فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۱، جلد ۸، شماره ۴، پائیز۹۴، صفحه ۶۱ تا ۶۶

مطالعه‌ی مولکولی ژن‌های مشترک در تکامل سلولی و سرطان بر روی بافت بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

شیرین مرادی فرد [۱]، **شهلا محمد گنجی** [۲]، زرین مینوچهر [۲]
۱-کارشناسی ارشد زیست سلولی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران. ایران.
۲-استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران. ایران.**shahlamg@yahoo.com**

تاریخ دریافت: ۹٤/۷/۲٤ تاریخ پذیرش:۹٤/۸/۲۵

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان در جهان است. ژن Axin شامل axin1 و axin2 می باشد. C-myc و دیگر ژن‌های این خانواده فاکتورهای رونویسی را کد می کنند که نقش حیاتی را درتکثیر سلولی، رشد، تمایز و آپاپتوز بازی می نمایند. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی نیمه کمی بیان ژن‌هایAXIN1 و CMYCدر mRNA بافت بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال و ارتباط خاموش یا روشن بودن این ژن‌ها در هر یک از مراحل توموری با فاکتورهای پاتولوژیک بیماران است.

روش کار: بدین منظور بررسی‌ها بر روی ٥٤ نمونه‌ی توموری و ٤١ نمونه‌ی نرمال(بافت سالم کنارناحیه توموری) از ٥٤ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهیه شد و آزمایش RT-PCR بر روی cDNA سنتز شده حاصل از mRNA بافت ها با پرایمرهای بتااکتین و ژن‌های AXIN1، CMYC انجام شد.

یافته ها: باتوجه به نتایج به دست آمده، بیان ژن AXIN1 در ٥٥٪ از نمونه‌ها روشن و در ٤٥٪ از نمونه‌ها خاموش بود و بیان ژن C-MYC در۸۷/۵٪ از نمونه‌ها روشن و در ۱۲/۵٪ از نمونه‌ها خاموش بود.آنالیزی آماری توسط نرم افزارSPSS و آزمون های، t-Test و X^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که نشان داد تفاوت معناداری میان بیان ژن‌های AXIN1 و C-MYC در دو گروه از نمونه‌های نرمال و تومور وجود دارد(P≤۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج حاصله نشان داد که بیان ژن‌های AXIN1 و C-MYC که همواره در تکامل سلولی نقش داشتند و بسیار موثر ظاهر می‌شدند در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال افزایش می‌یابد.

واژه های کلیدی: Axin1,CMYC، بیان ژن، سرطان کولورکتال،RT-PCR.

مقدمه

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان در جهان است. میزان شیوع سرطان کولورکتال در آسیا به سرعت رو به افزایش است. سالانه حدود ۱/۲ میلیون نفر به سرطان کولورکتال مبتلا می شوند و در هر سال، بیش از ۶۳۰۰۰۰ نفر در اثر این سرطان می میرند و حدود ۸ ٪ مرگ ومیر ناشی از سرطان را به خود اختصاص داده است(۷). *Myc*(*c-myc*) یک ژن تنظیمی است که فاکتورهای رونویسی را کد می نماید. C-MYC همواره نقش حیاتی را درتکثیر سلولی، رشد، تمایز و آپاپتوزیس بازی می کند. این ژن در طی تکامل و تکثیر سلولی همواره به صورت گسترده-ای بیان می شود(۲). C-MYC، در حالی که تکثیر و القای رشد سلول و رگ زایی را برعهده دارد، می‌تواند آپوپتوز را تحت شرایط خاصی و از طریق یک فرآیند به نام انکوژن ناشی از آپوپتوز القا نماید.یکی دیگر از عملکردهای مهم C-MYC به تنظیم چرخه‌ی سلولی می-توان اشاره کرد(۴). عملکرد آپوپتوزی C-MYC به توانایی آن برای القای پیشرفت چرخه سلولی مرتبط است.C-MYC، سلول‌ها را به آپاپتوز در طی چرخه‌ی

