

بررسی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در مراحل مختلف mRNA بافتی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری و ارتباط آن با فاکتورهای دموگرافی و پاتولوژی بیماران

شهلا محمدگنجی^۱، صدف مهبودی^۲، فردوس رستگار جزی^۳، عیسی جهانزاد^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۱۰/۱۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: ژن KAI1 یک ژن شناخته‌شده سرکوبگر متاستاز است که با مهار تحرک و تهاجم سلول‌های سرطانی اولیه، متاستاز را سرکوب می‌کند. ارزیابی بیان KAI1 در طیف وسیعی از تومورها، نشان داده که KAI1 در همه بافت‌های نرمال بیان دارد اما میزان بیان mRNA آن در بافت‌ها یکسان نیست. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در mRNA بافتی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری و ارتباط خاموش یا روشن بودن این ژن در هر یک از مراحل سرطانی مری و سایر فاکتورهای دموگرافی و پاتولوژی بیماران به‌منظور تعیین یک مارکر مفید در شناسایی مراحل توموری به‌ویژه متاستاز و تهاجم در این بیماران بود.

مواد و روش کار: بدین منظور ۳۵ نمونه توموری تازه و ۱۲ نمونه نرمال از ۳۵ بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی تهیه شد و آزمایش RT-PCR بر روی cDNA سنتز شده حاصل از mRNA بافت‌ها با پرایمرهای بتا‌کتین و ژن KAI1 انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد در ۶۹٫۲٪ نمونه‌ها بیان ژن KAI1 روشن و در ۳۰٫۸٪ درصد نمونه‌ها بیان این ژن خاموش بود. به‌طور جزئی‌تر نمونه‌های مرحله ۳ و ۴ و نمونه‌های توموری واجد متاستاز اصلاً بیانی برای این ژن را نشان نداد. تجزیه و تحلیل آماری مقایسه بیان ژن KAI1 در چهار گروه نرمال، مرحله یک، دو و سه توموری نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بیان ژن KAI1 در این گروه‌ها وجود دارد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: ارتباط معناداری بین بیان نیمه کمی ژن KAI1 با مرحله توموری نمونه‌ها ($P < 0.05$) و با متاستاز ($P = 0.00015$) مشاهده شد.

کلیدواژه‌ها: KAI1، ژن سرکوبگر متاستاز، سرطان بافت پوششی سنگفرشی مری، بیان mRNA

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دوازدهم، ص ۱۱۲۷-۱۱۱۹، اسفند ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران تلفن: ۴۴۵۸۰۴۶۶

Email: shahlamg@yahoo.com

مقدمه

وجود میزان بیان KAI1 در تومورهای بدخیم توپور (Solid tumors)، با در نظر گرفتن تنظیم منفی و یا کاهش بیان آن در مراحل پیشرفته سرطان، می‌تواند پیش‌آگهی خوبی در بیماران سرطانی (از نظر کلینیکی) باشد (۲). در برخی مقالات ارتباط معکوسی بین میزان بیان KAI1 و پیشرفت و تهاجم/متاستاز سلول‌های سرطانی در تعداد زیادی از سرطان‌ها مانند سرطان‌های پروستات، مثانه، سینه، کولون، معده، روده بزرگ، گردن رحم، پستان، پوست، ریه، کبد، تیروئید، لوزالمعده و HCC^۵ گزارش شده است (۳).

ژن KAI1 یا CD82، به‌عنوان یک ژن سرکوبگر متاستاز تومور شناخته‌شده است و متاستاز تومور را با مهار تحرک و تهاجم سلول‌های سرطانی اولیه سرکوب می‌کند (۱). مطالعات نشان داده میزان بیان KAI1 به‌عنوان یک مارکر مفید در عملکرد متاستاتیک تهاجم در انواعی از تومورهای انسانی است. ارزیابی بیان KAI1 در دهه گذشته در طیف وسیعی از تومورها انجام و مشخص شد که KAI1 در همه بافت‌های نرمال بیان می‌شود ولی میزان بیان آن در بافت‌های مختلف متفاوت است.

^۱ استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

^۲ کارشناسی ارشد زیست سلولی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

^۳ دانشیار بیوشیمی بالینی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

^۴ دانشیار پاتولوژی، تومور بانک ایران، انستیتو کانسر، بیمارستان امام خمینی، تهران، ایران

Human Hepatocellular Carcinoma ^۵

هدف از این پروژه تحقیقاتی، ارزیابی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در mRNA بافتی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری و ارتباط خاموش یا روشن بودن این ژن در هر یک از مراحل سرطانی مری و مقایسه با فاکتورهای دموگرافی و پاتولوژی بیماران به منظور تعیین یک مارکر مفید در شناسایی مراحل توموری به ویژه متاستاز و تهاجم می‌باشد. بر پایه نتایج حاصله، پزشک متخصص قادر خواهد بود بهترین روش درمانی را در زمانی سریع‌تر، نسبت به روش متداول موجود، بکار برد.

