



## مقاله پژوهشی

## تعیین سطح رونوشت ژن FGF12 در نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

گلشن خلفیان، ملیحه انتظاری\*

گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\* Email: mentezari@iautmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۰۵

## چکیده

سرطان کولورکتال چهارمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان و یکی از رایج ترین سرطان‌های دستگاه گوارش در جهان می‌باشد. با توجه به پیش آگاهی ضعیف و شیوع بالای این بیماری، تشخیص زود هنگام این بیماری حائز اهمیت می‌باشد. مطالعات گسترده‌ای نشان داده‌اند که مسیر سیگنالینگ فاکتور رشد فیبروبلاست از جمله مسیرهای موثر در تقویت رشد و متاستاز سلول‌های توموری می‌باشد. این مطالعه با هدف اندازه گیری سطح رونوشت ژن FGF12 در بافت توموری و حاشیه‌ای تومور افراد مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد. RNA کل از ۳۰ بافت توموری و ۳۰ بافت سالم بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال استخراج و سپس سنتز cDNA انجام شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن FGF12 و بتاکتین طراحی گردید در نهایت سطح mRNA ژن‌های مورد مطالعه با روش RT-PCR اندازه گیری شد و داده‌ها با استفاده از نرم افزار REST و SPSS تجزیه و تحلیل شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان رونوشت ژن FGF12 در بافت توموری نسبت به بافت سالم افزایش داشته ولی این افزایش معنی‌دار نبود در بررسی سایر فاکتورها میزان رونوشت FGF12 در بیماران در مرحله‌ی ۳ و ۴ (High Stage) نسبت به افراد در مرحله ۰، ۱ و ۲ (Low Stage) معنادار بود ( $P=0.043$ ) در حالی که میزان رونوشت این ژن با دیگر فاکتورهای بالینی ارتباط معناداری را نشان نداد. با توجه به افزایش رونوشت FGF12 در مراحل ۳ و ۴ سرطان کولورکتال نسبت به افراد در مراحل ۰، ۱ و ۲ شاید بتوان بیان کرد که این ژن در تومورزایی سرطان کولورکتال نقش دارد.

کلیدواژه‌ها: سرطان کولورکتال، FGF12، بیوماکر، RT-PCR.

## مقدمه

در سطح جهانی هر ساله حدود ۱/۴ میلیون مورد جدید سرطان کولورکتال تشخیص داده شده و حدود ۷۰۰/۰۰۰ نفر مرگ و میر ناشی از این سرطان برآورد شده است [۶]. این سرطان که دومین بدخیمی رایج

در بین سرطان‌ها، سرطان روده‌ی بزرگ یا کولورکتال رایج ترین نوع بدخیمی و چهارمین علت مرگ و میر مربوط به سرطان در سراسر جهان است.

فاکتورها در تهاجم و پیشرفت سرطان کولورکتال نقش دارند [۱۱]. بطور کلی، فاکتورهای رشد فیبروبلاست با انتقال سیگنال از طریق گیرنده‌هایشان در طیف وسیعی از وقایع فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مانند بازسازی، رگ‌زایی، بقای سلولی، مهاجرت و ترمیم زخم نقش مهمی ایفا می‌کنند [۱۳]. FGFها (Fibroblastic Growth Factors) را بر اساس عملکردشان می‌توان به دو گروه ترشحی (FGF1-FGF10 and FGF15-FGF23) و غیرترشحی یا درون سلولی (FGF11-FGF14) تقسیم بندی کرد. FGFهای درون سلولی که به عنوان فاکتورهای رشد همولوگی (FHF) نیز شناخته می‌شوند به دلیل اینکه در ناحیه‌ی دم انتهای N خود پیام ترشحی ندارند از سلول ترشح نمی‌شوند و مستقل از گیرنده‌ها عمل می‌کنند [۲۲]. این فاکتورها از ناحیه‌ی دم انتهای C خود به کانال‌های ولتاژ سدیمی و دیگر پروتئین‌های سلولی از جمله protein kinase (MAPK) scaffolding protein, IB2 (MAPK8IP2) و میکروتوبول‌ها متصل و آنها را تنظیم می‌کنند [۱۶]. براساس مطالعات انجام شده FHFها بطور قابل توجهی در نورون‌های درحال رشد و بالغ سیستم‌های عصبی مرکزی و محیطی رونویسی می‌شوند [۷]. با این حال عملکرد ژن‌های این خانواده تا حد کمی شناخته شده است. مطالعات گذشته رونویسی بیش از حد FGF12 (FHF3) را در سرطان سلول سنگفرشی مری (esophageal squamous cell carcinoma) (ESCC) [۳] و معده [۲۰] گزارش کرده‌اند. بعلاوه He و همکاران نشان دادند که رونوشت بیش از حد FGF12 در ماست سل‌ها (mast cells)، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ناشی از تابش پرتوی را مهار می‌کند [۱۳]. براساس نتایج

