

ارتباط بیان ژن اوکلودین با مشخصات بالینی و مورفولوژیک سرطان پستان

چکیده

فاطمه گنج زاده^۱
رضا شیرکوهی^{۲*}

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.
۲- گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰

زمینه و هدف: سرطان پستان، دومین سرطان شایع پس از ریه در جهان می‌باشد. همچنین این بیماری پنجمین علت شایع مرگ در اثر سرطان است. سرطان پستان، رشد مهارنشده‌ی سلول‌های غیرطبیعی است که در نواحی مختلف پستان ایجاد می‌شود. ۹۰٪ از سرطان‌ها بر اثر متاستاز رخ می‌دهند و غلبه بر پیوستگی‌های سلولی بدن از جمله پیوستگی‌های محکم یکی از راه‌های ایجاد متاستاز می‌باشد. اوکلودین (Occludin) یک پروتئین سرتاسری غشایی می‌باشد که در محل اتصالات محکم وجود دارد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی میزان بیان اوکلودین در سرطان پستان انسان بود.

روش بررسی: در این پژوهش نمونه‌های تومور ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان مراجعه‌کننده به انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) و ذخیره‌شده در بانک تومور ایران از ابتدای فروردین ۱۳۹۲ به مدت یک‌ماه، پس از دریافت رضایت‌نامه اخلاقی، مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا استخراج RNA کمی صورت گرفت و سپس با استفاده از رونویسی معکوس و (PCR) Polymerase chain reaction معمولی و Real-time PCR بیان ژن اوکلودین در این بیماران مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان ژن اوکلودین در بیماران با مرحله بالاتر بیماری نسبت به حالت کنترل بالاتر رفته بود و این افزایش به صورت معنادار به خصوص میان دو مرحله بالایی و پایینی قابل مشاهده بود.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن اوکلودین را می‌توان به‌عنوان یکی از فاکتورهای تاثیرگذار در روند تبدیل بافت سالم به سمت سرطانی شدن دانست.

کلمات کلیدی: نوپلازی پستان، اوکلودین، بیان ژن، یافته‌های مورفولوژیکی و میکروسکوپی، واکنش کمی زنجیره‌ای پلیمرز، مرحله‌بندی نوپلاسمی.

* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، انستیتو کانسر، مرکز تحقیقات سرطان
تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۱۴۵۴۵
E-mail: rshirkoohi@tums.ac.ir

مقدمه

توجهی در ایالات متحده افزایش یافته که به‌طور تقریبی از هر هشت زن، یک نفر مبتلا می‌گردد. میزان مرگ‌ومیر در سال‌های ۱۹۹۷-۱۹۹۳ کاهش یافته است که به‌علت موفقیت در تشخیص و درمان زودرس بوده است.^۱

بیشتر پستان از بافت چربی تشکیل شده است که شامل ۱۵ تا ۲۰ بخش می‌باشد که به‌اصطلاح لوب نامیده می‌شود و هر کدام از این

سرطان پستان شایعترین بدخیمی در زنان در سراسر دنیا و شایعترین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان ۵۰-۴۰ سال است.^۱ و سرطان پستان دومین علت مرگ ناشی از سرطان پس از سرطان ریه می‌باشد.^۳ طی ۵۰ سال گذشته میزان بروز سرطان پستان به‌طور قابل

پیوستگی، فضای بین سلولی مسدود است، بنابراین غشاهای دو سلول مجاور به هم می‌چسبند و به‌طور تقریبی هیچ فضای بین سلولی باقی نمی‌ماند. مهمترین پروتئین‌های آن کلادین و اوکلودین می‌باشد. اوکلودین یک پروتئین غشایی ایتگرال می‌باشد که در محل اتصالات محکم واقع شده است. روشن است که غلبه بر آن برای ایجاد متاستاز در سلول‌های سرطانی بسیار با اهمیت است.^۵ با توجه به اینکه فراوانی سرطان پستان رو به افزایش است و همچنین در مرحله انتهایی بدخیمی تومورها، مهاجرت سلولی و متاستاز رخ می‌دهد و مولکول‌های چسبنده و اتصالات سلولی نقش مهمی در چسبندگی و مهاجرت بازی می‌کنند، بنابراین هدف این پژوهش بررسی بیان ژن اوکلودین در بیماران مبتلا به سرطان پستان بود.

