

مقایسه بیان ژن *TBX3* در مبتلایان به سرطان سنگفرشی مری و افراد سالم

زهرا احمدزاده نوترکی^۱، مجتبی عمادی بایگی^{۲*}، مریم پیمانی^۳، علی اکبر شایسته^۴

^۱ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۲ گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۳ گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۴ گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۱۹

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: سرطان مری هشتمین سرطان شایع در جهان است. این سرطان در ایران مقام دوم را به خود اختصاص داده است. سالانه ۳/۲ درصد از کل سرطان‌های جدید، به سرطان مری مربوط می‌شود. بیان کنترل نشده ژن‌هایی که در کنترل خودبازسازی سلول‌های بنیادی نقش دارند، از اهمیت زیادی در فرایند سرطانی شدن برخوردار است. هدف از این مطالعه، مقایسه میزان بیان ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری افراد مبتلا به سرطان سنگفرشی مری و نمونه‌های افراد سالم بود.

روش بررسی: این یک مطالعه مورد-شاهد می‌باشد که بر روی ۴۰ نمونه بافتی شامل ۲۰ نمونه بافت توموری و ۲۰ نمونه بافت نرمال از بیماران مبتلا به سرطان مری در بیمارستان امام خمینی شهر اهواز جمع‌آوری شدند. پس از استخراج RNA از بافت‌های پارافینه و ساخت cDNA، با استفاده از روش qRT-PCR سطح بیان نسبی ژن‌های *TBX3* و *GUSB* (به عنوان کنترل داخلی) محاسبه کمی گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج ارزیابی‌های qRT-PCR نشان داد که میانگین میزان بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری نسبت به غیرتوموری، افزایش بیان دارد؛ همچنین میزان بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری در بازه ۵۰ - ۲۶، بالاتر از بازه‌ی سنی ۵۱-۸۱ سال مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نظریه سلول‌های بنیادی سرطانی، بسیاری از تومورها از سلول‌های بنیادی منشا می‌گیرند که منجر به اعطای توانایی مقاومت در برابر عوامل القاءکننده آپاپتوزیس و شیمی‌درمانی می‌شود. با توجه به نقش ژن *TBX3* در خودبازسازی سلول‌های بنیادی و افزایش بیان این ژن در افراد مبتلا به سرطان مری، به نظر می‌رسد که امکان استفاده از ژن *TBX3* به عنوان یک بیومارکر در مراحل تشخیص و پیش‌آگهی سرطان مری در آینده مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان سنگفرشی مری، بیان ژن، *TBX3*، خودبازسازی.

* نویسنده مسئول: مجتبی عمادی بایگی، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

Email: emadi-m@sci.sku.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه از جمله ایران می‌باشد (۱) و تخمین زده می‌شود که میزان شیوع سرطان تا سال ۲۰۲۵ تا حدود ۴۵ درصد در کشورهای پیشرفته افزایش می‌یابد. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که انواع مختلف سرطان‌ها، دومین علت مرگ و میر بعد از سوانح و بیماری‌های قلبی - عروقی می‌باشد. بیش از ۸۰ درصد موارد بیماری در کشورهای کمتر توسعه یافته رخ می‌دهد. میزان بروز سرطان مری در مردان دو برابر زنان است (۲). سرطان مری هشتمین سرطان شایع در جهان (۲) و دومین سرطان شایع در مردان ایران می‌باشد (۳). این سرطان همه ساله هزینه‌های سنگین انسانی و مادی را به جامعه تحمیل می‌کند (۱) و با حدود ۴۵۶۰۰۰ مورد جدید در سال ۲۰۱۲ (۳/۲ درصد از کل)، ششمین علت مرگ ناشی از سرطان با حدود ۴۰۰۰۰۰ مورد مرگ (۴/۹ درصد از کل) می‌باشد، این آمار شامل هر دو نوع سرطان مری و زیر مجموعه‌های آنها می‌باشد (۲). اگر چه در شمال شرق ایران میزان بروز (استاندارد شده از نظر سن) برای سرطان مری در دهه‌های اخیر کاهش یافته است، ولی هنوز اولین سرطان شایع در این منطقه در هر دو جنس (در مردان ۴۳/۳ در ۱۰۰۰۰۰ و در زنان ۳۶/۳ در ۱۰۰۰۰۰) به شمار می‌رود (۴)، در حالی که این رقم در مناطق جنوبی کشور در حدود ۳ در ۱۰۰۰۰۰ مورد است (۵).

