

بررسی بروز پروتئین مهار کننده‌ی تومور P33 در بافت‌های سالم و سرطانی کولورکتال

دکتر مهدی نیکبخت^۱، سمیه فلاح نژاد^۲، دکتر میترا حیدرپور^۳، دکتر بهمن رشیدی^۴

خلاصه

مقدمه: P33 یک پروتئین مهار کننده‌ی تومور است که در کنترل رشد سلولی و آپوپتوز فعالیت دارد. مهار بیان این پروتئین مرتبط با کاهش کنترل رشد سلولی است. سرطان کولورکتال دومین سرطان رایج در جهان است. تشخیص بیماری در مراحل اولیه می‌تواند میزان مرگ و میر ناشی از آن را کاهش دهد. برای بررسی نقش P33 در پاتوژنز سرطان کولورکتال، بیان این پروتئین را در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال توسط روش ایمونوهیستوشیمی بررسی نمودیم.

روش‌ها: در این مطالعه از ۷۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال و ۷۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌ها استفاده شد. بیان پروتئین P33 با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. تعداد سلول‌های رنگ آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار MotiC Advanced Plus 2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: پروتئین P33 در تمامی نمونه‌ها بیان شده بود و به طور عمده در هسته‌ی سلول‌های اپی‌تلیال متمرکز بود. بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P = 0/02$).

نتیجه‌گیری: بیان پروتئین P33 در نمونه‌های سرطانی به طور مشخصی نسبت به نمونه‌های سالم کمتر بود. این مطالعه نشان داد که بیان پروتئین P33 ممکن است با پاتوژنز سرطان کولورکتال ارتباط داشته باشد.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، ایمونوهیستوشیمی، ژن مهار کننده تومور.

مقدمه

بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (33-34 13q) واقع شده است (۴-۵) و دارای سه آگزون (1a، 1b و 2) و (۶-۷) و دو اینترون می‌باشد (۸-۹) که برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ توسط Garkavtsev و همکاران کشف شد (۱۱-۱۰، ۳). یک سری عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی باعث کاهش بیان این پروتئین می‌شود که شامل جهش، هیپر متیلاسیون ناحیه‌ی پروموتور ژن و عدم تعادل اللی (LOH) می‌باشد (۱۲-۱۳، ۱). از بین این گروه پروتئینی، پروتئین P33 در اکثر سرطان‌های انسانی کاهش بیان دارد (۱۳). پروتئین P33 در کنترل و تنظیم رشد سلولی،

سرطان کولورکتال دومین سرطان رایج در جهان می‌باشد. دامنه‌ی تغییرات ژنتیکی در ایجاد سرطان کولورکتال وسیع بوده، لذا لازم است ژن‌های کلیدی درگیر در این نوع سرطان مشخص شوند. تاکنون نقش آنکوژن‌ها و ژن‌های مهار کننده‌ی تومور متعددی در این سرطان مشخص شده است (۱). یکی از مهم‌ترین ژن‌های مهار کننده‌ی تومور در این نوع سرطان، ژن ING1 است که یکی از اجزای خانواده‌ی ژن‌های مهار کننده‌ی رشد (ING) می‌باشد (۴-۲). این ژن بر روی

^۱ دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ دستیار، گروه پاتولوژی، بیمارستان الزهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۴ استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهدی نیکبخت، دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

نمونه‌ها استفاده شد. تعدادی از نمونه‌ها به صورت بافت تازه از بخش جراحی و تعدادی دیگر به صورت بلوک پارافینی آماده از بخش پاتولوژی بیمارستان‌های الزهرا (س)، کاشانی، صدوقی و آزمایشگاه‌های خصوصی شهر اصفهان تهیه گردید.

تهیه‌ی لام: جهت تهیه‌ی لام هماتوکسیلین-ائوزین و ایمونوهیستوشیمی، ابتدا طی مرحله‌ی آماده‌سازی بافت، هر کدام از نمونه‌ها توسط اتانول‌های صعودی آنگیری شدند. سپس جهت شفاف‌سازی در گزین قرار گرفتند و بعد از قالب‌گیری در پارافین، برش‌های بافتی به ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه شد. آن گاه، جهت رنگ آمیزی معمولی هماتوکسیلین-ائوزین مراحل پارافین زدایی توسط گزین، آب‌دهی با اتانول‌های نزولی، رنگ آمیزی توسط هماتوکسیلین-ائوزین و آب‌گیری با اتانول‌های صعودی به ترتیب انجام شد.

