

بررسی بیان ژن های CK19 و VEGF در خون محیطی بیماران مبتلا به کارسینومای سلول های سنگفرشی دهان (OSCC)

پریسا نبوی^۱، عبدالرضا محمدنیا^۲، مریم ناصرالاسلامی^۳، نغمه بهرامی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کارسینومای سلول های سنگفرشی دهان (Oral squamous cell carcinoma یا OSCC) جزء ۱۰ تومور بدخیم شایع در جهان است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تغییرات بیان CK19 (Cytokeratin 19) و عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF) به عنوان نشانگرهای تشخیصی بود.

روش ها: در این مطالعه، ۳۰ فرد بیمار به عنوان گروه مورد و ۳۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. بیان ژن های CK19 و VEGF در سرم خون آن ها اندازه گیری شد. آزمون آماری t برای واکاوی داده ها مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: وجود نشانگر CK19 در افراد مبتلا به OSCC در ۱۷ نفر از ۳۰ نفر و نشانگر VEGF در ۲۳ نفر از ۳۰ نفر مثبت گزارش گردید.

نتیجه گیری: بیان دو ژن VEGF و CK19 در بیماران مبتلا به کارسینومای سلول های سنگفرشی دهان، نسبت به افراد سالم بیشتر است. بنابراین، بررسی سطح بیان این دو نشانگر زیستی در خون بیماران OSCC، می تواند به عنوان یک روش تشخیصی غربالگری بیماری در مراحل اولیه ی بیماری در نظر گرفته شود. در مجموع، می توان نتیجه این تحقیق را به عنوان یک تست تشخیصی غربالگری در مراحل اولیه بیماری دانست.

واژگان کلیدی: کارسینومای سلول های سنگفرشی سر و گردن، Cytokeatin 19، عامل رشد اندوتلیال عروقی

ارجاع: نبوی پریسا، محمدنیا عبدالرضا، ناصرالاسلامی مریم، بهرامی نغمه. بررسی بیان ژن های CK19 و VEGF در خون محیطی بیماران مبتلا به کارسینومای سلول های سنگفرشی دهان (OSCC). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۶): ۴۸۴-۴۸۰

مقدمه

سرطان دهان که اغلب به عنوان کارسینومای سلول سنگفرشی دهان (Oral squamous cell carcinoma یا OSCC) معرفی می شود، شایع ترین نوع سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن است (۱). به تازگی، میزان مرگ و میر به علت ابتلا به این سرطان در حال افزایش است (۲). عوامل افزایش دهنده ی این بیماری در سنین بالا، عوامل سرطان زایی نظیر سیگار، الکل و تنباکو با افزایش میزان آسیب به DNA و عواملی از این دست گزارش شده است (۳). کارسینومای سلول های پوششی، شایع ترین سرطان دهان با منشأ اپی تلیالی است که

در حفره ی دهان مشاهده می شود (۴).

یکی از روش های رایجی که برای تشخیص سرطان به کار می رود، روش های آزمایشگاهی است که با استفاده از نشانگرهای تومور صورت می گیرد (۵).

بررسی چندین نشانگر زیستی در کنار هم، می تواند نتایج دقیق تر و قابل اعتمادتری را جهت تشخیص سرطان ها در اختیار کادر درمانی قرار دهد (۶).

Cytokeratin 19 عضو خانواده ی بزرگ پروتئین های رشته ای بینابینی مشتمل بر بیش از ۲۰ نوع پلی پپتید است که به دو دسته ی

- ۱- گروه سلولی و مولکولی، دانشکده ی علوم و فن آوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
- ۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های مزمن تنفسی، پژوهشکده ی سل و بیماری های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری و گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده ی فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده ی علوم و فن آوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات جراحی های فک و صورت و گروه مهندسی بافت و سلولی کاربردی، دانشکده ی فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email: n-bahrami@sina.tums.ac.ir

نویسنده ی مسؤو: نغمه بهرامی

و cDNA در انتهای هر مرحله با استفاده از دستگاه Nanodrop بررسی و کنترل شد.

