

افزایش میزان بیان ژن ویژه‌ی توقف رشد ۲ (GAS2) در سرطان کولورکتال و ارتباط آن با پیشرفت و

پیش‌آگهی بیماری

بهزاد ایزدی اجیرلو^۱، صیاد بسطامی‌نژاد^۲، غلام بسطامی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژن ویژه‌ی توقف رشد ۲ (GAS2 یا Growth arrest-specific 2) در فعالیت‌های سلولی متعددی مانند چرخه‌ی سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده و تکثیر سلولی دخالت دارد و ممکن است به طور بالقوه در گسترش سرطان نقش داشته باشد. با این حال، ارتباط GAS2 با پیشرفت و پیش‌آگهی سرطان کولورکتال مشخص نیست و نیاز به بررسی دارد. بنابراین، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی رابطه‌ی بین بیان GAS2 بافت توموری با گسترش و پیش‌آگهی سرطان کولورکتال انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، نمونه‌های جراحی بافت توموری و بافت سالم مجاور آن، از ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال در انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی تهران جمع‌آوری گردید و میزان نسبی GAS2 بافت‌ها با روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) کمی سنجش گردید. ارتباط میزان بیان GAS2 در بافت توموری با پارامترهای بالینی-آسیب‌شناختی و میزان بقای کلی بیماران مشخص گردید.

یافته‌ها: میزان نسبی GAS2 در بافت‌های توموری نسبت به بافت‌های سالم مجاور افزایش قابل توجهی داشت [۱/۹۶ (۱/۱۷-۳/۴۰) در مقابل ۱/۱۰ (۱/۰۰-۱/۳۱)؛ $P < 0.001$]. به علاوه، میزان نسبی GAS2 در بافت‌های توموری ارتباط معنی‌داری با ویژگی‌های آسیب‌شناختی سرطان نظیر مرحله‌بندی Tumor spread، Lymph node و Metastasis (TNM) ($P = 0.010$)، درجه ($P = 0.010$)، اندازه ($P = 0.030$) و تهاجم تومور به سیستم لنفاوی ($P = 0.030$) و عروقی ($P = 0.040$) و همین‌طور کاهش بقای کلی بیماران ($P = 0.040$) نشان داد.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان GAS2 در سرطان کولورکتال با شاخص‌های پیشرفت سرطان و پیش‌آگهی ضعیف بیماری ارتباط دارد و بنابراین، ممکن است به عنوان یک نشانگر زیستی پیش‌آگهی در سرطان کولورکتال عمل کند.

واژگان کلیدی: پروتئین Growth arrest-specific 2 انسانی، مرحله‌بندی سرطان، پیش‌آگهی

ارجاع: ایزدی اجیرلو بهزاد، بسطامی‌نژاد صیاد، بسطامی غلام. افزایش میزان بیان ژن ویژه‌ی توقف رشد ۲ (GAS2) در سرطان کولورکتال و ارتباط آن با پیشرفت و پیش‌آگهی بیماری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۱۵): ۹۳-۱۰۰

برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی است (۴-۶). پروتئین ژن GAS2 از طریق مهار کردن فعالیت یک آنزیم سرین پروتئاز فعال شونده با کلسیم به نام کالپین-۲، حساسیت سلول را به مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی وابسته به P53 افزایش می‌دهد (۷). مهار بیان ژن GAS2 در فیبروبلاست‌های جنین موش به افزایش تکثیر این سلول‌ها منجر شده است (۸).

نقش ژن GAS2 در چندین سرطان مختلف نشان داده شده است. محور GAS2-Calpain2 نقش بسیار مهمی در رشد سلول‌های لوکمیک دارد و افزایش بیان GAS2 در رده‌های سلولی لوکمیک

مقدمه

سرطان کولورکتال، یکی از متداول‌ترین سرطان‌های مجرای گوارشی است که هنوز به عنوان یک عامل عمده‌ی مرگ و میر در سراسر جهان عمل می‌کند (۱-۲).

بیان نابه‌جای ژن‌هایی که برای تنظیم چرخه، تکثیر و مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی ضروری باشند، می‌تواند در ایجاد سرطان کولورکتال نقش داشته باشد (۳). یکی از این ژن‌ها، ژن ویژه‌ی توقف رشد ۲ (GAS2 یا Growth arrest-specific 2) می‌باشد که دارای فعالیت‌های متعددی نظیر تنظیم ریخت‌شناسی، چرخه و مرگ

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلان، ایلان، ایران

۲- استادیار، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلان، ایلان، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلان، ایلان، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: غلام بسطامی
Email: basati-gh@medilam.ac.ir

انستیتو کانسر نگهداری شده بودند. اطلاعات مربوط به خصوصیات بالینی و آسیب شناختی بیماران مانند سن، جنس، اندازه، مرحله بندی Tumor spread، Lymph node و Metastasis (TNM)، درجه، میزان درگیری لنفاوی و عروقی، وضعیت متاستاز و میزان بقای کلی بیماران با بررسی پرونده‌ی پزشکی و پی گیری آن‌ها فراهم گردید. افرادی که به دیگر انواع سرطان‌ها یا بیماری‌های التهابی مجرای گوارشی دچار بودند، در این مطالعه وارد نشدند. همچنین، افرادی که قبل از عمل جراحی تحت دیگر انواع مداخلات درمانی (پرتودرمانی، شیمی درمانی و جراحی قبلی) قرار گرفته بودند نیز از مطالعه حذف شدند. از همه‌ی افراد تحت مطالعه قبل از عمل جراحی رضایت‌نامه‌ی کتبی آگاهانه دریافت شده بود. این مطالعه، با تأیید کمیته‌ی اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام انجام گردید.

