

مطالعه‌ی مولکولی ژن‌های مشترک در تکامل سلولی و سرطان بر روی بافت بیماران

مبتلا به سرطان کولورکتال

شیرین مرادی فرد^۱، شهلا محمد گنجی^۲، زرین مینوچهر^۲

۱- کارشناسی ارشد زیست سلولی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

۲- استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. shahlang@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۵

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان در جهان است. ژن Axin شامل axin1 و axin2 می‌باشد. C-myc و دیگر ژن‌های این خانواده فاکتورهای رونویسی را کد می‌کنند که نقش حیاتی را در تکثیر سلولی، رشد، تمایز و آپاپتوز بازی می‌نمایند. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی نیمه کمی بیان ژن‌های AXIN1 و CMYC در mRNA بافت بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال و ارتباط خاموش یا روشن بودن این ژن‌ها در هر یک از مراحل توموری با فاکتورهای پاتولوژیک بیماران است.

روش کار: بدین منظور بررسی‌ها بر روی ۵۴ نمونه‌ی توموری و ۴۱ نمونه‌ی نرمال (بافت سالم کنارناحیه توموری) از ۵۴ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهیه شد و آزمایش RT-PCR بر روی cDNA سنتز شده حاصل از mRNA بافت‌ها با پرایمرهای بناکتین و ژن‌های AXIN1، CMYC انجام شد.

یافته‌ها: باتوجه به نتایج به دست آمده، بیان ژن AXIN1 در ۵۵٪ از نمونه‌ها روشن و در ۴۵٪ از نمونه‌ها خاموش بود و بیان ژن C-MYC در ۸۷/۵٪ از نمونه‌ها روشن و در ۱۲/۵٪ از نمونه‌ها خاموش بود. آنالیزی آماری توسط نرم افزار SPSS و آزمون‌های t-Test و X^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که نشان داد تفاوت معناداری میان بیان ژن‌های AXIN1 و C-MYC در دو گروه از نمونه‌های نرمال و تومور وجود دارد (P = ۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج حاصله نشان داد که بیان ژن‌های AXIN1 و C-MYC که همواره در تکامل سلولی نقش داشتند و بسیار موثر ظاهر می‌شدند در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: Axin1, CMYC, بیان ژن، سرطان کولورکتال، RT-PCR.

مقدمه

سلولی، رشد، تمایز و آپاپتوزیس بازی می‌کند. این ژن در طی تکامل و تکثیر سلولی همواره به صورت گسترده-ای بیان می‌شود (۲). C-MYC، در حالی که تکثیر و القای رشد سلول و رگ زایی را برعهده دارد، می‌تواند آپوپتوز را تحت شرایط خاصی و از طریق یک فرآیند به نام انکوژن ناشی از آپوپتوز القا نماید. یکی دیگر از عملکردهای مهم C-MYC به تنظیم چرخه‌ی سلولی می‌توان اشاره کرد (۴). عملکرد آپوپتوزی C-MYC به توانایی آن برای القای پیشرفت چرخه سلولی مرتبط است. C-MYC، سلول‌ها را به آپاپتوز در طی چرخه‌ی

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان در جهان است. میزان شیوع سرطان کولورکتال در آسیا به سرعت رو به افزایش است. سالانه حدود ۱/۲ میلیون نفر به سرطان کولورکتال مبتلا می‌شوند و در هر سال، بیش از ۶۳۰۰۰۰ نفر در اثر این سرطان می‌میرند و حدود ۸٪ مرگ و میر ناشی از سرطان را به خود اختصاص داده است (۷). Myc (c-myc) یک ژن تنظیمی است که فاکتورهای رونویسی را کد می‌نماید. C-MYC همواره نقش حیاتی را در تکثیر

CRC مشاهده شده است (۱۲). اما در این بررسی ژن AXIN1 مورد هدف می باشد. هدف از تحقیق حاضر نیز، تشخیص و شناسایی زود هنگام سرطان کولورکتال به کمک مقایسه بیان ژن های دخیل در مرحله ابتدایی این بیماری است.

