

بررسی بیان ژن‌های RUNX3 و CDH1 در بافت سرطانی و سالم بیماران مبتلا به سرطان معده

مستانه عین القضاتی^۱، محمدحسین صنعتی^۲، حسین عفت پناه^۳، نوشین شهاب^۴، مسعود سعیدی جم^{۵*}

^۱ کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، موسسه آموزش عالی نوردانش، میمه، اصفهان، ایران

^۲ استاد، گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

^۳ استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه بهداشت عمومی، دانشکده علوم پزشکی اسدآباد، همدان، ایران

^۴ کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۵ استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

*نویسنده مسئول: مسعود سعیدی جم، استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. ایمیل: sjam110@yahoo.com

DOI: 10.21859/hums-24012

چکیده

مقدمه: سرطان معده یک بیماری چندعاملی، چهارمین سرطان شایع جهان و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان است. این مطالعه باهدف تعیین بیان ژن‌های CDH1 و RUNX3 در بافت توموری و حاشیه‌ای سالم افراد مبتلا به سرطان معده طراحی و انجام شد.

روش کار: در این مطالعه موردی شامدی ۶۴ نمونه شامل ۳۲ نمونه از بافت توموری معده و ۳۲ نمونه از بافت حاشیه‌ای سالم آن از این بیماران تهیه گردید. از بافت‌های موردنظر RNA استخراج شد. سپس cDNA آن‌ها ساخته شد. درنهایت با استفاده از تکنیک Real Time PCR بیان ژن‌های CDH1 و RUNX3 اندازه‌گیری شد. برای تحلیل میزان بیان ژن‌ها از آزمون paired t-test استفاده گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه در ۸۷/۵٪ از بیماران مبتلا به سرطان معده در بافت توموری نسبت به بافت حاشیه‌ای سالم آن بیان ژن CDH1 به میزان ۷/۳۵ برابر کاهش یافته و در ۹۰٪ از این بیماران بیان ژن RUNX3 به میزان ۵/۴۶ برابر کاهش یافته است، که تفاوت معناداری را بین بافت سالم و توموری این بیماران نشان داده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش ژن‌های CDH1 و RUNX3 به‌عنوان ژن‌های سرکوب‌کننده تومور کاهش بیان آن‌ها به میزان قابل توجهی در بافت توموری افراد مبتلا به سرطان معده قابل توجه است.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۰۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۲۶

واژگان کلیدی:

سرطان معده

ژن CDH1

ژن RUNX3

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

مقدمه

سرطان در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ می‌باشد، سرطان معده در جهان به‌عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود [۱]. سرطان معده یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سرتاسر جهان می‌باشد، شیوع این سرطان ناشی از فرایند ایجاد بافت سرطانی در معده چند مرحله بوده و جزء بیماری‌های چندعاملی می‌باشد و دلیل آن هم ایجاد سرطان بر اثر وجود عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی

در کل سرطان معده بیماری افراد پیر است و نسبت مرد به زن حدود ۲ به ۱ است [۳]. این سرطان در سیاه‌پوستان دو برابر سفیدپوستان و با همان نسبت جنسی (مرد به زن ۲ به ۱) می‌باشد [۴]. بر اساس آمار سال ۲۰۰۵ بیشترین موارد این سرطان در کشورهای ژاپن و چین و روسیه مشاهده شده و کمترین موارد آن نیز مربوط به کشورهای توسعه‌یافته غربی می‌باشد [۵]. در سال ۱۹۳۰ در آمریکا، سرطان معده دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در میان

شدن سلول‌های سرطانی از تومورها، انتقال از طریق جریان خون و تهاجم به بافت‌های دیگر (متاستاز) ممانعت به عمل بیاورند [۱۲].

ژن Runx3 در ناحیه ۱p36 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱ قرار گرفته است و پروتئینی بنام فاکتور رونویسی وابسته به runt را در انسان کد می‌کند. که ساختار هتروداایمر دارد و به‌توالی ویژۀ ۵'-YGYGGT-3' موجود در enhancer و پرو موتور ژن‌ها متصل می‌شود و می‌تواند رونویسی را مهار یا فعال نماید. Runx3 یک تنظیم کننده شناخته شده مسیره‌های اصلی تکاملی می‌باشد و اخیراً بعنوان یک ژن سرکوب کننده توموری مورد شناسایی قرار گرفته است و نقش مهمی در پیامرسانی توسط مسیر انتقال پیام TGF- β ایفا می‌کند یکی از مهمترین مکانیسم‌هایی که طی آن این ژن دچار خاموشی می‌شود هیپرمتیلاسیون در جزایر CpG پروموتور می‌باشد که بعنوان ضربه دوم در نظریه دوضربه ای نادسون (Knudson's) نقش ایفا می‌کند. این ژن نقش مهمی در ترانسفورم مسیر سیگنالی فاکتور رشد (TGF) β به عهده دارد. که این نقش ممکن است به علت اثرات متقابل با FoxO3a/FKHRL7 باشد که هر دو برای فعال سازی پروآپوپتوز پروتئین Bim (Bcl-2-interaction mediator of cell death) ضروری‌اند و یا توسط همکاری با اعضا خانواده پروتئین SMAD باعث تحریک مسیر TGF-B/ SMAD با روشهای دیگر می‌شود.

ژن RUNX3 توسط سه مکانیسم اصلی تنظیم می‌شود: از دست دادن هتروزیگوت LDH، قرار گرفتن اشتباهی در محل mislocalization، متیله شدن پروموتور.

