

## مقایسه‌ی بروز پروتئین مهارکننده‌ی تومور TSLC1 در نمونه‌های سرطانی و سالم تخمدان توسط روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر مهدی نیکبخت دستجردی<sup>۱</sup>، صدیقه شهید پورفلاح<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** TSLC1 (Tumor suppressor in lung cancer 1) یک پروتئین مهارکننده‌ی تومور است که غیر فعال شدن آن می‌تواند چسبندگی بین سلولی و نیز اتصال بین غشا و اسکلت سلولی را از بین ببرد و باعث بروز فنوتیپ بدخیم و متاستاز گردد. در این مطالعه بروز ژن TSLC1 در نمونه‌های بافت سرطانی و بافت سالم مجاور سرطان تخمدان توسط روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

**روش‌ها:** در این مطالعه از ۶۰ نمونه‌ی سرطانی تخمدان و ۶۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های توموری استفاده شد. بروز پروتئین TSLC1 با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده از مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Motic Advanced Plus نسخه‌ی ۲ بررسی شد.

**یافته‌ها:** حضور رنگ قهوه‌ای سیتوپلاسم همراه با رنگ قهوه‌ای غشا و یا بدون آن، هر دو برای بیان TSLC1 مثبت در نظر گرفته شد. بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ( $P < 0/001$ ). همچنین کاهش بیان این پروتئین از لحاظ آماری به طور معنی‌داری با متاستاز به غدد لنفاوی ( $P = 0/028$ ) و مراحل (Stage) پیشرفته‌تر تومور ( $P = 0/032$ ) مرتبط بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به کاهش بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم در این مطالعه، بیان پروتئین TSLC1 ممکن است با پاتوژنز سرطان تخمدان ارتباط داشته باشد. از طرف دیگر کاهش بروز پروتئین TSLC1 می‌تواند در تهاجمی‌تر کردن رفتار کارسینومای تخمدان مؤثر باشد. بنابراین، این پروتئین به عنوان یک مارکر مولکولی تشخیصی برای بیماران با کارسینومای تخمدان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** سرطان تخمدان، ایمونوهیستوشیمی، ژن مهارکننده‌ی تومور، TSLC1

**ارجاع:** نیکبخت دستجردی مهدی، شهید پورفلاح صدیقه. **مقایسه‌ی بروز پروتئین مهارکننده‌ی تومور TSLC1 در نمونه‌های سرطانی و سالم تخمدان توسط روش ایمونوهیستوشیمی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۵): ۱۰۹۵-۱۰۸۶

اساس منطقه‌ی جغرافیایی و گروه‌های نژادی متفاوت است. میزان آن در اروپای شمال غربی و ایالات متحده و کانادا بالا و در آسیا و آمریکای لاتین پایین می‌باشد (۲). افزایش سن، مصرف الکل، کشیدن

### مقدمه

سرطان تخمدان مهم‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان دستگاه تولید مثل زنان و ششمین سرطان شایع در زنان است (۱). بروز سرطان تخمدان بر

\* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای به شماره‌ی ۳۹۰۳۶۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

بنابراین شناسایی بیومارکرهای ژنتیکی جدید در اولویت قرار دارد زیرا کشف زود هنگام سرطان را ممکن می‌سازد، اهداف درمانی جدید را برای درمان سرطان فراهم می‌کند و در نهایت بقای بیماران مبتلا سرطان تخمدان را افزایش می‌دهد.

پروتئین‌های کدشده توسط ژن‌های مهارکننده‌ی تومور، رشد خارج از کنترل سلول را مهار می‌کنند و در ثبات ژنومی نقش دارند (۹). هر گونه تغییر ژنتیکی که مانع سنتز یا عملکرد طبیعی پروتئین‌های مهارکننده‌ی تومور شود، می‌تواند منجر به ایجاد سرطان شود. این پروتئین‌ها توسط روش‌های مختلفی تکثیر سلولی را کنترل می‌کنند.

ژن (Tumor suppressor in lung cancer 1) TSLC1 یک مهارکننده‌ی تومور است که دارای عملکردهای متعددی در تنظیم تهاجم سلولی می‌باشد. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱۱ (11q23.2) واقع است (۱۰-۱۱). ژن TSLC1 یک گلیکوپروتئین ۷۵ کیلودالتونی را کد می‌نماید که مشابهت زیادی با مولکول‌های چسباننده‌ی سلولی مثل NCAM-1 و NCAM-2 دارد. گلیکوپروتئین TSLC1 در ضخامت غشای سلولی قرار دارد و شامل سه محدوده‌ی (Domain) خارج سلولی، سیتوپلاسمی و غشایی می‌باشد. محدوده‌ی سیتوپلاسمی آن دارای یک Protein 4.1-binding motif و یک PDZ-binding motif می‌باشد که هر دو دارای وظایف مهمی در عملکرد TSLC1 هستند (۱۲).

