مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۹۵/هفته‌ی سوم مهر ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۱۲

بررسی بیان ژن TOX3 در بیماران مبتلا به سرطان مری

ثریا احمدی بلوطکی[۱]، مجتبی عمادی بایگی[۲]، لیلا روحی[۳]، علی اکبر شایسته[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان مری، ششمین سرطان منجر به مرگ در دنیا می‌باشد. اگر چه بروز این بیماری در سه دهه‌ی گذشته در ایران رو به کاهش بوده است، اما همچنان ششمین سرطان شایع در کشور می‌باشد. ژن TOX3 به خانواده‌ای بزرگ و متنوع از پروتئین‌های HMG-box تعلق دارد که روی کروموزوم 16q12 قرار گرفته است. مطالعه‌ی حاضر با هدف مقایسه‌ی بیان ژن TOX3 در بافت پارافینه‌ی سرطانی و غیر توموری مری انجام شد.

روش‌ها: این مطالعه ، یک مطالعه‌ی مورد- شاهدی بود که بر روی تعداد ۴۰ نمونه از بافت پارافینه‌ی سرطانی مری و بافت سالم آن انجام شد. نمونه‌ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اهواز در سال‌های ۸۹-۱۳۸۴ جمع‌آوری گردید. RNA تام استخراج شد و پس از سنتز complementary DNA (cDNA)، سطوح بیان نسبی این ژن‌ها با استفاده از تکنیک Quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) و به روش 2-ΔΔCT تعیین شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژن *TOX3* در بافت‌های توموری مری نسبت به بافت‌های غیر توموری کاهش بیان داشت؛ هر چند که از نظر آماری، معنی‌دار نبود ($P > ۰/۱۰$).

نتیجه‌گیری: در سرطان مری سنگفرشی، بیان ژن *TOX3* در بافت‌های توموری مری نسبت به بافت‌های سالم کاهش می‌یابد. از این رو، با در نظر گرفتن کلیه‌ی نتایج بیان این ژن در منابع مختلف، می‌توان پیشنهاد نمود که ممکن است ژن *TOX3* در سرطان مری به عنوان یک مهار کننده‌ی تومور عمل نماید. بنابراین، مطالعات بیشتر جهت تعیین دقیق مکانیسم عمل این ژن به عنوان یک مهار کننده‌ی تومور در SCC مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: ژن TOX3، Real-time Pplymerase chain reaction، SYBER Green، سرطان مری

ارجاع: احمدی بلوطکی ثریا، عمادی بایگی مجتبی، روحی لیلا، شایسته علی اکبر. **بررسی بیان ژن TOX3 در بیماران مبتلا به سرطان مری.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۹۵): ۹۷۷-۹۷۱

مقدمه

سرطان مری، از شایع‌ترین سرطان‌ها و ششمین سرطان منجر به مرگ در دنیا می‌باشد (۱). شیوع این سرطان در آسیا، بیشتر از کشورهای غربی است که ممکن است متأثر از سبک زندگی و یا خصوصیات ژنتیک این افراد باشد (۲). اگر چه بروز این بیماری در سه دهه‌ی گذشته در ایران رو به کاهش بوده است، اما همچنان این سرطان ششمین سرطان شایع در کشور می‌باشد. سرطان مری، یکی از سرطان‌های با سیر سریع و پیش‌آگهی ضعیف است و میزان بقای پنج ساله‌ی این بیماران کمتر از ۱۰ درصد می‌باشد (۳).

فقدان علایم زودرس اولیه (٤) و ماهیت این سرطان، موجب می‌گردد که بیماران به طور معمول وقتی به پزشک مراجعه نمایند که بیماری در مراحل پیشرفته است و روش های درمانی، کمک اندکی در به دست آوردن مجدد سلامتی و بهبود کیفیت زندگی ایشان می نماید (۵). با توجه به کشندگی بالای این بیماری در مراحل انتهایی، چنانچه این بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، نسبتی از افراد ممکن است از مدت زمان بقای بیشتری نسبت به سایرین برخوردار شوند و یا حتی بهبود یابند (٤).

بروز این سرطان، با افزایش سن بیشتر می‌شود؛ به طوری که بیشترین شیوع در سن ۷۰-۵۰ سالگی می‌باشد. این بیماری، در مردان شایع‌تر از زنان است، هر چند در مناطق مختلف نسبت آن متفاوت است (٦).

۱- گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه و پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی تکوین جانوری، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- استادیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مجتبی عمادی بایگی
Email: email-m@sci.sku.ac.ir

این سرطان، دو نوع اصلی کارسینوم سلول سنگفرشی مری (Squamous cell carcinoma یا SCC) و آدنوکارسینوم مری (Esophageal adenocarcinoma یا EAC) را شامل می‌شود. در گذشته، SCC، ۹۵ درصد تمامی سرطان‌های مری را شامل می‌شد؛ اما از سال ۱۹۸۰ به بعد، میزان بروز EAC به سرعت افزایش یافته است و ۵۰ درصد موارد جدید سرطان مری را شامل می‌شود (۷).

TOX3 که با عنوان TNCR9 نیز شناخته شده است، به خانواده‌ای بزرگ و متنوع از پروتئین‌های HMG-box تعلق دارد که به عنوان عوامل مؤثر در اصلاح ساختار کروماتین از طریق پیوند و باز کردن پیوند DNA عمل می‌کند (۸). این ژن، از طریق بر هم‌کنش متقابل با پروتئین CREB، نسخه‌برداری نورونی وابسته به کلسیم را تنظیم می‌کند (۹) و به عنوان یک تنظیم کننده‌ی مهم رونویسی وابسته به کلسیم است. TOX3 روی کروموزوم 16q12 قرار گرفته است؛ منطقه‌ای که اغلب در سرطان‌های پستان از بین می‌رود. تا کنون، بیان این ژن در سرطان‌های پستان و معده بررسی و مشاهده شده است که آلل rs3803662 در نزدیکی ژن TOX3 با تظاهر کمتر mRNA ی TOX3 در سرطان پستان مرتبط است و یک نقش سرکوب کننده‌ی تومور، برای این ژن مطرح شده است (۱۰).

همچنین، این پلی‌مورفیسم با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان در ناقل‌های جهش BRCA1 و BRCA2 و در بیمارانی با گیرنده‌ی استروژن (Estrogen receptor یا ER) مثبت مرتبط است (۱۱). آنالیز این پلی‌مورفیسم در بیماران مبتلا به سرطان معده نیز نشان داد که ممکن است در پیش‌آگهی و درمان سرطان معده نقش داشته باشد (۱۲). بر اساس مطالعه‌ای که Choi و همکاران بر روی سرطان معده انجام دادند، مشخص گردید که ژن TOX3 می‌تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیک بالقوه برای احتمال ابتلا به سرطان معده در نظر گرفته شود (۱۳).

با توجه به مطالعاتی که بر روی بیان ژن TOX3 در سرطان معده و پستان انجام شده است و بیانگر آن است که ژن TOX3 می‌تواند به عنوان یک ژن سرکوب کننده‌ی تومور عمل کند، در این مطالعه برای اولین بار سطح بیان این ژن در بافت پارافینه‌ی سرطانی و غیر توموری مری نوع اسکواموس مقایسه شد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی مورد- شاهدی بود که بر روی ۴۰ نمونه از بافت پارافینه‌ی سرطان مری و بافت غیر توموری آن انجام شد. این نمونه‌ها از بیمارانی به دست آمده بود که در بیمارستان امام خمینی (ره) اهواز تحت عمل جراحی برداشتن مری بودند. از نمونه‌های به دست آمده، برش‌های ۱۰ میکرومتری تهیه و در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد و میکروتیوپ‌های حاوی نمونه به فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال یافتند. فرم رضایت‌نامه‌ی آگاهانه توسط تمام بیماران تکمیل و از ایشان دریافت گردید.

استخراج RNA: RNA تام با استفاده از کیت استخراج Rneasy FFPE Kit (50) (Cat. no: Q73504, Qiagen) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. RNA در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا مرحله‌ی سنتز complementary DNA (cDNA) نگهداری شد.

سنتز cDNA: cDNA با استفاده از کیت سنتز (Takara, Clontech) Prime Script RT Reagent Kit شرکت تاکارا ساخته شد. دستورالعمل این کیت شامل دو مرحله بود. مرحله‌ی اول، اضافه کردن (5X) Reaction buffer، PrimeScript ™ RT Enzyme Mix I و ۱۰۰ میکرولیتر Random Hexamer و مرحله‌ی دوم انکوباسیون آن در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، سپس در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه را شامل می‌شد. آن گاه، محصول در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

طراحی پرایمر: طراحی پرایمر با توجه به توالی‌های cDNA انسانی *TOX3* و GUSB (۱۴) با استفاده از نرم‌افزار Gene runner و سایت (NCBI) National Center for Biotechnology Information انجام شد. ویژگی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

Quantitative Real Time reverse transcriptase polymerase chain reaction: سطوح بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR و به وسیله‌ی دستگاه ترموسایکلر Rotor-gene 6000 (Qiagen, Hilden, Germany) اندازه‌گیری شد. واکنش‌ها برای ژن‌های TOX3 و GUSB در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از (2X) (Takara, Clontech) SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus)، ۰/۲ میکرولیتر پرایمر F، ۰/۲ میکرولیتر پرایمر R، ۱ میکرولیتر cDNA و ۳/۶ میکرولیتر آب Nuclease Free و در دماهای زیر انجام شد:

دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه‌ی تکثیر شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و Melting در دمای ۹۵-۷۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. کمی‌سازی نسبی بیان با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ به انجام رسید.

آنالیزهای آماری: جهت بررسی آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های غیر توموری، از آزمون آماری t استفاده شد. برای تمام محاسبات آماری انجام شده، $P \leq ۰/۰۵۰$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در **Real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)**

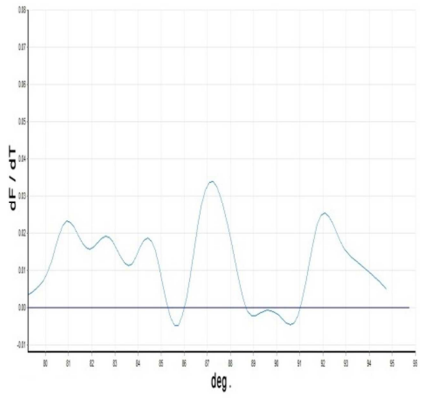
خصوصیات	TOX3	GUSB
F پرایمر	5’-TTGTAGCATCTATGTGGGACAG-3’	5’-CACGACACCCACCACCTACATC-3`
R پرایمر	5’ -AATCTAACATCCTCTCTCCTTCT-3’	5’-GACGCACTTCCAACTTGAACAG-3’
طول محصول PCR	۲۱۰	۱۲۳
دمای Annealing	۶۰ درجه‌ی سانتی گراد	۶۰ درجه‌ی سانتی گراد

یافته‌ها

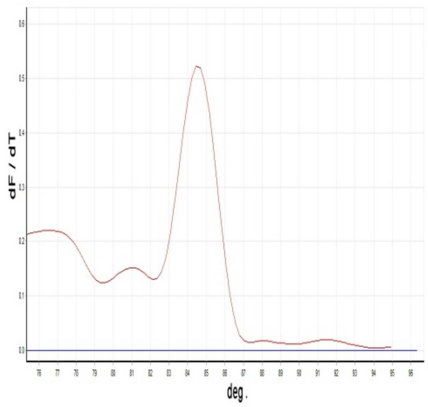
در این مطالعه، در مجموع ۲۰ بیمار مبتلا به اسکواموس سل کارسینوم شامل ۱۲ مرد (۶۰/۰ درصد) و ۸ زن (۴۰/۰ درصد) با متوسط سنی ۵۳/۵ سال (محدوده‌ی سنی ۸۱–۲۶ سال) مورد بررسی قرار گرفتند.

منحنی ذوب ژن GUSB به صورت تک قله به دست آمد که این خود بیانگر وجود تنها یک محصول PCR است (شکل ۱) و ژن TOX3 به صورت دو قله بود (شکل ۱). در ضمن، محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید Run و مشاهده شد که در هر کدام از واکنش‌های انجام شده با پرایمرهای اختصاصی، تنها یک باند اختصاصی وجود دارد و این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR را در نمونه‌های مورد بررسی تأیید کرد. پس از حصول اطمینان از بهینه‌سازی شرایط واکنش، واکنش‌های Real time RT-PCR برای ۴۰ نمونه‌ی توموری و غیر توموری انجام شد. بررسی منحنی‌های تکثیر و ذوب، نشان دهنده‌ی تکثیر نمایی قطعه‌ی مورد نظر با منحنی ذوب واحد بود.

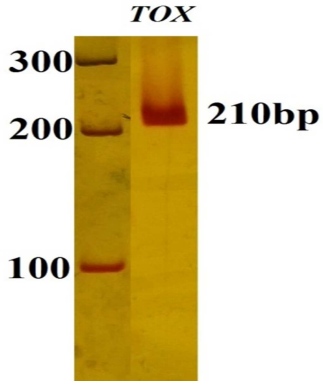
در مقایسه‌ی میزان میانگین بیان نسبی ژن TOX3 در نمونه‌های توموری نسبت به غیر توموری، آزمون t نشان داد که میانگین بیان نسبی ژن TOX3 در نمونه‌های غیر توموری نسبت به نمونه‌های توموری بالاتر می‌باشد، اما چون میزان معنی‌داری اختلاف آن‌ها بیشتر از ۰/۰۵ بود (P > ۰/۱۰)، اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن در نمونه‌های توموری و غیر توموری وجود نداشت (شکل ۲).



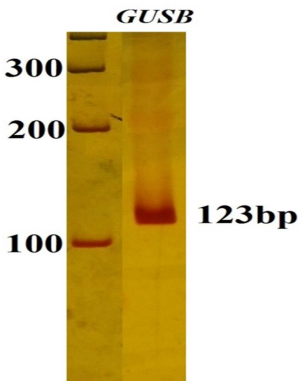
ب



الف

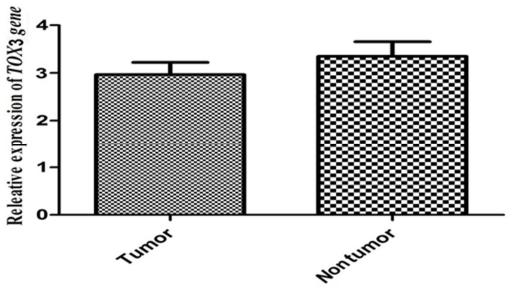


د



ج

شکل ۱. الف) منحنی ذوب **GUSB**. ب) منحنی ذوب ***TOX3***. ج) الکتروفورز محصول **Polymerase chain reaction (PCR)** معمولی **GUSB** روی ژل پلی‌آکریل‌آمید. د) الکتروفورز محصول **PCR** معمولی **TOX3** روی ژل پلی‌آکریل‌آمید



شکل ۲. نمودار ستونی مربوط به مقایسه‌ی بیان ژن TOX3 در نمونه‌های توموری و غیر توموری

بحث

سرطان مری، یک بیماری تهاجمی است که به طور معمول در مرحله‌ی پیشرفته از بیماری تظاهر می‌کند؛ به طوری که در نیمی از بیماران هنگام تشخیص، بیماری به لحاظ موضعی پیشرفته است و ۴۰-۳۰ درصد آن‌ها متاستاز دوردست قابل تشخیص دارند (۱۵). بیش از ۹۰ درصد موارد سرطان مری در مراحل انتهایی تشخیص داده می‌شوند، بنابراین با وجود پیشرفت در روش‌های تشخیص و درمان، پیش‌آگهی سرطان مری هنوز ضعیف و امید به زندگی ۵ ساله بعد از تشخیص بین ۳۰-۱۰ درصد است؛ به طوری که استفاده از روش‌های تشخیصی جدید برای تشخیص زودهنگام و پیش‌آگهی سرطان مری از اهمیت بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر، با توجه به پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه‌ی علوم مولکولی و یافتن آزمایش‌ها و تکنیک‌های ساده و کم هزینه‌ای از قبیل PCR، محققان به دنبال یافتن نشانگرهای زیستی مولکولی بوده‌اند که با بررسی آن‌ها بتوانند در زمان کمتر و بر پایه‌ی آزمون‌های حساس‌تر و اختصاصی‌تر، تومورهای مری را جهت انتخاب مدالیته‌ی درمانی دسته‌بندی نمایند.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان بیان TOX3، در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های غیر توموری، کمتر است. از این رو، مطالعه‌ی حاضر ممکن است بیانگر نقش مهار کننده‌ی تومور برای ژن TOX3 باشد. در ارتباط با این یافته، در مطالعه‌ی Gudmundsdottir و همکاران مشاهده شد که TOX3 می‌تواند یک ژن سرکوب کننده‌ی تومور در 16q باشد. همچنین، در این پژوهش، تأثیر TOX3 rs3803662 بر بقای بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی و مشاهده شد که ژنوتیپ CT/TT rs3803662، ارتباط معنی‌داری با بقای بهتر در میان بیماران مبتلا به سرطان معده از نوع منتشر شونده داشت (۱۶).

مطالعات اخیر، نقش TOX3 را در سرطان پستان و سرطان معده نشان داده‌اند. در تحقیقات، مشاهده شده است که آلل با فراوانی کمتر rs3803662 با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان و بیان پایین‌تر TOX3 همراه است که Single nucleotide polymorphisms (SNP) در محلی نزدیک به TOX3 و در ژن نامشخص LOC643714 قرار گرفته است (۱۶). همچنین، Riaz و همکاران به این نتیجه رسیدند که آلل‌های rs3803662 در نزدیکی ژن TOX3 با تظاهر کمتر mRNAی TOX3 در سرطان پستان مرتبط است و یک نقش سرکوب کننده‌ی تومور را برای این ژن در نظر گرفتند (۱۰).

آنالیز rs3803662 ژن TOX3 در سرطان پستان نشان داده است که این پلی مورفیسم، با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان در ناقل‌های جهش BRCA1 و BRCA2 و بیمارانی با گیرنده‌ی استروژن (ER یا Estrogen receptor) مثبت مرتبط است (۱۱). به علاوه، سطح بیان TOX3 در تومورهای ER مثبت در مقایسه با تومورهای ER منفی به طور قابل ملاحظه ای بالاتر بود (۲۰-۱۷). همچنین، مشاهده شده است که تأثیر بیان TOX3 و خطر آلل rs3803662 در سرطان پستان در تومورهای ER مثبت قوی تر است (۱۶). از طرفی، در مطالعات گذشته مشاهده شده است که بیان ژن TOX3 در سرطان پستان به خصوص نوع مهاجم آن افزایش می‌یابد. به علاوه، بیان نابه جای ژن TOX3 باعث افزایش تکثیر، مهاجرت و بقای سلول‌های سرطانی پستان می‌شود (۲۱). در نهایت آن که، افزایش سطح بیان mRNAی TOX3 بر پیامد بیماری در سرطان پستان تأثیر دارد؛ به طوری که می‌تواند متاستاز سرطان پستان به استخوان را پیش‌بینی نماید (۲۲).

به علاوه، آنالیز این پلی‌مورفیسم در بیماران مبتلا به سرطان معده در چین نشان داد که ممکن است این پلی‌مورفیسم، نقش مهمی در پیش آگهی و درمان سرطان معده داشته باشد (۱۲). به هر حال، اثبات شده است که TOX3 rs3803662 را می‌توان به عنوان یک نشانگر ژنتیک بالقوه برای احتمال ابتلا به سرطان معده در نظر گرفت (۱۳).

برای تأیید نتایج مطالعه‌ی حاضر، اطلاعات مربوط به تغییر میزان بیان ژن و تغییر در تعداد کپی DNA از پایگاه داده‌ای Oncomine (۲۳) استخراج گردید. کاهش معنی‌دار بیان ژن TOX3 در SCC در مطالعات Su و همکاران (۲۴) و Yu و همکاران (۲۵) مشاهده گردید. به علاوه به مانند مطالعه‌ی حاضر، کاهش بیان این ژن در نمونه‌های SCC در مطالعات Aoyagi و همکاران (۲۸ نمونه از ۴۰ نمونه) (۲۶) و Su و همکاران (۱۴ نمونه از ۱۸ نمونه) (۲۷) مشاهده گردید. همچنین، در مطالعات Bass و همکاران (۲۳ نمونه از ۴۰ نمونه) (۲۸) و نیز Beroukhim و همکاران (۲ نمونه از ۴ نمونه) (۲۹) کاهش تعداد کپی DNA در محل لوکوس این ژن گزارش گردید. جالب آن که بر اساس پایگاه اطلاعاتی Mitelman در بیماران SCC، دو نمونه وجود دارد که کروموزوم ۱۶ آن‌ها حذف شده است که می‌تواند بیانگر نقش سرکوب کنندگی تومور TOX3 باشد (۳۰).

در ارتباط با مشاهده‌ی دو پیک در Melting curve ژن TOX3 نیز آمپلیکون با استفاده از نرم‌افزار UMelt مورد آنالیز قرار گرفت و مشخص شد که وجود دو پیک برای ژن TOX3 طبیعی است.

در مجموع، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در سرطان مری، بیان ژن TOX3، در بافت‌های توموری مری نسبت به بافت‌های غیر توموری کاهش می‌یابد. از این رو، با در نظر گرفتن کلیه‌ی نتایج بیان ژن که بدان اشاره گردید، می‌توان پیشنهاد نمود که ممکن است ژن TOX3 در سرطان مری به عنوان یک مهار کننده‌ی تومور عمل نماید. بنابراین، مطالعات بیشتر جهت تعیین دقیق مکانیسم عمل این ژن به عنوان یک مهار کننده‌ی تومور در SCC مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد می‌باشد که با شماره‌ی ۱۲۵۲ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تصویب گردید. بدین وسیله، از زحمات تمام کسانی که در به نتیجه رسیدن این مطالعه همکاری نمودند، به خصوص سرکار خانم محبوبه گنجی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Tabatabaee SA, Hashemi SM, Eidy M, Davarpanah Jazi AH. Predicting factors for anastomotic leakage after esophageal cancer resection. Iran J Cancer Prev 2009; 2(2): 103-6. [In Persian].
2. Somi MH, Mousavi SM, Rezaeifar P, Naghashi SH. Cancer incidence among the elderly population in the northwest of Iran: a population based study. Iran J Cancer Prev 2009; 2(3): 117-26. [In Persian].
3. Akbari MR, Malekzadeh R, Nasrollahzadeh D, Amanian D, Sun P, Islami F, et al. Familial risks of esophageal cancer among the Turkmen population of the Caspian littoral of Iran. Int J Cancer 2006; 119(5): 1047-51.
4. Ghadimi MR, Rasouli M, Mahmoodi M, Mohammad K, Zeraati H. A Comparative study of impact of personal factors on survival of patients with. Hakim Res J 2011; 14(1): 41-9.
5. Semnani S, Besharat S, Abdolahi N, Keshtkar A, Kabir M, Fazel A, et al. Factors associated with esophageal cancer in the southeast part of the Caspian Sea. J Guilan Univ Med Sci 2005; 13(52): 24-8. [In Persian].
6. Kollarova H, Machova L, Horakova D, Janoutova G, Janout V. Epidemiology of esophageal cancer-an overview article. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2007; 151(1): 17-20.
7. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
8. O'Flaherty E, Kaye J. TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins. BMC Genomics 2003; 4(1): 13.
9. Yuan SH, Qiu Z, Ghosh A. TOX3 regulates calcium-dependent transcription in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(8): 2909-14.
10. Riaz M, Berns EM, Sieuwerts AM, Ruigrok-Ritstier K, de Weerd V, Groenewoud A, et al. Correlation of breast cancer susceptibility loci with patient characteristics, metastasis-free survival, and mRNA expression of the nearest genes. Breast Cancer Res Treat 2012; 133(3): 843-51.
11. Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, Schmutzler RK, et al. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Am J Hum Genet 2008; 82(4): 937-48.
12. Zhang X, Zhu H, Wu X, Wang M, Gu D, Gong W, et al. A genetic polymorphism in TOX3 is associated with survival of gastric cancer in a Chinese population. PLoS One 2013; 8(9): e72186.
13. Choi IK, Sung HJ, Lee JH, Kim JS, Seo JH. The relationship between Helicobacter pylori infection and the effects of chemotherapy in patients with advanced or metastatic gastric cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2012; 70(4): 555-8.
14. Emadi Baygi M, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. Cell Biol Toxicol 2010; 26(6): 553-67.
15. Kelsen D. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal cancer. J Clin Oncol 2001; 19(2): 283-5.
16. Gudmundsdottir ET, Barkardottir RB, Arason A, Gunnarsson H, Amundadottir LT, Agnarsson BA, et al. The risk allele of SNP rs3803662 and the mRNA level of its closest genes TOX3 and LOC643714 predict adverse outcome for breast cancer patients. BMC Cancer 2012; 12: 621.
17. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Rafnar T, Gudmundsson J, Gudjonsson SA, et al. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. Nat Genet 2007; 39(7): 865-9.
18. Reeves GK, Travis RC, Green J, Bull D, Tipper S, Baker K, et al. Incidence of breast cancer and its subtypes in relation to individual and multiple low-penetrance genetic susceptibility loci. JAMA 2010; 304(4): 426-34.
19. Liang J, Chen P, Hu Z, Shen H, Wang F, Chen L, et al. Genetic variants in trinucleotide repeat-containing 9 (TNRC9) are associated with risk of estrogen receptor positive breast cancer in a Chinese population. Breast Cancer Res Treat 2010; 124(1): 237-41.
20. Fasching PA, Pharoah PD, Cox A, Nevanlinna H, Bojesen SE, Karn T, et al. The role of genetic breast cancer susceptibility variants as prognostic factors. Hum Mol Genet 2012; 21(17): 3926-39.
21. Shan J, Dsouza SP, Bakhru S, Al-Azwani EK, Ascierto ML, Sastry KS, et al. TNRC9 downregulates BRCA1 expression and promotes breast cancer aggressiveness. Cancer Res 2013; 73(9): 2840-9.

22. Smid M, Wang Y, Klijn JG, Sieuwerts AM, Zhang Y, Atkins D, et al. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. J Clin Oncol 2006; 24(15): 2261-7.
23. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. Neoplasia 2004; 6(1): 1-6.
24. Su H, Hu N, Yang HH, Wang C, Takikita M, Wang QH, et al. Global gene expression profiling and validation in esophageal squamous cell carcinoma and its association with clinical phenotypes. Clin Cancer Res 2011; 17(9): 2955-66.
25. Yu K, Ganesan K, Tan LK, Laban M, Wu J, Zhao XD, et al. A precisely regulated gene expression cassette potently modulates metastasis and survival in multiple solid cancers. PLoS Genet 2008; 4(7): e1000129.
26. Aoyagi K, Minashi K, Igaki H, Tachimori Y, Nishimura T, Hokamura N, et al. Artificially induced epithelial-mesenchymal transition in surgical subjects: its implications in clinical and basic cancer research. PLoS One 2011; 6(4): e18196.
27. Su H, Hu N, Shih J, Hu Y, Wang QH, Chuang EY, et al. Gene expression analysis of esophageal squamous cell carcinoma reveals consistent molecular profiles related to a family history of upper gastrointestinal cancer. Cancer Res 2003; 63(14): 3872-6.
28. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. Nat Genet 2009; 41(11): 1238-42.
29. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. Nature 2010; 463(7283): 899-905.
30. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer [Online]. [cited 2016]; Available from: URL: http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman

Journal of Isfahan Medical School
Received: 21.05.2016
Vol. 34, No. 395, 3rd Week, October 2016
Accepted: 02.07.2016

The Expression of TOX3 Gene in Patients with Esophageal Cancer

Soraya Ahmadi-Balootaki[1], Modjtaba Emadi-Baygy[2], Leyla Rouhi[3], Ali Akbar Shayesteh[4]

Original Article

Abstract

Background: Esophageal cancer is the sixth cause of cancer mortality worldwide. While it is the sixth prevalent cancer in Iran, its incidence has been decreasing during the past 3 decades. Belonging to the HMG-box protein family, TOX3 (TOX high-mobility group box family member 3) gene is located on 16q12 chromosome. This study aimed to compare the expression of TOX3 gene in cancerous and non-cancerous tissue of esophagus.

Methods: In this case-control study, 40 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples of cases of esophageal Squamous cell carcinoma (SCC) and healthy tisuue were assessed. Samples were collected from patients referred to Imam Khomeini Hospital, Ahvaz, Iran, during 2005 to 210. Total RNA was extracted and complementary DNA (cDNA) was synthesied. The relative gene expression was determined using quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and quantified using 2-ΔΔCT method.

Findings: The expression of TOX3 gene was lower in tumor tissues compared to normal tissues. However, it was not statistically significant (P > 0.1).

Conclusion: Our study revealed that the expression of TOX3 is lower in squamous esophageal cancer. Consequently, by considering all the data about the expression of TOX3 gene from various resources, it could be suggested that the TOX3 gene might act as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma. Therefore, further studies should be done to elucidate the exact mechanism of action of the gene as a tumor suppressor in Squamous cell carcinoma.

Keywords: TOX3 gene, Real-time polymerase chain reaction, SYBR Green, Esophageal Cancer

Citation: Ahmadi-Balootaki S, Emadi-Baygy M, Rouhi L, Shayesteh AA. **The Expression of TOX3 Gene in Patients with Esophageal Cancer.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(395): 971-7.

1- Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Basic Sciences AND Research Institute of Biotechnology, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
3- Assistant Professor, Department of Developmental Biology, School of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
4- Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Ahvaz Jondishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Modjtaba Emadi-Baygy, Email: email-m@sci.sku.ac.ir