روش بررسی

در یک مطالعه مقطعی که از ابتدای فروردین ۱۳۹۲ به مدت یک‌ماه بر روی بیماران مراجعه‌کننده به انستیتو کانسر بیمارستان امام‌خمينی (ره) تهران انجام شد، ۳۰ نمونه به‌صورت تصادفی و بدون در نظر گرفتن مرحله سرطان پستان بیماران، از بانک دریافت گردید. تمامی نمونه‌ها از پیش توسط یک پاتولوژیست بررسی و تایید شده بودند. برای بررسی مرحله بیماران از روش انتقال اپی‌تلیال مزانشیمی (TNM) استفاده گردید که T نشان‌دهنده اندازه تومور، N بیانگر درگیری غدد لنفاوی و M نشان‌دهنده متاستاز می‌باشد.

RNA از بافت تومورال بیماران با استفاده از easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit (Intron Bio-Technologies, Seoul, Korea) استخراج و پس از تایید کیفیت آن با NanoDrop™ Spectrophotometer (2000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) با استفاده از پرایمر Random Hexamer, (Thermo Fisher, Wilmington, USA) از cDNA تهیه گردید.

بخش‌ها خود به قسمت‌های کوچک‌تری تقسیم می‌شوند که لوبول نامیده می‌گردند. لوب‌ها و لوبول‌های پستان توسط مجاری شیری با یکدیگر در ارتباط می‌باشند. ۹۰٪ از مرگ بیماران مبتلا به سرطان پستان به علت وقوع متاستاز می‌باشد.^۶ متاستاز فرایندی چندمرحله‌ای است که در آن سلول‌های سرطانی از جایگاه ابتدایی تومور رها شده و شروع به ایجاد تومورهای ثانویه در بافت‌های دورتر می‌کنند. این فرایند شوم مسئول مرگ بیش از ۳۲٪ افراد مبتلا به سرطان است. گمان می‌رود که فرایند متاستاز در انتهای رشد یک تومور اتفاق می‌افتد. نتایج پژوهش‌های اخیر نشان داده است که تومورهای اولیه نیز توانایی رهاسازی تعداد زیادی از سلول‌های سرطانی به داخل جریان خون و یا لنف را دارد و بنابراین متاستاز می‌تواند در مراحل اولیه نیز پدیدار شود.^۶

انتقال اپی‌تلیال یا مزانشیمال رویدادی است که در مراحل مختلفی اتفاق می‌افتد: نوع اول همان فرایندی است که در جنین موجب جایگزینی، جنین‌زایی و تکوین اعضا می‌گردد. نوع دوم در بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده و همچنین فیروز اعضا صورت می‌گیرد و نوع سوم در گسترش سرطان و متاستاز صورت می‌گیرد.^۷ همان‌طور که گفته شد ایجاد متاستاز نتیجه تغییرات زیادی در سیستم مولکولی بدن و تومور می‌باشد که یکی از این موارد ایجاد حالت انتقال اپی‌تلیال یا مزانشیمال است که در آن سلول‌های اپی‌تلیال به سلول‌های مزانشیمال که دارای قدرت تحرک زیادی می‌باشند، تبدیل می‌شوند. فاکتورهای مولکولی و سیگنال‌های سلولی زیادی در ایجاد آن نقش دارند که یکی از مهمترین عوامل از بین رفتن چسبندگی سلول و اتصالات سلولی می‌باشد. پیوستگی‌های سلولی را به سه نوع عمده تقسیم می‌کنند:

محکم، چسبنده و شکاف‌دار. پیوستگی‌های محکم مهم‌ترین نوع هستند که به اتصال مسدود معروفند و بیشتر در سلول‌های پوششی در اولین اتصال غشای سلولی از رأس سلول وجود دارد. در این نوع

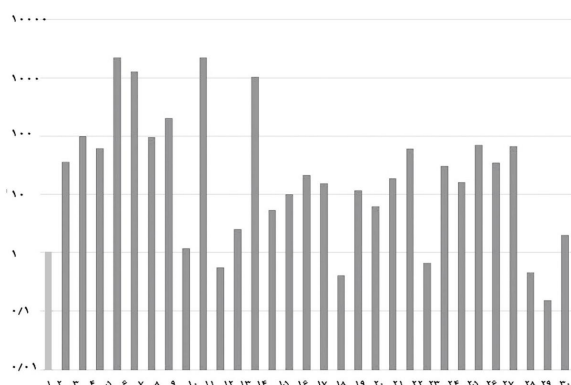
جدول ۱: توالی پرایمرهای OCLN (اکلودین) و GAPDH (کنترل House Keeping)

ژن	پرایمر آغازگر	پرایمر معکوس
OCLN	5'-TCCAATGGCAAAGTGAATGA-3'	5'GCAGGTGCTCTTTTGAAGG-3'
GAPDH	5'-TCACCAGGGCTGCTTTTAAC-3'	5'-GACAAGCTCCCGTTCTCAG-3'

