

شناسایی یوبیکوئیتین D از بافت‌های پارافینه، در بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ

امیر ایزدی^۱، دکتر الهام مسلمی^۲، دکتر سید محمد پورحسینی^۳، دکتر وحید رضا یاسایی^۴،
دکتر حمیدرضا خیری منجیلی^۵، حمیدرضا الیکایی^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان روده یکی علل مهم مرگ و میر ناشی از سرطان است. یوبیکوئیتین (UBD یا Ubiquitin D) و پروتئین‌های شبه یوبیکوئیتین، ناقلا ن سیگنال رسانی هستند که چندین عملکرد سلولی دارند و ترمیم DNA را کنترل می‌کنند. همچنین افزایش UBD با بیان p۵۳ مرتبط است؛ به طوری که در بسیاری موارد، باعث تسریع پیشرفت سرطان می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی یوبیکوئیتین D به عنوان یک نشانگر جهت تشخیص اولیه‌ی سرطان روده‌ی بزرگ و همچنین بررسی پیشرفت بیماری در افراد مبتلا به بیماری می‌باشد.

روش‌ها: ۳۰ نمونه‌ی بلوک پارافینه‌ی بافت افراد مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ و ۱۰ نمونه‌ی بافت سالم، پس از استخراج RNA (Ribonucleic acid) و سنتز cDNA (Complementary DNA) مطابق دستورالعمل کیت‌های مورد استفاده، آزمایش RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction) جهت شناسایی ژن UBD و ژن بتا اکتین (β -actin) به عنوان شاهد داخلی بهینه گردید.

یافته‌ها: محصول RT-PCR ژن UBD، ۳۹۵ جفت باز و آمپلیکون تکثیر یافته از ژن β -actin ۳۵۰ جفت باز اندازه شد. آزمایش RT-PCR ژن بتا اکتین در تمامی نمونه‌ها مثبت شد. از ۳۰ نمونه بلوک تهیه شده از افراد مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ، در ۱۸ نمونه (۹۵ درصد) آزمایش RT-PCR در مردان و در ۱۱ نمونه (۱۰۰ درصد) در زنان پاسخ مثبت داشتند که فقط ۱ نمونه (۵ درصد) در مردان منفی گزارش شد و مابقی نمونه‌ها مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: UBD نقش مهم و مؤثری در تشخیص سرطان روده‌ی بزرگ به عنوان یک نشانگر مؤثر، مستقل از مرحله‌ی تومور، بر عهده دارد و بررسی آن در شناسایی و تشخیص مراحل اولیه‌ی بیماری مهم و مؤثر است. نتایج نشان داد که در افراد بیمار ۹۷ درصد UBD بیان می‌شود و در افراد سالم این عدد به ۵ درصد کاهش می‌یابد.

واژگان کلیدی: Ubiquitin D، سرطان روده‌ی بزرگ، Reverse transcription-Polymerase chain reaction

ارجاع: ایزدی امیر، مسلمی الهام، پورحسینی سید محمد، یاسایی وحید رضا، خیری منجیلی حمیدرضا، الیکایی حمیدرضا. شناسایی یوبیکوئیتین D از بافت‌های پارافینه، در بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۱): ۹۷۲-۹۸۱

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنومی، دانشکده‌ی علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- استادیار، گروه نانوفناوری دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان و مؤسسه‌ی تحقیقاتی بانز اکسیر، تهران، ایران

۶- بخش هماتولوژی-ایمونولوژی، آزمایشگاه پاتوبیولوژی، بیمارستان سجاد و مؤسسه‌ی تحقیقاتی بانز اکسیر، تهران، ایران

مقدمه

سرطان روده یکی از دلایل عمده‌ی مرگ و میر ناشی از سرطان بوده است (۱-۲) و پس از سرطان‌های پستان، پروستات و ریه شایع‌ترین سرطان در دنیا می‌باشد (۳). این بیماری در ایران و همچنین سایر کشورهای جهان، سالانه از لحاظ اقتصادی آسیب‌های بسیار زیادی را وارد می‌کند. میزان سرطان در ۲۰ سال گذشته افزایش چشم‌گیری داشته است که این مطلب ناشی از تغییرات محیط، شیوه‌ی زندگی و نیز عادات غذایی می‌باشد (۴).

در ایران سالانه ۵۰۰۰ مورد جدید ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ (۷ در ۱۰۰۰۰) گزارش می‌شود. بر اساس آمار منتشر شده توسط وزارت بهداشت ایران، در سال ۱۳۸۴، حدود ۱۱۳۰ نفر شامل ۴۵۰ زن و ۶۸۰ مرد به علت این سرطان فوت نمودند (۵). در برخی مناطق جهان سرطان روده به دومین دلیل مرگ و میر تبدیل شده است (۶). بنابراین سرطان روده‌ی بزرگ، مشکلی مهم و جدی برای سلامت عمومی جامعه به حساب می‌آید. این سرطان به دو نوع ارثی و غیر ارثی تقسیم می‌شود. نوع ارثی نیز خود به دو نوع HNPCC (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) و FAP (Familial adenomatous polyposis) تقسیم می‌شود. به طور تقریبی ۸۰ درصد موارد غیر ارثی می‌باشند و ۲۰ درصد باقی‌مانده ارثی هستند، که از این میان ۱۰-۵ درصد مربوط به HNPCC می‌شود (۷).