تحقیقات انجام شده بیانگر نقش مهمی برای RUNX3، نه تنها در مراحل پیشرفته بلکه همچنین در نوپلاسیس است. مخصوصاً در سرطان‌های معده می‌باشد [۱۳، ۱۴].

سرطان معده معمولاً در مراحل پیشرفته شناسایی و تشخیص داده می‌شود و احتمال بهبود پایینی دارد. در واقع دانسته‌های ما از عوامل مولکولی این سرطان، نسبت به سایر سرطان‌های دیگر کمتر است. باوجوداینکه سرطان معده هنوز به‌عنوان یک بیماری مرگبار شناخته می‌شود، شناسایی نشانگرهای مولکولی، ژنتیکی و تغییرات اپی ژنتیکی و ویژگی‌های فارماکوژنتیک جدید، وضعیت تشخیص و درمان بیماران را بهبود می‌بخشد و امیدهایی درزمینه توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی مؤثرتر ایجاد می‌نماید به همین منظور در این مطالعه ژن‌هایی که در سرطان معده مؤثر هستند را در جمعیت ایرانی بررسی نموده‌ایم تا بتوان از آن‌ها به‌عنوان بیومارکر برای تشخیص زودرس سرطان معده استفاده کنیم

مردان و در میان زنان سومین عامل مرگ ناشی از سرطان بوده اما امروزه حتی در میان ۱۰ علت شایع مرگ هم نیست [۳]. سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در ایران می‌باشد که برخلاف کشورهای غربی بروز آن به‌طور چشمگیری رو به افزایش است. بالاترین میزان سرطان معده در ایران در استان اردبیل گزارش شده است [۶]. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد سرطان معده نتیجه تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی متعدد بر روی ژن‌های سرکوب کننده تومور، ژن‌های ترمیم کننده و مولکول‌های چسبندگی سلول است. تعدادی از ژن‌های سرکوبگر تومور شامل hMLM1, p14, p15, p16, GSTP1, RASSF1, COX-2, APC, CDH1, CDH4, DAP-K, THBS1, TIMP-3, RAR β , MGMT, CHFR, DCC, RUNX3, TSLC1 and 14-3-3 sigma می‌باشند که توسط هایپرمتیله شدن در سرطان معده خاموش می‌شوند، در این مطالعه به دو تا از این ژن‌ها پرداخته شده است و همچنین مشخص شده است که تغییرات اپی ژنتیکی ویژه‌ای در برخی از ژن‌های سلول‌های تومورال رخ می‌دهند. این تغییرات اپی ژنتیکی بالقوه ممکن است شاخص‌های زیستی (بیومارکرهای) خوبی برای تشخیص زودرس و پیشگیری باشند و در سه عرصه تشخیص تعیین پیش‌آگهی و درمان سرطان به کار آیند [۷] یک تا سه درصد کارسینوماهای معده بر اثر سندرم‌های ارثی شناخته شده مانند: FAP, HDGC و Lynch ایجاد می‌گردد. سرطان معده بامنشا HDGC یک بیماری اتوزومی غالب می‌باشد که تقریباً ۳۰ درصد افراد مبتلابه آن در یکی از ژن‌های مهارکننده تومور E-Cadherin یا CDH1 جهش دارند [۸، ۹] ژن E-Cadherin در ناحیه ۲۲،۱ بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۶ و در فاصله جفت بازی ۶۸۷۷۱۱۲۷-۶۸۸۶۹۴۴۴ قرار گرفته است. این ژن دستورات عمل ساخت یک پروتئین بنام کاده‌رین اپی تلیالی را فراهم می‌کند. کاده‌رین‌ها یکسری پروتئین‌های سطح سلولی‌اند که اتصال سلول‌های مجاور هم به یکدیگر را تسهیل می‌کنند و تشکیل بافت از سلول‌ها را با همراهی بسیاری از پروتئین‌های دیگر امکان‌پذیر می‌کنند [۱۰] علاوه بر نقش در اتصال سلول‌ها، ای کاده‌رین به‌عنوان ناقل سیگنال‌های شیمیایی به داخل سلول، کنترل حرکت سلول‌ها و تنظیم فعالیت یکسری ژن‌های خاص عمل می‌کنند [۱۱]. بعضی تحقیقات نشان داده‌اند که ژن CDH1 به‌عنوان یک ژن سرکوب کننده عمل تومور عمل می‌کند که سلول‌ها را از رشد و تقسیم غیرقابل کنترل برای سرطانی شدن محافظت می‌کنند. از آنجائیکه این پروتئین به اتصال سلول‌ها به همدیگر کمک می‌کنند، ممکن است از جدا

وهم چنین به این سؤال که آیا بیان ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف متفاوت است یا نه پاسخ دهیم.

روش کار

مطالعه حاضر به صورت موردی-شاهدی بوده و بر روی ۶۴ نمونه که ۳۲ نمونه از بافت سرطانی معده و ۳۲ نمونه از بافت مجاور آن بود که از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی تهران در فاصله سال‌های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۱ تهیه شده بود. نمونه‌ها پس از تهیه در نیتروژن مایع و شرایط عاری از RNAase سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد و بلافاصله در نیتروژن مایع نگهداری شدند. از نمونه بیمارانی که تحت درمان رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و یا ایمنی‌تراپی بودند در این مطالعه استفاده نشده است. یک فرم رضایت‌نامه رسمی از تمام بیماران گرفته شده است و کمیته اخلاق انستیتو کانسر این مطالعه را تأیید کرده است.