مواد و روش کار

در این مطالعه ابتدا جامعه آماری مورد نظر و حجم نمونه با توجه به عواملی چون شیوع سرطان بافت سنگفرشی مری (ESCC) 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 ۳۵ نمونه توموری و ۱۲ عدد نمونه نرمال (نمونه سالم مجاور تومور) تعیین گردید. این تعداد نمونه از میان بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی و تومور بانک ایران تهیه شد. همراه با نمونه‌های بافتی، اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلایان به ESCC بدست آمد. به منظور رعایت قوانین اخلاق زیستی، قبل از نمونه‌گیری از تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضایت نامه ای گرفته شد و سپس بافت‌ها بصورت تازه و در شرایط ازلت مایع به فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل گردید. در ادامه، اطلاعات حاصل از بیماران نمونه‌ها مورد بررسی دقیق قرار گرفت و تعدادی از نمونه‌ها که فاقد شرایط لازم بود، از ادامه مطالعه در این پروژه خارج شد. این شرایط عبارتست از: نامشخص بودن محل اولیه سرطان، ابتلای بیمار به سایر سرطان‌ها علاوه بر ESCC، سایر انواع سرطان مری به جز ESCC در نتایج هیستوپاتولوژیکی تومور، دقیق نبودن اطلاعات تاریخیچه یا گزارشات پاتولوژی بیماران و نسبت فامیلی بین بیماران.

از تمامی نمونه‌های بافتی سرطانی و نرمال (بافت مجاور تومور)، استخراج RNA بکمک کیت استخراج RNA شرکت Intron و مطابق دستور کار آن انجام شد. سپس سنتز cDNA بکمک کیت Intron و مطابق دستور کار مربوطه انجام گرفت و در ادامه بیان ژن CD82 یا KAI1 با آزمایش RT-PCR بررسی گردید. پرایمر اختصاصی برای ژن KAI1 و ژن بتا‌کتین به عنوان استاندارد داخلی و ژن خانه دار (House keeping) طراحی شد. توالی پرایمرها به شرح زیر می‌باشد:

CD82_F: 5' GATGTGGTTGTATTCGTG 3'

از طرف دیگر برخی بررسی‌ها نیز ارتباط مستقیمی بین کاهش بیان KAI1 و موتاسیون P53 را در سلول‌ها نشان داده است (۴-۶). مطابق نتایج مطالعه Marreiros و همکاران که جزو اولین مطالعات انجام شده بر روی ۸۰ بیمار مبتلا به HCC است، بیان پروتئین‌های JunB و KAI1/CD82 به ترتیب در ۷۳/۷۵ درصد و ۸۰ درصد تومورها کاهش یافته بود ولی در ۴۸/۷۵ درصد تومورها، p53 دارای بیان بیش از حد بود (۴، ۶). به عبارت دیگر بین میزان بیان KAI1 و وجود متاستاز در گره لنفاوی، بافت کبد^۱، یا صفاقی یک رابطه معکوس وجود دارد. به طور کلی گزارش‌ها نشان می‌دهد که بررسی میزان بیان ژن KAI1 در هر مرحله از سرطان به ویژه در مرحله متاستاز بسیار مهم است زیرا سطح بیان نسبتاً دقیق این ژن برای هر نوع سرطان، اختصاصی است.

از طرفی سرطان مری به عنوان ششمین سرطان در جهان و چهارمین در کشورهای در حال توسعه شیوع دارد و مطالعات نشان می‌دهد که علیرغم بهبود سطح زندگی فرهنگی- اقتصادی در جمعیت ایرانی، درصد وقوع این بیماری نه تنها کاهش نیافته بلکه افزایش نیز یافته است. درجه بقای پنج ساله این بیماری بسیار پایین و عموماً کمتر از ۸ درصد با میزان بقاء عمر کمتر از ۹ ماه پس از درمان می‌باشد. سرطان مری دارای دو نوع است: آدنوکارسینوما و کارسینوما سلول‌های سنگفرشی (esophageal Squamous Cell Carcinomas) که نوع کارسینوما آن در ایران شایع‌تر است. بالاترین شیوع سرطان مری مربوط به منطقه ای موسوم به کمر بند آسیایی است که از شرق ترکیه آغاز و پس از عبور از قزاقستان، ترکمنستان، تاجیکستان و ایران به سمت شرق و شمال چین ادامه می‌یابد و به هنگ‌کنگ و ژاپن ختم می‌شود. در ایران اغلب بیماران سرطانی مربوط به استان‌های شمالی و شمال شرقی (گلستان: گیلان، مازندران و شمال غرب کشور) می‌باشند. محققین بر این اعتقادند عوامل محیطی، ترکیبات شیمیایی و سرطانزای موجود در غذا، عادات غذایی، نحوه نگهداری مواد غذایی، پخت و پز و نیز استعدادهای ژنتیکی جمعیتی، از جمله فاکتورهای اتیولوژیک مهم در سرطان مری هستند. متأسفانه در اکثر موارد، سرطان مری خیلی دیر تشخیص داده می‌شود طوری که بیشترین مرگ و میر ناشی از این سرطان به علت متاستاز تومور قبل از تشخیص بیماری است. با توجه به این حقایق، امروزه توجه زیادی به تشخیص و درمان این بیماری معطوف است (۷، ۸).