پرایمرهای اختصاصی هر نشانگر در جدول ۱ آمده است (۹).

انجام Real-time RT-PCR این مرحله با استفاده از شرکت سیناکولون تهیه شد و با دستگاه Rotor Gene-QIAGEN HotTaq EvaGreen qPCR Mix (Cat No.BT11101) که از انجام گردید. اجزای واکنش Real-time RT-PCR به ترتیب شامل ۴ میکرولیتر Mastermix، پرایمر F و R هر کدام ۱ میکرولیتر، ۲۰ میکرولیتر cDNA و با آب مقطر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

شرایط دمایی و زمانی به ترتیب دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه (برای ۴۰ چرخه) بود.

مقایسه‌ی میانگین‌ها بین دو گروه با استفاده از آزمون آماری t و مقایسه‌ی درصد مثبت شدن نشانگرها در دو گروه با کمک آزمون مقایسه‌ی نسبت‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. اختلاف آماری در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جمعیت مورد مطالعه شامل دو گروه بیماران مبتلا به OSCC (گروه مورد) و افراد سالم (گروه شاهد) بودند که با توجه به برآورد حجم نمونه‌ی تحقیق در هر گروه ۳۰ نفر قرار گرفتند. مقایسه‌ی این دو گروه با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد با میانگین $11/74 \pm 49/04$ و دامنه‌ی سنی ۷۰-۲۵ سال و گروه مورد با میانگین $10/44 \pm 45/65$ و دامنه‌ی سنی ۶۸-۲۴ سال نشان نداد ($P = 0/312$).

اسیدی (CK9-CK23) و دسته‌ی پایه (CK1-CK8) تقسیم بندی می‌شوند. نقش اصلی CK 19 در حفظ تمامیت سلول اپی‌تلیال است و در چرخه‌ی سلولی پاسخ به استرس و آپوپتوز نیز نقش دارد (۷). عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor) یا VEGF یک گلیکوپروتئین همودایمیک است و به عنوان یک سیگنال چند عملکردی اصلی در فرایند التهاب و ترمیم زخم‌ها می‌باشد که به گیرنده‌ی VEGF در سطح سلول‌های اندوتلیال متصل می‌شود و یک القا کننده‌ی بالقوه‌ی آنژیوژنز می‌باشد (۸).

روش‌ها

۳۰ نفر از بیماران مراجعه کننده به انستیتوی سرطان دانشگاه علوم پزشکی تهران بر اساس تشخیص پزشک متخصص که مبتلا OSCC بودند، به عنوان گروه مورد و ۳۰ نفر از افراد سالم به عنوان گروه شاهد به طور داوطلبانه در این بررسی شرکت کردند. گروه‌های مورد و شاهد در این مطالعه در گروه‌های سنی و جنسی یکسانی در نظر گرفته شدند. از کلیه‌ی افراد مشارکت کننده در مطالعه‌ی حاضر، ۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد و استخراج RNA با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد و استخراج RNA با استفاده از RNeasy Midi Kit (qiagen Cat no.75144) انجام و مطابق با شیوه‌نامه‌ی کیت Total mRNA آماده گردید. ابتدا، لکوسیت‌ها توسط محلولی که در کیت کبازن بود، تجزیه و سپس، با سرنگ ۵ میلی‌لیتری هموژنیزه شدند. در مرحله‌ی بعد، لیزات و رسوب احتمالی به دست آمده و اتانول، به RNeasyMidi column به منظور اتصال RNA به ستون انتقال یافت و در نهایت، شستشوی ستون انجام و RNA استخراج شد.

