

تشخیص میکرومتاستاز با مارکر CEA در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده با روش Real-Time PCR

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۴/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۱/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: سرطان معده اولین سرطان بدخیم کشنده در ایران به‌شمار می‌رود. علی‌رغم پیشرفت‌های درمانی جدید برای درمان سرطان معده، گسترش تومور از طریق سیستم گردش خون و مغز استخوان به اندام‌های دورتر، اصلی‌ترین علت مرگ و میر در این افراد محسوب می‌شود. بنابراین نیاز فوری برای ایجاد روش‌های حساس جهت تشخیص سلول‌های توموری پخش شده در خون محیطی (PB) و مغز استخوان (BM) بیماران مبتلا به سرطان معده وجود دارد. **روش بررسی:** در این بررسی آینده‌نگر از Carcino Embryonic Antigen (CEA) به عنوان تومور مارکر و از (GAPDH) Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase به‌عنوان کنترل داخلی برای تشخیص و تعیین مقدار سلول‌های توموری پراکنده شده در نمونه‌های PB و BM ۳۵ فرد مبتلا (نسبت مرد به زن: ۲۰ به ۱۵ میانگین سنی: ۵۰ سال محدوده سنی: ۷۵-۳۰) به سرطان معده استفاده شده است. RNA کل از رده سلولی سرطان معده AGS استخراج و قطعات ژنی CEA و GAPDH توسط رونویسی معکوس سنتز شدند. قطعات تکثیر شده به‌طور جداگانه در داخل وکتور pTZ57R/T کلون شدند. سپس کلونینگ دوتایی این قطعات در داخل این وکتور صورت گرفت. از رقت‌های متوالی این پلاسمید برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. نمونه‌های PB و BM از افراد مبتلا به سرطان معده جمع‌آوری و بعد از سنتز cDNA بر روی آنها Real-Time PCR صورت گرفت. **یافته‌ها:** در این مطالعه، اندازه‌گیری کمی ژن‌های CEA و GAPDH با استفاده از Real-Time PCR با حساسیت بسیار بالا بهینه شد. mRNA CEA در ۲۳٪ نمونه‌های PB و ۲۰٪ نمونه‌های BM افراد مبتلا تشخیص داده شد ($p < 0.001$). در هیچ کدام از نمونه‌های مربوط به گروه کنترل mRNA CEA تشخیص داده نشد. **نتیجه‌گیری:** quantitative Real-Time PCR برای CEA می‌تواند به عنوان تکنیک مفیدی برای تشخیص میکرومتاستاز در نمونه‌های PB و BM افراد مبتلا به سرطان معده به‌کار رود.

کلمات کلیدی: سرطان معده، میکرومتاستاز، آنتی‌ژن کارسینوآمبریونیک، Real-Time PCR.

لیلا دردائی‌القلندیس^۱، رضا شاهسونی^۲
اردشیر قوام‌زاده^۲، مهرداد بهمنش^۱
الهام اصلانکوهی^۳، کامران علی‌مقدم^۲
سیدحمیداله غفاری^{۳*}

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه

تربیت مدرس

۲- مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند

مغز استخوان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- گروه سلولی مولکولی، دانشگاه خاتم

* نویسنده مسئول، تهران، مرکز تحقیقات هماتولوژی،

انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی،

کارگر شمالی

تلفن: ۸۴۹۰۲۶۶۵

email: shghaffari2000@yahoo.com

مقدمه

دنیاست^۴. میزان مرگ و میر ناشی از آن در جهان ۷۵۰۰۰ مورد در سال است.^۵ بر طبق مطالعات آماری مرگ و میر ناشی از سرطان معده حدود ۳۹٪ تمامی مرگ و میرهای ناشی از سرطان را در ایران تشکیل می‌دهد^۶ و سالانه از هر ۱۰۰۰۰ ایرانی ۲۵ نفر به سرطان معده مبتلا می‌شوند.^۷ هدف نهایی در درمان بیماران سرطانی از بین بردن تمامی سلول‌های توموری است و بنابراین تمامی راهکارهای درمانی در این راستا صورت می‌گیرد.^۸ در حال حاضر اقدام درمانی اولیه برای سرطان معده جراحی است، اما در بیشتر افراد بعد از عمل جراحی عود بیماری دیده می‌شود که در بیشتر موارد منجر به مرگ می‌شود.