¹ Interahepatic

فرار PeQLab, 96 universal gradient, UK thermal cycler داده شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، مشاهده باند با طول 100bp نشانه بیان ژن KAI1 و عدم مشاهده باند در این ناحیه نشانه عدم بیان یا خاموش بودن ژن می‌باشد.

ارتباط بین فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری و بررسی نیمه کمی بیان ژن KAI1 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 نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های فیشر، پیرسون، t-Test و کای دو مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. میزان P-Value با در نظر گرفتن $\alpha < 0.05$ محاسبه شد.

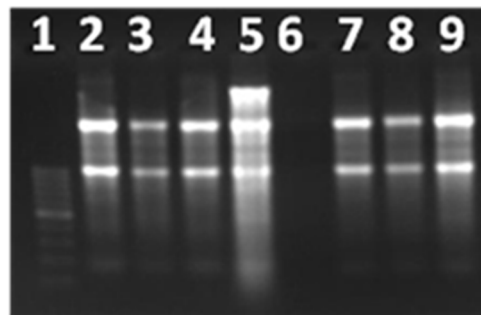
CD82_R: 5' ATCTCCTGCTTCTTTAGTC 3'

Beta_F: 5' TCA CCA ACT GGG ACG ACA TG

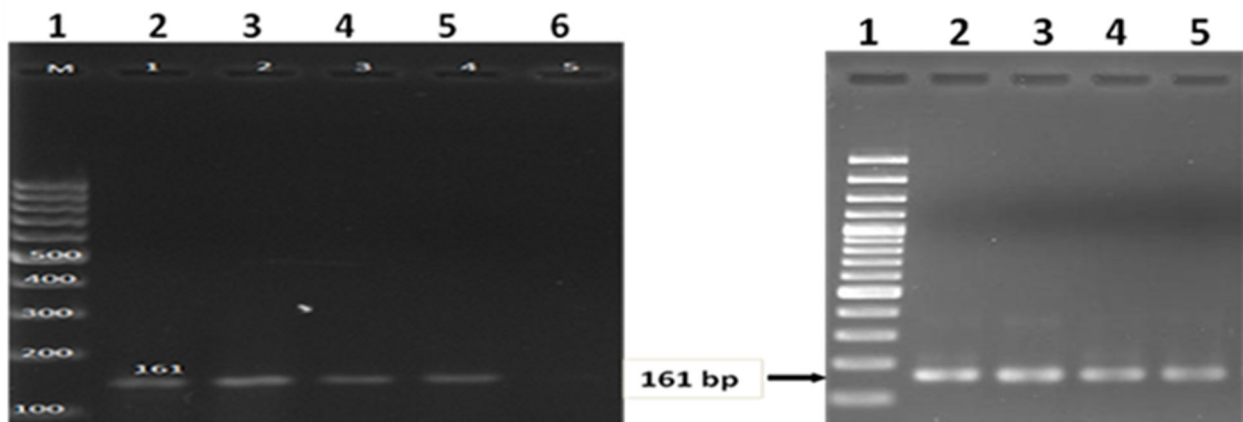
3'

Beta_R: 5' ACC GGA GTC CAT CAC GAT G 3'

