مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال سوم، شماره سوم، پیاپی یازدهم، زمستان ۱۳۹۳ (۱۲-۱)

بررسی میزان بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در سرطان در چند رده سلول سرطانی مختلف به روش RT-PCR

پروین بلوری[۱*]، رضا حاجی حسینی[۲]، رضا شیخ‌نژاد[۳]، محسن همدانی[۴]، مهناز سجادی[۵]، زهرا فرساد[۶]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی گرایش بیوشیمی، دانشگاه پیام نور
۲. استاد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور
۳. دکترای بیوشیمی، دانشگاه جورجیای آمریکا
۴. دکترای تخصصی سم شناسی، دانشگاه شهید بهشتی
۵. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، زیست مولکولی از دانشگاه امام حسین(ع)
۶. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۴، تاریخ تصویب: ۹۳/۱۰/۹)

چکیده

فرم تغییریافته و یا جهش‌یافته ژن‌ها یا همان پروتو انکوژن‌ها، مسئول ترویج رشد و تکثیر کنترل‌نشده سلولی می‌باشند. تجمع جهش در ژن‌های مختلف و خاص، در طول زمان منجر به سرطان می‌شود. الگوی بیان ژن (امضا مولکولی)، برای هر کلاس از سلول‌های توموری اختصاصی است. این مقاله آخرین روش نظارت بر بیان یک پانل از ژن‌های خاص سرطانی را شرح می‌دهد. روش real-time PCR براساس عملکرد کمی رنگ SYBR GReen، به‌طور وسیعی برای پروفایل ژن استفاده می‌شود. این روش آسان و مقرون به‌صرفه است و تنها بر روی ژن‌های مورد نظر تمرکز می‌کند. در این مطالعه میزان بیان ژن‌های موردنظر ما در پنج رده سلول‌های سرطانی انسانی به طور کمی اندازه‌گیری شد. ما ژن بتا-اکتین را به‌عنوان ژن مرجع در نظر گرفتیم. سلول‌ها لیز شدند و mRNA با استفاده از کیت RNA Purification و ستون‌های spin QIAGEN RNeasy استخراج گردید. رشته اول cDNA با استفاده از کیتHigh capacity cDNA Reverse transcription سنتز و میزان بیان ژن‌ها به وسیله دستگاه real-timePCR AB step one plus اندازه گیری شد.به طور خلاصه بیان ژن p53 در هر دو رده سلول سرطان پستان، MCF7 و T47-D و سرطان ریه، A549 بالا بود. بیان src در رده سرطان پروستات، PC3 بالاتر بود. همین‌طور SKOV3 (سرطان تخمدان) بیان بالای ژن HER-2 را نشان داد. نتایج به وضوح نشان می‌دهد که الگوی بیان این پانل از ژن‌ها، در هر رده سلولی تقریباً منحصر به فرد است.

واژه‌های کلیدی: سرطان، ژن، real-time PCR، رده سلول سرطانی، پروفایل بیان ژن

Examined the expression of several genes involved in cancer in several different cancer cell lines by RT-PCR

P. Boloori[1]*, R. Haji Hosseini[2], R. Shekh-Nejad[3], M. Hamedani[4], M. Sajadi[5], Z. Farsad[6]

1. M.Sc. of Biochemistry, Department of Biology, Payamnoor University, Tehran, Iran
2. Professor of Biochemistry Department, Payamnoor University
3. Ph.D. of Biochemistry, University of Georgia
4. Ph.D. of Toxicology, Shahid Beheshti University
5. M.Sc. of Molecular Biology, Emam Hosein University
6. M.Sc. Student, Genetic Department, Tarbiat Modares University

(Received: Jun. 25, 2014; Accepted: Dec. 30, 2014)

Abstract

The altered or mutated forms of genes known as proto-oncogenes are responsible for promoting cell growth and uncontrolled cell proliferation. An accumulation of many mutations in different and specific genes,over time is required to cause cancer. The pattern of gene expression, also called molecular signature is unique to a particular class of tumor or tumor cell. This paper describes the latest technique for monitoring the expression of a panel of cancer-specific genes. The PCR technique combines the quantitative performance of SYBR® Green-based real-time PCR is widely used for gene profiling. This technique is cost-effective, easy-to-use, and focuses only on the genes that you desire. In this study the expression of our target genes were quantitatively determined in five human cancer cell lines. We selected gene β-actin as our reference gene. Cells were lysed and the mRNAs were extracted using the RNA Purification Kit and cleaned up with Qiagen RNeasy spin columns. The first-strand cDNA was synthesized according to the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protocol. RT-PCR were performed with Gene Expression Assays in an AB step one plus Sequence Detection System. Briefly the expression of p53 was high in both breast cancer cell lines, MCF7, T47-D and lung cancer cells, A549. Src expression was higher in prostate cell line, PC3 and lung cancer cells, A549. Meanwhile SKOV3 (ovarian cancer cell line) showed high expression of her-2 gene. The results clearly show that the expression pattern of this panel of genes was unique to almost every cell line examined.

Keywords: cancer, genes, real-time PCR, cancer cell, gene expression profile.

* نویسنده مسئول: E-mail: parvinbolori@yahoo.com

مقدّمه

سرطان امروزه یکی از شایع‌ترین و مهلک‌ترین بیماری‌ها است. آمار نشان می‌دهد که سرطان به نوعی بیش از ۱/۳ جمعیت را گرفتار می‌کند، علت بیش از ۲۰ درصد مرگ‌ها است و در کشورهای پیشرفته بیش از ۱۰ درصد کل هزینه مراقبت‌های پزشکی را به خود اختصاص می‌دهد. سرطان در صورتی که در مراحل پیشرفته تشخیص داده شود، غالباً کشنده است. تشخیص زودرس و درمان به‌موقع، اهمیت حیاتی دارد و شناسایی افراد در معرض خطر ابتلا به سرطان پیش از ایجاد تومورو متاستاز[1] آن، یکی از اهداف مهم تحقیقات سرطان است (Version 3.5.2. Bethesda, 2011).

