

ارزش تشخیصی بیان ژن FHL۱ در تشخیص افتراقی تومورهای پاپیلاری تیروئید کار سینوما از تومورهای خوش خیم

دکتر جواد محمدی اصل^۱، غلامعباس دیناروند^۲، ندا گلچین^۳، دکتر نادر صاکی^۴، دکتر نسترن رنجبری^۵،
دکتر ایران رشیدی^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نمونه برداری سوزنی (Fine needle aspiration یا FNA) بهترین روش برای تشخیص قبل از جراحی تومورهای تیروئید است که به طور گسترده برای بیماران انجام می‌شود؛ اما برای حدود ۲۰ درصد موارد، جواب به صورت مشکوک و یا حد واسط گزارش می‌شود. هدف این تحقیق، بررسی ارزش تشخیصی بیان نسبی mRNA ژن FHL۱ به عنوان تومور مارکر جهت افتراق تومور خوش خیم و تومور بدخیم از نوع پاپیلاری تیروئید کار سینوما بود.

روش‌ها: ۵۰ نمونه از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر اهواز (شامل ۲۵ بیمار مبتلا به تومور بدخیم و ۲۵ بیمار مبتلا به تومور خوش خیم) در این تحقیق وارد شدند. برای استخراج RNA از نمونه‌های پارافینه شده و همچنین برای ساخت cDNA (Complementary DNA) از کیت استفاده شد. واکنش Real time PCR (Real time polymerase chain reaction) در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت و از مخلوط واکنش Real time PCR حاوی ماده‌ی فلورسانس سایبر گرین استفاده شد.

یافته‌ها: بیان نسبی mRNA در ژن FHL۱ در گروه بدخیم برابر ۰/۵۰ درصد بود؛ در حالی که در گروه خوش خیم این میزان خیلی بالاتر بود (۵/۲۹ درصد) و تفاوت بین این دو گروه، معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۱۹$). تجزیه و تحلیل ROC (Receiver operating characteristic) نشان داد که این ژن برای افتراق بین دو گروه تومورهای خوش خیم و بدخیم تیروئید کارایی خوبی دارد؛ سطح زیر منحنی (Area under the curve یا AUC) برابر ۰/۹۲ بود. حساسیت و ویژگی بیان ژن FHL۱ به عنوان یک آزمایش تشخیصی به ترتیب ۰/۸۴ و ۸۴/۰ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: بررسی بیان ژن FHL۱ جهت افتراق تومورهای پاپیلاری تیروئید کار سینوما از خوش خیم، کارایی بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: ارزش تشخیصی، بیان نسبی mRNA، ژن FHL۱، پاپیلاری تیروئید کار سینوما

ارجاع: محمدی اصل جواد، دیناروند غلامعباس، گلچین ندا، صاکی نادر، رنجبری نسترن، رشیدی ایران. ارزش تشخیصی بیان ژن FHL۱ در تشخیص افتراقی تومورهای پاپیلاری تیروئید کار سینوما از تومورهای خوش خیم. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۶):

۲۱۱۳-۲۱۲۱

۱- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی نور، اهواز، ایران

۴- دانشیار، گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۵- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۶- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

مقدمه

سرطان‌های غده‌ی تیروئید ۹۰ درصد سرطان‌های سیستم اندوکراین را شامل می‌شوند و مسئول ۶۳ درصد مرگ‌های ناشی از وقوع سرطان در سیستم اندوکراین می‌باشند (۱). گزارش شده است که نیمی از جمعیت عمومی بالغین در سطح زیر بالینی دارای ندول تیروئید هستند (۲) و چون فقط ۱۰ درصد از این ندول‌ها در واقع بدخیم خواهند بود، به همین دلیل آزمایش‌های قبل از عمل جراحی برای افتراق خوش‌خیم و یا بدخیم بودن آن‌ها تکامل یافته است (۳). بقای ۱۰ ساله‌ی سرطان تیروئید در بالغین میانسال ۸۰-۹۶ درصد است. عود مجدد در ۲۰-۵ درصد موارد پایلاری تیروئید کارسینوما دیده می‌شود. عود مجدد ممکن است ناشی از درمان ناقص اولیه و یا به دلیل وجود تومور با سلول‌های خیلی مهاجم باشد (۴). متاستاز دوردست به طور معمول در ۱۵-۱۰ درصد موارد پایلاری تیروئید کارسینوما رخ می‌دهد و میزان بقای ۱۰ ساله بعد از کشف متاستاز دوردست حدود ۴۰ درصد است (۴).