استخراج RNA از نمونه‌های بافتی: محتوای RNA کلی همه‌ی نمونه‌های بافتی (بافت توموری و سالم اطراف آن) با استفاده از کیت تجاری RNA (Qiagen, Rneasy Microarray Tissue Mini Kit) استخراج و مطابق با دستورالعمل سازندگان آن استخراج گردید. برای اطمینان از حذف هر گونه بقایای احتمالی DNA ژنومی نمونه‌ها بر اساس دستورالعمل کیت به مدت ۱۵ دقیقه تحت تأثیر هضم DNase بر روی ستون (RNase-free DNase Set, Qiagen) قرار گرفتند. برای ارزیابی کمیت و خلوص RNAهای استخراج شده، جذب نوری با کمک دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ (جذب در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر) امتحان گردید. کیفیت RNAهای استخراج شده نیز با کمک الکتروفورز بر روی ژل آگارز مشخص گردید. همه‌ی RNAهای استخراج شده تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند.

رونویسی معکوس RNA کلی به DNA complementary

(cDNA): به منظور سنتز cDNA مقدار ۵۰۰ نانوگرم از هر نمونه RNA استخراج شده (بعد از ذوب شدن بر روی یخ) با استفاده از کیت تجارتي سنتز cDNA (Takara, Otsu, Japan) مطابق دستورالعمل سازندگان آن رونویسی معکوس شدند. به طور خلاصه، فرایند رونویسی معکوس بر روی دستگاه Thermal cycler در یک چرخه‌ی دمایی ۳۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس، یک مرحله‌ی غیر فعال‌سازی آنزیمی در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام پذیرفت. cDNAها برای انجام فرایند Quantitative real-time polymerase chain reaction (qReal-time PCR) در مرحله‌ی بعدی در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند.

انجام qReal-time PCR برای انجام واکنش

میلونیدی و لنفوئیدی حاد با رشد این سلول‌های لوکمیک همراه بوده است (۹). سرکوب بیان ژن GAS2 در رده‌های سلولی سرطان کولورکتال، باعث کند شدن رشد و القای تجزیه‌ی پروتئین β -کاتین در آن‌ها شده است (۱۰). پروتئین β -کاتین، باعث تحریک خصوصیات تهاجمی و متاستاز در سلول‌های سرطان کولورکتال می‌شود (۱۱).

همچنین، در آزمایش‌هایی بر روی رده‌های مختلف سلولی سرطان کولورکتال، نشان داده شد که افزایش میزان بیان GAS2 با میزان رشد سلولی، تنظیم چرخه‌ی سلولی و حساسیت به شیمی‌درمانی در آن رده‌های سلولی ارتباط چشم‌گیری دارد (۱۲). افزایش میزان بیان ژن GAS2 در سلول‌های سرطان کولورکتال، ارتباط قابل توجهی با نشانگرهای زیستی تکثیر سلولی مانند Ki-67، MCM-2 (Minichromosome maintenance 2) و پروتئین ضد مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی Bcl-2 نشان داده است (۱۳). به طور کلی، افزایش میزان بیان ژن GAS2 در سلول‌های سرطان کولورکتال (۱۴)، سلول‌های لوکمیای میلونیدی مزمن (۱۵) و آدنوکارسینوما ریه (۱۶) گزارش شده است.

از نقطه نظر بالینی، مطالعات چندانی در مورد نقش GAS2 در سرطان کولورکتال وجود ندارد. به تازگی، تنها در مطالعه‌ی Huang و همکاران، مشخص گردید که افزایش میزان بیان GAS2 در نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، با افزایش عود بیماری همراه است (۱۲). از آن جایی که اطلاعات چندانی در مورد میزان بیان ژن GAS2 در بافت توموری سرطان کولورکتال و ارتباط آن با پیشرفت و پیش‌آگهی بیماری وجود ندارد، در این مطالعه میزان بیان ژن GAS2 در نمونه‌های بافت توموری و بافت سالم مجاور آن‌ها در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال مورد سنجش قرار گرفت و ارتباط میزان بیان آن با مشخصات بالینی و آسیب‌شناسی و نیز پیش‌آگهی بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

بیماران و جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه، به طور کلی، ۴۰ نمونه‌ی بافت توموری اولیه به همراه ۴۰ نمونه‌ی بافت سالم مجاور آن‌ها (بافت سالم به فاصله‌ی بیشتر از ۵ سانتی متر از بافت توموری) از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال که از پیش در طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۶ به طور متوالی در انستیتو کانسر تهران تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، تهیه گردید. تشخیص سرطان کولورکتال بر اساس یافته‌های بالینی و سپس، هیستوپاتولوژیکی استوار بود. نمونه‌های بافت توموری و بافت سالم مجاور آن بعد از عمل جراحی به صورت آبی در درون نیتروژن مایع منجمد گردید و تا زمان استخراج RNA از بافت در همان شرایط در بانک تومور

تکثیر cDNA این دو ژن اطمینان حاصل شود. بر این اساس، ژن شاهد داخلی β -اکتین به عنوان یک ژن طبیعی‌سازی مناسب برای تغییرات بین نمونه‌ای mRNA GAS2 مورد استفاده قرار گرفت و میزان بیان طبیعی‌سازی شده‌ی GAS2 نمونه‌ها، با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (۱۸).

