● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ نوزدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۲۵-۱۱۳، ۱۳۹۱

مقالهٔ پژوهشی

بررسی بیان ژن نوکلئوستمین به‌عنوان یک مارکر مولکولی جدید در تومورهای پستان

محمد علی حسینپورفیضی[*1]، سمیه ساعد[2]، اسماعیل بابایی[3]، وحید منتظری[4]، منیره حلیمی[5]

خلاصه

مقدمه: نوکلئوستمین یک پروتئین هسته‌ای متصل‌شونده به GTP می‌باشد، که به‌میزان بالایی در سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ بیان می‌شود، اما در بافت‌های تمایز یافته بیان نمی‌شود. هم‌چنین در انواعی از بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطانی نیز بیان می‌گردد. به‌دلیل شیوع روزافزون تومورهای پستان در سال‌های اخیر در این پژوهش صلاحیت بیان ژن نوکلئوستمین به‌عنوان مارکر مولکولی در تشخیص و درمان تومورهای پستان ارزیابی شده است.

روش: در مجموع ۴۱ نمونه‌ی توموری و ۲۰ نمونه‌ی طبیعی مربوط به حاشیه‌ی تومور با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی مورد مطالعه قرار گرفتند، و ژن β2 میکروگلوبولین (β2m) به‌عنوان کنترل داخلی به‌کار رفت. با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نتایج به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج این بررسی نوکلئوستمین یک مارکر تکثیری است و بیان آن درتومورهای پستان بیشتر از حاشیه‌ی تومور می‌باشد. سطح بیان نوکلئوستمین به‌طور معنی‌داری در ارتباط با ماهیت تکثیری تومورهای خوش‌خیم پستان بوده و افزایش معنی‌داری را بین تومورهای بدخیم و خوش‌خیم نشان می‌دهد. همچنین سطح بیان نوکلئوستمین به‌طور معنی‌داری در ارتباط با افزایش درجه‌ی تومورهای بدخیم پستان می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این نتایج استفاده از نوکلئوستمین را به‌عنوان مارکر تشخیصی در تفکیک و شناسایی بافت‌های توموری از غیرتوموری مؤثر نمی‌داند، ولی استفاده از آن را درتخمین اندازه‌ی تومور و هم چنین به‌عنوان فاکتور بالقوه پیش‌آگهی‌دهنده برای تعیین شدت‌های مختلف توموری در تومورهای پستان و پیش بینی رفتار آینده تومورها ممکن می‌سازد، از اینرو می‌تواند در کنار سایر روش‌های مرسوم آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. هم چنین ممکن است مهار نوکلئوستمین بتواند راهکار مؤثری در کاهش نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی پستان باشد.

واژه‌های کلیدی: نوکلئوستمین، سرطان پستان، RT-PCR

۱- استاد رادیوبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز ۲- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز ۳- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس ۴- استاد، گروه جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۵- استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی ● **آدرس پست الکترونیک:** pourfeizi@eastp.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۷/۱۹ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۹/۱۰/۱۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۰/۳/۴

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان و دومین عامل عمده‌ی مرگ ناشی از سرطان می‌باشد (۱). تلاش برای رده‌بندی مولکولی سرطان پستان منجر به نتایج مختلفی شده است که هیچ یک دربرگیرنده‌ی تمامی انواع تومورهای این بافت نمی‌باشند (۲). سرطان پستان بیشتر به حالت مزمن و در زنان بالغ دیده می‌شود. از آنجایی که سرطان پستان باعث درگیری زنان در سنین حداکثر بازدهی فردی، خانوادگی و اجتماعی می‌شود، توجه به این بیماری اهمیت ویژه‌ای دارد و تدابیر قابل توجهی به تحقیق و تلاش برای کنترل بیماری به‌ویژه غربال‌گری آن اختصاص یافته است (۳،۴). در این راستا تحقیقات وسیعی به‌منظور شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی برای انواع تومورهای پستان و همچنین انتخاب درمان مناسب بر پایه آن انجام گرفته است. تومورمارکرها فاکتورهایی هستند که در خون، ادرار یا بافت‌های بدن بوجود آمده و با استفاده از تست‌های آزمایشگاهی قابل تشخیص می‌باشند. این فاکتورها توسط سلول‌های سرطانی، یا پاسخ بدن به سرطان یا اختلالات غیرسرطانی خاصی تولید می‌شوند و مسئول فرآیندهای اصلی سلول می‌باشند، که حضور، افزایش یا کاهش آن‌ها می‌تواند برای اهداف مختلفی در زمینه‌های غربال‌گری، تشخیص، پیش‌آگهی یا درمان بیماری به‌کار رود (۵،۶). در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای معرفی مارکرهای مولکولی که بتوانند ماهیت تومورها را پیش‌بینی کرده، و به‌عنوان فاکتور کمکی تشخیصی و پیش‌آگهی در کنار روش‌های دقیق آسیب‌شناسی به‌کار برده شوند انجام گرفته است و مارکرهایی مطالعه و معرفی شده‌اند اما مارکری که دارای حساسیت و ویژگی بالا بوده و بتواند اکثر انواع بیماری را پوشش دهد در دسترس نمی‌باشد. مارکرهای مولکولی به‌دلیل تعیین خصوصیات سلول‌ها از لحاظ مولکولی می‌توانند اطلاعات با ارزشی را حتی قبل از ایجاد تغییرات وسیع مورفولوژیکی در سلول‌ها در اختیار پزشکان قرار داده و در پیش‌بینی رفتار آینده‌ی یک تومور مؤثر باشند (۷). سلول‌های بنیادین واحدهای ساختاری در طول مرحله اندام‌زایی هستند. در بالغین، این سلول‌ها مسئول جایگزینی سلول‌های طبیعی از بین رفته بوده و ممکن است باعث بهبود پس از آسیب شوند (۸). کنترل هماهنگ خودبازسازی و تمایز برای حفظ هومئوستازی سلول‌های بنیادین کلیدی است و زمانی که این کنترل هماهنگ از تنظیم خارج شود، باعث ایجاد سرطان می‌شود. از جمله عوامل دخیل در این فرآیند اختلال در عملکرد ژن‌هایی است که در تنظیم فرآیند خود بازسازی سلول‌های بنیادین دخیل هستند. به‌دلیل عدم کنترل هماهنگ خودبازسازی و تمایز در سلول‌های بنیادین، این اختلال موجب تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و در نتیجه تشکیل غده‌های توموری می‌شود (۹،۱۰).به‌دلیل ناشناخته بودن برنامه ملکولی تنظیم‌کننده حرکت سلول‌های بنیادین بین حالت‌های ساکن و تقسیم شونده فعال، تشخیص پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های بنیادین و آشکارسازی مسیرهای تنظیم‌کننده‌ی جدید آنها دارای اهمیت اساسی است (۱۱). علاوه بر این، از آنجا که وقوع سرطان در بافت‌های مختلف بدن حاصل تکثیر کنترل نشده‌ی سلول‌هاست، بالطبع شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی، کمک بزرگی به توسعه‌ی روش‌های درمانی هدفمند خواهد کرد. اولین قدم در راه شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی در یک نوع سلول بنیادین، مشخص کردن ژن‌های خودبازسازی است که در آن نوع سلول خاص بیان می‌شوند(۱۲). از جمله این ژن‌ها نوکلئوستمین می‌باشد، که به میزان بالایی در سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ بیان می‌شود، اما در بافت‌های تمایز یافته بیان نمی‌شود. هم چنین نوکلئوستمین در انواعی از بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطانی از جمله مغز، مثانه، کلیه، پروستات، معده، کبد و سلول‌های کارسینومای تهاجمی مجرایی و رده‌ی سلولی سرطانی پستان MMK (Human mammary cancer cell line) نیز بیان می‌گردد،