مواد و روش ها

در این مطالعه ابتدا جامعه آماری مورد نظر و حجم نمونه با توجه به عواملی چون شیوع سرطان کولورکتال در ایران، مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین بر روی این ژن و نتایج حاصله با در نظر گرفتن خطاهای نوع اول و دوم، تعداد ۵۰ نمونه توموری و ۵۰ نمونه نرمال (نمونه سالم مجاور تومور) تعیین گردید. این تعداد نمونه از میان بیماران غیرخوشایوند مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی و تومور بانک ایران تهیه شد. همراه با نمونه های بافتی، اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلا به کولورکتال به دست آمد. به منظور رعایت قوانین اخلاق زیستی، قبل از نمونه گیری از تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضایت نامه ای گرفته شد و سپس بافت ها به صورت تازه و در شرایط ازت مایع به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل گردید. در ادامه، اطلاعات حاصل از بیماران و نمونه ها مورد بررسی دقیق قرار گرفت و تعدادی از نمونه ها که فاقد شرایط لازم بود، از ادامه مطالعه در این پروژه خارج شد. این شرایط عبارت بود از: نامشخص بودن محل اولیه سرطان، ابتلای بیمار به سایر سرطان ها علاوه بر کولورکتال، دقیق نبودن اطلاعات تاریخیچه یا گزارشات پاتولوژی بیماران و نسبت فAMILI بین بیماران. مطابق دستور کار کیت استخراج RNA شرکت Intron، RNA تمامی نمونه های بافتی سرطانی و نرمال (بافت مجاور تومور) استخراج شد. سپس مطابق دستور کار کیت Fermentase، cDNA

سلولی حساس می نماید و در نبود سیگنال‌های مناسب رشد و بقا، سلول‌ها را به سمت آپاتوز سوق می‌دهد. البته بهتر است که این امر یک پدیده‌ی ایمن و مطمئن به سبب فعال شدن نابجای C-MYC در نظر گرفته شود (۵). C-MYC به طور بالقوه تنظیم حدود ۱۵ از تمام ژن‌ها را برعهده دارد و در اکثر سرطان‌ها مانند پستان، روده بزرگ، گردن رحم، سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه، استئوبلاستوم و گلیوبلاستوما دچار افزایش بیان می‌شود (۹). مدل جهش یافته‌ی این ژن نیز در بسیاری از سرطان‌ها یافت می‌گردد. خانواده mycها انکوژنی هستند. پروتئوکوزن c-myc به صورت یک کپی در ژنوم نرمال انسان قرار دارد و جایگاهش بر روی کروموزوم شماره ۸ است (۱). MYC ها از طریق مسیر سیگنالی Wnt, Shh, EGF (ERK/MAPK) فعال می‌شوند. بیان myc در رنج گسترده‌ای از سرطان‌های انسانی deregulate شده و اغلب هم با تومورهای تهاجمی و با قدرت تمایز کم در ارتباط می‌باشند. ژن Axin شامل axin1 (که معمولاً axin گفته می‌شود) و axin2 (که axil نامیده می‌شود)، می‌باشد (۱۲). ژن Axin1 از طریق پیرایش دو نوع مختلف را کد می‌کند که نوع ۲ کوچک تر است و آگزون ۹ در آن از دست رفته است. Axin1 یک پروتئین داربستی است که مسیرهای Wnt / بتا کاتین، SAPK / JNK ، p53 و مسیر TGF بتا را تنظیم می‌کند (۱۰). Axin1 در جنین موش در همه اندام‌ها بیان می‌شود، اما axin2 یک الگوی در مضیقه و محصور است، بدین معنا که axin1 به طور پیوسته اجزا کمپلکس تخریبی را در جهت حفاظت از پایین بودن فعالیت Wnt سیگنالینگ بیان می‌کند اما برخلاف آن axin2 در پاسخ به افزایش غلظت بتا کاتین upregulate (تنظیم مثبت) می‌شود (۱۲). Axin در ابتدا با توجه به نقشی که در تکامل داشته شناسایی گردید (۱۳). تغییرات زیادی در هر دو ژن axin1 و axin2 در تومورهای مختلفی از جمله سرطان

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه در چند بخش قابل ارائه است:

الف- نتایج تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات دموگرافی و پاتولوژی بیماران

