

## بررسی بیان ژن نوکلئوستمین به عنوان یک مارکر مولکولی جدید در تومورهای پستان

محمد علی حسینپورفیضی<sup>\*</sup>، سمیه ساعد<sup>۱</sup>، اسماعیل بابایی<sup>۲</sup>، وحید منتظری<sup>۳</sup>، منیره حلیمی<sup>۴</sup>

### خلاصه

مقدمه: نوکلئوستمین یک پروتئین هسته‌ای متصل شونده به GTP می‌باشد، که به میزان 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. به دلیل شیوع روزافزون تومورهای پستان در سال‌های اخیر در این پژوهش صلاحیت بیان ژن نوکلئوستمین به عنوان مارکر مولکولی در تشخیص و درمان تومورهای پستان ارزیابی شده است.

روش: در مجموع ۴۱ نمونه توموری و ۲۰ نمونه طبیعی مربوط به حاشیه‌ی تومور با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی مورد مطالعه قرار گرفتند، و ژن  $\beta 2$  میکروگلوبولین ( $\beta 2m$ ) به عنوان کنترل داخلی به کار رفت. با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نتایج به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

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

نتیجه‌گیری: این نتایج استفاده از نوکلئوستمین را به عنوان مارکر تشخیصی در تفکیک و شناسایی بافت‌های توموری از غیر توموری مؤثر نمی‌داند، ولی استفاده از آن را در تخمین اندازه‌ی تومور و هم‌چنین به عنوان فاکتور بالقوه پیش‌آگهی‌دهنده برای تعیین شدت‌های مختلف توموری در تومورهای پستان و پیش‌بینی رفتار آینده تومورها ممکن می‌سازد، از اینرو می‌تواند در کنار سایر روش‌های مرسوم آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. هم‌چنین 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- گروه جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۵- استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

\* نویسنده مسؤول، آدرس: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی • 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 ویژه‌ی 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. تومور مارکرها فاکتورهای 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 به کار 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 به کار 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 هموستازی 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 خودبازسازی 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 تقسیم‌شونده 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. هم‌چنین نوکلئوستمین در انواعی از بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطانی از جمله مغز، مثانه، کلیه، پروستات، معده، کبد و سلول‌های کارسینومای تهاجمی مجرایسی و رده‌ی سلولی سرطانی پستان (Human mammary cancer cell line) MMK نیز بیان می‌گردد،

رضایت کامل بیماران از کسانی که تحت عمل جراحی بیوپسی یا انواع ماستکتومی قرار گرفته بودند، جمع آوری 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 جمع آوری شدند و در قالب یک مطالعه مورد شاهدهی بررسی شدند. نمونه‌های مربوط به حاشیه‌ی تومور از محل دور از تومور که ظاهراً فاقد درگیری توموری بودند جمع آوری شدند.

#### استخراج RNA

RNA کل (Total RNA) با استفاده از محلول RNX- plus و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن-ایران) استخراج شد. به دلیل 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 آنزیم Dnase I و واکنش رونویسی معکوس (Reverse transcription)

برای جلوگیری از آلودگی RNA حاصله با DNA، ابتدا مقادیر یکسان از RNA اولیه (۱ میکروگرم) از هر نمونه با آنزیم DNase I 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.

اما در سلول‌های اپیتلیال نرمال پستانی بیان نمی‌شود (۱۳). نوکلئوستمین یکی از جدیدترین اعضای خانواده‌ی پروتئین‌های متصل‌شونده به GTP (Guanosine-Tri-Phosphate Binding Protein) است، و نقش مهمی را در امبریونز 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 بیرون‌ریزی ریبوزوم‌ها نقش دارد (۱۴، ۱۵). با توجه به این مشاهدات و نیز این واقعیت که بیان نوکلئوستمین در حین تمایز سلول‌های بنیادین و در مرحله‌ی سلول‌های پیش‌ساز 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 هسته‌ای 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 همئوستازی 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 استفاده‌ی تشخیصی، پیش‌آگهی و درمان تومورهای پستان در قالب یک مطالعه‌ی تجربی مورد ارزیابی قرار گرفته 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

## طراحی پرایمر

در این تحقیق، ژن  $\beta 2m$  ( $\beta 2$ -microglobulin) به عنوان کنترل داخلی انتخاب و از همان پرایمرهایی که توسط بابائی و همکاران بر روی ژن  $\beta 2m$  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 و  $\beta 2m$  به ترتیب NM-0143366 و NM-004048 می‌باشد). ویژگی این پرایمرها قرار داشتن آن‌ها روی آگزون‌های جداگانه است، در این صورت محصول PCR که ناشی از آلودگی با DNA ژنومی است قابل تکثیر نبوده و یا به دلیل تفاوت در اندازه‌ی قطعه‌ی تکثیر شده، از محصول RT-PCR قابل تمایز خواهد بود. توالی و جایگاه این پرایمرها به صورت 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  $\beta 2m$  Forward Primer (HBF): 5'-CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3' (94-114)

Human  $\beta 2m$  Reverse Primer (HBR): 5'-GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3' (265-284)

## واکنش PCR

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس و به دست آمدن cDNA، به منظور تکثیر قطعه‌ی مورد نظر، واکنش PCR با استفاده از  $2.5 \mu l$  از cDNA تهیه شده، به همراه مواد زیر (تهیه شده از شرکت سیناژن و ایزوژن بیوساینس) و استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Biometra) انجام گرفت:

-  $1 \mu l$  ۰/۱۲۵ Taq DNA Polymerase

-  $0.75 \mu l$  ۵۰ mM  $MgCl_2$

-  $0.5 \mu l$  ۱۰ mM dNTPs

-  $2/5 \mu l$  بافر تکثیر  $10 \times$

-  $0.75 \mu l$  از هر پرایمر بالا و پایین دست،  $20 \text{ mM}$

- آب تزریقی استریل (اتو کلاو شده) در حجم نهایی  $25 \mu l$  - پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش PCR، میکرو تیوب در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد و یک سیکل با دمای  $94^\circ C$  درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ و ۲ دقیقه به ترتیب برای  $\beta 2m$  و نوکلئوستمین اجرا شد. این سیکل انعقاد اولیه، سبب منعقد شدن DNA الگو می‌گردد. واکنش PCR برای ژن‌های نوکلئوستمین و  $\beta 2m$  با شرایط  $30^\circ C$  ثانیه دناچوریشن در دمای  $94^\circ C$  درجه سانتی‌گراد،  $40^\circ C$  و  $30^\circ C$  ثانیه آنیلینگ در دمای  $60^\circ C$  و  $57^\circ C$  درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای ژن‌های نوکلئوستمین و  $\beta 2m$  و ۱ دقیقه اکستنشن در دمای  $72^\circ C$  درجه سانتی‌گراد انجام گرفت، تعداد ۳۵ سیکل برای نوکلئوستمین و ۳۰ سیکل برای  $\beta 2m$  و یک سیکل اکستنشن نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای  $72^\circ C$  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  $45^\circ C$  ثانیه و دمای آنیلینگ  $64^\circ C$  -  $60^\circ C$  درجه سانتی‌گراد (بر اساس نوع آغازگر) بوده است (۱۹). واکنش PCR برای هر دو ژن نوکلئوستمین و  $\beta 2m$  در دو لوله جداگانه و در شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت. برای اطمینان از عدم آلودگی یک لوله نیز به عنوان کنترل منفی در هر واکنش به کار 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 cDNA 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  $\beta 2m$  cDNA انسانی با ۴۳/۵ درصد GC را شامل می‌شود.

#### تعیین توالی DNA استخراج شده

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

#### نیمه کمی کردن بیان ژن

برای بررسی بیان ژن نوکلئوستمین به صورت نیمه کمی، شدت باندهای مورد نظر  $\beta 2m$  برای هر نمونه با استفاده از نرم افزار Uvitech تعیین گردید و نسبت شدت بیان ژن نوکلئوستمین به  $\beta 2m$  در هر نمونه به عنوان شاخص شدت بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد. به منظور تعیین مثبت یا منفی بودن بیان در مرحله RT-PCR، پس از تعیین شدت بیان نسبی در نمونه‌های هر گروه، میانگین و انحراف از میانگین این اعداد تعیین و از شاخص میانگین  $\pm$  انحراف معیار به عنوان آستانه‌ی بیان استفاده شد. تمام نمونه‌هایی که بیان مساوی یا بالاتر از این حد را داشتند به عنوان مثبت و نمونه‌هایی که بیان پایین‌تری را داشتند به عنوان منفی در مرحله RT-PCR در نظر گرفته شدند.

#### آنالیز آماری

به منظور آنالیز آماری، میزان بیان نوکلئوستمین با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA یک طرفه در گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت.

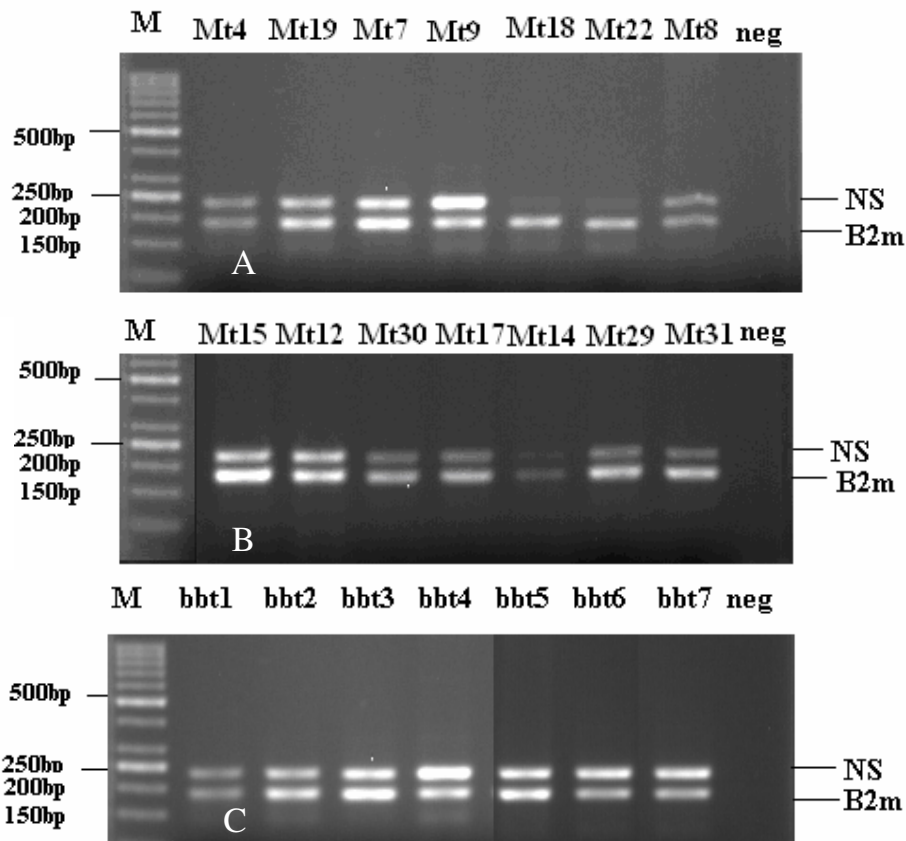
#### نتایج

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

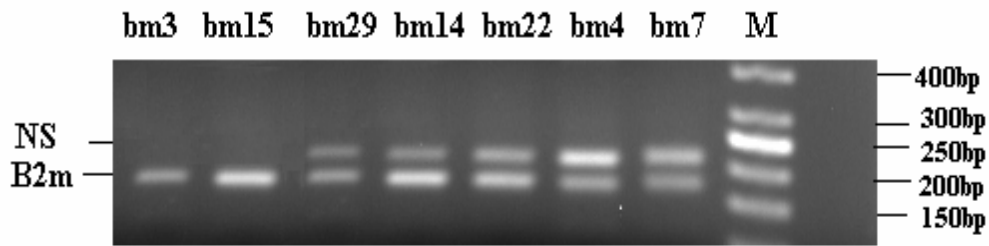
۴۱ نمونه‌ی توموری ۳۱ نمونه در گروه بدخیم و ۱۰ نمونه در گروه خوش خیم دسته‌بندی شدند. از ۳۱ نمونه بدخیم نیز ۱۷ نمونه در مرحله اولیه و ۱۴ نمونه در مرحله پیشرفته‌ی توموری قرار داشتند. همچنین غدد لنفاوی ۱۳ بیمار عاری از تومور و ۱۸ بیمار دارای درگیری توموری بودند. میانگین سنی بیماران در گروه توموری بدخیم، ۵۱/۱۸ سال و در گروه توموری خوش خیم، ۲۸/۹۱ سال (۴۵-۱۵ ساله) بود. توزیع بیماری در طرف چپ پستان در هر دو گروه توموری خوش خیم و بدخیم بالاتر بود. بررسی بیان نوکلئوستمین در گروه‌های مختلف افزایش بیان آن را به ترتیب از گروه‌های حاشیه‌ی تومور تا توموری نشان داد، که این مقدار ۵۵ درصد برای نمونه‌های حاشیه‌ی تومور و ۶۳/۴۱ درصد برای نمونه‌های توموری می‌باشد. در بین تومورها نیز ۸۰ درصد از نمونه‌های توموری خوش خیم و ۵۷/۰۶۴ 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 خوش خیم 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 خوش خیم 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 به جای آن که به عنوان یک مارکر بدخیمی عمل کند، به عنوان یک مارکر مناسب برای تکثیر سلول می‌باشد. در تطبیق بیشتر با داده‌های پاتولوژیکی، ارتباط بیان نوکلئوستمین با درگیری غدد لنفاوی و متاستاز نیز بررسی

در مراحل پایین تر بود (نمودار ۳). این اختلاف بین گروه توموری وحاشیه‌ی تومور، هم چنین بین تومورهای بدخیم و حاشیه‌ی تومور، معنی‌دار نبوده (به ترتیب  $P=0/543$  و  $P=0/333$ )، اما بین تومورهای خوش‌خیم و بدخیم و گروه‌های توموری بدخیم پیشرفته و اولیه معنی‌دار می‌باشد (به ترتیب  $P=0/072$  و  $P=0/016$ ). در بررسی بیشتر بین گروه توموری خوش‌خیم و گروه توموری بدخیم مرحله‌ی اولیه، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P=0/006$ ). بین تومورهای بدخیم مرحله‌ی 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).

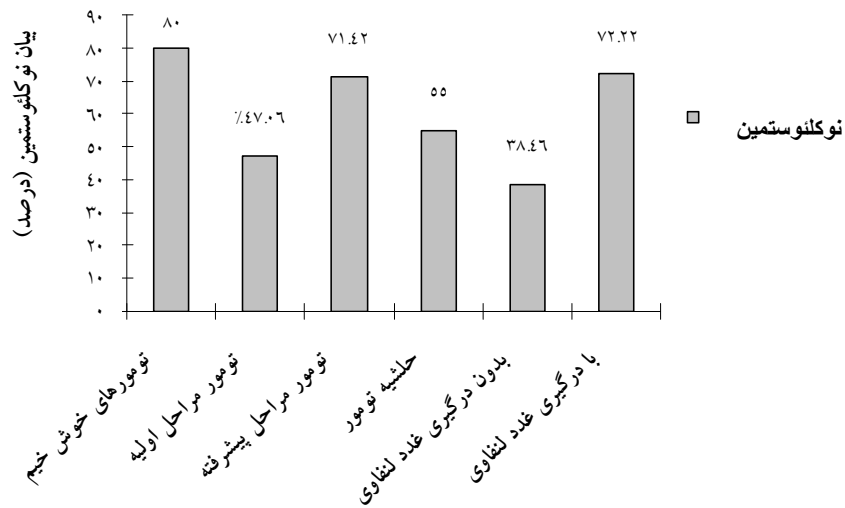
شد، که درصد بیان این ژن در گروه‌های با درگیری غدد لنفاوی ۷۲/۲۲ درصد و در گروه بدون درگیری غدد لنفاوی ۳۸/۴۶ درصد به دست آمد. (نمودار ۱ و شکل‌های ۱ و ۲). به منظور بررسی شدت بیان نوکلئوستمین در گروه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور و ارتباط میزان بیان آن با درجه‌ی تومورها و درگیری غدد لنفاوی توسط تومور، بیان 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 (نمودار ۲). این مقدار در تومورهای خوش‌خیم بالاتر از بدخیم بوده و در تومورهای بدخیم نیز میانگین بیان نوکلئوستمین در گروه توموری بدخیم پیشرفته، به مراتب بالاتر از میانگین بیان آن



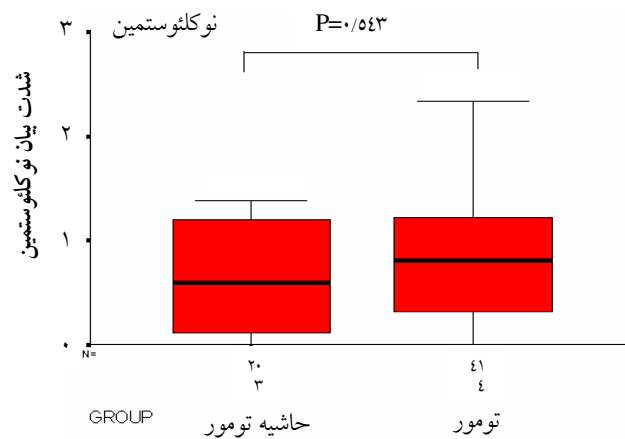
شکل ۱. الگوی الکتروفورز محصولات PCR ژن نوکلئوستمین و  $\beta 2m$  در نمونه‌های توموری. در تمامی عکس‌ها ستون سمت چپ مارکر را نشان می‌دهد. (A) نمونه‌های بدخیم مربوط به مرحله‌ی پیشرفته‌ی توموری Mt (Malignant tumor (Advanced stage) Mt، (B) نمونه‌های بدخیم مربوط به مرحله اولیه‌ی توموری Mt (Malignant tumor (primary stage) Mt، (C) نمونه‌های مربوط به تومورهای خوش‌خیم bbt (Breast benign tumor) bbt



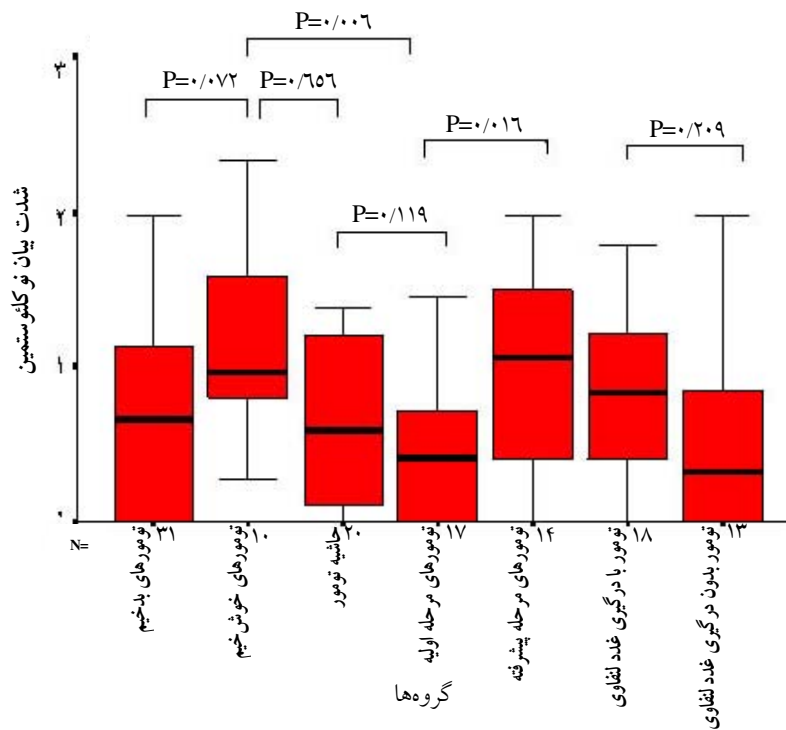
شکل ۲. الگوی الکتروفورس محصولات PCR ژن نوکلئوستمین و  $\beta 2m$  در نمونه‌های حاشیه‌ی تومور (Breast margin) سمت راست مارکر را نشان می‌دهد. نمونه‌های مربوط به حاشیه‌ی تومور از افرادی که نمونه‌های توموری از آنها گرفته شده بود جمع‌آوری گردیدند. این نمونه‌ها از نسج به ظاهر طبیعی و از فاصله‌ای دور از محل تومور که ظاهراً فاقد درگیری تومورال بودند گرفته شدند.



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



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



**نمودار ۳.** مقایسه‌ی بیان نوکلئوستمین در گروه‌های تومورهای بدخیم، توموری خوش خیم، حاشیه‌ی تومور، تومورهای مرحله‌ی اولیه، تومورهای مرحله‌ی پیشرفته، تومورهای با و بدون درگیری غدد لنفاوی در نمودار Box plot. در هر نمودار محدوده‌ی بیان نوکلئوستمین در هر گروه نشان داده شده است.

