایسه‌ای الگوی بیان این گیرنده‌ها در رده‌های سلولی (شرایط *in vitro*) و مقایسه‌ی آن با بافت توموری انسان (*in vivo*)، در تحقیق حاضر به دنبال مشخص کردن الگوی بیان این گیرنده‌ها در نمونه‌های سرطانی بافت پستان در انسان بودیم تا این که نقش این گیرنده‌ها را در این نوع سرطان انسانی ارزیابی کنیم.

روش‌ها

بافرها، محلول‌ها و مواد مورد استفاده در تکنیک RT-PCR، PCR و الکتروفورز از شرکت‌های معتبر خریداری شد.

تهیه‌ی نمونه‌ی بافت

در شروع عمل جراحی، مقداری از بافت سرطانی به صورت بیوپسی اکسیژیونال و یا ماستکتومی توسط جراح جدا گردید و پس از آزمایشات پاتولوژی و

تغییرات غلظت آدنوزین در بدخیمی‌ها و سرطان‌های جامد (Solid tumors) (۶) و اثرات کمپلکس این متابولیت پورینی در تکثیر سلولی (Proliferation) (۷)، سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول‌های طبیعی و سرطانی (۸-۹) و همچنین تمایز، آنژیوژنز و متاستاز (۱۰) مورد توجه قرار گرفته است و استفاده از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های آن به عنوان دارو در درمان سرطان و دیگر اختلالات فیزیولوژیک حجم زیادی از پژوهش‌های اخیر را شامل می‌شود.

گیرنده‌های آدنوزین A_{2A} به علت داشتن اثرات سرکوب سیستم ایمنی، اثر آنژیوژنیک و اثر حفاظتی در برابر ایسکمی به علت فعال شدن A_{2A} در شرایط هیپوکسی، موجب بقای تومور و فرار از سیستم ایمنی می‌شود. این گیرنده در سلول‌های سرطانی انسانی، نوروبلاستوما SH-SY5Y، هیبرید گلیوما، نوروبلاستوما NG108-15، لوسمی سلول‌های T ژورکات، ملانوما A375، سلول‌های اپی‌درموئید A431 گزارش شده است (۱۱). همچنین گیرنده‌های آدنوزین A_{2B} باعث مهار رشد در ماکروفاژ و سلول‌های ماهیچه‌ی صاف عروق و باعث تحریک پرولیفراسیون مویرگ‌های محیطی و تسریع روند آنژیوژنز می‌شود که به رشد تومور کمک می‌کند. این گیرنده در پرولیفراسیون ملانومای انسانی نیز نقش مؤثری دارد (۱۲-۱۳).

در طی سالیان متمادی سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان زنان و عمده‌ترین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین آنان بوده است؛ به طوری که سرطان پستان با بروز سالانه یک میلیون مورد در جهان، شایع‌ترین بدخیمی در بین زنان است و عامل ۱۸ درصد از سرطان‌ها در زنان محسوب می‌شود (۱۴).

گیرنده‌های آدنوزین مورد مطالعه، انتخابی‌تر بود و درصد تشابه بالاتری با توالی‌های ارائه شده داشت، انتخاب شد (جدول ۱).

تکنیک RT-PCR

با استفاده از توانایی آنزیم Reverse transcriptase (M-MULV)، یک رشته‌ی مکمل DNA یا cDNA با استفاده از RNA استخراج شده در آب محتوی دی‌اتیل پیروکربنات، به عنوان رشته‌ی الگو تهیه شد. سپس PCR تحت شرایط زیر با استفاده از آنزیم Taq DNA Polymerase در شرایط استاندارد انجام شد: Precycle به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ °C، Denaturation به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، Annealing به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۶ °C، Polymerization به مدت ۷۵ ثانیه در ۷۲ °C و Extention به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ °C.