مطابق این روش، ابتدا CT هر نمونه تعیین و سپس مقادیر ΔCT و $\Delta\Delta CT$ با استفاده از روابط ۱ و ۲ محاسبه گردید:

$$\text{رابطه‌ی (۱) } (\beta\text{-اکتین}) - CT = \Delta CT \text{ (نمونه)}$$

$$\text{رابطه‌ی (۲) } (\text{بافت سالم}) - \Delta CT = \Delta\Delta CT \text{ (بافت توموری)}$$

مقدار mRNA طبیعی‌سازی شده در هر نمونه‌ی بافتی (بافت توموری یا سالم مجاور) برابر با $2^{-\Delta\Delta CT}$ خواهد بود. در واقع، با این روش، میزان بیان ژن GAS2 در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور آن به صورت مقایسه‌ای محاسبه می‌گردد.

تجزیه و تحلیل آماری: همه‌ی داده‌ها به صورت میانه (دامنه‌ی بین چارکی) و تعداد (درصد) نشان داده شدند. تفاوت میزان نسبی mRNA GAS2 بافت توموری در مقایسه با بافت سالم مجاور آن از طریق آزمون Wilcoxon بررسی شد. تفاوت میزان نسبی mRNA GAS2 در بین دو دسته از بیماران با آزمون Mann-Whitney و در بین بیش از دو دسته از بیماران با آزمون Kruskal-Wallis ارزیابی گردید. برای شناسایی عوامل مستقل پیش‌بینی کننده‌ی بقا، آزمون Cox regression یک متغیره (Single variable) و چند متغیره (Multivariable) انجام گردید. برای نشان دادن ارتباط بین دو متغیر کمی و رتبه‌ای، از ضریب همبستگی Spearman استفاده گردید. واکاوی داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) صورت گرفت و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، نمونه‌های بافتی ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال شامل ۲۲ مرد و ۱۸ زن با میانگین سنی 56.70 ± 13.37 سال انتخاب گردید. در جدول ۱، خصوصیات بالینی - آسیب‌شناختی و میزان نسبی بیان ژن GAS2 بافت توموری بیماران آمده است. میزان نسبی بیان ژن GAS2 در بافت توموری بیماران ارتباط معنی‌داری با خصوصیات آسیب‌شناختی شامل مرحله‌بندی TNM، درجه، وضعیت متاستاز و تهاجم به سیستم لنفاوی و عروقی نشان داد. با این وجود، در ارتباط با دیگر خصوصیات مانند جنسیت، سن و اندازه‌ی تومور، تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد (جدول ۱).

Real-time PCR ابتدا نمونه‌های cDNA تولید شده در مرحله‌ی قبلی بر روی یخ قرار داده شدند تا به آرامی ذوب شوند. سپس، نمونه‌های cDNA ذوب شده با استفاده از مخلوط RT2 SYBR Green qPCR Mastermixes (Qiagen) روی یک دستگاه 96 quantitative real-time PCR (Bioneer, Daejeon, Korea) تکثیر گردیدند. هر مخلوط واکنش (در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) حاوی ۱ میکرولیتر cDNA، ۱۲/۵ میکرولیتر RT2 SYBR Green Mastermix، ۱ میکرولیتر پرایمر مستقیم و معکوس، و ۱۰/۵ میکرولیتر آب فاقد RNase بود. قبل از شروع واکنش، برای خارج کردن حباب‌های هوای احتمالی موجود در مخلوط واکنش و نیز مخلوط کردن اجزای واکنش، صفحه‌ی پلیت حاوی چاهک‌ها با صفحه‌ی نواری پوشانده شد و به مدت یک دقیقه در شتاب ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید.

برنامه‌ی دمایی واکنش qReal-time PCR شامل بالا رفتن دمای اولیه‌ی بلوک حرارتی دستگاه تا ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی دناتوره شدن مخلوط واکنش‌ها در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۱ چرخه‌ی دمایی متشکل از ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۸ ثانیه به مدت ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه طراحی گردید. همه‌ی واکنش‌های qReal-time PCR به صورت دوتایی انجام شدند و متوسط چرخه‌ی آستانه (Threshold cycle یا CT) آن‌ها برای هر نمونه محاسبه گردید. پرایمرهای Messenger RNA (mRNA) GAS2 با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی گردیدند و با استفاده از Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) امتحان شد.

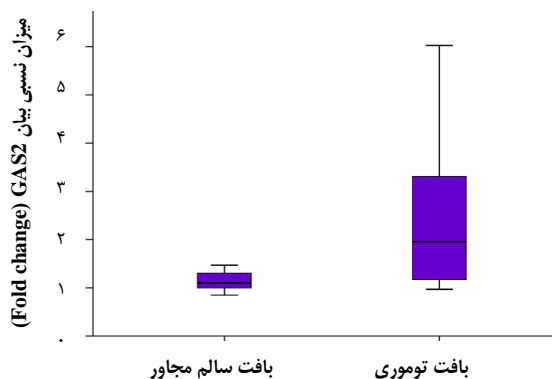
بر این اساس، پرایمرهای ژن GAS2 شامل توالی بالادست F: GAGGTGGGAAACTTTTGCA و پایین دست R: GGCAGAGACCACCAAGTAGT بودند. برای ژن خانه‌دار β -اکتین (به عنوان شاهد داخلی) و یک پرایمر مناسب شامل توالی بالادست F: GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG و پایین دست R: CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC استفاده قرار گرفت (۱۷).