ژن TSLC1 با فعالیت سرکوب‌گری تومور در بدن موش شناسایی شد و در انسان در ابتدا به عنوان یک ژن سرکوب‌کننده‌ی تومور در سرطان ریه

سیگار، داشتن سابقه‌ی فامیلی، قاعدگی زودرس، یائسگی دیررس و ناباروری باعث افزایش میزان بروز سرطان می‌گردد، در حالی که حاملگی، استفاده از قرص‌های ضد بارداری و شیردهی میزان بروز این نوع سرطان را کاهش می‌دهد (۳). سرطان تخمدان اغلب به صورت یک توده‌ی کیستی در لگن دیده می‌شود. و توسط عروق لنفاوی به کلیه و عروق خونی به کبد یا ریه متاستاز می‌دهد. تنها ۲۰ درصد از سرطان‌های تخمدان قبل از این که متاستاز دهند تشخیص داده می‌شوند و تحت درمان قرار می‌گیرند. اگر چه سرطان تخمدان می‌تواند از سلول زایا یا سلول گرانولوزا ایجاد شود، اما بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های تخمدان از سلول‌های پوششی سطح تخمدان منشأ می‌گیرند. در ۱۰-۵ درصد موارد این سرطان از نوع ارثی و در مابقی موارد از نوع اسپورادیک می‌باشد (۴، ۲).

به تازگی گزارش شده است که وقوع این بیماری در کشورهای آسیایی مثل چین و سنگاپور افزایش یافته است (۵). در سال‌های اخیر روش‌های درمانی سرطان تخمدان، باعث بهبود نسبی و بقای کوتاه مدت بیماران شده است (۶). با این وجود به دلیل فقدان علائم زودرس قابل کشف و وقوع بی سر و صدای این سرطان، اغلب مبتلایان به آن (۷۰ درصد) در مراحل (Stage) پیشرفته تشخیص داده می‌شوند که همین امر منجر به بالا رفتن میزان مرگ و میر در این بیماران می‌شود (۷).

مانند سایر انواع سرطان‌های انسانی، به نظر می‌رسد در سرطان تخمدان نیز یک فرایند تدریجی شامل شروع، پیشروی موضعی و متاستاز دور دست، ناشی از انواع وسیعی از تغییرات ژنتیکی می‌باشد (۸).

در این مطالعه، ما سطوح بروز پروتئین TSLC1 را از طریق ایمونوهیستوشیمی (IHC) در تعدادی از نمونه‌های سرطانی تخمدان انسانی و بافت‌های طبیعی مجاور آن‌ها به عنوان گروه شاهد بررسی نمودیم.

### روش‌ها

در این مطالعه از ۶۰ نمونه بافت سرطانی تخمدان و ۶۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های توموری استفاده شد. نمونه‌های سرطانی به صورت قالب پارافینی و به صورت تصادفی از نمونه‌های سرطان تخمدان موجود در بخش‌های پاتولوژی بیمارستان‌های الزهرا (س)، شهید بهشتی، مهرگان و دکتر شریعتی شهر اصفهان تهیه شد. برای این کار ابتدا با رعایت اصول اخلاقی و حفظ مشخصات بیماران به بررسی پرونده‌های بیماران در بخش آرشیو بیمارستان پرداخته شد. به این ترتیب که بعد از جستجو در پرونده‌های افراد مبتلا به سرطان تخمدان مشخص شدند و شماره‌ی پاتولوژی و سن آن‌ها یادداشت شد. سپس لام‌ها و بلوک‌های هر شخص از انبار نگهداری استخراج گردید. یک یا چند نمونه‌ی مثبت و چند نمونه‌ی منفی (شاهد) از میان لام و بلوک‌های هر فرد برداشته شد. بررسی لام‌ها و تعیین موارد سالم (به عنوان گروه شاهد) و سرطانی توسط متخصص پاتولوژی انجام گرفت. کلیه‌ی اطلاعات کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌ها ثبت گردید. نمونه‌های با اطلاعات کلینیکوپاتولوژیک ناقص از مطالعه خارج شدند. نمونه‌های شاهد از بافت سالم مجاور نمونه‌ی سرطانی تهیه شد.