الکتروفورز ژل آگارز

در این روش، نمونه‌های تکثیر یافته حاصل از PCR با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۷ جدا گردید که پس از اضافه کردن اتیدیوم بر مایه، با استفاده از دستگاه Gel Doc و مقایسه‌ی طول قطعات به دست آمده با مارکرهای وزن مولکولی بررسی شد. به منظور تأیید نتایج به دست آمده از روش RT-PCR همزمان از

مشخص کردن درجه و نوع سرطان داخل فلاسک نیتروژن مایع قرار گرفت و به آزمایشگاه انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمایش داخل فریزر ۸۰ °C- قرار گرفت. نمونه‌های طبیعی با تأیید پاتولوژیست از پاراننیم طبیعی و غیر سرطانی پستان جدا شده به همراه بافت توموری، به دست آمد.

خرد کردن بافت و استخراج RNA سلولی

پس از خارج ساختن نمونه‌ها از فریزر، بافت در هاون چینی که حاوی مقداری ازت مایع بود، قرار گرفته، به وسیله‌ی دسته هاون در حالی که بافت در ازت مایع قرار دارد خرد شده، به صورت پودر در آورده شد. برای جداسازی RNA سلولی از روش Acid phenol Guanidinium Thiocyanate به فرم محلول تجاری RNX استفاده شد (۱۷). سپس RNA سلولی جدا شده (به صورت Pellet) در آب محتوی DEPC حل شد.

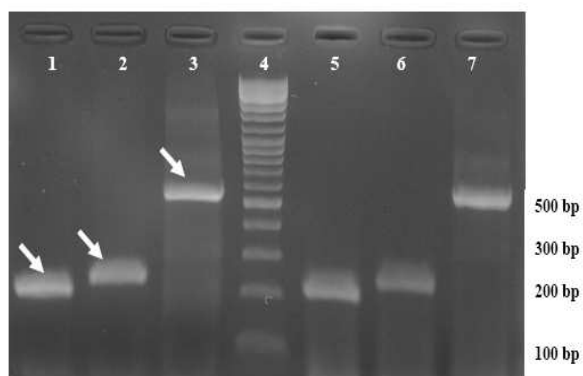
طراحی و انتخاب پرایمر

طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3 و Primer Bank انجام شد. سپس برای انتخاب بهترین جفت پرایمر، پرایمرهای پیشنهادی در سایت NCBI، Blast شد و درصد تشابه و تطابق آن با ژن‌های مختلف بررسی گردید. در نهایت پرایمرهایی که برای

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

شماره‌ی دسترسی ژن NCBI گیرنده‌ها code	Oligo Name	نقطه‌ی شروع	Sequence 5'-3'	طول قطعه‌ی مورد انتظار در PCR
NM-000675	A2AAR-Left	۶۰۱	AGCTGAAGCAGATGGAGAGC	۲۳۷ bp
	A2AAR-Right	۸۳۷	AGGGATTCACAACCGAATTG	۲۳۷ bp
NM-000676	A2BAR-Left	۶۷۹	CAG'CGG'GAG'ATTC'CATGCAG	۲۰۶ bp
	A2BAR-Right	۸۸۴	CGG'TTC'CGGTAAGCATAGACAAT	۲۰۶ bp
NM-001101	Bata Actin-Left	۳۲۱	AGAAAATCTGGCACCACACC	۵۵۳ bp
	Bata Actin-Right	۸۷۳	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	۵۵۳ bp