ژن *TBX3* تنظیم کننده اصلی حفظ فرآیند

خودبازسازی در سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشد و باعث مهار فرآیند تمایز در طی تکوین جنین می‌شود. مطالعه‌ها نشان داده است که افزایش بیان این ژن خاصیت پرتوان را هم در سلول‌های بنیادی موش و هم در انسان افزایش می‌دهد (۶). جایگاه ژن *TBX3* انسان روی کروموزوم 12q24.21 است و این ژن شامل ۸ اگزون می‌باشد و طول آن بیش از ۹ کیلو باز می‌باشد. شبکه تنظیمی ژن‌های *OCT4*، *NANOG* و *SOX2* باعث تنظیم ژن *TBX3* می‌شوند و هر دو مسیر با همکاری متقابل در تنظیم خودتجدیدی و مهار تمایز سلول‌های بنیادی جنینی نقش اساسی ایفا می‌کنند (۷). ژن *TBX3* به عنوان یک ژن مهار کننده مرگ سلولی شناسایی شده است. بیان ژن *TBX3* به وسیله مسیر *Wnt-β catenin* فعال می‌شود و باعث تکثیر و حفظ سلول‌های سرطانی می‌گردد (۸).

به دلیل شیوع بالای سرطان مری و ضعف‌های موجود در روش‌های متداول تشخیص آن که دارای دقت و حساسیت نمی‌باشد، شناسایی تومور مارکرهایی که بتوانند ماهیت بیولوژیکی تومورها را پیش‌بینی کنند اهمیت زیادی خواهد داشت. هدف از مطالعه حاضر، مقایسه میزان بیان ژن *TBX3* بین بیماران مبتلا به سرطان سنگفرشی مری و افراد سالم با استفاده از روش qRT-PCR است زیرا بیان ژن مذکور ممکن است علاوه بر آن که توانایی بالقوه استفاده به عنوان مارکر حالت سرطانی را دارا باشد، یکی از ژن‌های کلیدی در ویژگی خودبازسازی

سلول‌های بنیادی و مهارکننده تمایز این سلول‌ها می‌باشد. از طرف دیگر نقش مهم این ژن در سلول‌های بنیادی، می‌تواند تأیید دیگری برای نظریه سلول‌های بنیادی سرطانی بوده و خصوصیات بن یاخته‌های سرطانی یک تومور را بازگو کند.

روش بررسی

این یک مطالعه مورد-شاهد می‌باشد که بر روی ۴۰ نمونه بیوپسی پارافینه بافت مری مورد بررسی قرار گرفت که ۲۰ بلوک مربوط به بافت پارافینه سرطان سنگفرشی مری و ۲۰ بلوک بافت پارافینه سالم مری (کنترل) که بیماری و سلامت آن‌ها از نظر بالینی و پاتولوژی، تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و با توجه به علایم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی تأیید شده بود، از بیمارستان امام خمینی شهر اهواز جمع‌آوری گردید. مشخصات کلینیکو پاتولوژی بیماران مورد بررسی در این مطالعه، در جدول ۱ آمده است. سپس ۳۰ میلی‌گرم از بافت پارافینه هر بیمار به منظور انجام آزمایش‌های مولکولی انتخاب و با میکروتوم به صورت ورقه‌هایی به ضخامت ۱۰ میکرون برش زده شد و با آن - هپتان و متانول عمل پارافین زدایی صورت گرفت.

به منظور استخراج RNA و سنتز cDNA، RNA تام، با استفاده از کیت استخراج RNase FFPE کیژن طبق دستور العمل شرکت سازنده تخلیص و بلافاصله جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای سنتز cDNA حداکثر مقدار از RNA استخراج شده با

استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت Prime Script™ RT Enzyme Mix شرکت تاکارا ژاپن، در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد.

