

ارزیابی سطح بیان ژن CXCL12 در رده سلولی آدنوکارسینومای ریه A549 با استفاده از روش Real Time PCR

ریحانه محبوبی^۱، جلیل فلاح مهرآبادی^۲، الهه علی عسگری^۳

۱- کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران.

۲- دکتری میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبی‌شناسی لیستر، تهران، ایران. jalil.fallah@gmail.com

۳- دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سرطان ریه شایع‌ترین بدخیمی و اولین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان و مردان جهان است، به طوری که بقای ۵ ساله بیماران حدود ۱۵٪ می‌باشد. با توجه به نقش تهاجمی CXCL12 و چالش‌های موجود در مطالعات مختلف در بیان و عدم بیان CXCL12 و وجود متاستاز در مراحل اولیه ی آدنوکارسینومای ریه، رده سلولی A549 انتخاب شد تا میزان بیان ژن CXCL12 در آن مورد بررسی قرار گیرد.

روش کار: در این مطالعه رده سلولی A549 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شد. از رده ی سلولی مذکور RNA استخراج گردید و پس از ارزیابی کمی و کیفی آن، cDNA سنتز شد. سپس میزان بیان ژن CXCL12 با روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: بیان اندک CXCL12 در رده سلولی آدنوکارسینومای ریه A549 نشان دهنده ی آن است که CXCL12 می‌تواند به عنوان یک مارکر بالقوه برای اهداف پیشگویی کننده و در نهایت درمانی در نظر گرفته شود. نتیجه گیری: CXCL12 در رده سلولی آدنوکارسینومای ریه A549 بیان کمی دارد.

واژه های کلیدی: CXCL12، رده سلولی A549، Real Time PCR، سرطان ریه.

مقدمه

آدنوکارسینوما بسیار کندتر از کارسینوم سلول سنگفرشی (Squamous Cell Carcinoma) رشد می کند، اما به طور وسیع و در مراحل ابتدایی تر متاستاز می دهد (۲۵، ۲۴، ۲۱، ۲۰). از میان طیف پاتولوژیکی وسیع سرطان ریه، بروز آدنوکارسینوما به طور مشهودی در دو دهه گذشته افزایش یافته و به دلایل ناشناخته شایع ترین نوع سرطان ریه در زنان و هم چنین بر طبق مطالعات زیادی، در مردان می‌باشد (۱۱، ۸، ۵). ۲- کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) که فراوانی آن ۳۰-۴۰ درصد می‌باشد و عمدتاً در مردان دیده شده و به شدت با مصرف سیگار ارتباط دارد (۲۶، ۲۴). ۳- کارسینوم سلول بزرگ Large

سرطان ریه شایع ترین بدخیمی و اولین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان و مردان جهان است، به طوری که بقای ۵ ساله ی بیماران حدود ۱۵ درصد می‌باشد (۱۷، ۷، ۱). سرطان ریه بر اساس اهداف تشخیصی و درمانی به دو صورت کلی کارسینوم سلول غیر کوچک ریه (NonSmall Cell Lung Carcinoma) و کارسینوم سلول کوچک ریه (Small Cell Lung Carcinoma) طبقه بندی می‌شود. NSCLC از سه نوع گروه توموری تشکیل شده است: ۱- آدنوکارسینوما (Adeno carcinoma) با فراوانی ۳۰-۴۰ درصد موارد، شایع ترین نوع سرطان ریه در زنان و افراد غیرسیگاری می‌باشد.

به طور چشم گیری در زنان، بیماران آدنوکارسینوما و افراد غیر سیگاری بالاتر است (۱۸، ۶، ۳). با توجه به نقش مهاجمی CXCL12 و چالش‌های موجود در مطالعات مختلف در بیان CXCL12 و متاستاز در مراحل اولیهی آدنوکارسینومای ریه، رده سلولی A549 به عنوان یک رده سلولی نمایان گر آدنوکارسینومای اپی تلیال ریه انتخاب شد تا میزان بیان ژن CXCL12 در آن مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

در این مطالعه رده سلولی A549 آدنوکارسینومای اپی تلیالی ریه از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد. این رده سلولی در محیط Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Medium) با افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین (پادتن طب) کشت داده شد.