در حال حاضر، برای درمان سرطان روده‌ی بزرگ به طور گسترده از جراحی استفاده می‌شود که این امر در مرحله‌ای از بیماری است که تومور سرطانی، رشد زیادی داشته است (۸). بنابراین نتایج بالینی که در بیماران تشخیص داده می‌شود، در مرحله‌ی تومورزایی قرار دارد (۹). بدیهی است که یک روش جدید جهت

تشخیص سریع‌تر بیماری و حتی قبل از عود کردن بیماری امری ضروری به نظر می‌رسد. در طی ۱۰ سال گذشته، تعداد زیادی انکوژن و ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور برای هر کدام از مراحل ایجاد کننده‌ی مسیر ژنتیکی سرطان کلون شناخته شده است. اگر چه این مطلب بیانگر آن است که موتاسیون به ترتیب خاصی اتفاق می‌افتد، اما تجمع موتاسیون‌ها به مراتب با اهمیت‌تر از ترتیب آن‌ها می‌باشد (۱۱-۱۰).

مطالعات نشان داده است که میزان یوبیکوئیتین D (UBD یا Ubiquitin D) که همچنین به عنوان FAT۱۰ نیز شناخته می‌شود، در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. UBD اولین بار در بافت رتیکولو اندوتلیال و سیستم لنفوئیدی مخاطی به عنوان یکی از ژن‌های لوکوس (Major histocompatibility complex) MHC کلاس I واقع در کروموزوم ۶ انسان شناخته شد (۱۲-۱۴). UBD نقش مهمی در تخریب پروتئین‌های مختلف بر عهده دارد، از جمله در تمایز سلولی، تنظیم چرخه‌ی سلولی، امبریوزیز، آپوپتوزیز، انتقال پیام، ترمیم DNA، انتقال عرض سلولی، پاسخ به استرس و پاسخ ایمنی؛ که تمامی این اعمال، به وسیله‌ی تخریب پروتئین‌ها انجام نمی‌شوند. نشانگرهای مولکولی مختلفی مانند p۵۳، K-Ras و DPC۴ در پیش‌بینی وجود سرطان روده‌ی بزرگ نقش دارند (۱۵، ۷).

تحقیقات نشان داده است میزان بیان UBD در ایجاد توده‌ی سرطانی مؤثر است (۱۶-۱۷). کاهش بیان UBD منجر به القای غیر طبیعی آپوپتوزیز، تقسیم سلولی و یا ناپایداری کروموزومی می‌شود که با تغییرات نئوپلازی همراه است. از طرف دیگر، افزایش بیان UBD در سرطان‌های کبد، سرویکس،

رعایت عوامل یکسان برای نمونه‌ها و ۱۰ نمونه از افراد سالم با شرایط مشابه جهت برش‌گیری، انتخاب و جمع‌آوری گردید. نمونه‌های تهیه شده مربوط به سال ۱۳۹۰ و افراد انتخاب شده از نظر سنی در طیف ۸۸-۳۰ ساله قرار داشتند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال داده شد و مراحل استخراج بلافاصله بر روی آن‌ها انجام گردید. همچنین نمونه‌ها برای نگهداری در زمان طولانی‌تر در یخچال با دمای 4°C درجه قرار گرفت و برای تأیید صحت روش نگهداری نمونه‌ها، پس از ۲ و ۶ ماه بعد، دوباره مورد استخراج RNA قرار گرفتند و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان RNA به دست آمده مقایسه شد که تغییر زیادی در میزان RNA بین دو نمونه بعد از استخراج مشاهده نگردید.

استخراج RNA از بافت پارافینه: برای استخراج RNA از بافت پارافینه، ابتدا توسط دستگاه میکروتوم ۵-۶ برش با اندازه‌ی $10\ \mu\text{m}$ از بافت تهیه و در میکروتیوب $1/5\ \text{ml}$ قرار داده شد. جهت پارافین‌زدایی $1\ \text{ml}$ گزیزولوز به نمونه افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای 56°C انکوبه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دور $13000\ \text{rpm}$ سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و سپس به بافت ته نشین شده، $1\ \text{ml}$ اتانول مطلق افزوده و چند بار وارونه گردید. لوله به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه در $13000\ \text{rpm}$ سانتریفوژ شد. بعد مایع رویی دور ریخته شد و پلت باقی مانده در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. این کار دوباره تکرار گردید تا پارافین به طور کامل از بافت، حذف و بافت تمیز و یکنواختی به دست آید.