پس از تأیید تشخیص پاتولوژی نمونه‌ها توسط پاتولوژیست مراحل زیر جهت تهیه‌ی لام

مشخص شد (۱۴-۱۳). موتاسیون‌های غیر فعال‌کننده‌ی TSLC1 نادر است، در حالی که LOH (Loss of heterozygosity) در محل استقرار این ژن (11q23.2) شایع می‌باشد، به طوری که در ۴۲ درصد از سرطان‌های ریه، ۳۳ درصد از سرطان‌های کبد و ۱۷ درصد از سرطان‌های پانکراس یافت شده است. همچنین Hypermethylation ناحیه‌ی پروموتور TSLC1 در حدود ۴۰ درصد از سرطان‌های ریه، ۱۵-۳۰ درصد از سرطان‌های کبد، معده، پانکراس، پستان، نازوفارنکس و پروستات و نیز ۳۵-۶۰ درصد از سرطان‌های گردن رحم مشاهده شده است؛ در حالی که در مورد درگیری ژن TSLC1 در نمونه‌های سرطانی تخمدان گزارش‌های کمی ارائه شده است. این ژن در اکثر بافت‌های بدن به جز لنفوسیت‌های محیطی بیان می‌شود. به تازگی مشخص شده است که بروز پروتئین TSLC1 در سرطان‌های ریه، پانکراس، سینه، پروستات، نازوفارنکس و معده کاهش می‌یابد. فقدان بروز پروتئین TSLC1 هم در سرطان روده مشاهده شده است (۲۱-۱۵).

نشان داده شده است که فقدان یا کاهش بیان ژن TSLC1 می‌تواند یک مارکر تشخیصی در آدنوکارسینوم ریه و کارسینوم مری باشد (۲۴-۲۲)، با این وجود نقش TSLC1 در توسعه و پیشرفت سرطان تخمدان هنوز به درستی شناسایی نشده است. با توجه به این که سرطان تخمدان یکی از سرطان‌های بدخیم در اصفهان می‌باشد و مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده‌ی پیش‌آگهی در این سرطان، حضور و توسعه‌ی متاستاز است؛ بنابراین تعیین بروز ژن TSLC1، به عنوان یکی از اجزای Cell adhesion molecules، می‌تواند نقش مهمی در تعیین پیش‌آگهی داشته باشد.

ایمونوهیستوشیمی به ترتیب انجام شد.

الف) آماده‌سازی بافت:

۱. آب‌گیری نمونه‌ها توسط اتانول‌های صعودی (۷۰ درصد، ۹۵ درصد، ۹۹ درصد)

۲. شفاف‌سازی نمونه‌ها توسط گزیلن

۳. قالب‌گیری نمونه‌ها به وسیله پارافین

ب) برش‌گیری: برش‌های بافتی به ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه شد.

ج) رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی:

۱. پارافین‌زدایی توسط غوطه‌ورسازی نمونه‌ها

در گزیلن

۲. آب‌دهی توسط اتانول‌های نزولی (۹۹ درصد، ۹۵ درصد، ۷۰ درصد)

۳. در مرحله‌ی بعد به منظور توقف فعالیت Endogenous peroxide برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۵ درصد انکوبه شدند.

۴. شستشو در آب جاری

۵. Antigen retrieval به مدت یک دقیقه در

دمای ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در بافر ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم در یک Microwave oven انجام شد.

۶. پس از Antigen retrieval، برش‌ها به مدت

۵ دقیقه به Tris بافر سالین انتقال داده شدند.

۷. توقف فعالیت Endogenous peroxide

توسط سرم نرمال ۱۰ درصد (Goat) در TBS به مدت پنج دقیقه.

۸. برداشت سرم اضافه و اضافه کردن آنتی‌بادی

اولیه با رقت ۱:۵۰۰ به مدت یک شب در درجه‌ی حرارت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد

۹. شستشو با TBS دو بار و هر بار ۵ دقیقه

۱۰. انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه با رقت

۱:۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه

۱۱. شستشو با TBS دو بار و هر بار ۵ دقیقه

۱۲. واکنش کروموزنی-ک توسط

Diaminobenzidine انجام گرفت.

۱۳. رنگ‌آمیزی مخالف نیز با Hematoxilin

انجام شد.

۱۴. در گروه‌های شاهد منفی از PBS به جای

آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده شد.