در زنان و سومین در مردان در سراسر جهان می‌باشد [۵] یک بیماری هتروژنی است که به علت تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در ژن‌های تنظیم کننده‌ی تکثیر، مهاجرت، تمایز، چسبندگی و مرگ سلولی در سلول‌های مخاطی کولون به وجود می‌آید [۴]، بعلاوه حدود ۵۰-۷۰ درصد سرطان کولورکتال از ضایعه‌ی خوش خیمی توسعه می‌یابد که تشخیص و حذف این ضایعه برای کاهش بروز و مرگ و میر این سرطان بسیار مهم می‌باشد [۲۳]. انتخاب گزینه‌های درمانی تا حد زیادی به مرحله‌ی سرطان بستگی دارد طبق سیستم TNM زمانی که سرطان در مراحل اولیه (مثال؛ مرحله I و II) تشخیص داده می‌شود، احتمال درمان بالا است اما در مراحل پیشرفته (مثال؛ مرحله III و IV) که گسترش بیشتری در بدن یافته احتمال درمان کمتر خواهد شد [۲] بعلاوه با وجود پیشرفت‌های گسترده‌ی بالینی، پیش آگاهی سرطان کولورکتال به علت ماهیت تهاجمی و عود مجدد هنوز بسیار ضعیف است [۱۵]. پیشرفت‌های ما در درک ژنتیک و اپی ژنتیک سرطان کولورکتال منجر به ایجاد بینش جدیدی در پاتوژنز این سرطان شده است. اخیراً بیومارکرهای غیرتهاجمی با اختصاصیت بالا شناسایی شده‌اند که می‌توانند در تشخیص و پیش آگاهی زودهنگام این سرطان بکار روند [۱۸]. تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی مانند تغییر در رونوشت ژن به عنوان مارکرهای مولکولی بالقوه سرطان کولورکتال مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸]. مطالعاتی زیادی رونویسی بیش از حد فاکتورهای رشد و گیرنده‌هایشان از جمله فاکتورهای رشد اپیدرمال و فیبروبلاست را در انواع سرطان‌ها گزارش کرده‌اند [۱۷، ۲۱]. بعلاوه مطالعات اخیر در خصوص فاکتورهای رشد فیبروبلاست نشان داده‌اند که این

همراه ۱ میکرولیتر (10mM) dNTP، ۱ میکرولیتر Random Hexamer (40µg/µl) و ۱ میکرولیتر Oligo dT (100µg/µl) در میکروتیوب ریخته و با آب به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد، سپس لوله را به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده و بلافاصله در یخ گذاشته سپس به هر نمونه ۱ میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase، ۰/۵ میکرولیتر Riblock، ۴ میکرولیتر بافر ۵X اضافه کرده در نهایت با آب به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. در آخر، واکنش طبق شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه، ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر مدل BEK Lab سنتز شد. cDNAهای سنتز شده تا زمان مرحله بعدی یعنی Real-time PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. یک چاهک حاوی تمام محتویات آزمایش بجز cDNA به عنوان کنترل منفی جهت اطمینان از عدم آلودگی در نظر گرفته شد. پس از انجام واکنش PCR جهت تایید صحت آزمایش محصول به دست آمده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. به منظور بررسی سطح رونوشت ژنهای مورد نظر پرایمرهای اختصاصی برای توالی cDNA هر ژن طراحی گردید. توالی ژنهای FGF12 و بتاکتین (به عنوان کنترل داخلی) از سایت NCBI به دست آمد. طراحی پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار Oligo7 انجام شد. سپس پرایمرها با استفاده از سایت NCBI و UCSC بلاست گردیدند تا دقت و اختصاصی بودن آنها به طور کامل مورد بررسی قرار گیرد. ویژگی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

مطالعات گذشته در مورد نقش موثر ژن FGF12 در پیشرفت سرطان، ما در این مطالعه به بررسی سطح رونوشت ژن FGF12 در بافت‌های توموری و نرمال کولورکتال پرداختیم تا با افزایش آگاهی از تغییر سطح رونوشت این ژن گامی در پیشرفت درمان هدفمند سرطان کولورکتال برداریم.

