Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 16, No. 3, Autumn 2016, Pages 261-270

Semi-Quantitative Evaluation of KAI1 Gene Expression in Colorectal Cancer and Correlation with Clinical Stage and Progression Factors of the Disease

Mohammad Ganji S*[1], Molapour MN[2], Javadi G[2], Jahanzad E[3]

1. Department of Molecular Medicine, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2. Department of Genetics, Azad Islamic University, Sciences and researches branch, Tehran, Iran
3. Iran Tumor bank, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding author. Tel: +982144787466 Fax: +982144787399 E-mail: shahlamg@yahoo.com

Received: Jun 15, 2015 Accepted: Nov 26, 2015

ABSTRACT

Background & objectives: 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 subjects to the down regulation in tumors. The present research aims semi-quantitative evaluation of KAI1 mRNA expression in Iranian patients with colorectal cancer (CRC) and correlation between expression levels of KAI1 and stage oftumorigenesis, especially metastasis and invasion of CRC as well as pathologic factors of patients.

Methods: RT-PCR was done by specific primers for KAI1 and β-actin genes on the 80 tumor tissues and 14 normal tissues as fresh samples which obtained from 80 unrelated patients referred to Imam Khomeini Hospital.

Results: According the results, 51.2% and 48.8% of the sample were on and off for KAI1 gene expression, respectively. As a detail, 97.3% of samples in the stage 3 and 4 and 94.5% of metastatic phases samples showed no expression of this gene. Statistical analysis showed that there is a significant difference of the KAI1 expression between four groups of samples; normal, stage 1, 2 and 3 ($p<0.05$). Also a significant difference was observed between semi-quantitative KAI1 expression and degree of spread to regional lymph nodes ($p=0.02$) as well as semi-quantitative KAI1 expression and metastasis ($p=0.000001$).

Conclusion: A significant difference between semi-quantitative expression of KAI1 and degree of spread to regional lymph nodes ($p=0.02$) and metastasis ($p=0.000001$) was observed.

Keywords: KAI1 gene; Metastasis; Colorectal Cancer; Gene Expression.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

ارزیابی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در سرطان کولورکتال و ارتباط آن با مرحله بالینی و فاکتورهای پیشرفت بیماری

شهلا محمدگنجی[1*]، محمدناصر مولاپور[2]، غلامرضا جوادی[2]، عیسی جهانزاد[3]

۱. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه پزشکی مولکولی، تهران، ایران ۲. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران ۳. تومور بانک ایران، انستیتو سرطان، بیمارستان امام خمینی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱٤٤۷۸۷٤٦٦ فاکس: ۰۲۱٤٤۷۸۷۳۹۹ پست الکترونیک: shahlamg@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: ژن KAI1 در واقع یک ژن شناخته شده سرکوبگر متاستاز است که با مهار تحرک و تهاجم سلول‌های سرطانی اولیه، متاستاز را سرکوب می‌کند. بیان KAI1 در همه بافت های نرمال نشان داده است، اما میزان بیان mRNA آن در تومورها یکسان نیست. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی نیمه کمی بیان ژنKAI1 در mRNA بافتی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال و ارتباط خاموش یا روشن بودن این ژن در هر یک از مراحل توموری با فاکتورهای پاتولوژیک بیماران است. شاید بتوان به مارکری مفید در شناسایی مراحل توموری بویژه متاستاز و تهاجم در سرطان کولورکتال دست یافت.

روش کار: بدین منظور ۸۰ نمونه توموری تازه و ١٤ نمونه نرمال از ۸۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهیه شد و آزمایش RT-PCR بر روی cDNA سنتز شده حاصل از mRNA بافت ها با پرایمرهای بتا اکتین و ژنKAI1 انجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد در ۵۱/۲٪ نمونه ها بیان ژنKAI1 روشن و در ٤۸/۸٪ نمونه ها بیان این ژن خاموش بود. بطور جزئی تر تمامی نمونه های نرمال، ۶۰٪ نمونه های مرحله یک و ۷۵/۵٪ نمونه های توموری مرحله دو، برای ژن KAI1 دارای بیان بود. در حالیکه ۹۷/۳٪ نمونه های مراحل ۳ و٤ و ۹٤/۵٪ نمونه های توموری واجد متاستاز بیانی برای این ژن را نشان نداد. تجزیه و تحلیل آماری مقایسه بیان ژنKAI1 در چهار گروه نرمال، مرحله یک، مرحله دو و مرحله سه توموری نشان داد که اختلاف معنی داری در بیان ژنKAI1 در این گروه ها وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: ارتباط معناداری بین بیان نیمه کمی ژن KAI1 با متاستاز به گره‌های لنفاوی (فاکتور N) ($p=۰/۰۲$) و متاستاز ($p=۰/۰۰۰۰۱$) مشاهده شد.