برای انجام آزمایش qRT-PCR از دستگاه RG-6000 (Corbett, Australia)، و کیت SYBR®Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, Japan) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش به وسیله نرم‌افزار Gene Runner طراحی شد و اختصاصی بودن الیگوهای طراحی شده برای ژن هدف به وسیله برنامه BLAST تأیید گردیدند. توالی پرایمرها در جدول ۲ آورده شده است. هر واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix، ۰/۲ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر cDNA و ۳/۶ میکرولیتر آب مقطر انجام گردید. پس از تهیه حجم مورد نظر، واکنش PCR در ۴۰ سیکل، شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. یک مرحله اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و یک مرحله پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه نیز در ابتدا و انتهای چرخه‌ها انجام شد. هم‌چنین ژن *Glucuronidase (GUSB)*، *Beta*، ژنی با قابلیت ثبات در شرایط مختلف (Reference Gene)، به منظور مقایسه و سنجش درستی بیان ژن اصلی استفاده شد (۹). برنامه دمایی PCR هم برای ژن مورد نظر و هم برای ژن مرجع یکسان انتخاب گردید. پس از اتمام

۸ درصد قرار گرفت و مشاهده شد که در هر کدام از واکنش‌های انجام شده با پرایمرهای *TBX3* و *GUSB* تنها یک باند اختصاصی وجود دارد که این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه‌های ما را تأیید کرد.

پس از انجام Real-time PCR، منحنی تکثیر cDNA برای ژن‌های *TBX3* و *GUSB* در هر نمونه رسم شد و Ct هر کدام تعیین گردید (شکل ۲ و ۳).

بررسی میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* (نرمال شده نسبت به ژن مرجع *GUSB*) در ۲۰ نمونه پارافینه توموری مری و ۲۰ نمونه‌ی غیرتوموری (نمودار ۱) با استفاده از روش qRT-PCR انجام شد. مقایسه میزان میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری نسبت به غیرتوموری در آزمون آماری تی تست با $p < 0/05$ نشان داد که میانگین میزان بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری نسبت به غیرتوموری، افزایش بیان دارد، اما این اختلاف، معنی‌دار نبود (نمودار ۱).

الگوی بیان ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری در بازه‌های سنی ۵۰ - ۲۶ و ۵۱-۸۱، بررسی میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* (نرمال شده نسبت به ژن مرجع *GUSB*) در ۲۰ نمونه پارافینه توموری مری در بازه‌های سنی ۵۰ - ۲۶ و ۵۱-۸۱ سال انجام شد. مقایسه میزان میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری در بازه‌های سنی ذکر شده در آزمون آماری تی تست با $p < 0/05$ نشان داد که میانگین میزان بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری در بازه‌ی سنی ۵۱-۸۱، به طور معنی‌دار بالاتر از بازه سنی ۵۰ - ۲۶ می‌باشد ($p = 0/04$) (نمودار ۲).

چرخه‌های PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۱ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه و بین دمای ۶۵-۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی اختصاصیت واکنش PCR رسم گردید. از هر نمونه سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت.

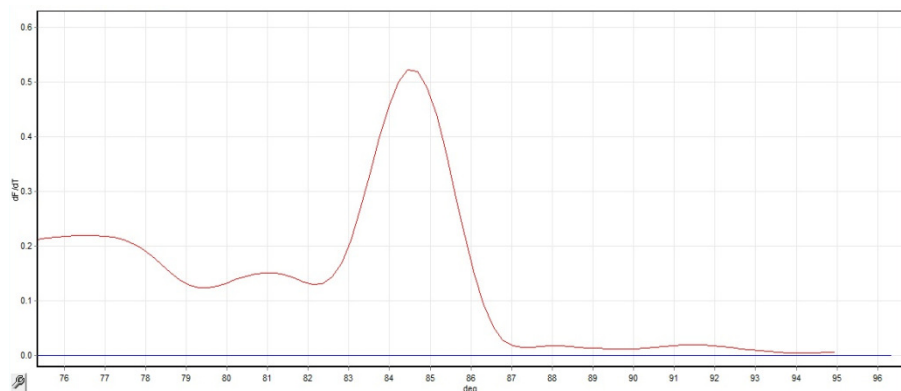
جهت کمی‌سازی نسبی بیان ژن از روش لیواک استفاده شد؛ در روش لیواک (۱۰) با فرض این که Efficiency ژن مورد نظر و ژن مرجع با هم برابر هستند می‌توان تغییرات بیان را محاسبه کرد. مزیت روش $\Delta\Delta CT$ در سهولت مراحل کار است و یک بار رسم منحنی استاندارد کافی می‌باشد و در صورتی از این روش استفاده می‌شود که کارایی PCR در نمونه‌های کنترل و هدف نزدیک به ۱۰۰ درصد باشد و بین آنها تفاوت کارایی PCR بیشتر از ۱۰ درصد نباشد. جهت بررسی آماری داده‌ها، شامل مشخصات بیماران و محاسبه میزان بیان نسبی بیان ژن و بررسی شدت بیان در نمونه‌های توموری و غیرتوموری و مقایسه‌ی آن‌ها، از نرم افزار SPSS استفاده شد. همچنین به منظور مقایسه شدت بیان ژن میان نمونه‌های توموری و غیرتوموری از آزمون تی تست جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها

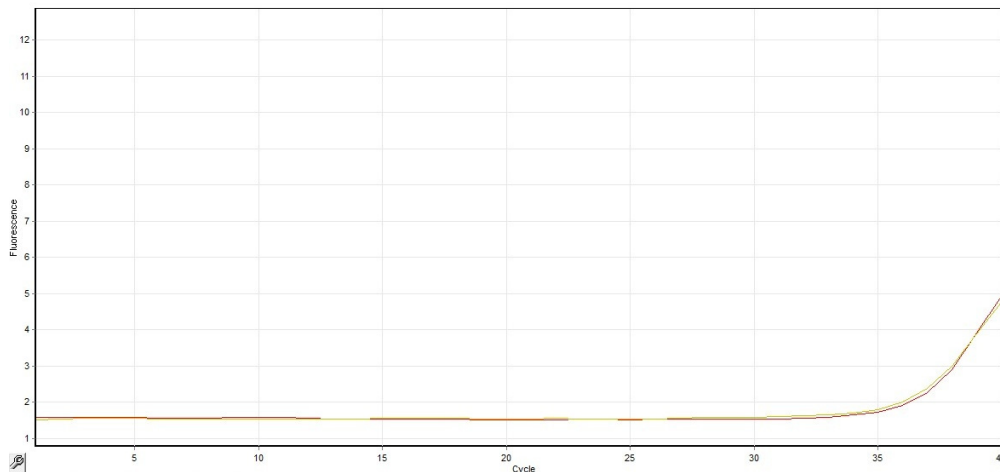
بررسی بیان ژن *TBX3* به روش qRT-PCR انجام شد. منحنی ذوب ژن‌های *TBX3* و *GUSB* به صورت تک قله به دست آمد که این خود بیان‌گر تنها یک محصول خاص در PCR است (شکل ۱). در ضمن محصول PCR نیز بر روی ژل پلی آکریل آمید

جدول ۱: مشخصات بیماران مبتلا به سرطان مری مورد بررسی در این مطالعه

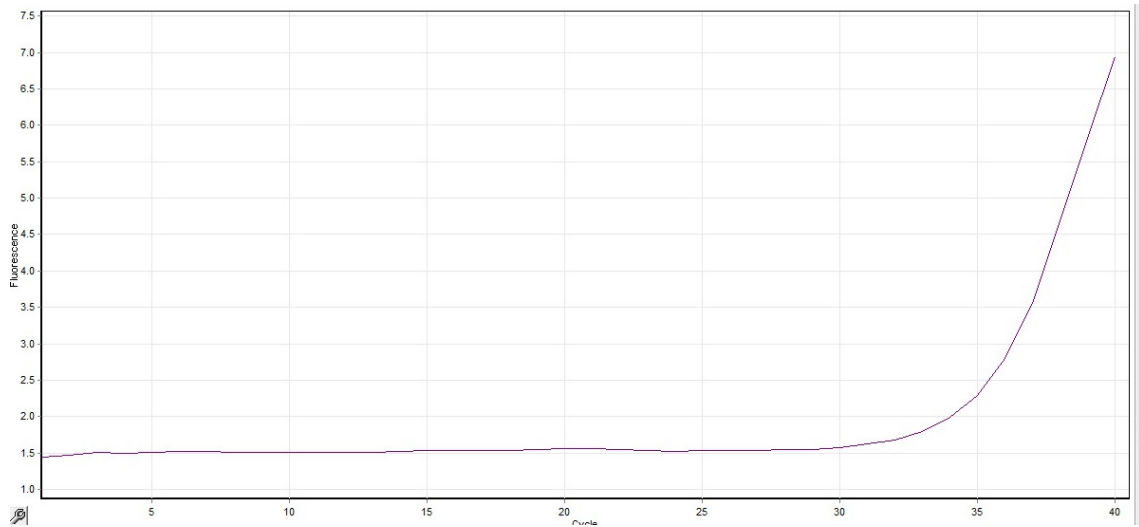
فراوانی (درصد)	خصوصیات
۱۲ (۶۰)	جنسیت مرد
۸ (۴۰)	جنسیت زن
۹ (۴۵)	تعداد افراد بین ۲۶-۵۰ سال
۱۱ (۵۵)	تعداد افراد بین ۵۱-۸۱ سال
۲۰ (۱۰۰)	نوع تومور سنگفرشی مری
۰ (۰)	نوع تومور آدنوکارسینوما