د) بررسی میکروسکوپی مقاطع نشان‌دار شده با

آنتی‌بادی:

مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی به منظور بررسی

میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری و به

کارگیری نرم‌افزار Motic Advance Plus نسخه‌ی ۲

در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویربرداری شه و سپس

جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده شد. در

این بررسی، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش

شد و در صد سلول‌هایی که رنگ قهوه‌ای گرفته

بودند، تعیین گردید. شمارش سلول‌های

رنگ‌آمیزی شده توسط دو نفر و بدون اطلاع قبلی از

هویت نمونه‌ها انجام گرفت. بر همین اساس نمونه‌ها

به سه گروه درجه‌بندی شدند:

۱) بروز طبیعی (بیشتر از ۷۰ درصد از سلول‌های

سرطانی برای رنگ‌آمیزی TSLC1 مثبت بودند).

۲) کاهش بروز (۷۰-۲۰ درصد سلول‌های

سرطانی برای رنگ‌آمیزی TSLC1 مثبت بودند).

۳) فقدان بروز (کمتر از ۲۰ درصد سلول‌های

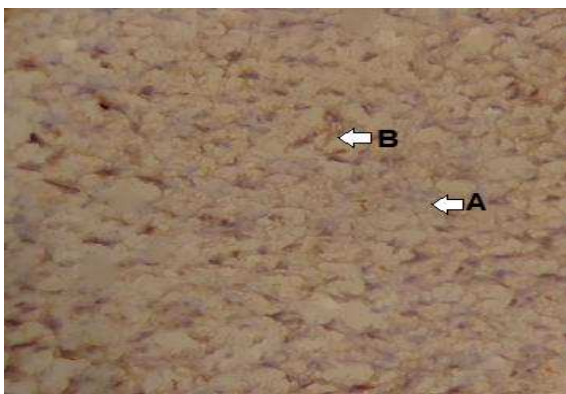
اپی‌تلیال برای رنگ‌آمیزی TSLC1 مثبت بودند).

آنالیز آماری اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS

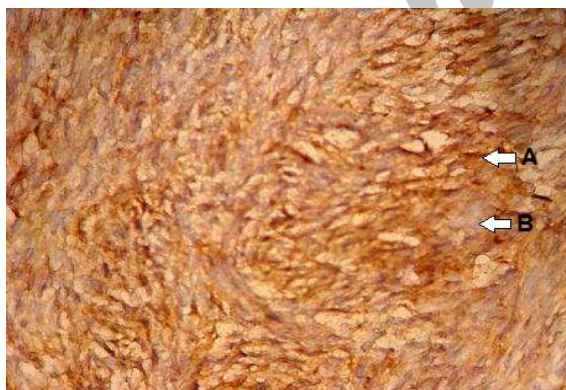
(SPSS Inc., Chicago, IL) و توسط آزمون‌های  $\chi^2$

برای بررسی ارتباط بروز پروتئین با ویژگی‌های

داشتند. بیان این پروتئین در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ( $P < 0/001$ ). همچنین کاهش بیان این پروتئین از لحاظ آماری به طور معنی‌داری با متاستاز به غدد لنفاوی ( $P = 0/028$ ) و مراحل پیشرفته‌تر تومور ( $P = 0/032$ ) مرتبط بود (جدول ۱).



شکل ۱. بروز پروتئین TSLC1 (Tumor suppressor in lung cancer 1) در یک نمونه از بافت سرطانی تخمدان. بخش اعظم سلول‌ها به رنگ آبی (A: عدم بروز پروتئین) و بخش کمتری از سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای (B: بروز پروتئین) رنگ‌آمیزی شده‌اند (بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).



شکل ۲. بروز پروتئین TSLC1 (Tumor suppressor in lung cancer 1) در یک نمونه از بافت سالم تخمدان. بخش اعظم سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای (A: بروز پروتئین) و بخش کمتری از سلول‌ها به رنگ آبی (B: عدم بروز پروتئین) رنگ‌آمیزی شده‌اند (بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).

کلینیکوپاتولوژیک انجام گرفت. از نظر آماری یافته‌های با مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

### یافته‌ها

در این مطالعه از ۶۰ نمونه‌ی سرطان تخمدان به عنوان گروه آزمایش و ۶۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های تومور به عنوان گروه شاهد استفاده شد. بعد از مراحل آماده‌سازی بافت و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی تمامی نمونه‌ها مورد تأیید پاتولوژی نیز قرار گرفت.