RT-PCR می‌باشد. همچنین وجود باند قابل تفکیک مربوط به گیرنده‌ی A_{2A} در ناحیه‌ی ۲۳۷ bp و مشاهده‌ی باند واضح مربوط به گیرنده‌ی A_{2B} در ناحیه‌ی ۲۰۶ bp به ترتیب بیانگر بیان ژن گیرنده‌ی A_{2A} و A_{2B} در نمونه‌های مورد مطالعه است.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR مربوط به بتا اکتین و زیر گروه‌های A_{2A} و A_{2B} روی ژل آگارز با غلظت ۱/۷٪ (نمونه تومور)
 ستون ۱) گیرنده‌ی آدنوزین A_{2B} مربوط به نمونه ۱- ۲۰۶ bp
 ستون ۲) گیرنده‌ی آدنوزین A_{2A} مربوط به نمونه ۱- ۲۳۷ bp
 ستون ۳) شاهد مثبت- ۵۵۳ bp
 ستون ۴) مارکر وزن مولکولی- ۱۰۰ bp
 ستون ۵) گیرنده‌ی آدنوزین A_{2B} مربوط به نمونه ۲- ۲۰۶ bp
 ستون ۶) گیرنده‌ی آدنوزین A_{2A} مربوط به نمونه ۲- ۲۳۷ bp
 ستون ۷) شاهد مثبت ۵۵۳ bp

با توجه به نمونه‌های نتایج به دست آمده که در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند، با استفاده از تکنیک RT-PCR مشخص می‌شود که بیان هر دو زیر گروه A_{2A} و A_{2B} از مجموع زیر گروه‌های گیرنده‌های آدنوزین در هر دو نمونه‌ی طبیعی و سرطانی به صورت کیفی وجود دارد. با استفاده از آنالیزهای شکل که در قسمت روش‌ها به آن اشاره گردید، Relative intensity هر گیرنده از هر نمونه به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد و مشخص گردید که میانگین دانسیته‌ی نسبی باندهای مشاهده شده در مورد بافت توموری برای گیرنده‌های

شاهد‌های مثبت و منفی استفاده گردید. شاهد مثبت یکی از ژن‌های House keeping، (بتا-اکتین) بود که با طراحی پرایمری مناسب در شرایط مشابهی گیرنده‌های آدنوزین، بیان ژن مربوط به آن نیز بررسی شد. شاهد منفی، نمونه‌های PCR شده‌ای هستند که عمل ترانسکریپتاز معکوس بر روی آن‌ها انجام نشده است.

نیمه کمی نمودن نتایج حاصل از RT-PCR

برای نیمه کمی نمودن نتایج حاصل از RT-PCR، عکس‌های مربوط به هر نمونه با استفاده از نرم‌افزارهای Photoshop و یا ImageJ مورد بررسی و آنالیز قرار داده شد و یک مقایسه‌ی نیمه کمی بین میزان بیان گیرنده‌های آدنوزین A_{2A} و A_{2B} در نمونه‌ی بافت سرطان پستان انسان و بافت طبیعی انجام شد. Relative intensity به دست آمده در مقابل بتا اکتین هر نمونه، نرمالیزه شد تا به مقادیر نسبی بیان هر کدام از گیرنده‌ها پی برده شود (۱۸).

یافته‌ها

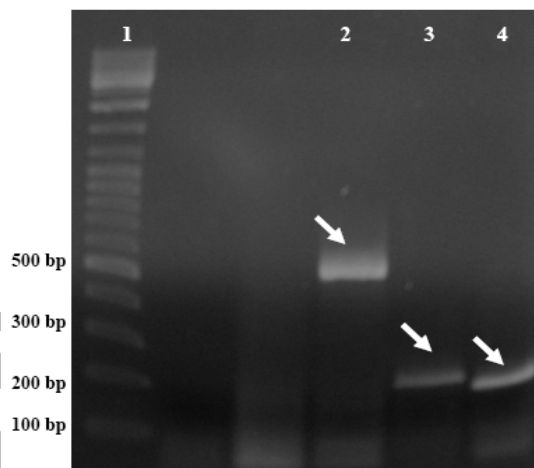
همان طور که در قسمت روش‌ها اشاره شد، نمونه‌های مورد نظر از بیماران جراحی شده به دست آمد (تعداد ۱۱ نمونه جمع‌آوری گردید). همچنین با همکاری پاتولوژیست، تعداد ۴ عدد نمونه‌ی بافت طبیعی نیز تهیه شد. نمونه‌های مورد نظر با استفاده از روش RT-PCR مورد آزمایش قرار گرفت و از ژن بتا اکتین نیز به عنوان شاهدی بر تأیید فرایند PCR استفاده گردید.

