

بررسی تغییرات میزان پروتئین ARG طی پیشرفت بدخیمی لنفومای منتشر سلول بزرگ B

دکتر فریبرز مکاریان*، شهناز امانی**، دکتر زهرا کبیری***، دکتر منصور صالحی****

* متخصص هماتولوژی، استادیار گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

** کارشناس علوم تغذیه، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

*** پزشک عمومی، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

**** دانشیار ژنتیک و بیولوژی مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۶/۶/۲۰

چکیده

ARG یک پروتئین انکوژن و عضوی از خانواده‌ی پروتئینی تیروزین کینازها می‌باشد. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر مشخص کردن اهمیت ژن ARG در staging سرطان لنفومای منتشر سلول بزرگ B (DLBCL) بود.

مقدمه:

شانزده نمونه‌ی DLBCL و چهار نمونه‌ی گره‌ی لنفوی فعال (reactive lymph node) (به عنوان گروه شاهد) پس از staging به وسیله‌ی سیستم Ann Arbor در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. از نمونه‌ها پس از ثبوت در فرمالدئید و قالب‌گیری در پارافین، بلوک تهیه شد. پس از تهیه‌ی برش، نمونه‌ها با دو آنتی‌بادی اولیه‌ی خاص ژنهای ARG و GAPDH (به عنوان یک House Keeping Gene) هیبرید شدند. سپس لام‌ها شستشو داده شدند و با دو آنتی‌بادی ثانویه‌ی نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسینس هیبرید شدند. آنتی‌بادی ثانویه‌ی ARG با رنگ فلورسینس سبز (FITC) و آنتی‌بادی ثانویه‌ی GAPDH با رنگ فلورسینس قرمز (Texas red) نشاندار شده بود. میزان شدت رنگ‌های سبز و قرمز پس از عکس برداری از لام‌ها با استفاده از دوربین CCD، اندازه‌گیری شد و نسبت رنگ سبز به قرمز برای هر سلول نمونه‌های مورد و شاهد اندازه‌گیری شد. تفاوت در میانگین این نسبت بین نمونه‌های مورد و شاهد بیانگر تغییر در میزان بیان پروتئین ARG بود.

روش‌ها:

در نمونه‌های مورد مطالعه، میانگین نسبت رنگ سبز به قرمز (بیانگر سطح بیان پروتئین ARG) در گره‌های لنفوی فعال و stage I، II و III سرطان DLBCL تفاوت معنی‌داری داشت. سطح بیان ARG بین همه‌ی گروه‌ها به استثنای مرحله III و IV در نمونه‌های DLBCL متفاوت بود.

یافته‌ها:

تفاوت‌های مشاهده شده در سطح بیان ARG در مراحل مختلف DLBCL نشانگر این مطلب است، که این ژن ممکن است قابلیت کاربرد به عنوان بیومارکر در Staging سرطان DLBCL را دارا باشد. علاوه بر این به کار بردن مهارکننده‌های اختصاصی ARG به عنوان عوامل جدید شیمی درمانی، می‌تواند در درمان DLBCL مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری:

لنفوما، پروتئین ARG، لنفومای منتشر سلول B بزرگ.

واژگان کلیدی:

تعداد صفحات: ۱۰

تعداد جدول‌ها: ۱

تعداد نمودارها: ۱

تعداد منابع: ۲۳

فریبرز مکاریان، متخصص هماتولوژی، استادیار گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

E-mail: mokarian@med.mui.ac.ir

آدرس نویسنده‌ مسئول:

مقدمه

لنفوم غیر هوچکین (NHL) سرطانی هتروژن شامل دو گروه بدخیمی لنفوسیت‌های T و B می‌باشد. در میان بدخیمی‌های سلول‌های B، لنفومای منتشر سلول‌های B بزرگ (DLBCL) که به علت بدخیمی لنفوسیت‌های B بزرگ ترانسفورم شده به وجود می‌آید، شایع‌ترین لنفوم غیر هوچکین است (۱).

ژن‌های بسیاری در سرطان‌زایی نقش دارند به عنوان مثال تغییر در عملکرد انکوژن‌ها منجر به تغییر شکل نئوپلاستیک سلول‌ها می‌شود. ژن‌های فعال کننده و یا تحریک کننده تقسیم سلولی مانند فاکتورهای رشد، گیرنده‌های فاکتورهای رشد، پروتئین‌کینازها، اجزای سیستم انتقال سیگنال (Signal Transduction)، فسفوپروتئین‌های هسته‌ای و فاکتورهای رونویسی نمونه‌هایی از انکوژن‌ها می‌باشند. در میان فاکتورهای مذکور خانواده‌ی پروتئین‌کینازها به خوبی شناخته شده‌اند. ABL-1 (یک تیروزین کیناز غیر رسپتوری) پروتوانکوژنی است که در هماتوپوئیس طبیعی به ویژه در تولید دودمان میلوئید نقش دارد.