اما در سلول‌های اپیتلیال نرمال پستانی بیان نمی شود(۱۳). نوکلئوستمین یکی از جدیدترین اعضای خانواده ی پروتئین‌های متصل شونده به GTP (Guanosine-Tri-Phosphate Binding Protein) است، و نقش مهمی را در امبریوژنز اولیه و تنظیم تکثیر سلولی در سلول‌های بنیادین و سرطانی دارد، و نیز در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (apoptosis)، به تأخیر انداختن پیری و بیوژنز ریبوزوم‌ها نقش دارد (۱۴،۱۵). با توجه به این مشاهدات ونیز این واقعیت که بیان نوکلئوستمین در حین تمایز سلول‌های بنیادین ودر مرحله ی سلول‌های پیش ساز و پیش از خاموشی ژن‌های دخیل در پیشبرد تکثیر سلولی نظیر PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) متوقف می‌شود، از این ژن به‌عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادین نام برده می‌شود. نام نوکلئوستمین از جایگاه هسته ای و بیان آن در سلول‌های بنیادین برگرفته شده است. اختلال در مسیرها و ژن‌های القاکننده‌ی تمایز می‌تواند منجر به تکثیر بی‌رویه‌ی سلول‌ها و از بین رفتن هومئوستازی بافتی، انباشته‌شدن غیرطبیعی سلول‌ها و نهایتاً تولید غده‌های توموری شود (۱۶). نکته‌ی مهم این است که سرطان پستان یک بیماری هتروژن می‌باشد و با توجه به اینکه نوکلئوستمین یک مارکر مولکولی جدید می‌باشد، که اخیراً مورد توجه محققان قرار گرفته است، بنابراین در تحقیق حاضر بیان این ژن به‌عنوان مارکر بالقوه به‌منظور استفاده‌های تشخیصی، پیش‌آگهی و درمان تومورهای پستان در قالب یک مطالعه‌ی تجربی مورد ارزیابی قرارگرفته است.

روش بررسی

نمونه‌گیری

نمونه‌های انسانی مورد نیاز این تحقیق از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا(ع) تبریز جمع آوری شدند. نمونه‌ها تحت نظارت جراح متخصص توراکس و با رضایت کامل بیماران از کسانی که تحت عمل جراحی بیوپسی یا انواع ماستکتومی قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شده و در لوله‌های عاری از RNase قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل شده و تا مرحله‌ی استخراج RNA در نیتروژن مایع نگه‌داری شدند. تعداد نمونه‌های مورد نیاز جهت ارائه نتایج قابل قبول از نظر آماری با توجه به مطالعات قبلی در این زمینه تعیین و در مجموع ۴۱ نمونه توموری و ۲۰ نمونه از بافت‌های حاشیه‌ی تومور جمع‌آوری شدند و در قالب یک مطالعه مورد شاهدی بررسی شدند. نمونه‌های مربوط به حاشیه‌ی تومور از محل دور از تومور که ظاهرا فاقد درگیری توموری بودند جمع‌آوری شدند.

استخراج RNA

RNAی کل (Total RNA) با استفاده از محلول RNX- plus و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن-ایران) استخراج شد. به‌دلیل حساسیت کار با RNA از نظر آلودگی با RNase جهت غیرفعال‌سازی این آنزیم کلیه‌ی لوازم مورد استفاده با محلول DEPC (Di Ethyl Pyro Carbonate) ۰/۱ درصد تیمار گردید. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید.

تیمار با آنزیمDnase I و واکنش رونویسی معکوس (Reverse transcription)

برای جلوگیری از آلودگی RNA حاصله با DNA، ابتدا مقادیر یکسان از RNAی اولیه (۱ میکروگرم) از هر نمونه با آنزیم DNaseI تیمار و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Germany,Fermentase) به cDNA تبدیل شدند.

طراحی پرایمر

در این تحقیق، ژن β2m (β2-microglobolin) به‌عنوان کنترل داخلی انتخاب و از همان پرایمرهایی که توسط بابائی و همکاران بر روی ژن β2m انسانی طراحی شده بود، استفاده شد (۱۷). جهت تکثیر ژن نوکلئوستمین از پرایمرهایی که توسط جعفرنژاد و همکاران برای نمونه‌های انسانی طراحی شده بودند استفاده گردید (۱۸). (شماره دستیابی ژن نوکلئوستمین وβ2m به‌ترتیب NM-۰۱۴۳۶۶ وNM-۰۰۴۰۴۸ می‌باشد). ویژگی این پرایمرها قرار داشتن آن‌ها روی اگزون‌های جداگانه است، در این صورت محصول PCR که ناشی از آلودگی با DNAی ژنومی است قابل تکثیر نبوده و یا به‌دلیل تفاوت در اندازه‌ی قطعه‌ی تکثیر شده، از محصول RT-PCR قابل تمایز خواهد بود. توالی و جایگاه این پرایمرها به‌صورت زیر می‌باشند:

Human Nucleostemin Forward Primer (NSF): 5´-TCC GAA GTC CAG CAA GTA TTG-3´ (1138-1158)

Human Nucleostemin Reverse Primer (NSR): 5´-AAT GAG GCA CCT GTC CAC TC-3´ (1350-1369)

Human β2m Forward Primer (HBF): 5´- CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3´ (94-114)

Human β2m Reverse Primer (HBR): 5´- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3´ (265-284)

واکنش PCR

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس و به‌دست آمدن cDNA، به‌منظور تکثیر قطعه‌ی مورد نظر، واکنش PCR با استفاده از μl 2.5 از cDNA تهیه شده، به‌همراه مواد زیر (تهیه شده از شرکت سیناژن و ایزوژن بیوساینس) و استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Biometra) انجام گرفت:

- ۰/۱۲۵ μl آنزیم Taq DNA Polymerase
- ۰/۷۵ μl $MgCl_2$ ۵۰mM
- ۰/۵ μl dNTPs ۱۰mM
- ۲/۵ μl بافر تکثیر ۱۰X
- ۰/۷۵ μl از هر پرایمر بالا و پایین دست، ۲۰mM
- آب تزریقی استریل (اتو کلاو شده) در حجم نهایی ۲۵μl

پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش PCR ، میکروتیوب در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد و یک سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ و ۲ دقیقه به ترتیب برای β2m و نوکلئوستمین اجرا شد. این سیکل انعقاد اولیه، سبب منعقد شدن DNAی الگو می‌گردد. واکنش PCR برای ژن‌های نوکلئوستمین وβ2m با شرایط ۳۰ ثانیه دناچوریشن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰و۳۰ ثانیه آنیلینگ در دمای ۶۰ و ۵۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای ژن‌های نوکلئوستمین وβ2m و ۱ دقیقه اکستنشن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت، تعداد ۳۵ سیکل برای نوکلئوستمین و ۳۰ سیکل برای β2m و یک سیکل اکستنشن نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. روش PCR مشابه مطالعه‌ی جعفری کرمانی و همکاران بود با این تفاوت که در پژوهش مذکور زمان انعقاد و آنیلینگ ۴۵ ثانیه و دمای آنیلینگ ۶۴-۶۰ درجه سانتی‌گراد (بر اساس نوع آغازگر) بوده است (۱۹). واکنش PCR برای هر دو ژن نوکلئوستمین وβ2m در دو لوله جداگانه و در شرایط کاملا یکسان انجام گرفت. برای اطمینان از عدم آلودگی یک لوله نیز به‌عنوان کنترل منفی در هر واکنش به‌کار رفت که در آن به جای cDNA آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. بعد از انجام واکنش PCR برای اطمینان از تکثیر بهینه‌ی قطعه‌ی مورد نظر محصول PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید. قطعه‌ی حاصل از پرایمرهای NSF و NSR ۲۳۲ جفت باز بوده که از نوکلئوتید ۱۱۳۸ تا ۱۳۶۹ از توالی cDNAی نوکلئوستمین انسانی را شامل می‌شود. طول قطعه‌ی حاصله از پرایمرهای HBF و HBR ۱۹۱ جفت باز بوده که از نوکلئوتید ۹۴ تا ۲۸۴ از

توالی β2m cDNA انسانی با ۴۳/۵ درصد GC را شامل می‌شود.

تعیین توالی DNA استخراج شده

به‌منظور تایید هویت قطعات حاصل از PCR، باند ۲۳۲ نوکلئوتیدی نوکلئوستمین از طریق شرکت ژن فناوران تهران، توسط شرکت Microgeneتعیین توالی شده و با توالی موجود در Gene Bank مقایسه شدند.

نیمه کمی کردن بیان ژن

برای بررسی بیان ژن نوکلئوستمین به‌صورت نیمه کمی، شدت باندهای مورد نظر وβ2m برای هر نمونه با استفاده از نرم افزارUvitech تعیین گردید و نسبت شدت بیان ژن نوکلئوستمین به β2m در هر نمونه به‌عنوان شاخص شدت بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین مثبت یا منفی بودن بیان در مرحله‌ی RT-PCR، پس از تعیین شدت بیان نسبی در نمونه‌های هر گروه، میانگین و انحراف از میانگین این اعداد تعیین و از شاخص میانگین ± انحراف معیار به‌عنوان آستانه‌ی بیان استفاده شد. تمام نمونه‌هایی که بیان مساوی یا بالاتر از این حد را داشتند به‌عنوان مثبت و نمونه‌هایی که بیان پایین‌تری را داشتند به‌عنوان منفی در مرحله‌ی RT-PCR در نظر گرفته شدند.

آنالیز آماری

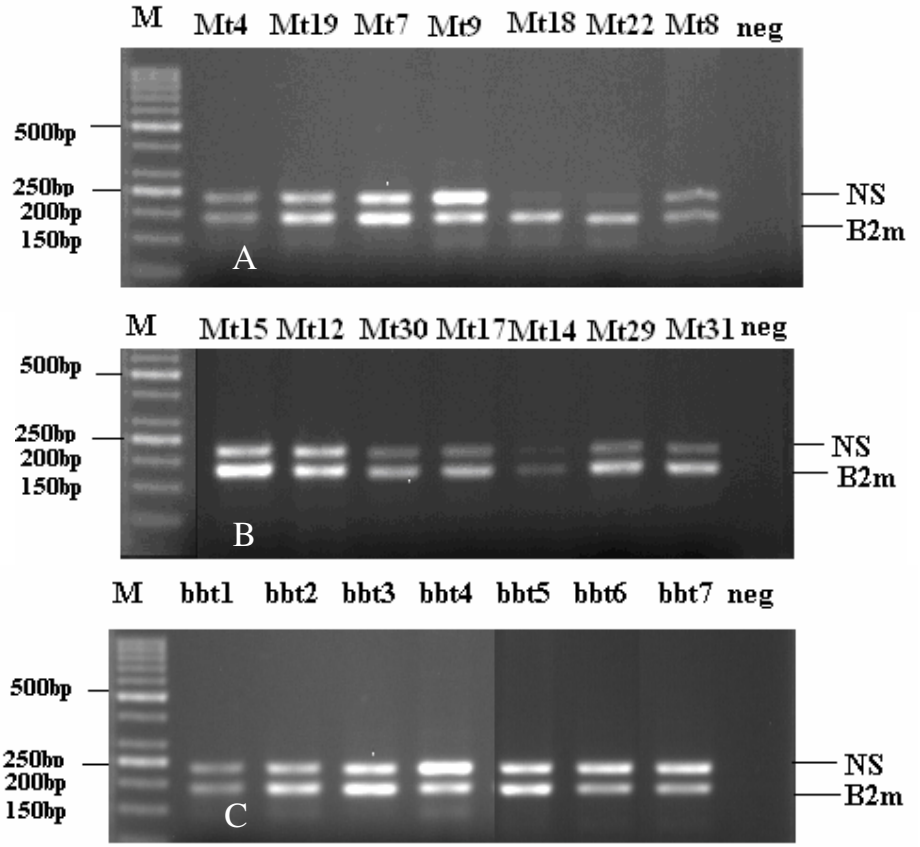
به‌منظور آنالیز آماری، میزان بیان نوکلئوستمین با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA یک‌طرفه در گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