تومورهای بدخیم بافت‌های اپی‌تلیالی معمول‌ترین نوع سرطان هستند که اکثریت مرگ و میر ناشی از سرطان را شامل می‌شوند.^۱ سرطان معده نیز یکی از سرطان‌های اپی‌تلیالی است که در دنیای امروز شایع است.^۲ آدنوکارسینوماها ۹۵٪ تومورهای بدخیم معده را شامل می‌شوند و ۵٪ بقیه را لنفوما، تومورهای استرومال و سایر تومورهای نادر تشکیل می‌دهند.^۳ اگرچه با بهبود روش‌های زندگی در طی دهه‌های اخیر شیوع سرطان معده کاهش یافته است اما هنوز هم سرطان معده دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سرتاسر

استفاده شد. از هر فرد هم برای گروه کنترل و هم برای گروه مورد مطالعه حدود ۷ml خون محیطی گرفته شد و برای جلوگیری از آلودگی با سلول‌های اپی‌تلیالی پوست حدود ۲ml اولیه دور ریخته شد. جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای از نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان. سلول‌های تک‌هسته‌ای از ۵ml نمونه خون محیطی و ۵ml نمونه مغز استخوان تیمار شده با EDTA بر روی گرایانت محلول فایکول جدا شدند. سلول‌ها سه بار با بافر نمکی فسفات (PBS) شستشو شد و برای جمع‌آوری رسوب سلولی جهت استخراج RNA سلول‌ها به مدت پنج دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. استخراج RNA و رونویسی معکوس (RT): RNA کل با استفاده از ماده RNX (شرکت سیناژن) طبق پروتوکل شرکت سازنده استخراج شد. یک میکروگرم از RNA با استفاده از آنزیم رونویسی معکوس M-MLV و پرایمر Random Hexamer (شرکت فرمتاز) به cDNA تبدیل شد. مخلوط واکنش RT به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد و ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انکوبه شد.

پرایمر و پروب: پرایمرهای مورد نیاز برای کلون کردن قطعات ژنی CEA و GAPDH توسط نرم‌افزار GENERUNNER طراحی شدند. پرایمرهای مورد نیاز برای کلون کردن قطعات CEA و GAPDH و همچنین پروب و پرایمرهای TaqMan لازم برای انجام Real-Time PCR ۱۰ و ۱۶ سنتز شدند. پروب‌های TaqMan مربوط به CEA و GAPDH در انتهای ۵' با ۶- کربوکسی فلورسین (FAM) به عنوان رنگ گزارش‌گر و در انتهای ۳' با ۶- کربوکسی تترامیتیل رودامین (TAMRA) به عنوان رنگ خاموش‌کننده نشان‌دار شدند.

ایجاد تکنیک Absolute quantitative Real-Time PCR

کلونینگ ژن‌های CEA و GAPDH: برای تکثیر قطعات ژنی مربوط به CEA و GAPDH از رده سلولی AGS که مربوط به سرطان معده است استفاده شد. رده سلولی AGS در محیط DMEM (GIBCO) به همراه ۱۰٪ سرم گاوی (FBS, GIBCO) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Sigma) کشت داده شد. سلول‌ها بعد از تیمار با تریپسین/EDTA از کف فلاسک جمع‌آوری شدند. RNA کل از رده سلولی AGS با استفاده از مواد و روش‌های ذکر شده استخراج شده و cDNA سنتز گردید. با کمک RT-PCR قطعات ۵۲۵ جفت بازی مربوط به CEA و ۵۳۵ جفت بازی مربوط به GAPDH تکثیر شدند. سپس هر کدام از این قطعات به صورت جداگانه توسط T/A کلونینگ در داخل وکتور