تخمندان، پانکراس، معده و روده دیده شده است، اما در سرطان‌های کلیه، پروستات و تیروئید دیده نشده است. افزایش بیان UBD در سرطان معده با متاستاز همراه است و سطح mRNA (Messenger RNA) یوبیکوئیتین D و همچنین پروتئین آن به عنوان یک عامل غیر وابسته در بیماری شناخته شده است (۱۸). افزایش UBD با بیان p۵۳ مرتبط است که منجر به بیان UBD به طور غیر مستقیم و به دنبال آن تسریع پیشرفت سرطان معده می‌شود (۴، ۱۸). ارتباط بین بیان UBD با تمایز سلولی و مراحل پیشرفته‌ی تومور، بیانگر دخالت احتمالی UBD در پیشرفت کارسینوزن است.

به طور کلی، به نظر می‌رسد UBD به عنوان یک شاخص مهم در پیش‌بینی، تشخیص، بررسی پیشرفت سرطان روده و همچنین به عنوان یک عامل آگاهی دهنده‌ی عود مجدد، در بیماران مراحل II و III به دنبال جراحی عمل می‌کند. تا کنون، مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی اهمیت بالینی و ارزشیابی نقش پیش‌آگهی دهنده‌ی UBD در سرطان روده بزرگ گزارش نشده است و تحقیقات بسیار کمی در این زمینه در دنیا صورت گرفته است. هدف از این مطالعه، شناسایی UBD به عنوان یک نشانگر زیستی جهت تشخیص اولیه در افراد مبتلا به سرطان روده توسط تکنیک RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction) بود. همچنین وجود و عدم وجود UBD در افراد مبتلا به سرطان روده مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌ها: در این مطالعه، ۳۰ نمونه بلوک پارافینه‌ی بافت افراد مبتلا به سرطان روده، پس از بررسی توسط متخصص پاتولوژی و

(Diethylpyrocarbonate) حل و در فریزر $^{\circ}\text{C} -80$ نگهداری گردید.

سنتز cDNA (Complementary DNA): برای سنتز cDNA از کیت vivantis (2-steps RT-PCR Kit) استفاده شد. مراحل کار مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. ابتدا مقدار $10 \mu\text{l}$ RNA، به همراه $1 \mu\text{l}$ از 10 mM dNTP (deoxyribonucleotide) و $1 \mu\text{l}$ Random hexamer مخلوط گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در $^{\circ}\text{C} 65$ قرار داده شد. مقدار $2 \mu\text{l}$ از $10 \times \text{MMULV}$ و $0.5 \mu\text{l}$ آنزیم (Moloney murine leukemia virus) M-MLV به هر واکنش اضافه شد و در نهایت با اضافه کردن آب، حجم نهایی به $20 \mu\text{l}$ رسید. لوله‌ی نهایی به مدت ۱ ساعت در دمای $^{\circ}\text{C} 42$ انکوبه گردید.

پرایمرهای ویژه‌ی RT-PCR: توالی ژن β -actin که به عنوان شاهد داخلی مورد استفاده قرار گرفت و همچنین UBD از سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) به دست آمد و توسط برنامه‌ی Primer express پرایمرهای اختصاصی آن‌ها طراحی گردید. پرایمرها توسط NCBI و Gene Runner نیز (Basic local alignment search tool) شدند تا دقت و تخصصی بودن آن‌ها به طور کامل مورد ارزیابی قرار گیرد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

خرد کردن و هضم بافت: در این مرحله، ابتدا $100 \mu\text{l}$ بافر هضم کننده (سیناژن-ایران) به تیوب محتوای بافت افزوده شد، سپس $20 \mu\text{l}$ پروتیناز K (سیناژن-ایران 20 mg/ml) به این مخلوط افزوده شد و لوله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $^{\circ}\text{C} 56$ قرار گرفت و به دنبال آن، ۱۵ دقیقه در $^{\circ}\text{C} 80$ انکوبه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در 8000 rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی به لوله‌ی جدید منتقل گردید.

استخراج RNA به کمک محلول RNX Plus (سینا کلون، ایران): مقدار $1000 \mu\text{l}$ از محلول RNX به لوله‌ی جدید اضافه شد و سپس به مدت ۵ ثانیه ورتکس گردید. لوله به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. $200 \mu\text{l}$ کلروفورم افزوده شد، ۱۵ ثانیه ورتکس گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در 15000 rpm سانتریفوژ گردید. فاز رویی به لوله‌ی جدید انتقال داده شد و هم حجم آن ایزوپروپانول افزوده شد و سپس ۱۰ بار لوله وارونه گردید. لوله به مدت ۶ ساعت در $^{\circ}\text{C} -20$ نگهداری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در 13000 rpm سانتریفوژ شد و مایع رویی به آرامی و با وارونه کردن، تخلیه شد. به پلت حاصل، 1 ml اتانول 75 درجه اضافه و 10 مرتبه وارونه گردید. دوباره به مدت ۸ دقیقه در 7500 rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی تخلیه شد و پس از خشک شدن پلت، رسوب در $50 \mu\text{l}$ آب DEPC