در این مطالعه عوامل دموگرافی و فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی با توجه به اطلاعات موجود در پرونده بیماران استخراج و طبقه بندی شد. از میان عوامل دموگرافی فاکتورهای قومیت، محل تولد و تاریخچه بیماری در خانواده بیماران مورد بررسی قرار گرفت و از میان عوامل پاتولوژی فاکتورهای سن بیماران، سایز تومور و مرحله (stage) تومور بر حسب سیستم TNM بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد تعداد بیماران مورد بررسی در این پروژه، ۲۴ نفر زن (۴۳.۶٪) و ۳۱ نفر مرد (۵۶.۴٪) با میانگین سنی ۵۵/۴۸ سال و طیف سنی ۱۶ تا ۷۶ سال بود. هیچ یک از این افراد نسبت خویشاوندی با یک دیگر نداشتند و سن ۶۴/۸٪ آن‌ها بالاتر از ۵۰ سال بود. از نظر تاریخچه، هیچ یک از افراد فامیل این بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال یا سایر سرطان‌ها نبودند. نتایج پاتولوژی تایید شده توسط پاتولوژیست بر اساس Enneking staging system و متغیرهای TNM، نشان داد که از نظر مرحله بندی تومورها، ۹ نمونه در مرحله صفر (stage0)، ۲۵ نمونه در مرحله یک (Stage 1)، ۱۳ نمونه در مرحله دو (Stage 2)، ۸ نمونه در مرحله سوم (stage3) و ۴۱ نمونه نرمال مربوط به بافت کناری ناحیه‌ی توموری همان بیماران بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد ارتباط معناداری بین نتایج حاصل از آزمایش نیمه کمی نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، با بیان ژن Axin1 در این بیماران ($P=0/03$) و بیان ژن C-MYC ($P=0/03$) وجود داشت.