در سرطان، به دلیل پیدایش مجموعه‌ای از تغییرات ژنی پایه در سلول، رفتار سلولی دستخوش تغییر و انحراف می‌شود. سلول سرطانی، در واقع از منظر رفتار و محتویات سلولی، بیشتر به سلول نابالغ[2] شباهت دارد. انواع متفاوتی از سلول‌های بدن می‌توانند سرطانی شوند. سلول سرطانی از جهات زیادی با سلول سالم یا غیرسرطانی تفاوت آشکار دارد. این تغییرات بر کنترل رشد سلول، شکل، ارتباطات بین سلولی، ترکیبات غشای[3] سلولی، ساختار اسکلت سلولی[4]، ترشح[5] برخی پروتئین‌ها[6]، بیان ژنی[7]، مرگ سلولی و ... اعمال می‌شود. سرطان بیماری واحدی نیست، بلکه بیشتر نامی است که برای توصیف انواع نئوپلازی‌ها[8] به کار می‌رود. نئوپلازی نوعی روند بیماری است که با تکثیر کنترل نشده سلولی، منجر به ایجاد یک توده یا تومور می‌شود. سلول‌ها با گذر از چرخه سلولی و انجام میتوز[9] افزایش می‌یابند، در حالی که فرسایش به علت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، از طریق نوعی روند طبیعی قطعه قطعه شدن DNA و خودکشی سلولی که به آن آپوپتوز[10] اطلاق می‌شود، سلول‌های غیرعادی و معیوب را از یک بافت خارج می‌کند. در نئوپلازی این تعادل از بین رفته، آپوپتوز صورت نمی‌گیرد و سلول‌ها به نوعی نامیرا می‌شوند. سلول‌های عادی در محیط کشت تا زمانی که به تراکم خاصی برسند تکثیر می‌یابند و سپس این تکثیر متوقف شده و وارد فاز Go می‌شوند این خصوصیت، مهار تکثیر وابسته به تراکم[11] نامیده می‌شود. یکی از عوامل مؤثر بر این خصوصیت، میزان در دسترس بودن فاکتورهای رشد خارج سلولی برای سلول است. سلول‌های سرطانی با کاهش نیاز خود به این فاکتورها به تکثیر بی‌رویه خود ادامه می‌دهند و این خصوصیت مهاری در آنها وجود ندارد. بعضی از سلول‌های سرطانی با ساختن این فاکتورها تکثیر خود را القاء می‌نمایند. سلول‌های سرطانی معمولاً کمتر از سلول‌های عادی همرده خود توسط ارتباطات سلول–سلول و سلول ماتریکس کنترل می‌شوند. چسبندگی سلول‌های سرطانی به دلیل ایجاد اختلال در ساخت فاکتورهای چسباننده سلولی نظیر E-cadherin کاهش می‌یابد و به همین دلیل خصوصیات مورفولوژیکی و سایتواسکلتی آنها تغییر می‌یابد. همچنین به دلیل عدم وجود اتصالات محکم با سلول‌های همسایه یا ماتریکس خارج سلولی، این سلول‌ها توانایی حمله و متاستاز به نقاط دیگر را پیدا می‌کنند (National Center for Health Statistics, 2012). همزمان با رشد و تکثیر سلولی نیاز سلول‌ها به ذخایر اکسیژن و مواد غذایی افزایش می‌یابد. سلول‌های سرطانی فاکتورهای رشدی را ترشح می‌کنند که با تحریک رشد و تکثیر سلول‌های جدار داخلی رگ‌ها، سبب تولید رگ‌های جدید در بافت سرطانی می‌گردد. رگ‌های جدید علاوه بر رفع نیاز سلول‌ها به این ذخایر، به

1. Metastasis
2. Immature
3. Membrane
4. Cytoskeleton
5. Discharge
6. Proteins
7. Gene Expression
8. Neoplasia
9. Mitosis
10. Apoptosis
11. Density-dependent inhibition

سلول‌های سرطانی امکان ورود به چرخه عمومی خون و آغاز فرآیند متاستاز را می‌دهد. خصوصیت دیگر سلول‌های سرطانی عدم روی دادن پدیده تمایز[1] در آنهاست. بسیاری از سلول‌ها بعد از تمایز، قابلیت تکثیر سلولی را از دست می‌دهند. اما در بسیاری از سرطان‌ها نظیر لنفوماها و لوکمیاها، این پدیده در سلول‌های سرطانی در مراحل اولیه متوقف می‌گردد و سلول‌ها به تکثیر بی‌رویه خود ادامه می‌دهند. همچنین مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوزیس)، جزیی جدایی‌ناپذیر از فرآیند تمایز می‌باشد. بسیاری از سلول‌های تمایز یافته بعد از طی عمر تعیین‌شده خود، وارد مرحله آپوپتوز می‌شوند. در حالی که در سلول‌های سرطانی آپوپتوز اتفاق نیفتاده و این سلول‌ها نامیرا می‌گردند. سرطان زمانی رخ می‌دهد که بیان ژن‌ها از حالت عادی خارج شده و دستخوش تغییر شود. مطالعات زیادی صورت گرفته است که نشان می‌دهد، تعیین پروفایل ژنی می‌تواند نقش مؤثری در گروه‌بندی دقیقی از سرطان‌ها داشته باشد. تفاوت بین Acute myeloid و Acute lymphoblastic Leukaemia به این طریق مشخص شد. Diffuse Large B Lymphoma نیز با تعیین پروفایل ژنی تشخیص داده شد. منبع دیگری که فوق‌العاده در گروه‌بندی مؤثر است و در دانشگاه میشیگان[2] به وجود آمد، Oncomine Cancer Profiling Database می‌باشد. روش Unsupervised Analysis نیز به وسیله Brown & Boststein مورد استفاده بوده است. از میکرو RNA (miRNA) هم به جای استفاده از کل RNA برای تعیین پروفایل استفاده شده‌است. این مطالعه که در بخش بیولوژی مولکولی شرکت تحقیقاتی مهندسی توفیق دارو انجام گرفت، با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمی با رنگ سایبرگرین، نسبت بیان ژن‌های دخیل در سرطان p53-KIT-Src-her2--bcl2 mTor-vegf-PI_3K نسبت به ژن β-actin (ژن مرجع)، در ۵ رده سلول سرطانی با منشأ انسانی (سرطان ریه) A549– (سرطان پروستات) PC_3– (سرطان‌سینه) T47-d وMCF-7–(سرطان تخمدان) $SKOV_3$ که امروزه شیوع زیادی داشته‌اند، مشخص شد (Wang & Wang, 2009).