طراحی پرایمر

پرایمرهای CXCL12 و بتا اکتین توسط نرم-افزارهای Allele ID و MEGA6 طراحی شد. اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های هدف به وسیلهی برنامه BLAST آزمایش گردید. در این مطالعه از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی برای ژن CXCL12 استفاده شده است. توالی‌های مورد نیاز برای ژن CXCL12 و بتا اکتین (Macrogen-کره جنوبی) تهیه شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA از رده سلولی A549 با استفاده از تریزول (سیگما- آمریکا) طبق روش مرسوم استخراج شد. به طور خلاصه، ابتدا جهت شستشوی سلول‌ها و حذف محیط کشت، به رسوب سلولی حدود ۲۰۰ میکرولیتر PBS اضافه و در مرحله بعد ۱۰۰۰ میکرولیتر تریزول اضافه گردید. به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق

یک تومور اپی تلیالی بدخیم تمایز نیافته که فاقد خصوصیات سلول‌شناسی SCLC و تمایز غددی یا سنگفرشی است. دسته دیگر از انواع پاتولوژیکی عمده سرطان ریه SCLC ها با فراوانی حدود ۲۰ درصد می‌باشد. روند رشد این گونه سرطان ریه تند است و در زمان کوتاهی در اندام‌های دیگر گسترش می‌یابد و بیشتر در راه‌های هوایی میانی تجمع یافته است (۲۶، ۲۴، ۱۹). ژن CXCL12، که تحت عنوان فاکتور مشتق شده از استرومال (Stromal Derived Factor-1) نیز شناخته می‌شود، روی کروموزوم شماره ۱۰ انسانی قرار دارد (۲). این ژن یک کموکاین التهابی با وزن مولکولی ۸ کیلو دالتون که در جذب شیمیایی لنفوسیت، تنظیم سلول‌های خون ساز (هماتوپوئیتیک) و فرآیندهای فیزیولوژیکی متعدد نقش دارد، کد می‌کند. این ژن ایزوفرم‌های مختلف دارد که عبارتند از: CXCL12 α ، CXCL12 β ، CXCL12 γ ، CXCL12 δ و CXCL12 φ (۲۷، ۱۰). CXCL12 با افزایش رشد تومور، دخالت در مهاجرت و چسبندگی سلول‌های توموری، افزایش رگ زایی و فراهم آوردن محیط سرکوب گر ایمنی، در پاتوژنز تومور دخالت می‌کند (۹). نتایج مطالعات بر روی رده سلولی A549، Clau-1 و بافت‌های توموری NSCLC عدم بیان CXCL12 و بیان گیرنده آن (CXCR4) را در این دو رده سلولی و بافت توموری نشان داده است (۱۴، ۱۲). مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۶ نشان داده که میزان بیان ژن CXCL12 در رده‌های سلولی سرطان ریه نسبت به برونشیا سالم افزایش بیان داشته است و بیان این ژن در نمونه‌های بافت توموری که متاستاز به مغز داشتند نسبت به تومورهای فاقد متاستاز به طور چشم گیری افزایش دارد (۲۳، ۱۷). مطالعات اخیر حاکی از آن است که CXCL12 در هر دو رده سلولی NSCLC و SCLC افزایش بیان داشته است و در نمونه‌های بافت توموری NSCLC، میزان بیان CXCL12

استخراج شده نیز با استفاده از میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط نانودراپ بررسی و کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و مشاهده باندهای 18S و 28S مربوط به RNA ریوزومی بررسی (شکل ۱) و سپس RNA ها تا زمان استفاده در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. cDNA با دو میکروگرم از RNA و با استفاده از آنزیم Revert Aid RT در حضور پرایمرهای هگزامر تصادفی، مطابق با 'chva' شرکت سازنده کیت (EU(Lithuania) - Thermo scientific) سنتز شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	پرایمرها	توالی	طول قطعه حاصل از تکثیر	دمای اتصال
CXCL12	Forward Reverse	TCTTCGAAAGCCATGTTGC CACTTGCTGTTGTTGTTCTT	۱۱۰ جفت باز	57°C
B- actin	Forward Reverse	TCCTCCTGAGCGCAAGTAC CCTGCTTGCTGACCACATCT	۸۹ جفت باز	57°C

به منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA ی استخراج شده در شرایط عاری از RNase، کیفیت نمونه های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگاروز و کمیت آن ها بررسی شد. در بررسی ژل، دو باند 18 S و 28 S RNA ریوزومی به وضوح قابل مشاهده بود که بیان گر عدم تجزیه RNA می باشد (شکل ۱). در بررسی با نانو دراپ نیز نسبت جذب در ۲۶۰ نسبت به ۲۸۰ نانومتر، ۱/۸ به دست آمد که نشان دهنده ی درجه خلوص بالای نمونه می باشد. در کل این نتیجه حاکی از آن است که RNA استخراجی می تواند با اطمینان در مراحل بعدی مطالعه استفاده شود.