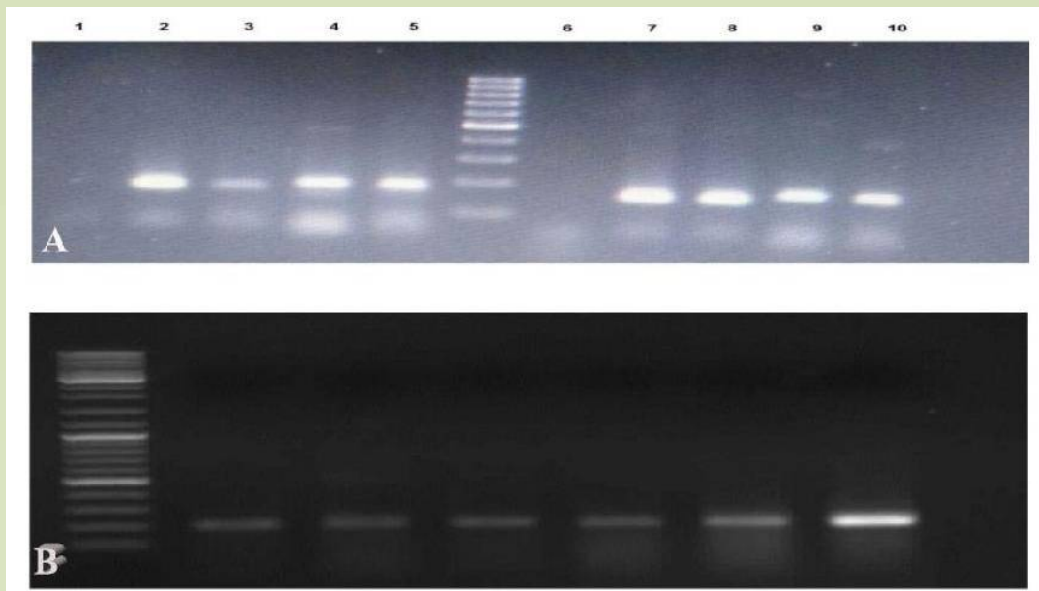
ب- نتایج حاصل از تست های آزمایشگاهی

نتایج بررسی کمی RNA استخراج شده از بافت‌ها

سنتز شد و در ادامه بیان ژن‌های Axin1 و C-MYC با آزمایش RT-PCR بررسی گردید. پرایمر طراحی شده اختصاصی برای ژن‌های Axin1 و C-MYC و ژن بتا‌کتین به عنوان استاندارد داخلی و ژن House keeping از مقاله منتشر شده توسط همین گروه تحقیقاتی استفاده شد. جهت آزمایش RT-PCR، مواد زیر در حجم $10 \mu\text{L}$ به میکروتیوب اضافه و طبق دستورالعمل $5 \mu\text{L}$ از Taq DNA Polymerase 2x، Master Mix Red، پرایمر اختصاصی $0/5 \mu\text{L}$ ، پرایمر اختصاصی Forward و $0/5 \mu\text{L}$ پرایمر اختصاصی Reverse با غلظت $10 \mu\text{M}$ ، $0/5 \mu\text{L}$ از نمونه‌ی الگو با غلظت همسان شده‌ی $1000 \text{ ng} / \mu\text{L}$ برای همه‌ی نمونه‌ها و در نهایت میکروتیوب‌ها در شرایط دمایی 95°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و سپس 35°C سیکل به صورت 95°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰، annealing 65°C درجه سانتی‌گراد برای پرایمرهای اختصاصی بالا به مدت ۴۵ ثانیه و 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای هر دما و در نهایت ۵ دقیقه در 72°C درجه سانتی‌گراد و در دستگاه ترموسیکلر مدل PeQLab, 96 universal gradient، UK thermal cycler قرار داده شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز $1/5\%$ ، مشاهده باند با طول 153 bp و 173 bp نشانه بیان ژن AXIN1 و C-MYC و عدم مشاهده باند در این ناحیه نشانه عدم بیان یا خاموش بودن ژن‌ها می‌باشد. ارتباط بین فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و بررسی نیمه کمی بیان ژن‌های AXIN1 و C-MYC در بافت این بیماران، بر اساس داده‌های حاصل از پرونده بیماران شامل اطلاعات دموگرافی، کلینیکی، پاتولوژی و نیز نتایج حاصل از کارهای آزمایشگاهی با کمک آنالیز آماری نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های t-Test و X^2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. میزان P -Value با در نظر گرفتن $P=0/05$ محاسبه شد.

نشان داد که مقدار غلظت RNA برای تمامی نمونه‌ها مناسب و متفاوت از یکدیگر بود و نسبت جذب A260/A280 برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۸ تا ۲ می‌باشد که نشان دهنده عدم وجود آلودگی پروتئین، کلروفرم و هم چنین عدم تجزیه و تخریب مولکول‌های RNA است. از نظر کیفی نیز تمامی RNA استخراج شده از بافت‌ها دارای کیفیت خوبی بود. نتایج آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های AXIN1، C-MYC و بتا‌کتین، نشان داد که بتا‌کتین به عنوان یک

ژن housekeeping در تمامی نمونه‌ها بیان می‌شود (شکل ۱). در حالی که ژن‌های AXIN1 و C-MYC فقط در برخی از نمونه‌ها بیان داشتند. در واقع در ۵۵٪ نمونه‌ها بیان ژن AXIN1 روشن و در ۴۵٪ نمونه‌ها بیان این ژن خاموش بود در مورد ژن C-MYC نیز در ۸۷/۵٪ بیان این ژن روشن و در ۱۲/۵٪ بیان آن خاموش بود (نمودار ۱).