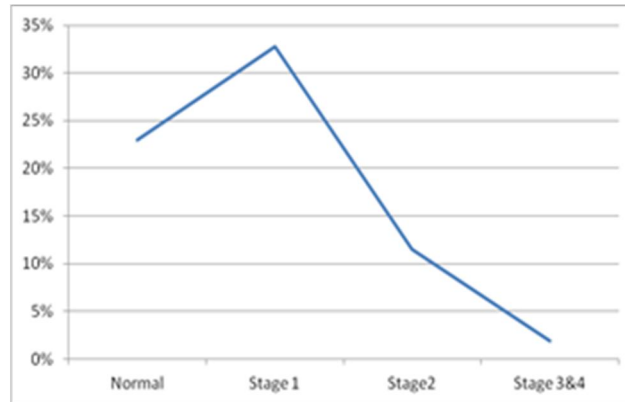
جهت آزمایش RT-PCR، مواد زیر در حجم 12.5 μ L به میکروتیوب اضافه شد. 1 mM dNTPs (Fermentase Co. Burlington, Ontario, Canada), 0.2 μ M specific oligonucleotide primers, 100 ng modified DNA, U/ μ L Taq polymerase (Hot start, Qiagen, Valencia, CA, USA)؛ و میکروتیوبها در شرایط دمایی 95°C بمدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به صورت 95°C، 57°C annealing برای پرایمر های اختصاصی بالا و 72°C بمدت ۳۰ ثانیه برای هر دما و در نهایت ۱۰ دقیقه در 72°C و در دستگاه ترموسیکلر مدل



شکل (۱): الگوی RNA استخراج شده از چند تا از بافت‌های توموری و نرمال از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال بر روی آگارز ۱/۵ درصد. چاهک اول سمت چپ، ladder 100bp، چاهک ۶: خالی، چاهک‌های ۲-۵: چند تا از بافت‌های توموری بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، چاهک‌های ۷-۹: چند تا از بافت‌های نرمال



شکل (۲): الگوی حاصل از از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن بتاآکتین (شکل سمت راست، ۲-الف) و ژن KAI1 (شکل سمت چپ، ۲-ب) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. شکل ۲-الف- به ترتیب از چپ به راست، چاهک شماره ۱: مارکر وزن مولکولی 100 bp، چاهک‌های ۲-۵، بیان بتاآکتین در چند نمونه توموری و نرمال. باندهای با اندازه 161bp، نشانه بیان این ژن می‌باشد. شکل ۲-ب- به ترتیب از چپ به راست، چاهک شماره ۱: مارکر وزن مولکولی 100 bp، چاهک شماره ۲: کنترل کثبت، چاهک شماره ۶: کنترل منفی، چاهک‌های شماره ۲-۵: بیان ژن KAI1 در چند تا از نمونه‌های بافتی بیماران. باندهای با اندازه 161bp، نشانه بیان این ژن می‌باشد.



شکل (۳): ارتباط بیان نیمه کمی ژن KAI1 در مراحل مختلف سرطان وبافت نرمال را نشان می‌دهد. این ارتباط خطی می‌باشد و نشان می‌دهد بیان ژن KAI1 با شیب یکسانی از Stage I به سمت مراحل دیگر تغییر کرده است طوری‌که در در مراحل ۳ و ۴ تقریباً بیانی دیده نمی‌شود.

جدول (۱): ارتباط بین دادهای نیمه کمی بیان ژن KAI1 و فراوانی پارامترهای دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلا به ESCC. میزان P-Value با در نظر گرفتن $\alpha < 0.05$ محاسبه شد.

Clinical Factors		Expression of KAI1		P-value
		On n(%)	Off n(%)	
Gender	Male (n= 18)	10(28.6)	8(22.9)	0.3
	Female (n= 17)	6(17.1)	11(31.4)	
Age	50< (n=14)	8(22.9)	6(17.1)	1
	50> (n=21)	12(34.3)	9(25.7)	
Tumor Size	<5.7 (n=19)	11(31.4)	8(22.9)	0.5
	>5.7 (n=16)	7(20)	9(25.7)	
T	T2 (n=13)	6(17.6)	7(20.6)	1
	T3 (n=21)	10(29.4)	11(32.4)	
N	N0 (n=13)	5(14.3)	8(22.9)	1
	N1 (n=13)	6(17.1)	7(20)	
	N2 (n=9)	5(14.3)	4(11.4)	
Metastasis	M0 (n=24)	19(54.3)	5(14.3)	0.00015*
	M1 (n=11)	1(2.8)	10(28.6)	
Stage	0 (n=12)	12(23)	0(0)	0.04*=(S2 Vs. S1) 0.02*=(S2 Vs. S3&4) 0*(S1 Vs. S3&4)
	1(n=18)	17(32.8)	1(1.9)	
	2(n=10)	6(11.5)	4(7.8)	
	3&4(n=12)	1(1.9)	11(21.1)	

نتایج

الف- نتایج تجزیه و تحلیل آماری دموگرافی و اطلاعات

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

بیماران

و همچنین عدم تجزیه و تخریب مولکول‌های RNA). از نظر کیفی نیز تمامی RNA استخراج شده از بافت‌ها واجد کیفیت خوبی بودند (شکل ۱).