جا به جایی کروموزومی که در آن ژن‌های c-abl روی کروموزوم ۹ و bcr روی کروموزوم ۲۲ دخیل می‌باشند، منجر به ایجاد کروموزوم فیلادلفیا می‌گردد که توسط روش‌های سیتوژنتیک قابل تشخیص است. کروموزوم فیلادلفیا در ۹۵٪ از بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید مزمن (CML) دیده می‌شود (۲-۳). بنابراین c-abl دارای نقشی حیاتی در ایجاد لوسمی و دیگر سرطان‌هاست.

در طول چند سال اخیر دانشمندان بر روی ژن ABL-2 یا ARG و محصول آن (پروتئین ARG) مطالعات بسیاری انجام داده‌اند و علت این امر تا حد

زیادی همولوگ بودن ARG با c-abl می‌باشد. پروتئین‌های c-abl و ARG در نواحی N-ترمینال، SH2، SH3 و دومین کیناز ۹۰٪ مشابه هستند. ناحیه C-ترمینال ARG و c-abl ۲۹٪ شباهت دارد و به علت وجود دومین‌های کروی (گلوبولار G)، رشته‌ای (فیلامنتوس) (F) و دومین‌های متصل شونده به اکتین از سایر تیروزین کینازهای غیررسپتوری متمایز می‌شوند (۴).

مطالعات قبلی بعضی از نقش‌های کینازهای ABL را مشخص نموده‌اند، مواردی چون تنظیم تقسیم سلولی، تجدید سازماندهی اسکلت سلولی، مهاجرت سلولی، پاسخ به استرس اکسیداتیو و آسیب به DNA (۵-۸).

عملکرد اختصاصی ARG به خوبی مشخص نشده است، اما این ژن در فراهم‌سازی شرایطی برای تکامل سیستم عصبی، همچنین برای عملکرد بافت مغز در افراد بالغ نقش دارد. علاوه بر این ARG ممکن است در هماتوپوئیس نیز دارای اهمیت باشد (۹).

ARG نیز مانند ABL-1 در تعدادی از سرطان‌ها نقش قابل توجهی دارد. اولین مطالعه‌ای که نقش ARG را در لوسمی انسان نشان داد، مطالعه‌ای بود که بر روی دودمان سلولی AML-M3 انجام گرفت و ARG به عنوان یک ژن جدید همکاری کننده با ETV6 در دودمان سلولی AML-M3 گزارش شد (۱۰). شواهد دیگری نیز در تأیید نقش ARG در سایر سرطان‌ها وجود دارد. به عنوان مثال مطالعه‌ی ریزسنجی (Microarray) که بر روی کارسینومای معده‌ی انسان انجام شد، کاهش بیان ARG در این کارسینوما را نشان داد (۱۱). در حالی که در سرطان آدنوئید پانکراس و سرطان پستان افزایش بیان این ژن گزارش شده است (۱۲-۱۳). همچنین در مطالعه‌ی دیگری که با همین

یکسان در لنفوئید و گره‌های لنفی فعال بود. برای انجام این مقایسه از دو آنتی‌بادی یکی برای ژن ARG و دیگری برای ژن House keeping (خانه پای) به کار رفته در این مطالعه (GAPDH) استفاده شد. هرگونه تغییر در نسبت ARG به GAPDH نشانگر تغییر در سطح بیان ARG در نمونه‌ها می‌باشد؛ زیرا سطح بیان ژن GAPDH در لنفوما و گره‌های لنفاوی ثابت است (۱۶). این روش، روشی نیمه کمی (Semiquantitative) به منظور مقایسه‌ی سطح بیان ژن یا پروتئین در برشهای بافتی است.

نمونه‌های لنفوما بر اساس سیستم Ann-Arbor به چهار stage تقسیم شدند. برای هر stage چهار نمونه مورد مطالعه قرار گرفت. قطعات بافتی ابتدا با استفاده از روش‌های استاندارد ثابت شده، سپس از آنها بلوک پارافینی تهیه می‌شد. در مرحله بعدی با استفاده از یک میکروتوم چرخشی Gung برش‌های ۴ میکرومتری از بلوکها تهیه و در سطح آب مقطر ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد شناور می‌شد. پس از این مرحله نمونه‌ها بر روی لام‌های میکروسکوپ قرار داده شده، به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند. این لام‌ها پیشتر در محلول ۳- آمینو پروپیل تری اتوکسیسیلان قرار داده شده بودند تا نمونه‌ها به خوبی به سطح آنها بچسبند.