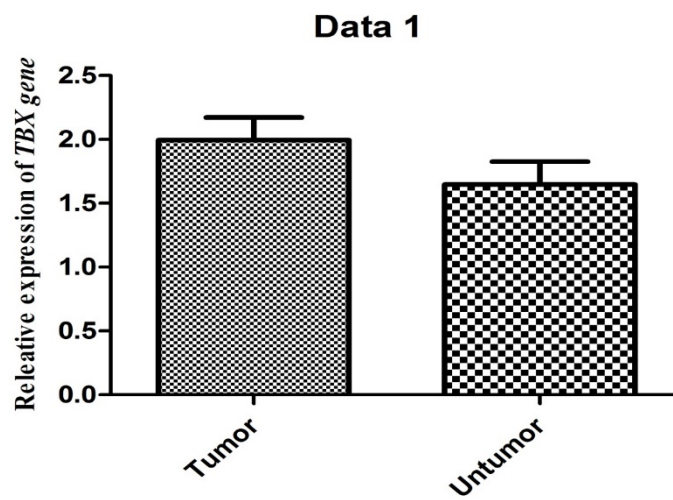
شکل ۱: منحنی ذوب مربوط به ژن *TBX3* در نمونه‌های بافت مری



شکل ۲: منحنی تکثیر ژن *GUSB* در نمونه‌های بافت مری

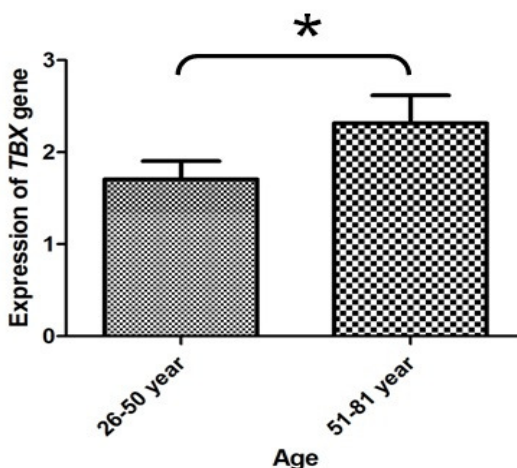


شکل ۳: منحنی تکثیر ژن *TBX3* در نمونه‌های بافت مری



نمودار ۱: مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری و غیر توموری پارافینه مری. با مقایسه هیستوگرام‌ها، میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* (نرمال شده نسبت به *GUSB*) در بافت‌های توموری نسبت به غیر توموری بالاتر است. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

I



نمودار ۲: مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* در نمونه‌های توموری در بازه‌های سنی ۲۶-۵۰ و ۵۱-۸۱ با مقایسه هیستوگرام‌ها، میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* (نرمال شده نسبت به *GUSB*) در بافت‌های توموری در بازه‌ی سنی ۵۱-۸۱ بالاتر است. نتایج به صورت میانگین ± انحراف‌معیار نشان داده شده است. علامت * نشانه معنی‌داری تفاوت میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* در بافت‌های توموری در بازه‌ی سنی ۵۱-۸۱ با استفاده از آزمون تی‌تست با $p < 0.05$

جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده در روش q RT-PCR

اندازه محصول	توالی پرایمر	نام ژن
۱۴۸ bp	F: 5'- CCA TGA GGG TGT TTG ATG AAA GAC -3' R: 5'- CGA ACC TCA AAG ATT TAT GTC CC -3'	TBX3
۱۲۳ bp	F: 5'- CAC GAC ACC CAC CAC CTA CATC -3' R: 5'- GAC GCA CTT CCA ACT TGA ACAG -3'	GUSB