متاستاز پنهان در زمان جراحی یکی از دلایل عمده عود بیماری است. از آنجایی که انتشار سلول‌های توموری مرحله‌ای ضروری برای ایجاد متاستاز است^{۹،۱۰} بنابراین می‌توان گفت که در این نوع تومورها، مرگ و میر بالا به علت تومور اولیه نیست بلکه به علت میکرومتاستازهایی است که رخ داده و تظاهرات بالینی آن حتی ممکن است سال‌ها بعد از درمان اولیه بارز شود.^{۱۱} مطالعات سیتولوژیک نشان داده است که سلول‌های منتشر شده از تومورهای اپی‌تلیالی در خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا قابل تشخیص است، بنابراین تشخیص و اندازه‌گیری کمی سلول‌های توموری منتشر شده در نمونه‌های خون افراد مبتلا می‌تواند یک روش تشخیصی آسان و مناسب برای تعیین پیش‌آگهی و موثر بودن درمان محسوب شود.^{۱۲-۱۴} هدف ما در این بررسی استفاده از میزان کپی mRNA مربوط به CEA برای تشخیص و بررسی کمی سلول‌های توموری منتشر شده در خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا با استفاده از quantitative Real-Time PCR است. چسبندگی سلولی نقش دارد و به‌طور طبیعی در طی رشد و نمو جنینی تولید می‌شود، اما تولید آن بعد از تولد بسیار محدود شده و تنها در بافت اپی‌تلیالی دستگاه گوارش بیان می‌شود، بنابراین در خون افراد بزرگسال سالم وجود ندارد. بیان CEA مجدداً در افراد مبتلا به سرطان معده شدت یافته و دارای نقش مهم در پیشرفت سرطان معده است.^{۱۵} بنابراین ارزیابی میزان کپی mRNA مربوط به CEA در افراد مبتلا به سرطان معده می‌تواند علاوه بر مفید بودن نوع درمان، موثر بودن درمان انتخاب شده بعد از یک دوره درمانی را نشان دهد.

روش بررسی

بیماران در این مطالعه آینده‌نگر از نمونه خون محیطی و مغز استخوان ۳۵ فرد مبتلا به سرطان معده که برای اولین بار به بیمارستان دکتر شریعتی و امام‌خمینی تهران بین سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۵ مراجعه کرده بودند، قبل از عمل جراحی و با جلب توافق افراد مبتلا استفاده شد. نمونه‌های توموری بعد از عمل جراحی به صورت میکروسکوپی توسط پاتولوژیست کارآزموده مورد بررسی قرار گرفت و طبقه‌بندی شدند. ۳۰ نمونه خون محیطی و مغز استخوان از افراد بدون هر نوع سرطان اپی‌تلیالی (نسبت مرد به زن: ۱۸ به ۱۲ میانگین سنی: ۴۲ محدوده سنی ۳۳-۵۲) و با جلب توافق به عنوان کنترل در این مطالعه

شدن در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه می‌باشد. آنالیز آماری داده‌ها: جهت مقایسه تعداد کپی CEA mRNA در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم و همچنین بررسی میزان بیان این ژن در مرحله‌های (Stage) مختلف بیماری از تست Mann-Whitney و Kruskal Wallis نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۵ استفاده شد. مقادیر $p < 0/05$ معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

ایجاد Real-Time PCR برای ارزیابی کمی CEA mRNA: پلاسمید نوترکیب (pTZ57R/T) شامل ۵۲۵ جفت باز مربوط به CEA و ۵۳۵ جفت باز مربوط به GAPDH ساخته شد (شکل ۱). رقت‌های متوالی (۱۰۱-۱۰۶ نسخه پلاسمید در ۱۰ ماکرولیتر) از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T تهیه شده و مورد سنجش Real-Time PCR قرار گرفت. بر اساس Ct Values به دست آمده از انجام Real-Time PCR بر روی رقت‌های متوالی منحنی استاندارد رسم شد (شکل ۱). در راستای اندازه‌گیری تعداد نسخه CEA موجود در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده، در مرحله اول تعداد کپی CEA mRNA در نمونه‌های خون محیطی ۳۰ فرد سالم اندازه گرفته شد. حساسیت تکنیک بهینه شده می‌تواند تا پنج کپی از mRNA مربوط به CEA را در نمونه‌ها تشخیص دهد. تشخیص CEA mRNA در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم از ۳۵ نمونه خون محیطی (PB) افراد مبتلا، در هشت نمونه mRNA مربوط به CEA تشخیص داده شد و در نمونه‌های مغز استخوان (BM) این افراد در هفت نمونه mRNA مربوط به CEA تشخیص داده شد. در سه بیمار از ۳۵ بیمار هم نمونه مغز استخوان و هم نمونه خون محیطی مثبت است (جدول ۱). تعداد کپی CEA mRNA در نمونه‌های PB و BM بیماران بین ۳۰۰-۲۰۰۰ کپی بود که میانه آن در حدود ۲۰۰۰ کپی می‌باشد در هیچ یک از نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد کنترل mRNA مربوط به CEA تشخیص داده نشد ($p < 0/001$ و شکل ۲). در آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری در تعداد کپی CEA mRNA بین نمونه‌های PB و BM افراد بیمار دیده نشد ($p = 0/35$ شکل ۲). تشخیص CEA mRNA در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا در مرحله‌های (stages) مختلف بیماری. درصد نمونه‌های مثبت از نظر وجود کپی