واژه های کلیدی: ژن KAI1 ، متاستاز، سرطان کولورکتال، بیان ژن

دریافت: ۹٤/۳/۲۵ **پذیرش:** ۹٤/۹/۵

مقدمه

ژن KAI1 یا CD82، بعنوان یک ژن سرکوبگر متاستاز تومور شناخته شده است و متاستاز تومور را با مهار تحرک و تهاجم سلول های سرطانی اولیه سرکوب می‌کند [۲،۱]. بر اساس مطالعات، میزان بیان KAI1 در انواعی از تومورهای انسانی می‌تواند به عنوان یک مارکر مفید در عملکرد متاستاتیک تهاجم باشد. ارزیابی بیان KAI1 در دهه گذشته در طیف وسیعی از تومورها انجام و مشخص شد که KAI1 در همه بافت های نرمال بیان می شود ولی میزان بیان آن در بافت‌های مختلف متفاوت است. وجود میزان بیان KAI1در تومورهای بدخیم توپور[1]، با در نظر گرفتن تنظیم منفی و یا کاهش بیان آن در

[1] Solid Tumors

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

مراحل پیشرفته سرطان، می تواند پیش آگهی خوبی در بیماران سرطانی (از نظر کلینیکی) باشد [۳]. در برخی مقالات ارتباط معکوسی بین میزان بیان KAI1 و پیشرفت و تهاجم/متاستاز سلول های سرطانی در سرطان‌هایی مانند پروستات، مثانه، سینه، کولون، معده، روده بزرگ، گردن رحم، پستان، پوست، ریه، کبد، تیروئید، لوزالمعده و HCC[1] گزارش شده است [۳،٤]. از طرف دیگر برخی بررسی‌ها نیز ارتباط مستقیمی بین کاهش بیان KAI1 و موتاسیون P53 را در سلول‌ها نشان داده است [۷،۶،۵]. برخی مطالعات نیز از ژن KAI1 به عنوان یک ژن هدف برای القاء هیپوکسی نام برده‌اند [۸]. نتایج مطالعه ماریوس[2] و همکاران نشان داد که بیان پروتئین‌های JunB و KAI1/CD82 به ترتیب در ۷۳/۷٪ و ۸۰٪ تومورهای مبتلایان به HCC کاهش یافت ولی در ٤۸/۷٪ تومورها، p53 دارای بیانی بیش از حد بود [۵،۷]. بعبارت دیگر ارتباط معکوس بین میزان بیان ژن KAI1 و متاستاز در گره لنفاوی، بافت کبد[3]، یا صفاقی وجود دارد. در مطالعه دیگری، بیان پروتئین‌های GAL-3 و CD82/KAI1 به روش ایمونوهیستوشیمی در ۱۶۰ نمونه بافت توموری ریه NSCLC و ۲۰ نمونه از بافت ریه افراد طبیعی تشخیص داده شد و مشخص شد که بیان GAL-3 و CD82/KAI1 ممکن است با شروع، توسعه و متاستاز NSCLC ارتباط داشته باشد. بنابراین تشخیص ترکیبی از GAL-3 و CD82/KAI1 نقش مهمی در پیش بینی پیشرفت و پیش آگهی NSCLC دارد [۹]. بطور کلی گزارش‌ها نشان می دهد که بررسی میزان بیان ژن KAI1 در هر مرحله از سرطان بویژه در مرحله متاستاز بسیار مهم است، زیرا سطح بیان نسبتاً دقیق این ژن برای هر نوع سرطان اختصاصی است.