برای ردیابی پروتئین P33 در نمونه‌های سرطانی نیز رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام شد. به این منظور پس از پارافین زدایی و آب‌دهی، برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۵٪ انکوبه و سپس شستشو داده شد؛ آن گاه، در میکروویو ۹۸ درجه با بافر ۱۰٪ مولار سیترات سدیم به مدت ۱ دقیقه بازیافت آنتی‌ژن صورت گرفت. به منظور توقف فعالیت اندوژنوس پراکسیداز، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در سرم نرمال (Goat) قرار گرفتند. بعد از برداشت سرم اضافی، بافت‌ها با مقدار کافی آنتی‌بادی اولیه (ING1b) (با رقت ۱:۲۰۰) پوشانده و به مدت ۱ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد؛ سپس دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر TBS شستشو داده شد. در مرحله‌ی بعد نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه (با رقت ۱:۵۰۰) انکوبه شد و

آپوپتوز، حفظ ثبات ژنوم، تنظیم چرخه‌ی سلولی و به طور ویژه در روند پیری سلول نقش دارد (۱۴). بیان بیش از حد این پروتئین رشد سلولی را از طریق توقف فاز G1 در چرخه‌ی سلولی مهار کرده، آپوپتوز را القا می‌نماید (۱۶-۱۵، ۳).

کاهش یا مهار بیان پروتئین P33 باعث رشد خارج از کنترل و فناپذیری سلول می‌گردد. از طرف دیگر، فقدان کامل عملکرد P33 منجر به کاهش حساسیت سلول به آپوپتوز می‌شود که می‌تواند روند تشکیل سرطان را تسهیل کند (۱۷). تحقیقات نشان داده است که در برخی از انواع سرطان‌ها مانند سرطان پستان، لنفوما، معده، نوروبلاستوما (۲۰-۱۸)، کبد (۲۱)، ریه (۲۲)، ملانوما (۲۳) و آستروسیتوما (۲۴) بیان P33 کاهش پیدا می‌کند و این کاهش بیان پروتئین به طور مشخصی با پاتوژنز بیماری ارتباط دارد (۲۵-۲۶). با توجه به اهمیت این پروتئین و نیز با توجه به این که سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است، تعیین بروز پروتئین P33 می‌تواند نقش مهمی در تعیین پاتوژنز بیماری داشته باشد. روش ایمونوهیستوشیمی یک روش مناسب در بررسی تغییرات بیان محصولات ژنی در سرطان‌ها است. با استفاده از این روش می‌توان به طور سریع و با دقت تجمع پروتئین P33 در بافت را ردیابی نمود. در این تحقیق، که برای اولین بار در ایران صورت گرفته است، بیان پروتئین P33 با روش ایمونوهیستوشیمی در بافت‌های سرطانی و بافت‌های سالم بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در شهر اصفهان مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش‌ها

تهیه‌ی نمونه: در این مطالعه از ۷۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال و ۷۰ نمونه‌ی از بافت سالم مجاور همان

یافته‌ها

ویژگی‌های دموگرافیک نمونه‌ها: در این مطالعه از ۷۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال به عنوان گروه آزمایش و از ۷۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌ها به عنوان گروه شاهد استفاده شد. ۴۳ مورد (۶۱/۴۲ درصد) از افراد، مرد و ۲۷ مورد (۳۸/۵۷ درصد) زن بودند. پایین‌ترین سن در نمونه‌ها ۳۰ سال و بالاترین سن ۸۷ سال بود و میانگین سنین نمونه‌ها نیز $۱۳/۰۱ \pm ۶۱/۹۵$ سال محاسبه شد. ۵۴ عدد از نمونه‌ها (۷۷/۱۴ درصد) بالای ۵۰ سال سن داشتند.

ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌ها: بعد از مراحل آماده سازی بافت و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین تمامی نمونه‌ها مورد تأیید تشخیص پاتولوژی قرار گرفت. تمامی نمونه‌ها از نوع آدنوکارسینوما بود که از این بین، ۱۰ مورد آدنوکارسینومای موسینی (شکل ۱) و ۶۰ مورد آدنوکارسینومای غیر موسینی (شکل ۲) بود. ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌ها در جدول شماره ۱، ۲، که بیان سلولی P33 را در نمونه‌های سالم و توموری نشان می‌دهد، ۲۵ عدد از نمونه‌های سرطانی (۳۵/۷ درصد) در گروه ۱ (۰ تا ۱۵) قرار گرفتند؛ در حالی که ۱۱ عدد از نمونه‌های سالم (۱۵/۷ درصد) نیز در این گروه قرار داشتند؛ که نشان دهنده‌ی کاهش بیان این پروتئین در نمونه‌های سرطانی است. بر طبق همین جدول، ۴۰ مورد از نمونه‌های سرطانی در گروه ۲ (۱۵ تا ۵۰) و ۵ مورد در گروه ۳ (بیشتر از ۵۰) قرار گرفتند. در نمونه‌های سالم ۴۱ مورد در گروه ۲ و ۱۸ مورد در گروه ۳ قرار داشتند.

بعد از شستشو جهت انجام واکنش کروموزنیک، برش‌ها در یک محلول حاوی دی آمینو بنزیدین قرار گرفته، دوباره شستشو داده شد. در این مرحله، رنگ آمیزی مخالف با هماتوکسیلین صورت گرفت و در گروه‌های کنترل منفی فقط از آنتی بادی اولیه استفاده گردید.

بررسی میکروسکوپی مقاطع نشان‌دار شده با

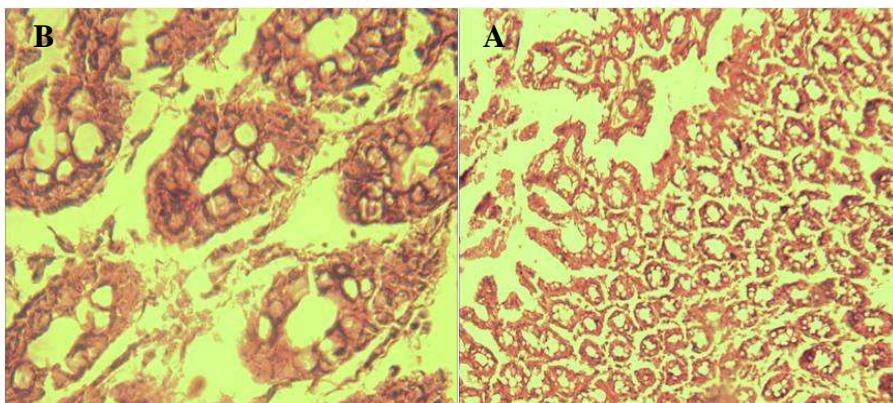
آنتی بادی: مقاطع نشان‌دار شده با آنتی بادی به منظور بررسی میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری (مدل CETI، ساخت آمریکا) و به کارگیری نرم‌افزار Motic Advance Plus 2 در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویر برداری شد و سپس جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده گردید. در این بررسی، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد و درصد سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به شدت رنگ آمیزی شده بود، تعیین گردید؛ بر همین اساس، نمونه‌ها به سه گروه درجه بندی شدند: گروه ۱ شامل نمونه‌هایی بود که حداکثر ۱۵ درصد از سلول‌های شمارش شده در آن‌ها هسته‌ی به شدت رنگ آمیزی شده داشت؛ در گروه ۲ نمونه‌هایی قرار گرفت که حداقل ۱۵ و حداکثر ۵۰ درصد از سلول‌های شمارش شده در آن‌ها هسته‌ی به شدت رنگ آمیزی شده داشت؛ در گروه ۳ نیز نمونه‌هایی قرار گرفت که بیشتر از ۵۰ درصد از سلول‌های شمارش شده‌ی آن‌ها هسته‌ی به شدت رنگ آمیزی شده داشت.