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction)

نام پرایمر	توالی	وزن مولکولی
UBD F	AATGCTTCCTGCCTCTGTGT	۳۳۹ bp
UBD R	TTTCACTTGTGCCACTGAGC	
β -actin F	AGAAAATCTGGCACCCACACC	۳۹۵ bp
β -actin R	CTCCTTAATGTACGCACGA	

UBD: Ubiquitin D

به حساب می‌آید. محصول RT-PCR به دست آمده از این ژن نیز ۳۹۵ جفت باز طول داشت.

مقایسه‌ی نتایج یوبیکوئیتین D در نمونه‌های طبیعی و نمونه‌های افراد مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ: نتایج آزمایش RT-PCR برای ژن β -actin به عنوان شاهد داخلی در تمامی آزمایش‌ها مثبت دیده شد که این مطلب نشان دهنده‌ی صحت و دقت روش استخراج RNA مورد استفاده و همچنین تأیید سنتز cDNA وجود mRNA در این نمونه‌ها می‌باشد.

در این مطالعه، ۳۰ نمونه‌ی بافت سرطانی و ۱۰ نمونه‌ی بافت سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. از کل نمونه‌های مربوط به بیماران ۶۳ درصد از نمونه‌ها را مردان و ۳۷ درصد را زنان تشکیل دادند. از ۱۰ نمونه بلوک تهیه شده از افراد طبیعی، پاسخ آزمایش RT-PCR در تمام نمونه‌ها، منفی ارزیابی شد و از ۳۰ نمونه بلوک تهیه شده از افراد مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ، در ۱۸ نمونه (۹۵ درصد) آزمایش RT-PCR در مردان و در ۱۱ نمونه (۱۰۰ درصد) در زنان نیز پاسخ مثبت داشتند. از این تعداد، فقط ۱ نمونه (۵ درصد) در مردان منفی بود و هیچ نمونه‌ای در زنان منفی گزارش نشد.

همچنین با بررسی گروه‌های سنی در مردان و زنان، می‌توان به این امر اشاره داشت که سن سرطان در مردان نسبت به زنان کمتر است. نتایج در نمونه‌های مورد نظر در جدول ۲ و شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی TBE ۰/۵ X الکتروفورز گردید. شکل ۱ نتایج الکتروفورز محصول PCR رنگ‌آمیزی شده با سایبر گرین از نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

مواد لازم جهت انجام آزمایش RT-PCR: هر واکنش شامل ۲ μ l cDNA الگو (cDNA ساخته شده)، ۲/۵ μ l از ۱۰ X PCR buffer، ۱ μ l از هر یک از دو پرایمر جلویی و عقبی ۱۰ mM، ۰/۷۵ μ l از ۱۰ mM dNTP، ۰/۵ μ l از ۵۰ mM MgCl_۲ (dATP، dCTP، dGTP و dTTP) و ۰/۴ μ l از ۵ u/ μ l Taq DNA polymerase بود و واکنش در حجم نهایی ۲۵ μ l تهیه شد. پروتکل دمایی به صورت دانتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه به دنبال آن ۳۵ سیکل، به صورت دانتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در دمای ۶۱ °C به مدت ۳۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ °C به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