تایید پرایمرهای سنتز شده

بعد از سنتز cDNA، برای تایید پرایمرها، PCR معمولی انجام شد و نمونه ها بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ ران شدند. به ترتیب دو باند ۸۸ و ۱۱۰ جفت بازی برای بتا اکتین و CXCL12 مشهود است (شکل ۲).

بیان ژن CXCL12 در رده سلولی A549

نتایج نشان داد CXCL12 در رده ی سلولی اپی تلیالی آدنوکارسینوما ی ریه (A549) بیان شده است. با توجه به

انکوبه شد. سپس با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم و انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، مخلوط حاصل سانتریفیوژ و فاز رویی تشکیل شده حاوی RNA به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید. نمونه به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد انکوبه و سپس سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و در دور ۷۵۰۰g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در انتها پس از خشک شدن نسبی، به منظور حل شدن، به رسوب حاصله آب فاقد RNase اضافه شد. کمیت RNA

Real Time PCR کمی

CXCL12 به عنوان ژن هدف و بتا اکتین به عنوان ژن مرجع انتخاب شدند. سپس واکنش-Real time RT-PCR برای ژن هدف و مرجع بر روی رده سلولی A549 به صورت زیر انجام گرفت:

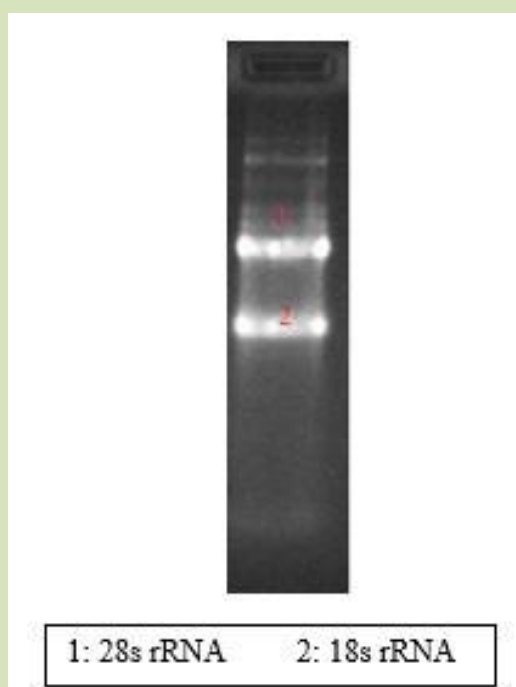
مخلوطی به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲μl از cDNA الگو، ۱۲μl مستر میکس سایر گرین (ampliqon- دانمارک)، ۹ μl آب مقطر، ۱ μl از پرایمر پس رو و ۱ μl از پرایمر پیش رو تهیه شد. Real time PCR در دستگاه (Exicycler™96)، کره جنوبی) مطابق با برنامه دمایی و زمانی زیر انجام پذیرفت: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی گراد واسرشت سازی cDNA الگو برای ۱۵ دقیقه در چرخه اول و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه و دمای نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه. واکنش برای هر نمونه cDNA انجام و Ct برای هر ژن محاسبه گردید.

نتایج

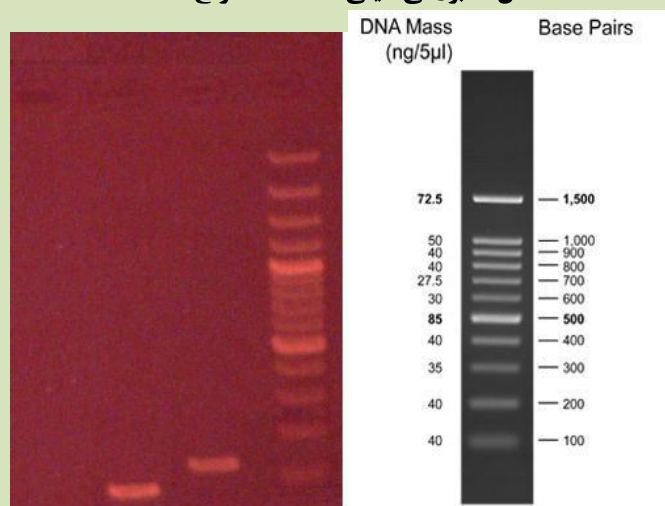
تعیین کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده

منحنی ذوب (Tm) جهت تایید نهایی محصولات مربوط به ژن بتا اکتینین و CXCL12 ترسیم شده است. این نمودار نشان داده است که دمای ذوب بتا اکتینین و CXCL12 به ترتیب ۸۵ و ۸۸/۵ می باشد (نمودار ۲).

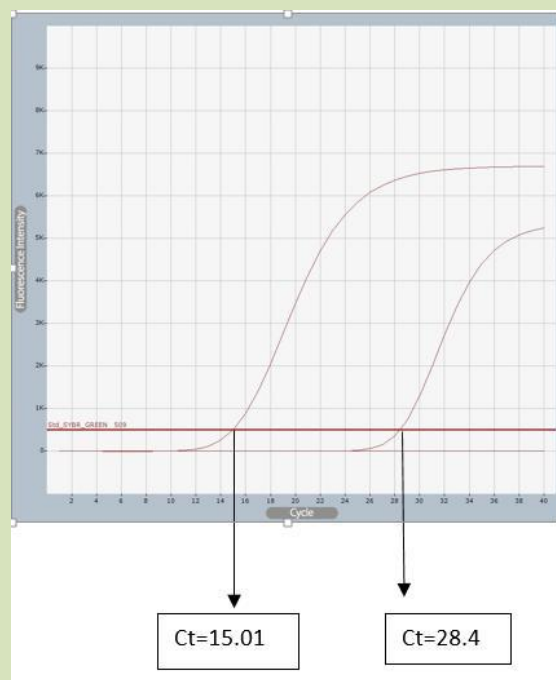
داده‌های حاصل از Real Time PCR، Ct مربوط به ژن بتا اکتینین و CXCL12 به ترتیب ۱۵/۰۱ و ۲۸/۴ می باشد. بر این اساس می توان نتیجه گرفت CXCL12 نسبت به بتا اکتینین بیان کمتری دارد (نمودار ۱).



شکل ۱- بررسی کیفی RNA استخراج شده



شکل ۲- تایید پرایمرها به وسیله ی نتایج حاصل از PCR از نمونه های cDNA



نمودار ۱- تکثیر ژن CXCL12 و بتا اکتین در واکنش Real Time PCR



نمودار ۲- منحنی ذوب حاصل از Real time PCR

مهاجرت تومور به اندام دیگر می‌شود (۱۸). با توجه به مطالعات انجام شده بر روی بافت NSCLC و این یافته که CXCL12 در افراد آدنوکارسینوما بیان بیشتری دارد، مطالعه حاضر نشان دهنده ی بیان بسیار کم CXCL12 نسبت به بتا اکتین با روش Real Time PCR در رده سلولی آدنوکارسینوما ی ریه، A549 می‌باشد. مطالعات مختلفی بر روی چند رده سلولی از جمله A549 نشان داده است که ژن CXCL12 در سطح پروتئین و mRNA در رده ی سلولی A549 و نمونه‌های بافت توموری NSCLC (مرحله ۱ و ۲)

بحث و نتیجه گیری

ژن CXCL12 به عنوان یک کموکاین در اتصال به گیرنده خود (CXCR4) از طریق مسیرهای متعدد می‌تواند در بیماری زایی طیف وسیعی از تومورها از جمله سرطان ریه دخالت و باعث رشد تومور، افزایش رگ زایی و متاستاز شود (۹). این کموکاین تحت تاثیر پیرایش‌های متعدد، ایزوفرم‌های مختلفی را به وجود می‌آورد (۲۷). مطالعات نشان داده است که افزایش بیان CXCL12 بیشتر در جایگاه‌های متاستاتیک می‌باشد و شیب کموکاینی ایجاد شده سبب