به منظور اندازه‌گیری سطح بیان پروتئین‌های ARG و GAPDH از روش ایمنو‌هیستوشیمی استفاده شد. آنتی‌بادی اولیه‌ی ARG (sc-6856) که مختص توالی C-ترمینال ARG انسانی بود، یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال بز بود. آنتی‌بادی اولیه‌ی ویژه GAPDH (sc-25778) یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG در خرگوش ضد GAPDH انسان بود. آنتی‌بادی‌های

روش بر روی لنفوما انجام شد، نشان داده شد که در تبدیل لنفوما‌ی فولیکولار به DLBCL میزان بیان ARG افزایش می‌یابد. در این مطالعه بیان ژنها در هفت نمونه‌ی لنفوما‌ی فولیکولار که به DLBCL تبدیل شده بودند، بررسی شد و نتایج حاکی از آن بود که بیان ژن ARG در چهار نمونه از هفت نمونه‌ی مورد مطالعه افزایش یافته است (۱۴).

به نظر می‌رسد این افزایش بیان ARG در بعضی از نمونه‌ها (و نه در همه‌ی آنها) به این علت است که نمونه‌های مورد آزمایش در stage‌های مختلف DLBCL قرار داشته‌اند. به ویژه که مطالعات نشان داده‌اند در سرطان تایموما افزایش بیان ARG با staging این سرطان مرتبط می‌باشد و با عبور از stage I تا IV سطح بیان ARG افزایش می‌یابد (۱۵). در مطالعه‌ی حاضر به منظور ارزیابی نقش ژن ARG در DLBCL سطح بیان پروتئین ARG در مراحل مختلف کلینیکی DLBCL بررسی شده است. علاوه بر این سطح بیان پروتئین ARG در نمونه‌های DLBCL با بافت لنفوئید طبیعی نیز مقایسه شده است.

روش‌ها

بلوک‌های پارافینی بیست نمونه مورد مطالعه قرار گرفت که شانزده عدد آن متعلق به بیماران DLBCL و چهار عدد آن متعلق به بیماران لنفادنوپاتی ویروسی یا باکتریایی بود. کلیه‌ی بیماران در فاصله‌ی سال‌های ۷۸ تا ۸۴ در بیمارستان سیدالشهدای (ع) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند.

به منظور اندازه‌گیری سطح بیان ARG در نمونه‌های مختلف نیاز به مقایسه‌ی بیان این پروتئین و یک پروتئین House keeping (خانه پای)، با سطح بیان

۱ به ۲۰۰ رقیق شدند و $150 \mu\text{L}$ از هرکدام از آنها برای هر اسلاید به کار برده شد. از این مرحله کلیه واکنش‌ها در تاریکی انجام گرفت. پس از این مرحله روی لام‌ها با لامل پوشانده شد و توسط لاک ناخن شفاف آب‌بندی گردید. لام‌ها به مدت یک ساعت در دمای 37°C درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس با محلول PBS (2×10 دقیقه) شستشو داده شدند. لام‌ها پس از آماده‌سازی با استفاده از یک میکروسکوپ فلورنس (LEICA (BZOO) که برای رنگ‌های فلورنس FITC و Texas red دارای فیلترهای اختصاصی بود، مورد مطالعه قرار گرفتند.

از هر میدان دید میکروسکوپ، دو عکس گرفته شد، یکی با فیلتر قرمز و یکی با فیلتر سبز؛ عکس‌ها توسط دوربین CCD متصل به میکروسکوپ (LEICA, DC 350F) تهیه و به کامپیوتر متصل به دوربین انتقال یافت. تصاویر ذخیره شده در کامپیوتر با استفاده از نرم‌افزار آنالیز کننده تصاویر- نوشته شده توسط شرکت IP Lab Spectrum Signal Analytics, Tucson, USA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. این نرم‌افزار توسط شرکت scientific Digital انگلستان تولید و از شرکت Vysis آمریکا تهیه گردید.