### روش بررسی:

**جمع‌آوری و نگه داری نمونه‌ها:** در این مطالعه مورد شاهدی تعداد ۳۰ نمونه بافت از افراد مبتلا به سرطان کولورکتال و ۳۰ نمونه بافت مجاور تومور (سالم) همان بیماران از بیمارستان امام خمینی (ره) و تومور بانک ایران طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۹۵ جمع‌آوری گردید. به منظور رعایت قوانین اخلاق زیستی قبل از شروع کار از تمامی بیماران رضایت‌نامه‌ی کتبی گرفته شد و همچنین اطلاعات کلینیکوپاتولوژی بیماران ثبت شد. نمونه‌های بافتی بصورت تازه در شرایط ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند.

### استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA

از نمونه‌های بافتی با استفاده از روش (Cat No. RNeasy Micro Kit (QIAGEN, (ID74004 Germany) انجام شد. سپس RNAهای استخراج شده تا انجام مراحل بعدی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت و خلوص RNAها با دستگاه نانودراپ سنجیده شد. و جهت تایید کیفیت نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند. cDNA طبق روش RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, USA) (Cat No.K1622) سنتز شد. طبق این روش به مقدار ۱ میکروگرم (۱۰۰۰ نانو گرم) RNA از هر نمونه به

جدول ۱. مشخصات پرایمرها

طول محصول	توالی	NCBI Num-accession	ژن
97bp	Forward: ACGTCTTGTTATTTGGGCATCG Reverse: GGGCAGTGGGGAGTTTAGTC	NM-004113.5CFGF11	FGF12
151bp	Forward: GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG Reverse: CTAGAAGCATTGCGGTGGAC	NM-001303460.1CFGF11	Beta actin

استفاده گردید. پس از بررسی نرمال بودن توزیع متغیرها با استفاده از تست کولموگورف-اسمیرنوف، برای ارزیابی ارتباط بین رونوشت ژن‌های مورد مطالعه و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال از تست همبستگی پیرسون و Independent samples t-test استفاده گردید. جهت تعیین میزان رونوشت نسبی ژن‌ها و مقایسه سطوح رونوشت در نمونه‌های بافتی توموری و غیر توموری نرم افزار REST2009 و روش لیواک بکار برده شد. و نمودارها با Graph pad prism7 رسم گردید. ارزش معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها:

به‌منظور بررسی اثر ژن FGF12 در سرطان کولورکتال، سطوح رونوشت این ژن را در ۳۰ بافت توموری و ۳۰ بافت مجاور سالم با استفاده از qPCR اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار دادیم. طبق شکل ۱ منحنی ذوب ژن FGF12 به صورت تک قله بدست آمد که نشان دهنده‌ی اختصاصی بودن تکثیر ژن مورد نظر است. آنالیز داده‌ها نشان داد میزان رونوشت نسبی ژن FGF12 در بافت توموری نسبت به بافت سالم افزایش داشته ولی این افزایش رونوشت معنی‌دار نبود (شکل ۳). در آنالیزی دیگر ارتباط بین رونوشت این ژن و شاخص‌های کلینیکوپاتولوژی توسط آزمون‌های پیرسون و t.test بررسی شده است. همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده است بیماران بر اساس هریک از شاخص‌های

واکنش **Real time PCR**: برای ارزیابی سطح رونوشت ژن FGF12 از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. این بررسی به روش سایبرگرین و در دستگاه Roche Light Cycler® 96 انجام شد. قبل از انجام واکنش Real-time PCR ابتدا رقعت‌های متوالی با ضریب ۱۰ از cDNA جهت رسم منحنی‌های استاندارد و تعیین کارآمدی PCR برای ژن مورد نظر تهیه شد. واکنش طبق پروتکل SYBR green master mix (Takara, Japan) (Cat No. #RR820Q) انجام شد. هر واکنش شامل ۱۲/50 μL سایبرگرین، 1 μL پرایمر اختصاصی ژن FGF12، ۱۰۰ نانوگرم cDNA بود در نهایت با آب مقطر به حجم نهایی 25 μL رسانده شد. و طبق برنامه‌ی دمایی- زمانی مشخص، ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی اولیه cDNA الگو به مدت ۲ دقیقه، سپس ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه در ۴۰ سیکل تکرار شد. واکنش برای هر ژن دو بار انجام شد. پس از پایان یافتن واکنش‌ها، برای بررسی تکثیر اختصاصی ژن FGF12 منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. سطوح رونوشت ژن FGF12 با بتا‌اکتین نرمالایزه و در نهایت با فرمول لیواک محاسبه شد.