برای ردیابی پروتئین TSLC1 در نمونه‌ها، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Motic advance plus نسخه‌ی ۲ در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویربرداری شد و سپس جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده شد. در این بررسی حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد. درصد سلول‌هایی که به رنگ قهوه‌ای رنگ‌آمیزی شده بودند تعیین گردید و بر اساس سه گروه درجه‌بندی شدند و بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی و بافت‌های سالم مجاور بررسی شد.

حضور رنگ قهوه‌ای سیتوپلاسم همراه با رنگ قهوه‌ای غشا و یا بدون آن، هر دو برای بیان TSLC1 مثبت در نظر گرفته شد (شکل‌های ۱ و ۲).

۹ مورد (۱۵ درصد) بافت‌های سرطانی فاقد بروز پروتئین بود. ۲۸ مورد (۴۶/۷ درصد) و ۲۳ مورد (۳۸/۳ درصد) از نمونه‌های سرطانی به ترتیب کاهش بروز و بروز طبیعی داشتند. همه ۶۰ مورد (۱۰۰ درصد) بافت‌های سالم مجاور بروز طبیعی

جدول ۱. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 (Tumor suppressor in lung cancer 1) با ویژگی‌های کلینیکی پاتولوژیک نمونه‌های سرطانی

ویژگی‌های کلینیکی پاتولوژیک نمونه‌های بافت سرطانی	تعداد کل	بروز طبیعی (درصد) تعداد	کاهش بروز (درصد) تعداد	فقدان بروز (درصد) تعداد	مقدار P
سن					۰/۳۵۰
> ۵۰ سال	۳۲ (۵۳/۳)	۱۴ (۴۳/۸)	۱۳ (۴۰/۶)	۵ (۱۵/۶)	
< ۵۰ سال	۲۸ (۴۶/۷)	۹ (۳۲/۱)	۱۵ (۵۳/۶)	۴ (۱۴/۳)	
وجود متاستاز					۰/۰۲۸
خیر	۲۶ (۴۳/۳)	۱۵ (۵۷/۷)	۹ (۳۴/۶)	۲ (۷/۷)	
بلی	۳۴ (۵۶/۷)	۱۰ (۲۹/۴)	۱۷ (۵۰)	۷ (۲۰/۶)	
Stage					۰/۳۲۰
I	۱۰ (۱۶/۷)	۷ (۷۰)	۳ (۳۰)	۰ (۰)	
II	۶ (۱۰)	۳ (۵۰)	۲ (۳۳/۳)	۱ (۱۶/۷)	
III	۳۵ (۵۸/۳)	۱۲ (۳۴/۳)	۱۸ (۵۱/۴)	۵ (۱۴/۳)	
IV	۹ (۱۵)	۲ (۲۲/۳)	۴ (۴۴/۴)	۳ (۳۳/۳)	

میزان Hypermethylation ژن‌های مهارکننده‌ی تومور از جمله ژن TSLC1 که باعث کاهش بروز TSLC1 می‌گردد با افزایش سن، افزایش می‌یابد (۲۸). همچنین در سرطان ریه فقدان بروز TSLC1 در مردان مبتلا به این نوع سرطان بیشتر از زنان مبتلا دیده شده است (۲۹) و نیز در این نوع سرطان مشخص شده است که در بیماران که میزان بروز پروتئین در آن‌ها پایین‌تر است احتمال عود بیماری بیشتر می‌باشد و استفاده از روش‌های درمانی اضافه جهت کنترل بیماری مورد نیاز است (۲۳).

Cell adhesion molecules در عملکردهای متقابل بین سلولی و عملکردهای متقابل سلول با ماتریکس خارج سلولی نقش ایفا می‌نمایند. مدارک متعددی نشان می‌دهند که بروز تغییرات در ویژگی‌های چسبندگی سلول‌های سرطانی دارای نقشی محوری در ایجاد، پیشرفت و متاستاز سرطان دارد. فقدان چسبندگی بین سلولی و جدا شدن سلول‌ها از غشای قاعده‌ای زیرین، به سلول‌های سرطانی امکان می‌دهد تا از