از طرفی سرطان کولورکتال شایع‌ترین بدخیمی دستگاه گوارش و چهارمین سرطان شایع در سراسر دنیا است. این بدخیمی دومین علت مرگ ناشی از سرطان در مردان و سومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان می‌باشد. عوامل محیطی و وراثتی متعددی باعث افزایش احتمال ابتلا به این بدخیمی‌ها است. بر اساس آمار گزارش شده از وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ایران سومین عامل مرگ و میر در ایران بعد از مرگ ناشی از بیماری‌های قلبی و تصادفات، سرطان است. در بین ۵ سرطان اول در ایران برای مردان، سرطان کلورکتال در جایگاه سوم و در زنان در جایگاه چهارم قرار دارد [۱۱،۱۰].

متاسفانه علیرغم بهبود سطح زندگی فرهنگی-اقتصادی در جمعیت ایرانی، درصد وقوع این بیماری افزایش نیز یافته است و در بیشتر موارد این بیماری خیلی دیر تشخیص داده می‌شود، به طوریکه بیشترین مرگ و میر ناشی از این سرطان به علت متاستاز تومور قبل از تشخیص بیماری است [۱۲،۱۰]. بنابراین لازم است توجه زیادی به تشخیص و درمان این بیماری معطوف گردد.

هدف از این پروژه تحقیقاتی، ارزیابی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در mRNA بافتی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال و ارتباط خاموش یا روشن بودن این ژن در هر یک از مراحل توموری و مقایسه نتایج با فاکتورهای پاتولوژیک بیماران به منظور تعیین یک مارکر مفید در شناسایی مراحل توموری بویژه 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.

روش کار

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

[1] Hepatocellular Carcinoma
[2] Marreiros
[3] Interahepatic

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

سایر محققین بر روی این ژن و نتایج حاصله با درنظر گرفتن خطاهای نوع اول و دوم، تعداد ۸۰ نمونه توموری و ۱٤ عدد نمونه نرمال (نمونه سالم مجاور تومور) تعیین گردید. این تعداد نمونه از میان بیماران غیرخویشاوند 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 مبتلایان به کولورکتال بدست 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 بصورت تازه و در شرایط ازت مایع به فریزر ۷۰°C- درجه سانتیگراد 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 است از: نامشخص بودن محل اولیه سرطان، ابتلای بیمار به سایر سرطان‌ها علاوه بر کولورکتال، دقیق نبودن اطلاعات تاریخچه یا گزارشات پاتولوژی بیماران و نسبت فامیلی 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 Intron، cDNA سنتز شد و در ادامه بیان ژن CD82 یا KAI1 با آزمایش RT-PCR بررسی گردید. پرایمر طراحی شده اختصاصی برای ژن KAI1 و ژن بتاکتین به عنوان استاندارد داخلی و ژن خانه‌دار[1] از مقاله منتشر شده توسط همین گروه تحقیقاتی استفاده شد [۱۳].

جهت آزمایش RT-PCR، مواد زیر در حجم ۱۲/۵ µL به میکروتیوب اضافه شد 1mM dNTPs (Fermentas Co., Burlington, Ontario, Canada), 0.2 µM specific oligonucleotide primers, 100 ng modified DNA, U/µL Taq polymerase (Hot start,Qiagen,Valencia, CA, USA). و میکروتیوب ها در شرایط دمایی ۹۵°C بمدت ۱۵دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل به صورت ۹۵°C، annealing ۵۷°C برای پرایمرهای اختصاصی زیر و ۷۲°C بمدت ۳۰ ثانیه برای هر دما و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C و در دستگاه ترموسیکلر مدل PeQLab, 96 universal gradient, UK thermal cycler قرار داده شد. توالی پرایمرها برای ژن های مورد نظر به شرح زیر بود:

KAI1_Forward: 5- CAT GAA TCG CCC TGA GGT CAC CTA-3
KAI1_Reverse: 5-GCC TGC ACC TTC TCC ATG CAG CCC-3
βactin_Forward: 5- AGA CGC AGG ATG GCA TGG G-3
βactin _Reverse: 5- GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3

سپس الکتروفورز محصول PCRبر روی ژل آگارز 1.5% انجام شد و روشن و خاموش بودن ژن در نمونه بررسی شد. مشاهده باند با طول 161bp 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 کولورکتال و بررسی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در بافت این بیماران، بر اساس داده های حاصل از پرونده بیماران شامل اطلاعات دموگرافی، کلینیکی، پاتولوژی و نیز نتایج خاصل از کارهای آزمایشگاهی با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های پیرسون، t-Test و X^2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از این مطالعه به ترتیب اطلاعات حاصل از دموگرافی و نتایج آزمایشگاهی، به شرح زیر است.