نتایج آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های KAI1 و بتاکتین، نشان داد که بتاکتین به‌عنوان یک ژن housekeeping در تمامی نمونه‌ها بیان می‌شود (شکل ۲ الف) در حالیکه ژن KAI1 فقط در برخی از نمونه‌ها بیان داشت. در واقع در ۶۹٫۲ درصد نمونه‌ها بیان این ژن روشن و در ۳۰٫۸ درصد نمونه‌ها بیان این ژن خاموش بود (جدول ۱). به‌طور جزئی‌تر تمامی نمونه‌های نرمال، ۳۲٫۸ درصد (۱۷ تا ۱۸ نمونه) مرحله یک توموری، ۱۱٫۵ درصد نمونه‌های توموری مرحله ۲ و ۱٫۹ درصد نمونه‌های توموری مرحله ۳ و ۴، دارای بیان برای ژن KAI1 بودند و ۲۱ درصد (۱۱ تا ۱۲ نمونه) مرحله ۳ و ۴ برای این ژن بیانی را نشان ندادند. همچنین نمونه‌های توموری واجد متاستاز اصلاً بیانی برای این ژن را نشان نداد (شکل ۲ ب).

ج- آنالیز آماری ارتباط بین نتایج RT-PCR و اطلاعات دموگرافی و اطلاعات بیماران: تجزیه و تحلیل آماری مقایسه بیان ژن KAI1 در چهار گروه نرمال، Stage1, Stage2, Stage3 و بکمک تست Post Hoc نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بیان ژن KAI1 در گروه‌های نرمال، Stage1, Stage2, Stage3&4 وجود دارد ($P < 0.05$).

بر اساس نتایج سایر مقالات، انتظار این است که بیان ژن KAI1 در سرطان‌های توموری مانند مری، معده و ... به ترتیب از مرحله نرمال به Stage 1, Stage 2, Stage 3 کمتر شود و در Stage 4 اصلاً بیانی نداشته باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز در این راستا می‌باشد زیرا ارتباط بیان ژن KAI1 در گروه‌های توضیح داده شده در بالا به صورت خطی است (شکل ۳) که نشان می‌دهد بیان این ژن با شیب یکسانی در مراحل مختلف سرطان تغییر می‌کند.

آنالیز داده‌های RT-PCR با سایر فاکتورهای بالینی:

بدین منظور، همراهی بین داده‌های نیمه کمی حاصل از RT-PCR برای ژن KAI1 و فاکتورهای ریسک بالینی از جمله ارتباط بیان ژن در مراحل مختلف و متاستاز (فاکتور M)، متاستاز به گره‌های لنفاوی (فاکتور N)، میزان رشد تومور در لایه‌های دیواره روده (فاکتور T)، سایز تومور، سن و جنسیت مورد بررسی قرار گرفت و معنی‌داری ارتباط آن‌ها توسط آزمون فیشر، پیرسون و کای‌دو انجام شد ($P < 0.05$). نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد با توجه به داده‌های آماری و میزان *P-Value* ارتباط معنی‌داری بین بیان نیمه کمی ژن KAI1 با متاستاز مشاهده شد ($P = 0.00015$). همچنین ارتباط معناداری بین بیان نیمه کمی ژن

در این مطالعه عوامل دموگرافی و فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی با توجه به اطلاعات موجود در پرونده بیماران استخراج و طبقه بندی شد البته گاهی برخی اطلاعات در مورد بعضی از بیماران در دسترس نبود. از میان عوامل دموگرافی فاکتورهای قومیت، محل تولد، تاریخچه بیماری در خانواده بیماران، استعمال یا عدم استعمال سیگار توسط بیماران مورد بررسی قرار گرفت و از میان عوامل پاتولوژی فاکتورهای سایز تومور و مرحله (stage) تومور بر حسب سیستم TNM بررسی شد.