نمونه‌برداری سوزنی (Fine needle aspiration یا FNA) بهترین روش برای تشخیص قبل از عمل تومورهای بدخیم تیروئید است که به طور گسترده برای بیماران انجام می‌شود؛ اما متأسفانه برای حدود ۲۰ درصد موارد (محدوده‌ی بین ۹/۲-۴۲/۰ درصد) جواب قطعی گزارش نمی‌شود و به صورت مشکوک و یا حد واسط گزارش می‌شود (۷-۵).

خطر بدخیمی در نمونه‌های FNA بین ۴۰-۱۰ درصد مشکوک به سرطان گزارش می‌شوند، از این رو، تمام بیماران نیازمند برداشت ندول مشکوک خواهند بود تا جواب دقیق‌تر با بررسی نمونه‌های

بیوپسی پاتولوژی مشخص شود و فقط در حدود ۲۰ درصد این نمونه‌های مشکوک، دارای نئوپلاسم بدخیم خواهند بود (۶). از طرف دیگر، در ۱۰ درصد موارد FNA، جواب‌های منفی کاذب گزارش می‌شود که منجر به تشخیص دیر هنگام سرطان و در نتیجه درمان دیر هنگام می‌گردد و این امر بر روی سیر بیماری تأثیر منفی می‌گذارد (۶).

بنابراین با توجه به دلایلی مانند عدم شناسایی تمام سرطان‌های تیروئید با انجام FNA و وجود موارد منفی کاذب در گزارش‌ها، انجام آزمایش‌های مولکولی بر اساس بررسی نشانگرهای زیستی مناسب، ضروری به نظر می‌رسد تا به وسیله‌ی آن‌ها بتوان صحت آزمایش‌های تشخیص سرطان تیروئید را در قبل از عمل بهبود بخشید (۶). این میدان فعال در مطالعات سرطان‌شناسی است تا انجام جراحی‌های غیر ضروری را در این دسته از بیماران کاهش دهد (۸-۹).

تاکنون هیچ نشان زیستی منفردی که بتواند تمام تومورهای خوش‌خیم را از بدخیم افتراق دهد، شناخته نشده است و به همین دلیل، از ترکیب‌های انواع مختلف نشانگرهای زیستی استفاده می‌شود تا بهترین نتایج به دست آید (۱۰). مطالعات گسترده در بررسی میزان بیان mRNA در ژن‌های مختلف در انواع سرطان‌ها منجر به شکل‌گیری این ایده شده است که از تفاوت بیان ژن‌ها در سطح mRNA به عنوان نشان زیستی جدید مولکولی برای افتراق سلول‌های سرطانی استفاده شود.

در مطالعه‌ای از نحوه‌ی بیان ۴ ژن برای ارتقای تشخیص تومورهای فولیکولار کارسینوما تیروئید استفاده شده بود و نتایج رضایت‌بخش بودند (۱۱).

بتوان به تشخیص دقیق‌تر نمونه‌برداری‌های سوزنی کمک کرد و از انجام عمل‌های تیروئیدکتومی غیر ضروری کاست. هدف این تحقیق بررسی ارزش تشخیصی بیان نسبی mRNA ژن FHL1 جهت افتراق تومور خوش‌خیم و تومور بدخیم از نوع پاپیلاری تیروئید کارسینوما می‌باشد.

روش‌ها

انتخاب بیماران

حجم نمونه در این تحقیق ۵۰ مورد بود و ۲۵ نمونه از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر اهواز با تومورهای بدخیم تیروئید و ۲۵ نمونه با تومورهای خوش‌خیم تیروئید در این تحقیق وارد شدند. مناسب‌ترین بلوک‌های پارافینی بعد از بازبینی مجدد توسط یک پاتولوژیست انتخاب شدند. همچنین پاتولوژیست‌های همکار طرح با بررسی نمونه‌ها، نوع تومور احتمالی را گزارش دادند. سه نمونه که در گزارش پاتولوژی آن‌ها هیچ ضایعه‌ی خوش‌خیم یا بدخیمی گزارش نشده بود، به عنوان بافت طبیعی انتخاب گردیدند.