آن گاه، ساخت *complementary DNA* (cDNA) با استفاده از Viva 2-steps RT-PCR Kit (Cat no .RTPL12) انجام شد. این کیت، برای سنتز رشته‌ی cDNA به روش دو مرحله‌ای مناسب است. سنتز cDNA به واسطه‌ی Total RNA با استفاده از پرایمرهای Random hexamer یا Oligo dt انجام شد. کیفیت و کمیت RNA

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

پارامترها	18s rRNA	CK19-mRNA	VEGF-mRNA
آغاز گر F	GTAACCCGTTGAACCCATT	TCCGAACCAAGTTTGAGAC	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT
طول پرایمر	۲۰	۱۹	۲۰
آغاز گر R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	AATCCACCTCCACACTGA	ATCTGCATGGTATGTTGGA
طول پرایمر	۲۰	۱۸	۲۰
طول قطعه‌ی تکثیری	۱۵۲	۲۲۲	۲۲۶
دمای مطلوب Annealing	۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد	۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد	۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد

VEGF: Vascular endothelial growth factor; mRNA: Messenger RNA

بحث

سرطان دهان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جهان و یکی از ده علت شایع مرگ و میر محسوب می‌گردد (۱۰).

بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های دهان از نوع کارسینومای سلول‌های سنگفرشی هستند و حدود ۹ درصد سرطان‌ها، شامل کارسینومای غدد بزاقی، سارکوما و لنفوما هستند (۱۱). بیشتر سرطان‌های دهان در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند. در واقع، این ضایعات زمانی که بر اثر پیشرفت زیاد، منجر به ظهور علائم بالینی شده باشد، کشف می‌شوند و این موضوع، سبب شده است که پیش‌آگهی سرطان دهان در بیشتر نقاط جهان خوب نباشد (۱۲). به تازگی، نقش نشانگرهای زیستی در تشخیص زودهنگام سرطان مورد توجه ویژه قرار گرفته است (۱۳). بررسی چندین نشانگر زیستی در کنار هم، می‌تواند نتایج دقیق‌تر و قابل اعتمادتری را جهت تشخیص سرطان‌ها در اختیار کادر درمانی قرار دهد (۱۴). پژوهش حاضر، به منظور بررسی تغییرات بیان CK19-mRNA و VEGF-mRNA در خون محیطی بیماران مبتلا به کارسینومای سلول‌های سنگفرشی دهان و مقایسه با افراد سالم انجام و طی آن مشاهده شد که میزان بیان این نشانگر زیستی در افراد مبتلا به سرطان، بیشتر از افراد سالم است.

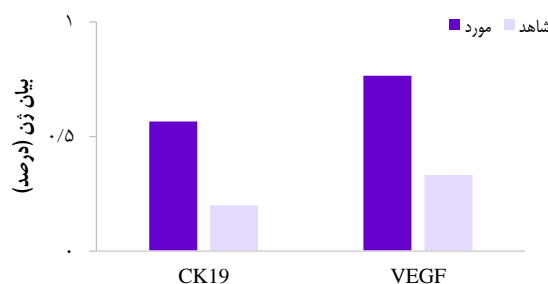
CK19 عضو خانواده‌ی بزرگ پروتئین‌های رشته‌ای بینایی و از خانواده‌ی کراتین است (۷). VEGF نیز یک پروتئین سیگنال تولید شده توسط سلول می‌باشد که باعث تحریک عروق بافت و رگ می‌شود (۱۵). در مطالعه‌ی، ۵۰ نمونه‌ی مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی دهان و ۵۰ نمونه‌ی سالم مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. در این مطالعه، سطح سرمی VEGF در بیماران، بیشتر از افراد سالم بود (۱۶). در این مطالعه نیز بررسی بیان نشانگرهای زیستی (CEA-mRNA) و CK19-mRNA انجام و مشاهده گردید که بیان این نشانگرهای زیستی، در سرطان سلول‌های سنگفرشی دهان افزایش می‌یابد.

مطالعه‌ی دیگری نشان داد که میزان بیان VEGF به روش Realtime PCR در بیماران بیشتر از افراد سالم است که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد (۱۵).