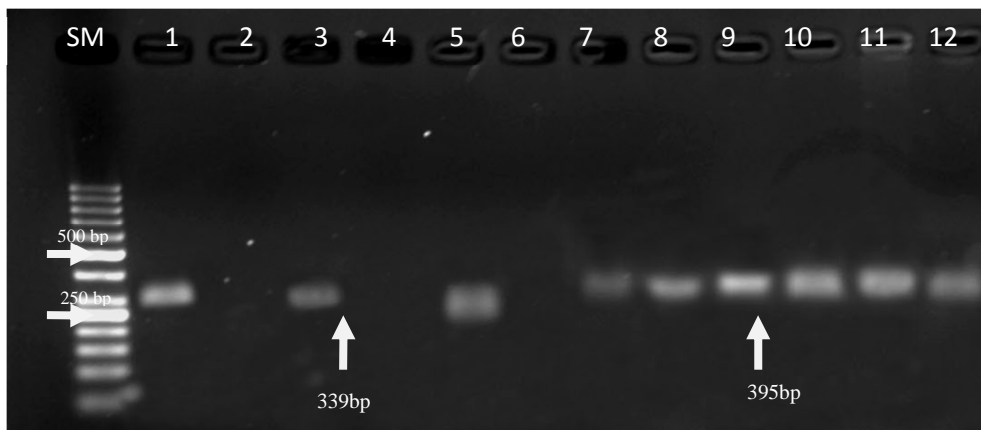
یافته‌ها

نتیجه‌ی بهینه‌سازی آزمایش RT-PCR برای ژن‌های UBD و β -actin: پس از بهینه‌سازی آزمایش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن آمپلیکون تکثیر یافته در کنار نمونه‌ی شاهد منفی و اندازه‌ی نشانگر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی سایبر گرین (سیناژن-ایران) در بافر TBE (Tris/Borate/EDTA) ۰/۵ X الکتروفورز گردید. مشاهده می‌شود باند حاصل از محصول RT-PCR برای ژن یوبیکوئیتین D ۳۳۹ جفت باز طول داشت.

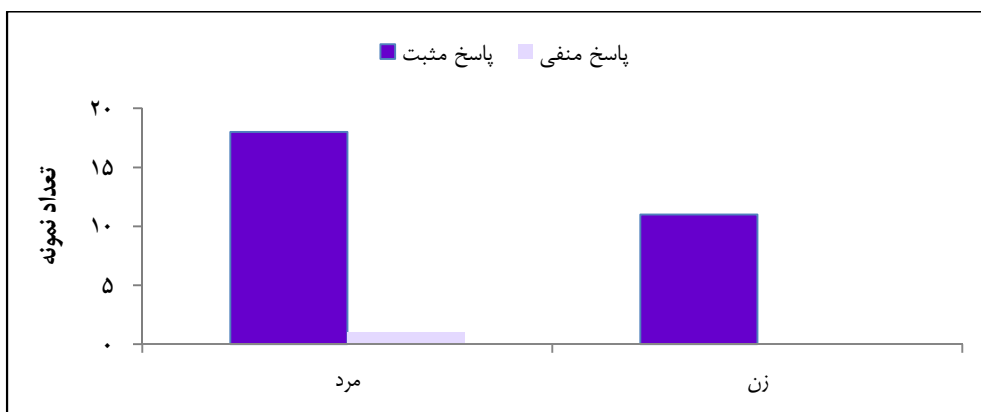
در این مطالعه از ژن β -actin به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. از آن جایی که این ژن جزء ژن‌هایی است که بیان دائمی در سلول دارند، از این رو هدف مناسبی جهت بررسی به عنوان شاهد داخلی

جدول ۲. نتایج و شرایط نمونه‌های بیمار و سالم

گروه سنی	مرحله بیماری	پاسخ منفی بیماران تعداد (درصد)	پاسخ مثبت بیماران تعداد (درصد)	نمونه‌های بیمار تعداد (درصد)	نمونه‌های سالم تعداد (درصد)	جنسیت
۳۰-۸۰	I-IV	۱ (۵)	۱۸ (۹۵)	۱۹ (۶۳)	۷ (۷۰)	مرد
۴۲-۸۸	I-IV	۰ (۰)	۱۱ (۱۰۰)	۱۱ (۳۷)	۳ (۳۰)	زن



شکل ۱. SM نشانگر مولکولی ۵۰ bp DNA Ladder (۶-۱) محصول RT-PCR (Reverse transcription-) Ubiquitin D (UBD) ژن (Polymerase chain reaction) در نمونه‌های بیمار، (۷-۱۲) محصول RT-PCR ژن β -actin (شاهد داخلی)



شکل ۲. نتایج بررسی Ubiquitin D (UBD) در نمونه‌های بیمار

بیماری مبتلا و بیش از ۵۵۰۰۰ از بین می‌روند (۸). در ایران نیز سالانه تعداد زیادی در اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. در طی ۱۰ سال گذشته، تعداد زیادی انکوژن و ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور برای هر کدام از مراحل ایجاد

بحث

سرطان روده چهارمین سرطان شایع در دنیا با برآورد ۷۸۳۰۰۰ مورد جدید در سال می‌باشد (۱). سرطان کولون علت اصلی مرگ و میر در ایالات متحده است. سالانه بیش از ۱۳۵۰۰۰ نفر در امریکا به این

کننده‌ی مسیر ژنتیکی سرطان کلون شناخته شده است. مطالعات نشان می‌دهد که UBD نقش مهمی در تنظیم تقسیم هسته‌ی سلول، بی‌ثباتی کروموزوم و همچنین آپوپتوز و پاسخ ایمنی بر عهده دارد (۱۹، ۱۴-۱۲).

ارتباط بین بیان UBD و تکثیر سلولی با پیشرفت مراحل تومور نشان دهنده‌ی آن است که ژن UBD ممکن است در پیشرفت سرطان مؤثر باشد. افزایش بیان UBD در سلول‌های سرطانی کبد و همچنین دستگاه گوارش گزارش شده است (۱۶). به علاوه، افزایش میزان بیان mRNA و UBD نیز در فیروبلاست و سرطان کبد نیز تأیید شده است (۱۷، ۱۳).