#### آنالیز آماری:

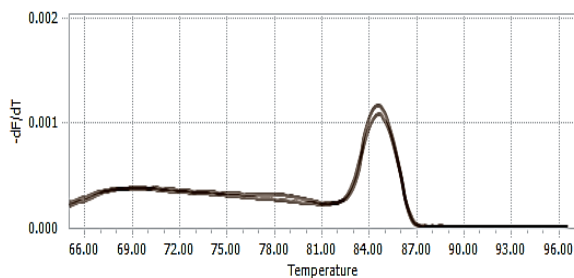
جهت انجام آنالیز آماری و انتخاب آزمون مناسب برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS.v23

high stage نسبت به low stage وجود داشت (P=0.043)، که این امر نشان دهنده‌ی آن است که سطح رونوشت این ژن با پیشرفت بیماری در ارتباط می‌باشد ولی اختلاف معناداری بین سطح رونوشت این ژن با دیگر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی مورد مطالعه در این پژوهش مشاهده نگردید (P>0.05).

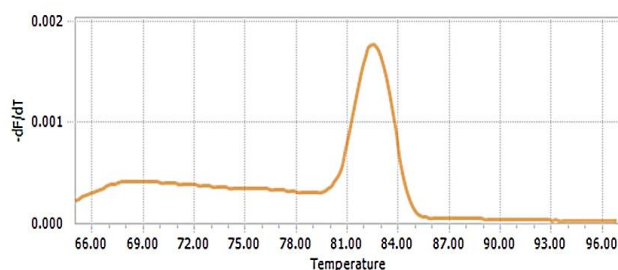
کلینیکوپاتولوژی سن، درجه تومور، اندازه تومور، مرحله‌ی تومور و حمله به گره لنفاوی به گروه‌های مختلف تقسیم شدند. همانطور که در شکل ۴ مشخص شده است، طبق سیستم مرحله‌بندی TNM با تفکیک مرحله بیماری به دو گروه low stage (۱،۰) و high stage (۳و۴)، افزایش سطح رونوشت معناداری در میانگین رونوشت ژن FGF12 گروه

جدول ۲: ارتباط میان سطح رونوشت ژن FGF12 با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (مقدار P کمتر از 0.05 به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد)

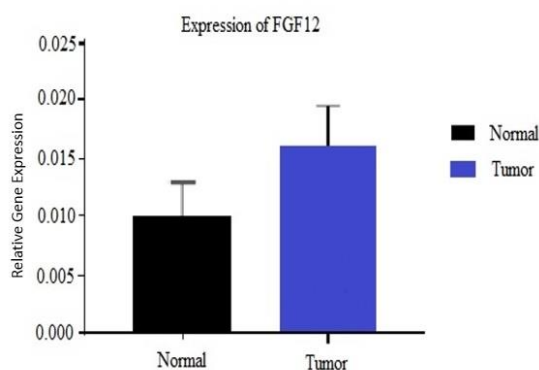
مقدار P (P-value)	میزان رونوشت FGF12	تعداد بیماران n (درصد بیماران %)	متغیرها
۰/۸۸۶	۱۵/۸۹	۷(۲۳/۳%)	سن بیماران بر حسب سال
	۲۰/۳۶	۲۳(۷۶/۶%)	≤۵۰
۰/۳۷۸	۶/۰۳	۹(۳۰%)	>۵۰
	۱۰/۲۲	۷(۲۳/۳%)	مرحله بندی تومور
	۱۴/۴۳	۸(۲۶/۷%)	0
	۵۳/۲۸	۵(۱۶/۷%)	I
	۶۱/۰۶	۱(۳/۳%)	II
۰/۱۹۷	۳۰/۲۷	۹(۳۰%)	III
	۱۷/۷۹	۱۰(۳۳/۳%)	IV
	۲۸/۹۲	۳(۱۰%)	درجه تومور
	۳/۱۵	۸(۲۶/۷%)	I
۰/۴۶۷	۱۷/۴۷	۲۳(۷۶/۶%)	II
	۱۷/۷۵	۷(۲۳/۳%)	III
۰/۶۱۲	۱۸/۸۵	۲۳(۷۶/۶%)	IV
	۲۷/۰۵	۴(۱۳/۳%)	اندازه تومور ( بر حسب سانتی متر)
	۱۲/۰۸	۳(۱۰%)	≤۵
			>۵
			تهاجم لنفاوی
			بلی
			خیر
			نامشخص