ویژگی محصول واکنش‌های Real-time PCR برای همه‌ی نمونه‌ها با اجرای برنامه‌ی واکاوی نقطه‌ی ذوب ارزیابی گردید. بدین ترتیب، پیک اختصاصی مربوط به تکثیر mRNA GAS2 تأیید گردید. چرخه‌ی آستانه با کمک نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR انتخاب گردید. قبل از شروع واکنش Real-time PCR برای نمونه‌ها، رقت‌های سریال از cDNA هدف (GAS2) در مقایسه با cDNA ژن شاهد داخلی (β -اکتین) تهیه و واکنش Real-time PCR بر روی آن‌ها اجرا گردید تا از همسانی کارایی

جدول ۱. ارتباط بین خصوصیات بالینی و آسیب‌شناختی و میزان نسبی بیان GAS2 در بافت توموری در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

مقدار P	میزان بیان GAS2 [دامنه‌ی بین چارکی] میانه	بیماران تعداد (درصد)	متغیر
۰/۸۴۰	۱/۹۹ (۱/۳۳-۳/۰۷)	۲۲ (۵۵/۰)	جنسیت
	۱/۳۱ (۱/۱۳-۴/۱۱)	۱۸ (۴۵/۰)	مرد
۰/۷۵۰	۱/۹۹ (۱/۱۸-۴/۳۳)	۲۵ (۶۲/۵)	سن (سال)
	۱/۹۳ (۱/۱۳-۳/۱۲)	۱۵ (۳۷/۵)	≤ ۶۰
۰/۰۰۵	۱/۱۱ (۰/۹۹-۱/۲۲)	۷ (۱۷/۵)	مرحله‌بندی تومور (TNM staging)
	۱/۹۳ (۰/۹۷-۱/۹۳)	۳ (۷/۵)	0
	۱/۳۳ (۱/۱۵-۱/۸۰)	۵ (۱۲/۵)	IA
	۲/۴۱ (۱/۹۱-۴/۳۸)	۹ (۲۲/۵)	IB
	۳/۰۲ (۲/۰۸-۴/۰۶)	۶ (۱۵/۰)	IIB
	۲/۲۵ (۱/۱۳-۵/۷۰)	۷ (۱۷/۵)	IIIA
	۵/۵۲ (۴/۹۹-۵/۵۲)	۳ (۷/۵)	IIIB
	۱/۳۰ (۱/۱۱-۲/۲۵)	۱۱ (۲۷/۵)	IV
	۱/۷۹ (۱/۱۴-۲/۳۴)	۱۶ (۴۰/۰)	I (خوب تمایز یافته)
	۲/۴۹ (۱/۰۸-۴/۸۷)	۴ (۱۰/۰)	II (با تمایز متوسط)
۰/۴۳۰	۱/۹۹ (۱/۱۸-۵/۴۰)	۱۷ (۴۲/۵)	اندازه‌ی تومور (سانتی‌متر)
	۱/۹۳ (۱/۱۷-۳/۱۲)	۲۳ (۵۷/۵)	≥ ۵
< ۰/۰۰۱	۱/۵۷ (۱/۱۳-۲/۳۵)	۳۲ (۸۰/۰)	وضعیت متاستاز
	۵/۶۷ (۵/۳۴-۵/۸۷)	۸ (۲۰/۰)	M0
۰/۰۳۶	۲/۶۶ (۱/۲۰-۵/۲۱)	۲۸ (۷۰/۰)	تهاجم لنفاوی
	۱/۴۹ (۱/۱۳-۱/۹۵)	۱۲ (۳۰/۰)	بلی
۰/۰۴۴	۲/۹۳ (۱/۱۳-۵/۶۲)	۱۹ (۴۷/۵)	تهاجم عروقی
	۱/۷۶ (۱/۱۷-۲/۲۰)	۲۱ (۵۲/۵)	خیر
۰/۱۹۰	۵/۲۸ (۱/۳۹-۵/۲۸)	۳ (۷/۵)	Perforation
	۱/۹۳ (۱/۱۵-۳/۱۳)	۳۷ (۹۲/۵)	بلی

داده‌ها به صورت میانه (دامنه‌ی بین چارکی) و تعداد (درصد) نشان داده شدند. میزان نسبی 2 Growth arrest-specific (GAS2) بین دو دسته از بیماران با آزمون Mann-Whitney و بین بیش از دو دسته از بیماران با آزمون Kruskal-Wallis مقایسه گردیده است.



شکل ۱. میزان نسبی بیان 2 Growth arrest-specific (GAS2) بافت توموری و بافت سالم مجاور آن در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال. میزان نسبی بیان GAS2 در بافت توموری و بافت سالم مجاور از طریق آزمون Wilcoxon با هم مقایسه گردید.