### بحث

اگر چه عملکرد TSLC1 هنوز به طور کامل مشخص نشده است، ولی مطالعات In vivo و In vitro نشان داده‌اند که این پروتئین نه تنها القاکننده‌ی آپوپتوز می‌باشد، بلکه در تنظیم چسبندگی بین سلولی و حرکت سلولی نقش ایفا می‌نماید (۲۵). کاهش بیان TSLC1 در مراحل پیشرفته‌ی سرطان ریه همراه با پیش‌آگهی ضعیف این تومور گزارش شده است، به طوری که با کاهش بیان TSLC1 میزان مرگ و میر در این نوع تومور افزایش می‌یابد. مشاهدات دیگر نیز نشان داده است که میزان بیان TSLC1 با قدرت تهاجمی تومور مرتبط می‌باشد، به طوری که با کاهش بیان این پروتئین قدرت تهاجمی تومور افزایش می‌یابد و به نواحی دیگر متاستاز می‌دهد (۲۶). در سرطان نازوفارنکس گزارش شده است که در ۸۳ درصد موارد، متاستاز به غدد لنفاوی با کاهش بیان و یا فقدان بیان TSLC1 مرتبط بوده است (۲۷). از طرف دیگر در سرطان معده گزارش شده است که

ناحیه‌ی اولیه خود رها شوند، ماتریکس خارج سلولی را تخریب نمایند و در نهایت یک فنوتیپ تهاجمی کسب کنند و به بافت‌های اطراف خود متاستاز بدهند. ژن TSLC1 از اجزای Cell adhesion molecules است که در سازمان‌دهی اسکلت سلولی با ایجاد اتصالات محکم بین سلولی نقش ایفا می‌نماید. غیر فعال شدن این ژن می‌تواند چسبندگی بین سلولی و نیز اتصال بین غشا و اسکلت سلولی را از بین ببرد و باعث بروز فنوتیپ بدخیم و متاستاز گردد (۲۵).

به تازگی فقدان و یا کاهش بیان ژن TSLC1، در بسیاری از سرطان‌های انسانی از قبیل سرطان پانکراس، سرطان پستان، سرطان پروستات و دیگر تومورهای بدخیم گزارش شده است (۲۱-۱۵). پروتئین TSLC1 به عنوان مولکولی که در چسبندگی بین سلولی دخیل می‌باشد، در فرآیندهای بیولوژیک مختلف، از قبیل تهاجم موضعی و متاستاز دور دست نقش دارد (۲۶).

برای بررسی بروز پروتئین TSLC1 در سرطان تخمدان، در این مطالعه سطوح بروز این پروتئین با رنگ‌آمیزی IHC در ۶۰ نمونه‌ی سرطانی و ۶۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های توموری، تعیین شد. از اطلاعات کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌ها نیز برای بررسی و ارتباط آن با نتایج رنگ‌آمیزی IHC استفاده شد.

نتایج ما نشان‌دهنده‌ی سطح بالای بروز پروتئین TSLC1 در تمام بافت‌های طبیعی تخمدان بود. در مقابل، در گروه نمونه‌های سرطانی تخمدان، کاهش و یا فقدان بروز پروتئین TSLC1 مشاهده شد. از طرف دیگر فقدان یا کاهش بروز این پروتئین به طور معنی‌داری در نمونه‌های سرطانی با مراحل پیشرفته‌تر و دارای متاستاز به غدد لنفاوی بیش از سایر نمونه‌ها

بود. بنابراین بر طبق این یافته‌ها فقدان یا کاهش بروز پروتئین TSLC1 در سرطان تخمدان می‌تواند نشان‌دهنده‌ی یک مکانیسم مولکولی اکتسابی باشد که توسط آن سلول‌های سرطانی بیشتر در معرض تهاجم موضعی و متاستاز دور دست می‌باشند. کاهش بروز پروتئین TSLC1 به طور چشمگیری در انواع سرطان‌های انسانی گزارش شده است (۲۱-۱۵). در مقاله‌ای که به تازگی چاپ شده است، اهمیت پیش‌آگهی و تأثیر بالینی کاهش بروز TSLC1 در سرطان تخمدان گزارش شده است که با نتایج ما مطابقت دارد (۳۲). در این مقاله، تأثیر بروز پروتئین TSLC1 (که توسط رنگ‌آمیزی IHC بررسی شد) بر بقای بیماران مبتلا به سرطان تخمدان مطالعه شد و نتایج حاصل از آن نشان داد که فقدان و یا کاهش بروز پروتئین TSLC1 در سرطان تخمدان مرتبط با بقای کوتاه بیمار است. در واقع سطح بروز این پروتئین پیش‌بینی‌کننده‌ای برای کاهش بقای کلی بیماران می‌باشد و بیماران مبتلا به تومورهایی با سطوح طبیعی بروز TSLC1، پیش‌آگهی بسیار مطلوب‌تری نسبت به بیماران با فقدان یا کاهش بروز این پروتئین داشتند (۳۲). در مطالعه‌ی حاضر بقای بیماران بررسی نشد که لازم است در مطالعات آتی مورد توجه قرار بگیرد.

در حال حاضر، مکانیسم دقیقی از چگونگی اعمال اثر پروتئین TSLC1 به عنوان مهارکننده‌ی تومور، بر روی تومورهای بدخیم انسانی، ارائه نشده است.

یافته‌های کنونی ما نقش مهم TSLC1 به عنوان یک سرکوبگر تومور را در توسعه و پیشرفت سرطان تخمدان، نشان داد. مطالعات اخیر دیگری، کاهش چسبندگی سلولی را در مراحل اولیه‌ی شروع تهاجم و متاستاز در تومورهای انسانی بدخیم نشان می‌دهند

(۲۹-۲۷، ۲۳).

**نتیجه گیری**

با توجه به کاهش بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم در این مطالعه، بروز پروتئین TSLC1 ممکن است با پاتوزن سرطان تخمدان ارتباط داشته باشد. از طرف دیگر کاهش بروز پروتئین TSLC1 می‌تواند در تهاجمی‌تر کردن رفتار کارسینومای تخمدان مؤثر باشد. بنابراین، این پروتئین می‌تواند به عنوان یک مارکر مولکولی تشخیصی برای بیماران با کارسینوم تخمدان مورد استفاده قرار گیرد.

بنابراین پروتئین TSLC1 ممکن است عملکردی به عنوان Cell adhesion molecule داشته باشد و در نتیجه کاهش یا فقدان بیان آن، افزایش تهاجم موضعی و متاستاز دوردست رخ بدهد.

سطوح طبیعی پروتئین TSLC1 در تنظیم آپوتیوز سلولی که فرآیند فیزیولوژیک مهمی برای سرطان‌زایی و رشد تومور می‌باشد (۳۰، ۱۴)، اهمیت دارد. این که هیپرمیتلاسیون پروموتور یکی از مکانیسم‌های مهم مولکولی دخیل در خاموشی ژن، در ژن‌های سرکوبگر تومور مانند TSLC1 می‌باشد، به طور کامل اثبات شده است ولی کماکان برای درک دقیق‌تر تأثیر غیر فعال شدن ژن TSLC1 بر توسعه و پیشرفت سرطان تخمدان و دیگر تومورهای انسانی، لازم است تحقیقات بیشتری انجام شود.

**تشکر و قدردانی**

از تمامی کارکنان آزمایشگاه پاتولوژی دکتر مهاجری به ویژه سرکار خانم محمودی که ما را در تهیه‌ی لام‌های IHC یاری رساندند سپاسگزاری می‌نماییم.

**References**

1. Permuth-Wey J, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 472: 413-37.
2. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19(1): 3-10.
3. Quinn JE, Carser JE, James CR, Kennedy RD, Harkin DP. BRCA1 and implications for response to chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 113(1): 134-42.
4. Shahshahan Z. Staging of 250 patients with ovarian cancer during 1981-2008 in Isfahan, Iran, hospitals. *Iran J Surg* 2013; 12(33): 30-4.
5. Lynch HT, Casey MJ, Lynch J, White TE, Godwin AK. Genetics and ovarian carcinoma. *Semin Oncol* 1998; 25(3): 265-80.
6. Vaidya AP, Curtin JP. The follow-up of ovarian cancer. *Semin Oncol* 2003; 30(3): 401-12.
7. Barnholtz-Sloan JS, Schwartz AG, Qureshi F, Jacques S, Malone J, Munkarah AR. Ovarian cancer: changes in patterns at diagnosis and relative survival over the last three decades. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(4): 1120-7.
8. DiSaia PJ, Bloss JD. Treatment of ovarian cancer: new strategies. *Gynecol Oncol* 2003; 90(2 Pt 2): S24-S32.
9. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 2006; 25(43): 5864-74.
10. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2001; 27(4): 427-30.
11. Murakami Y, Nobukuni T, Tamura K, Maruyama T, Sekiya T, Arai Y, et al. Localization of tumor suppressor activity important in nonsmall cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14): 8153-8.
12. Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, et al. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 2002; 277(34): 31014-9.
13. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Maruyama T, Ito A, Asamura H, et al. Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*