مایکرودایسکشن

برای انجام مایکرودایسکشن در ابتدا به وسیله‌ی میکروتوم برش‌های ۶ میکرونی از بلوک‌های پارافینی داده شد. سپس این برش‌ها در یک محیط عاری از RNase (Ribonuclease) بر روی لام‌های مخصوص مایکرودایسکشن گذاشته شدند. این لام‌ها دارای یک لایه‌ی نازک فیلم هستند و قبل از استفاده، مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول پلی‌ال لایزین روی آن‌ها گذاشته شده بود تا بافت‌ها بهتر به لایه‌ی فیلم بچسبند. از هر بلوک، دو عدد لام برای استخراج

ژن FHL1 بر روی کروموزوم X و در محل Xq۲۶ قرار دارد و شماره‌ی شناسایی (Gene identity document یا Gene ID) آن ۲۲۷۳ می‌باشد و از ۷ اگزون تشکیل شده است. محصول آن از رشد سلول‌های سرطانی از طریق مسیر پیام‌رسانی مشابه با TGFb (Transforming growth factor beta) جلوگیری می‌کند. این ژن، کنترل‌کننده‌ی پروليفراسیون، تکامل و آپتوز سلولی است. ۳ عضو این خانواده، پروتئین‌هایی به نام‌های FHL1، FHL2 و FHL3 را کد می‌کنند که با (۲) Mothers against decapentaplegic Smad2 (homolog)، Smad3 و Smad4 اتصال فیزیکی و عملکردی برقرار می‌کنند. اما نقش دقیق این ژن در تکامل سرطان هنوز مشخص نشده است (۱۲). محصولات پروتئینی ژن FHL1 و برخی ژن‌های دیگر در سرطان‌های تیروئید تغییر می‌کند (۱۴-۱۳).

با توجه به کاستی‌هایی که نمونه‌برداری سوزنی در تشخیص تومورهای بدخیم تیروئید دارد، نیاز به نشانگرهای زیستی که بتوانند تومورهای بدخیم تیروئید را از انواع خوش‌خیم افتراق دهند، احساس می‌شود. این نشانگرهای زیستی که بر اساس اختلالات ایجاد شده در ماده‌ی ژنتیکی استوار هستند، چون با مقادیر کم RNA قابل انجام هستند، به طور بالقوه کاربردهایی بالینی خواهند داشت.

بنابراین، با نشانگرهای زیستی متعدد بیان mRNA بر روی بیوپسی‌های تومورهای پاپیلاری تیروئید کارسینوما انجام شد تا کارایی آن‌ها در افتراق از تومورهای خوش‌خیم ارزیابی گردد و در صورت موفقیت‌آمیز بودن، در تحقیقات بعدی کارایی آن‌ها در نمونه‌برداری‌های سوزنی سنجیده شود و با این کار،

ماده‌ی فلورسانس سایبر گرین و محصول شرکت TAKARA به نام SYBR® Premix Ex Taq™ استفاده شد؛ چون نسبت به مخلوط واکنش رنگی EvaGreen، جواب‌های بهتری به دست آمده بود. در هر تیوب واکنش، مواد با مقادیر زیر اضافه شد.

۱۰ µl	PreMix ۲X .۱
۱ µl	Primer ۲ mM هر .۲
۷ µl	D.W .۳
۲ µl	cDNA .۴

واکنش‌های Real time PCR هم با دستگاه مارک CORBET به نام ۶۰۰۰ Rotor-Gene انجام شد. چرخه‌ی دمایی به صورت ۱۰ ثانیه ۹۵ °C، سپس ۴۵ سیکل شامل ۵ ثانیه ۹۵ °C، ۱۵ ثانیه ۶۰ °C و ۱۰ ثانیه ۷۲ °C درجه بود. در انتهای هر سیکل در دمای ۷۲ °C، نورسنجی با نور سبز و طول موج تابش ۴۷۰ و بازتاب ۵۱۰ نانومتر انجام می‌گرفت. سپس منحنی ذوب از دمای ۶۵-۹۵ درجه محاسبه می‌شد.