میزان رنگ سبز (پروتئین ARG) و رنگ قرمز (پروتئین GAPDH) در هر کدام از تصاویر ذخیره شده از میدان‌های میکروسکوپی اندازه‌گیری شد. نسبت رنگ سبز به قرمز و میانگین این نسبت برای همه‌ی نمونه‌های DLBCL و گره‌های لنفی فعال محاسبه شد.

سطح بیان GAPDH در گره‌های لنفی طبیعی و بافت‌های لنفوئیدی نئوپلاسمی یکسان است، به همین دلیل تفاوت در نسبت رنگ سبز به قرمز در نمونه‌های

ثانویه کتزوگه با فلوروکروم برای ARG و GAPDH به ترتیب شامل آنتی‌بادی کتزوگه‌ی Texas red الاغ، ضد IgG خرگوش (sc-2095) و آنتی‌بادی کتزوگه‌ی FITC موش، ضد IgG بز (sc-2356) بود. همه‌ی آنتی‌بادی‌ها از کمپانی بیوتکنولوژی سانتاکروز آمریکا خریداری شدند. تهیه‌ی لام‌ها شامل انتقال برشها به لام، پارافین زدایی، آب‌دهی و احیای آنتی ژن بود.

پارافین زدایی و آب‌دهی به برشها طی مراحل زیر انجام پذیرفت: گزلیل (2×10 دقیقه)، الکل خالص (2×5 دقیقه)، الکل 95% (2×5 دقیقه)، الکل 80% (5 دقیقه)، آب دیونیزه شده (5 دقیقه)، سالین بافری فسفات (PBS) (2×5 دقیقه). پس از آب‌دهی، لام‌ها در محلول HIER (سیترات، $0/01$ مولار، $\text{pH} = 6$) قرار داده و تا رسیدن به دمای جوش گرم شد. این مرحله با قرار دادن 10 لام در 100 میلی لیتر محلول HIER در اجاق میکروویو به مدت 3 دقیقه در 900 وات صورت گرفت. پس از خارج کردن لام‌ها از میکروویو و رسیدن دمای آنها به درجه حرارت اتاق، آنها را با آب مقطر شستشو دادیم. در مرحله بعدی، 150 میکرولیتر محلول blocking peptide (با رقت 1 به 20 در BSA) به لام‌ها اضافه شد و برای یک ساعت در 37°C درجه سانتیگراد در یک جعبه مرطوب (humified chamber) قرار داده شدند. سپس لام‌ها با PBS شستشو داده شدند.

آنتی‌بادی‌های اولیه بر طبق توصیه‌ی شرکت سازنده به میزان 1 به 400 در PBS رقیق شده، $150 \mu\text{L}$ از هرکدام از آنها به لام‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای 37°C درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس با محلول PBS شستشو داده شدند (2×10 دقیقه). آنتی‌بادی‌های کتزوگه‌ی ثانویه در بافر PBS به نسبت

از ارزیابی دقیق سطح بیان پروتئین می‌شود، اما با استفاده از توانایی دوربین CCD می‌توان به ارزیابی نسبی از سطح بیان پروتئین دست یافت. این روش در اساس شبیه روش لکه‌گذاری وسترن می‌باشد، که در آن سیگنال‌های حاصل از پروتئین مورد استفاده در مقایسه با سیگنال‌های حاصل از یک ژن خانه‌پای مورد بررسی نیمه‌کمی قرار می‌گیرد. در مطالعه‌ی حاضر ژن GAPDH به عنوان ژن شاهد مورد استفاده قرار گرفته است. سطح بیان این ژن در بافت لنفوئیدی طبیعی یا نئوپلاستیک یکسان است.

در برش‌های تهیه شده از گره‌های لنفی فعال و DLBCL، ۱۱۰ سلول مورد بررسی قرار گرفتند، اگر چه این روش به نسبت وقت‌گیر می‌باشد اما اطلاعات بسیار دقیقی در مورد تغییرات سطح بیان پروتئین در داخل سلول‌ها فراهم می‌کند.

سطح بیان GADH، ARG: تغییرات در سطح بیان ARG در نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس کاهش یا افزایش نسبت سطح بیان ARG به GAPDH محاسبه شد. همان‌طور که پیشتر نیز بیان شد، سطح بیان GAPDH در سرطان‌ها ثابت می‌باشد. بنابراین هرگونه تغییر در نسبت رنگ سبز به قرمز نشان دهنده‌ی تغییر در سطح بیان ARG می‌باشد.

میانگین نسبت سطح بیان ARG به GAPDH در مراحل I تا IV سرطان DLBCL به ترتیب ۰/۰۶۹، ۰/۰۷۲، ۰/۰۷۷ و ۰/۰۷۷ و در عقده‌های لنفی فعال ۰/۰۶۵ بود. محاسبه‌ی P-value نشان داد، که به جز تفاوت مشاهده شده بین مراحل III و IV تفاوت مشاهده شده بین سایر گروه‌های مورد مطالعه، معنی‌دار بود. خلاصه‌ی این نتایج در شکل و جدول ۱ آورده شده است.

مورد آزمایش نشانگر تفاوت در سطح بیان پروتئین ARG می‌باشد. قبل از انجام آزمایشات پیش‌گفته برای هرکدام از نمونه‌ها یک لام IHC جهت تأیید این که سلول از نوع لنفوسیت‌های B است - نه لنفوسیت‌های T- تهیه گردید. روش تهیه‌ی این لام‌ها نیز مانند روش ذکر شده در بالا می‌باشد اما در این جا از آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای تمایز سلول‌های B از سلول‌های T استفاده شد و نیازی به استفاده از کنژوگه‌ی فلورسنت نبود و به جای آن از آنتی‌بادی ثانویه‌ی نشان‌دار شده با روش‌های شیمیایی استفاده گردید.

جهت مقایسه‌ی داده‌ها در گروه‌های مختلف از آزمون One Way ANOVA استفاده شد؛ کلیه‌ی تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گردید.

یافته‌ها

بیماران: سطح بیان پروتئین ARG در ۱۶ بیمار مبتلا به DLBCL بررسی شد. DLBCL دارای چهار stage می‌باشد و چهار نمونه از بیماران در هر stage بررسی شدند. علاوه بر این سطح بیان این پروتئین در چهار بیمار مبتلا به لنفادنوپاتی غیرنئوپلاستیک ویروسی یا باکتریایی نیز بررسی شد.

آنالیز نتایج حاصل از ایمینوهیستوشیمی: سطح بیان پروتئین در برش‌های تهیه شده از بلوک‌های پارافینی از بافت لنفوئید بیماران DLBCL و لنفادنوپاتی بررسی شد. این روش به منظور بررسی سطح بیان بیش از یک ژن در یک سلول خاص و در یک زمان معین به کار برده می‌شود. ما این روش را برای اندازه‌گیری بیان پروتئین، تکمیل کردیم و به کار بردیم. لازم به ذکر است که متفاوت بودن شرایط IHC برای هر لام مانع

مقایسه شده بود، تطابق داشت. در مطالعه‌ی حاضر بیان ARG در stageهای مختلف DLBCL مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این دو مطالعه حاکی از آن بود که سطح بیان ARG نه تنها بین لنفوم‌های مختلف بلکه بین stageهای مختلف DLBCL نیز متفاوت می‌باشد.

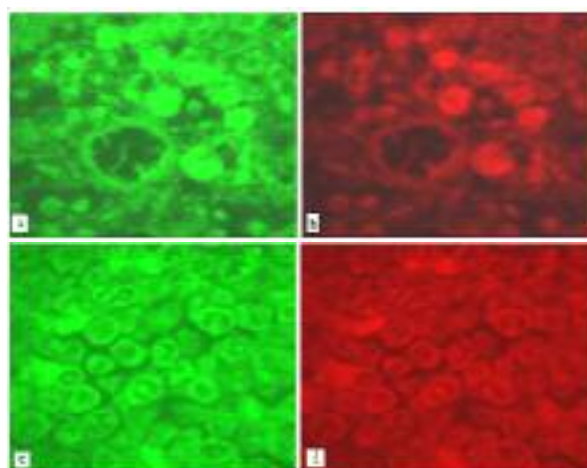
مقایسه‌ی بیان پروتئین ARG بین چهار stage سرطان DLBCL نتایج جدیدی را در خصوص ارتباط بین سطح بیان آن و staging در DLBCL نشان داد. نتایج نشان داد که بیان ARG بین مراحل I و II و همچنین مراحل II و III ($P < 0/001$) تفاوت معنی‌داری دارد. این تفاوت معنی‌دار بین مرحله I با مراحل III و IV و بین مرحله II با مرحله IV نیز مشاهده شد. اما بیان ARG بین مرحله III و IV تفاوت معنی‌داری نداشت.