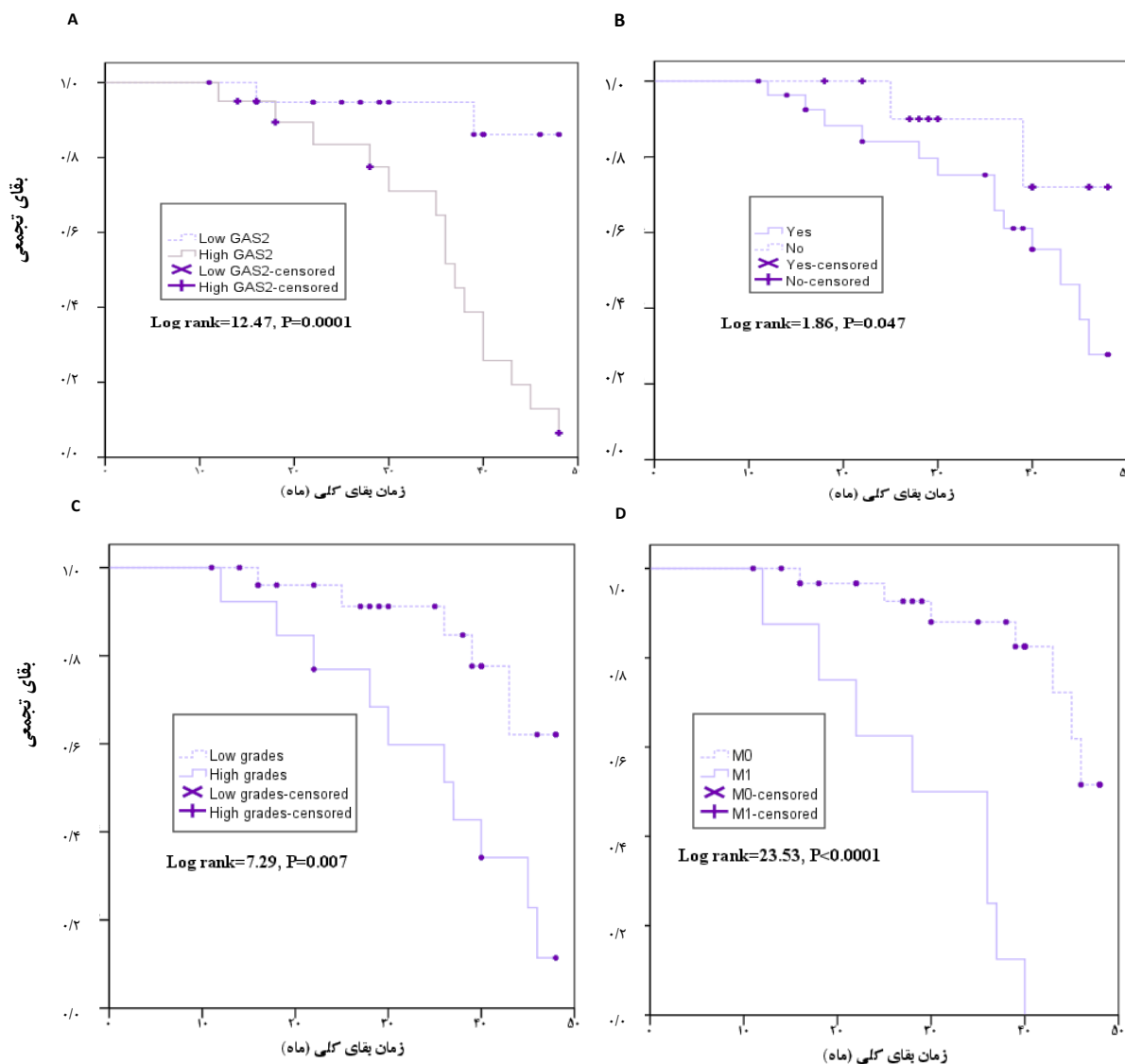
در بررسی مقایسه‌ای میزان نسبی بیان ژن GAS2 در بافت توموری و بافت سالم مجاور آن مشخص گردید که میزان نسبی بیان این ژن در بافت توموری (۱/۱۷-۳/۴۰) به طور معنی‌داری بیشتر از بافت سالم (۱/۰۰-۱/۳۱) مجاور تومور است ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۱).

در مرحله‌ی بعدی، ارتباط میزان نسبی بیان GAS2 بافت توموری با دیگر خصوصیات آسیب‌شناختی رتبه‌ای و کمی تومور مانند مرحله‌بندی TNM، درجه و اندازه‌ی تومور با کمک آزمون ضریب همبستگی Spearman مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس، میزان نسبی بیان GAS2 در بافت توموری با مرحله‌بندی TNM ($P = ۰/۰۱۰$, $\rho = ۰/۶۰$)، درجه ($P = ۰/۰۳۰$, $\rho = ۰/۳۵$) و اندازه‌ی تومور ($P = ۰/۰۱۰$, $\rho = ۰/۴۸$) ارتباط معنی‌دار و مستقیمی نشان داد.

بیماران نشان ندادند.