نتایج نشان می‌دهد تعداد بیماران مورد بررسی در این پروژه، ۱۷ نفر زن (۴۸٫۵ درصد) و ۱۸ نفر مرد (۵۱٫۵ درصد) با میانگین سنی 60.8 ± 13.9 سال و طیف سنی ۳۷ تا ۸۴ سال بود. هیچ یک از این افراد نسبت خویشاوندی با یکدیگر نداشتند و سن ۶۳ درصد آن‌ها بالاتر از ۵۰ سال بود. از نظر قومیت نیز ۵۳ درصد آذری (۳۳ نفر)، ۱۳ درصد (۷ نفر) گیلکی و شمالی و ۳۳ درصد (۱۷ نفر) از بیماران کرد، لر و یا فارس بودند. در واقع اکثر بیماران مورد مطالعه در این بررسی آذری و شمالی (۵/۶۶ درصد) و محل تولد و سکونت آن‌ها اردبیل، گرگان، مازندران و شهرستان‌های تابعه (منطقه ای واقع در کمربند مرکزی آسیایی از نظر شیوع سرطان مری) بود. اعتیاد به سیگار و سایر مخدرها، در ۷/۵ درصد بیماران مشاهده شد. از نظر تاریخچه، هیچ یک از افراد فامیل این بیماران مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری یا سایر سرطان‌ها نبودند. نتایج پاتولوژی تأیید شده توسط پاتولوژیست بر اساس سیستم مرحله بندی انکینگ (Enneking staging system) و متغیرهای TNM، نشان داد که از نظر مرحله بندی تومورها، ۱۸ نمونه در مرحله یک (Stage 1)، ۱۰ نمونه در مرحله دو (Stage 2)، ۱۲ نمونه در مرحله سوم و چهارم (Stage 3 & 4) و ۱۲ نمونه نرمال بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که بین فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری و وضعیت توموری ایشان از نظر مراحل پیشرفت سرطان، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($P\text{-value} > 0.05$). همچنین نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که بین فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری و متاستاز تومور، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد و متاستاز سرطان بافت سنگفرشی مری مستقل از فاکتورهای بالینی Tumor size، T، N و Stage رخ می‌دهد ($P\text{-value} > 0.05$).

ب- نتایج حاصل از تست‌های آزمایشگاهی:

نتایج بررسی کمی RNA استخراج شده از بافت‌ها 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 است (نشان دهنده عدم وجود آلودگی پروتئین، کلروفورم

می‌یابد. او در سالهای 2002 و 2006 با مطالعه مبتلایان به سرطان پروستات و سرطان مثانه با روش ایمنوهایستوشیمی نشان داد با پیشرفت بیماری میزان بیان پروتئین کاهش می‌یابد (۵، ۶، ۱۶). M. Andreas آلمانی در سال 2005 با مطالعه بر روی متاستاز سرطان پستان که باعث متاستاتیک شدن مغز می‌شود و روش Real time PCR نتایج ارزشمندی را کسب کرد و اعلام کرد که بیان ژن KAI1 در نمونه‌های متاستاز مشاهده نشد در حالیکه در نمونه‌های غیر متاستاتیک، بیان کمی از این ژن نشان داده شد (۱۷).

Maurer CA نیز با مطالعه میزان بیان ژن و پروتئین KAI1 در بیماران مبتلا به سرطان کولون نشان داد که میزان بیان در سطح mRNA و پروتئین در بافت توموری نسبت به بافت طبیعی کولون، ۸۷ درصد بیشتر است. این افزایش ۹/۱ برابر میانه ($P < 0.001$) بود بیان KAI1 در سطح mRNA به شدت وابسته به مرحله تومور بود. بیان KAI1 در سطح mRNA در سرطان کولورکتال در مراحل ۲ و ۳ به میزان قابل توجهی بالاتر از مرحله ۴ تومور بود (به ترتیب $P < 0.03$ و $P < 0.015$) (۱۸). تنها مطالعه انجام شده در ایران بر روی سمیت cisplatin بر سمیت سلول‌ها و متاستاز سل لاین MCF-7 مربوط به سرطان پستان است که در سال 2012 توسط مختاری و همکاران به چاپ رسید. ایشان به بررسی کاهش بیان ژن‌های KAI1/TBP با تکنیک Real time نشان دادند که ماده cisplatin باعث کاهش بیان این ژن‌ها می‌شود (۱۹).

از محدودیت‌های این مطالعه، تهیه نمونه و اخذ رضایتنامه از بیماران بود. تکمیل صحیح اطلاعات پرسشنامه بخصوص اطلاعات پاتولوژی بیماران از دیگر محدودیت‌های این طرح تحقیقاتی است و لازم است پرکردن صحیح پرسشنامه توسط بیماران تحت نظر یک پرستار آموزش دیده انجام شود. بدلیل چند عاملی بودن پدیده سرطان و پیچیدگی شدید مولکولی مراحل سرطان به‌ویژه متاستاز، پیشنهاد می‌شود مطالعات مشابه البته با تعداد نمونه بسیار بالاتر بر روی سایر مارکرهای مولکولی دخیل در مسیر سرطانی شدن برای تشخیص زود هنگام متاستاز صورت پذیرد. در این صورت است که می‌توان ادعا نمود داده‌های تحقیقات مولکولی در حوزه بهداشت و سلامت کاربردی است.