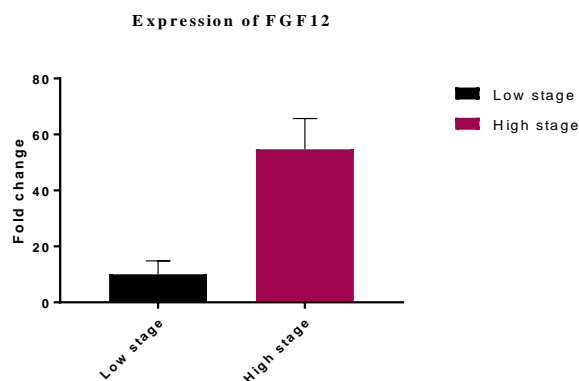
شکل ۱. نمودار منحنی ذوب ژن FGF12



شکل ۲. نمودار منحنی ذوب ژن بتا اکتین.



شکل ۳. مقایسه‌ی میزان نسبی رونوشت FGF12 بافت توموری با بافت سالم مجاور تومور در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال.



شکل ۴. مقایسه‌ی میزان نسبی رونوشت FGF12 در بافت توموری بین دو گروه بیمار در مرحله پیشرفته (۳ و ۴) و مرحله اولیه (۱ و ۲). بر اساس مرحله بندی TNM، Low stage شامل مراحل اولیه‌ی سرطان کولورکتال می‌باشد (مراحل ۰، ۱ و ۲) و High stage نیز مراحل پیشرفته‌ی سرطان کولورکتال را شامل می‌شود (مراحل ۳ و ۴).

## بحث

FGFها آسیب بافتی ناشی از تابش پرتوی را مهار می‌کند. در واقع FGF12 توسط دومین CPP خود می‌تواند به درون سلول‌ها وارد شود و بدون تعامل با هیچ پروتئین و گیرنده‌ای آپوپتوز را کاهش دهد که پیشنهاد کردند این ویژگی ممکن است اثرات درمانی داشته باشد [۱۴]. مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۴ توسط Fumiaki Nakayama و همکاران گزارش شد که سطح رونوشت بالای FGF12 در سلول‌های HMC-1 می‌تواند مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از پرتو یونی سلول‌های اپیتلیال روده‌ای موش را کاهش دهد که پیشنهاد کننده‌ی نقش انکوژنیک این ژن می‌باشد [۱۳].

در سال ۲۰۱۶، song و همکاران برای اولین بار عملکرد FGF12 را در بیولوژی عروقی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از آنجایی که ماهیچه صاف عروقی (VSMC) که ماهیچه‌ی خودکار دیواره‌ی رگ‌های روده می‌باشد، فنوتیپ خود را بین حالت‌های غیرانقباضی و انقباضی در پاسخ به تغییرات محیطی از جمله پاسخ به آسیب تنظیم می‌کند؛ نتیجه گرفتند که FGF12 بعنوان یک تنظیم‌گر اصلی، تمایز فنوتیپ سلول‌های عضله صاف عروقی (VSMC) به سلول‌های شبه-SMC را از طریق مسیر p38 MAPK کنترل و القا می‌کند و برای تغییر فنوتیپ VSMC ضروری و کافی است بطوریکه طبق نتایج بدست آمده، FGF12 تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش و فیبروبلاست‌های پوست انسان را به سلول‌های شبه-SMC تقویت کرد؛ بعلاوه نشان دادند FGF12 در سلول‌های عضله صاف عروقی قابل انقباض دیواره‌های رگ نرمال تا حد زیادی رونویسی شد اما در سلول‌های عضله صاف

به دلیل پیش آگاهی ضعیف سرطان روده‌ی بزرگ، تلاش برای جستجوی درمان‌های بهتر و پیش بینی این سرطان در مراحل اولیه یک اولویت برای جامعه‌ی پزشکی می‌باشد. با افزایش پیشرفت‌های گسترده در تکنولوژی مولکولی، مطالعات بیومارکرها در سرطان تقریباً هر روزه منتشر می‌شود [۱] و به علت این پیشرفت‌ها لازم است پزشکان و دانشمندان درک کاملی از نشانگرهای مولکولی و توسعه‌ی آنها داشته باشند [۹]، از طرف دیگر درک مکانیسم‌های مولکولی سرطان کولورکتال ممکن است در ایجاد روش‌های غربالگری غیرتهاجمی، ارزان و با اختصاصیت بالا، گامی موثر در تشخیص و درمان سرطان کولورکتال باشد [۱]. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که FGFها و گیرنده‌های آنها در توسعه و تهاجم تومور دخیل هستند و ممکن است نقش مهمی در پاتولوژی سرطان ایفا کنند در مقابل مطالعات کمی رونوشت ژن‌های خانواده‌ی FGFهای درون سلولی (iFGF) در تومورهای بدخیم و ارتباطشان با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی را مورد بررسی قرار داده‌اند [۱۰]. بنابراین در این مطالعه سطح رونوشت ژن FGF12 مربوط به FGFهای درون سلولی را در بافت‌های توموری و حاشیه‌ی تومور سرطان کولورکتال را مورد بررسی قرار دادیم و ممکن است نتایج این پژوهش اطلاعات جدیدی در خصوص شناسایی نقش این ژن از خانواده‌ی iFGF در سرطان کولورکتال ارائه دهد.