برای شناسایی عوامل مستقل پیش‌بینی کننده‌ی بقا، آزمون Cox regression یک متغیره (Single variable) و چند متغیره (Multivariable) انجام گردید. آزمون یک متغیره نشان داد که میزان بالای بیان GAS2 به همراه درجات بالاتر و وجود متاستاز، به عنوان عوامل مستقل پیش‌بینی کننده‌ی کاهش بقای کلی بیماران عمل می‌کنند. با این حال، آزمون Cox regression چند متغیره نشان داد که از بین سه عامل پیش‌گفته، دو عامل میزان بالای بیان GAS2 و وجود متاستاز، به عنوان پیش‌بینی کننده‌های مستقل کاهش بقای کلی بیماران عمل می‌کنند (جدول ۲).

برای نشان دادن ارتباط میزان نسبی بیان GAS2 بافت توموری با میزان بقای کلی بیماران بر اساس میانه، میزان بیان GAS2 (بعد از تبدیل لگاریتمی) به دو گروه با بیان بالا و با بیان پایین تقسیم شدند. سپس، با کمک واکاوی منحنی بقای Kaplan-Meier و آزمون Log rank مشخص گردید که میزان بالاتر بیان GAS2 در بافت توموری با کاهش بقای کلی بیماران ارتباط معنی‌داری داشت (شکل ۲). همچنین، دیگر خصوصیات آسیب‌شناختی مانند درگیر نمودن سیستم لنفاوی، افزایش درجه و وجود متاستاز ارتباط معنی‌داری با کاهش بقای کلی بیماران نشان دادند (شکل ۲). با این حال، دیگر خصوصیات بالینی و آسیب‌شناختی، ارتباط معنی‌داری با بقای کلی



شکل ۲. واکاوی منحنی Kaplan-Meier برای میزان نسبی بیان GAS2 (A)، درگیر نمودن سیستم لنفاوی (B)، درجه‌ی بافت توموری (C) و وجود متاستاز (D) در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (n = ۴۰). مقادیر بالاتر میزان نسبی بیان GAS2 (مقادیر بالاتر از ۱/۹۶)، درگیر نمودن سیستم لنفاوی، درجه‌های بالاتر بافت توموری و وجود متاستاز با کاهش بقای کلی بیماران ارتباط دارد.

جدول ۲. نتایج آزمون Cox regression یک متغیره و چند متغیره برای شناسایی عوامل مستقل پیش‌بینی کننده‌ی میزان بقای کلی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

متغیر	آزمون تک متغیره		آزمون چند متغیره	
	مقدار P	HR(95% CI)	مقدار P	HR(95% CI)
سن (≥ 60 سال / < 60 سال)	۰/۷۶۰	۰/۸۵ (۰/۲۹-۲/۵۰)	۰/۸۴۰	۰/۸۵ (۰/۱۶-۴/۴۹)
جنسیت (زن/مرد)	۰/۷۶۰	۱/۳۹ (۰/۴۸-۴/۰۲)	۰/۱۷۰	۳/۰۱ (۰/۶۳-۱۴/۴۷)
اندازه‌ی تومور (≥ 5 سانتی متر / < 5 سانتی متر)	۰/۸۹۰	۱/۰۷ (۰/۳۸-۳/۰۴)	۰/۳۹۰	۰/۴۴ (۰/۰۷-۲/۸۸)
مرحله‌بندی TNM (0+I+II/III+IV)	۰/۷۶۰	۱/۶۰ (۰/۵۷-۴/۵۱)	۰/۹۱۰	۰/۹۳ (۰/۲۶-۳/۳۰)
درجه (I+II/III+IV)	۰/۰۳۰	۱/۹۲ (۱/۱۰-۷/۶۹)	۰/۵۷۰	۱/۴۳ (۰/۴۰-۵/۱۰)
درگیری لنفاوی (Yes/No)	۰/۱۹۰	۰/۳۷ (۰/۰۸-۱/۶۴)	۰/۶۰۰	۰/۵۸ (۰/۰۷-۴/۴۳)
درگیری عروقی (Yes/No)	۰/۲۷۰	۰/۵۶ (۰/۲۰-۱/۵۷)	۰/۲۲۰	۷/۳۶ (۰/۲۹-۱۸/۶۳)
متاستاز (M1/M0)	< ۰/۰۰۱	۸/۷۳ (۲/۹۰-۳۹/۸۵)	۰/۰۴۰	۷/۷۹ (۱/۰۸-۵۵/۹۶)
سوراخ شدگی (Yes/No)	۰/۳۴۰	۰/۴۸ (۰/۱۰-۲/۱۸)	۰/۴۴۰	۱/۴۸ (۰/۸۲-۳/۳۸)
میزان نسبی بیان GAS2 ($> 1/96$ / $< 1/96$)	۰/۰۰۴	۸/۹۴ (۲/۰۴-۳۹/۲۴)	۰/۰۴۳	۵/۵۷ (۱/۰۵-۲۹/۴۶)

TNM: Tumor speard, Lymph node, Metastasis; CI: Confidence interval; HR: Hazard ratio; GAS2: Growth arrest-specific 2