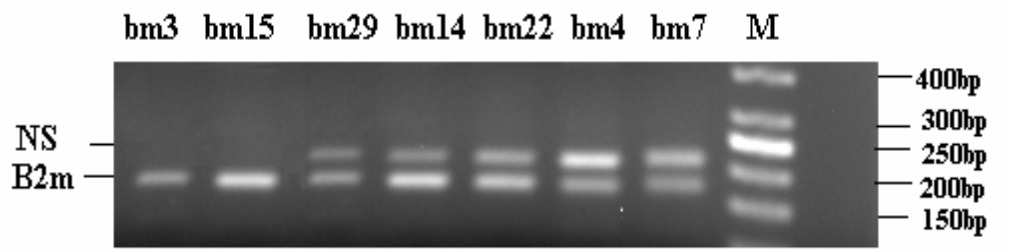
در این تحقیق ۴۱ نمونه‌ی توموری پستان و ۲۰ نمونه‌ی مربوط به بافت‌های حاشیه‌ی تومور از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا(ع) تبریز مورد مطالعه قرار گرفتند. از ۴۱ نمونه‌ی توموری ۳۱ نمونه در گروه بدخیم و ۱۰ نمونه در گروه خوش خیم دسته‌بندی شدند. از ۳۱ نمونه بدخیم نیز ۱۷ نمونه در مرحله اولیه و ۱۴ نمونه در مرحله پیشرفته‌ی توموری قرار داشتند. همچنین غدد لنفاوی ۱۳ بیمار عاری از تومور و ۱۸ بیمار دارای درگیری توموری بودند. میانگین سنی بیماران در گروه توموری بدخیم، ۵۱/۱۸ سال و در گروه توموری خوش‌خیم، ۲۸/۹۱ سال (۴۵-۱۵ ساله) بود. توزیع بیماری در طرف چپ پستان در هر دو گروه توموری خوش‌خیم و بدخیم بالاتر بود. بررسی بیان نوکلئوستمین در گروه‌های مختلف افزایش بیان آن را به‌ترتیب از گروه‌های حاشیه‌ی تومور تا توموری نشان داد، که این مقدار۵۵ درصد برای نمونه‌های حاشیه‌ی تومور و۶۳/۴۱ درصد برای نمونه‌های توموری می‌باشد. در بین تومورها نیز ۸۰ درصد از نمونه‌های توموری خوش خیم و۵۸/۰۶۴ درصد از نمونه‌های توموری بدخیم برای بیان نوکلئوستمین مثبت ارزیابی شدند. در میان نمونه‌های توموری بدخیم، میزان بیان نوکلئوستمین در تومورهای مرحله‌ی پیشرفته ۷۱/۴۲ درصد در مقایسه با ۴۷/۰۵۸ درصد برای تومورهای مرحله‌ی اولیه بود. بنابراین بیان نوکلئوستمین در تومورهای بدخیم نسبت به خوش‌خیم کاهش ولی در گروه بدخیم از تومورهای مرحله اولیه تا پیشرفته افزایش نشان می‌دهد، که در ارتباط با میزان بالای تکثیر در این سلول‌ها می‌باشد، و به نظر می‌رسد بیان نوکلئوستمین با افزایش درجه‌ی توموری همراه است. هم چنین بیان بالای نوکلئوستمین در تومورهای خوش‌خیم که منبعی از سلول‌های در حال تکثیر هستند، می‌تواند حاکی از وجود خاصیت تکثیر شوندگی بالا در این تومورها باشد و نیز می‌توان گفت که در این تحقیق با احتمال زیاد این ژن به‌جای آن که به‌عنوان یک مارکر بدخیمی عمل کند، به‌عنوان یک مارکر مناسب برای تکثیر سلول می‌باشد.

در تطبیق بیشتر با داده‌های پاتولوژیکی، ارتباط بیان نوکلئوستمین با درگیری غدد لنفاوی و متاستاز نیز بررسی