شناسایی عملکرد اختصاصی ژن FGF12 هنوز در حال بحث و بررسی می‌باشد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که FGF12 مانند بعضی دیگر از اعضای

سرطان سلول سنگفرشی مری نقش قابل توجهی دارد بطوریکه خاموشی این ژن توسط FGF12 siRNA باعث کاهش قابل توجه تکثیر سلول‌های سرطانی شد. در واقع باتوجه به اینکه ژن FGF12 بعنوان یک عضو کلیدی مسیر سیگنالینگ MAPK که خود در پیشرفت سرطان درگیر است، بطور قابل توجهی در سلول‌های توموری نسبت به غیرتوموری افزایش رونوشت داشته این ژن را بعنوان یک بیومارکر بالقوه برای پیش آگاهی و بقای بیماران ESCC شناسایی کردند، و پیشنهاد شد می‌تواند به عنوان یک هدف جدید برای درمان بیولوژیکی نیز مفید باشد [۳]. در پژوهشی دیگر، آنالیزهای مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ توسط Volkmore و همکاران نشان داد با تقسیم بندی بیماران از نظر هیستولوژیکی تومور به دو نوع Diffuse و Intestinal، در ۶۲٫۵٪ بیماران افزایش رونوشت معنادار FGF12 در نوع Diffuse سرطان معده نسبت به بافت نرمال مشاهده شد، درحالی که هیچ تغییر بیانی از ژن FGF12 در نوع Intestinal تومورها وجود نداشت. طبق این نتایج نتیجه گرفتند احتمالاً FGF12 در پاتوزن نوع Diffuse سرطان معده درگیر و دخالت دارد. بعلاوه ارتباط معناداری بین سطح رونوشت ژن FGF12 و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی بیماران (مرحله، متاستاز، سن و جنس) مشاهده نکردند [۲۰]. در مطالعه‌ی حاضر افزایش سطح رونوشت ژن FGF12 در بافت توموری نسبت به بافت سالم مشاهده شد ولی این افزایش بیان معنی‌دار نبوده که مغایر با مطالعات گذشته می‌باشد که ممکن است به دلیل محدودیت نمونه‌های مورد مطالعه و یا نوع جمعیت مورد مطالعه باشد. در بررسی‌های دیگر میانگین رونوشت این ژن در

عروقی رگ‌های آترواسکلروتیک و آسیب دیده رونویسی کاهش یافته بود. در بررسی دیگر نشان دادند که با انتقال FGF12 به عروق کاروتید آسیب دیده موش صحرائی تشکیل هایپرپلازی neointima را کاهش داد که در نهایت نتیجه گرفتند با القای تغییر در میزان رونویسی ژن FGF12 می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری‌های عروقی از جمله تغییرات نابجا در فنوتیپ VSMC بکار رود [۱۹].

پژوهش‌های مطالعه‌ای در خصوص عملکرد VSMC‌ها بیان کردند که برای تعمیر بافت در پاسخ به آسیب، فنوتیپ انقباضی به فنوتیپ تکثیری/ مهاجرت کننده تغییر می‌یابد، بعلاوه این پاسخ به آسیب مستلزم تولید تعدادی فاکتور رشد از جمله فاکتور رشد اپیدرمال، فاکتور رشد فیبروبلاست و ... می‌باشد. حال اگر VSMC‌های تکثیرکننده یا مهاجرتی قادر به بازگشت به فنوتیپ انقباضی نباشند، بازسازی عروق پاتوژنیک را تحریک و ضایعه‌های عروقی اینتیمال را تولید می‌کند که این عدم تغییر به فنوتیپ انقباضی ممکن است به علت حضور میتوزن‌های بیش از حد در محیط سلولی باشد. بعلاوه اگر VSMC‌ها بطور طبیعی نتوانند از فنوتیپ تکثیری/ مهاجرتی به انقباضی تغییر کنند ممکن است در متاستاز سرطان نقش داشته باشد در واقع به دلیل اینکه گزارش شد FGF12 تنظیم‌گر اصلی تغییر فنوتیپ VSMC‌ها می‌باشد در صورت رونوشت نابجای این ژن ممکن است منجر به ایجاد تغییرات پاتولوژیکی از جمله بیماری‌های عروقی و یا حتی متاستاز سرطان رخ دهد [۱۲].