در پژوهش دیگری که توسط Guo و همکاران برای بررسی بیان CK19، CK20 و CEA-mRNA خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان ریه به روش nested RT-PCR انجام شد، مشاهده گردید که بیان CEA-mRNA ۴۸/۲ درصد، بیان CK20 ۴۱/۰ درصد و CK19 ۳۶/۱ درصد بود و ۷۳/۵ درصد نمونه‌ها، حداقل یک نشانگر مثبت داشته‌اند و این موضوع، به طور کامل با متاستاز ارتباط داشته است (۱۷).

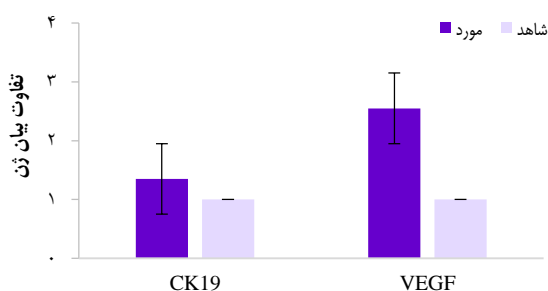
به طور کلی، نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر در تطابق با مطالعات پیشین نشان داد که بیان دو ژن VEGF و CK19 در بیماران

نتایج Real-time RT-PCR برای نشانگر VEGF در ۲۳ نفر از گروه مورد مثبت شد؛ به این مفهوم که در ۲۳ نفر از گروه مورد، بر اساس روش Real-time RT-PCR، این نشانگر زیستی بیان شده است و در گروه شاهد نیز ۱۰ نفر از ۳۰ نفر مثبت بودند. مقایسه‌ی آماری میزان مثبت شدن این نشانگر بین گروه مورد و گروه شاهد که با استفاده از آزمون Two-sample binomial انجام شد، بیانگر تفاوت آماری معنی‌داری بین این دو گروه بود ($P = ۰/۰۲۲$). همچنین، نشانگر CK19 در ۱۷ نفر از گروه مورد و ۶ نفر از گروه شاهد مثبت بود. مقایسه‌ی آماری میزان مثبت شدن این نشانگر بین گروه مورد و گروه شاهد که با استفاده از آزمون Two-sample binomial انجام شد، بیانگر تفاوت آماری معنی‌داری بود ($P = ۰/۰۱۵$) (شکل ۱).



شکل ۱. ارزیابی بیان ژن‌های Vascular endothelial growth factor (VEGF) و Cytokeratin 19 (CK19) بین گروه‌های مورد و شاهد

تفاوت میزان بیان نشانگرها با روش $\Delta\Delta Ct$ در مورد VEGF-mRNA و CK19-mRNA بررسی گردید (شکل ۲).



شکل ۲. تفاوت بیان ژن‌های Vascular endothelial growth factor (VEGF) و Cytokeratin 19 (CK19) بین دو گروه مورد و شاهد

به این ترتیب، در مورد نشانگر VEGF، تعداد نسخه‌های اولیه‌ی این نشانگر در گروه مورد به طور متوسط ۲/۵۵ برابر گروه شاهد بود و در مورد CK19، تعداد نسخه‌های اولیه‌ی این نشانگر در گروه مورد به طور متوسط ۱/۳۵ برابر گروه شاهد بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، از زحمات استادان محترم دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم زیستی قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

مبتلا به کارسینومای سلول‌های سنگفرشی دهان، نسبت به افراد سالم بیشتر است. بنابراین، بررسی سطح بیان این دو نشانگر در خون بیماران، می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه در تشخیص سرطان OSCC در نظر گرفته شود.