بحث

خودبازسازی سلول‌های بنیادی نقش دارند به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده اند که بیان کنترل نشده آنها از اهمیت زیادی در فرایند سرطانی شدن برخوردار است. مطالعه‌های انجام شده در ایران نشان دهنده میزان بالای خطر ابتلا به سرطان مری در نواحی ساحلی دریای خزر (شمال ایران) است. هم‌چنین

سرطان یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه از جمله ایران می‌باشد. سرطان‌ها، دومین علت مرگ و میر پس از سوانح و بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد. در میان بیماری‌های سرطان، سرطان مری هشتمین سرطان شایع دنیا می‌باشد. امروزه ژن‌هایی که در کنترل

حاضر، بیان این ژن در ۲۰ نمونه پارافینه بافت توموری و ۲۰ نمونه پارافینه بافت غیر توموری، مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور، بهینه‌سازی شرایط تکثیر ژن *TBX3* و ژن کنترل داخلی با استفاده از واکنش PCR معمولی و Real time صورت پذیرفت. نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص کرد که میانگین بیان نسبی ژن *TBX3* در بافت‌های توموری نسبت به غیر توموری افزایش بیان دارد، اما این اختلاف به طور معنی‌دار نبود. بازآوری داده‌های میکرواری از پایگاه داده ای انکوماین (۱۹) نشان می‌دهد که این ژن در مطالعه‌های مختلفی افزایش بیان در سرطان مری نسبت به نمونه‌های نرمال را نشان می‌دهد که از جمله این مطالعه‌ها می‌توان به مطالعه کیمچی و همکاران (۲۰)، بیتتر و همکاران (۲۱)، هاو و همکاران (۲۲)، هو و همکاران (۲۳)، و سو و همکاران (۲۴) اشاره نمود.

ایتو و همکاران نشان دادند که افزایش بیان ژن *TBX3* موجب افزایش تکثیر سلول‌های اپیتلیالی و سرطان مثانه در موش می‌شود. همچنین در این مطالعه ژن *TBX3* به عنوان یک ژن مهار کننده آپاپتوزیس شناسایی شد و مشخص شد که بیان ژن *TBX3* به وسیله مسیر Wnt- β catenin فعال شده و باعث تکثیر و حفظ سلول‌های سرطانی می‌شود (۸). پرز و پریس، بیان کردند فاکتور رونویسی *T-box*، *TBX3*، در چندین سرطان افزایش بیان داشته و به عنوان یک هدف شیمی‌درمانی ارابه شده است. شواهد نشان می‌دهد که *TBX3* ممکن است یک نقش کلیدی برای

مطالعه‌های سال ۲۰۰۸ که در استان کرمان انجام گرفته است، بیان گر افزایش ۱۱ درصدی خطر ابتلا به آدنوکارسینوم در سال است (۱۲ و ۱۱). بر اساس نظریه جدید اشتقاق سلول‌های سرطانی از سلول‌های بنیادی بسیاری از تومورها از سلول‌های بنیادی بافت‌های تمایز یافته منشأ می‌گیرند (۱۴ و ۱۳). در هر توده توموری، تعداد اندکی از سلول‌ها به سلول‌های بنیادی شباهت دارند. این سلول‌ها، دارای توانایی مقاومت در برابر عوامل القاءکننده آپاپتوزیس و شیمی‌درمانی می‌باشند و پیشنهاد می‌شود یکی از عوامل بازگشت سرطان پس از انهدام تومورهای اولیه، حضور این سلول‌ها در ناحیه توموری باشد (۱۶ و ۱۵). با توجه به نکاتی که ذکر شد، شیوع بالای سرطان مری و ضعف‌های موجود در روش‌های متداول تشخیص آن که دارای دقت و حساسیت کافی نمی‌باشد؛ شناسایی تومور مارکرهایی که بتوانند ماهیت بیولوژیکی تومورها را پیش‌بینی کنند اهمیت زیادی خواهد داشت

مطالعه کارلسون و همکاران نشان دادند که ژن *TBX3* فرآیند خودتجدیدی را در سلول‌های بنیادی در مراحل تکوین جنینی تنظیم می‌کند (۱۷). در مطالعه‌های یاروش و همکاران افزایش بیان ژن *TBX3* با مهار ژن *P14* باعث افزایش تقسیم سلول‌های اپیتلیالی شده و می‌تواند منجر به بروز سرطان سینه شود، اما مکانیسم آن ناشناخته است (۱۸). از آنجایی که تا کنون بیان ژن *TBX3* در بافت‌های توموری و نرمال مری انسان مطالعه نشده بود، در پژوهش

واحد شهرکرد می‌باشد، که بدون حمایت مالی آن دانشگاه انجام شد. محققان همچنین، سپاسگزاری خود را از خانم محبوبه گنجی بیان می‌دارند.