مطالعات *in vitro* توسط Bhushan و همکاران نشان داد ژن FGF12 در تکثیر و تهاجم سلول‌های



- Comprehensive Cancer Network. 15(3):370-398.
- [3] Bhushan A., Singh A., Kapur S., Borthakar B.B., Sharma J., Rai A.K., *et al.* 2017, Identification and Validation of Fibroblast Growth Factor 12 Gene as a Novel Potential Biomarker in Esophageal Cancer Using Cancer Genomic Datasets. *Omic: a journal of integrative biology.* 21(10):616-631.
- [4] Binefa G., Rodríguez-Moranta F., Teule À., and Medina-Hayas M. 2014, Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World journal of gastroenterology: WJG.* 20(22):6786.
- [5] Chi Y. and Zhou D. 2016, MicroRNAs in colorectal carcinoma-from pathogenesis to therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 35(1):43.
- [6] Gandomani H.S., Aghajani M., Mohammadian-Hafshejani A., Tarazoj A.A., Pouyesh V., and Salehiniya H. 2017. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy.* 4(10):1656-1675.
- [7] Goetz R., Dover K., Laezza F., Shtraizent N., Huang X., Tchetchik D., *et al.* 2009, Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHF for binding and modulation of voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry.* jbc. M109. 001842.
- [8] Gonzalez-Pons M. and Cruz-Correa M. 2015, Colorectal cancer biomarkers: where are we now? *BioMed research international.*
- [9] Henry N.L. and Hayes D.F. 2012, Cancer biomarkers. *Molecular oncology.* 6(2):140-146.
- [10] Korc M. and Friesel R.E. 2009, The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Current cancer drug targets.* 9(5):639-651.
- [11] Liu R., Huang S., Lei Y., Zhang T., Wang K., Liu B., *et al.* 2015, FGF8 promotes colorectal cancer growth and metastasis by activating YAP1. *Oncotarget.* 6(2):935.
- [12] Louis S.F. and Zahradka P. 2010, Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Experimental & Clinical Cardiology.* 15(4):e75.

گروهی که در مراحل پیشرفته‌ی بیماری (۳و۴) قرار داشتند نسبت به افراد در مراحل اولیه (۰، ۱ و ۲) بررسی شدند که افزایش رونوشت معناداری مشاهده شد، در مقابل با دیگر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی مورد بررسی در این مطالعه ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. تمامی نتایج تحقیقاتی که اخیراً در بررسی نقش این ژن در سرطان انجام شد مغایر با نتایج مطالعه‌ی حاضر بوده بدین صورت که در بیشتر مطالعات قبلی افزایش سطح رونوشت ژن FGF12 در سرطان کلورکتال به صورت معنی‌دار گزارش شده است، علاوه بر این در خصوص بررسی ارتباط این ژن با فاکتورهای بالینی اطلاعات زیادی گزارش نشده است ولی در مطالعه حاضر با توجه به این که افزایش رونوشت معنی‌داری در مراحل پیشرفته بیماری نسبت به مراحل اولیه بیماری وجود داشت می‌توان این ژن را به عنوان یک بیومارکر در تشخیص مراحل پیشرفت سرطان کلورکتال مورد استفاده قرار داد. بنابراین برای اثبات بیشتر نتایج این پژوهش، پیشنهاد می‌شود مطالعات گسترده تری در حجم نمونه‌ی بالاتر و همچنین بررسی ارتباط این ژن با فاکتورهای بالینی در آینده انجام گیرد. به هر حال امیدواریم نتایج این مطالعه تحقیقات آتی را به سمت شناسایی بیشتر این ژن سوق دهد.