استخراج RNA

RNA تام با استفاده از محلول تریزول (Trizol Invitrogen Carlsbad USA) مطابق پروتکل شرکت مربوطه از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت استخراج شد. خلوص و غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Nanodrop Spectrophotometr Bio-Tek-USA) اندازه‌گیری شد. و اینتگریتی با ژل آگارز الکتروفورز ۱% بررسی شد. RNA در دمای ۸۰ c - تا مرحله

سنتز cDNA نگهداری شدند.

سنتز cDNA

سنتز cDNA از mRNA تام با استفاده از کیت شرکت فرمنتازو بر اساس پروتکل شرکت و در دماهای (۲۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه، ۷۰°C به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. غلظت و خلوص به وسیله دستگاه نانو دراپ بر اساس توضیحات ذکر شده اندازه‌گیری شد. تمام cDNA ها در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

Quantitative Real time PCR

سطوح بیان این ژن‌ها با qRT-PCR و به وسیله دستگاه ترمو سایکلر (BIO-RAD USA) اندازه‌گیری شد. واکنش‌ها برای دو ژن RUNX3 و CDH1 با روش و با استفاده از کیت تاکارا (TAKARA, japan) انجام شد. واکنش‌ها در حجم ۲۰ μL شامل (۱۰ μL sybrgreen0)، (آب nuclease free ۷ μL)، (۱ μL cDNA)، (پرایمر ۱ μL F)، (پرایمر ۱ μL R) و بر اساس پروتکل شرکت انجام شد که میزان (۵ μg) Template RNA بوده به عنوان کنترل داخلی rRNA ۱۸ s استفاده شد.

جهت تعیین Efficiency واکنش Real-Time_PCR با رقت‌های (۱-۱/۱-۱/۱۰-۱/۱۰۰) پرایمرها انجام شد و شیب منحنی استاندارد که بیانگر کارایی پرایمرها بود به دست آمد. طراحی پرایمر به وسیله نرم‌افزار 7-alleleID انجام شد. خواص پرایمرها در (جدول ۱) نشان داده شده است. کارایی پرایمر به وسیله کنترل مثبت و منفی تأیید شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمر های استفاده شده در REAL time RT-PCR

خصوصیات	CDH1	RUNX3	18s rRNA
Num- Accession NCBI ber	NM_004360.3	NM_004350.2	X03205
F پرایمر	AGAACGCATTGCCACAT-ACAC	TCTGTAAAGGC-CCAAAGTGGGA	GTAACCCGTTGAAC-CCCATT
طول پرایمر	۲۱	۲۲	۲۰
مقدار مورد استفاده، پیکو مول	۱۰	۱۰	۱۰
R پرایمر	GAGGATGGTGTAAGC-GATGG	ACCTCAGCATGA-CAATATGTCACAA	CCATCCAATCGGTAG-TAGC
طول پرایمر	۲۰	۲۵	۲۰
مقدار مورد استفاده، پیکو مول	۵	۱۰	۱۰
طول امپلی کون	۲۵۰	۱۹۷	۲۰۰
مرحله دمای انیلینگ، °C	۵۰/۸	۵۲/۷	۵۳/۵

تعیین توالی DNA

بهمنظور تأیید هویت قطعات حاصل از PCR، منطقه حاوی هر باند از ژل بریده شد و هر باند توسط شرکت Bioneer کره جنوبی تعیین توالی شد و با توالی موجود در Gene Bank مقایسه شد. که تشابه ۱۰۰٪ برای CDH1 و تشابه ۹۹٪ برای RUNX3 تأییدی بر نتیجه کار است (تصویر ۱ الف). مقادیر مورد انتظار برای ژن‌های مورد مطالعه به ترتیب $200 = 18srRNA$ bp $250 = CDH1$ و $197 = RUNX3$ bp می‌باشد که با توجه به نزدیک بودن این مقادیر با مقادیر به دست آمده از ژل می‌توان به صحت کار پی برد.