در آخر با توجه اینکه این پروژه به‌عنوان اولین مطالعه در جمعیت ایرانی می‌باشد و نتایج حاصله در راستای سایر مطالعات مشابه در سطح جهان است، می‌توان تاکید کرد که کاهش/فقدان بیان ژن KAI1 در مراحل پیشرفته و متاستازی در بسیاری از سرطان‌ها دیده شده است اما بررسی میزان تفاوت در سطح بیان از یک نوع سرطان به نوع دیگر متفاوت است. در صورت شناسایی

KAI1 با مرحله توموری نمونه‌ها مشاهده شد ($P < 0.05$). به‌طوری‌که جزئی باید گفته شود این ارتباط در مراحل ۲ نسبت به یک ($P = 0.04$)، مرحله ۳ و ۴ نسبت به یک ($P = 0.02$)، مرحله ۳ و ۴ نسبت به ($P = 0.00$) دو وجود دارد (جدول ۱).

بحث

در خصوص همراهی بیان ژن KAI1 با فاکتورهای ریسک بالینی در سرطان بافت سنگفرشی مری، مطالعات اندکی صورت گرفته است و داده‌های محدودی در اختیار داریم که این موضوع به نوبه خود اهمیت این مطالعه را نشان می‌دهد. از طرف دیگر چون سرطان یک بیماری پیچیده و چند فاکتوری است، سیستم‌های طبقه بندی سنتی سرطان با چالش‌های زیادی روبه رو شده و نیازمند داده‌های دقیق‌تر و با جزئیات بیشتر می‌باشد؛ بنابراین با توجه به اینکه بقای طول عمر اکثر بیماران مبتلا به سرطان مری پس از جراحی، ۵ سال و گاهی کمتر است و از طرف دیگر، نیازهای بیماران سرطانی در سال‌های اول تا پنجم پس از تشخیص با هم متفاوت است، بررسی کامل‌تر سرطان مری بسیار ضروری می‌باشد. همچنین بررسی‌های این بیماری از جنبه مولکولی در پیشرفت و توسعه متاستاز هنوز درک ضعیفی است که عمدتاً به دلیل این است که متاستاز یک فرایند بسیار پیچیده است و شامل انواعی از عوامل مثبت و منفی می‌باشد (۹، ۱۰).

نتایج این مطالعه تحت عنوان بررسی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در بافت‌های توموری و نرمال، که اولین بررسی در این زمینه در ایران می‌باشد، نشان داد که ژن KAI1 در ۶۹،۲ درصد نمونه‌ها روشن و در ۳۰،۸ درصد نمونه‌ها خاموش بود. میزان بیان ژن KAI1 با افزایش مراحل توموری نسبت عکس دارد و اختلاف معنی‌داری در بیان ژن KAI1 در گروه‌های نرمال، Stage 1، Stage 2 و Stage 3&4 وجود دارد ($P < 0.05$). این نتایج، در راستای مطالعات مشابه انجام شده توسط سایر محققین است که نشان دادند با پیشرفت بیماری، بیان در مرحله متاستاز رو به کاهش می‌گذارد اما اندازه میزان بیان در هر نوع از سرطان با نوع دیگر متفاوت است (۱۱-۱۳). به‌عنوان مثال FU-Shing Liu در سالهای 2001 و ۲۰۰۳ با مطالعه بیماران تایوانی مبتلا به مراحل مختلف سرطان دهانه رحم و آندومتر و روش‌های Quantitative Real-Time PCR و ایمنوهایستوشیمی نشان داد با پیشرفت بیماری و رسیدن به مراحل متاستاز بیان ژن و پروتئین رو به کاهش است به طوری که در مراحل متاستاز بیانی دیده نمی‌شود (۱۴، ۱۵). Paul Jackson استرالیایی در سال ۲۰۰۱ با بررسی رده سلولی بیماران مبتلا به سرطان پروستات و مثانه با روش RT-PCR نشان داد با پیشرفت بیماری میزان بیان کاهش

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولان و پرسنل محترم بیمارستان امام خمینی و تومور بانک ایران که در تهیه نمونه‌های مورد نظر برای این تحقیق، همکاری و مساعدت خوبی داشتند قدردانی نمایند.

بیمارانی که کاهش بیان در سلول‌های توموری را نشان می‌دهند، ممکن است پزشکان بتوانند راهکار مناسب درمانی را پیدا کند و این بیماران را جهت مهار متاستاز مورد هدف درمانی قرار دهند. استراتژی بازگرداندن بیان KAI1 نیز ممکن است به‌منظور محدود کردن گسترش سلول‌های توموری مورد بررسی قرار گیرد.