در این مطالعه عوامل دموگرافی و فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژی با توجه به اطلاعات موجود در

[1] House Keeping

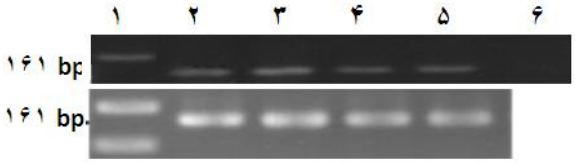
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

پرونده بیماران استخراج و طبقه‌بندی 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 سایز تومور و مرحله[1] تومور بر حسب سیستم TNM[2] بررسی شد.

نتایج نشان داد تعداد بیماران مورد بررسی در این پروژه، ۳۵ نفر زن (۴۳/۷٪) و ٤٥ نفر مرد (۵۶/۳٪) با میانگین سنی ۱۳/۹±۶۲/۸ سال و طیف سنی ٤٧ تا ٨٥ سال بود. هیچ یک از این افراد نسبت خویشاوندی با یکدیگر نداشتند و سن ۷۸/۷ درصد 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 تاییدشده توسط پاتولوژیست بر اساس سیستم مرحله بندی انکینگ[3] و متغیرهای TNM، نشان داد که از نطر مرحله بندی تومورها، ۱۲ نمونه در مرحله یک (Stage 1)، ۱۸ نمونه در مرحله دو (Stage 2)، ۱۷نمونه در مرحله سوم و ۱۹ نمونه در مرحله چهارم (Stage 4) و ١٤ نمونه نرمال بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد ارتباط معناداری بین نتایج حاصل از آزمایش نیمه کمی نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، با فاکتورهای درگیری غدد لنفاوی (p=۰/۰۲) و متاستاز تومور وجود دارد (p=۰/۰۰۰۰۰۱) .

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 ۸/۱ تا ۲ بود که نشان دهنده عدم وجود آلودگی پروتئین، کلروفرم و همچنین عدم تجزیه و تخریب مولکول‌های RNA است. از نظر کیفی نیز تمامی RNA استخراج شده از بافت‌ها دارای کیفیت خوبی بودند.

نتایج آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های KAI1 و بتا اکتین، نشان داد که بتا اکتین به عنوان یک ژن خانه‌دار در تمامی نمونه‌ها بیان می‌شود (شکل ۱ پایین)، در حالی که ژن KAI1 فقط در برخی از نمونه‌ها بیان داشت. در واقع در ۵۱/۲٪ نمونه ها بیان این ژن روشن و در ٤٨/٨٪ نمونه ها بیان این ژن خاموش بود (جدول ۱). بطور جزئی تر تمامی نمونه‌های نرمال، ۶۰٪ (۹ تا از ۱۲ نمونه) مرحله یک تومور، ۷۵/۵٪ نمونه‌های تومور مرحله ۲ دارای بیان برای ژن KAI1 بودند و ۹۷/۳٪ نمونه‌های مراحل ۳ و ٤ برای این ژن بیانی را نشان ندادند. همچنین ۹٤/۵٪ نمونه های تومور واجد متاستاز، بیانی برای این ژن را نشان نداد (شکل ۱ بالا).



شکل ۱. الگوی حاصل از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن KAI1 (شکل بالا) و ژن بتا اکتین (شکل پایین) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به ترتیب از چپ به راست: چاهک شماره ۱: مارکر وزن مولکولی bp 100، چاهک های ۲-۵ شکل بالا، بیان ژن KAI1 در چند تا از نمونه‌های بافتی بیماران و چاهک های ۲-۵ شکل پایین، بیان بتااکتین در چند نمونه توموری و نرمال. باندهای با اندازه 161bp، نشانه بیان این ژن می باشد. چاهک شماره ۶: کنترل منفی برای ژن KAI1.

از نقطه نظر درگیری غدد لنفاوی نیز از میان ۶۲ نمونه با مشخصه پاتولوژی N1 و N2، تنها ۲۹٪ (۱۸ نمونه) دارای بیان برای این ژن بودند (جدول ۱).