شناسایی ژن‌های نشانگر زیستی پیش‌آگهی دهنده‌ی مرتبط با بقا در سرطان کولورکتال، به علت ناهمگونی بسیار بالای تومورهای آن یک چالش بسیار بزرگ است (۱۹). در این وضعیت، شناسایی یک ژن نشانگر زیستی پیش‌آگهی دهنده‌ی مرتبط با بقا می‌تواند از لحاظ بالینی حایز اهمیت باشد. اگر چه اطلاعاتی راجع به ارتباط افزایش بیان ژن GAS2 و میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال وجود ندارد، اما به تازگی در یک مطالعه، ارتباط افزایش بیان این ژن با پیش‌آگهی ضعیف بیماری برای عود بیماری در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال گزارش شده است (۱۲) که باز هم با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. یکی از مولکول‌هایی که ممکن است از طریق GAS2 با پیش‌آگهی ضعیف و کاهش بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مورد توجه قرار بگیرد، پروتئین β -کاتین است؛ چرا که افزایش آن باعث تحریک تهاجم و متاستاز سرطان کولورکتال می‌شود (۱۱). در توافق با این یافته، این که مهار رونویسی GAS2 در سلول‌های میلوئیدی مزمن توسط Interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP) باعث کاهش فعالیت پروتئین β -کاتین می‌شود (۲۰) و افزایش غلظت و فعالیت پروتئین β -کاتین با پیش‌آگهی ضعیف بیماری و بحران انفجاری (Blast crisis) در لوکمای میلوئیدی مزمن ارتباط دارد (۲۱).

بنابراین، بیان بیش از حد GAS2 در بافت توموری در مطالعه‌ی کنونی و ارتباط آن با کاهش بقای کلی بیماران ممکن است به افزایش پروتئین β -کاتین در سلول‌های بافت سرطان کولورکتال ارتباطی داشته باشد؛ چرا که پروتئین GAS2 از طریق مهار کردن آنزیم کالپین-۲ باعث افزایش غلظت پروتئین β -کاتین می‌شود (۱۱-۱۰). با این حال، تأیید این موضوع نیاز به شواهد بیشتری در سطح سلولی و بافتی سرطان کولورکتال دارد.

بحث

بر اساس یافته‌های این مطالعه، میزان نسبی بیان GAS2 بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور آن در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال افزایش چشم‌گیری نشان داد. از طرفی، افزایش میزان نسبی بیان این ژن با خصوصیات آسیب‌شناختی پیشرفت بیماری مانند مرحله‌بندی TNM، درجه‌ی تومور، اندازه‌ی تومور و نیز کاهش بقای بیماران ارتباط معنی‌دار و مستقیمی نشان داد. این یافته‌ها، دلالت بر آن دارند که میزان بیان ژن GAS2 ممکن است نقش بسیار مهمی در پاتوفیزیولوژی سرطان کولورکتال داشته باشد. بنابراین، افزایش بیان این ژن ممکن است با پیامدهای وخیم‌تر و پیش‌آگهی بد بیماری همراه باشد.

اگر چه ژن GAS2 از طریق مهار کردن فعالیت آنزیم کالپین-۲ حساسیت سلول را به مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی وابسته به P53 افزایش می‌دهد و بدین ترتیب، به عنوان یک سوپسترای مرگ سلولی تلقی می‌شود و انتظار می‌رود که اثرات ضد سرطانی داشته باشد (۷)، اما از طرفی، مهار آنزیم کالپین-۲ توسط آن منجر به افزایش غلظت پروتئین β -کاتین می‌شود که خود باعث تحریک خصوصیات تهاجمی و متاستاز در سلول‌های سرطان کولورکتال می‌گردد (۱۱-۱۰). ارتباط میزان بیان ژن GAS2 در بافت توموری با شاخص‌های پیشرفت توموری نظیر مرحله‌بندی TNM، درجه و اندازه‌ی تومور در مطالعه‌ی کنونی با یافته‌های مطالعات اخیر و در واقع، با اثرات تومورژنیک آن هم‌خوانی دارد.

همچنین، افزایش بیان ژن GAS2 در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور آن در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های مطالعات دیگر راجع به افزایش بیان آن در سلول‌های سرطان کولورکتال (۱۴)، سلول‌های لوکمای میلوئیدی مزمن (۱۵) و آدنوکارسینوما‌ی ریه (۱۶) در یک راستا می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه، حاصل پایان‌نامه با کد IR.MEDILAM.REC.1397.056 مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایلام و با همکاری انستیتو کانسر دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی این که میزان بیان GAS2 در بافت توموری سرطان کولورکتال نسبت به بافت سالم مجاور آن افزایش می‌یابد و این افزایش، با شاخص‌های آسیب‌شناختی پیشرفت و گسترش سرطان کولورکتال و نیز پیش‌آگهی بد بیماری ارتباط مستقیمی دارد. بر این اساس، میزان بیان GAS2 ممکن است به عنوان یک نشانگر زیستی پیش‌آگهی دهنده‌ی سرطان کولورکتال به کار برود.