آنالیز مربوط به RT-PCR جهت الگوی بیان گیرنده‌های A_{2A}، A_{2B} و ژن بتا اکتین در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. چنانچه در شکل مشاهده می‌گردد، وجود باند مربوط به بتا اکتین در ناحیه‌ی ۵۵۳ bp که همان ناحیه‌ی مورد انتظار بود، بیانگر صحت فرایند

بحث

از آن جا که اولین قدم در مورد تعیین گیرنده‌های آدنوزین، بررسی الگوی بیان ژن‌های آن‌ها از طریق بررسی mRNA می‌مربوط به آن‌ها می‌باشد (۱۹)، تحقیق حاضر با استفاده از روش RT-PCR و در ادامه‌ی تحقیقات قبلی، که بر روی تعیین نقش گیرنده‌های آدنوزین در رده‌های سلولی سرطان پستان انجام گرفته است (۲۱-۲۰)، به منظور بررسی الگوی بیان گیرنده‌های آدنوزین در نمونه‌ی بافتی سرطان پستان در انسان انجام شد. بدین ترتیب بررسی مقایسه بین نتایج حاصل از بافت سرطانی پستان انسان (in vivo) با نتایج حاصل از مطالعات قبلی که بر روی رده‌های سلولی سرطان پستان انجام شده است امکان پذیر گردیده، می‌تواند به روشن شدن نقش و اهمیت این گیرنده‌ها و همچنین زیر کلاس‌های خاص آن در مراحل مختلف رشد سرطان پستان کمک نماید. تعداد زیادی از مطالعات انجام گرفته در مورد عوامل مرتبط و مؤثر در سرطان به ارتباط گیرنده‌های آدنوزین در سرطان‌های مختلف پرداخته‌اند (۱۰). بیان و دخالت گیرنده‌های A_{2A} در سلول‌های سرطانی نوروبلاستوما، لوکمی و ملانوما گزارش شده و معلوم گردیده است که این دسته از گیرنده‌ها در تحریک مرگ و آپوپتوز سلول‌های ملانومای انسانی و سلول‌های خونی نقش دارد (۱۱-۱۰). همچنین نشان داده شده است که فعال کردن گیرنده‌های A_{2A} نقش ایمنوساپرسیو و محافظت تومور در برابر ایسکمی داشته، باعث بهبود ماندگاری سلول‌های هیپوکسی شده‌ی تومور می‌گردد و توانایی متاستاز آن افزایش می‌یابد (۱۰). از طرف دیگر، گیرنده‌های A_{2B} که در غلظت‌های بالای پاتوفیزیولوژیک فعال می‌گردند نیز در سرطان نقش

A_{2B} برابر ۱/۰۳۷ و در مورد بافت طبیعی برابر ۰/۷۶ می‌باشد. بنابراین به طور میانگین گیرنده‌های A_{2B} در بافت توموری نسبت به بافت طبیعی مجاور تومور ۱/۳۶ برابر بیان بیشتری داشته؛ در صورتی که تفاوت کمی بین بیان گیرنده‌های آدنوزین A_{2A} در بافت طبیعی (۰/۹۷) و بافت تومور (۱/۰۲) دیده نمی‌شود (شکل ۳).



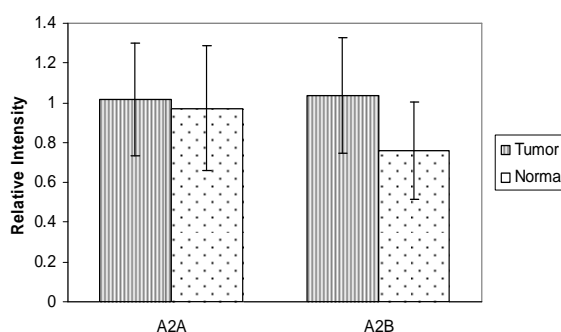
شکل ۲. الکتروفورز محصولات RCR مربوط به بتا‌کتین و زیر گروه‌های A_{2A} و A_{2B} روی ژل آگارز با غلظت ۱/۷٪ (نمونه طبیعی)