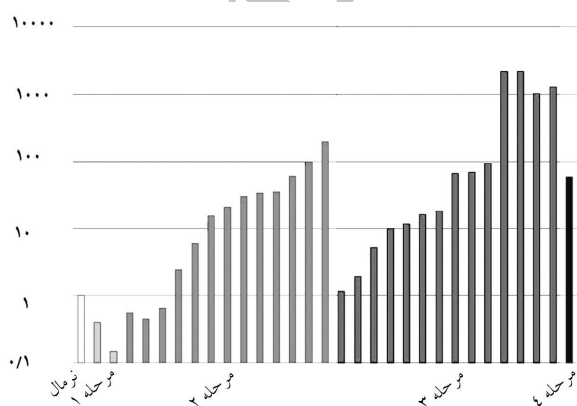
یافته‌ها

مطالعات دموگرافیک، میانگین سنی بیماران را ۴۸/۷ مشخص نمود (بیشترین و کمترین به ترتیب ۷۱ و ۳۱ سال). همگی بیماران جنسیت زن داشتند. داده‌های دموگرافیک بیماران و مشخصات بالینی، پاتولوژی و اندازه تومور در جدول ۳ مشخص گردیده است. در ارزیابی نتایج همان‌گونه که در نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده گردید، میان مرحله بیماری و بیان ژن‌های اوکلودین ارتباط معنادار مشخص وجود داشت، بدین‌صورت که بیان این ژن در بیمارانی که مرحله بیشتری داشتند بالاتر بود.

میزان تغییرات بیان ژن اوکلودین در هر بیمار و ارتباط آن با مرحله



نمودار ۱: تغییرات بیان ژن اوکلودین



نمودار ۲: تغییرات بیان ژن اوکلودین برحسب مرحله بیماران

سپس روی cDNA سنتز شده جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژن با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱) و استفاده از برنامه تنظیم شده (جدول ۲)، Real Time polymerase chain reaction (RT-PCR) (Rotor- Gene Q real-time PCR cycler, QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) صورت گرفت (بیان ژن اوکلودین با استفاده از روش PCR کمی انجام گردید). برای بررسی میزان تغییر در بیان ژن و مقایسه آن در میان بیماران از Relative expression software tool (REST, QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) استفاده گردید و در نهایت با محاسبه $\Delta\Delta CT$ و ΔCT نتایج آماری پژوهش به دست آمد. با استفاده از آزمون آماری Student's t-test مقادیر P value اندازه‌گیری و نتایج $P < 0.05$ به صورت معنادار گزارش شد. از نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

جدول ۲: سیکل‌ها و دمای مورد استفاده در Real Time PCR

مرحله	درجه	مدت
شروع	۹۵	۱۰ دقیقه
۴۰ سیکل	۹۵	۱۰ ثانیه
	۵۶	۱۵ ثانیه
	۷۲	۲۰ ثانیه
انتهاپی	۵۸	۹۰ ثانیه

جدول ۳: مشخصات بیماران

مشخصات	تعداد (%)
سن بیمار	
< ۴۰	۹ (۳۰)
≥ ۴۰	۲۱ (۷۰)
اندازه تومور	
< ۳ cm	۱۱ (۳۶/۶)
≥ ۳ cm	۱۹ (۶۳/۴)
مرحله بالینی	
۱	۲ (۶/۷)
۲	۱۳ (۴۰)
۳	۱۴ (۵۰)
۴	۱ (۳/۷)

در پژوهش ما تغییر در بیان ژن اوکلودین به صورت افزایش بیان مشاهده شد. مطالعات مشابهی بر روی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال پیرامون ژن هم خانواده آن (کلاودین) انجام شده است که بیانگر ارتباط میان کاهش بیان در مرحله بالینی دو بوده است، در صورتی که در مورد اوکلودین چنین چیزی مشاهده نشده و حتی در مواردی نیز بیان بالاتر بوده است.^{۱۴} در مورد این پروتیین مطالعات بیانگر اثر متفاوت بیان زیرگروه‌های آن در انواع مختلف سرطان‌ها می‌باشد.