#### References:

- [1] Abdel-Rahman O. 2015, Targeting FGF receptors in colorectal cancer: from bench side to bed side. *Future Oncology.* 11(9):1373-1379.
- [2] Benson A.B., Venook A.P., Cederquist L., Chan E., Chen Y.-J., Cooper H.S., *et al.* 2017, Colon cancer, version 1.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National*

- [18] Siravegna G. and Bardelli A. 2016, Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients. *Molecular oncology*. 10(3):475-480.
- [19] Song S.-H., Kim K., Jo E.-K., Kim Y.-W., Kwon J.-S., Bae S.S., *et al.* 2016, Fibroblast growth factor 12 is a novel regulator of vascular smooth muscle cell plasticity and fate. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. ATVB. 116.308017.
- [20] Volkomorov V., Grigoryeva E., Krasnov G., Litviakov N., Tsyganov M., Karbyshev M., *et al.* 2013, Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and gene expression analysis. *Experimental oncology*.
- [21] Zammit C., Coope R., Gomm J., Shousha S., Johnston C., and Coombes R. 2002, Fibroblast growth factor 8 is expressed at higher levels in lactating human breast and in breast cancer. *British journal of cancer*. 86(7):1097.
- [22] Zhang X., Bao L., Yang L., Wu Q., and Li S. 2012, Roles of intracellular fibroblast growth factors in neural development and functions. *Science China Life sciences*. 55(12):1038-1044.
- [23] Zhou W., Chu Y., and An G. 2017, Significant difference of neutrophil-lymphocyte ratio between colorectal cancer, adenomatous polyp and healthy people. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 21(23):5386-5391.
- [13] Nakayama F., Müller K., Hagiwara A., Ridi R., Akashi M., and Meineke V. 2008, Involvement of intracellular expression of FGF12 in radiation-induced apoptosis in mast cells. *Journal of radiation research*. 49(5):491-501.
- [14] Nakayama F., Umeda S., Yasuda T., Fujita M., Asada M., Meineke V., *et al.* 2014, Cellular internalization of fibroblast growth factor-12 exerts radioprotective effects on intestinal radiation damage independently of FGFR signaling. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 88(2):377-384.
- [15] Nedaeinia R., Sharifi M., Avan A., Kazemi M., Nabinejad A., Ferns G.A., *et al.* 2017, Inhibition of microRNA-21 via locked nucleic acid-anti-miR suppressed metastatic features of colorectal cancer cells through modulation of programmed cell death 4. *Tumor Biology*. 39(3):1010428317692261.
- [16] Ornitz D.M. and Itoh N. An Introduction to the Fibroblast Growth Factors. *Fibroblast Growth Factors: Biology And Clinical Application-Fgf Biology And Therapeutics*. 1.
- [17] Sato T., Oshima T., Yoshihara K., Yamamoto N., Yamada R., Nagano Y., *et al.* 2009, Overexpression of the fibroblast growth factor receptor-1 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *Oncology reports*. 21(1):211-216.

## Determining the Level of FGF12 Gene Transcript in the Tissue Samples of the Patients with Colorectal Cancer

Khalafian G., Entezari M.\*

Department of Genetics, Faculty of advanced sciences and technology, Islamic Azad University, Tehran medical sciences, Tehran, Iran

\* Email: mentezari@iautmu.ac.ir

Received: 24 February 2019

Accepted: 15 April 2019

### Abstract

Colorectal cancer is the fourth reason of mortality caused by cancer and it is one of the most common cancers of digestive system all over the world. Due to poor awareness with regard to the disease and also its high prevalence, early diagnosis of it is of paramount importance. A wide variety of studies has shown that the signaling pathway of fibroblast growth factor is among the effective pathways in growth and metastasis of tumor cells. Accordingly, this study is aimed at measuring the level of FGF12 gene transcript in tumor margin and tumor tissue of the patients with colorectal cancer. The total RNA was extracted from 30 tumor tissues and 30 healthy tissues in the patients with colorectal cancer and then cDNA was synthesized. The specific primers were designed for FGF12 gene as well as beta-actin and eventually, the mRNA level of the genes under study was measured through RT-PCR method and data analysis was done using REST and SPSS software. The results of this study showed that there has been an increase in FGF12 gene transcript in tumor tissue compared to the healthy tissue; but, the increase was not significant. In the analysis of the other factors, there was a significant difference in FGF12 gene transcript in the patients being at the stages 3 and 4 (High Stage) compared to the ones at the stages 1, 1 and 2 (Low Stage) ( $p=0.043$ ); while, there was no significant difference between the rate of the FGF12 gene transcript and the other clinical factors. Based on the increase in FGF12 gene transcript in the patients being at the stages 3 and 4 of colorectal cancer compared to the ones at the stages 0, 1, and 2, it can be stated that this gene plays a role in tumor creation of colorectal cancer.

**Keywords:** Colorectal Cancer, FGF12, Biomarker, RT-PCR.