[1] Stage
[2] TNM Classification of Malignant Tumors. **T** describes the size of tumor. **N** describes nearby (regional) lymph nodes that are involved. **M** describes distant metastasis.
[3] Enneking Staging System

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

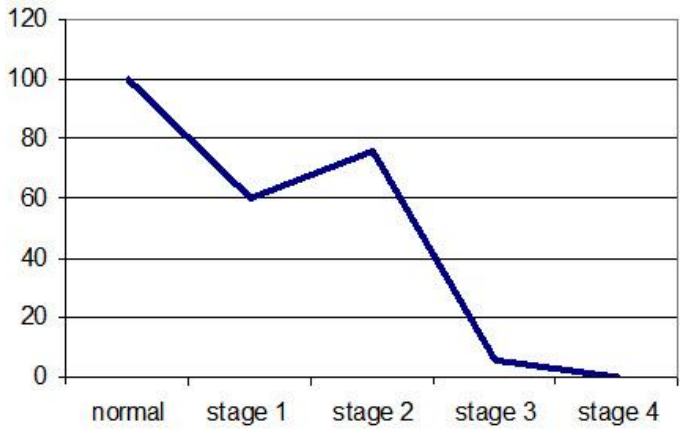
جدول ۱. ارتباط بین داده های نیمه کمی بیان ژن KAI1 و فراوانی پارامترهای دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال.

میزان $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

فاکتورهای کلینیکی (n)		بیان ژن KAI1		P-value
		روشن n (%)	خاموش n (%)	
جنسیت	مرد (n= ٤٥)	۲۲(٤٨/٨)	۲۳(٥١/۲)	۰/۶۵
	زن (n= ۳٥)	۱۹(٥٤/۲)	۱۶(٤٥/٨)	
سن	>٥۰ (n=۱۷)	۹(٥۲/۹)	۸(٤۷/۱)	۰/۸
	<٥۰ (n=۶۳)	۳۰(٤۷/۶)	۳۳(٥۲/٤)	
سایز تومور	<٥/۷ (n=٤۶)	۲٥(٥٤/۳)	۲۱(٥٤/۷)	۱
	>٥/۷ (n=۳٤)	۱۹ (٥٥/٨)	۱٥(٤٤/۲)	
Tفاکتور	T1(n=۱۲)	۷(٥٨/۳)	٥(٤۱/۷)	۰/٥
	T2 (n=۲۹)	۱۳(٤٤/٨)	۱۶(٥٥/۲)	
	T3 (n=۳۹)	۱٨(٤۶/۱)	۲۱(٥۳/۹)	
Nفاکتور	N0 (n=۱٨)	۱۲(۶۶/۶)	6(۳۳/٤)	۰/۰۲*=(N0 Vs N1)
	N1 (n=۳۷)	۱۰(۲۷)	۲۷(۷۳)	
	N2 (n=۲٥)	٨(۳۲)	۱۷(۶٨)	
متاستاز	M0 (n=٥٤)	۳٨(۷۰/۳)	۱۶(۳۰)	۰/۰۰۰۰۰۱*
	M1 (n=۱٨)	۱(٥/٥)	۱۷(۹٤/٥)	
	MX (n=٨)	۶(۷٥)	۲(۲٥)	
مرحله	۰ (n=۱٤)	۱٤(۱۰۰)	۰(۰)	۱
	۱ (n=۱۲)	۹(۷٥)	۳(۲٥)	
	۲ (n=۱٨)	۱۷(۹٤/٥)	۱(٥/٥)	
	۳ (n=۱۷)	۱(٥/٨)	۱۶(۹٤/۲)	
	٤ (n=۱۹)	۰(۰)	۱۹(۱۰۰)	

آنالیز آماری جهت یافتن ارتباط بین نتایج RT-PCR و اطلاعات دموگرافی و پاتولوژی بیماران نشان داد که در مقایسه بیان ژن KAI1 در چهار گروه نرمال، Stage1, Stage2, Stage3 و به کمک تست Post Hoc نشان داد که اختلاف معنی داری در بیان ژن KAI1 در گروه های نرمال، Stage1، Stage2، و Stage3&4 وجود دارد ($p<۰/۰٥$). بر اساس نتایج سایر محققین، انتظار این است که بیان ژن KAI1 در سرطان‌های توموری مانند مری، معده و... به ترتیب از مرحله نرمال به Stage1، Stage2 و Stage3 کمتر شود و در Stage4 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 ۲) که نشان می‌دهد بیان این ژن با شیب یکسانی در مراحل مختلف توموری از مرحله نرمال به سمت مراحل دیگر تغییر کرده است و در در مراحل ۳ و ٤ تقریباً بیانی برای این ژن دیده نمی‌شود. با تناسب تعداد نمونه‌ها در مراحل مختلف توموری از جمله مراحل یک و دو، شکست موجود در این نمودار خطی برطرف خواهد شد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]