References

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017; 66(4): 683-91.
2. Liu X, Bi Y, Wang H, Meng R, Zhou W, Zhang G, et al. Different trends in colorectal cancer mortality between age groups in China: An age-period-cohort and joinpoint analysis. *Public Health* 2019; 166: 45-52.
3. Saini MK, Sanyal SN. Cell cycle regulation and apoptotic cell death in experimental colon carcinogenesis: Intervening with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Nutr Cancer* 2015; 67(4): 620-36.
4. Brancolini C, Bottega S, Schneider C. Gas2, a growth arrest-specific protein, is a component of the microfilament network system. *J Cell Biol* 1992; 117(6): 1251-61.
5. Brancolini C, Schneider C. Phosphorylation of the growth arrest-specific protein Gas2 is coupled to actin rearrangements during Go-->G1 transition in NIH 3T3 cells. *J Cell Biol* 1994; 124(5): 743-56.
6. Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J* 2001; 20(11): 2702-14.
7. Brancolini C, Marzinotto S, Schneider C. Susceptibility to p53 dependent apoptosis correlates with increased levels of Gas2 and Gas3 proteins. *Cell Death Differ* 1997; 4(3): 247-53.
8. Zhang CL, Liu X, He QJ, Zheng H, Xu S, Xiong XD, et al. miR3425p promotes Zmpste24-deficient mouse embryonic fibroblasts proliferation by suppressing GAS2. *Mol Med Rep* 2017; 16(6): 8944-52.
9. Sun L, Zhou H, Liu H, Ge Y, Zhang X, Ma W, et al. GAS2-Calpain2 axis contributes to the growth of leukemic cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015; 47(10): 795-804.
10. Benetti R, Copetti T, Dell'Orso S, Melloni E, Brancolini C, Monte M, et al. The calpain system is involved in the constitutive regulation of beta-catenin signaling functions. *J Biol Chem* 2005; 280(23): 22070-80.
11. Yuan G, Zhang B, Yang S, Jin L, Datta A, Bae S, et al. Novel role of STRAP in progression and metastasis of colorectal cancer through Wnt/beta-catenin signaling. *Oncotarget* 2016; 7(13): 16023-37.
12. Huang CJ, Lee CL, Yang SH, Chien CC, Huang CC, Yang RN, et al. Upregulation of the growth arrest-specific-2 in recurrent colorectal cancers, and its susceptibility to chemotherapy in a model cell system. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1862(7): 1345-53.
13. Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, Czyzewska J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(8): 3049-52.
14. Chang CC, Huang CC, Yang SH, Chien CC, Lee CL, Huang CJ. Data on clinical significance of GAS2 in colorectal cancer cells. *Data Brief* 2016; 8: 82-6.
15. Zhou H, Ge Y, Sun L, Ma W, Wu J, Zhang X, et al. Growth arrest specific 2 is up-regulated in chronic myeloid leukemia cells and required for their growth. *PLoS One* 2014; 9(1): e86195.
16. Murugesan SN, Yadav BS, Maurya PK, Chaudhary A, Singh S, Mani A. Expression and network analysis of YBX1 interactors for identification of new drug targets in lung adenocarcinoma. *J Genomics* 2018; 6: 103-12.
17. Oz S, Maercker C, Breiling A. Embryonic carcinoma cells show specific dielectric resistance profiles during induced differentiation. *PLoS One* 2013; 8(3): e59895.
18. 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.
19. Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, Vermeulen L. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: A case for molecular disease subtypes. *Cancer Res* 2015; 75(2): 245-9.
20. Huang W, Zhou W, Saberwal G, Konieczna I, Horvath E, Katsoulidis E, et al. Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) decreases beta-catenin activity in myeloid cells by repressing GAS2 transcription. *Mol Cell Biol* 2010; 30(19): 4575-94.
21. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351(7): 657-67.

Upregulated Expression of the Growth Arrest-Specific-2 (GAS2) Gene in Colorectal Cancer, and its Relation to Cancer Progression and Prognosis

Behzad Izadi-Ajeerlo¹, Saiyad Bastaminejad², Gholam Basati³

Original Article

Abstract

Background: Growth arrest-specific 2 (GAS2) gene is implicated in a variety of cellular functions such as cell cycle, apoptosis, and proliferation, and may be potentially involved in cancer progression. However, whether GAS2 is associated with colorectal cancer (CRC) progression and prognosis remains to be uncovered. Thus, this study investigated the association of GAS2 expression in tumor with CRC progression and prognosis.

Methods: In the case-control study, surgical tumor and adjacent normal tissues from 40 patients with CRC were collected at Cancer Institute of Imam Khomeini Hospital in Tehran, Iran, and relative expression level of GAS2 in the tissues was assayed using quantitative real-time polymerase chain reaction method. The correlation of tumor GAS2 expression with the clinicopathological features and overall survival rate of patients was determined.

Findings: The relative expression level of GAS2 in tumor tissues was significantly elevated compared to the adjacent normal tissues [1.96 (1.17-3.40) vs. 1.10 (1.00-1.31), $P < 0.001$]. Moreover, the expression levels of GAS2 in tumor tissues were significantly associated with clinicopathological features of cancer including tumor stage in Tumor spread, Lymph node spread, and Metastasis (TNM) staging ($P = 0.010$), grade ($P = 0.010$), size ($P = 0.030$), and lymphatic ($P = 0.030$) and vascular invasion ($P = 0.040$) as well as the decreased overall survival ($P = 0.040$).

Conclusion: Elevated expression of GAS2 in CRC is associated with cancer progression indices and poor prognosis; hence it may be served as a prognostic biomarker in CRC.

Keywords: Growth arrest-specific 2 protein, human, Cancer staging, Prognosis

Citation: Izadi-Ajeerlo B, Bastaminejad S, Basati G. **Upregulated Expression of the Growth Arrest-Specific-2 (GAS2) Gene in Colorectal Cancer, and its Relation to Cancer Progression and Prognosis.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(515): 93-100.

1- Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

2- Assistant Professor, Department of Molecular Medicine and Genetics, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3- Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine AND Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Corresponding Author: Gholam Basati, Email: basati-gh@medilam.ac.ir