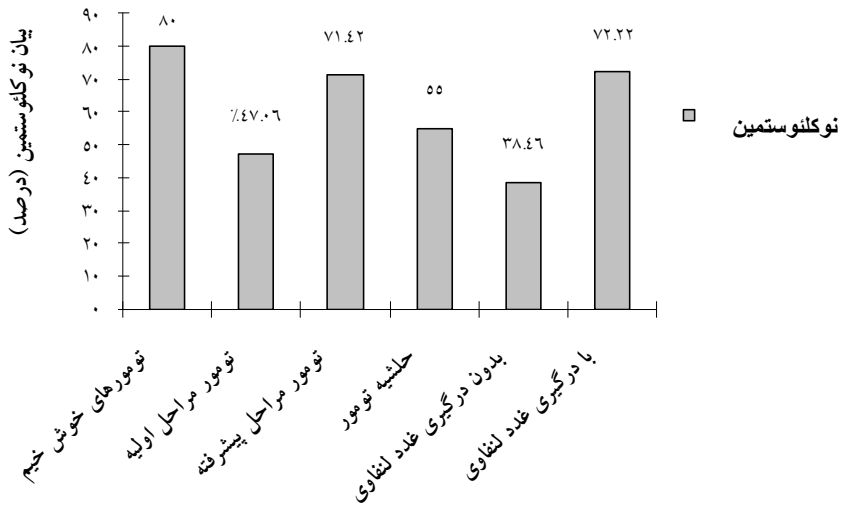
شد، که درصد بیان این ژن در گروه‌های با درگیری غدد لنفاوی ۷۲/۲۲ درصد و در گروه بدون درگیری غدد لنفاوی ۳۸/۴۶ درصد به‌دست آمد. (نمودار۱ وشکل‌های ۱و۲). به‌منظور بررسی شدت بیان نوکلئوستمین در گروه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور و ارتباط میزان بیان آن با درجه‌ی تومورها و درگیری غدد لنفاوی توسط تومور، بیان نوکلئوستمین در گروه‌های مختلف تعیین و با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست آماری One-Way ANOVA مقایسه شد. شدت بیان نوکلئوستمین به ترتیب از گروه توموری تا حاشیه‌ی تومور کاهش می‌یابد(نمودار۲). این مقدار در تومورهای خوش‌خیم بالاتر از بدخیم بوده و در تومورهای بدخیم نیز میانگین بیان نوکلئوستمین در گروه توموری بدخیم پیشرفته، به‌مراتب بالاتر از میانگین بیان آن در مراحل پایین‌تر بود(نمودار ۳). این اختلاف بین گروه توموری وحاشیه‌ی تومور، هم چنین بین تومورهای بدخیم و حاشیه ی تومور، معنی‌دار نبوده (به ترتیب P=۰/۵۴۳ و P=۰/۳۳۳)، اما بین تومورهای خوش‌خیم و بدخیم و گروه‌های توموری بدخیم پیشرفته و اولیه معنی‌دار می‌باشد(به ترتیب P=۰/۰۷۲ و P=۰/۰۱۶). در بررسی بیشتر بین گروه توموری خوش‌خیم و گروه توموری بدخیم مرحله ی اولیه، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P=۰/۰۰۶). بین تومورهای بدخیم مرحله ی اولیه و حاشیه‌ی تومور اختلاف، معنی‌دار نبود. بیان نوکلئوستمین در تومورهای بدون درگیری غدد لنفاوی کمتر از تومورهای با درگیری غدد لنفاوی بود اگرچه اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۳).



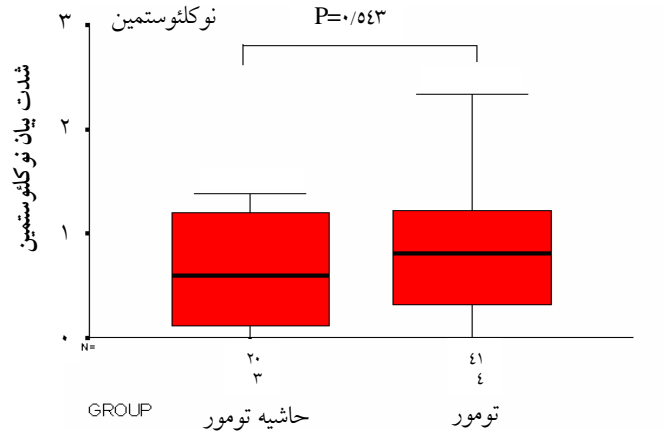
شکل ۱. *الگوی الکتروفورز محصولات PCR ژن نوکلئوستمین و β2m در نمونه‌های توموری. در تمامی عکس‌ها ستون سمت چپ مارکر را نشان می‌دهد. A) نمونه‌های بدخیم مربوط به مرحله‌ی پیشرفته‌ی توموری Mt (Malignant tumor (Advanced stage، B) نمونه‌های بدخیم مربوط به مرحله اولیه‌ی توموری Mt (Malignant tumor (primary stage، C) نمونه‌های مربوط به تومورهای خوش‌خیم bbt (Breast benign tumor)*



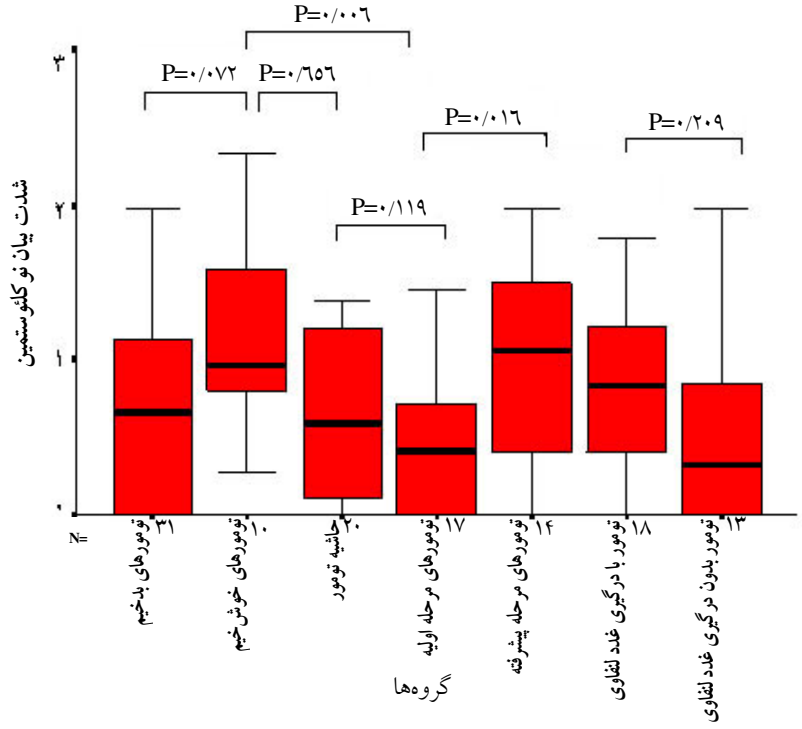
شکل ۲. *الگوی الکتروفورز محصولات PCR ژن نوکلئوستمین و β2m در نمونه‌های حاشیه‌ی تومور bm (Breast margin) ستون سمت راست مارکر را نشان می‌دهد. نمونه‌های مربوط به حاشیه‌ی تومور از افرادی که نمونه‌های توموری از آنها گرفته شده بود جمع‌آوری گردیدند. این نمونه‌ها از نسج به ظاهر طبیعی و از فاصله‌ای دور از محل تومور که ظاهراً فاقد درگیری تومورال بودند گرفته شدند.*



نمودار ۱. *مقایسه‌ی درصد بیان نوکلئوستمین در گروه‌های توموری خوش‌خیم، بدخیم مرحله‌ی اولیه، پیشرفته، حاشیه، تومورهای بدخیم با درگیری غدد لنفاوی و بدون درگیری غدد لنفاوی*



نمودار ۲. *مقایسه‌ی بیان نوکلئوستمین دردو گروه توموری(Tumoral) و حاشیه‌ی تومور (Margin)در نمودار Box plot.*