ملانوم بدخیم، که یک بیماری بسیار تهاجمی و مقاوم به درمان است داشته باشد. در تحقیق مذکور برای اولین بار نشان داده شد (شرایط آزمایشگاهی و درون بدن) که بیان بیش از حد ژن *TBX3* در سلول‌های ملانوم غیر تومورژنیک اولیه برای تشکیل و تهاجم تومور کافی است. علاوه بر این، *TBX3* ممکن است نقش مهمی به عنوان یک سوئیچ متقابل بین تکثیر سلولی وابسته به بستر و تهاجم تومور را بازی کند (۲۵). در مطالعه دیگری، چن و همکاران نشان دادند که بیان mRNA مربوط به *TBX3* در سرطان سینه در مقایسه با بافت‌های مجاور، افزایش قابل توجهی یافته بود. همچنین بیان *TBX3* mRNA در سرطان سینه متاستاتیک به طور قابل توجهی بالاتر از تومورهای غیر متاستاتیک بود (۲۶).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، به نظر می‌رسد که بیان ژن *TBX3* در سرطان سنگفرشی مری افزایش می‌یابد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً با توسعه مطالعه مقدماتی حاضر در زمینه بیان ژن *TBX3* و نقش آن در سرطان مری، از آن به عنوان تومور مارکری بالقوه در تشخیص، پیش‌آگهی و درمان سرطان مری استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی

REFERENCES

1. Yazdanbod E, Samadi F, Malekzade R, Babaie M, Iranparvar M, Azami A. Four-Year Survival Rate of Patients with Upper GI Cancer in Ardabil. *J Ardabil Univ Med Sci* 2005; 5(2): 180–4.
2. Kiadaliri AA. Gender and social disparities in esophagus cancer incidence in Iran, 2003-2009: a time trend province-level study-Asian pac j cancer prev. 2014; 15(2): 623-70
3. Malekzadeh R, Semnani SH, Sajjadi S A. Esophageal cancer in Iran. *Gastroenterology* 2008; 1(62): 25-34.
4. Semnani S, Sadjadi A, Fahimi S, Nouraie M, Naeimi M, Kabir J. Declining incidence of esophageal cancer in the Turkmen Plain, eastern part of the Caspian Littoral of Iran: a retrospective cancer surveillance. *Cancer Detect Prev* 2006; 30(1): 14–9.
5. Bagheri Lankarani K, Mola A, Asadian F, Tabei SZ, Panjeshahin MR. Changing epidemiology of esophageal cancer in fars province, Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences* 2002; 27(1): 4–10.
6. Galan-Cardiad JM, Harel S, Arenzana TL, Hou ZE, Doetsch FK, Mirny LA, et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* 2007; 129(2): 345–57.
7. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; 442(7102): 533–8.
8. Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, Takahashi S, Shirai T. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer Lett* 2005; 219(1): 105–12.
9. Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, et al. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes* 2005; 19(2): 101-9.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402–8.
11. Kamangar F, Malekzadeh R, Dawsey SM, Saidi F. Esophageal cancer in Northeastern Iran: a review. *Arch Iran Med* 2007; 10(1): 70–82.
12. Haghdoost AA, Hosseini H, Chamani G, Pourhoseingholi M.A, Pourhoseingholi A, Ashtari S. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Kerman, Iran. *Arch Iran Med* 2008; 11(4): 364–70.
13. Gostjeva EV, Thilly WG. Stem cell stages and the origins of colon cancer: a multidisciplinary perspective. *Stem Cell Rev* 2005; 1(3): 243–51.
14. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006; 124(6): 1111–5.
15. Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Sasaki A, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Hum Cell* 2006; 19(1): 24–9.
16. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23(43): 7274–82.
17. Carlson H, Ota S, Campbell CE, Hurlin PJ. A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; 10(21): 2403–13.
18. Yarosh W, Barrientos T, Esmailpour T, Lin L, Carpenter PM, Osann K, et al. TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res* 2008; 68(3): 693–9.
19. Rhodes DR, Jianjun Y, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. Oncomine: A Cancer Microarray Database and Integrated Data-Mining. *Platform Neoplasia* 2004; 6(1): 1–6.
20. Kimchi ET, Posner MC, Park JO, Darga TE, Kocherginsky M, Karrison T, et al. Progression of Barretts metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. *Cancer Res* 2005; 65(8): 3146-54.
21. Bittner M. International Genomics Consortium Expression Project for Oncology (expO) - All samples. International Genomics Consortium, 2006 Sep 13 Phoenix AZ, Arizona.
22. Hao Y, Triadafilopoulos G, Sahbaie P, Young HS, Omary MB, Lowe AW. et al. Gene expression profiling reveals stromal genes expressed in common between Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2006; 131(3): 925-33.
23. Hu N, Clifford RJ, Yang HH, Yang H, Wang C, Goldstein A, et al. Genome wide analysis of DNA copy number neutral loss of heterozygosity (CNNLOH) and its relation to gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Genomics* 2010; 18(11): 576.
24. Su H, Hu N, Yang HH, Wang C, Takikita M, Wang QH, et al. Global gene expression profiling and validation in esophageal squamous cell carcinoma and its association with clinical phenotypes. *Clin Cancer Res* 2011; 17(9): 2955-66.