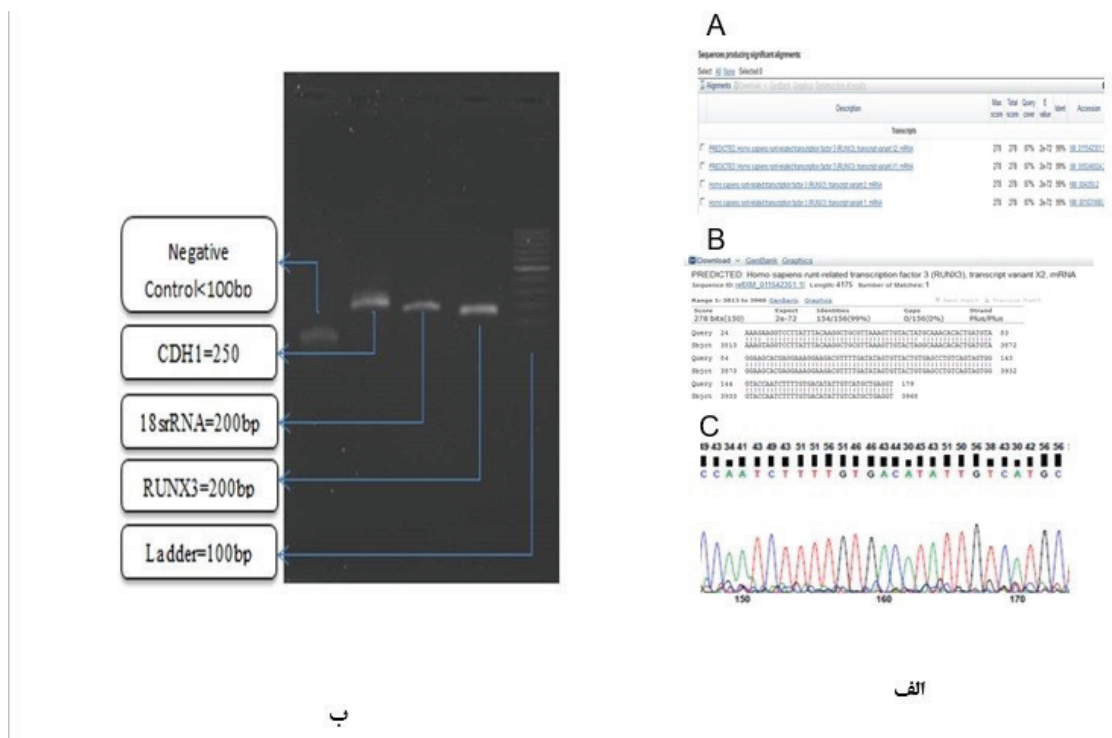
تجزیه تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری و انتخاب آزمون مناسب جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها نیاز است ابتدا نتایج به دست آمده در نرم‌افزار SPSS ۱۶ وارد شده و اطلاعات توصیفی از قسمت Descriptive Statistic به دست آمد که بعد از بررسی نرمال بودن توزیع متغیرها با استفاده از روش one sample Kolmogorov smirnov test، برای مقایسه بین دو گروه متغیر

نرمال از آزمون Independent samples t-test نیز استفاده گردید. برای نشان دادن توانایی این دو ژن در تشخیص افراد سالم و بیمار براساس آزمون استاندارد طلایی، از منحنی راک (ROC) استفاده شده است. ΔCt سیکلی از واکنش تعریف شده که سیگنال فلورسانس از Threshhold عبور می‌کند و تفاوت Ct بین ژن مورد نظر و ژن رفرنس به‌عنوان ΔCt تعریف شد. $\Delta\Delta Ct$ تفاوت Ct بین نمونه‌های سرطانی و سالم است. Folding change از رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آمد [۱۵].

یافته‌ها

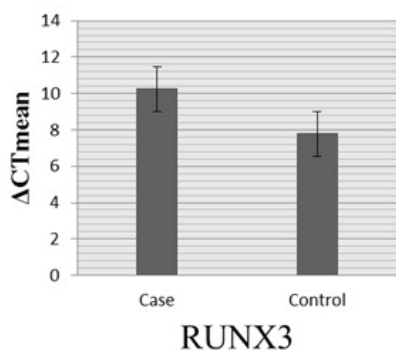
خلاصه‌ای از مشخصات این بیماران در جدول ۲ آمده است MeltingPeak دو ژن به‌صورت تک قله به دست آمد که این خود بیانگر وجود تنها یک محصول PCR است. در ضمن محصول PCR بر روی ژل قرار گرفت و مشاهده شد که در هر کدام از واکنش‌های انجام شده با پرایمرهای اختصاصی تنها یک باند اختصاصی وجود دارد این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه‌های مورد بررسی را تأیید کرد (تصویر ۱ ب).



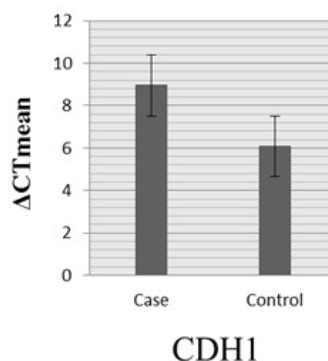
تصویر ۱: الف_ نتایج تعیین توالی cDNA ژن RUNX3. تعیین توالی ژن مذکور توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گردید. (A). نتیجه NCBI Blast توالی مورد نظر با توالی‌های موجود در GenBank (B). Alignment توالی یافت شده با توالی‌های مشابه موجود در GenBank (c) بخشی از توالی یافت شده آن گونه که توسط دستگاه تعیین توالی گزارش شده است. که تشابه ۹۹٪ تأییدی بر نتیجه کار است. ب- الکتروفورز محصول ژن‌های Ladder 100bp در کنار CDH1, RUNX3, 18srRNA

جدول ۲: خلاصه‌ای از ویژگی‌های نمونه‌های مطالعه شده

خصوصیات	تعداد (درصد)
سن، سال	
کمتر از ۵۹	۸ (۲۵)
۵۹ و بیشتر	۲۴ (۷۵)
جنس	
مرد	۲۶ (۸۱)
زن	۶ (۱۹)
مرحله تومور	
مرحله ۱	۱۰ (۳۱)
مرحله ۲	۲۲ (۶۹)
اندازه تومور، سانتی‌متر	
۵ و کمتر	۶ (۱۹)
بیشتر از ۵	۲۶ (۸۱)
تهاجم عروقی	
دارای تهاجم عروقی	۱۳ (۴۰/۶)
فاقد تهاجم عروقی	۱۹ (۵۹/۴)