نمودار۳. *مقایسه‌ی بیان نوکلئوستمین در گروه‌های توموری بدخیم، توموری خوش‌خیم، حاشیه‌ی تومور، تومورهای مرحله‌ی اولیه، تومورهای مرحله‌ی پیشرفته، تومورهای با و بدون درگیری غدد لنفاوی در نمودار Box plot. در هرنمودار محدوده‌ی بیان نوکلئوستمین در هر گروه نشان داده شده است.*

بحث

در سال ۲۰۰۰، cDNAی مربوط به ژن نوکلئوستمین برای اولین بار در رده‌ی سلول‌های سرطانی سینه گزارش شد، ولی عملکرد آن نا مشخص بود. دو سال بعد در سال۲۰۰۲، طی یک پژوهش بیان یک پروتئین جدید متصل شونده به P53، به‌نام نوکلئوستمین در سلول‌های بنیادی مغز رت بالغ مشاهده و ثبت شد (۱۵). در بررسی دیگری در سال ۲۰۰۴، با استفاده از تکنیک دورگه سازی درجای بافتی (Tissue insitu hibridization)، بیان mRNAی نوکلئوستمین در سیتوپلاسم سلول‌های کارسینومای مهاجم مجرایی پستان تشخیص داده شد، ولی در سلول‌های بافت‌های بالغ نرمال تمایز یافته، مانند کلیه و سلول‌های اپیتلیال طبیعی غدد پستانی، بیان mRNAی نوکلئوستمین آشکار نگردید(۱۳).در سال ۲۰۰۴ هم چنین بیان بالایی ازmRNAی نوکلئوستمین در رده‌ی سلولی سرطان پستان انسانی(MMK-7)، با استفاده از روش نورترن بلات نشان داده شد و ثابت شد که با مهار بیان نوکلئوستمین از طریق روش‌های مولکولی، تعداد سلول‌هایی که در فاز G0/G1 قرار دارند، نسبت به سلول‌های فاز S افزایش می‌یابد و از این طریق ثابت شد که این ژن در تنظیم تکثیر سلولی و تمایز نقش دارد (۲۰). علیرغم مطالعات انجام یافته در مورد آشکارسازی بیان ژن نوکلئوستمین در سلول‌های کارسینومای مهاجم مجرایی پستان و رده ی سلولی سرطان پستان انسانی(MMK-7)، و اثبات درگیری نوکلئوستمین در آسیب‌شناسی سرطان پستان، هیچ مطالعه ی در خور توجهی درمورد دخالت نوکلئوستمین در بروز تومورهای پستان و

اهمیت آن در تشخیص، پیشگویی، پیش‌آگهی و نیز مشخص کردن درجه یا مرحله تومور در تومورهای پستان صورت نگرفته است. هر چند که اکثر مطالعات اخیر به آشکارسازی نقش این ژن ازطریق مهار بیان آن پرداخته‌اند (۲۴-۲۰، ۱۸). درتعدادی از مطالعات نیز، بیان این ژن در انواعی از بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطانی آشکار شده و درگیری آن در پاتوژنز این بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطانی به اثبات رسیده است (۱۳،۱۹،۲۵) ولی تاکنون تحقیقی درمورد بیان یا عدم بیان این ژن و نیز اهمیت بیان این ژن در تشخیص و پیش آگهی تومورهای پستان در ایران و در جمعیت آذربایجان صورت نگرفته است. هم چنین ارتباط بیان این ژن با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی به ویژه درگیری غدد لنفاوی توسط تومور، اندازه‌ی تومور و نیز درجه و مرحله‌ی تومور گزارش نشده است. لذا با توجه به نتایج حاصل از مطالعات اولیه در خصوص ارتباط بیان نوکلئوستمین با پاتوژنز انواعی از تومورها از جمله معده، کبد، پستان، پروستات، مثانه، کلیه، مری، پانکراس، بافت آدنوکارسینومای قلب، بافت کارسینومای ناحیه آمپول رحم، و نیز تعدادی از انواع رده‌های سلولی سرطانی (۱۳،۲۰،۲۶)، هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن نوکلئوستمین به‌عنوان مارکرمولکولی بالقوه در تشخیص و پیش‌آگهی تومورهای پستان و به‌طور ویژه در مبتلایان ناحیه‌ی شمال غرب ایران می‌باشد. مطالعات روی انواع مختلف تومورهای انسانی از جمله سرطان کبد، معده، مری، پستان، نشان داده است که نوکلئوستمین در عمده سلول‌های سرطانی بیان می‌شود، در حالی که در بافت‌های تمایز یافته نرمال بالغ، مانند کلیه بالغ و سلول‌های اپیتلیال نرمال غدد پستانی بیان نمی‌شود (۱۳). نتایج ما نیز نشان می‌دهد، میزان بیان نوکلئوستمین در نمونه‌های توموری بیشتر می‌باشد، اما برخلاف نتایج مطالعات قبلی، بیان نوکلئوستمین در نمونه‌های حاشیه‌ی به ظاهر طبیعی بافت پستانی نیز مشاهده گردید. اگرچه میزان بیان نوکلئوستمین افزایش معنی‌داری را در گروه توموری نسبت به نمونه‌های حاشیه‌ی تومور نشان نمی‌دهد. از آنجا که مرزبندی غده‌ی توموری و تفکیک حاشیه‌ی تومور از قسمت توموری آن می‌تواند در کنار سایر روش‌های درمانی در برداشت تومور و نیز اعمال روش‌های درمانی از جمله رادیوتراپی مفید واقع شود و نیز از آنجا که تومورهای بدخیم سفت بوده و از نظر قوام و استحکام بافتی مثل مداد پاک‌کن هستند، به پوست یا بافت‌های اطراف می‌چسبند و به سختی مرز آن‌ها تعیین می‌شود، لذا به‌دلیل اهمیت این موضوع، در این پژوهش میزان بیان نوکلئوستمین در نمونه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور مقایسه گردید. نتایج به دست آمده علاوه بر اینکه بیان‌گر مشکوک بودن نمونه‌های سالم گرفته شده از حاشیه‌ی تومور می‌باشد، اما بیان بیشتر نوکلئوستمین در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های حاشیه‌ی تومور، به دلیل معنی‌دار نبودن اختلاف بیان این ژن بین دو گروه توموری و حاشیه تومور نوکلئوستمین را به‌عنوان فاکتور توموری بالقوه در تومورهای پستان پیشنهاد نمی‌کند و استفاده از آن را به‌عنوان یک مارکر مولکولی در تفکیک بافت‌های توموری از غیرتوموری مؤثر نمی‌داند. ولی به‌دست آوردن نتایج قوی‌تر و مطمئن‌تر نیازمند بررسی نمونه‌های بیشتر بوده تا نتایج قوی‌تری از لحاظ آماری ارائه شود و هم چنین با توجه به‌بیان قابل توجه نوکلئوستمین در بافت‌های حاشیه‌ی تومور مورد بررسی، بهتر به‌نظر می‌رسد که نمونه‌های طبیعی بافت پستان که از افراد سالم تهیه شده‌اند نیز از نظر بیان نوکلئوستمین، مورد بررسی قرار گیرند (به‌عنوان مثال از افرادی که تحت جراحی زیبایی قرار گرفته‌اند، و یا استفاده از بافت طبیعی پستان زنانی که به‌دلیل وجود مشکل ژینگانتوماستی یا ماکروماستی (بزرگی پستان‌ها)، جراحی ماموپلاستی کاهنده را برای کوچک‌تر کردن اندازه‌ی پستان انجام داده‌اند. این جراحی برای زنانی که از نظر جسمی یا روانی از این عارضه رنج می‌برند، یک جراحی انتخابی است (۴،۷). لازم به توضیح است که باوجود معنی‌دار نبودن شدت بیان نوکلئوستمین در بین گروه توموری و حاشیه‌ی تومور، بیان بالای آن در گروه توموری خوش‌خیم (۸۰درصد) و بیان کم آن در تومورهای

بدخیم (۵۸/۰۶۴ درصد) بیان‌گر ارتباط این ژن با حالت تکثیری است.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از ارزیابی نوکلئوستمین به‌عنوان مارکر مولکولی در تومورهای پستان نشان داد که:

با احتمال زیاد نوکلئوستمین یک مارکر تکثیری است، یعنی هر نوع سلولی اعم از سلول‌های بنیادین، پیش ساز، سرطانی و سلول‌های تمایز یافته‌ی بالغ نرمال، زمانی که در حال تکثیر فعال باشند، نوکلئوستمین را بیان خواهند کرد، و زمانی که بیان آن مهار شود، باعث کاهش تکثیر سلولی و تمایز در سلول‌های بنیادین، پیش‌ساز و سرطانی (نقش نوکلئوستمین در این سلول‌ها کنترل تکثیر سلولی و تمایز است) و کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های تمایز یافته‌ی طبیعی در حال تکثیر می‌شود (نقش نوکلئوستمین فقط کنترل تکثیر این سلول‌هاست).

بیان نوکلئوستمین درتومورهای پستان بیشتر از گروه‌های حاشیه‌ی تومور می‌باشد.

سطح بیان نوکلئوستمین به‌طور معنی‌داری در ارتباط با ماهیت تکثیری تومورهای پستان بوده (این امر می‌تواند به‌دلیل نرخ بالای سلول‌های در حال تکثیر در تومورهای خوش‌خیم باشد و افزایش معنی‌داری را در بین تومورهای بدخیم و خوش‌خیم نشان می‌دهد، بنابراین می‌توان گفت که براساس این تحقیق با احتمال زیاد این ژن به‌جای آنکه به‌عنوان یک مارکر بدخیمی عمل کند، به‌عنوان یک مارکر مناسب برای تکثیر سلول بوده، و با پیشرفت تومورهای خوش‌خیم به سوی بدخیمی بیان نوکلئوستمین افزایش نمی‌یابد یعنی باعث پیشرفت تومور از طبیعت خوش‌خیمی به بدخیمی نمی‌شود.

سطح بیان نوکلئوستمین به‌طور معنی‌داری در ارتباط با افزایش درجه ی تومورهای بدخیم پستان بوده و افزایش معنی‌داری را در بین تومورهای بدخیم مرحله اولیه و پیشرفته نشان می‌دهد و در تومورهای با درگیری غدد لنفاوی بیشتر از تومورهای بدون درگیری غدد لنفاوی می‌باشد. بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد، که همگام با پیشرفت تومور به سوی مراحل بالاتر بیان نوکلئوستمین افزایش می‌یابد.

از آن جا که نوکلئوستمین در پیشروی تومور از مراحل پایین‌تر به مراحل بالاتر فرم بدخیمی دخیل می‌باشد، بنابراین با احتمال زیاد، با مهار بیان نوکلئوستمین از طریق روش‌های مولکولی مانند RNAi (RNA interference) در تومورهای اولیه و بدون درگیری غدد لنفاوی، می‌توان از پیشرفت این تومورها به مراحل بالاتر بدخیمی و متاستاز به غدد لنفاوی جلوگیری کرد.

این نتایج استفاده از نوکلئوستمین را به‌عنوان مارکر تشخیصی در تفکیک و شناسایی بافت‌های توموری از غیرتوموری پستان مؤثر نمی‌داند، ولی استفاده از آن را در تخمین اندازه‌ی تومور و هم چنین به‌عنوان فاکتور بالقوه پیش آگهی‌دهنده برای تعیین شدت‌های مختلف توموری در تومورهای پستان و پیش‌بینی رفتار آینده تومورها ممکن می‌سازد، که می‌تواند در کنار سایر روش‌های رایج آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. هم چنین ممکن است مهار نوکلئوستمین بتواند راهکار مؤثری در کاهش نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی پستان باشد. قابل ذکر است که ارزیابی بیان ژن نوکلئوستمین به‌عنوان مارکر مولکولی در تومورهای پستان در ایران و شمال غرب کشور، برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته است و لازم است که نمونه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گرفته تا بتوان نتایج قابل اطمینان‌تری را از نظر آماری ارائه داد.

سپاسگزاری

از همکاری بیماران محترم و خانواده‌های ایشان، کارکنان اتاق عمل و بخش پاتولوژی بیمارستان امام رضا(ع) و امام خمینی(ره) تبریز و همکاران دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز قدردانی می‌نماییم. همچنین از دوستان و همکاران گرامی در آزمایشگاه رادیوبیولوژی برای همکاری در نمونه‌گیری و انجام هر چه بهتر آزمایش‌ها کمال تشکر را داریم.