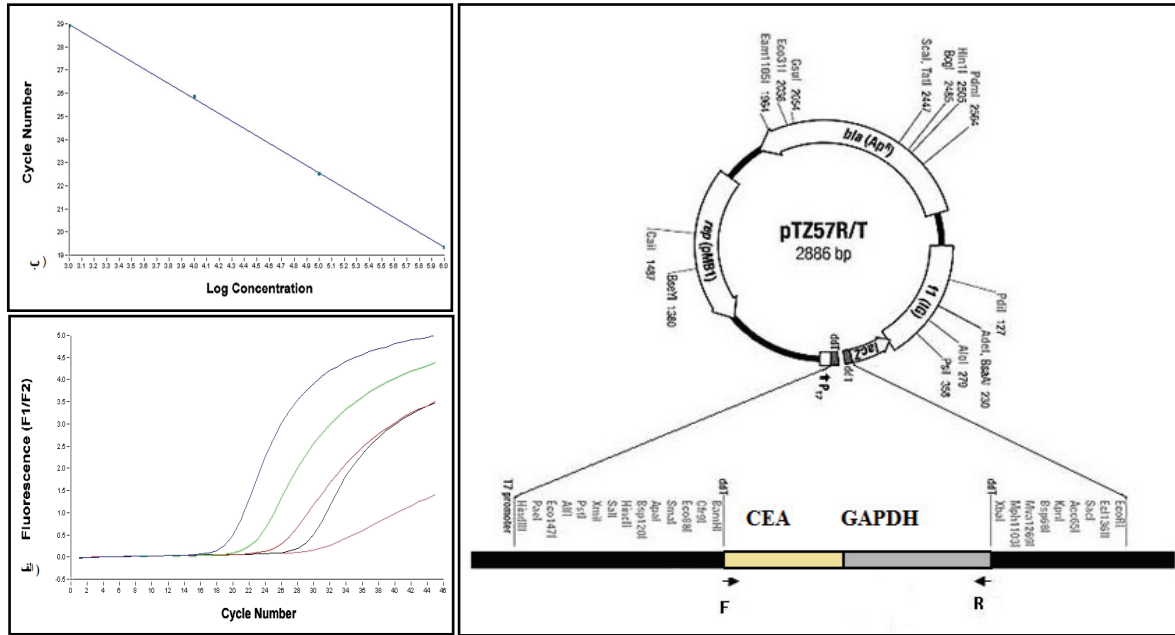
(Fermentas, InsT/Aclone TM PCR Product Cloning) pTZ57R/T کلون شدند. محصول به هم متصل شده به داخل سوش باکتری DH5α ترانسفورم شدند. در مرحله بعد هر کدام از قطعات کلون شده با هضم آنزیمی دوگانه آنزیم‌های محدودالانر KpnI و BamHI (فرمتاز) از وکتور خارج شده و با استفاده از آنزیم T4 Ligase (فرمتاز) به یکدیگر متصل شده و دوباره در داخل وکتور pTZ57R/T کلون شد (شکل ۱). در این مرحله نیز پلاسمید حاوی دو ژن به هم متصل شده به داخل سوش باکتری DH5α ترانسفورم شد. پس از غربال کردن باکتری نوترکیب و استخراج پلاسمید خالص، پلاسمید حاصل با استفاده از پرایمرهای عمومی M۱۳ تعیین توالی شد.