- 2006; 106(8): 1751-8.
14. Pletcher MT, Nobukuni T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Sekiya T, et al. Identification of tumor suppressor candidate genes by physical and sequence mapping of the TSLC1 region of human chromosome 11q23. *Gene* 2001; 273(2): 181-9.
  15. Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, et al. Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance. *Cancer Sci* 2005; 96(8): 480-6.
  16. Jansen M, Fukushima N, Rosty C, Walter K, Altink R, Heek TV, et al. Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol Ther* 2002; 1(3): 293-6.
  17. Allinen M, Peri L, Kujala S, Lahti-Domenici J, Outila K, Karppinen SM, et al. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34(4): 384-9.
  18. Fukuhara H, Kuramochi M, Fukami T, Kasahara K, Furuhashi M, Nobukuni T, et al. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93(6): 605-9.
  19. Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, et al. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 294-305.
  20. Hui AB, Lo KW, Kwong J, Lam EC, Chan SY, Chow LS, et al. Epigenetic inactivation of TSLC1 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog* 2003; 38(4): 170-8.
  21. Honda T, Tamura G, Waki T, Jin Z, Sato K, Motoyama T, et al. Hypermethylation of the TSLC1 gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93(8): 857-60.
  22. Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, et al. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62(18): 5129-33.
  23. Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, et al. Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2003; 98(5): 1002-7.
  24. Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, et al. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6320-6.
  25. Heller G, Geradts J, Ziegler B, Newsham I, Filipits M, Markis-Ritzinger EM, et al. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 103(3): 283-91.
  26. Ito A, Okada M, Uchino K, Wakayama T, Koma Y, Iseki S, et al. Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma. *Lab Invest* 2003; 83(8): 1175-83.
  27. Lung HL, Cheung AK, Xie D, Cheng Y, Kwong FM, Murakami Y, et al. TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9385-92.
  28. Matsubayashi H, Sato N, Brune K, Blackford AL, Hruban RH, Canto M, et al. Age- and disease-related methylation of multiple genes in nonneoplastic duodenum and in duodenal juice. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1): 573-83.
  29. Heller G, Fong KM, Girard L, Seidl S, End-Pfutzenreuter A, Lang G, et al. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene* 2006; 25(6): 959-68.
  30. Yang G, He W, Cai M, Luo F, Kung H, Guan X, et al. Loss/Down-regulation of tumor suppressor in lung cancer 1 expression is associated with tumor progression and is a biomarker of poor prognosis in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21(3): 486-93.

## Comparative Investigation of TSLC1 Tumor Suppressor Protein Expression in Cancerous and Normal Ovarian Specimens

Mehdi Nikbakht-Dastjerdi PhD<sup>1</sup>, Sedigheh Shahid-Poorfallah<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** TSLC1 is a tumor suppressor protein its inactivation destroy the intracellular adhesion and connection between the membrane and cytoskeleton tend to malignant phenotype and metastasis. In this study, the expression of TSLC1 was examined in normal and cancerous ovarian cancer specimens.

**Methods:** 60 samples of ovarian cancer and 60 adjacent normal tissues from the same tumor samples were studied. TSLC1 protein expression was evaluated by immunohistochemistry method. Percentage of cells stained from each tissue sections was checked with light microscope and Motic Advanced Plus 2 software.

**Findings:** The presence of brown cytoplasmic membrane, with or without brown membrane, was considered positive for TSLC1 expression. Protein expression in tumor tissue was significantly reduced compared to adjacent normal tissues ( $P < 0.001$ ). The reduction of protein expression was associated with lymph node metastasis ( $P = 0.028$ ) and more advanced tumor stages ( $P = 0.032$ ).

**Conclusion:** According to the reduced expression of TSLC1 protein in tumor compared to normal samples in this study, expression of TSLC1 protein may be related to ovarian cancer pathogenesis. On the other hand, reduced expression of TSLC1 protein can cause ovarian carcinoma to become aggressive. So, this protein can be used as a diagnostic molecular marker for patients with ovarian carcinoma.

**Keywords:** Ovarian cancer, TSLC1, Tumor suppressor gene, Immuno-histochemistry

**Citation:** Nikbakht-Dastjerdi M, Shahid-Poorfallah S. Comparative Investigation of TSLC1 Tumor Suppressor Protein Expression in Cancerous and Normal Ovarian Specimens. J Isfahan Med Sch 2013; 31(245): 1086-95

\* This paper is derived from a medical doctorate thesis No. 390362 in Isfahan University of Medical Sciences.  
1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
2- Student of Medicine, School of Medicine And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
**Corresponding Author:** Mehdi Nikbakht-Dastjerdi PhD, Email: nikbakht@med.mui.ac.ir