Ori wald و همکاران با استفاده از الایزا و ایمونوهیستوشیمی نشان داده‌اند که CXCL12 در بیشتر نمونه‌های NSCLC مرحله 1A و 2B بیان شده است (۲۲). H Imai و همکاران با روش Real Time PCR رده‌های سلولی مختلف NSCLC، SCLC، رده‌های سلولی برونشیل و بافت‌های تازه سرطان ریه را مورد بررسی قرار دادند و افزایش بیان این ژن را در رده‌های سرطانی نسبت به سلول‌های اپی تلیال برونشیل انسانی غیر بدخیم نشان دادند. هم چنین این مطالعه بیان گر این است که ژن CXCL12 در افراد مبتلا به آدنوکارسینوما، زنان و غیرسیگاری‌ها بیان بیشتری دارد (۶). می‌توان در مطالعات آینده میزان بیان این ژن در سطح mRNA و پروتئین در نمونه‌های بافت توموری بررسی و سطح بیان آن با بافت نرمال مقایسه شود. به علاوه با توجه به یافته‌های مطالعات قبلی حاکی از تفاوت در سطح بیان ایزوفرم‌های مختلف ژن CXCL12 در سرطان پستان (۱، ۲۹)، ایزوفرم‌های مختلف این کمو کاین نیز در سرطان ریه مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های علمی خانم دکتر رودی و آقای دکتر بازرگان به خاطر همکاری در اجرای عملی این طرح تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. Alberg, A.J., Samet, J.M. (2003). Epidemiology of lung cancer. *Chest Journal*, 123(1_suppl); 21S-49S.
2. Akishima-Fukasawa, Y., Nakanishi, Y., Ino, Y., Moriya, Y., Kanai, Y., Hirohashi, S. (2009). Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. *American journal of clinical pathology*, 132(2); 202-10.
3. Brand, S., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Diebold, J., Otte, J-M. (2005). CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Experimental cell research*, 310(1); 117-30.
4. Dai, X., Mao, Z., Xie, S., Zhang, H., Huang, J. (2013). The CXCL12/CXCR4 autocrine loop increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro. *Oncology letters*, 5(1); 277-82.
5. Hoffmann, D., Rivenson, A., Hecht, S.S. (1996). The biological significance of tobacco-

specific N-nitrosamines: smoking and adenocarcinoma of the lung. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 26(2); 199-211.

6. Imai, H., Sunaga, N., Shimizu, Y., Kakegawa, S., Shimizu, K., Sano, T. (2010). Clinico pathological and therapeutic significance of CXCL12 expression in lung cancer. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 23(1); 153-64.

7. Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C., Ward, E.M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(8); 1893-907.

8. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2); 69-90.

9. Kryczek, I., Wei, S., Keller, E., Liu, R., Zou, W. (2007). Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. بیان نمی‌شود (۱۳، ۴). این اختلاف ممکن است ناشی از هتروژنی بافت سرطانی باشد. مطالعات بسیاری هتروژنی بودن تومور را اثبات کرده‌اند و نشان داده‌اند که بافت توموری از جمعیت سلولی به نام سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) منشا می‌گیرد که قابلیت آغاز تومورزایی، حفظ بافت توموری، مقاومت به داروهای کمو-رادپوترایی و متاستاز را دارد (۲۸). بر این اساس رودی و همکاران با پاساژ دادن CSC‌های رده سلولی A549 و افزایش خاصیت مهاجمی آن‌ها با استفاده از ایمونوهیستوشیمی، وسترن بلات، میکروآرایه و Real Time PCR، افزایش بیان ژن CXCL12 را در جمعیت سلول بنیادی سرطانی نسبت به سلول‌های بالغ به صورت کمی بیان کردند (۱۵). از مسائل مهمی که در مطالعات بعدی می‌توان به آن پرداخت، ارزیابی سطح بیان این ژن در بیماران مبتلا به سرطان ریه است که چند دوره تحت درمان قرار گرفته‌اند. علت دیگر اختلاف در بیان یا عدم بیان ژن CXCL12 ممکن است ناشی از متیلاسیون نواحی غنی از الیگونوکلو تیدهای CPG پروموتور ژن CXCL12 باشد و متیلاسیون در این نواحی باعث خاموشی بیان ژن شود (۲۴). مطالعه‌ای در سرطان پانکراس مشخص نمود که CXCL12 به عنوان یک مهار کننده تومور، رشد و متاستاز تومور را مهار می‌کند (۱۶). این موضوع می‌تواند زمینه‌ساز بررسی عملکرد بیولوژیکی CXCL12 در رده‌های سلولی و بافت توموری ریه باشد.

specific N-nitrosamines: smoking and adenocarcinoma of the lung. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 26(2); 199-211.