برای مثال نوع سه و چهار کلادین در تومورهای تخمدان و در درجه بالای سرطان پستان افزایش بیان دارد.^{۱۶،۱۵} در حالی که در مبتلایان سرطان معده مطالعات نشان‌دهنده نتایج وارونه بود.^{۱۷} مجموعه این نتایج بیانگر این است که بیان انواع ژن‌های اتصالات سلولی در انواع سرطان‌ها متفاوت می‌باشد و این یافته‌ها نشان‌دهنده اهمیت تغییر بیان در رابطه با پیش‌آگهی احتمالی می‌باشد. افزایش بیان ژن اوکلودین را شاید بتوان به عنوان یکی از فاکتورهای تاثیرگذار، در دگرگونی بافت به سمت سرطانی شدن بدانیم.

در این فرضیه، ما این مورد را مدنظر گرفتیم که عواملی که باعث برهم زدن نظم سلول و متاستاز می‌شوند، می‌تواند در مکانیسم‌های ایجاد بیماری‌ها از جمله سرطان نیز با افزایش و یا کاهش فعالیت خود نقش داشته باشند. ژن‌های دخیل در پیوستگی‌های سلولی از جمله ژن اوکلودین نیز یکی از این فاکتورها است که در پژوهش ما نیز میزان بیان آن افزایش پیدا کرده است.

برخی از مطالعات، همسو با پژوهش ما نبود که علت آنرا می‌توان به فاکتورهای مداخله‌گر دیگری به جز ژن اوکلودین در پیوستگی سلولی نسبت داد. دیگر اینکه بافت تومور یک بافت هتروژن است. با توجه با اینکه افزایش بیان را در بیشتر بیماران شاهد هستیم، شاید بتوانیم این ژن را به عنوان یکی از عوامل در بدخیمی تومور بدانیم و با بررسی بیشتر در طیف گسترده‌تری از بیماران و فهم مکانیسم‌های درگیر اقدام به تهیه پروفایل ژنی نماییم که ژن اوکلودین می‌تواند نقشی را در این بین بازی کند.^{۱۹،۱۸} به طور کلی بیان اوکلودین بیماران با مرحله بالینی بالاتر، نسبت به حالت کنترل افزایش یافته است که با توجه به نتایج پژوهش حاضر، بررسی با حجم نمونه بالاتری از بیماران پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی ارتباط میان بیان ژن اوکلودین و مشخصات بالینی و

بیماری (نمودار ۱) مورد بررسی قرار گرفت بر اساس آن، در ۲۲ بیمار، بیان این ژن نسبت به مورد کنترل که مربوط به بافت پستان فرد سالم بود، عدد بالاتری را نشان داد. سه مورد از آنها بیانی مشابه بافت نرمال نشان دادند، در صورتی که پنج مورد از آنها بیانی کمتر از بافت نرمال نشان دادند. این بررسی بدون در نظر گرفتن مرحله بیماران انجام گردید و تنها جهت برآورد کلی میانگین بیان ژن اوکلودین انجام گردید. بر اساس نمودار ۲، ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان، مرحله بالینی متفاوتی داشتند که از بین آنها، دو مورد در مرحله یک قرار داشتند که بیان کمتر از نرمال را از خود نشان دادند. همچنین ۱۳ بیمار در مرحله دو قرار داشتند که از میان آنان سه مورد بیان کمتر و ۱۰ مورد بیان بیشتر از بافت نرمال داشتند.

از میان ۱۴ بیمار در مرحله سه، یک مورد بیان مشابه بافت نرمال و ۱۳ مورد بیان بالاتری از بافت نرمال داشتند. تنها یک مورد از بیماران در مرحله چهار قرار داشت و بیانی بالاتر از بافت نرمال را نشان می‌داد. به طور کلی بررسی آماری با آزمون Student's t-test بیانگر تفاوت معنادار بین مرحله‌ها بوده است ($P=0/0288$). در حالی که این تفاوت میان مرحله یک و دو معنادار نبود ($P=0/0563$). تفاوت میان دو مرحله بالینی پایینی (یک و دو) و بالایی (سه و چهار) معنادار بود ($P=0/0453$).

بحث

مولکول‌های چسبنده و پیوستگی‌های سلولی نقش مهمی در چسبندگی و مهاجرت سلول‌ها در سرطان ایفا می‌کنند.^{۱۰،۹} پیوستگی‌های محکم، پیوستگی‌های بین سلولی سختی هستند که یک ساختار مولکولی پیچیده‌ای را نشان می‌دهند که شامل پروتیین‌های آداتور (مانند Zonula occludens, ZO) و پروتیین‌های پیونددهنده غشای اینترگرال (مانند اوکلودین و کلادین) می‌باشد. محل این اتصالات در سمت داخل غشای پلاسمایی سلول می‌باشد. دو نوع از مهمترین این اتصالات کلادین و اوکلودین می‌باشند.^{۱۱} پروتیین اوکلودین به وسیله ژن آن کد شده که وزن آن ۶۵ کیلو دالتون است و پروتیین سرتاسری غشای پلاسمایی واقع در پیوستگی محکم می‌باشد. پژوهش‌ها نشان داده است که در طی انتقال اپی‌تلیال به مزانشیمی، بیان هر دو ژن تغییر می‌کند.^{۱۲،۱۳}