ستون ۱) مارکر وزن ملکولی ۱۰۰ bp

ستون ۲) شاهد مثبت - ۵۵۳ bp

ستون ۳) گیرنده‌ی آدنوزین A_{2A} - ۲۳۷ bp

ستون ۴) گیرنده‌ی آدنوزین A_{2B} - ۲۰۶ bp



شکل ۳. مقایسه‌ی بیان گیرنده‌های A_{2A} و A_{2B} بر اساس

Relative Intensity باندهای مشاهده شده در نمونه‌های تومور و طبیعی پستان. به طور خلاصه، Relative Intensity به دست آمده در مقابل بتا‌کتین هر نمونه طبیعی سازی شد تا به مقادیر نسبی بیان هر کدام از گیرنده‌ها پی برده شود.

دارند که تحریک پرولیفراسیون مویرگ‌های محیطی و القای آنژیوژنز و همچنین تحریک رشد سلول‌های ملانومای انسانی از جمله‌ی آن‌هاست (۱۳-۱۲، ۱۰، ۵). اهمیت گیرنده‌های آدنوزین A₃ در سرطان‌های پستان، کولون انسانی و دخالت آن در سیتوتوکسیسیتی و آپوپتوز (۲۲، ۱۰، ۸) و همچنین مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی وابسته به گیرنده‌ی A_{2B} نشان داده شده است (۲۲-۲۰).

در این مطالعه که بر روی بافت تومور سرطان سینه‌ی انسانی انجام گرفته است، علاوه بر بررسی این گیرنده‌ها در بافت سرطانی (n = ۱۱)، به بررسی بیان این گیرنده‌ها در تعدادی بافت طبیعی (n = ۴) نیز پرداخته شد تا بتوان به یک بررسی و مقایسه‌ی کلی بین بافت طبیعی و سرطانی پرداخت. تفاوت الگوی بیان گیرنده‌ها در رده‌های سلولی سرطان سینه‌ی انسانی در این مطالعه مشخص شده است. در مورد سرطان پستان انسان به اهمیت و نقش گیرنده‌های آدنوزین در رده‌های سلولی مختلف وابسته به گیرنده‌ی استروژن MCF-7 و غیر وابسته به گیرنده‌ی استروژن MDA-MB231 و MDA-MB488 می‌توان بیان کرد که الگوی بیان گیرنده‌های آدنوزین بر حسب نوع رده‌ی سلولی سرطان پستان متفاوت بوده، همچنین مسیر سیگنالینگ آن‌ها نیز مختلف می‌باشد (۲۱-۲۰، ۹). یافته‌های این تحقیق نشان داد که به طور میانگین گیرنده‌های A_{2B} در بافت توموری نسبت به بافت طبیعی مجاور تومور ۱/۳۶ برابر بیان بیشتری داشته؛ در صورتی که تفاوت کمی بین بیان گیرنده‌های آدنوزین A_{2A} در بافت طبیعی (۰/۹۷) و بافت تومور (۱/۰۲) دیده نمی‌شد.

در ارتباط با بیان و توزیع گیرنده‌های آدنوزین در بافت سرطانی و همچنین بافت طبیعی مجاور و غیر

مجاور آن مطالعات زیادی صورت نگرفته است. اولین تحقیق انجام شده در این زمینه، بررسی بیان گیرنده‌ی A₃ آدنوزین در بافت توموری و طبیعی بود که توسط Madi و همکاران انجام گرفت (۲۳). Madi و همکاران با استفاده از روش RT-PCR نشان دادند که از ۴۰ نمونه‌ی توموری سرطان کولون و ۱۷ نمونه‌ی سرطانی پستان، بیان گیرنده‌های A₃ در بافت توموری در مقایسه با بافت غیر توموری مجاور یا بافت‌های طبیعی به میزان قابل توجهی بالاتر است. حتی آن‌ها نشان دادند که غده‌های لنفاوی متاستاز یافته از بافت توموری بیان بالاتری را از بافت تومور اولیه دارند. مطالعات پروتئینی این گروه نشان داد که در کل بافت‌های سرطانی کولون، پروتئین A₃ به میزان ۶۱ درصد و در کل نمونه‌های سرطانی پستان به میزان ۷۸ درصد (در مقایسه با طبیعی) افزایش بیان پروتئین دیده می‌شود.