ب



الف

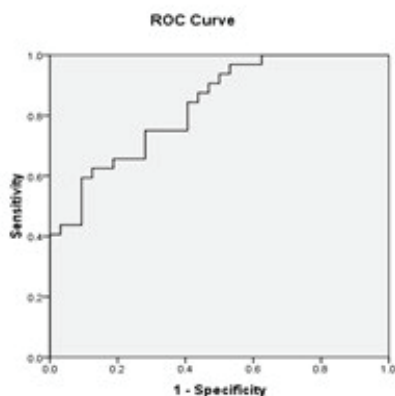
تصویر ۲: الف- توزیع فراوانی ΔCTmean ژن CDH1 دریافت سالم توموری بیماران مبتلابه سرطان معده: ΔCTmean ژن CDH1 دریافت سالم ±۰/۳۷ و در بافت توموری ۸/۹۵ ±۰/۳۷ می‌باشد. که دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد. (P < ۰/۰۰۱). ب- توزیع فراوانی ΔCTmean ژن RUNX3 دریافت سالم توموری بیماران مبتلابه سرطان معده ΔCTmean ژن RUNX3 دریافت سالم ±۰/۴۰ و در بافت توموری ۱۰/۲۴ ±۰/۴۰ می‌باشد. که دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد. (P < ۰/۰۰۱).

RUNX3 در دو بافت سالم و سرطانی دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۰۱).

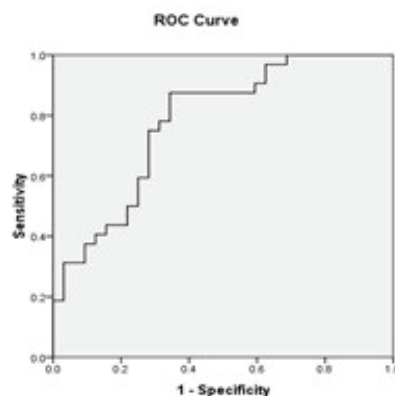
در این مطالعه در ۸۷/۵٪ از بیماران مبتلابه سرطان معده در بافت توموری نسبت به بافت حاشیه‌ای سالم آن بیان ژن CDH1 به میزان ۷/۳۵ برابر کاهش یافته و در ۹۰٪ از این بیماران بیان ژن RUNX3 به میزان ۵/۴۶ برابر کاهش یافته است. که تفاوت معناداری رابین بافت سالم و توموری این بیماران نشان داده است.

تجزیه و تحلیل منحنی ROC برای ارزیابی ارزش تشخیصی CDH1, RUNX3 در افتراق نمونه‌های بافت توموری از بافت حاشیه‌ای سالم انجام شد (تصویر ۳).

میانگین بیان CDH1 در بافت سالم ۶/۰۸ و در بافت سرطانی ۸/۹۵ بود. متوسط Folding change ۰/۱۳۶ به دست آمد که نشان‌دهنده کاهش بیان CDH1 دریافت سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور آن است (تصویر ۲ الف). آنالیز Paired t-test نیز نشان داد که تفاوت سطح بیان CDH1 در دو بافت سالم و سرطانی دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (P = ۰/۰۰۰). میانگین بیان RUNX3 در بافت سالم ۷/۷۸ و در بافت سرطانی ۱۰/۲۴ بود. متوسط Folding change ۰/۱۳۸ به دست آمد که نشان‌دهنده کاهش بیان RUNX3 دریافت سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور آن است. (تصویر ۲ ب). آنالیز Paired t-test نیز نشان داد که تفاوت سطح بیان



ب



الف

تصویر ۳: منحنی راک (ROC): مساحت سطح زیر منحنی الف) برای RUNX3 برابر با ۷۷/۹ و مساحت سطح زیر منحنی؛ ب) برای CDH1 برابر با ۸۳ است

میزان حساسیت برای ژن RUNX3 نزدیک به ۹۰٪ است و میزان اختصاصیت آن نزدیک به ۶۰٪ است و میزان حساسیت برای ژن CDH1 نزدیک به ۸۰٪ است و میزان اختصاصیت آن نزدیک به ۶۰٪ است. کم بودن میزان اختصاصیت می‌تواند به علت کم بودن تعداد نمونه مورد بررسی باشد. و بالا بودن میزان حساسیت این دو ژن نشان‌دهنده بالا بودن ارزش تشخیصی‌شان است.

بحث

باوجود اینکه سرطان معده هنوز به‌عنوان یک بیماری مرگبار شناخته می‌شود، شناسایی نشانگرهای مولکولی، ژنتیکی و تغییرات اپی ژنتیکی و ویژگی‌های فارماکوژنتیک جدید، وضعیت تشخیص و درمان بیماران را بهبود می‌بخشد و امیدهای درزمینه توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی مؤثرتر ایجاد می‌نماید و همچنین باعث افزایش آگاهی درزمینه ایجاد و نحوه گسترش سرطان معده می‌شود. در سال‌های اخیر ارتباط بین RNA ها و ژن‌های هدف آن‌ها در سرطان معده موردتوجه قرار گرفته است [۱۶] و از آن جایی که تحقیق بر روی نشانگرهای نوع RNA با پیشرفت در تکنیک‌های PCR به‌ویژه Real-time RT-PCR گسترده شده است، می‌توان به سراغ روش‌های تشخیصی زودرس رفت، تا بتوان شناسی بهبودی بیماران را افزایش داد و هزینه‌های تشخیص و درمانی آن‌ها را کاهش داد [۲].

نتایج این مطالعه نشان داد که در ۸۷/۵٪ از بیماران مبتلابه سرطان معده در بافت توموری به میزان ۷/۳۵ برابر نسبت به بافت حاشیه‌ای سالم آن بیان ژن CDH1 کاهش یافته و در ۹۰٪ از بیماران مبتلابه سرطان معده در بافت توموری به

میزان ۵/۴۶ برابر نسبت به بافت حاشیه‌ای سالم آن بیان ژن CDH1 کاهش یافته است و از آنجایی که بیان ژن‌های CDH1 و RUNX3 تفاوت معناداری رابین بافت سالم و توموری این بیماران نشان داده است. لذا این بررسی ژن‌های CDH1 و RUNX3 به‌عنوان یک بیومارکر احتمالی تشخیصی در سرطان معده معرفی نموده است. این یافته‌ها اکثر گزارشات قبلی را تایید می‌کند. از جمله مطالعه‌ای که توسط شینو و همکاران در سال ۱۹۹۵ جهت بررسی بیان E-cadherin در سرطان معده انجام شد. بیان پایین E-cadherin با آدنو کارسینوم تمایز نیافته رابطه معنادار داشت و کاهش بیان E-cadherin با افزایش رشد تومور، متاستاز دوردست و بقای پایین بیمار ارتباط داشت [۱۷]. همچنین بر اساس نتایج حاصل از مطالعه در سرطان معده کاهش بیان E-cadherin بین ۱۷٪ تا ۹۲٪ موارد دیده می‌شود [۱۸، ۱۹] که در مطالعه حاضر در ۸۷/۵٪ از بیماران کاهش بیان ژن E-cadherin وجود داشت.

به‌طور کلی در مطالعه‌ای که توسط لازار و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کشور رومانی انجام شد [۲۰] و همچنین دیگر تحقیقات [۲۱] به این نتایج رسیده بودند که ۱- بیان غیرطبیعی E-cadherin به‌طور معناداری بیشتر در نوع منتشر سرطان در مقایسه با نوع روده‌ای بوده است.

۲- بیان غیرطبیعی E-cadherin با متاستاز دوردست-بقای کمتر بیمار و انتشار بیشتر تومور ارتباط داشته است.

از آنجایی که E-cadherin در اتصال سلولی و کنترل حرکات سلولی نقش دارد [۱۱] می‌توان نتایج به‌دست‌آمده در بالا را توجیه کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که از این بیومارکر می‌توان به‌عنوان فاکتور پیشرفت بیماری و نیز تشخیص استفاده نمود.

میزان حساسیت برای ژن RUNX3 نزدیک به ۹۰٪ است و میزان اختصاصیت آن نزدیک به ۶۰٪ است و میزان حساسیت برای ژن CDH1 نزدیک به ۸۰٪ است و میزان اختصاصیت آن نزدیک به ۶۰٪ است. کم بودن میزان اختصاصیت می‌تواند به علت کم بودن تعداد نمونه مورد بررسی باشد. و بالا بودن میزان حساسیت این دو ژن نشان‌دهنده بالا بودن ارزش تشخیصی‌شان است.

بحث

باوجود اینکه سرطان معده هنوز به‌عنوان یک بیماری مرگبار شناخته می‌شود، شناسایی نشانگرهای مولکولی، ژنتیکی و تغییرات اپی ژنتیکی و ویژگی‌های فارماکوژنتیک جدید، وضعیت تشخیص و درمان بیماران را بهبود می‌بخشد و امیدهای درزمینه توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی مؤثرتر ایجاد می‌نماید و همچنین باعث افزایش آگاهی درزمینه ایجاد و نحوه گسترش سرطان معده می‌شود. در سال‌های اخیر ارتباط بین RNA ها و ژن‌های هدف آن‌ها در سرطان معده موردتوجه قرار گرفته است [۱۶] و از آن جایی که تحقیق بر روی نشانگرهای نوع RNA با پیشرفت در تکنیک‌های PCR به‌ویژه Real-time RT-PCR گسترده شده است، می‌توان به سراغ روش‌های تشخیصی زودرس رفت، تا بتوان شناسی بهبودی بیماران را افزایش داد و هزینه‌های تشخیص و درمانی آن‌ها را کاهش داد [۲].

نتایج این مطالعه نشان داد که در ۸۷/۵٪ از بیماران مبتلابه سرطان معده در بافت توموری به میزان ۷/۳۵ برابر نسبت به بافت حاشیه‌ای سالم آن بیان ژن CDH1 کاهش یافته و در ۹۰٪ از بیماران مبتلابه سرطان معده در بافت توموری به

پروگنوز مهم استفاده کرد [۲۶]. همبستگی پلی مورفیسم های ژن های مرتبط با تکثیر سلولی و سرطان معده نیز در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. در فرا تحلیلی که از ۵۵ مقاله پژوهشی منتج می شود، پیشنهاد شده است که این پلی مورفیسم ها قابلیت استفاده به عنوان نشانگرهای زیستی (Biomarker) برای پیش آگاهی در مورد خطر سرطان معده را دارند [۲۷]. کاهش بیان ژن های CDH1 و RUNX3 در مطالعه حاضر با توجه به نقش آنها به عنوان یک سرکوب کننده عمل تومور که سلول ها را از رشد و تقسیم غیر قابل کنترل برای سرطانی شدن محافظت می کنند، قابل توجیه است. از طرفی بالا بودن میزان حساسیت ژن های مورد مطالعه در منحنی راک می تواند بیانگر ارزش تشخیصی این ژن ها به عنوان نشانگرهای زیستی احتمالی در تشخیص سرطان معده باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه پیش رو بیان ژن های CDH1 در ۸۷/۵٪ نمونه ها ۷/۳۵ برابر و RUNX3 در ۹۰٪ نمونه ها ۵/۴۶ برابر در بافت بدخیم افراد مبتلا به سرطان معده نسبت به بافت سالم آن ها کاهش یافته است که در هر دو مورد کاهش معنادار بوده است. با توجه به نقش CDH1 و RUNX3 به عنوان یک ژن سرکوب کننده عمل تومور که سلول ها را از رشد و تقسیم غیر قابل کنترل برای سرطانی شدن محافظت می کنند قابل توجیه است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله که منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی می باشد از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان نهایت تشکر و سپاسگزاری را می نمایند. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