مواد و روش‌ها

محققان یافته‌اند که ژن SRC در بسیاری از انواع سرطان‌های انسانی بیان می‌شود، به ویژه در سرطان پستان و ۸ پروتوانکوژن Bcl-2, KIT, Her2, P53, VEGF, SRC, mTOR, PI3K، قبلاً کم و بیش توسط محققین مورد مطالعه قرار گرفته، و مشخص شده که هر کدام در ایجاد سرطان نقش دارند.با شناخت میزان بیان این ژن‌ها در سل لاین‌های سرطانی مختلف می‌توان ابزار مطالعه میزان تغییرات ژنی را در اختیار محققین قرار داد. از این رو هنگامی که محققی هدفش مطالعه بر روی ژن خاصی است و یا داروی هدفمندی برای درمان سرطان ساخته است می‌تواند سل لاینی را انتخاب کند که میزان بیان ژن مورد مطالعه قبلاً در آن اندازه‌گیری شده و با افزایش فعالیت ژن و یا مهار آن می‌تواند کارایی داروی ساخته شده را بیازماید و به هدف خود که درمان سرطان است برسد (Browne & Crown, 2011).

موتاسیون و یا حذف ژن p53 به عنوان ژن سرکوب‌گرتومور می‌تواند یکی از دلایل سرطان در بعضی از بیماران سرطانی باشد. مکانیسم دقیق بیان ژن Src در سرطان‌های انسانی هنوز نامشخص است. بسیاری از مطالعات در بررسی مکانیسم‌هایی که از طریق آن Src مروج سرطان است نشان می‌دهد که این ژن نقش مهم و متمایز را در ترویج شروع، پیشرفت و متاستاز سرطان از طریق تغییرات متعدد در مسیرهای سیگنالینگ برعهده دارند. همچنین افزایش میزان بیان ژن HER-2 که در

1. Defferntiation
2. Michigan

تعدادی از سرطان‌ها به ویژه سرطان پستان و رحم گزارش شده است باعث گردیده که این ژن حائز اهمیت شود. تغییرات در ساختار وافزایش فعالیت ژن KIT که یک پروتوانکوژن است موجب پاتوژنز ماستوسیتوز سیستمیک، القای رشد سلولی و افزایش عمر سلول به‌وسیله جلوگیری از آپوپتوز می‌شود. افزایش بیان ژن BCL2 باعث مهار آپوپتوز طبیعی در این سلول‌ها است. مکانیسم‌های تغییر تنظیم، مسئول تولید زیاد پروتئین Bcl2 هستند که در بسیاری از تومورهای سفت از قبیل سرطان‌های پروستات[1]، پستان[2] و ریه وجود دارند. سرطانی که بتواند VEGF را بیان کند قادر به رشد و متاستاز خواهد بود. بیان VEGF می‌تواند باعث بیماری عروق در شبکیه چشم و دیگر قسمت‌های بدن شود.

mTOR باعث ادغام پاسخ طیف گسترده‌ای از سیگنال‌های (مواد غذایی، هورمون‌ها، عوامل رشد و تنش‌های سلولی) برای تنظیم رشد سلولی، سوخت‌وساز بدن و زنده ماندن است. افزایش بیان این ژن موجب اخلال در سیگنالینگ سلول شده و ممکن است باعث ایجاد بسیاری از سرطان‌ها گردد (Wheeler *et al*., 2009). بیان افزایش یافته ژن PI3K موجب تخریب غشاء پایه، نوزایی عروق و مهاجرت سلولی می‌گردد. از این‌رو در ایجاد بسیاری از سرطان‌ها دخیل است (Bethesda, 2012).

این تحقیق با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمّی به روش رنگ سایبرگرین و دستگاه Real Time-PCR انجام شد. مراحل انجام کار به ترتیب: ۱. استخراج RNA از سلول‌های سرطانی؛ ۲. تهیه cDNA از روی RNA؛ ۳. انجام Real-Time PCR جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژن؛ ۴. اندازه‌گیری درصد بیان ژن در مقایسه با ژن کنترل با استفاده از نرم‌افزا ر طراحی شده (Pfaffl, 2010).

1. Prostate
2. Breast

استخراج RNA

در حدود ۵-۴ میلیون سلول کشت داده شده در بخش کشت سلول را شمرده و با دور rpm ۱۳۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم تا رسوب سلول تشکیل شود (animal cell culture protocols Qiagen, 2013).

با استفاده از کیت RNeasy mini kit شرکت Qiagen، RNA هر یک از سلول‌ها استخراج و برای مراحل بعد در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شدند (RNeasy mini kit protocol Qiagen).

پس از استخراج RNA از سلول موردنظر، لازم است که غلظت RNA به دست آمده را بسنجیم. با استفاده از نسبت A260/A280 میزان ناخالصی محاسبه می‌شود و هر چه میزان این نسبت به ۱/۸ نزدیک‌تر باشد، میزان ناخالصی نیز کمتر خواهد بود (General Guidelines for Working with RNA, Kirsanov *et al*., 2010).

ساخت cDNA

ابتدا باید میزان RNA ای که باید برای ساخت ۱۰۰ میکرولیتر cDNA مورد استفاده قرار گیرد، محاسبه شود. در اینجا احتیاج به ۲ ماکروگرم/ ماکرولیتر می‌باشد که به این صورت محاسبه می‌شود. عدد X مقدار ماکرولیتر مورد نیاز ما از RNA می‌باشد.

$$\frac{2\frac{\mu g}{\mu l}}{OD260} = X\ \mu l$$

با استفاده از کیت fast transcription kit protocol شرکت Qiagen از روی RNA به دست آمده از هر رده سلولی، cDNA را سنتز می‌کنیم. طبق پروتوکل، ۱ میکروتیوب ۰/۵ میکرولیتری برداشته و محلول‌های زیر را در حجم‌های تعیین شده در آن می‌ریزیم:

5X Reaction Buffer: 20 µl
Random Hexzamer Primer: 0.5 µl
dNTP Mix: 10 µl
RiboLock™ RNase inhibitor: 2.5 µl

M-MuLVReverseTranscriptase: 2.5 µl
RevertAid™
DTT: 10 µl
BSA: 2.5 µl
DEPC-treated water: 2 µl

مجموع حجم‌های فوق ۵۰ میکرولیتر است. میزان حجم RNA محاسبه شده را از ۵۰ کم کرده و به اندازه نتیجه به دست آمده، به RNA آب DEPC اضافه می‌کنیم، تا حجم آب و RNA جمعاً ۵۰ میکرولیتر شود. سپس آن را جهت ساخته شدن cDNA، در دستگاه ترمال سایکلر قرار می‌دهیم.

دستگاه ترمال سایکلر مورد استفاده در این پژوهش ساخت شرکت Biotech می‌باشد و برنامه‌ای که برای انجام RT-PCR به آن داده شده به صورت زیر است:

Real CDNA in a PCR thermal cycler:
26^0C for 10 min (primer anealing)
42^0C for 45 min (reverse transcription)
75^0C for 10 min (inactivated the enzyme)

پس از ساخت cDNA، برای اطمینان از ساخته شدن آن و درجه خلوص آن، غلظت cDNA را با روش اسپکتروفوتومتری که در بالا ذکر شد، تعیین می‌نماییم (fast transcription kit protocol, Qiagene).

دمای اتصال پرایمر به الگو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، چون در ایجاد محصول اختصاصی اثر می‌گذارد. Tm درجه حرارتی است که نیمی از پرایمرها به DNA الگو هیبرید می‌شوند و آن از طریق فرمول زیر محاسبه می‌گردد:

$$Tm=[4\times(C+G)]+[2\times(A+T)]$$

در این فرمول C + G تعداد نوکلئوتیدهای G و C در توالی پرایمر و A+T تعداد نوکلئوتیدهای A و T در آن است. درجه حرارت مرحله اتصال در آزمایش PCR با محاسبه Tm برای هر پرایمر و کم کردن ۱ تا ۲ درجه سانتی‌گراد از آن تعیین می‌شود، بنابراین برای به‌دست آوردن دقیق Tm باید آن را به طور تجربی آزمایش کرد و این درجه حرارت را برای پرایمرها اپتیمایز کرد (primer Tm estimation methods: open wet ware, 2009).

Real Time PCR

اصول حاکم بر این تکنیک همانند سایر تکنیک‌های PCR است. ولیکن به جای DNA از RNA به عنوان الگوی شروع واکنش استفاده می‌شود. مراحل کار بدین صورت است که ابتدا cDNA مورد نظر ساخته می‌شود و سپس به کمک پرایمرهای اختصاصی تکثیر می‌یابد (جدول ۱).

پرایمرها را از ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج کرده، با استفاده از کیت Hot Taq EvaGreen qPCRMix ساخت شرکت sinaclone، ترکیبات زیر را در مقادیر تعیین شده، به هر چاهک اضافه می‌کنیم. مجموع این مقادیر ۲۰ میکرولیتر است.

پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه:

- از هر پرایمر پیشرو و پیرو ۱ میکرولیتر
- cDNA: ۲ میکرولیتر
- Power SYBER Green PCR Master Mix: ۱۰ میکرولیتر
- DEPC Water: ۶ میکرولیتر

در این پژوهش از روش آستانه نسبی یا مقایسه نسبی و دستگاه Step One Pls Real time PCR استفاده شده است (Hot Taq EvaGreen qPCRMix protocol sinaclone). پس از به دست آوردن C_T mean (میانگین C_T ژن‌هایی که مورد Real time PCR قرار گرفته‌اند)، اعداد به دست آمده را وارد برنامه نرم‌افزاری Bio pronet [۱] کرده و گراف ژن‌های مورد مطالعه مربوط به هر نمونه را در مقایسه با ژن کنترل بتااکتین به دست می‌آوریم.

۱. نرم‌افزاری که توسط کارشناس مربوطه در شرکت توفیق دارو طراحی شده.

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده (primer design NCBI)

Gene	Sequence (5'→3')	Length Produce	TM	GC%
Vegf	Forward: GGCAGAAGGAGGAGGGACAGAATC	24 bp	76	58.00%
	Reverse: CATTTACACGTCTGCGGATCTTGT	24 bp	70	45.00%
Her-2	Forward: AGTACCTGGGTCTGGACGTG	20 bp	60.03	60.00%
	Reverse: CTGGGAACTCAAGCAGGAAG	20 bp	59.98	55.00%
Bcl-2	Forward: GTCTGGGAATCGATCTGGAA	20 bp	60.01	50.00%
	Reverse: CATAAGGCAACGATCCCATC	20 bp	60.30	50.00%
m-TOR	Forward: TTGAGGTTGCTATGACCAGAGAGAA	25bp	72.00	44.00%
	Reverse: TTACCAGAAAGGACACCAGCCAATG	25 bp	74.00	48.00%
PI3K	Forward: GATTGGTTCTTTCCTGTCTCTG	22 bp	64.00	45.00%
	Reverse: CTAGAATTTCGGGGATAGTT	20 bp	56.00	40.00%
P53	Forward: GGCCCACTTCACCGTACTAA	20 bp	59.99	55.00%
	Reverse: GTGGTTTCAAGGCCAGATGT	20 bp	59.97	50.00%
SRC	Forward: ACCACCTTTGTGGCCCTCTATG	22 bp	68.07	55.00%
	Reverse: GCCACCAGTCTCCCTCTGTGTT	22 bp	70.00	60.00%
KIT	Forward: CTGTTCACTCCTTTGCTGAT	20 bp	58.97	45.00%
	Reverse: TTCGTAATCGTAGCTGGCAT	20 bp	58.93	45.00%
βACTIN	Forward: CCACACCTTCTACAATGAGC	20 bp	60.00	50.00%
	Reverse: CATGATCTGGGTCATCTTCTCG	22bp	66.00	50.00%

نتایج

این پژوهش بر روی ۵ رده سلولی سرطانی کشت داده شده در آزمایشگاه کشت سلول انجام گرفت و میزان بیان ۸ ژن در مقایسه با ژن کنترل در هر رده سلولی بررسی شد.

A549: سرطان ریه

T47-d و MCF-7: سرطان سینه

$SKOV_3$: سرطان تخمدان

PC_3: سرطان پروستات

ژن‌های مورد مطالعه

۸ ژن دخیل در سرطان شامل: SRC –KIT–Her2 –PI_3K–mTOR–Vegf–p53–BCL-2 و ۱ ژن کنترل β-Actin (Heidi Chial, 2008– protooncogen to ancogen to cancer).

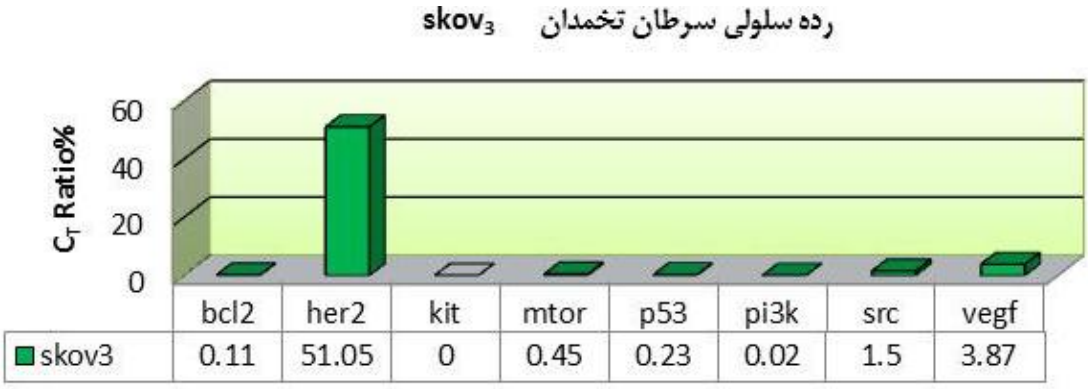
نتایج بررسی میزان بیان ژن‌ها در سل لاین‌های مورد مطالعه با روش Real Time- PCR

نتایج بدست آمده از آزمون Real Time- PCR سلول $SKOV_3$ نشان‌دهنده بالا بودن درصد بیان ژن her_2 نسبت به ژن‌های دیگر می‌باشد (جدول ۲ و نمودار ۱). همچنین در سلول سرطان سینه MCF-7 و T47-d (طبق جدول‌های ۳ و ۴ و نمودارهای ۲ و ۳) میزان بیان ژن p53 نسبت به ژن‌های دیگر در مقایسه با ژن کنترل بالا می‌باشد. در سل لاین سرطان پرستات (PC_3) بر طبق جدول ۵ و نمودار ۴ بیان ژن Src بالا می‌باشد. در نهایت در سل لاین سرطان سینه A549 بر طبق جدول ۶ و نمودار ۵ میزان بیان ژن‌های P53، her2 و Src نسبت به سایر ژن‌های مورد مطالعه در مقایسه با ژن کنترل بیان بالاتری دارند.

جدول ۲. اعداد C_T هر ژن به همراه میانگین اعداد گزارش شده از دستگاه، همچنین درصد بیان هرژن در مقایسه با ژن کنترل (بتا اکتین) در سل لاین $SKOV_3$

gen	bcl_2	her_2	kit	mtor	p53	pi_3k	src	vegf	βact
C_T 1	29.6	20.78	36.5	27.7	28.56	32.3	25.87	24.52	19.81
C_T2	29.6	20.74	36.5	27.6	28.57	32.4	25.87	24.53	19.82
C_T3	29.65	20.79	36.5	27.5	28.56	32.3	25.86	24.48	19.81
C_T Mean	29.61	20.77	36.5	27.6	28.56	32.3	25.86	24.51	19.81
C_T Ratio%	0.11	51.05	0	0.45	0.23	0.02	1.5	3.87	100

C_TRatio=(2^-C_T mean)*100/(2^-C_T control)



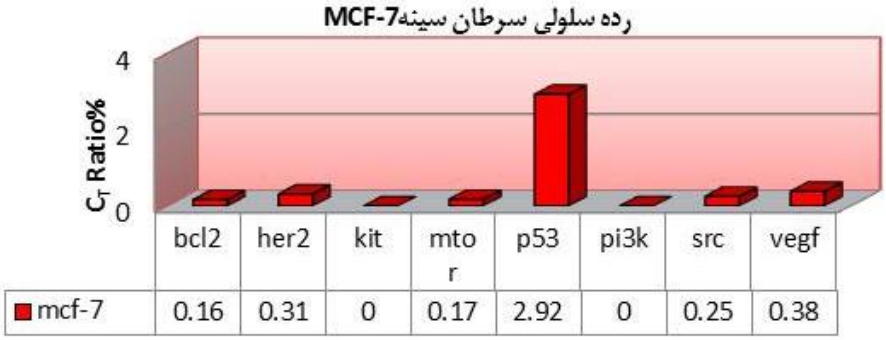
(ژن مرجع بتا اکتین)

نمودار ۱. نمودار میزان بیان کمی ژن‌های هدف موردنظر (در مقایسه با ژن بتا اکتین) در سل لاین $skov_3$ برحسب C_T ratio%

جدول ۳. اعداد CT هر ژن به همراه میانگین اعداد گزارش شده از دستگاه، همچنین درصد بیان هرژن در مقایسه با ژن کنترل (بتا اکتین) در سل لاین MCF-7

gen	bcl2	her2	kit	mtor	p53	pi3k	src	vegf	bact
C_T 1	24.71	23.69	33.5	24.63	20.45	32.84	24.05	23.44	15.35
C_T2	24.72	23.72	33.53	24.59	20.46	32.84	24.06	23.42	15.39
C_T3	24.72	23.75	33.52	24.61	20.47	32.85	24.04	23.41	15.39
C_T mean	24.72	23.72	33.51	24.61	20.49	32.84	24.05	23.43	15.39
C_TRatio%	0.16	0.31	0	0.17	2.92	0	0.25	0.38	100

C_TRatio=(2^-C_T mean)*100/(2^-C_T control)