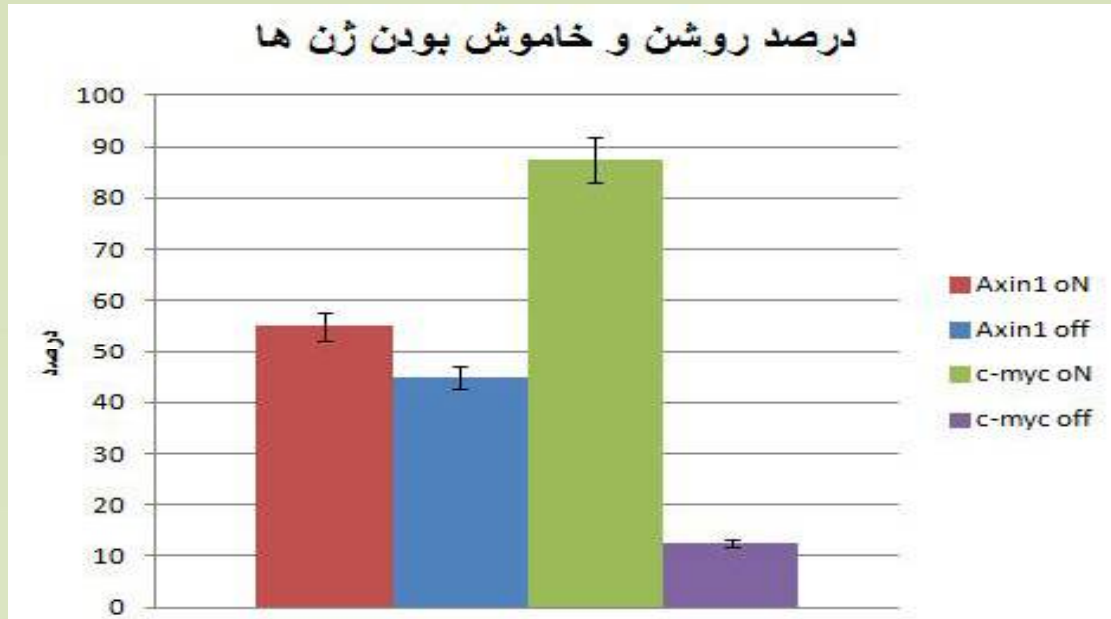
شکل ۱- (A) الگوی حاصل از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن Axin1 (بخش چپ مارکر)، ژن C-MYC (بخش راست مارکر). (B) ژن بتا‌کتین که بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به ترتیب از چپ به راست شکل الف: چاهک ۱ کنترل منفی ژن Axin1، چاهک ۲- بیان ژن Axin1 با اندازه باند ۱۷۳ bp در چند تا از نمونه‌های بافتی بیماران. مارکر با وزن مولکولی 100 bp، چاهک ۶ کنترل منفی ژن c-myc، چاهک ۷-۱۰ بیان ژن C-MYC با اندازه باند ۱۵۳ bp در چند تا از نمونه‌های بافتی بیماران. شکل ب: بیان ژن کنترل داخلی بتا‌کتین بر روی نمونه‌های سنتز شده.

بحث و نتیجه گیری

این نتایج، در راستای مطالعات مشابه انجام شده توسط سایر محققین است که به مختصری از مطالعات بشرح زیر اشاره می‌شود: D.R.Smite و همکارانش در سال ۱۹۹۷ بر روی افزایش بیان پروتئین کوژن *C-myc* را در سرطان زایی روده بزرگ کار کردند به این صورت که

تغییرات پروتئین کوژن *c-myc* در سرطان روده ی بزرگ در سطح RNA مورد بررسی قرار دادند. سطح بیان mRNA را در سلول توموری و نرمال بررسی کردند تکنیک‌هایی که در این بررسی استفاده شد. پس از استخراج RNA نورترن بلات انجام دادند و بعد از

استخراج DNA ساترن بلات و دات بلات بکار گرفتند. تو موورها بود(۱). نتیجه حاصل افزایش بیان این mRNA در ۶۶ درصد از



نمودار ۱- درصد روشن و خاموش بودن ژن Axin1 و C-MYC توسط RT-PCR در بافت بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

Axin1 یک پروتئین داربستی است که مسیرهای Wnt / بتا کاتنین، / JNK SAPK ، ، p53 و مسیر TGF بتا را تنظیم می‌کند(۱۰). جهش‌ها در Axin1 نیز در خیلی از سرطان‌ها یافت شده است(۶). اما همین ژن در سطح پروتئینی کاملاً آشکار است که به عنوان یک داربست در تعامل با پروتئین‌های متعدد نقش حیاتی در تنظیم بسیاری از مسیرهای سلولی ایفا می‌کند. در بررسی‌های انجام شده در سرطان مری نیز نشان داد که در ارتباط با افزایش تهاجم به گره‌های لنفاوی میزان بیان ژن Axin1 کاهش پیدا کرده است(۸). این نکته نیز قابل تامل است که سرطان روده بزرگ همواره تحت تاثیر مسیر سیگنالدهی Wnt قرار دارد و جهش ژنتیکی در ژن APC باعث پولیپ آدنوماتوز خانوادگی می‌گردد که در ۹۵٪ منجر به سرطان روده بزرگ می‌گردد(۳). ولی در بررسی‌های نشان دادیم که ژن Axin1 در ۵۵٪ از بافت بیماران مبتلا به