REFERENCES

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90. DOI: 10.3322/caac.20107 PMID: 21296855
- Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. *Methods Mol Biol.* 2012;863:411-35. DOI: 10.1007/978-1-61779-612-8_26 PMID: 22359309
- Anderson DK, Brancardi FC, Seymour L, Schwartz MO, Schwartz S. Principles of surgery. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011.
- Rondolph T. Stomach and deudenum disease. In: Braunwald E, Kasper D, editors. *Harrison's of internal medicine.* 16th ed. New York: MacGrow-Hill; 2010.
- Inoue M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. *Postgrad Med J.* 2005 81(957):419-24.
- Yazdanbod A, Arshi S, Derakhshan MH, Sadjadi AR, Malekzadeh R. Gastric cardia cancer; the most common type of upper gastrointestinal cancer in Ardabil, Iran: an endoscopy clinic experience. *Arch Iran Med.* 2001;4(2):76-9.
- Schneider BG, Peng DF, Camargo MC, Piazuelo MB, Sicinski LA, Mera R, et al. Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer.* 2010;127(11):2588-97. DOI: 10.1002/ijc.25274 PMID: 20178103
- Fitzgerald RC, Caldas C. Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. *Gut.* 2004;53(6):775-8. PMID: 15138199
- Oliveira C, Suriano G, Ferreira P, Canedo P, Kaurah P, Mateus R, et al. Genetic screening for familial gastric cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 2004;2(2):51-64. DOI: 10.1186/1897-4287-2-2-51 PMID: 20233471
- Bacani JT, Soares M, Zwingerman R, di Nicola N, Senz J, Riddell R, et

علیرغم گزارش هایی که در بالا ذکر شد در مطالعه که توسط ژنگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ در کشور چین انجام شد. بیان شد که E-cadherin به تنهایی نقشی در سرطان معده ندارد اما اثر آن با MUC2 نقشی سینر ژیک در ایجاد سرطان معده دارد [۲۲].

همچنین در مطالعه دیگری هیچ همبستگی بین بیان کاهش یافته E-cadherin و جنس، سن، محل تومور، pTNM، pN، pT و تهاجم عروقی - لنفی وجود نداشت [۲۳].

در حال حاضر مطالعات انجام شده در رابطه با ژن بسیار کم است و این ژن جای بررسی بسیار زیادی دارد. بیشتر مطالعات انجام شده در خصوص نقش و عملکرد این ژن است از جمله مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ انجام شد مشخص شد که موش های ژنتیکی فاقد این عنصر دارای تکثیر بالای سلول های اپیتلیال بوده، نسبت به اثرات مهاری TGF نیز مقاوم هستند که این امر گواه بر این ادعاست که Runx3 در دسته عوامل سرکوب گر تومور نیز طبقه بندی می شود [۲۴] همچنین یو و همکاران در CSI سنگاپور، نشان دادند که RUNX3 یک جزء اصلی در مکانیزم سرکوب تومور می باشد. هیپرمتیلاسیون این ژن تاکنون در تعداد زیادی از بدخیمی های انسانی نشان داده شده است. اگر چه مطالعه حاضر بر روی سرطان ریه متمرکز شده است، نتایج آن به توضیح توسعه سایر سرطانهای انسانی کمک بسزایی می کند [۲۵] مطالعه ای است که توسط الموندهری و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد از ۱۰۵ بیمار نمونه خون محیطی گرفته شد و متیلاسیون ژن های RUNX3, P16, CDH1 با تکنیک Pyrosequencing انجام شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که در بیماران مسن افزایش متیلاسیون در ژن های مذکور دیده می شود. به خصوص افزایش متیلاسیون اختصاصی پروموتور این ژن ها دیده می شود. که در نهایت نتیجه گیری شد که آنالیز کلی و اختصاصی متیلاسیون DNA می توان به عنوان یک فاکتور

- al. CDH1/E-cadherin germline mutations in early-onset gastric cancer. *J Med Genet.* 2006;43(11):867-72. DOI: [10.1136/jmg.2006.043133](https://doi.org/10.1136/jmg.2006.043133) PMID: [16801346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16801346/)
11. Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, Senz J, De Luca A, Chun N, et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA.* 2007;297(21):2360-72. DOI: [10.1001/jama.297.21.2360](https://doi.org/10.1001/jama.297.21.2360) PMID: [17545690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17545690/)
 12. Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:48. DOI: [10.1186/1471-2407-6-48](https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-48) PMID: [16512896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16512896/)
 13. Yamamura Y, Lee WL, Inoue K, Ida H, Ito Y. RUNX3 cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells. *J Biol Chem.* 2006;281(8):5267-76. DOI: [10.1074/jbc.M512151200](https://doi.org/10.1074/jbc.M512151200) PMID: [16373335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16373335/)
 14. Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, et al. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31577-82. PMID: [10531362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10531362/)
 15. 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. DOI: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262) PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)
 16. Effatpanah H, Yadegarazari R, Karami M, Majlesi A, Shabab N, Saidijam M. Expression Analysis of mir-21 and mir-221 in Cancerous Tissues from Iranian Patients with Gastric Cancer. *Iran Biomed J.* 2015;19(4):188-93. PMID: [26209976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26209976/)
 17. Shino Y, Watanabe A, Yamada Y, Tanase M, Yamada T, Matsuda M, et al. Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical E-cadherin expression in human gastric carcinomas. *Cancer.* 1995;76(11):2193-201. DOI: [10.1002/1097-0142\(19951201\)76:11<2193::AID-CN-CR2820761104>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19951201)76:11<2193::AID-CN-CR2820761104>3.0.CO;2-2)
 18. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet.* 2000;58(4):250-64. PMID: [11076050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11076050/)
 19. Bach S, Makristathis A, Rotter M, Hirschl AM. Gene expression profiling in AGS cells stimulated with Helicobacter pylori isogenic strains (cagA positive or cagA negative). *Infect Immun.* 2002;70(2):988-92. PMID: [11796637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11796637/)
 20. Lazar D, Taban S, Sporea I, Dema A, Cornianu M, Lazar E, et al. Gastric cancer: correlation between clinicopathological factors and survival of patients. II. *Rom J Morphol Embryol.* 2009;50(2):185-94. PMID: [19434309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19434309/)
 21. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Somatic genome variations in health and disease. *Curr Genomics.* 2010;11(6):387-96. DOI: [10.2174/138920210793176065](https://doi.org/10.2174/138920210793176065) PMID: [21358982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21358982/)
 22. Zhang HK, Zhang QM, Zhao TH, Li YY, Yi YF. Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2004;10(20):3044-7. PMID: [15378790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15378790/)
 23. Johnson AD. Single-nucleotide polymorphism bioinformatics: a comprehensive review of resources. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(5):530-6. DOI: [10.1161/CIRCGENETICS.109.872010](https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.872010) PMID: [20031630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20031630/)
 24. Wu M, Jolicoeur N, Li Z, Zhang L, Fortin Y, L'Abbe D, et al. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis.* 2008;29(9):1710-6. DOI: [10.1093/carcin/bgn073](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn073) PMID: [18356149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18356149/)
 25. Lee YS, Lee JW, Jang JW, Chi XZ, Kim JH, Li YH, et al. Runx3 inactivation is a crucial early event in the development of lung adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2013;24(5):603-16. DOI: [10.1016/j.ccr.2013.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.003) PMID: [24229708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24229708/)
 26. Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Tarantini L, Baccarelli A, Rusiecki JA. The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinoma. *PLoS One.* 2010;5(12):e15585. DOI: [10.1371/journal.pone.0015585](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015585) PMID: [21203466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21203466/)
 27. Gao L, Nieters A, Brenner H. Cell proliferation-related genetic polymorphisms and gastric cancer risk: systematic review and meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(12):1658-67. DOI: [10.1038/ejhg.2009.102](https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.102) PMID: [19536170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19536170/)

Evaluation of CDH1&RUNX3 Expression in Cancerous and Normal Tissue of Patients with Gastric Cancer

Mastaneh Einolghozati ¹, Mohammad Hossein Sanati ², Hossein Effatpanah ³, Nooshin Shabab ⁴, Massoud Saidijam ^{5,*}

¹ MSc of Biotechnology, Nourdanesh Institute of Higher Education, Meymeh, Isfahan, Iran

² Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Public Health, Research Center for Molecular Medicine, Asadabad Faculty of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁴ MSc, Department of Molecular Medicine and Genetics, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁵ Professor, Research Center for Molecular Medicine, Department of Molecular Medicine and Genetics, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* Corresponding author: Massoud Saidijam, Professor, Research Center for Molecular Medicine, Department of Molecular Medicine and Genetics, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. E-mail: sjam110@yahoo.com

DOI: 10.21859/hums-24012

Received: 22/12/2016

Accepted: 15/04/2017

Keywords:

Stomach Neoplasms

Cadherins

RUNX3

How to Cite this Article:

Einolghozati M, Sanati MH, Effatpanah H, Shabab N, Saidijam M. Evaluation of CDH1&RUNX3 Expression in Cancerous and Normal Tissue of Patients With Gastric Cancer. *Sci J Hamadan Univ Med Sci.* 2017;**24**(1):11-19. DOI: 10.21859/hums-24012

© 2017 Hamadan University of Medical Sciences.

Abstract

Introduction: Gastric cancer is a multifactorial disease and the fourth most common cancer in the world and the second cause of death from cancer. This study was designed and performed to investigate CDH1 and RUNX3 genes expression in healthy and tumor marginal tissue of people with gastric cancer.

Methods: In this case-control study, 64 samples including 32 samples of gastric tumor tissue and 32 samples of normal tissue from the patient's were prepared. Next, RNA was extracted from tissue and cDNA was made. Finally, using Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR), gene expression measurements were also performed for CDH1 and RUNX3. Paired t test was used for data analysis.

Result: Overall, in 87.5% of patients with gastric cancer, CDH1 margin dropped to 7.35 in tumor tissue compared to healthy tissue gene expression, and in 90% of patients, RUNX3 gene expression was reduced by as much as 46.5 times. Significant differences were found between normal and cancerous cells of these patients.

Conclusion: Given the role of RUNX3 gene, CDH1 and decreased expression of tumor suppressor genes as they are significantly in tumor tissue of patients with gastric cancer is justified.