References

1. Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe H.L, et al. Trends in Breast Cancer by Race and Ethnicity, *CA Cancer J Clin* 2006; 56(3):168-83.
2. Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuellar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. Molecular classification of breast cancer. *Cir Cir* 2008; 76(1): 87-93.
3. Pezo RC, Singer RH. Nuclear microenvironments. *J Cell Biochem* 2008; 104(6):1953–63.
4. Katapodi MC, Dodd MJ, Lee KA, facione NC. Underestimation of Breast Cancer Risk: Influence on Screening Behavior. *Oncol Nurs Forum* 2009; 36(3):306-14.
5. Venkitaraman AR. Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:461–87.
6. American cancer society. Prevention and early detection, Tumor Markers. 29 2007.
7. Carlson RW, Arreld DC, Anderson BO, Burstein HJ, Carter WB, Edge SB, et al. Breast Cancer. Clinical practice Guidelines in oncology. *J Nath Compr Canc Netw* 2009; 7(2): 122-92.
8. Tsai RY, McKay R.D. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 2005; 168(2): 179-84.
9. Mačingová Z, Filip S. Cancer stem cells–New approach to cancerogenensis and treatment. *Acta Medica* (Hradec Králové) 2008; 51(3):139–44.
10. Bieh J.K, Russell B. Introduction to Stem Cell Therapy. *J Cardiovasc Nurs* 2009; 24(2): 98-103.
11. Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. *Stem Cells* 2006; 24(4):1113-20.
12. Semil C, Tony S, Torsten B, Karin E, Elzo D, et al. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in drosophila neural stem cells. *Developmental Cell* 2006; 11:775–89.
13. Liu S.J, Cai Z.W, Liu Y.J, Dong M.Y, Sun L.Q, Hu G.F, et al. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9):1246-9.
14. Shirai H, Autieri M, Eguchi S. Small GTP binding proteins and mitogen-activated protein kinases as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16(2): 111-5.
15. Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 2002; 16: 2991-3003.
16. Ma H, PedersonT. Nucleostemin: a multiplex regulator of cell-cycle progression, *Trends Cell Biol* 2008; 18(12): 575-9.
17. Babaei E. Evaluation of the survivin Gene expression as a special tumor marker in diagnosis and prognosis of osteosarcoma.M.Sc. thesis, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University [Persian].
18. Jafarnejad S.M, Mowla S.J, Moghadam matin M. Specific Knockdown of Nucleostemin Gene Expression by RNA Interference in rat bone marrow mesanchimal stem cells. *Sci J Blood Transfus Organ* 2006; 4(4): 275-84.

19. Jafari Kermani A, Fathi F, Mowla S.J, Gheisari Y. Expression of Oct-4, Sox-2, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1 and Sox-9 self renewal genes in human umbilical cord vein mesenchymal stem cells. *Sci J Blood Transfus Organ* 2008; 4(4): 275-84.
20. Sijin L., Ziwei C, Yajun L, Meigu D, Hongwei Z, Guofa H, et al. The Effect of Knocking-down nucleostemin gene expression on the in vitro proliferation and in vivo tumorigenesis of HeLa Cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23(3): 529-38.
21. Ran-lu L, Yong XU, Zhi-Hong Z, Meng W, jian-Tao S, Shi-Yong Oi, et al., Expression of nucleostemin in prostate cancer and its effect on the proliferation of PC-3 cells. *Chinese Med J* 2008; 121(4):299-304.
22. Yue BH, WangYY, Yu L, Wang QX, Liu SA, et al. Effects of Nucleostemin gene silencing on morphology and cytochemistry of HL-60 cells. *Life Science Journal* 2008; 5(2): 9.
23. Ma H, Pederson T. Depletion of the nucleolar protein nucleostemin causes G1 cell cycle arrest via the p53 pathway. *Mol Biol Cell* 2007; 18(7): 2630-5.
24. Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neurosci Lett* 2005; 390(2): 81–6.
25. Siddiqi S, Gude N, Hosoda T, Muraski J, Rubio M, Emmanuel G, et al. Myocardial Induction of nucleostemin in response to postnatal growth and pathological challenge. *Circ Res* 2008; 103(1): 89-97.
26. Fan Y, Liu Z, Zhao S, Lou F, Nilsson S, Ekman P, et al. Nucleostemin mRNA is expressed in both normal and malignant renal tissues. *Br J Cancer* 2006; 94(11): 1658 –62.

Evaluation of Nucleostemin Gene Expression as a New Molecular Marker in Breast Tumors

Hosseinpour Feizi M.A, Ph.D.[1*], Saed S., M.Sc.[2], Babaei E., M.Sc.[3], Montazeri V., M.D.[4], Halimi M., Ph.D.[5]

1. Professor of Radiobiology, School of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran
2. M.Sc. in Genetics, Department of Biology, School of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran
3. Ph.D. student of Molecular Genetics, School of Natural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Professor of Thorax Surgery, Department of Surgery, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
5. Assistant Professor of Pathology, Department of Pathology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* Corresponding author; e-mail: E-mail: pourfeizi@eastp.ir

(Received: 11 Oct 2010 Accepted: 25 May 2011)

Abstract

Background & Aims: Nucleostemin is one of the stem cell enriched proteins which encodes a novel nucleolar GTP-binding protein found at high levels in the adult and embryonic stem (ES) cells but not in terminally differentiated cells. It is also expressed in tumor cell lines as well as in the several types of human cancers. Due to the increasing rate of breast cancer in recent years, in the present study we evaluate the usefulness of Nucleostemin as a potential diagnostic and therapeutic molecular marker in breast tumors.

Methods: A total of 41 tumoral and 20 non-tumoral adjacent tissues were studied by Semiquantitative Reverse Transciptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). β2m was used as an internal control. Data were analyzed through SPSS software.

Results: According to the obtained results, nucleostemin is a proliferation marker with higher eapression in breast tumors rather than in adjacent normal tissues. Nucleostemin expression level was significantly correlated with profilertion potential of breast benign tumors ($p< 0.05$). The expression of Nucleostemin was significantly correlated with the advanced stages of breast tumors ($p<0.05$).

Conclusion: Nucleostemin expression level may be used in estimating tumor size and as a potential prognostic marker for determinig breast tumors stage and future metastases. Moreover, nucleostemin inhibition can be an effective sterategy in decreasing the proliferation of breast tumor cell lines

Keywords: Nucleostemin, Breast neoplasms, Reverse Transcriptace Polimeras Chain Reaction (RT-PCR)

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(2): 113-125