References

1. Wong YK, Tsai WC, Lin JC, Poon CK, Chao SY, Hsiao YL, et al. Socio-demographic factors in the prognosis of oral cancer patients. *Oral Oncol* 2006; 42(9): 893-906.
2. Pourhoseingholi MA, Faghihzadeh S, Hajizadeh E, Abadi A. Years of life lost due to colorectal cancer in Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2010; 3(4): 187-9.
3. Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38(8): 737-46.
4. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45(4-5): 309-16.
5. Salehi Nodeh A, Ghafouri S, Razavi S, Mirshafie S. Assessment of TPS tumor marker with ELISA for early detection and monitoring of Breast Cancer. *Payavard Salamat* 2008; 2(1-2): 84-8. [In Persian].
6. Boonstra JJ, Kok TC, Wijnhoven BP, van Heijl M, van Berge Henegouwen MI, Ten Kate FJ, et al. Chemotherapy followed by surgery versus surgery alone in patients with resectable oesophageal squamous cell carcinoma: long-term results of a randomized controlled trial. *BMC Cancer* 2011; 11: 181.
7. Xu F, Chen J, Shen HH, Wang XD, Shan J. The diagnostic significance of the detection of cytokeratin 19 mRNA by quantitative RT-PCR in benign and malignant pleural effusions. *J Zhejiang Univ Sci* 2004; 5(10): 1286-9.
8. Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2007; 78(9): 1783-7.
9. Kim HY, Park SY, Lee SW, Lee HR, Lee WS, Rhim BY, et al. Inhibition of HMGB1-induced angiogenesis by cilostazol via SIRT1 activation in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2014; 9(8): e104743.
10. Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Correa L, de Sousa SO. Oral squamous cell carcinoma: An analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci* 2010; 52(2): 267-73.
11. Maleki D, Ghojzadeh M, Mahmoudi SS, Mahmoudi SM, Pournaghi-Azar F, Torab A, et al. Epidemiology of oral cancer in Iran: A systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(13): 5427-32.
12. Lippman SM, Sudbo J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *J Clin Oncol* 2005; 23(2): 346-56.
13. Umeda M, Shigeta T, Takahashi H, Minamikawa T, Komatsubara H, Oguni A, et al. Clinical evaluation of Lugol's iodine staining in the treatment of stage I-II squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011; 40(6): 593-6.
14. De Roock W, Biesmans B, De Schutter J, Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Mol Diagn Ther* 2009; 13(2): 103-14.
15. Kashani K, Bahrami N, Barikro N, Mohamadnia A. A pilot study of CK20 mRNA, VEGF mRNA, VEGF protein in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer. *Minerva Pneumol* 2017; 56: 229-34.
16. Payehghadr S, Bahrami N, Naji T, Mohammadi F. Detection of miR-21, MUC1mRNA and VEGF protein biomarkers expression changes in oral squamous cell carcinomas (OSCC) in peripheral blood. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology* 2018; 3(2): 59-64.
17. Guo Y, Wang J, Huang P. Clinical significance of CK20, CK19, CEA mRNAs in peripheral blood from lung cancer patients. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2009; 12(9): 1013-7. [In Chinese].

Expression of Cytokeratin 19 (CK19) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Genes in Peripheral Blood of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC)

Parisa Nabavi¹, Abdolreza Mohamadnia², Maryam Naseroleslami³, Naghmeh Bahrami⁴

Original Article

Abstract

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the 10 most common malignant tumors. This study aimed to evaluate the relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and cytokeratin 19 (CK19) genes as biomarkers for diagnosis of OSCC.

Methods: In this study, 30 patients and 30 healthy individuals were selected. CK19 and VEGF were measured in peripheral blood using real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. T-test was performed to analyze the data.

Findings: In patients with OSCC, CK19 and VEGF markers were positive in 17 and 23 patients out of 30.

Conclusion: The expression of VEGF and CK19 is more among the patients with OSCC, compared to healthy people. In summary, the result of this study can be considered as a diagnostic screening test in the early stages of the disease.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma, Cytokeratin 19, Vascular endothelial growth factor

Citation: Nabavi P, Mohamadnia A, Naseroleslami M, Bahrami N. **Expression of Cytokeratin 19 (CK19) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Genes in Peripheral Blood of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC).** J Isfahan Med Sch 2019; 37(526): 480-4.

1- Department of Cellular and Molecular Biology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD) AND Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Craniomaxillofacial Research Center AND Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Naghmeh Bahrami, Email: n-bahrami@sina.tums.ac.ir