www.SID.ir

سلولی حساس می نماید و در نبود سیگنال‌های مناسب رشد و بقا، سلول‌ها را به سمت آپاپتوز سوق می‌دهد. البته بهتر است که این امر یک پدیده‌ی ایمن و مطمئن به سبب فعال شدن نابجایC-MYC در نظر گرفته شود(۵). C-MYC به طور بالقوه تنظیم حدود ۱۵٪ از تمام ژن‌ها را برعهده دارد و در اکثر سرطان ها مانند پستان، روده بزرگ، گردن رحم، سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه ، استئوبلاستوم و گلیوبلاستوما دچار افزایش بیان می-شود(۹). مدل جهش یافته ی این ژن نیز در بسیاری ازسرطان ها یافت می گردد. خانواده *myc*ها انکوژنی هستند. پروتوانکوژن *c-myc* به صورت یک کپی در ژنوم نرمال انسان قرار دارد و جایگاهش برروی کروموزوم شماره ی ۸ است(۱). *MYC* ها ازطریق مسیر سیگنالی(Wnt,Shh,EGF(ERK/MAPK فعال می‌شوند. بیان *myc* در رنج گسترده ای ازسرطان‌های انسانی deregulate شده و اغلب هم با تومورهای تهاجمی و با قدرت تمایز کم درارتباط می باشند. ژن *Axin* شامل axin1(که معمولاً axin گفته می شود) و axin2(که axil نامیده می شود)، می باشد(۱۲). ژن Axin1 از طریق پیرایش دو نوع مختلف را کد می‌کند که نوع ۲ کوچک تر است و اگزون ۹ در آن از دست رفته است. Axin1 یک پروتئین داربستی است که مسیرهای Wnt / بتا کاتنین، SAPK / JNK ، p53 و مسیرTGF بتا را تنظیم می‌کند(۱۰). Axin1 در جنین موش درهمه اندام ها بیان می شود، اما axin2 یک الگوی در مضیقه و محصور است، بدین معنا که axin1 به طور پیوسته اجزا کمپلکس تخریبی را در جهت حفاظت از پایین بودن فعالیت Wnt سیگنالینگ بیان می‌کند اما برخلاف آن axin2 در پاسخ به افزایش غلظت بتا کاتنین upregulate(تنظیم مثبت) می شود(۱۲). Axin در ابتدا با توجه به نقشی که در تکامل داشته شناسایی گردید(۱۳). تغییرات زیادی در هر دو ژن axin1 وaxin2 در تومورهای مختلفی از جمله سرطان CRC مشاهده شده است(۱۲). اما در این بررسی ژن AXIN1 مورد هدف می باشد. هدف از تحقیق حاضر نیز، تشخیص و شناسایی زود هنگام سرطان کولورکتال به کمک مقایسه بیان ژن های دخیل در مرحله ابتدایی این بیماری است.

مواد و روش ها

در این مطالعه ابتدا جامعه آماری مورد نظر و حجم نمونه با توجه به عواملی چون شیوع سرطان کولورکتال در ایران، مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین بر روی این ژن و نتایج حاصله با درنظر گرفتن خطاهای نوع اول و دوم، تعداد ۵۰ نمونه توموری و ۵۰ نمونه نرمال(نمونه سالم مجاور تومور) تعیین گردید. این تعداد نمونه از میان بیماران غیرخویشاوند مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی و تومور بانک ایران تهیه شد. همراه با نمونه های بافتی، اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلا به کولورکتال به دست آمد. به منظور رعایت قوانین اخلاق زیستی، قبل از نمونه گیری از تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضایت نامه ای گرفته شد و سپس بافت ها به صورت تازه و در شرایط ازت مایع به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل گردید. در ادامه، اطلاعات حاصل از بیماران و نمونه ها مورد بررسی دقیق قرار گرفت و تعدادی از نمونه ها که فاقد شرایط لازم بود، از ادامه مطالعه در این پروژه خارج شد. این شرایط عبارت بود از: نامشخص بودن محل اولیه سرطان، ابتلای بیمار به سایر سرطان ها علاوه بر کولورکتال، دقیق نبودن اطلاعات تاریخچه یا گزارشات پاتولوژی بیماران و نسبت فامیلی بین بیماران. مطابق دستور کار کیت استخراج RNA شرکت Intron، RNA تمامی نمونه های بافتی سرطانی و نرمال(بافت مجاور تومور) استخراج شد. سپس مطابق دستور کار کیت Fermentase، cDNA