به همین منظور به دنبال مطالعات کامل و جامع پنجه‌پور و همکاران بر روی بیان، فانکشن، بایندینگ و سیگنالینگ گیرنده‌های آدنوزین بر روی سلول‌های سرطانی پستان مشخص گردید که گیرنده‌ی A_{2B} در رده‌های سلولی سرطان پستان از نوع MDA-MB231 دخیل بوده، باعث انتقال پیام داخل سلولی از طریق تغییر در مقدار cAMP و همچنین تغییر در آزاد سازی کلسیم اینوزیتول ۳ فسفات داخل سلول می‌گردد (۲۰). اهمیت این رده‌های سلولی که برای اولین بار به عنوان یک منبع با ارزش از گیرنده‌های A_{2B} معرفی می‌شدند، این موضوع را مشخص نمود که احتمال می‌رود این گیرنده‌ها در پرولیفراسیون و تکثیر سلولی نقش دارند. یافته‌های این تحقیق نیز نشان داد که در موافقت با تحقیق قبلی نقش احتمالی گیرنده‌های A_{2B} در بافت توموری نیز بیان بالاتری نسبت به بافت طبیعی دارد.

یافته‌های حاصل از این تحقیق با مشخص کردن نوع گیرنده‌ی آدنوزین بیان شده در سطح mRNA می‌تواند زمینه‌ی مطالعات بعدی را در جهت تعیین عملکرد و نقش گیرنده‌ی مربوط با استفاده از تأثیر آدنوزین و آگونیست‌های اختصاصی گیرنده‌ها بر روی رشد سلولی و مسیر سیگنالینگ داخل سلولی آن‌ها مشخص نماید و در آینده، ما را به سمت درمان و یا جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان با استفاده از آگونیست‌ها و یا آنتاگونیست‌های اختصاصی گیرنده‌های آدنوزین سوق دهد.

به هر حال، به منظور تأیید و قطعیت کامل نتایج این تحقیق، مطالعه‌ی بعدی با استفاده از روش Real-Time RT-PCR مقادیر کمی بیان ژن‌های همه‌ی زیر گروه‌های گیرنده‌های آدنوزین را با تعداد نمونه‌ی طبیعی و سرطانی بیشتر با دقت و حساسیت بیشتری در حال انجام است.

نتیجه‌گیری

مطالعات نیمه کمی انجام شده در این تحقیق، به اهمیت زیر گروه A_{2B} در سرطان پستان انسان اشاره دارد.