۲۰۵۶۷-۵۱-۰۴-۹۱ می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

مورفولوژیک بیماران مبتلا به سرطان پستان " مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۱۳۹۲ به کد

References

1. Klauber-DeMore N. Tumor biology of breast cancer in young women. *Breast Dis* 2005-2006;23:9-15.
2. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer. *N Engl J Med* 1992;327(5):319-28.
3. Babu GR, Lakshmi SB, Thiagarajan JA. Epidemiological correlates of breast cancer in South India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(9):5077-83.
4. Adaniel C, Kirchoff T. Introduction to epidemiology of breast and ovarian cancers. *Ann Oncol* 2013;24 Suppl 8:viii61-viii62.
5. From the Centers for Disease Control and Prevention. Breast cancer incidence and mortality: United States, 1992. *JAMA* 1996;276(16):1293-4.
6. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006;127(4):679-95.
7. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112(12):1776-84.
8. Van Itallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J Cell Sci* 1997;110 (Pt 9):1113-21.
9. Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res* 2011;13(3):211.
10. Mimeault M, Batra SK. Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. *Ann Oncol* 2007;18(10):1605-19.
11. Denker BM, Nigam SK. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 2):F1-9.
12. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 1997;137(6):1393-401.
13. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003;22(13):2021-33.
14. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005;18(4):511-8.
15. Morin PJ. Claudin proteins in ovarian cancer. *Dis Markers* 2007;23(5-6):453-7.
16. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer* 2009;124(9):2088-97.
17. Ohtani S, Terashima M, Satoh J, Soeta N, Saze Z, Kashimura S, et al. Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival. *Gastric Cancer* 2009;12(1):43-51.
18. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006;56(1):37-47; quiz 50-1.
19. Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol* 2012;3(2):117-36.

Association between occludin gene expression and clinical morphological characteristics in breast cancer

Fatemeh Ganjzadeh M.Sc.¹
Reza Shirkoohi M.D., Ph.D.^{2*}

1- Department of Genetics, Guilan University, Guilan, Iran.

2- Department of Genetics, Cancer Research Center, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Genetics, Imam Khomeini Hospital Complex, Cancer Institute of Iran, Cancer Research Center, Keshavarz Blvd. Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66914545
E-mail: rshirkoohi@tums.ac.ir

Abstract

Received: 26 Jul. 2014 Accepted: 19 Jan. 2015 Available online: 11 Mar. 2015

Background: Breast cancer is the second most common cancer in the world after lung cancer also is the fifth cause of cancer mortality. About 90 percent of cancer mortality is because of metastasis and devastating between cell attachments, especially tight cell junctions. Epithelial mesenchymal transition is a phenomena involved in metastasis and starts with cell detachment. Occludin is the integral membrane protein which is located in tight junctions. Obviously distressing tight junction, which facilitates the stages of metastasis in cancer cells are very critical step. The aim of this study was to demonstrate the importance of occludin expression and its relationship with invasiveness in human breast cancer.

Methods: In a cross sectional study we evaluated 30 patients who were referred to Cancer Institute of Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran, Iran, from March 2013 to April 2013. Samples were derived from fresh frozen tumor of patients suffering from breast cancer after inform consent assignment in the Tumor Bank of Iran (TBI). RNA was extracted from tumor tissue followed by reverse transcription, polymerase chain reaction (PCR), conventional Real-time PCR and data analysis for the occludin gene expression. Data were analyzed based on clinical staging of breast cancer patients which were cited in data bank of TBI.

Results: Results of this study have demonstrated that the occludin gene expression was increased with the advanced stage. In 22 of patients the expression of gene was elevated compared with normal samples. On the other hand, the expression was significantly increased in stage II in comparison with stage I.

Conclusion: The expression of occludin has increased by elevation of stage compared with normal tissue. It is suggested that alteration in the expression of this gene might be a possible factor which could affect on patient's prognosis the same as other factors which are belonging to the same family. Increasing in expression of this gene might be considered as one of the possible markers which predict the possibility of invasion and metastasis.

Keywords: breast neoplasms, gene expression, morphological and microscopic findings, neoplasm staging, occludin, real-time polymerase chain reaction.