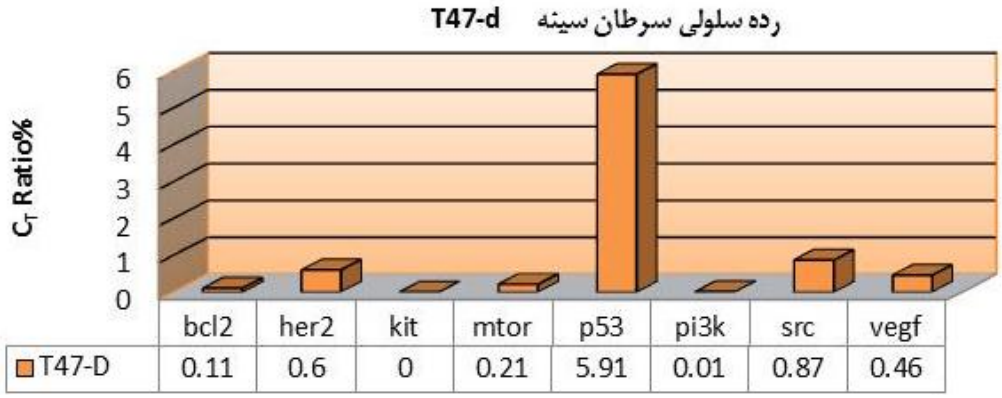
(ژن مرجع بتا اکتین)

نمودار ۲. نمودار میزان بیان کمی ژن‌های هدف موردنظر (در مقایسه با ژن بتا اکتین) در سل لاین MCF-7 برحسب C_T ratio%

جدول ۴. اعداد C_T هر ژن به همراه میانگین اعداد گزارش شده از دستگاه، همچنین درصد بیان هرژن در مقایسه با ژن کنترل (بتا اکتین) در سل لاین T47-d

gen	bcl2	her2	kit	mtor	p53	pi3k	src	vegf	bact
C_T 1	28.53	26.17	36.8	27.5	22.88	32.40	25.65	26.56	18.81
C_T2	28.59	26.18	36.7	27.65	22.89	32.45	25.65	26.6	18.8
C_T3	28.55	26.16	36.6	27.7	22.88	32.43	25.66	26.53	18.8
C_T Mean	28.57	26.17	36.7	27.61	22.88	32.42	25.65	26.56	18.8
C_T atio%	0.11	0.6	0	0.21	5.91	0.01	0.87	0.46	100

C_TRatio=(2^-C_T mean)*100/(2^-C_T control)



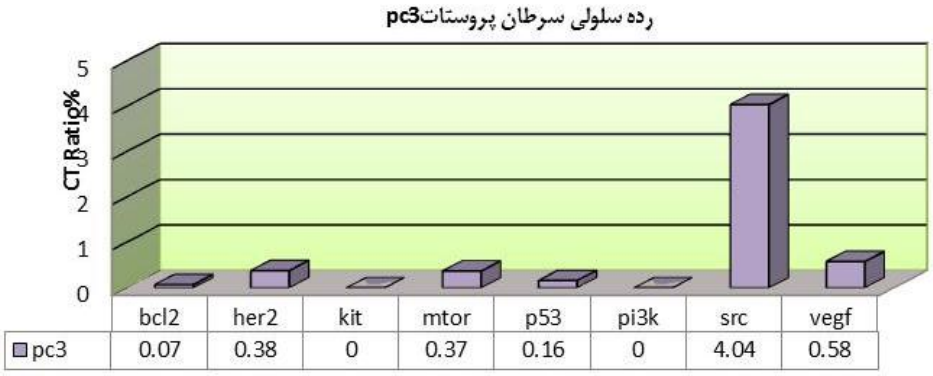
(ژن مرجع بتا اکتین)

نمودار ۳. نمودار میزان بیان کمی ژن‌های هدف مورد نظر(در مقایسه با ژن بتا اکتین) در سل لاین T47-d برحسب C_T ratio%

جدول ۵. اعداد C_T هر ژن به همراه میانگین اعداد گزارش شده از دستگاه، همچنین درصد بیان هرژن در مقایسه با ژن کنترل (بتا اکتین) در سل لاین PC_3

gen	bcl2	her2	kit	mtor	p53	pi3k	src	vegf	βact
C_T 1	26.52	24.06	35.88	24.09	25.35	32.65	20.63	23.44	16
C_T2	26.51	24.05	35.89	24.05	25.33	32.66	20.63	23.4	16.1
C_T3	26.5	24.05	35.89	24.09	25.34	32.64	20.63	23.41	16
C_T Mean	26.51	24.05	35.89	24.07	25.33	32.65	20.63	23.41	16
C_TRatio%	0.07	0.38	0	0.37	0.16	0	4.04	0.58	100

C_TRatio=(2^-C_T mean)*100/(2^-$C_T$control)



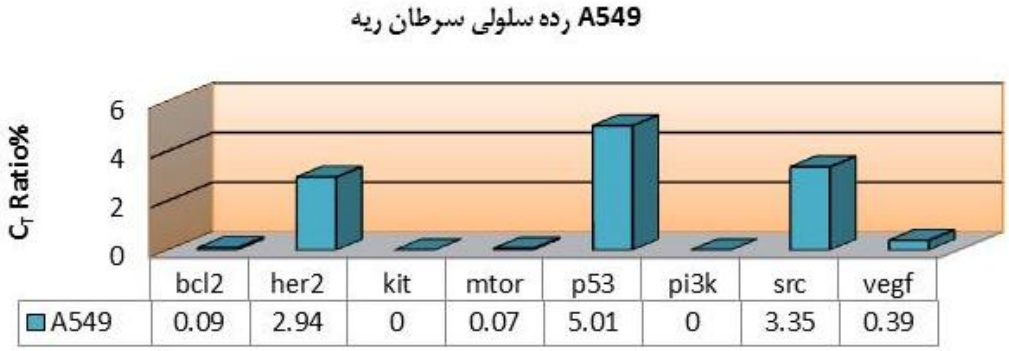
(ژن مرجع بتا اکتین)

نمودار ۴. نمودار میزان بیان کمی ژن‌های هدف موردنظر (در مقایسه با ژن بتا اکتین) در سل لاینPC_3 برحسب C_T ratio%

جدول ۶. اعداد C_T هر ژن به همراه میانگین اعداد گزارش شده از دستگاه، همچنین درصد بیان هرژن در مقایسه با ژن کنترل (بتا اکتین) در سل لاین A549