25. Peres J, Prince S. The T-box transcription factor, TBX3, is sufficient to promote melanoma formation and invasion. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 117.
26. Chen Z, Lü G, Ji T. Expression of TBX3 mRNA and its role in the pathogenesis and metastasis of breast cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2009; 29(1): 87-9.

Comparison of *TBX3* Gene Expression among Patients with Squamous Esophageal Cancer and Normal Individuals

Ahmadzadeh-Notarki Z¹, Emadi-Baygi M^{2*}, Peymani M³, Shayesteh A⁴

¹Biotechnology Research Center, Islamic Azad University of Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran,
²Department of Genetics, Research Institute of Biotechnology, University Of Shahrekord, Shahrekord, Iran,
³Biotechnology Research Center, School of Basic Sciences, Islamic Azad University of Shahrekord Branch,
Shahrekord, Iran, ⁴ Department of Internal Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences,
Ahvaz, Iran

Received: 13 Feb 2016 Accepted: 9 Jul 2016

Abstract

Background & aim: Esophageal cancer is the eighth most prevalent cancer worldwide and the second in Iran. Annually, esophageal cancer makes up 3.2% of all new cancer cases. Altered expression of stem cells self-renewal genes is of great importance in the tumorigenesis. The aim of this study was to compare the *TBX3* gene expression in tumoral samples of patients with squamous esophageal cancer and normal tissue samples of healthy individuals.

Methods: The present cross-sectional study was performed on 40 samples, including 20 samples of tumor esophageal cancer tissue and 20 samples of normal tissue samples from Imam Khomeini Hospital in Ahwaz, Iran. After extracting RNA from FFPE tissues and synthesizing cDNA, expression levels of *TBX3* and *GUSB* (as internal control) genes were relatively quantified using qRT-PCR. Data were analyzed using t-test.

Results: The results of the qRT-PCR analyses showed that the average relative gene expression in tumor samples was higher than normal samples. Furthermore, *TBX3* gene expression exhibited greater expression in the tumor samples of the patients in the 26-50 years age range in compared with the 51-81 years age range

Conclusion: According to the cancer stem cell theory, many tumors originated from stem cells leading to the inhibition of apoptosis and resistance to chemotherapy. Considering the role of *TBX3* gene in self-renewal of stem cells and its increased expression in patients with squamous esophageal cancer, it seems that *TBX3* gene might be used as a biomarker in the diagnosis and prognosis of esophageal cancer in future.

Keywords: Squamous esophageal cancer, gene expression, *TBX3*, self-renewal

Corresponding author: Emadi-Baygi M, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Research Institute of Biotechnology, University Of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

Email: emadi-m@sci.sku.ac.ir

Please cite this article as follows:

Ahmadzadeh-Notarki Z, Emadi-Baygi M, Peymani M, Shayesteh A. Comparison of *TBX3* Gene Expression among Patients with Squamous Esophageal Cancer and Normal Individuals. *Armaghane-danesh* 2016; 21 (4): 348-359.