6. Imai, H., Sunaga, N., Shimizu, Y., Kakegawa, S., Shimizu, K., Sano, T. (2010). Clinico pathological and therapeutic significance of CXCL12 expression in lung cancer. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 23(1); 153-64.

7. Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C., Ward, E.M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(8); 1893-907.

8. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2); 69-90.

9. Kryczek, I., Wei, S., Keller, E., Liu, R., Zou, W. (2007). Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis.

American Journal of Physiology-Cell Physiology, 292(3); C987-C95.

10. Kucia, M., Jankowski, K., Reza, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, DJ. (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. Journal of molecular histology, 35(3); 233-45.

11. Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, ME. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, 410(6824); 50-6.

12. Phillips, RJ., Burdick, MD., Lutz, M., Belperio, JA., Keane, MP., Strieter, RM. (2003). The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. American journal of respiratory and critical care medicine, 167(12); 1676-86.

13. Phillips, RJ., Mestas, J., Gharaee-Kermani, M., Burdick, MD., Sica, A., Belperio, JA. (2005). Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1 α . Journal of Biological Chemistry, 280(23); 22473-81.

14. Reckamp, KL., Figlin, RA., Burdick, MD., Dubinett, SM., Elashoff, RM., Strieter, RM. (2009). CXCR4 expression on circulating pancreatic keratin positive cells is associated with survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. BMC cancer, 9(1); 213.

15. Roudi, R., Madjd, Z., Ebrahimi, M., Samani, F., Samadikuchaksaraei, A. (2014). CD44 and CD24 cannot act as cancer stem cell markers in human lung adenocarcinoma cell line A549. Cellular and Molecular Biology Letters, 19(1); 23-36.

16. Roy, I., Zimmerman, NP., Mackinnon, AC., Tsai, S., Evans, DB., Dwinell, MB. (2014). CXCL12 chemokine expression suppresses human pancreatic cancer growth and metastasis. PloS one, 9(3); e90400.

17. Siegel, RL., Miller, KD., Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians, 65(1); 5-29.

18. Sun, YX., Wang, J., Shelburne, CE., Lopatin, DE., Chinnaiyan, AM., Rubin, MA. (2003).

Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. Journal of cellular biochemistry, 89(3); 462-73.

19. Travis, WD. (2011). Pathology of lung cancer. Clinics in chest medicine, 32(4); 669-92.

20. Travis, WD., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, AG., Geisinger, K., Yatabe, Y. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society: international multi disciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. Proceedings of the American Thoracic Society, 8(5); 381-5.

21. Wahbah, M., Boroumand, N., Castro, C., El-Zeky, F., Eltorkey, M. (2007). Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. Annals of diagnostic pathology, 11(2); 89-96.

22. Wald, O., Shapira, OM., Izhar, U. (2013). CXCR4 / CXCL12 axis in non small cell lung cancer(NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. Therapeutics. 3(1); 26.

23. Wang, J., Loberg, R., Taichman, RS. (2006). The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. Cancer and Metastasis Reviews, 25(4); 573-87.

24. Wendt, M. K., Cooper, A. N., Dwinell, M. B. (2008). "Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells." Oncogene, 27(10); 1461-1471.

25. Wistuba, II., Gazdar, AF. (2006). Lung cancer preneoplasia. Annu Rev Pathol Mech Dis, 1; 331-48.

26. Yousem, SA., Beasley, MB. (2007). Bronchioloalveolar Carcinoma. Archives of pathology & laboratory medicine, 131(7); 1027-32.

27. Youlten, DR., Cramb, SM., Baade, PD. (2008). The international epidemiology of lung cancer: geographical distribution and secular trends. Journal of Thoracic Oncology, 3(8); 819-31.

28. Yu, L., Cecil, J., Peng, S-B., Schrementi, J., Kovacevic, S., Paul, D. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. Gene, 374; 174-9.

29. Shuang, Z. (2014). "A comprehensive analysis of CXCL12 isoforms in breast cancer 1, 2." Translational oncology, 7(3); 429-438.