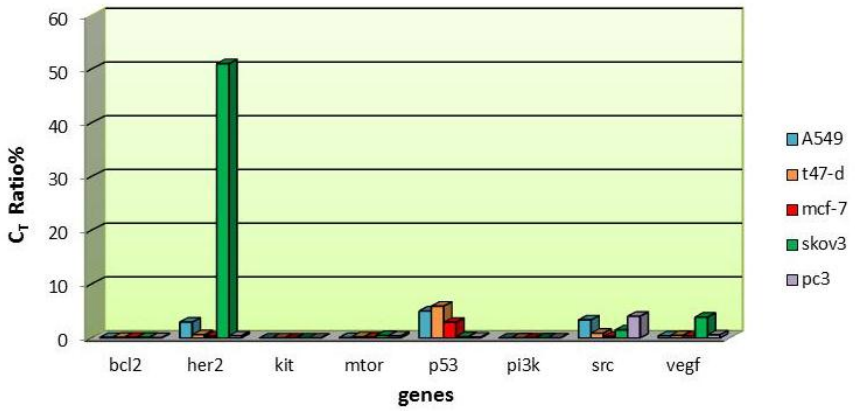
gen	bcl2	her2	kit	mtor	p53	pi3k	src	vegf	bact
ct 1	27.51	22.53	34.9	27.95	21.73	34.48	22.35	25.4	17.44
ct2	27.51	22.53	34.8	27.96	21.75	34.5	22.36	25.46	17.43
ct3	27.52	22.51	34.9	27.96	21.78	34.51	22.34	25.47	17.44
ct mean	27.51	22.52	34.9	27.96	21.76	34.5	22.34	25.44	17.44
ct ratio%	0.09	2.94	0	0.07	5.01	0	3.35	0.39	100

C_TRatio=(2^-C_T mean)*100/(2^-$C_T$control)



(ژن مرجع بتا اکتین)

نمودار ۵. میزان بیان کمی ژن‌های هدف مورد نظر(در مقایسه با ژن بتا اکتین) در سل لاین A549 برحسب C_T ratio%



نمودار ۶. مقایسه کلی در صد بیان ژن‌ها در ۵ رده مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از دلایل انتخاب گروه ژنی مورد استفاده در این مطالعه، مؤثر بودن آنها در اغلب سرطان‌هاست، نقش برخی از ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش، در ایجاد سرطان به اثبات رسیده است.همچنین برخی از این ژن‌ها کمتر مورد مطالعه قرار گرفته واطلاعات کمی از آنها موجود است. مطالعه این ۸ پروتوانکوژن با هم و در یک پنل، که برای درک بیشتر، از روابط داخل سلولی ژن‌ها، طراحی گردیده است یکی از مزایای این مطالعه می‌باشد و در دنیا، این ژن‌ها کمتر در کنار هم مطالعه شده‌اند. البته مطالعات موردی از ژن‌ها در سل لاین‌های مختلف با روش‌های اندازه‌گیری بیان مختلف، گزارش شده است. در مورد انتخاب روش مطالعه، در مقایسه با سایر روش‌های تعیین پروفایل ژنی، Real Time PCR به روش سایبرگرین روش کارآمدتر وجدیدتری است، این روش از حساسیت و دقت کافی جهت تشخیص مقادیر بسیار کم از بیان هر یک از ژن‌ها برخوردار است. همچنین پرایمرهای اختصاصی که در این تحقیق طراحی گردیده ژن‌های موردنظر را به طور اختصاصی مورد شناسایی قرار می‌دهد. در این روش ما به مقدار کمی سلول کشت داده شده نیاز داریم. همچنین بر روی میزان بیان بعضی از ژن‌های پنل ژنی در سل لاین‌های سرطانی مورد نظردر این تحقیق، در سطح دنیا مطالعات کمی صورت گرفته و نیازمند مطالعات بیشتر است.

طبق نتایج به دست آمده از نمودارها، ژن her2 در سل لاین $skov_3$ بیان بسیار بالاتری را نسبت به سایر ژن‌ها نشان می‌دهد. در مقایسه با مطالعاتی که بر روی این ژن در دنیا صورت گرفته، مؤید بالا بودن میزان بیان ژن her2 در سل لاین SKOV3 (سرطان تخمدان) می‌باشد. بر طبق مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر، تقویت و افزایش بیان این ژن در سرطان در ۳۰٪ سرطان‌های پستان و سرطان‌های دیگر گزارش شده است.ولی در این تحقیق در هیچ یک از سل لاین‌های سرطان سینه مورد مطالعه، her2 بیان بالاتری نسبت به سایر ژن‌ها ندارد.در سالهای اخیر این ژن به عنوان یک بیومارکر برای اهداف درمانی و تولید داروهای هدفمند مورد توجه قرار گرفته است. محققان یافته‌اند که ژن SRC در بسیاری از انواع سرطان‌های انسانی بیان می‌شود، به ویژه در سرطان پروستات و سرطان ریه. گراف‌ها و نمودارها نشان می‌دهند که ژن SRC در همه سل لاین‌های مورد مطالعه به ویژه در سل لاین PC_3 و A549 و SKOV3 بالاتری دارد. که می‌تواند این ژن در این سل لاین‌ها به عنوان مارکر ژنی در نظر گرفته شود. در این مطالعه ژن p53 در همه سل لاین‌های مورد مطالعه بیان شده، ولی در سل لاین‌های سرطانی A549 و T47-d بیان بالاتری داشته و در سل لاین سرطانی MCF-7 و سل لاین‌های دیگر بیان کمتری داشته است. مطالعات انجام شده بر روی میزان بیان این ژن در دنیا، نشان‌دهنده بیان این ژن درسرطان ریه و سینه بوده و مؤید این بررسی می‌باشد. در این مطالعه ژن VEGF در سل لاین $SKOV_3$ بیان بالاتری داشته است که مقایسه بررسی‌های انجام شده در گذشته، تایید کننده این مطلب می‌باشد. همچنین ژن VEGF در سل لاین‌های دیگر کمی بیان شده است. ژن mToR در هر یک از سل لاین‌های مورد مطالعه بیان بسیار کمی داشته است. سیگنالینگ mTOR در توسعه بیماری و در گسترش طول عمر در موجودات مدل نقش دارد. این مسیر با بیماری‌های انسانی مانند دیابت و سرطان همراه است، ژن KIT در هیچ یک از سل لاین‌های مورد مطالعه بیانی نداشته، و یا بیان آنها نسبت به ژن مرجع (بتا اکتین) آنقدر پایین بوده که قابل اندازه‌گیری نبوده است. برطبق مطالعه انجام گرفته در دنیا، در چندین نوع از نئوپلاسم و در ملانومای

مخاطی بیان این ژن مشاهده شده است. افزایش فعالیت pI3K با بسیاری از سرطان‌ها همراه است. بر طبق مطالعات انجام گرفته بیان افزایش یافته ژن pI3K موجب تخریب غشاء پایه، نوزایی عروق و مهاجرت سلولی می‌گردد. از این‌رو در ایجاد بسیاری از سرطان‌ها از جمله ریه و پروستات دخیل است.در این تحقیق بر طبق نمودارها در هیچ کدام از سل لاین‌ها این ژن بیان نشده و یا بیان بسیار کمی داشته است.