Archive of SID

www.SID.ir

سنتز شد و در ادامه بیان ژن‌های Axin1 و C-MYC با آزمایش RT-PCR بررسی گردید. پرایمر طراحی شده اختصاصی برای ژن‌های Axin1 و C-MYC و ژن بتااکتین به عنوان استاندارد داخلی و ژن House keeping از مقاله منتشر شده توسط همین گروه تحقیقاتی استفاده شد. جهت آزمایش RT-PCR، مواد زیر در حجم ۱۰ µL به میکروتیوب اضافه و طبق دستورالعمل ۵ µL از Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red ، ۰/۵ µL پرایمراختصاصی Forward و ۰/۵µL پرایمر اختصاصی Reverse با غلظتM ۱۰µ، ۰/۵ µL ازنمونه‌ی الگو باغلظت همسان شده‌ی ۱۰۰۰ ng/ µL برای همه‌ی نمونه‌هاو در نهایت میکروتیوب ها در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰، annealing ۶۵ درجه سانتی گراد برای پرایمرهای اختصاصی بالا به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای هر دما و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در دستگاه ترموسیکلر مدل PeQLab, 96 universal gradient, UK thermal cycler قرار داده شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، مشاهده باند با طول ۱۵۳ bp و ۱۷۳ نشانه بیان ژن AXIN1 و C-MYC و عدم مشاهده باند در این ناحیه نشانه عدم بیان یا خاموش بودن ژن‌ها می‌باشد. ارتباط بین فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و بررسی نیمه کمی بیان ژن‌های AXIN1 وC-MYC در بافت این بیماران، بر اساس داده های حاصل از پرونده بیماران شامل اطلاعات دموگرافی، کلینیکی، پاتولوژی و نیز نتایج حاصل از کارهای آزمایشگاهی با کمک آنالیز آماری نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های، t-Test و X^2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. میزان P-Value با در نظر گرفتن P≤۰/۰۵محاسبه شد.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه در چند بخش قابل ارائه است:

الف- نتایج تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات دموگرافی و پاتولوژی بیماران

در این مطالعه عوامل دموگرافی و فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی با توجه به اطلاعات موجود در پرونده بیماران استخراج و طبقه بندی شد. از میان عوامل دموگرافی فاکتورهای قومیت، محل تولد و تاریخچه بیماری در خانواده بیماران مورد بررسی قرار گرفت و از میان عوامل پاتولوژی فاکتورهای سن بیماران،سایز تومور و مرحله (stage) تومور بر حسب سیستم TNM بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد تعداد بیماران مورد بررسی در این پروژه، ۲۴ نفر زن(۴۳.۶٪) و ۳۱ نفر مرد(۵۶.۴٪) با میانگین سنی ۵۵/۴۸ سال و طیف سنی ۱۶ تا ۷۶ سال بود. هیچ یک از این افراد نسبت خویشاوندی با یک دیگر نداشتند و سن ۶۴/۸٪ آن ها بالاتر از ۵۰ سال بود. از نظر تاریخچه، هیچ یک از افراد فامیل این بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال یا سایر سرطان ها نبودند. نتایج پاتولوژی تایید شده توسط پاتولوژیست بر اساس Enneking staging system و متغیرهای TNM، نشان داد که از نظر مرحله بندی تومورها، ۹ نمونه در مرحله صفر(stage0)، ۲۵ نمونه در مرحله یک(Stage 1)، ۱۳ نمونه در مرحله دو(Stage 2)، ۸ نمونه در مرحله سوم(stage3) و ۴۱ نمونه نرمال مربوط به بافت کناری ناحیه‌ی توموری همان بیماران بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می دهد ارتباط معناداری بین نتایج حاصل از آزمایش نیمه کمی نمونه های بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، با بیان ژن Axin1 در این بیماران(P=۰/۰۳) و بیان ژن C-MYC(P=۰/۰۳) وجود داشت.

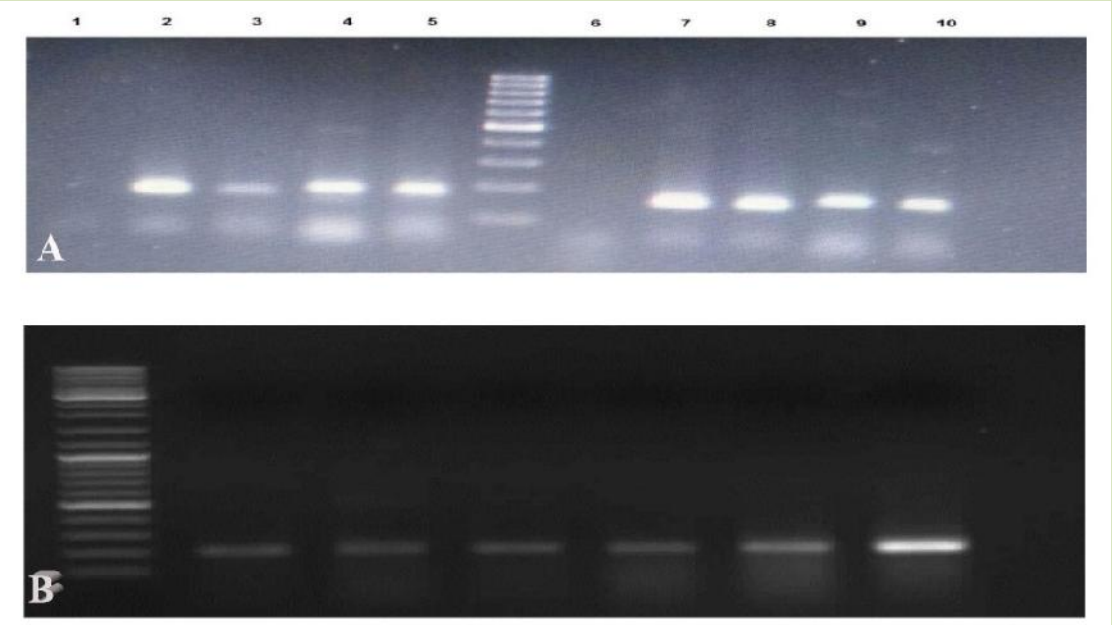
ب- نتایج حاصل از تست های آزمایشگاهی

نتایج بررسی کمی RNA استخراج شده از بافت ها

Archive of SID

www.SID.ir

نشان داد که مقدار غلظت RNA برای تمامی نمونه ها مناسب و متفاوت از یک دیگر بود و نسبت جذب A260/A280 برای تمام نمونه‌ها بین ۸/۱ تا ۲ می باشد که نشان دهنده عدم وجود آلودگی پروتئین, کلروفرم و هم چنین عدم تجزیه و تخریب مولکول‌های RNA است. از نظر کیفی نیز تمامی RNA استخراج شده از بافت ها دارای کیفیت خوبی بود. نتایج آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن های AXIN1، C-MYC و بتااکتین، نشان داد که بتااکتین به عنوان یک ژن housekeeping درتمامی نمونه‌ها بیان می‌شود(شکل ۱). در حالی‌که ژن‌های AXIN1 و C-MYC فقط در برخی از نمونه ها بیان داشتند. در واقع در ۵۵٪ نمونه ها بیان ژن AXIN1 روشن و در ۴۵٪ نمونه ها بیان این ژن خاموش بود درمورد ژن C-MYC نیز در ۸۷/۵٪بیان این ژن روشن و در ۱۲/۵٪بیان آن خاموش بود (نمودار۱).



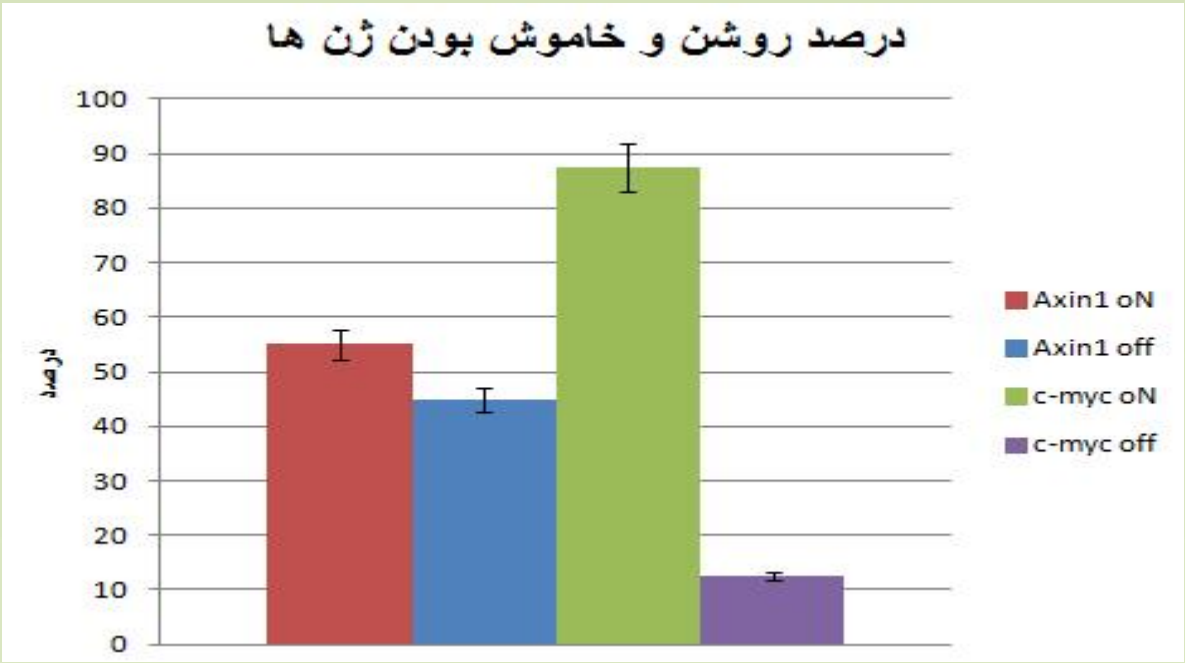
شکل۱-A) الگوی حاصل از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن Axin1 (بخش چپ مارکر)، ژن C-MYC (بخش راست مارکر).B) ژن بتااکتین که بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به ترتیب از چپ به راست شکل الف : چاهک ۱ کنترل منفی ژنAxin1 ،چاهک ۲-۵ بیان ژن Axin1 با اندازه باند bp ۱۷۳در چند تا از نمونه‌های بافتی بیماران. مارکر با وزن مولکولی 100 bp ، چاهک ٦ کنترول منفی ژن c-myc ، چاهک ۷-۱۰ بیان ژن C-MYC بااندازه باند bp۱۵۳در چند تا از نمونه‌های بافتی بیماران. شکل ب: بیان ژن کنترل داخلی بتا اکتین بر روی نمونه‌های سنتز شده.

بحث و نتیجه گیری

این نتایج، در راستای مطالعات مشابه انجام شده توسط سایر محققین است که به مختصری از مطالعات بشرح زیر اشاره می شود:D.R.Smite و همکارانش در سال ۱۹۹۷برروی افزایش بیان پروتوانکوژن *C-myc* را در سرطان زایی روده بزرگ کارکردند به این صورت که تغییرات پروتوانکوژن *c-myc* درسرطان روده ی بزرگ درسطح RNA مورد بررسی قرار دادند. سطح بیان mRNA را درسلول توموری و نرمال بررسی کردند تکنیک هایی که در این بررسی استفاده شد. پس از استخراج RNA نورترن بلات انجام دادند و بعد از

www.SID.ir

استخراج DNA ساترن بلات و دات بلات بکار گرفتند. نتیجه حاصل افزایش بیان این mRNAدر۶۶درصد از تومورها بود(۱).



نمودار۱- درصد روشن و خاموش بودن ژن *Axin1* و *C-MYC* توسط *RT-PCR* در بافت بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