در این مطالعه، برای اولین بار mRNA ژن UBD در نمونه‌های پارافینه‌ی بافت روده‌ی بزرگ شناسایی شد. بلوک‌های پارافینه منبع اطلاعات ارزنده‌ای را در بخش پاتولوژی بیمارستان‌ها برای انجام مطالعات گسترده، فراهم می‌نمایند.

Yan و همکاران میزان پروتئین UBD در بافت افراد مبتلا به سرطان روده را با کمک تکنیک‌های qPCR و Tissue microarray (TMA)، و سترن بلات و رنگ‌آمیزی ایمونو هیستوشیمی مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که افزایش میزان سیتوپلاسمی UBD به طور مستقیم به مراحل بیماری و ایجاد متاستاز بستگی دارد. آن‌ها همچنین بیان نمودند که میزان طول عمر در افراد مبتلا به سرطان روده با UBD منفی به مراتب بیشتر از افراد UBD مثبت می‌باشد (۲۰).

نتایج مطالعه‌ی Ren و همکاران نشان داد که میزان بیان FAT۱۰ از طریق گیرنده‌ی TNF (TNFR۱) یا TNF- α (Tumor necrosis factor receptor) و مسیر NF- κ B

در مطالعه‌ی فان، افزایش بیان FAT۱۰ در سلول‌های کارسینومای کولون نسبت به سلول‌های مخاط طبیعی کولون با استفاده از ریز تشریح لیزری و ریز آرایه‌های cDNA به اثبات رسید. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که بیان FAT۱۰ در مکانیسم پیشرفت از پولیپ‌های خوش‌خیم به کارسینومای تهاجمی نقش مؤثری دارد (۲۳). Oliva و همکاران مهار افزایش بیان UBD توسط TNF- α و INF γ (Interferon-gamma) را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان نمودند که درمان همراه با TNF- α و INF γ باعث کنترل بیشتر روند پیشرفت بیماری می‌شود (۲۴). مطالعات نشان می‌دهد که افزایش UBD ممکن است با رفتار تهاجمی و فرایندهای متاستاز سرطان روده‌ی بزرگ ارتباط داشته باشد. اما مکانیسمی که ممکن است بیان‌کننده‌ی آن باشد که UBD منجر به تومورزایی شود، هنوز مشخص نشده است. در آینده، آزمایش‌های مولکولی می‌تواند نقش مهم UBD را در پیشرفت سرطان روده‌ی بزرگ به طور کامل مشخص نماید، اما تا کنون

در این مطالعه، برای اولین بار mRNA ژن UBD در نمونه‌های پارافینه‌ی بافت روده‌ی بزرگ شناسایی شد. بلوک‌های پارافینه منبع اطلاعات ارزنده‌ای را در بخش پاتولوژی بیمارستان‌ها برای انجام مطالعات گسترده، فراهم می‌نمایند.

Yan و همکاران میزان پروتئین UBD در بافت افراد مبتلا به سرطان روده را با کمک تکنیک‌های qPCR و Tissue microarray (TMA)، و سترن بلات و رنگ‌آمیزی ایمونو هیستوشیمی مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که افزایش میزان سیتوپلاسمی UBD به طور مستقیم به مراحل بیماری و ایجاد متاستاز بستگی دارد. آن‌ها همچنین بیان نمودند که میزان طول عمر در افراد مبتلا به سرطان روده با UBD منفی به مراتب بیشتر از افراد UBD مثبت می‌باشد (۲۰).

نتایج مطالعه‌ی Ren و همکاران نشان داد که میزان بیان FAT۱۰ از طریق گیرنده‌ی TNF (TNFR۱) یا TNF- α (Tumor necrosis factor receptor) و مسیر NF- κ B

نتایج مطالعه‌ی Ren و همکاران نشان داد که میزان بیان FAT۱۰ از طریق گیرنده‌ی TNF (TNFR۱) یا TNF- α (Tumor necrosis factor receptor) و مسیر NF- κ B

نتایج مطالعه‌ی Ren و همکاران نشان داد که میزان بیان FAT۱۰ از طریق گیرنده‌ی TNF (TNFR۱) یا TNF- α (Tumor necrosis factor receptor) و مسیر NF- κ B

مورد بررسی قرار گیرند، موضوعی است که قابل بحث باقی مانده است (۲۷-۲۸).

این اولین گزارشی است که با شناسایی mRNA UBD بیان این ژن را در بافت کلون افراد مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ در ایران نشان داده است و نقش آن را در سلول‌های بافت کلون بررسی نموده است. نتایج این مطالعه می‌تواند در پیشرفت پیش‌آگهی از سرطان مؤثر واقع گردد.