References:

- Miranti CK. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cell Signal* 2009;21(2):196–211.
- Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res* 1999;59(22):5724–31.
- Friess H. Differential Expression of Metastasis-Associated Genes in Papilla of Vater and Pancreatic Cancer Correlates With Disease Stage. *J Clin Oncol* 2001. 19(9): 2422-32.
- Guo W. Detection of promoter hypermethylation of the CpG island of E-cadherin in gastric cardiac adenocarcinoma. *Eur J Med Res* 2009. 14: 453-8.
- Marreiros A, Dudgeon K, Dao V, Grimm M-O, Czolij R, Crossley M, et al. KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells. *Oncogene* 2005;24(4):637–49.
- Jackson P. Downregulation of KAI1 mRNA in localised prostate cancer and its bony metastases does not correlate with p53 overexpression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2003. 6(2): 174-81.
- Mohammad Ganji S, et al. Associations of risk factors obesity and occupational airborne exposures with CDKN2A/p16 aberrant DNA methylation in esophageal cancer patients. *Dis Esophagus* 2010. 23(7): 597-602.
- Mohammad Ganji S. E-cadherin promoter methylation in the high risk region for Squamous Cell Carcinoma of Esophagus comparison and correlation with pathological features of the disease. *J Sci Islamic Republic of Iran* 2014. 25(1): 19 - 26.
- Bernards R and W. RA. A progression puzzle. *Nature*, 2002: 418-823.
- Miyazaki T. Mutation and Expression of the Metastasis Suppressor Gene KAI1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer* 2000 89(5): 955-62.
- Friess H, Guo XZ, Berberat P, Graber HU, Zimmermann A, Korc M, et al. Reduced KAI1 expression in pancreatic cancer is associated with lymph node and distant metastases. *Int J Cancer* 1998;79(4):349–55.
- Uchida S. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999 79(7-8): 1168-73.
- Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61(13):5284–8.
- Liu FS, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ES, et al. KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159(5):1629–34.
- FU-Shing L. KAI1 gene relates to squamous cell carcinoma of the larynx. *Chinese Med J* 2003. 116(9): 1307.
- Rowe A, Jackson P, Expression of KITENIN, a KAI1/CD82 binding protein and metastasis

- enhancer, in bladder cancer cell lines: Relationship to KAI1/CD82 levels and invasive behavior. *Oncology Reports* 2006. 16: 1267-72.
17. Stark AM, et al. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005. 131: 191-8.
18. Maurer CA, et al. Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery Today*, 1999. 126(5): 869-80.
19. Mokhtari MJ, et al. Cisplatin Induces Up-Regulation of KAI1, a Metastasis Suppressor Gene, in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Tropical J Pharmaceutical Res* 2012. 11(4): 523-9.

SEMI-QUANTITATIVE EVALUATION OF KAI1 GENE EXPRESSION AND CORRELATION BETWEEN STAGES OF TUMORS, DEMOGRAPHIC AND PATHOLOGIC FACTORS OF PATIENTS WITH SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF ESOPHAGUS

Shahla Mohammad Ganji^{1*}, Sadaf Mahboudi², Ferdous Rastgar-Jaziri³, Eisa Jahanzad⁴

Received: 20 Oct, 2014; Accepted: 8 Jan, 2015

Abstract

Background & Aims: KAI1 is a tumor suppressor gene and inhibitor of metastasis in a wide range of malignancies. While it is ubiquitously expressed in normal tissues, KAI1 expression is down regulated in tumors. The present research proposal aims semi quantitative evaluation of KAI1 mRNA expression in Iranian patients with Squamous Cell Carcinoma of Esophagus(SCCE) on finding a correlation between expression levels of KAI1 and stage of tumorigenesis, especially metastasis and invasion of SCCE as well as demographic and pathologic factors of patients.

Materials & Methods: In this study, KAI1 and β -Actin mRNA levels was detected by RT-PCR on 35 tumor tissues and 12 normal tissues as fresh samples obtained from 35 patients referring to Imam Khomeini Hospital.

Results: Accordingly, 69.2% and 30.8% of the sample were on and off for KAI1 gene expression, respectively. The samples in stages 3, 4, and metastatic phases showed no expression of this gene. Statistical analysis showed that there was a significant differences of the KAI1 expression between four groups of samples; normal, stage 1, 2, 3 ($P < 0.05$).

Conclusion: There is a significant difference between semi-quantitative of KAI1 expression and stages of tumor samples ($P < 0.05$) as well as semi-quantitative of KAI1 expression and metastasis ($P = 0.00015$). The outcome of the present research proposal would be applicable as a suitable mean for clinicians in order to better treat Esophageal Squamous-Cell Carcinoma.

Keyword(s): KAI1, Metastasis suppressor gene, Squamous cell carcinoma of esophagus, mRNA expression

Address: National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Shahrak-e Pajoohesh, km 15, Tehran - Karaj Highway, Tehran, Iran, **Tel:** +98 21 44787466

Email: shahlamg@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2015; 25(12): 1127 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Molecular Genetics Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran (Corresponding Author)

² MSC in Cell Molecular Biology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

³ Associate Professor, Biochemistry Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Pathology Department, Iran Tumor bank, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran