

بررسی مقایسه‌ای بروز پروتئین مهارکننده تومور RB در نمونه‌های سرطانی و سالم کولورکتال توسط روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر مهدی نیکبخت دستجردی^۱، گلناز رئیسی^۲

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های دستگاه گوارش است که چگونگی بروز پروتئین‌های P21، P53، E-Catherine و β -Catenin در پیش‌آگهی این بدخیمی مؤثر است. هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی وضعیت پروتئین Retinoblastoma (RB) در سلول‌های توموری و غیر توموری کولون افراد مبتلا به این بدخیمی از طریق روش ایمونوهیستوشیمی بود.

روش‌ها: نمونه‌ها از نقاط مورد نظر بلوک‌های توموری و غیر توموری ۵۰ بیمار مبتلا سرطان کولورکتال برداشته شد و برش‌های حاصل به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی و بروز پروتئین RB در آن‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: بروز پروتئین RB در سلول‌های توموری بیش از سلول‌های غیر توموری کولون افراد مبتلا بود ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: بیان بیش از حد این پروتئین در سلول‌های توموری کولورکتال می‌تواند منجر به فقدان حساسیت به آپوپتوز شود و در نهایت باعث افزایش طول عمر سلول‌های نابجا و افزایش مقاومت به درمان گردد.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، ایمونوهیستوشیمی، ژن مهارکننده تومور، رتینوبلاستوما

مقدمه

کریپت‌های کولون به طور پیوسته در حال ترمیم هستند که لازم است به منظور ایجاد تعادل بین تکثیر، تمایز و مرگ سلولی جهت حفظ هموستاز طبیعی بافتی به صورت دقیق و جامع انجام گیرد. در یک کولون طبیعی، سلول‌های زایا (Proliferating cells) به قسمت‌های بالای کریپت (جایی که تمایز پیدا می‌کنند)، مهاجرت می‌کنند و سپس آپوپتوز غیر وابسته به پروتئین P53 در سطح لومینال انجام می‌شود (۳-۲). این با آپوپتوزی که وابسته به P53 است (که در پاسخ به آسیب DNA رخ می‌دهد)، متفاوت می‌باشد (۴). پروتئین Retinoblastoma (RB) نیز در تنظیم چرخه‌ی

سرطان کولورکتال شایع‌ترین سرطان دستگاه گوارش می‌باشد که عامل اصلی بروز آن به طور دقیق شناخته نشده است. این سرطان با توجه به عامل جنسیت در بین زنان، پس از سرطان ریه و پستان رتبه‌ی سوم را از نظر شیوع دارد و در بین مردان پس از سرطان ریه و پروستات قرار می‌گیرد. از نظر مرگ و میر در زنان پس از سرطان پستان شایع‌ترین علت مرگ می‌باشد. طبق آمارهای موجود، بروز سرطان کولون تا سال ۱۹۹۲ به مدت ۴۰ سال ثابت بود؛ هر چند که علت مرگ و میر آن رو به کاهش بوده است (۱).

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای به شماره‌ی ۳۹۰۵۷۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

^۱ دانشیار، گروه آناتومی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

سلولی، تمایز و آپوپتوز در سایر بافت‌ها دخالت دارد. با این حال، نقش این پروتئین در کولون و سرطان کولورکتال، هنوز به طور واضح مشخص نشده است (۷-۵). پروتئین RB به وسیله‌ی ژن مهارکننده‌ی تومور RB-1 کدگذاری می‌شود و بخشی از Pocket protein همراه با دو پروتئین مرتبط P_{107} و P_{130} می‌باشد.

واژه‌ی Pocket protein مشتق از ۳ پروتئین همولوگ در حوزه‌ی A/B Pocket (که یک ناحیه‌ی جهش‌زای‌های توموری است)، انکوپروتئین متصل شونده‌ی ویروسی و تداخل E_2F است (۸).

کمپلکس‌های Cyclin-cdk اتصال Pocket protein‌ها را تنظیم می‌کنند. کمپلکس E_2F به وسیله‌ی فسفریلاسیون Pocket protein در چرخه‌ی سلولی دخالت می‌نماید (۹). برای مثال، اثر متقابل پروتئین RB هیپوفسفریله با E_2F-1 از ورود سلول به فاز S (Synthesis) جلوگیری می‌کند (۱۰)؛ یعنی پروتئین RB و سایر بخش‌های خانواده‌ی Pocket protein نقش مهمی را در سیکل سلولی و تکثیر سلولی ایفا می‌نمایند (۱۴-۱۱).

مطالعات قبلی نقش پروتئین RB را در تنظیم آپوپتوز سلولی تأیید می‌کنند (۱۵). آزمایشات انجام شده بر روی سلول‌های SAOS-2 استئوسارکوما که فقدان عملکرد پروتئین RB را داشتند، نشان می‌دهد که در غیاب این پروتئین، آپوپتوز سلول‌های مرده به طور گسترده انجام می‌شود (در مقایسه با سلول‌های SAOS-2 که انواعی از این پروتئین را داشتند) (۶). مطالعه‌ی دیگری گزارش کرده است که غیر فعال‌سازی ژن RB-1 در فیبروبلاست‌های امبریونیک موش‌ها، باعث القای آپوپتوز می‌شود (۱۶).

بنابراین، به نظر می‌رسد پروتئین RB در برخی

سیستم‌های سلولی، آپوپتوز را مهار می‌کند. این مهار ممکن است از طریق تجزیه‌ی پروتئین E_2F-1 که می‌تواند آپوپتوز را القا کند انجام گیرد (۱۸-۱۷). در این مورد، لازم است که پروتئین RB قبل از رخ دادن آپوپتوز برداشته یا غیرفعال شود. برای تأیید این مطلب، یک پروتئین ۳۰ کیلوبازی در سلول‌های آپوپتوتیک از سلول‌های توموری کولون شناسایی شده است که نشان می‌دهد در حین انجام فرایند آپوپتوز پروتئین RB شکسته می‌شود (همچنین در سلول‌های فیروبللاست و لنفوسیت مشاهده شده است) (۲۰-۱۹). بنابراین شکست در انتهای C- پروتئین RB منجر به تولید پلی پپتید ۵ کیلودالتونی P_{100} می‌شود (۲۱). پروتئین RB P_{100} همچنان می‌تواند به E_2F-1 متصل شود و فعالیت رونویسی E_2F -mediated را مهار کند؛ هر چند که این عملکرد ضد آپوپتوزی ضعیف شده است (که شاید از طریق ناتوانی آن در اتصال به انکوژن mDm_2 باشد). بنابراین به نظر می‌رسد که عملکرد Growth suppressive و Anti Apoptotic پروتئین RB مجزا از یکدیگر باشد.

فقدان عملکرد پروتئین RB به علت جهش یا حذف ژنی نه تنها در رتینوبلاستوما، بلکه در انواع زیادی از تومورها (شامل مثانه، پستان، ریه و سرطان تخمدان) نیز دیده می‌شود (۲۵-۲۲). البته فقدان یا غیرفعال بودن ژن RB-1 در تومورهای کولورکتال چندان متداول نیست (۲۷-۲۶). تنها حدود ۱۱ درصد از کارسینوماهای کولورکتال فقدان آللیک روی کروموزوم ۱۳ را نشان می‌دهند (۲۸).

در عوض، در تومورهای کولورکتال، RB-1 mRNA به طور قابل توجهی نسبت به مخاط طبیعی کولون بیان شده است (۲۹) که ممکن است منجر به افزایش بیان

RB-Relted-Kinas های cdc_2 و cdk_2 شود (۳۰).

به علاوه، مطالعات انجام شده حفظ عملکرد پروتئین RB در سلول‌های کولورکتال را تأیید می‌کنند. نتایج به دست آمده از یک مطالعه‌ی انجام شده در محیط سلولی بیان می‌کند که پروتئین RB در بافت طبیعی اپی‌تلیوم کولون در ناحیه‌ی Midcrypt لوکالیزه می‌شود، در حالی که سلول‌های تمایز یافته در ناحیه‌ی RB negative top of crypt بوده‌اند.

با توجه به اهمیت این پروتئین و نیز با توجه به این که سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها است و تعیین پیش‌آگهی این بیماران اهمیت فراوانی در امر درمان و تعیین مدت بقای آن‌ها دارد، در این تحقیق بیان این پروتئین را در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در مقایسه با بافت طبیعی مجاور تومور از طریق روش ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌های سرطانی در شهر اصفهان بررسی کردیم.

روش‌ها

این مطالعه به روش مورد-شاهدی بر روی بلوک‌های پارافینی تهیه شده از بخش توموری کولون ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال (به عنوان مورد) و بافت سالم مجاور همان نمونه‌های توموری (به عنوان شاهد) در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان انجام گرفت.

معیار انتخاب نمونه‌ها، تأیید وجود آدنوکارسینوم کولورکتال در بررسی هیستوپاتولوژی اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین و ائوزین نمونه‌ها بود.

در این مطالعه، توسط میکروتوم برش‌هایی به قطر ۴-۵ میکرون از بلوک‌های پارافینی (هم نمونه‌های سرطانی و هم نمونه‌های بافت طبیعی) تهیه شد. سپس

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام گردید. برای این کار، پارافین‌زدایی توسط غوطه‌ورسازی نمونه‌ها در گزلیل انجام شد و توسط اتانول‌های نزولی (۹۹، ۹۵ و ۷۰ درصد) آب‌دهی صورت گرفت. پس از آن برای توقف فعالیت Endogenous peroxide، برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۵ درصد انکوبه شدند و سپس شستشو و آب‌گیری شدند. Antigen retrieval با قراردادن نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در دمای ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در بافر ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم در میکروویو انجام شد. پس از آن برش‌ها به مدت ۵ دقیقه به Tris با فرماسالین منتقل شدند. فعالیت Endogenous peroxide توسط سرم طبیعی ۱۰ درصد (Goat) در TBS به مدت ۵ دقیقه متوقف شد و سرم اضافی برداشت گردید. آنتی‌بادی اولیه با دقت ۱:۲۰۰ به نمونه اضافه گردید و نمونه در حرارت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد و پس از آن با TBS ۲ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو انجام شد. به طور مجدد نمونه‌ها با آنتی‌بادی ثانویه با دقت ۱:۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند و شستشوی مجدد، ۲ بار با TBS و هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. واکنش کروموزنیک توسط Diaminobezidine انجام شد و نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی مخالف با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند.

پس از تهیه‌ی لام ایمونوهیستوشیمی، بررسی میکروسکوپی مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی انجام گردید. برای این کار مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی به منظور بررسی میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری و به کارگیری نرم‌افزار MotiC advance plus 2 در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت

در جدول ۱ ثبت شده است. در این مطالعه، نمونه‌ها به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ آمیزی شده بودند.

جدول ۱. مشخصات دموگرافیک ۵۰ نمونه‌ی مبتلا به سرطان آدنوکارسینوما‌ی کولورکتال

متغیر	تعداد
جنس	مرد ۳۳
	زن ۱۷
سن	≥ 60 ۳۲
	≤ 59 ۱۸
نوع تومور	آدنوکارسینوما‌ی موسینی ۸
	آدنوکارسینوما‌ی غیرموسینی ۴۲
Grade	G1 ۳۱
	G2 ۱۴
	G3 ۵
محل تومور	کولون ۳۶
	رکتوسیگموئید ۱۴

قبل از مراحل آماده‌سازی بافت، تمامی نمونه‌ها مورد تأیید پاتولوژی قرار گرفت. بروز پروتئین RB به طور عمده در هسته‌ی سلول‌های اپی‌تلیال بود و بر حسب بروز پروتئین RB، هسته‌ی سلول‌ها به دو دسته‌ی آبی و قهوه‌ای تقسیم شدند. سلول‌های قهوه‌ای نمایانگر بیان پروتئین RB و سلول‌های آبی نشان از عدم بیان این پروتئین بود (شکل ۱).

برای ردیابی پروتئین RB در نمونه‌ها، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Motic advance plus 2 در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویربرداری شد و سپس جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده گردید. در این بررسی حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد. درصد سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها رنگ‌آمیزی شده

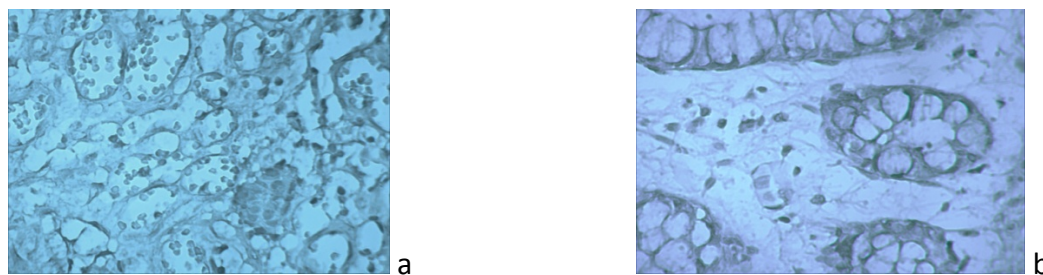
تصویربرداری شدند و سپس جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده گردید. در این بررسی، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد و درصد سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها رنگ‌آمیزی شده بود، تعیین گردید. در گروه‌های شاهد ++ از PBS به جای آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده شد.

پس از آن درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به رنگ قهوه‌ای نسبت به سلول‌هایی که رنگ آبی گرفته بودند، در هر بافت مشخص گردید و بر این اساس نمونه‌های سرطانی به سه گروه تقسیم شدند. گروه ++ که میزان بروز پروتئین در آن‌ها مشابه بافت طبیعی مجاور بود (درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم کمتر از ۲ برابر بود)، گروه +++ که میزان بروز پروتئین در آن نسبت به بافت طبیعی مجاور افزایش یافته بود (درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی بین ۲ تا ۲/۴۹ برابر بود) و گروه ++++ که میزان بروز پروتئین در آن نسبت به بافت طبیعی به شدت افزایش یافته بود (درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی بالای ۲/۵ برابر بود).

آنالیز آماری اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و با به کارگیری آزمون‌های χ^2 و Student-t انجام گرفت. از نظر آماری یافته‌های با مقدار $P < 0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۵۰ نمونه‌ی سرطان کولورکتال به عنوان گروه آزمایش و ۵۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های تومور، به عنوان گروه شاهد استفاده گردید. خصوصیات دموگرافیک نمونه‌های سرطانی که شامل سن، جنس، محل تومور و نوع تومور می‌باشد،



شکل ۱. بروز پروتئین RB در نمونه‌های بافت سرطانی (a) و بافت سالم مجاور تومور (b). در کلیه نمونه‌ها اعم از سرطانی و سالم دو دسته سلول قابل مشاهده است: دسته‌ی اول سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها رنگ قهوه‌ای گرفته است و دسته‌ی دوم سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به رنگ آبی می‌باشد (بزرگ‌نمایی $\times 400$)

جدول ۲. مقایسه‌ی بروز پروتئین RB در نمونه‌های سرطانی کولورکتال با بافت سالم مجاور (مارژین)

مقدار P	گروه		متغیر
	مارژین	تومور	
$< 0/001$	$0/63 \pm 0/1$	$1/67 \pm 0/1$	نسبت سلول‌های قهوه‌ای به آبی *
	۵۰ (۱۰۰)	۲ (۴)	++
$< 0/001$	۰	۲۳ (۴۶)	+++ سلول‌ها**
	۰	۲۵ (۵۰)	++++

** (درصد) تعداد

*: انحراف معیار \pm میانگین

سلولی، تمایز و آپوپتوز در سیستم‌های مختلف سلولی ایفا می‌کند.

این فرایندها در حفظ هموستاز بافتی در کریپت‌های کولون حیاتی هستند. با این حال میزان مطالعات درباره‌ی نقش این پروتئین در کولون زیاد نبوده است.

بیان سایر پروتئین‌ها مانند Bax، Bcl-2، TGF β و IGFBP-3 نقش مهمی در ساختار این Cryptها داشته‌اند.

مطالعات قبلی نشان داده است که بیان پروتئین RB در سلول‌های اپی‌تلیال کولون به میزان زیاد در ناحیه‌ی تمایز رخ نمی‌دهد، بلکه بیشتر در Base and mid crypt رخ می‌دهد و بیان این پروتئین به طور قابل توجهی در Top of normal Crypt کاهش یافته است. در مطالعه منتشر شده توسط Yamamoto و همکاران نیز تنظیم کاهشی بیان این پروتئین در Top of Colonic Crypt

بود، تعیین گردید و بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های طبیعی مجاور بررسی شد. با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با به کارگیری آزمون‌های χ^2 و Student-t مشخص گردید که بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور به طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/001$).

نتایج به دست آمده در جدول ۲ نشان داده شده است. طبق جدول ۲، ۴ درصد نمونه‌های توموری در گروه ++، ۴۶ درصد در گروه +++ و ۵۰ درصد در گروه ++++ قرار گرفت. همچنین ۱۰۰ درصد نمونه‌های بافت سالم مجاور در گروه ++ قرار گرفت که نشان دهنده‌ی افزایش بیان این پروتئین در نمونه‌های توموری بود.

بحث

پروتئین RB نقش مهمی را در تنظیم چرخه‌ی

نشان داده شده است (۳۱).

مطالعه‌ی Guy و همکاران در محیط *In vitro*، در بررسی بیان این پروتئین در سلول‌های پیش سرطانی اپی‌تلیال کولون‌ها نشان داد که پروتئین RB در Colonic adenoma-derived cell lines تنظیم کاهش داشت، در حالی که فرایند تمایز افزایش یافته بود. جالب توجه است که با وجود این که در لایه‌های سلولی تومور (PC/AA/C1/SB10) فرایند تمایز القا شده بود، اما پروتئین RB کاهش نیافته بود (۳۲).

این یافته‌ها تأیید می‌کند اگر چه بیان پروتئین RB برای القای تمایز صورت می‌پذیرد، اما ضرورت ندارد و بیان این پروتئین در سلول‌های توموری به صورت نابجا (Aberant) اتفاق می‌افتد.

طی بررسی‌های انجام شده مشخص شد که در سرطان کولون پروتئین فعال RB حفظ شده و به صورت افزایشی تنظیم شده است. به علاوه این موضوع با سطوح بالای رونویسی RB که طبیعی بود، همراه است که حفظ عملکرد پروتئین RB در سلول‌های سرطان کولورکتال را بیان می‌کند.

نقش پروتئین RB به عنوان یک فاکتور حیاتی در تعدادی از انواع سلولی کشف شده است، در صورتی که اگر ژن RB-1 یا پروتئین RB در سلول‌ها وجود نداشت یا عملکردی نبود، مرگ سلولی آپوپتوتیک افزایش می‌یافت؛ به طوری که موش‌هایی که نقص ژن RB-1 داشتند، در نتیجه‌ی آپوپتوز زیاد Viable نبودند. Guy و همکاران نشان دادند که HPVE₇ به پروتئین RB متصل می‌شود و آن را غیرفعال می‌کند و در نتیجه باعث افزایش آپوپتوز خود به خود و آپوپتوز وابسته به آسیب DNA می‌شود (در سلول‌های adenoma-derived) (۳۲).

مهار بیان پروتئین RB در سلول‌های تمایز یافته، سلول‌ها را برای آپوپتوز حساس‌تر می‌کند. در سلول‌های آپوپتوز شده کولون، محصولات تجزیه شده‌ی پروتئین RB مشاهده شد که نشان می‌دهد که در حین آپوپتوز این پروتئین تجزیه می‌شود (۳۲).

Browne و همکاران یک نقش برای پروتئین RB در کنترل تعداد سلول‌ها در کولون پیشنهاد دادند و این فرضیه که پروتئین RB یک فاکتور حیاتی در کولون است، مطرح شد (۱۹).

در مطالعه‌ی Guy و همکاران نیز عملکرد پروتئین RB به عنوان یک فاکتور حیاتی در سلول‌های اپی‌تلیال معرفی شد. بر اساس این مطالعه، سرکوب بیان پروتئین RB از طریق رونویسی در نزدیکی TOP of the crypt پیشنهاد شد. سلول‌هایی که پروتئین RB را حفظ کردند، به علت عملکرد آنتی‌آپوپتیک این پروتئین، در برابر آپوپتوز محافظت می‌شوند (۳۲). در حمایت از این نظریه Yamamoto و همکاران نشان دادند، در صورتی که RB-1 mRNA در سلول‌های کارسینوما‌ی کولون به وسیله‌ی Anti sense-oligodeoxynucleotid مورد هدف قرار داده شود، باعث کاهش ۷۰ درصدی در بیان پروتئین RB می‌شود و به دنبال آن آپوپتوز القا می‌گردد (۳۱). این فرضیه نشان می‌دهد که باقی ماندن این پروتئین در سلول‌های توموری کولون باعث فرار این سلول‌ها از مرگ می‌شود. بنابراین نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی Guy و همکاران (۳۲) در سلول‌های پیش بدخیم با استفاده از HPV-E₇ در سرکوب پروتئین RB با نتایج Yamamoto و همکاران (۳۱) مطابقت داشت.

جالب است که این دو مطالعه‌ی غیر وابسته نتیجه‌ای مغایر با نقش مرسوم پروتئین RB (به عنوان مهارکننده‌ی

کمی و کیفی صورت گرفت که می‌تواند از مزایای این مطالعه باشد.

با توجه به سایر تحقیقات بین میزان بیان پروتئین و بروز سرطان رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت. بر همین اساس پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده ارتباط بیان پروتئین در سطح بافت با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بیان بیش از حد پروتئین RB در سلول‌های توموری کولورکتال می‌تواند منجر به فقدان حساسیت به آپوپتوز شود و در نهایت باعث افزایش طول عمر سلول‌های نابجا و افزایش مقاومت به درمان گردد.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمامی اعضای آزمایشگاه پاتولوژی دکتر مهاجری به خصوص سرکار خانم محمودی به دلیل همکاری همه‌جانبه تشکر و قدردانی می‌شود.

تومور) را نشان دادند. در واقع بیان این پروتئین می‌تواند منجر به رشد سلول‌های کولورکتال شود.

به طور خلاصه، بیان پروتئین RB در نزدیکی Top of the normal crypt کاهش پیدا کرد. در مدل‌های استفاده شده در آزمایشگاه نشان داده شد که بیان این پروتئین در سلول‌های تمایز یافته از طریق رونویسی تنظیم می‌شود و این سطح از تنظیم در سلول‌های توموری کاهش می‌یابد. نتیجه‌ی عملکردی کاهش پروتئین RB، افزایش پاسخ سلولی به سیگنال‌های آپوپتوتیک می‌باشد.

بیان این پروتئین در تومور کولورکتال مغایر با نقش مرسوم پروتئین RB (به عنوان مهارکننده‌ی تومور) می‌باشد که باعث ایجاد سلول‌هایی با قابلیت فرار از آپوپتوز و در نتیجه منجر به افزایش حیات سلول‌های نابجا می‌شود.

در این تحقیق بیان ژن RB در سطح پروتئین بررسی شد. این بررسی با دقت بسیار بالا و شمارش حداقل ۱۰۰۰ سلول در ۱۰ محدوده‌ی مختلف از نظر

References

1. Corman ML. Colon and Rectal surgery. 5th ed. New York, NY: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
2. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3): 493-501.
3. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 12): 3569-77.
4. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, et al. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 1994; 54(3): 614-7.
5. Coppola JA, Lewis BA, Cole MD. Increased retinoblastoma gene expression is associated with late stages of differentiation in many different cell types. *Oncogene* 1990; 5(11): 1731-3.
6. Haas-Kogan DA, Kogan SC, Levi D, Dazin P, T'Ang A, Fung YK, et al. Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *EMBO J* 1995; 14(3): 461-72.
7. Sellers WR, Kaelin WG. RB [corrected] as a modulator of transcription. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288(1): M1-M5.
8. Paggi MG, Baldi A, Bonetto F, Giordano A. Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review. *J Cell Biochem* 1996; 62(3): 418-30.
9. Beijersbergen RL, Bernards R. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287(2-3): 103-20.
10. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81(3): 323-30.

11. Clarke AR, Maandag ER, van RM, van der Lugt NM, van d, V, Hooper ML, et al. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 1992; 359(6393): 328-30.
12. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992; 359(6393): 295-300.
13. Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, et al. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992; 359(6393): 288-94.
14. Zacksenhaus E, Jiang Z, Chung D, Marth JD, Phillips RA, Gallie BL. pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. *Genes Dev* 1996; 10(23): 3051-64.
15. Endo T, Goto S. Retinoblastoma gene product Rb accumulates during myogenic differentiation and is deinduced by the expression of SV40 large T antigen. *J Biochem* 1992; 112(4): 427-30.
16. Almasan A, Yin Y, Kelly RE, Lee EY, Bradley A, Li W, et al. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12): 5436-40.
17. Qin XQ, Livingston DM, Kaelin WG, Jr., Adams PD. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(23): 10918-22.
18. Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG, Jr., Livingston DM, et al. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 1996; 85(4): 549-61.
19. Browne SJ, Williams AC, Hague A, Butt AJ, Paraskeva C. Loss of APC protein expressed by human colonic epithelial cells and the appearance of a specific low-molecular-weight form is associated with apoptosis in vitro. *Int J Cancer* 1994; 59(1): 56-64.
20. An B, Dou QP. Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res* 1996; 56(3): 438-42.
21. Chen WD, Otterson GA, Lipkowitz S, Khleif SN, Coxon AB, Kaye FJ. Apoptosis is associated with cleavage of a 5 kDa fragment from RB which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding. *Oncogene* 1997; 14(10): 1243-8.
22. Berns EM, de KA, van Putten WL, van Staveren IL, Bootsma A, Klijn JG, et al. Association between RB-1 gene alterations and factors of favourable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. *Int J Cancer* 1995; 64(2): 140-5.
23. Hiyama K, Ishioka S, Shirotani Y, Inai K, Hiyama E, Murakami I, et al. Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb. *Oncogene* 1995; 10(5): 937-44.
24. Takano H, Okamoto A, Terashima Y, Yokota J. High-incidence of allelic loss at the rb gene locus in advanced human ovarian-cancer. *Int J Oncol* 1995; 6(1): 129-35.
25. Miyamoto H, Shuin T, Ikeda I, Hosaka M, Kubota Y. Loss of heterozygosity at the p53, RB, DCC and APC tumor suppressor gene loci in human bladder cancer. *J Urol* 1996; 155(4): 1444-7.
26. Meling GI, Lothe RA, Borresen AL, Hauge S, Graue C, Clausen OP, et al. Genetic alterations within the retinoblastoma locus in colorectal carcinomas. Relation to DNA ploidy pattern studied by flow cytometric analysis. *Br J Cancer* 1991; 64(3): 475-80.
27. Ali AA, Marcus JN, Harvey JP, Roll R, Hodgson CP, Wildrick DM, et al. RB1 protein in normal and malignant human colorectal tissue and colon cancer cell lines. *FASEB J* 1993; 7(10): 931-7.
28. Wildrick DM, Boman BM. Does the human retinoblastoma gene have a role in colon cancer? *Mol Carcinog* 1994; 10(1): 1-7.
29. Gope R, Christensen MA, Thorson A, Lynch HT, Smyrk T, Hodgson C, et al. Increased expression of the retinoblastoma gene in human colorectal carcinomas relative to normal colonic mucosa. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(4): 310-4.
30. Yamamoto H, Monden T, Ikeda K, Izawa H, Fukuda K, Fukunaga M, et al. Coexpression of cdk2/cdc2 and retinoblastoma gene products in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995; 71(6): 1231-6.
31. Yamamoto H, Soh JW, Monden T, Klein MG, Zhang LM, Shirin H, et al. Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinomas may protect cells from apoptosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5(7): 1805-15.
32. Guy M, Moorghen M, Bond JA, Collard TJ, Paraskeva C, Williams AC. Transcriptional down-regulation of the retinoblastoma protein is associated with differentiation and apoptosis in human colorectal epithelial cells. *Br J Cancer* 2001; 84(4): 520-8.

A Comparative Survey on the Expression of Retinoblastoma Protein as A Tumor Suppressor Protein in Cancerous and Non-Cancerous Colorectal Tissue Samples Using Immunohistochemistry Method

Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD¹, Golnaz Raeesi²

Abstract

Background: Colorectal cancer is one of the most prevalent gastrointestinal malignancies. Expression of some proteins including P53, P21, E-cadherin and β -catenin is assumed to have a prognostic role for this malignancy. In the present study we evaluated the association of retinoblastoma (RB) protein expression and pathogenesis of colorectal cancer. The presence of RB in cancerous and non-cancerous colorectal tissue samples were compared using immunohistochemistry method.

Methods: Tissue sections were taken from tumoral and non-tumoral defined areas of 50 colorectal cancer patients. After coloration according to immunohistochemistry method, all samples were studied for RB expression.

Findings: We found RB expression in colorectal tumoral cells to be significantly higher than that of non-tumoral cells ($P < 0.0001$).

Conclusion: RB overexpression in cancerous cells may lead to insensibility to apoptosis and consequent long life of affected cells as well as resistance to treatment.

Keywords: Colorectal cancer, Immunohistochemistry, Tumor suppressor gene, Retinoblastoma.

* This paper is derived from a medical doctorate thesis No. 390575 in Isfahan University of Medical Sciences.

¹ Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

² Student of Medicine, School of Medicine And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD, Email: nikbakht@med.mui.ac.ir