شکل۲. ارتباط بیان نیمه کمی ژن KAI1 در مراحل مختلف سرطان وبافت نرمال را نشان می‌دهد. این ارتباط خطی بوده و نشان می‌دهد بیان ژن KAI1 با شیب یکسانی از مرحله نرمال به سمت مراحل دیگر تغییر کرده است، طوری که در مراحل ۳ و ٤ تقریباً بیانی دیده نمی شود. با تناسب تعداد نمونه‌ها در مراحل مختلف توموری از جمله مراحل یک و دو، شکست موجود دراین نمودار خطی برطرف خواهد شد. محور افقی، نشان دهنده وضعیت مراحل نمونه های توموری است و محور عمودی فراوانی بیان ژن KAI1 را نشان می دهد.

برای آنالیز داده‌های RT-PCR با سایر فاکتورهای بالینی، همراهی بین داده‌های نیمه‌کمی حاصل از RT-PCR برای ژن KAI1 و عوامل خطر 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 های t تست، پیرسون و کای‌دو انجام شد ($p<۰/۰۵$). 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 ($p=۰/۰۰۰۰۰۱$) و درگیری غدد لنفاوی ($p=۰/۰۲$) مشاهده شد (جدول ۱).

بحث

در خصوص همراهی بیان ژن KAI1 با عوامل خطر بالینی در سرطان کولورکتال، مطالعات اندکی صورت گرفته است و داده‌های محدودی در اختیار است که این موضوع به نوبه خود اهمیت این مطالعه را نشان می دهد. از طرف دیگر چون سرطان یک بیماری پیچیده و چندعاملی است، سیستم‌های طبقه‌بندی سنتی سرطان با چالش‌های زیادی روبه رو شده و نیازمند داده‌های دقیق‌تر و با جزئیات بیشتر می‌باشد. همچنین متاستاز، بعنوان یک فرایند بسیار پیچیده، شامل انواعی از عوامل مثبت و منفی است که در خصوص بررسی مولکولی پیشرفت و توسعه متاستاز اطلاعات ضعیفی موجود است. بقای طول عمر اکثر بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نیز پس از جراحی گاهی کمتر از ۵ سال است. بنابراین بررسی کامل و جامع در خصوص این سرطان ضروری است [۱۵،۱٤]. نتایج این مطالعه تحت عنوان بررسی نیمه‌کمی بیان ژن KAI1 در بافت‌های توموری و نرمال، که دومین بررسی در این زمینه در ایران می‌باشد، نشان داد که ژن KAI1 در ۵۱/۲٪ نمونه‌ها روشن و در ٤۸/۸٪ نمونه‌ها خاموش بود. میزان بیان ژن KAI1 با افزایش مراحل توموری نسبت عکس دارد و اختلاف معنی‌داری در بیان ژن KAI1 در گروه‌های نرمال، Stage1، Stage 2، و Stage3&4 وجود دارد ($p<۰/۰۵$). نتایج مطالعه قبلی توسط گروه تحقیقاتی مطالعه حاضر بر روی نمونه‌های توموری سرطان بافت سنگفرشی مری نشان داد که ژن KAI1 در ۶۹/۲٪ نمونه‌ها روشن و در ۳۰/۸٪ نمونه‌ها خاموش بود [۱۱]. این نتایج، در راستای