. مطالعه Sofia Lagerholmi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی شناسایی غیرتهاجمی سطح بیان سه mRNA مربوط به سه ژن C-mycp64 و C-mycp67 و c-erbB2 در سرطان کولورکتال بود. از آن جایی که سرطان کولورکتال یکی از اصلی‌ترین دلایل مرگ و میر در غرب به حساب می‌آید، شناسایی آسیب‌های زود هنگام بسیار موثر است. بنابراین ایشان با استفاده از تکنیک‌های RT-PCR و PCR amplification پس از استخراج RNA از نمونه‌ها و طراحی پرایمر برای ژن‌های مورد نظر، نتایجی به دست آوردند و نشان دادند که حاکی از بیان ۷۸/۵٪ mRNA مربوط به C-mycp64 و ۷۸/۶٪ C-mycp67 در بیماران CRC بود. بنابراین نشان داد علاوه بر این که با CRC ارتباط دارند بلکه مارکرهای بسیار خوبی در بررسی سرطان کولورکتال هستند(۱۱). Salahsho و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند

احتمال را نیز دور نمی‌کند بنابراین انجام این بررسی با استفاده از تکنیک real time PCR جهت حصول نتایج قابل اطمینان در ادامه‌ی روند این پروژه در دست اقدام می‌باشد.

سرطان کولورکتال بیان داشته و در ۴۵٪ این ژن خاموش بوده است بدین معنا که پرایمرهای اختصاصی ما برای این ژن در ۵۵٪ حالتی از این ژن را در بافت بیماران CRC که فاقد هیچ جهشی بوده است تکثیر کرده اند اما از طرفی خاموش بودن بیان در ۴۵٪ از نمونه ها این

1.D.R. Smith, T. M. H.-S. G. (1993). Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 68; 407-413.

2.Downs, K. (1989). Contrasting patterns of myc and N-myc expression during gastrulation of the mouse embryo. *Genes & development*, 3(6); 860-869.

3.Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2); 159-170.

4.Mateyak, M. K. (1997). Phenotypes of c-myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination." *Detail*, 36; 38.

5.Meyer, N., Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer*, 8(12); 976-990.

6.Miyoshi, Y., et al. (1998). "Activation of the -catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3." *Cancer research* 58(12): 2524-2527.

7.Mohandas, K. M. (2011). " Colorectal cancer in India: controversies, enigmas and primary prevention. *Indian. J Gastroenterol* 30(1): 3-6.

8.Nakajima, M., et al. (2003). "Reduced expression of Axin correlates with tumour

progression of oesophageal squamous cell carcinoma." *British journal of cancer* 88(11): 1734-1739.

9.Nesbit, C. E., et al. (1999). "MYC oncogenes and human neoplastic disease." *Oncogene* 18(19): 3004-3016.

10.Salahshor, S. and J. Woodgett (2005). "The links between axin and carcinogenesis." *Journal of clinical pathology* 58(3): 225-236.

11.Sofia Lagerholm, S. L., Sudhir Dutta & Padmanabhan Nair (2005). "Non-invasive detection of c-myc p64, c-myc p67 and c-erbB-2 in colorectal cancer." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 40: 1343-1350.

12.Syed Mudassar, M. S. K., Nighat P. Khan, and M. u.-H. a. K. I. Andrabi (2014). Possible Role of Proto-Oncogenes in Colorectal Cancer — A Population Based Study, INTECH. Vita, M. and M. Henriksson (2006). "The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer." *Seminars in Cancer Biology* 16(4): 318-330.

13.Zeng, L., et al. (1997). "The mouse Fusedlocus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation." *Cell* 90(1): 181-192.