. مطالعه Sofia Lagerholmi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ برروی شناسایی غیرتهاجمی سطح بیان سه mRNA مربوط به سه ژن C-mycp64 وC-mycp67 و-c erbb2 درسرطان کولورکتال بود. از آن جایی که سرطان کولورکتال یکی از اصلی ترین دلیل مرگ و میردرغرب به حساب می آید، شناسایی آسیب های زود هنگام بسیارموثر است. بنابراین ایشان با استفاده از تکنیک های RT-PCR و PCR amplification پس از استخراج RNA از نمونه ها و طراحی پرایمر برای ژن های موردنظر، نتایجی به دست آوردند و نشان دادند که حاکی از بیان ۷۸/۵٪ mRNA مربوط به C-mycp64 و۷۸/۶٪ C-mycp67 در بیماران CRC بود. بنابراین نشان داد علاوه براین که باCRC ارتباط دارند بلکه مارکرهای بسیار خوبی در بررسی سرطان کولورکتال هستند(۱۱). Salahsho و همکارانش در سال۲۰۰۵ نشان دادند Axin1 یک پروتئین داربستی است که مسیرهای Wnt / بتا کاتنین، / SAPK JNK ، ، p53 و مسیرTGF بتا را تنظیم می کند(۱۰). جهش‌ها در Axin1 نیز در خیلی از سرطان ها یافت شده است(۶). اما همین ژن در سطح پروتئینی کاملاً آشکار است که به عنوان یک داربست در تعامل با پروتئین های متعدد نقش حیاتی در تنظیم بسیاری از مسیرهای سلولی ایفا می کند. در بررسی‌های انجام شده در سرطان مری نیز نشان داد که در ارتباط با افزایش تهاجم به گره‌های لنفاوی میزان بیان ژن Axin1 کاهش پیدا کرده است(۸). این نکته نیز قابل تامل است که سرطان روده بزرگ همواره تحت تاثیر مسیر سیگنالدهی Wnt قرار دارد و جهش ژنتیکی در ژن APC باعث پولیپ آدنوماتوز خانوادگی می‌گردد که در ۹۵٪ منجر به سرطان روده بزرگ می‌گردد(۳). ولی در بررسی های نشان دادیم که ژن Axin1 در ۵۵٪ ازبافت بیماران مبتلا به

Archive

www.SID.ir

سرطان کولورکتال بیان داشته و در۴۵٪ این ژن خاموش بوده است بدین معنا که پرایمرهای اختصاصی ما برای این ژن در۵۵٪ حالتی از این ژن را در بافت بیماران CRC که فاقد هیچ جهشی بوده است تکثیر کرده اند اما از طرفی خاموش بودن بیان در۴۵٪ از نمونه ها این احتمال را نیز دور نمی‌کند بنابراین انجام این بررسی با استفاده از تکنیک real time PCR جهت حصول نتایج قابل اطمینان در ادامه‌ی روند این پروژه در دست اقدام می‌باشد.

منابع

1.D.R. Smith, T. M. H.-S. G. (1993). Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. Br. J. Cancer, 68; 407-413.

2.Downs, K. (1989). Contrasting patterns of myc and N-myc expression during gastrulation of the mouse embryo. Genes & development, 3(6); 860-869.

3.Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell, 87(2); 159-170.

4.Mateyak, M. K. (1997). Phenotypes of c-myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombinatiion." Detail, 36; 38.

5.Meyer, N., Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. Nature Reviews Cancer, 8(12); 976-990.

6.Miyoshi, Y., et al. (1998). "Activation of the β-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3." Cancer research 58(12): 2524-2527.

7.Mohandas, K. M. (2011). " Colorectal cancer in India: controversies, enigmas and primary prevention. Indian." J Gastroenterol 30(1): 3-6.

8.Nakajima, M., et al. (2003). "Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma." British journal of cancer 88(11): 1734-1739.

9.Nesbit, C. E., et al. (1999). "MYC oncogenes and human neoplastic disease." Oncogene 18(19): 3004-3016.

10. Salahshor, S. and J. Woodgett (2005). "The links between axin and carcinogenesis." Journal of clinical pathology 58(3): 225-236.

11. Sofia Lagerholm, S. L., Sudhir Dutta & Padmanabhan Nair (2005). "Non-invasive detection of c-myc p64, c-myc p67 and c-erbb-2 incolorectal cancer." Scandinavian Journal of Gastroenterology 40: 1343-1350.

12. Syed Mudassar, M. S. K., Nighat P. Khan, and M. u.-H. a. K. I. Andrabi (2014). Possible Role of
Proto-Oncogenes in Colorectal Cancer — A Population Based Study, INTECH. Vita, M. and M. Henriksson (20" .(06The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer." Seminars in Cancer Biology 16(4): 318-330.

13. Zeng, L., et al. (1997). "The mouse Fusedlocus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation." Cell 90(1): 181-192.

Archive of SID

www.SID.ir