تجزیه و تحلیل یافته‌ها: آنالیز آماری اطلاعات با استفاده

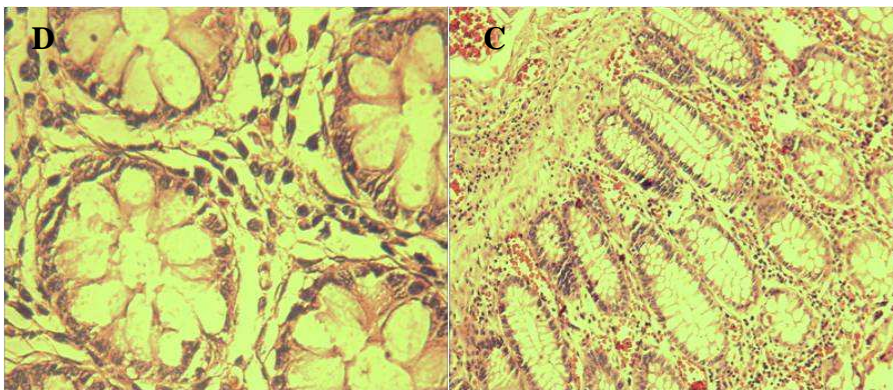
از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و با به کارگیری آزمون χ^2 انجام گرفت. از نظر آماری یافته‌های با مقادیر P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید (۵).

جدول ۱. ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک بیماران

| متغیر | تعداد (درصد) |
|-----------|-------------------------|
| محل تومور | کولون ۴۷ (۶۷/۱۴) |
| | رکتوسیگموئید ۲۳ (۳۲/۸۵) |
| | I ۹ (۱۲/۸۵) |
| Stage | IIA ۲۴ (۳۴/۲۸) |
| | IIB ۱۹ (۲۷/۱۴) |
| | IIIA ۴ (۵/۷) |
| | IIIB ۸ (۱۱/۴۲) |
| | IIIC ۶ (۸/۵۷) |
| Grade | موسینی ۱۰ (۱۴/۲۸) |
| | ۱ ۳۱ (۴۴/۲۸) |
| | ۲ ۲۰ (۲۸/۵۹) |
| | ۳ ۹ (۱۲/۸۵) |
| نوع تومور | موسینی ۱۰ (۱۴/۲۸) |
| | غیر موسینی ۶۰ (۸۵/۷۱) |
| متاستاز | دارد ۲۵ (۳۵/۷۱) |
| | ندارد ۴۵ (۶۴/۲۹) |



شکل ۱. A: نمونه‌ی آدنوکارسینومای موسینی از ناحیه‌ی کولون با Stage برابر IIIC با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×
B: نمونه‌ی آدنوکارسینومای موسینی از ناحیه‌ی کولون با Stage برابر IIIC با بزرگ‌نمایی ۴۰۰×

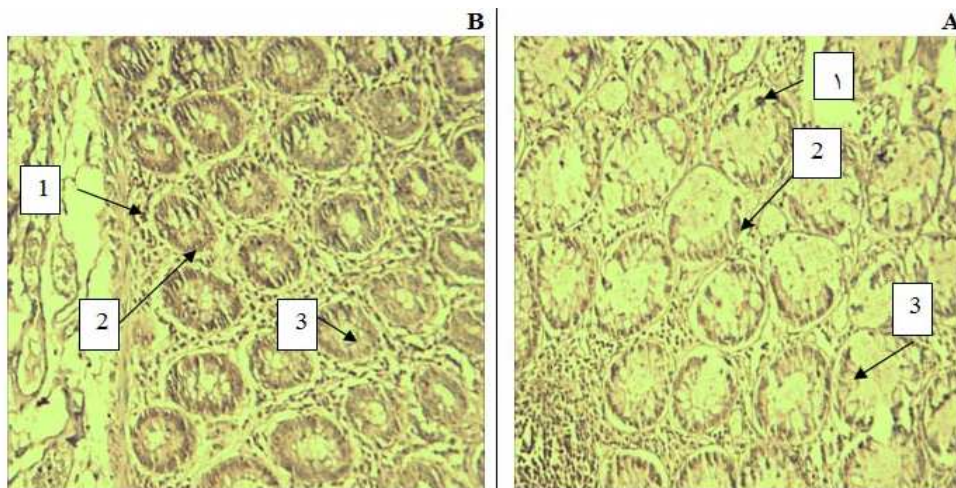


شکل ۲. C: نمونه‌ی آدنوکارسینومای غیر موسینی از ناحیه‌ی کولون با Stage برابر IIIA با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×
D: نمونه‌ی آدنوکارسینومای غیر موسینی از ناحیه‌ی کولون با Stage برابر IIIA با بزرگ‌نمایی ۴۰۰×

نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی و شمارش

سلولی نمونه‌ها با رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی: برای ردیابی پروتئین P33 در نمونه‌ها، رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی انجام شد. در بررسی ۱۰ محدودی متفاوت تصویربرداری، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد. پروتئین P33 در تمامی نمونه‌ها بیان شده بود و به طور عمده در هسته‌های سلول‌های اپی‌تلیال متمرکز بود؛ ولی میزان بیان این پروتئین در سلول‌های مختلف بافت اپی‌تلیال متفاوت بود؛ به گونه‌ای که بر اساس شدت رنگ آمیزی هسته، سلول‌ها به سه دسته تقسیم شدند: سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به شدت

رنگ آمیزی شده بود؛ سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به میزان متوسط رنگ آمیزی شده بود و سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به طور ضعیف رنگ آمیزی شده بود (شکل ۳). درصد سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به شدت رنگ آمیزی شده بود، تعیین گردید و بر اساس سه گروه درجه بندی شده در روش اجرا، بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی و بافت‌های سالم مجاور بررسی شد. با استفاده از آزمون χ^2 مشخص گردید که بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P = ۰/۰۲$) (جدول ۲).



شکل ۳. A: نمونه‌ای از بافت توموری از ناحیه کولون با Stage برابر IIA با بزرگ‌نمایی $100\times$

B: بافت سالم مجاور تومور از همان نمونه با بزرگ‌نمایی $100\times$

۱. سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به شدت رنگ آمیزی شده، ۲. سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به میزان متوسط رنگ آمیزی شده و ۳. سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به طور ضعیف رنگ آمیزی شده است.

جدول ۲. میزان بیان پروتئین P33 با رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی در بافت‌های سرطانی و سالم مجاور

| P value | گروه بندی نمونه | | |
|---------|-----------------|--------------|--------------|
| | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) |
| ۰/۰۰۲ | ۵(۷/۱) | ۴۰(۵۷/۱) | ۲۵ (۳۵/۷) |
| | ۱۸(۲۵/۷) | ۴۱(۵۸/۶) | ۱۱ (۱۵/۷) |

* گروه ۱: در این گروه نمونه‌هایی قرار گرفتند که در حداکثر ۱۵ درصد از سلول‌های شمارش شده، هسته به شدت رنگ آمیزی شده بود.

** گروه ۲: در این گروه نمونه‌هایی قرار گرفتند که در حداقل ۱۵ و حداکثر ۵۰ درصد از سلول‌های شمارش شده، هسته به شدت رنگ آمیزی شده بود

*** گروه ۳: در این گروه نمونه‌هایی قرار گرفتند که در بیشتر از ۵۰ درصد از سلول‌های شمارش شده، هسته به شدت رنگ آمیزی شده بود.

بحث

سرطان روده‌ی بزرگ سومین علت مرگ ناشی از سرطان است و در ایران سومین سرطان رایج می‌باشد (۲۷). ژن‌های مهار کننده‌ی تومور متعددی در این سرطان نقش دارند که از این بین، ژن مهار کننده‌ی تومور *ING1*، که به تازگی کشف شده است، تغییرات قابل توجهی را نشان می‌دهد. پروتئین P33، که توسط این ژن کدگذاری می‌شود (۵، ۱)، در اغلب سرطان‌ها دچار تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی می‌گردد؛ این تغییرات که شامل جهش، هیپرمتیلاسیون ناحیه‌ی پروموتور و عدم تعادل اللی (LOH) است، منجر به کاهش بیان پروتئین P33 می‌شود (۱۳). کاهش یا عدم بیان پروتئین P33 باعث رشد خارج از کنترل سلول و از طرف دیگر منجر به کاهش حساسیت سلول به آپوپتوز می‌شود و می‌تواند روند تشکیل سرطان را تسهیل کند (۱۷). بیان این پروتئین در اغلب سرطان‌ها، از جمله سرطان کولورکتال، کاهش می‌یابد و این کاهش بیان به طور مشخصی با مدت بقای بیمار ارتباط دارد (۲۶). در مطالعه‌ی حاضر، این کاهش بیان در نمونه‌های سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم مجاور مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل از شمارش سلولی، به طور کلی، بیان P33 در نمونه‌های سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم کاهش معنی‌دار یافته بود. مطالعات دیگری که توسط سایر محققین صورت گرفته است نیز کاهش بیان پروتئین P33 در سرطان کولورکتال و سایر سرطان‌ها را گزارش می‌کنند.

در مطالعه‌ی ای که Ahmed و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در انگلیس بر روی ۵۱ مورد سرطان کولورکتال روش ایمونوهیستوشیمی انجام دادند در ۳۲٪ از نمونه‌ها کاهش بیان پروتئین P33 مشاهده شد در این

مطالعه ارتباط بین بیان پروتئین P33 با متاستاز و مدت بقای بیماران نیز بررسی شده است به گونه‌ای که بیماران با بیان کمتر پروتئین میزان بقای کمتری نسبت به سایر بیماران داشتند. (۳) در مطالعه حاضر بیان پروتئین بر روی ۷۰ نمونه با همین روش و با استفاده از نرم افزار بررسی شده است و تنها بیان را بین دو گروه تومور و سالم مقایسه کرده ایم.

در مطالعه‌ی Chen و همکاران بر روی ۳۵ نمونه‌ی سرطان کولورکتال با روش‌های PCR و RT-PCR، بیان P33 به طور قابل توجهی نسبت به نمونه‌های سالم کمتر بود. همچنین این کاهش بیان با سرطان‌زایی و پیشرفت تومور نیز ارتباط داشت (۲۸). در این مطالعه، بیان ژن P33 مورد بررسی قرار گرفته بود، در صورتی که در مطالعه‌ی ما، بیان در سطح پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت.

مطالعه‌ی Tallen و همکاران بر روی ۳۷ مورد سرطان آستروسیتوما با روش RT-PCR، کاهش بیان P33 در این سرطان را گزارش می‌کند که این کاهش بیان با پیشرفت و تکامل سرطان نیز ارتباط داشت (۲۴).

در مطالعه‌ی Kameyama و همکاران که بر روی ۸۸ بیمار مبتلا به سرطان ریه با روش RT-PCR به صورت کمی انجام شد نیز در ۷۱/۶ درصد از بیماران کاهش بیان P33 مشاهده گردید (۲۲).

مطالعه‌ی Nouman و همکاران بر روی ۶۷ بیمار با سرطان ملانوسیت با روش ایمونوهیستوشیمی نیز کاهش بیان پروتئین P33 را گزارش می‌کند (۲۳).

در مطالعه‌ی Ohgi و همکاران بر روی ۸۶ مورد سرطان کبد با روش ایمونوهیستوشیمی نیز همین نتایج در مورد بیان P33 گزارش شد. در این مطالعه، بیان

سلول در ۱۰ محدوده‌ی مختلف از دو نظر کمی و کیفی صورت گرفت که می‌تواند از مزایای این مطالعه باشد. بر اساس یافته‌های سایر محققان، بین میزان بیان پروتئین و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک ارتباط وجود داشته است و پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، ارتباط بیان پروتئین در سطح بافت با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از زحمات پرسنل محترم آزمایشگاه پاتولوژی دکتر مهاجری، به ویژه شخص جناب آقای دکتر محمد رضا مهاجری و آزمایشگاه پاتولوژی دکتر منصور مهزاد که ما را در این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نماییم. همچنین لازم است از جناب آقای دکتر محمد حسین صانعی که با در اختیار قرار دادن برخی از نمونه‌ها ما را در انجام این تحقیق همراهی نمودند، تشکر به عمل آید.

پروتئین با Stage تومور نیز مورد ارزیابی قرار گرفت که مشخص شد این کاهش بیان در تومورهای با Stage پیشرفته بارزتر می‌باشد (۲۹).

در بررسی YU و همکاران بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان پانکراس، با روش ایمونوهیستوشیمی کاهش بیان پروتئین P33 مشاهده شد. همچنین بین بیان پروتئین با یافته‌های کلینیکوپاتولوژیک هیچ گونه ارتباطی مشاهده نشد (۳۰).

با توجه به نتایج به دست آمده، پروتئین P33 نقش مهمی در سرطان‌ها، به ویژه سرطان کولورکتال، ایفا می‌کند و کاهش بیان این پروتئین با پاتوژنز سرطان ارتباط دارد. بر همین اساس می‌توان از کاهش بیان این پروتئین به عنوان یک مارکر در تشخیص سرطان کولورکتال استفاده کرد و با تشخیص زودرس سرطان، میزان مرگ و میر آن را کاهش داد.

در این تحقیق که برای اولین بار در ایران صورت گرفت، بیان ژن P33 در سطح پروتئین بررسی شد؛ این بررسی با دقت بسیار بالا و شمارش حداقل ۱۰۰۰

References

- Ahmed IA, Kelly SB, Anderson JJ, Angus B, Challen C, Lunec J. The predictive value of p53 and P33(ING1b) in patients with Dukes'C colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2008; 10(4): 344-51.
- Russell M, Berardi P, Gong W, Riabowol K. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Exp Cell Res* 2006; 312(7): 951-61.
- Garkavtsev I. Suppression of the novel growth inhibitor P33(ING1) promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996; 14: 415-20.
- Tallen UG, Truss M, Kunitz F, Wellmann S, Unryn B, Sinn B, et al. Down-regulation of the inhibitor of growth 1 (ING1) tumor suppressor sensitizes p53-deficient glioblastoma cells to cisplatin-induced cell death. *J Neurooncol* 2008; 86(1): 23-30.
- Nouman GS, Anderson JJ, Wood KM, Lunec J, Hall A, Angus B. Loss of nuclear expression of the P33ING1b inhibitor of growth protein in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2002; 55(8): 596-601.
- Cheung KJ, Li G. The tumor suppressor ING1: structure and function. *Exp Cell Res* 2001; 268(1): 1-6.
- Baranova V, Ivanov DV, Makeeva NV, Corcoran M, Nikitin EA, Borodina TA, et al. Genomic organization of a tumor growth inhibitor gene ING1. *Mol Biol* 2000; 34(2): 232-6.
- Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Hanafusa H, Etani T, Nishioka S, et al. Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2000; 60(12): 3143-6.

9. Cheung KJ, Li G. The tumor suppressor ING1: structure and function. *Exp Cell Res* 2001; 268(1): 1-6.
10. Saito A, Furukawa T, Fukushige S, Koyama S, Hoshi M, Hayashi Y, et al. p24/ING1-ALT1 and p47/ING1-ALT2, distinct alternative transcripts of P33/ING1. *J Hum Genet* 2000; 45(3): 177-81.
11. Nouman GS, Anderson JJ, Lunec J, Angus B. The role of the tumor suppressor P33 ING1b in human neoplasia. *J Clin Pathol* 2003; 56(7): 491-496.
12. Martin J, Dufour JF. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(11): 1720-33.
13. Sarela AI, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. The candidate tumor suppressor gene, ING1, is retained in colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 1999; 35(8): 1264-7.
14. Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert FM, Young D, Bazett-Jones DP, et al. UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 19): 3455-62.
15. Kadigee MR, Ayer DE. The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of PF1 is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. *J Biol Chem* 2006; 281: 28831-6.
16. Zhu JJ, Li FB, Zhou JM, Liu ZC, Zhu XF, Liao WM. The tumor suppressor P33ING1b enhances taxol-induced apoptosis by p53-dependent pathway in human osteosarcoma U2OS cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(1): 39-47.
17. Sanchez-Cespedes M, Okami K, Cairns P, Sidransky D. Molecular analysis of the candidate tumor suppressor gene ING1 in human head and neck tumors with 13q deletions. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27(3): 319-22.
18. Nouman GS, Anderson JJ, Crosier S, Shrimankar J, Lunec J, Angus B. Downregulation of nuclear expression of the P33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol* 2003; 56(7): 507-511.
19. Nouman GS, Anderson JJ, Lunec J, Angus B. The role of the tumor suppressor P33 ING1b in human neoplasia. *J Clin Pathol* 2003; 56(7): 491-6.
20. Goeman F, Thormeyer D, Abad M, Serrano M, Schmidt O, Palmero I, et al. Growth inhibition by the tumor suppressor P33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Mol Cell Biol* 2005; 25(1): 422-31.
21. Zhu Z, Lin J, Qu JH, Feitelson MA, Ni CR, Li FM, et al. Inhibitory effect of tumor suppressor P33(ING1b) and its synergy with p53 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11(13): 1903-9.
22. Kameyama K, Huang CL, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Sumitomo S, et al. Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9(13): 4926-34.
23. Numan GS, Anderson JJ, Mathers ME, Leonard N, Crosier S, Lunec J, et al. Nuclear to cytoplasmic compartment shift of the P33 ING1b tumor suppressor protein is associated with malignancy in melanocytic lesions. *Journal compilation. Histopathology* 2002; 40(4): 360-6.
24. Tallen G, Kaiser I, Krabbe S, Lass U, Hartmann C, Henze G, et al. No ING1 mutations in human brain tumors but reduced expression in high malignancy grades of astrocytoma. *Int J Cancer* 2004; 109(3): 476-9.
25. Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(5): 1054-65.
26. Benhattar J, Cerottini JP, Saraga E, Metthez G, Givel JC. P53 mutations as a possible predictor of response to chemotherapy in metastatic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69(3): 190-2.
27. Sodeifi N, Sotoudeh M, Shafieyan S. Immunohistochemical and Tissue Array Study for comparison of the expression of tumor suppressor genes and with intercellular adhesive molecular in colorectal adenocarcinoma and nontumoral colon. *Yakhteh Medical Journal* 2006; 8(3): 178-83.
28. Chen LS, Wei JB, Zhou YC, Zhang S, Liang JL, Cao YF, et al. Genetic alterations and expression of inhibitor of growth 1 in human sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(39): 6120-4.
29. Ohgi T, Masaki T, Nakai S, Morishita A, Yukimasa S, Nagai M, et al. Expression of P33(ING1) in hepatocellular carcinoma: relationships to tumor differentiation and cyclin E kinase activity. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37(12): 1440-8.
30. Yu GZ, Zhu MH, Zhu Z, Ni CR, Zheng JM, Li FM. Genetic alterations and reduced expression of tumor suppressor P33(ING1b) in human exocrine pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10(24): 3597-601.

Study of P33 Tumor Suppressor Protein Expression in Normal and Cancerous Colorectal Tissues

Mehdi Nikbakht PhD¹, Somayeh Fallahnejad², Mitra Heydarpur MD³, Bahman Rashidi PhD⁴

Abstract

Background: P33 (ING1b) is a tumor suppressor protein involved in growth control and apoptosis. Suppression of P33 expression is associated with the loss of cellular growth control. Colorectal cancer is the second most common malignancy in the world. Detection of the disease at an early stage can reduce mortality. To investigate the role of P33 in colorectal carcinoma pathogenesis, we evaluated P33 expression in colorectal cancer patients by immunohistochemistry.

Methods: P33 protein expression from 70 colorectal cancer specimens and their matched normal colorectal sections from the series of colorectal cancer patients was examined in paraffin-embedded material by immunohistochemistry. The proportions of cellular staining for P33 were estimated under light microscopy by using Motic Advanced Plus 2 soft ware.

Findings: P33 was expressed in all tissues, and was mainly localized in the nuclei of epithelial cells. P33 was down-regulated in the colorectal cancer specimens, compared with the matched normal tissues ($P = 0.002$).

Conclusion: Expression of P33 in cancer tissues was significantly lower than normal tissues. This study showed that P33 expression may be associated with pathogenesis of colorectal cancer.

Key words: Colorectal cancer, Immunohistochemistry, Tumor suppressor gene.

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

² MSc Student, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³ Resident, Department of Pathology, Alzahra Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁴ Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

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