References

1. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4): 527-52.
2. Fishman P, Bar-Yehuda S. Pharmacology and therapeutic applications of A₃ receptor subtype. *Curr Top Med Chem* 2003; 3(4): 463-9.
3. Dhalla AK, Shryock JC, Shreeniwas R, Belardinelli L. Pharmacology and therapeutic applications of A₁ adenosine receptor ligands. *Curr Top Med Chem* 2003; 3(4): 369-85.
4. Fredholm BB, Cunha RA, Svenningsson P. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem* 2003; 3(4): 413-26.
5. Volpini R, Costanzi S, Vittori S, Cristalli G, Klotz KN. Medicinal chemistry and pharmacology of A_{2B} adenosine receptors. *Curr Top Med Chem* 2003; 3(4): 427-43.
6. Blay J, White TD, Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 1997; 57(13): 2602-5.
7. Sychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 2000; 87(2-3): 161-73.
8. Ohana G, Bar-Yehuda S, Barer F, Fishman P. Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A₃ adenosine receptor. *J Cell Physiol* 2001; 186(1): 19-23.
9. Panjehpour M, Karami-Tehrani F. An adenosine analog (IB-MECA) inhibits anchorage-dependent cell growth of various human breast cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(8): 1502-9.
10. Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 2003; 100(1): 31-48.
11. Sitkovsky MV. Use of the A_{2A} adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol* 2003; 65(4): 493-501.
12. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. A_{2B} adenosine receptors stimulate growth of porcine and rat arterial endothelial cells. *Hypertension* 2002; 39(2 Pt 2): 530-5.
13. Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz KN et al. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2002; 119(4): 923-33.
14. National Breast Cancer Centre. Early detection of breast cancer. Position statement. Available at www.nbcc.org.au/resources/documents/EDP_earlydetectionposition0804.pdf [Accessed September 2007].
15. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. *Public Health* 2000; 114(2): 143-5.
16. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
17. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
18. Serazin-Leroy V, Denis-Henriot D, Morot M, de Mazancourt P, Giudicelli Y. Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene tran

- scripts. *Mol Cell Probes* 1998; 12(5): 283-91.
19. Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 1996; 118(6): 1461-8.
 20. Panjehpour M, Castro M, Klotz KN. Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A2B adenosine receptors mediating a Ca²⁺ signal. *Br J Pharmacol* 2005; 145(2): 211-8.
 21. Panjehpour M, Karami-Tehrani F. Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors. *Oncol Res* 2007; 16(12): 575-85.
 22. Zeng D, Maa T, Wang U, Feoktistov I, Biggioni I, Belardinelli L. Expression and function of A2B adenosine receptors in the U87MG tumor cells. *Drug Dev Res* 2003; 58(4): 405-11.
 23. Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Erlanger A, Ohana G, et al. The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition. *Clin Cancer Res* 2004; 10(13): 4472-9.

Archive of SID

Expression of A_{2A} and A_{2B} Adenosine Receptors in Human Breast Tumors

Mojtaba Panjehpour PhD¹, Mohammad Moosavi Nasab PhD¹

Abstract

Background: The expression profile, signal transduction, molecular function and cell growth modulation of adenosine receptor subtypes in the human breast cancer cell lines are described; we decided to investigate the possible roles of adenosine receptors in the human breast tissues. In this study, we used RT-PCR to assess A_{2A} and A_{2B} gene expression in normal and tumoral breast tissues.

Methods: Breast tumors and non-neoplastic mammary tissues (n = 15) were collected immediately after mastectomy and stored at -80°C until use. All tumors were histologically confirmed to be breast cancer. Total RNA was extracted and reverse transcribed to cDNA. PCR primers were synthesized from human adenosine receptor cDNA sequences. PCR was performed under optimized condition for each receptor subtype. Amplification of beta-actin mRNA served as control for RT-PCR. The PCR products were separated on 1.5% agarose gels.

Finding: To elucidate the expression of A_{2A} and A_{2B} mRNA in breast carcinoma and normal tissues, we compared the level of A_{2A} and A_{2B} mRNA expression by RT-PCR analysis. All breast tumor and normal tissue specimens expressed A_{2A} and A_{2B} adenosine receptor transcripts. We observed that expression of A_{2B} in tumor tissues is 1.36 fold of normal tissues but there was no difference between the expressions of A_{2A} in tumor and normal tissues of the breast, when normalized against that of beta-actin.

Conclusion: These results indicated for the first time, to our knowledge, the expression profile of A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors in the human breast carcinoma. The present study showed that a high A_{2B} gene expression level was found in breast tumor tissues in comparison with the normal tissues. However, further studies based on the Real-time quantitative RT-PCR are needed to confirm gene expression levels.

Key words: Adenosine receptors, Human breast cancer, RT-PCR.

¹ School of Pharmacy and Bioinformatics Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Mojtaba Panjehpour PhD, Email: panjehpour@pharm.mui.ac.ir