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

مطالعات مشابه انجام شده توسط سایر محققین است که نشان دادند با پیشرفت بیماری، بیان در مرحله متاستاز رو به کاهش می گذارد اما اندازه میزان بیان در هر نوع از سرطان با نوع دیگر متفاوت است[۱۶،۱۷،۱۸]. به مختصری از مطالعات بشرح زیر اشاره می‌شود: فوشینگ لو[1] با مطالعه بیماران تایوانی مبتلا به مراحل مختلف سرطان دهانه رحم و آندومتر با روش های Quantitative Real-Time PCR و ایمنوهیستوشیمی نشان داد بیان ژن KAI1 و پروتئین آن با پیشرفت بیماری رو به کاهش است و در مرحله متاستاز اصلاً بیانی ندارد [۲۰،۱۹]. پل جکسون[2] با بررسی رده سلولی بیماران مبتلا به سرطان پروستات و مثانه با روش RT-PCR نشان داد با پیشرفت بیماری میزان بیان این ژن کاهش می‌یابد. نتایج مطالعات او در سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۶ بر روی بیماران مبتلا به سرطان های پروستات و مثانه با روش ایمنوهیستوشیمی حاکی از این است که با پیشرفت بیماری میزان بیان پروتئین KAI1 کاهش می یابد [۱۳،۷،۶]. استارک[3] با مطالعه کمی بیان ژن KAI1 بر روی مبتلایان به سرطان پستان در مرحله متاستاز به مغز، اعلام کرد که در نمونه‌های متاستاز بیانی برای این ژن مشاهده نشد، در حالی که در نمونه‌های غیرمتاستاتیک، بیان کمی از این ژن نشان داده شد [۲۱]. مطالعه مالیک[4] و همکاران با عنوان بررسی میزان بیان KAI1 در مراحل رونویسی و ترجمه به منظور یافتن اهمیت آن در پیش آگهی سرطان پستان، نشان داد ارتباط معکوس بین بیان KAI1 و پیشرفت تومور می‌تواند این ژن را به عنوان یک مارکر پیش آگهی قوی معرفی کند.

اگرچه در این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین بیان KAI1 و grade های مختلف تومور مشاهده نشد (P = 0.064)، همبستگی قابل توجهی بین میزان بیان KAI1 و مراحل سرطان پستان (بر اساس سیستم TNM) در بیماران مشاهده شد (p=۰/۰۴۵). همچنین بقای عمر ۱۰ سال و بالاتر در بیماران دارای میزان بیان بالایی از KAI1 نسبت به بیماران دارای سطح بیان پایین یا حتی بیان منفی این ژن مشاهده شد (p=۰/۰۱۳۶) [۱]. موئز[5] و همکاران به بررسی نیمه کمی تغییرات بیانی ایزوفرم‌های دو ژن سرکوبگر متاستاز KAI1 و KiSS1 در ۲۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۲۵ فرد نرمال پرداختند و نشان دادند که بیان mRNA ژن‌های KAI1 و KISS1 در مقایسه با بافت سالم در افراد نرمال بطور قابل توجهی کاهش یافت [۲۲].

مورر[6] 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٪ بیشتر است. این افزایش ۱/۹ برابر میانه (p<۰/۰۰۱) 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 ٤ تومور بود (به ترتیب p<۰/۰۳ و p<۰/۰۱۵) [۲۳]. از مطالعات انجام شده در ایران می‌توان به دو مورد زیر پرداخت: مطالعه بررسی سمیت cisplatin بر روی سلول ها و متاستاز سل لاین MCF-7 مربوط به سرطان پستان که توسط مختاری و همکاران منتشر شد. آنها به بررسی کاهش بیان ژن‌های KAI1/TBP با تکنیک کمی Real time نشان دادند که ماده cisplatin باعث کاهش بیان این ژن‌ها می‌شود [۲٤]. مورد دیگر، ارزیابی نیمه کمی بیان ژن KAI1 در مراحل مختلف توموری بیماران ایرانی مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری است که نتایج آن توسط محمدگنجی و همکاران منتشر شد. در این بررسی ژن KAI1 در ۶۹/۲٪

[1] FU-Shing Liu
[2] Paul Jackson
[3] Stark
[4] Malik
[5] Mooez
[6] Maurer CA

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

نمونه‌ها روشن و در ۳۰/۸٪ نمونه‌ها خاموش بود [۱۱]. 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 بود و لازم بود پرکردن صحیح پرسشنامه توسط بیماران تحت نظر یک پرستار آموزش دیده انجام شود. بدلیل چندعاملی بودن پدیده سرطان و پیچیدگی شدید مولکولی مراحل سرطان بویژه 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 بعنوان اولین مطالعه در جمعیت ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال می‌باشد و نتایج حاصله در راستای سایر مطالعات مشابه در سطح جهان است، می توان تاکید کرد که کاهش/ فقدان بیان ژن KAI1در 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 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 به منظور محدودکردن گسترش سلول‌های توموری مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج پروژه مصوب با شماره ۹۰۰۰۶۷۹۹ و تحت حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران[1] می‌باشد که کارهای عملی و آزمایشگاهی آن در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک انجام شد که از هر دو سازمان مذکور قدردانی می‌گردد. همچنین 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 داشتند، قدردانی نمایند.