نتایج این مطالعه نشان داد UBD می‌تواند نقش مهم و مؤثری در تشخیص اولیه‌ی سرطان روده‌ی بزرگ به عنوان یک نشانگر زیستی، مستقل از مرحله‌ی تومور، بر عهده داشته باشد. همچنین می‌توان به این امر اشاره نمود که افزایش میزان UBD ارتباط مستقیمی با مراحل II و III بیماری دارد. این مطالب اطلاعات اولیه در زمینه‌ی نقش UBD هستند و مطالعات گسترده‌تری برای تأیید دقیق نقش پیش‌آگهی دهنده‌ی این عامل، مورد نیاز است. نتایج این مطالعه نشان داد که در افراد بیمار ۹۷ درصد UBD بیان می‌شود و در افراد سالم این عدد به ۵ درصد کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسؤولین باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق که در انجام این طرح ما را یاری و هزینه‌های این پروژه را تأمین نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

شاخص‌های مورد تأییدی برای پیش‌آگهی از سرطان روده‌ی بزرگ مشخص نشده است (۲۵).

بر اساس تحقیقات قبلی بیان شده است که UBD توسط p۵۳ تنظیم می‌گردد و کارکردن و یا کار نکردن آن را p۵۳ تعیین می‌کند و همچنین افزایش بیان UBD به کاهش بیان p۵۳ نسبت داده شده است (۲۶)؛ اما جهش در توالی برنامه‌نویسی UBD گزارش نشده است (۱۷). در این مطالعه، بیان UBD به عنوان یک شاخص ژنی که نقشی مهم و مؤثری در پیش‌آگهی از سرطان روده‌ی بزرگ، به ویژه برای پیش‌بینی بازگشت مجدد در بیماران مراحل II و III پس از جراحی مورد توجه قرار گرفته است. نتایج نشان داد که میزان mRNA مربوط به UBD در بافت‌های سرطانی و بافت‌های اطراف تومور افزایش یافته است. افزایش بیان UBD به ویژه در نمونه‌های افراد در مراحل II و III بیماری دیده شد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم دسترسی به برخی اطلاعات از جمله تعداد غدد لنفاوی برداشته شده، متاستاز به کبد، نوع عمل جراحی و ... اشاره نمود که می‌توانند تأثیر مهمی در بقای بیماران مبتلا به سرطان روده داشته باشند. اگر چه تا کنون وضعیت غدد لنفاوی بین مراحل II و III و متاستاز به طور معمول به عنوان یک عامل پیش‌آگهی برای سرطان روده‌ی بزرگ در نظر گرفته شده است؛ اما این امر که باید غدد لنفاوی همیشه

References

- Huang WS, Tang R, Lin PY, Changchien CR, Chen JS, Chiang JM, et al. Impact of the cyclin D1 A870G polymorphism on susceptibility to sporadic colorectal cancer in Taiwan. *Dis Colon Rectum* 2006; 49(5): 602-8.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(4): 225-49.
- Yaylim-Eraltan I, Arikian S, Yildiz Y, Cacina C, Ergen HA, Tuna G, et al. The influence of cyclin D1 A870G polymorphism on colorectal cancer risk and prognosis in a Turkish population.