نتایج به وضوح نشان می‌دهد که الگوی بیان این پانل از ژن‌ها، در هر رده سلولی تقریباً منحصر به فرد است. مطالعه و اندازه‌گیری میزان بیان هر کدام از ژن‌های مورد مطالعه در سل لاین‌های موردنظر در این تحقیق (بیان بالا و یا بیان نشدن)، می‌تواند کمک مؤثری در شناخت ژن‌های معیوب نموده همچنین به محققین در اهداف تحقیقاتی (اندازه‌گیری تأثیر داروهای هدفمند ساخته شده بر روی هر یک از ژن‌ها) کمک نماید. با استفاده از این روش، پژوهشگران می‌توانند ژن‌های دیگری را بنا بر اهدافی که دارند انتخاب و میزان بیان آن ژن را در سل لاین‌های مورد نظر اندازه‌گیری نمایند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از استادان محترم پروفسور رضا حاجی‌حسینی جناب آقای دکتر شیخ‌نژاد و دکتر محسن همدانی و خانم‌ها سجادی و فرساد به خاطر آرمان‌های بلند انسان‌دوستانه‌شان برای پیشبرد تحقیقات پایه‌ای و مساعدت فراوان در این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Joinpoint Regression Program, Version 3.5.2. Bethesda, MD.; (2011). Statistical Research and Applications Branch, National Cancer Institute.

Iorio, M.V.; et al. (2006). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res; 65, 7065-7070 (2005). Nature Rev. Cancer; 6: 857-866,

Lapointe, J.; et al. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostat cancer. Proc. Natl Acad. Sci. USA 101, 811-816.

Mecham, BH.; Klus, GT.; Strovel, J.; Augustus, M.; Byrne, D.; Bozso, P.; et al. Sequence-matched probes.

Produce increased cross-plat-form consistency and more reproducible biological results in microarray-based gene expression measurements. (2004). Nucleic Acids Res; 32:e74.

Rhodes, D.R.; et al. (2005). Mining for regulatory programs in the cancer transcriptome.Nature Genet; 37, 579-583.

Wang, SP.; Wang, WL.; Chang, YL.; et al. (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. Nat Cell Biol; 11: 694-704.

Olff, AC.; Hammond, ME.; Hayes, DF.; (2012). Re: Predictability of adjuvant trastuzumab benefit in N9831 patients using the ASCO/CAP HER2-positivity criteria. J Natl Cancer Inst; 104: 957-958.

Wheeler, DL.; Iida, M.; Dunn, EF.; (2009). The role of Src in solid tumors. Oncologist; 14(7): 667-78. doi:10.1634/theoncologist.2009-0009. PMC 3303596. PMID 19581523.

Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program SEER*Stat Database: Mortality-All COD, Aggregated With State, Total US (1969-2009) <Katrina/Rita Population Adjustment>. Bethesda, MD: National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch; 2012. Released September 2012; underlying mortality data provided by National Center for Health Statistics 2012.

Pfaffl, M.W.; (2010). The ongoing

evolution of qPCR. Methods; 50: 215-216.

Surveillance Research Program, National Cancer Institute. (2012). SEER*Stat Software, version 7.1.0. Bethesda, MD.

Browne, BC.; Crown, J.; Venkatesan, N.; Duffy, MJ.; Clynes, M.; Slamon, D.; et al. (2011). Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells. Ann Oncol; 22: 68-73.

Beharry, Z.; Zemskova, M.; Mahajan, S.; Zhang, F.; Ma, J.; Xia, Z.; et al. (2009). Novel benzylidene-thiazolidine-2,4-diones inhibit Pim protein kinase activity and induce cell cycle arrest in leukemia and prostate cancer cells. Mol Cancer Ther; 8: 1473-83.

Weinstein, I.B.; Joe, A.K.; (2006). Mechanisms of disease: Oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. Nature Clinical Practice Oncology; 3: 448-457.

Prat, A.; Parker, JS.; Karginova, O.; Fan, C.; Livasy, C.; Herschkowitz, JI.; et al. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res.

Ying, M.; Li, D.; Yang, L.; Wang, M.; Wang, N.; Chen, Y.; et al. (2010). Loss of SOCS3 expression is associated with an increased risk of recurrent disease in breast carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol.

Koboldt, DC.; Fulton, RS.; McLellan, MD.; Schmidt, H.; Kalicki-Veizer, J.; McMichael, JF.; et al. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature.

Protective effects of liquiritin apioside on cigarette smoke-induced lung epithelial cell injury. Fundamental & Clinical Pharmacology 26: 10.1111/fcp. 2012. 26. issue-4, 473-483.

Online publication date: 1-Aug-2012.

Sun, Y.; Niu, J.; Huang, J.; (2009). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Am J Transl Res; 1: 148-162.

Wang, W.; Epstein, JI.; (2008). Small cell carcinoma of the prostate: A morphologic and immunohistochemical study of 95 cases. Am J Surg Pathol; 32: 65-71.

The Analysis of Small Molecule Metabolite Profiles in the Blood as a Biomarker of Lung Cancer, Peter Mazzone et al. (2014). Chest, doi: 10.1378/chest.1989452, published online October.

Rothenberg, M.E.; et al. (2008). Human and Rat Hepatocytes Cultured on Ultra-Web and Ultra-Web Polyamine Synthetic Matrices show Enhanced Physiologic Activity When Compared to Collagen. Application Note - Corning Life Sciences Technical Monograph CLS-AN-094: Article can be downloaded from Technical Information/ Cell Culture/Culture Surfaces at www.corning.com/lifesciences . - See more at: http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/evolution-of-cell.html#sthash.U8TjewtR.dpuf