## بحث

آشکار نگردید (۱۳). در سال ۲۰۰۴ هم چنین بیان بالایی از mRNA 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 مجرای پستان و رده‌ی سلولی سرطان پستان انسانی (MMK-7)، و اثبات درگیری نوکلئوستمین در آسیب‌شناسی سرطان پستان، هیچ مطالعه‌ی در خور توجهی در مورد دخالت نوکلئوستمین در بروز تومورهای پستان و

در سال ۲۰۰۰، DNAی مربوط به ژن نوکلئوستمین برای اولین بار در رده‌ی سلول‌های سرطانی سینه گزارش شد، ولی عملکرد آن نامشخص بود. دو سال بعد در سال ۲۰۰۲، طی یک پژوهش بیان یک پروتئین جدید متصل شونده به p53، به نام نوکلئوستمین در سلول‌های بنیادی مغزرت بالغ مشاهده و ثبت شد (۱۵). در بررسی دیگری در سال ۲۰۰۴، با استفاده از تکنیک دورگه سازی در جای بافتی (Tissue insitu hibridization)، بیان mRNA نوکلئوستمین در سیتوپلاسم سلول‌های کارسینومای مهاجم مجرای پستان تشخیص داده شد، ولی در سلول‌های بافت‌های بالغ نرمال تمایز یافته، مانند کلیه و سلول‌های اپیتلیال طبیعی غدد پستانی، بیان mRNA نوکلئوستمین



اهمیت آن در تشخیص، پیشگویی، پیش آگهی 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 از طریق مهار بیان آن پرداخته‌اند (۲۴-۲۰، ۱۸). در تعدادی 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 در مورد 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 آدنوکارسینوما، بافت کارسینوما ناحیه آمپول رحم، و نیز تعدادی از انواع رده‌های سلولی سرطانی (۲۶، ۲۰، ۱۳)، هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن نوکلئوستمین به عنوان مارکر مولکولی بالقوه در تشخیص و پیش آگهی تومورهای پستان و به طور 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 پاک کن هستند، به پوست یا بافت‌های اطراف می‌چسبند و به سختی مرز آن‌ها تعیین می‌شود، لذا به دلیل اهمیت این موضوع، در این پژوهش میزان بیان نوکلئوستمین در نمونه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور مقایسه گردید. نتایج به دست آمده علاوه بر اینکه بیان گر 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 به عنوان فاکتور توموری بالقوه در تومورهای پستان پیشنهاد نمی‌کند و استفاده از آن را به عنوان یک مارکر مولکولی در تفکیک بافت‌های توموری از غیرتوموری مؤثر نمی‌داند. ولی به دست آوردن نتایج قوی‌تر و مطمئن‌تر نیازمند بررسی نمونه‌های بیشتر بوده تا نتایج قوی‌تری از لحاظ آماری ارائه شود و هم چنین با توجه به بیان قابل توجه نوکلئوستمین در بافت‌های حاشیه‌ی تومور مورد بررسی، بهتر به نظر می‌رسد که نمونه‌های طبیعی بافت پستان که از افراد سالم تهیه شده‌اند نیز از نظر بیان نوکلئوستمین، مورد بررسی قرار گیرند (به عنوان مثال از افرادی که تحت جراحی زیبایی قرار گرفته‌اند، و یا استفاده از بافت طبیعی پستان زنانی که به دلیل وجود مشکل ژینگانئوماستی 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 با وجود معنی‌دار نبودن شدت بیان نوکلئوستمین در بین گروه توموری و حاشیه‌ی تومور، بیان بالای آن در گروه توموری خوش‌خیم (۸۰ درصد) و بیان کم آن در تومورهای

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 غیر توموری پستان مؤثر نمی‌داند، ولی استفاده از آن را در تخمین اندازه‌ی تومور و هم‌چنین به‌عنوان فاکتور بالقوه پیش‌آگهی‌دهنده 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. هم‌چنین 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 می‌نمایم. همچنین از دوستان و همکاران گرامی در آزمایشگاه رادیوبیولوژی برای همکاری در نمونه‌گیری و انجام هر چه بهتر آزمایش‌ها کمال تشکر را داریم.

بدخیم (۵۷۰۶۴ 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، پیش‌ساز، 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 در تومورهای 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 درجه‌ی 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

## 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 cancerogenesis 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, Pederson T. 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 mesenchymal 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.<sup>1\*</sup>, Saed S., M.Sc.<sup>2</sup>, Babaei E., M.Sc.<sup>3</sup>, Montazeri V., M.D.<sup>4</sup>, Halimi M., Ph.D.<sup>5</sup>

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 Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).  $\beta$ 2m 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 expression in breast tumors rather than in adjacent normal tissues. Nucleostemin expression level was significantly correlated with proliferation 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 determining breast tumors stage and future metastases. Moreover, nucleostemin inhibition can be an effective strategy in decreasing the proliferation of breast tumor cell lines

**Keywords:** Nucleostemin, Breast neoplasms, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

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