- Anticancer Res 2010; 30(7): 2875-80.
4. Zhang S, Cui Y, Weng Z, Gong X, Chen M, Zhong B. Changes on the disease pattern of primary colorectal cancers in Southern China: a retrospective study of 20 years. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(8): 943-9.
 5. Zhang LQ, Wang J, Shang JQ, Bai JL, Liu FY, Guan X, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 populations. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26(10): 1249-55.
 6. Jiang SX, Wang XS, Geng CH, Wang GY. Altering trend of clinical characteristics of colorectal cancer: a report of 3,607 cases. *Ai Zheng* 2009; 28(1): 54-6.
 7. Paul-Samojedny M, Kokocinska D, Samojedny A, Mazurek U, Partyka R, Lorenz Z, et al. Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of colon cancer prognosis. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741(1-2): 25-9.
 8. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(19): 1420-5.
 9. Galandiuk S, Wieand HS, Moertel CG, Cha SS, Fitzgibbons RJ, Jr., Pemberton JH, et al. Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 174(1): 27-32.
 10. Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, Sutter T, Zhang Y, Begg M, et al. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 1996; 110(3): 669-74.
 11. Kim HJ, Yu MH, Kim H, Byun J, Lee C. Noninvasive molecular biomarkers for the detection of colorectal cancer. *BMB Rep* 2008; 41(10): 685-92.
 12. Ren J, Kan A, Leong SH, Ooi LL, Jeang KT, Chong SS, et al. FAT10 plays a role in the regulation of chromosomal stability. *J Biol Chem* 2006; 281(16): 11413-21.
 13. Raasi S, Schmidtke G, Groettrup M. The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(38): 35334-43.
 14. Cnaan A, Yu X, Booth CJ, Lian J, Lazar I, Gamfi SL, et al. FAT10/diubiquitin-like protein-deficient mice exhibit minimal phenotypic differences. *Mol Cell Biol* 2006; 26(13): 5180-9.
 15. Duffy MJ, van DA, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43(9): 1348-60.
 16. Lee CG, Ren J, Cheong IS, Ban KH, Ooi LL, Yong TS, et al. Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers. *Oncogene* 2003; 22(17): 2592-603.
 17. Lukasiak S, Schiller C, Oehlschlaeger P, Schmidtke G, Krause P, Legler DF, et al. Proinflammatory cytokines cause FAT10 upregulation in cancers of liver and colon. *Oncogene* 2008; 27(46): 6068-74.
 18. Ji F, Jin X, Jiao CH, Xu QW, Wang ZW, Chen YL. FAT10 level in human gastric cancer and its relation with mutant p53 level, lymph node metastasis and TNM staging. *World J Gastroenterol* 2009; 15(18): 2228-33.
 19. Lim CB, Zhang D, Lee CG. FAT10, a gene up-regulated in various cancers, is cell-cycle regulated. *Cell Div* 2006; 1: 20.
 20. Yan DW, Li DW, Yang YX, Xia J, Wang XL, Zhou CZ, et al. Ubiquitin D is correlated with colon cancer progression and predicts recurrence for stage II-III disease after curative surgery. *Br J Cancer* 2010; 103(7): 961-9.
 21. Ren J, Wang Y, Gao Y, Mehta SB, Lee CG. FAT10 mediates the effect of TNF-alpha in inducing chromosomal instability. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 21): 3665-75.
 22. Qing X, French BA, Oliva J, French SW. Increased expression of FAT10 in colon benign, premalignant and malignant epithelial neoplasms. *Exp Mol Pathol* 2011; 90(1): 51-4.
 23. Fan J, Yang X, Wang W, Wood WH, III, Becker KG, Gorospe M. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(16): 10611-6.
 24. Oliva J, Bardag-Gorce F, French BA, Li J, McPhaul L, Amidi F, et al. Fat10 is an epigenetic marker for liver preneoplasia in a drug-primed mouse model of tumorigenesis. *Exp Mol Pathol* 2008; 84(2): 102-12.
 25. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008; 135(4): 1079-99.
 26. Zhang DW, Jeang KT, Lee CG. p53 negatively regulates the expression of FAT10, a gene upregulated in various cancers. *Oncogene* 2006; 25(16): 2318-27.
 27. Johnson PM, Porter GA, Ricciardi R, Baxter NN. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long-term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(22): 3570-5.
 28. Wang J, Hassett JM, Dayton MT, Kulaylat MN. The prognostic superiority of log odds of positive lymph nodes in stage III colon cancer. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(10): 1790-6.

Identifying Ubiquitin D in Paraffin-Embedded Tissues in Patients with Colorectal Cancer

Amir Izadi MSc¹, Elham Moslemi PhD², Seyed Mohammad Poorhosseini MD, PhD³,
Vahid Reza Yassaee PhD⁴, Hamid Reza Kheiri PhD⁵, Hamid Reza Elikai MSc⁶

Original Article

Abstract

Background: Colon cancer is one major cause for cancer-related deaths. Ubiquitin D (UBD) and its alike proteins are signal transduction pathways with several cellular functions including DNA repair control. There is relation between increase in ubiquitin D and increase in p53 expression in a way that in many cases, this growth has accelerated the cancer progress. This study aimed to detect ubiquitin D, as a marker for the early detection of colorectal cancer and disease progress in patients.

Methods: 30 samples of paraffin-embedded tissue blocks of patients with colorectal cancer and 10 normal tissue samples were studied. Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) testing to detect ubiquitin D gene and b-actin gene as an internal control was obtained.

Findings: The size of RT-PCR product of ubiquitin D gene was 395 and the size of amplified b-actin was 350 bp. The RT-PCR of b-actin was positive in all samples. The RT-PCR products of 18 samples (95%) of male patients and 11 samples (100%) of female patients were positive. Only one sample had negative product.

Conclusion: Considering the results, we can conclude that ubiquitin D, as a useful marker that is independent of tumor stage, plays an important role in the detection of colorectal cancer and its study is really important in identification and detection of early stages of disease. Results showed that the expression of the ubiquitin D in patients is 97% and it reduces to 5% in healthy people.

Keywords: Ubiquitin D, Colorectal cancer, Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

Citation: Izadi A, Moslemi E, Poorhosseini SM, Yassaee VR, Kheiri HR, Elikai HR. **Identifying Ubiquitin D in Paraffin-Embedded Tissues in Patients with Colorectal Cancer.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(291): 972-81

1- Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran

3- Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Genomic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan AND Banej Exir Research Center, Tehran, Iran

6- Department of Hematology, Immunology Laboratory, Sajad Hospital AND Banej Exir Research Center, Tehran, Iran

Corresponding Author: Amir Izadi MSc, Email: amir_izad@yahoo.com