[1] Iranian national Science Foundation: INSF

References

1- Malik FA, Sanders AJ, Jones AD, Mansel RE, Jiang WG. Transcriptional and translational modulation of KAI1 expression in ductal carcinoma of the breast and the prognostic significance. Int J of Mol Med. 2009 Feb; 23(22):273-8.

2- Miranti CK. Controlling cell surface dynamics and signaling: How CD82/KAI1 suppresses metastasis. Cell Signal. 2009 Feb; 21(2):196-211.

3- 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 Nov; 59(22):5724-31

4- Friess H, Guo XZ, Tempia-Caliera AA, Fukuda A. Differential expression of metastasis-associated genes in papilla of vater and pancreatic cancer correlates with disease stage. J Clin Oncol. 2001 May; 19(9):2422-32.

5- Guo W, Dong Z, Guo Y, Kuang G, Yang Z. Detection of promoter hypermethylation of the CpG island of E-cadherin in gastric cardiac adenocarcinoma. Eur J Med Res. 2009 Sep; 14(10):453-8.

6- Jackson P, Ow K, Yardly G, Delporado W, Quinn DI, Yang JL, et al. 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.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

7- Marreiros A, Dudgeon K, Dao V, Grimm MO, 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 Jan; 24(4):637-49.
8- Kim B, Boo K, Lee JS, Kim KI, Kim WH, Cho HJ, et al. Identification of the KAI1 metastasis suppressor gene as a hypoxia target gene. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Feb; 393(1):179-84.
9- Wu SW, Yu L, Zhou L, Cheng ZN, Tao YS. Expression of Gal-3 and CD82/KAI1 proteins in non-small cell lung cancer and their clinical significance. Chinese J of Oncol. 2013 Feb; 35(2):124-8.
10- Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Parkin DM.. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. Asian Pac J Cancer Prev. 2005 Jul-Sep; 6(3):359-63.
11- Mohammad Ganji S, Mahboodi S, Rastgar-Jazii F, Jahanzad E. 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. Urmia Med J. 2015 Feb; 25(12):1119-27.
12- Fathi M, Yavari K, Taghikhani M, Maragheh MG, Mesbah-Namin SA, Babaei MH. Demonstration of dose dependent cytotoxic activity in SW480 colon cancer cells by ^{177} Lu-labeled siRNA targeting IGF-1R. Nucl Med Biol. 2013 May; 40(4):529-36.
13- 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. Oncol Reports. 2006 Jul; 16:1267-72.
14- Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. Nature. 2002 Aug; 418(6900):823.
15- Miyazaki T, kato H, Shitara Y, Yoshikawa M, Tajima K, Masuda N. Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer. 2000 Sep; 89(5): 955-62.
16- 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 Aug; 79(4):349-55.
17- Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Li ZG, Hong T, Miyake M. Imamura M. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 1999 Mar; 79(7-8):1168-73.
18- Xiaohong Y, Lisa LW, Careen T, Ebecca S, Susette M, Marc EL. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. Cancer Res. 2001 Jul; 61:5284-8
19- 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 Nov; 159(5):1629-34.
20- FU-Shing L. KAI1 gene relates to squamous cell carcinoma of the larynx. Chinese Med J. 2003; 116(9):1307-1307.
21- Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. J Cancer Res Clin Oncol. 2005 Mar; 131:191-8.
22- Mooez S, Malik FA, Kayani MA, Rashid R, Zahid A, Khan A. Expressional alterations and transcript isoforms of metastasis suppressor genes (KAI1 and KiSS1) in breast cancer patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2011; 12(10):2785-91.
23- Maurer CA, Graber HU, Friess H, Beyermann B, Willi D. Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. Surgery. 1999 Nov; 126(5):869-80.
24- Mokhtari MJ, Akbarzadeh A, Hashemi M, Javadi G, Mahdeian R, Mehrabi MR. Cisplatin induces up-regulation of KAI1, a metastasis suppressor gene, in MCF-7 breast cancer cell line. Trop J of Pharm Res. 2012 Aug; 11(4): 523-9.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]