ARG و c-abl اعضای خانواده‌ی Abelson از تیروزین کینازهای غیر رسپتوری پستانداران می‌باشند. این دو ژن همواره در بافت بالغ بیان می‌شوند (۴). c-abl برای رشد و تکامل طبیعی ضروری می‌باشد، به طوری که موش‌هایی که در ژن مذکور اختلال دارند، به طور معمول ضعیف متولد شده و دارای اختلالاتی در سر و چشم‌ها می‌باشند. بیشتر این موش‌ها در دوران نوزادی به دلیل اختلال در سیستم لنفاوی (Defective Lymphopoiesis) از بین می‌روند. اگر چه c-abl و ARG همولوگ هستند اما موش‌هایی که دارای کمبود ARG می‌باشند، به صورت طبیعی رشد می‌کنند ولی بعضی اختلالات رفتاری را نشان می‌دهند (۱۷، ۹). به تازگی HernandezKole و همکارانش نشان داده‌اند که ARG در تنظیم مورفوژنز عصبی در مغز پس از تولد نقش دارد (۱۸) و رفتار غیر طبیعی در موش‌هایی که دارای

جدول ۱. مقایسه میانگین، ماکزیمم و مینیمم نسبت ARG به

GAPDH			
Group	Mean Ratio	Min.	Max.
Reactive lymph node	۰/۶۵	۰/۶۲	۰/۶۷
DLBCL stage I	۰/۶۹	۰/۶۱	۰/۷۲
DLBCL stage II	۰/۷۲	۰/۶۹	۰/۷۹
DLBCL stage III	۰/۷۷	۰/۷۴	۰/۸۰
DLBCL stage IV	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۸۰

حداقل ۱۰۰ سلول برای هر گروه مورد مطالعه قرار گرفته است.



شکل ۱. نمونه‌ای از تصویرهای نشان‌دهنده‌ی سطح بیان پروتئین‌های ARG و GAPDH که به ترتیب با استفاده از آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با رنگ‌های فلورسینس سبز (FITC) و قرمز (Texas red) مشخص می‌شوند، در stageهای III (a و b) و II (c و d) سرطان DLBCL

بحث

مطالعه حاضر جهت بررسی نقش احتمالی بیان ARG در پیشرفت stageهای مختلف DLBCL طراحی شده بود. مطالعه‌ی ما نشان داد که بیان ARG در مراحل پیشرفته DLBCL (مراحل III و IV) بیشتر از مراحل I و II می‌باشد. علاوه بر این مطالعه‌ی ما نقش احتمالی ARG در بیماریزایی DLBCL را در مقایسه با گره‌های لنفی غیرنئوپلاستیک نشان داد، زیرا ARG در نمونه‌های DLBCL در مقایسه با گره‌های لنفی فعال بیان بالاتری داشت. این نتیجه با نتیجه‌ی مطالعه‌ی قبل ما که در آن بیان ARG بین انواع مختلف لنفوما

مطالعه‌ی بررسی ارتباط بین الگوی بیان تیروزین کینازها و سرطان پستان نشان دادند که بیان ARG در سرطان پستان بسیار بالاست (۱۲). همین نتیجه در مورد سرطان آدنوئید پانکراس نیز به دست آمد (۱۳). Wu و همکاران نشان دادند که افزایش بیان

ARG در سرطان آدنومای معده با افزایش رگ‌زایی مرتبط می‌باشد. آن مطالعه نشان دهنده‌ی نقش بالقوه‌ی ARG در پیشرفت و قدرت تهاجمی سرطان معده بود (۲۰). در راهبردی جدید برای درمان ملانوما از ممانعت کننده‌های تیروزین کیناز استفاده شده و نشان داده شد که کاهش بیان ARG نقش مهمی در درمان ملانوما دارد. مطالعه‌ای که به بررسی این مسأله با استفاده از روش ایمینوهیستوشیمی پرداخته (۲۱) از روشی کم و بیش مشابه روش مورد استفاده در مطالعه ما استفاده کرده است. سطح بیان ARG در سرطان مثانه نیز بررسی شده و نتایجی کم و بیش مشابه به دست آمده است (۲۲). مطالعه بر روی سطح بیان ژنها با استفاده از روش ریزسنجی در لنفوما نقش احتمالی افزایش بیان ARG در لنفوما را مشخص کرده است. به این صورت که افزایش سطح بیان ARG در ترانسفورم شدن لنفومای فولیکولار به DLBCL نشان داده شده است (۱۴).

نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ما حاکی از آن است که سطح بیان ARG بین مرحله III و IV تفاوت معنی‌داری ندارد. به نظر می‌رسد که ژنها یا مکانیزم‌های دیگری در انتقال DLBCL از مرحله‌ی III به مرحله‌ی IV نقش دارند. از طرف دیگر سطح بیان ARG در مراحل I و II نسبت به مراحل III و IV پایین‌تر می‌باشد. به علت این که staging سرطان DLBCL از جمله فاکتورهای تعیین کننده شاخص

کمبود ARG می‌باشند، احتمال دارد به علت همین نقص در مورفوزن سیستم عصبی آنها باشد. این مسأله در سلول‌های سرطانی نیز ممکن است اتفاق بیافتد، به طوریکه افزایش بیان ARG می‌تواند سبب تقسیم غیرعادی سلول‌ها شود.

گرچه این عقیده وجود دارد که ARG مانند c-abl ممکن است در مکانیسم‌های مهم سلولی مانند تنظیم تقسیم سلول، آپوپوز، مهاجرت سلولی، تغییر در اسکلت سلولی و ترمیم DNA دخیل باشد (۸-۵)، اما نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ما حاکی از آن است که با پیشرفت stage‌های DLBCL سطح بیان ARG افزایش می‌یابد. این نتایج با نقش ARG در تغییر عملکرد اسکلت سلولی هماهنگی دارد اما با نقش آن در آپوپوز و ترمیم DNA در تضاد است.

در مطالعه‌ای که بر روی دودمان سلولی هپاتومای انسان (HLE) صورت گرفته است، کاهش بیان ARG مشاهده شده و بیان شده است که کاهش بیان ARG باعث کاهش عملکرد آپوپتیک آن در نهایت منجر به تهاجمی‌تر شدن سرطان می‌شود (۱۹). در مطالعه‌ی مشابه دیگری که بر روی سرطان معده‌ی انسان انجام شده است، نتایج مشابهی به دست آمده است (۱۱). افزایش بیان ARG احتمال دارد در جلوگیری از متاستاز و تهاجم به بافت‌های مجاور نقش داشته باشد.

به استثنای مطالعات ذکر شده، کم و بیش همه‌ی مطالعات انجام شده بر روی بیان ARG در سرطان‌های مختلف افزایش بیان این ژن را در سرطان تأیید کرده‌اند به طوری که در حال حاضر این عقیده مورد قبول است که بین افزایش بیان ARG و ابتلا به سرطان ارتباطی قوی وجود دارد. Meric و همکاران در

صورت انتخابی مهار کند و احتمال دارد از پیشرفت DLBCL جلوگیری کند (۲۳). مطالعه‌ی ما نشان دهنده‌ی ارتباط بین افزایش بیان ARG و staging سرطان DLBCL می‌باشد. مطالعه‌ی دیگری که ارتباط بین افزایش بیان ARG و staging یک سرطان را نشان می‌دهد توسط Sasaki و همکاران در خصوص تایمومما انجام شد (۱۵). مطالعه‌ی ما نخستین مطالعه‌ای است که ارتباط بین سطح بیان ARG و staging در لنفوما بررسی می‌نماید. بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه و سایر مطالعات به نظر می‌رسد مطالعه‌ی بیشتر در مورد ارزش ARG به عنوان یک بیومارکر در staging بعضی از سرطانها می‌بایست بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

پیش آگهی بین‌المللی (IPI) است شاید بتواند به عنوان شاخصی در پیشگویی میزان بقای بیماران مبتلا به DLBCL به کار رود. در حال حاضر ما در حال طراحی مطالعات تکمیلی برای تعیین نقش دقیق ARG در DLBCL می‌باشیم.

نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که بین پیشرفت DLBCL و بیان ARG رابطه وجود دارد. لذا تصور می‌شود استفاده از روش‌های درمانی بر اساس مهار ARG بتواند در شیمی درمانی لنفوما مفید واقع شود. به عنوان مثال Gleevec (ST1571) یک مولکول کوچک دارویی است که می‌تواند تیروزین کینازها به خصوص C-KIT، PDG، ARG و c-ab1 را به

References

- Schnitzer B. Classification of lymphomas. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1978; 9(2):123-78.
- Sandberg AA, Gemmill RM, Hecht BK, Hecht F. The Philadelphia chromosome: a model of cancer and molecular cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 21(2):129-46.
- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 1988; 319(15):990-8.
- Kruh GD, Perego R, Miki T, Aaronson SA. The complete coding sequence of arg defines the Abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(15):5802-6.
- Pendergast AM. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* 2002; 85:51-100.
- Li Y, Shimizu H, Xiang SL, Maru Y, Takao N, Yamamoto K. Arg tyrosine kinase is involved in homologous recombinational DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5):697-702.
- Cao C, Leng Y, Li C, Kufe D. Functional interaction between the c-Abl and Arg protein-tyrosine kinases in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 2003; 278(15):12961-7.
- Cao C, Ren X, Kharbanda S, Koleske A, Prasad KV, Kufe D. The ARG tyrosine kinase interacts with Siva-1 in the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; 276(15):11465-8.
- Koleske AJ, Gifford AM, Scott ML, Nee M, Bronson RT, Miczek KA, et al. Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron* 1998; 21(6):1259-72.
- Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, et al. A new ETV6/TEL partner gene, ARG (ABL-related gene or ABL2), identified in an AML-M3 cell line with a (1;12)(q25;p13) translocation. *Blood* 2000; 95(6):2126-31.
- Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, et al. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002; 8(4):580-5.
- Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC. Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(2):361-7.
- Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Nielsen T, Loader J, Terris B, Stamp G, et al. Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. *Oncogene* 2002; 21(29):4587-94.
- de VS, Hofmann WK, Grogan TM, Krug U, Schrage M, Miller TP, et al. Gene expression profile of serial samples of transformed B-cell lymphomas. *Lab Invest* 2003; 83(2):271-85.

15. Sasaki H, Ide N, Yukiue H, Kobayashi Y, Fukai I, Yamakawa Y, et al. Arg and DAP3 expression was correlated with human thymoma stage. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21(6):507-13.
16. Finnegan MC, Goepel JR, Hancock BW, Goyns MH. Investigation of the expression of house-keeping genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1993; 10(4-5):387-93.
17. Giniger E. A role for Abl in Notch signaling. *Neuron* 1998; 20:667-81.
18. Hernandez SE, Settleman J, Koleske AJ. Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr Biol* 2004; 14(8):691-6.
19. Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Zhang WH, Qi SY, Hu J, et al. Gene expression profiles of hepatoma cell line HLE. *World J Gastroenterol* 2003; 9(4):683-7.
20. Wu CW, Li AF, Chi CW, Huang CJ, Huang CL, Lui WY, et al. Arg tyrosine kinase expression in human gastric adenocarcinoma is associated with vessel invasion. *Anticancer Res* 2003; 23(1A):205-10.
21. Ivan D, Niveiro M, Diwan AH, Eton O, Kim KB, Lacey C, et al. Analysis of protein tyrosine kinases expression in the melanoma metastases of patients treated with Imatinib Mesylate (STI571, Gleevec). *J Cutan Pathol* 2006; 33(4):280-5.
22. Lu TJ, Lu TL, Su IJ, Lai MD. Tyrosine kinase expression profile in bladder cancer. *Anticancer Res* 1997; 17(4A):2635-7.
23. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 2001; 97(8):2440-8.

Received: 20.2.2008
Accepted: 28.7.2008

The evaluation of ARG expression in DLBCL staging

Faribourz Mokarian MD*, Shahnaz Amani**, Zahra Kabiri MD***, Mansoor Salehi****.

* Assistant Professor, Department of Hematology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

** Nutritionist, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

*** General Practitioner, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

**** Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Background:

Abstract

ARG is a proto-oncogene and a member of a tyrosine kinase proteins family. It has great importance in many cancers, but there is no conclusive evidence on its role in DLBCL staging. The aim of this study was to evaluate importance of ARG, in this cancer's staging.

Methods:

Sixteen DLBCL and 4 reactive lymph node (as control group) samples, after staging using Ann Arbor staging system, were used in this study. Formaldehyde fixed paraffin embedded blocks were prepared from the samples. After the sectioning, all samples were hybridized with primary antibodies against ARG and GAPDH (as control house keep keeping gene). The slides were then washed and hybridized with fluorescently labeled secondary antibodies (ARG, green labeled and GAPDH, red). After capturing the pictures using CCD camera, the intensity of green and red colures was measured and the ratio between green/red, that demonstrate changes in ARG expression, were calculated.

Findings:

The mean ratio of green/red (ARG expression) was significantly different between reactive lymph node, stage I, II and III of DLBCL. ARG expression was different between all groups except for between stage III and VI of DLBCL.

Conclusion:

The observed changes in ARG expression is a potential biomarker for DLBCL staging. In addition specific inhibitors of ARG can be considered as new chemotherapy agents in the DLBCL treatment.

Key words:

Lymphoma, ARG, DLBCL

Page count:

10

Tables:

1

Figures:

1

References:

23

Address of Correspondence:

Faribourz Mokarian MD, Assistant Professor, Department of Hematology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
E-mail: mokarian@med.mui.ac.ir