تهیه منحنی استاندارد: در مرحله پلاسمید حلقوی تعیین توالی شده، با برش آنزیمی آنزیم محدودالانر HindIII به صورت خطی درآمده و بعد از استخراج از روی ژل غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و سپس تعداد کپی مورد نظر محاسبه شد. رقت‌های متوالی (۱۰۷-۱۰) کپی ژن در هر واکنش) از این پلاسمید برای رسم منحنی استاندارد تهیه شد. منحنی استاندارد بر اساس Ct values به دست آمده از رقت‌های متوالی پلاسمید pTZ57R/T دارای قطعه CEA-GAPDH تهیه شد. Ct values حاصل از نمونه‌های بیماران بر روی منحنی استاندارد برده شده و تعداد نسخه مربوط به CEA و GAPDH در هر کدام از این نمونه‌ها به صورت اتوماتیک محاسبه شد. نمونه حاوی آب استریل به جای الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

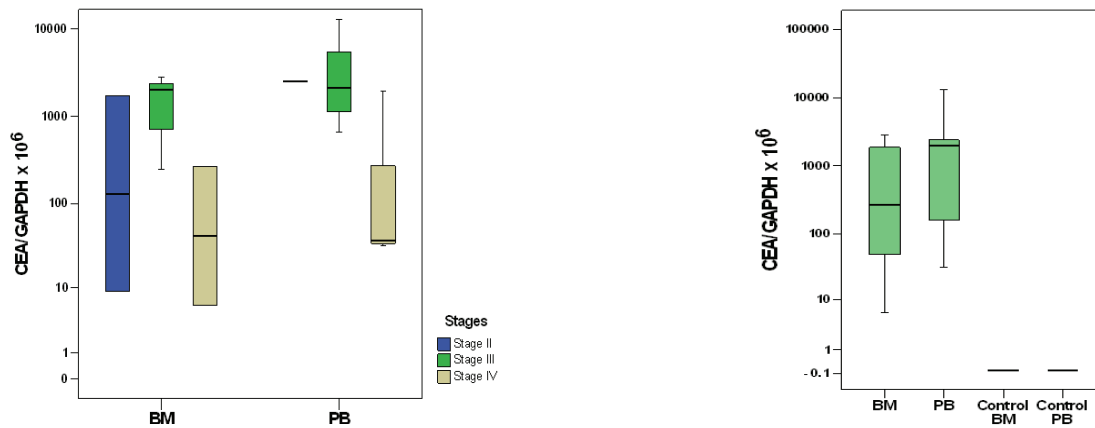
واکنش Quantitative Real-Time PCR (TaqMan): تمام واکنش‌های Real-Time PCR در دستگاه Roche LightCycler (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) انجام شد. هر واکنش ۲۰ ماکرولیتری شامل ۱X بافر آنزیم Taq DNA polymerase، ۵ میلی‌مولار منیزیم کلراید، ۲۵۰ میلی‌مولار dNTP mix، ۲۵۰ نانومول از هر پرایمر، ۲۰۰ نانومول پروب TaqMan، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۲ ماکرولیتر DNA به عنوان الگو می‌باشد. شرایط دمایی Real-Time PCR شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه جهت واسرشت شدن اولیه، ۴۵ سیکل هر کدام شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشت شدن، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه برای annealing، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه برای extension و در نهایت یک سیکل برای خنک

جدول- ۱: تعداد و درصد نمونه‌های مثبت از نظر وجود CEA mRNA در مرحله‌های مختلف بیماری

Stage IV	Stage III	Stage II	تعداد کل نمونه‌های مثبت	
۳(٪۳۸/۵)	۴(٪۲۰)	۱(٪۱۴/۳)	۸(٪۲۲/۸)	تعداد و درصد نمونه‌های مثبت برای CEA mRNA PB
۲(٪۲۵)	۳(٪۱۵)	۲(٪۲۸/۵)	۷(٪۲۰)	تعداد و درصد نمونه‌های مثبت برای CEA mRNA BM



شکل- ۱: ساخت پلاسمید نو ترکیب شامل قطعات ژنی CEA و GAPDH و استفاده از آن برای رسم منحنی استاندارد. الف) پروفایل تکثیر CEA توسط Real-Time PCR. رت‌های متوالی از پلاسمید نو ترکیب CEA-GAPDH به مدت ۴۵ سیکل تکثیر شدند. ب) منحنی استاندارد CEA که در آن مقادیر Ct در برابر تعداد نسخه‌های مختلف پلاسمید نو ترکیب CEA-GAPDH رسم شده است. ضریب تصحیح منحنی ۰/۰۲۷۲ و شیب آن ۳/۲- می‌باشد.



شکل- ۲: طیف و میانه تعداد کپی CEA mRNA در نمونه‌های BM و PB بیماران در مرحله‌های مختلف بیماری. محدوده باکس‌ها نشان‌دهنده حداقل و حداکثر تعداد کپی CEA (به ازای هر ۱۰^۶ کپی GAPDH) در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده در مرحله‌های مختلف بیماری است.

شکل- ۳: طیف و میانه تعداد کپی CEA mRNA در نمونه‌های BM و PB گروه بیماران و کنترل. در این نمودار محدوده باکس‌ها نشان‌دهنده حداقل و حداکثر تعداد کپی CEA (به ازای هر ۱۰^۶ کپی GAPDH) در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده و در افراد سالم است.

وجود mRNA این ژن در نمونه‌های افراد سالم با تکنیک Real-Time PCR بررسی شد. در هیچ یک از نمونه‌های گروه کنترل CEA mRNA تشخیص داده نشد که این بیانگر اختصاصیت بالای CEA برای تشخیص سلول‌های توموری منتشر شده می‌باشد. این یافته با نتیجه مطالعه Ikeguchi^{۱۱} مطابقت دارد. یافته‌های این مطالعه اختلاف معنی‌داری ($p < 0/001$) را از نظر تعداد کپی mRNA ژن CEA در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان بین افراد کنترل و افراد مبتلا به سرطان معده نشان داد. این یافته با نتایجی که حاصل از مطالعه Dong^{۱۸} و Flatmark^{۱۹} بر روی سرطان کلورکتال است، مشابهت دارد. این موضوع بیانگر اختصاصیت و حساسیت بسیار بالای ژن CEA به عنوان تومور مارکر قابل استفاده جهت تشخیص میکرومتاستاز در خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده می‌باشد. در این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین در صد نمونه‌های مثبت در خون محیطی و مغز استخوان با مرحله بیماری دیده نشد این یافته با نتایجی که حاصل از چندین مطالعه مختلف بر روی سرطان کلورکتال و پستان است، مشابهت دارد.^{۱۸،۱۹} بنابراین تکنیک بهینه شده ما در این مطالعه قادر است که نه تنها سلول‌های سرطانی منتشر شده را در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص دهد بلکه همچنین می‌توان این سلول‌ها را در مراحل اولیه بیماری تشخیص داد که این امر به غربالگری افرادی که در مراحل اولیه بیماری هستند اما در معرض بروز متاستاز قرار دارند کمک می‌کند. مطالعه ما نشان داد که بین نمونه‌های خون و مغز استخوان افراد بیمار از نظر تعداد کپی mRNA ژن CEA اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. درصد نمونه‌های مثبت برای CEA در خون محیطی ۲۳٪، در مغز استخوان ۲۰٪ و تنها در ۸/۷٪ از بیماران هر دو نمونه از نظر وجود CEA مثبت بوده است. اما در مطالعه Berois^{۲۰} که یکی از معدود مطالعاتی است که به بررسی میکرومتاستاز هم بر روی خون و هم مغز استخوان در سرطان پستان پرداخته است، درصد نمونه‌های مثبت برای CEA در خون محیطی سه درصد، در مغز استخوان ۱۳٪ بوده و در کل نمونه‌های مثبت در ۱۵ درصد از بیماران هر دو نمونه از نظر وجود CEA مثبت بوده است. در این مطالعه از بین هفت نمونه BM مثبت برای CEA mRNA، سه نمونه در PB نیز مثبت بودند. اگرچه مطالعات متعددی با تکنیک‌های مختلف برای تشخیص میکرومتاستاز در سرطان‌های اپی‌تلیالی در نمونه خون یا مغز استخوان صورت گرفته است. اما تاکنون مطالعه‌ای

CEA mRNA در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا در مرحله‌های مختلف بیماری به طور کلی در جدول ۱ خلاصه شده است. میانه تعداد کپی در نمونه‌های PB در مرحله‌های II, III, IV بیماری به ترتیب برابر ۳۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰ در نمونه‌های BM به ترتیب برابر ۲۰۰، ۳۰۰۰ و ۵۰ کپی می‌باشد. در آنالیز آماری، تست ارتباط معنی‌داری را در میزان کپی CEA mRNA در نمونه‌های مغز استخوان خون محیطی بیماران در مرحله‌های مختلف بیماری نشان داد (به ترتیب $p = 0/331$ و $p = 0/319$ شکل ۳).

بحث

Real-Time RT-PCR تکنیک تشخیص کمی RNA و DNA می‌باشد که تلفیقی از PCR با کارایی بالا، اختصاصیت پروب DNA و حساسیت بالای آنالیز می‌باشد. با استفاده از منحنی استاندارد برای ژن مورد نظر می‌توان تعداد نسخه آن را در هر نمونه‌ای به دست آورد. عدم نیاز به روش‌های آنالیز پس از تکثیر (post PCR analysis) نظیر ژل الکتروفورز برای آنالیز محصول از مزایای مهم Real-Time PCR محسوب می‌شود که این امر احتمال آلودگی و ایجاد نتایج مثبت کاذب را کاهش می‌دهد. هدف این مطالعه ایجاد و بهینه‌کردن تکنیک Quantitative Real-Time PCR بر اساس پروب TaqMan برای سنجش میزان کپی CEA mRNA در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده می‌باشد. حساسیت تکنیک بهینه شده در این مطالعه تست ستاپ شده قادر است تا در هر میکروتیوب پنج نسخه از CEA mRNA را در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده تشخیص دهد. نشان داده شده است که تشخیص CEA mRNA در نمونه خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان‌های اپی‌تلیالی می‌تواند به عنوان یک مارکر اولیه جهت پیش‌بینی عود یا متاستاز در این بیماران محسوب شود.^{۱۰،۱۳} علاوه بر تشخیص حضور یا عدم حضور سلول‌های توموری منتشر شده در خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان‌های اپی‌تلیالی، به نظر می‌رسد که تعداد سلول‌ها منتشر شده نیز از نظر کلینیکی دارای اهمیت می‌باشد. Cote نشان داد که تعداد سلول‌های توموری منتشر شده در مغز استخوان با میزان عود در افراد مبتلا به سرطان پستان ارتباط دارد.^{۱۶،۱۷} برای تعیین اختصاصیت ژن CEA جهت بررسی CEA در نمونه‌های خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده،

می‌تواند یک مارکر مولکولی مناسب جهت بررسی حضور سلول‌های در خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده به منظور تشخیص اولیه گسترش سلول‌های بدخیم از تومور اولیه محسوب شود. اما از آنجایی که سلول‌های توموری از نظر آنتی‌ژنی هتروژن می‌باشند، لذا به نظر می‌رسد که استفاده از چندین مارکر به‌طور همزمان جهت بررسی میکرومتاستاز می‌تواند ضریب اطمینان به نتایج حاصل و استفاده از آنها را در کلینیک افزایش دهد.

مبتنی بر تکنیک TaqMan Quantitative Real-Time PCR برای تشخیص میکرومتاستاز به‌طور همزمان در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان معده صورت گرفته است. از اینرو برای درک ارتباط بین سلول‌های توموری منتشر شده در خون و مغز استخوان و بررسی پتانسیل متاستاتیک آنها نیاز به مطالعات مولکولی گسترده و همچنین استفاده از نمونه‌های بیشتر و مخصوصاً پی‌گیری دراز مدت بیماران وجود دارد. در کل، مطالعه ما نشان داد که CEA

References

- Pantel K, Riethmüller G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;213(Pt 3):1-18.
- Wu CW, Chi CW, Lin WC. Gastric cancer: prognostic and diagnostic advances. *Expert Rev Mol Med* 2002;4(6):1-12.
- Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RCJ, Gansler TS, Holland JF, Frei EJ, editors. *Cancer Medicine*. Canada, Hamilton: BC Decker Inc; 2003.
- Khan J, Wei JS, Ringnér M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001;7(6):673-9.
- Kim JM, Sohn HY, Yoon SY, Oh JH, Yang JO, Kim JH, et al. Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(2 Pt 1):473-82.
- Yaghoobi M, Rakhshani N, Sadr F, Bijarchi R, Joshaghani Y, Mohammadkhani A, et al. Hereditary risk factors for the development of gastric cancer in younger patients. *BMC Gastroenterol* 2004;4:28.
- Yazdanbod A, Arshi S, Derakhshan M, Sadjadi A, Malekzadeh R. Gastric cardia cancer; the most common type of upper gastrointestinal cancer in Ardabil, Iran: an endoscopy clinic experience. *Arch Iran Med* 2001;4(2):76-9.
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(8):4589-94.
- Kienle P, Koch M. Are "micrometastases" of the peritoneum equivalent to distant metastases? *Dig Surg* 2002;19(6):453-8.
- Ikeguchi M, Ohro S, Maeda Y, Fukuda K, Yamaguchi K, Shirai H, et al. Detection of cancer cells in the peripheral blood of gastric cancer patients. *Int J Mol Med* 2003;11(2):217-21.
- Janni W, Rack B, Lindemann K, Harbeck N. Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time? *Oncologist* 2005;10(7):480-92.
- Kienle P, Koch M. Minimal residual disease in gastrointestinal cancer. *Semin Surg Oncol* 2001;20(4):282-93.
- Müller P, Schlimok G. Bone marrow "micrometastases" of epithelial tumors: detection and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126(11):607-18.
- Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 1995;72(2):268-76.
- Ordoñez C, Sreaton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 2000;60(13):3419-24.
- Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991;9(10):1749-56.
- Alvero AB, Burtneess BA, Ercan AG, Sapi E. Improved method for the detection of cytokeratin 19-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients. *Lab Invest* 2004;84(5):658-61.
- Xu D, Li XF, Zheng S, Jiang WZ. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA, CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;7(6):445-51.
- Flatmark K, Bjørnland K, Johannessen HO, Hegstad E, Rosales R, Hårklau L, et al. Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8(2):444-9.
- Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernández P, et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. *Eur J Cancer* 2000;36(6):717-23.

Development of a quantitative Real-Time PCR for micrometastasis detection using CEA in peripheral blood and bone marrow specimens of gastric cancer patients

Received: June 23, 2008 Accepted: January 26, 2009

Abstract

Dardaei Alghalandis L¹
Shahsavani R²
Ghavamzadeh A.²
Behmanesh M.¹
Aslankoochi E.³
Alimoghdam K.²
Ghaffari S. H.^{2*}

1- Department of Genetics, Faculty of Basic Science, Tarbiat Modares University

2- Hematology, Oncology and BMT Research Center, Tehran University Medical Sciences

3- Cellular and molecular department, Khatam University

Background: Gastric adenocarcinoma is the first leading fatal malignancy in Iran. Despite advances in novel therapeutics approaches for gastric cancer (GC) patient, tumor dissemination via blood stream to distant organ is still the major cause of death. Therefore, there is urgent need to establish sensitive methods for early detection of disseminated tumor cells in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) specimens of gastric cancer patients.

Methods: In the present study, we use Carcinoma Embryonic Antigen (CEA) as a tumor marker and Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) as an internal control to detection and quantification of disseminated tumor cells in PB and BM specimens of affected individuals. Total RNA was extracted from AGS (gastric cancer) cell line and CEA and GAPDH fragments were generated by reverse transcription. The amplified fragments were cloned into pTZ57R/T vector separately. Double cloning of these genes has done into one pTZ57R/T vector. Serial dilution of this recombinant plasmid is used to construct standard curve, each containing a known amount of input copy number. Total RNA was extracted from BP and BM specimens of 35 GC patients. cDNA of the specimens were synthesized by reverse transcription and subjected to Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR).

Results: We developed a highly sensitive and specific quantitative PCR for CEA and GAPDH using Real-Time PCR based on TaqMan technology. CEA mRNA was detected in 23% of PB and 20% of BM specimens. There was no CEA mRNA detecting in control group.

Conclusions: The QRT-PCR for CEA can be a useful technique for detection of micrometastases in the PB and BM specimens of gastric cancer patients.

Keywords: Carcino embryonic antigen, gastric, adenocarcinoma, metastasis, PCR.

*Corresponding author: Hematology, Oncology and BMT Research Center, Tehran University Medical Sciences, Shariati Hospital, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-84902665
email: shghaffari2000@yahoo.com