بررسی بیان نسبی mRNA ژن FHL1

برای بررسی بیان ژن FHL1 با تکنیک Real time PCR از پرایمرهایی استفاده شد که با کمک سایت اینترنتی Primer3 طراحی شده بودند. پرایمرها طوری طراحی شدند که هر کدام در آگزون جداگانه‌ای قرار بگیرند تا از تکثیر DNA ژنومیک جلوگیری شود. طول محصول PCR کمتر از ۸۰ جفت باز طراحی گردید تا برای تکثیر نمونه‌های پارافینی مشکلی ایجاد نگردد. از ژن GAPDH به عنوان شاهد استفاده شد. طول قطعه‌ی تکثیر شده ۷۶ (bp) و ردیف بازسازی پرایمری F: GCCAACACCTGTGTGGAAT

در RNA نظر گرفته شدند و یک لام هم با رنگ هماتوکسلین ائوزین (Sigma) رنگ‌آمیزی شد تا در زمان میکرودایسکشن به عنوان راهنما برای شناسایی محدوده‌ی سلول‌ها استفاده شود. لام‌های مخصوص برای استخراج RNA در فریزر ۸۰ °C- نگهداری شدند.

استخراج RNA از نمونه‌های پارافینی و ساخت cDNA

برای استخراج RNA از نمونه‌های میکرودایسکت شده از کیت شرکت Roche به نام High pure RNA paraffin kit استفاده شد. برای ساخت cDNA از کیت شرکت Qiagen به نام Quantitech RT بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای ساخت cDNA از ۱ میکروگرم RNA به عنوان الگو استفاده گردید. در مرحله‌ی اول در تیوب‌های مخصوص PCR به نمونه‌های RNA، ۲ میکرولیتر gDNA eliminator (Genomic deoxyribonucleic acid eliminator) اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۲ °C انکوبه شدند و بعد از آن، نمونه‌ها بر روی یخ گذاشته شدند. به محلول، ۴ میکرولیتر آنزیم RT (Reverse transcriptase) و ۱ میکرولیتر پرایمر و ۴ میکرولیتر بافر ۵X اضافه شد و با کمک دستگاه ترموسیکلر تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C و ۵ دقیقه در دمای ۹۰ °C انکوبه شدند. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر آب به cDNAها اضافه شد و تا زمان استفاده، در فریزر ۸۰ °C- بایگانی شدند.

آزمایش Real time PCR

واکنش (Real time polymerase chain reaction) Real time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. از مخلوط واکنش Real time PCR که دارای

TP: True-positive

TN: True-negative

FP: False-positive

FN: False-negative

PPV: Positive predictive value

NPV: Negative predictive value

از آزمون (Receiver operating characteristic)

ROC برای محاسبه‌ی بهترین مقدار مرزی در بررسی‌های یافته‌های بیان نسبی mRNA استفاده شد. این آزمون بهترین مقدار مرزی برای یافته‌های هر آزمایش را با بالاترین حساسیت و ویژگی در اختیار ما قرار می‌دهد و با محاسبه‌ی سطح زیر منحنی (AUC یا Area under the curve)، کارایی آزمایش برای افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم محاسبه شد.

یافته‌ها

بیان نسبی mRNA در ژن FHL1 در گروه بدخیم ۰/۵۰ درصد بود؛ در حالی که در گروه خوش‌خیم این میزان خیلی بالاتر (۵/۲۹ درصد) و تفاوت بین این دو گروه معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۱۹$) (جدول ۱). تجزیه و تحلیل ROC نشان داد که این ژن برای افتراق بین دو گروه تومورهای خوش‌خیم و بدخیم تیروئید کارایی خوبی دارد ($AUC = ۰/۹۲$).

اگر بررسی بیان نسبی mRNA ژن FHL1 به عنوان ملاک تشخیصی قرار می‌گرفت، بهترین نقطه‌ی مرزی برای افتراق دو نوع تومورهای خوش‌خیم از بدخیم، میزان کمتر از ۰/۵۷ درصد بود و با این میزان، نقطه‌ی مرزی تعداد ۲۱ مورد بدخیم و ۲۱ مورد خوش‌خیم درست تشخیص داده شدند. اما ۴ مورد بدخیم و ۴ مورد خوش‌خیم به طور کاذب تشخیص داده شدند. بنابراین، حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیب ۸۴/۰ و ۸۴/۰ به دست آمد (جدول ۲).

R: GCCAGAAGCGGTTCTTATAGTG بعد از انجام موفقیت‌آمیز PCRها، مقدار Ct (Cycle threshold) که نمایانگر سیکل آستانه‌ی PCR است، محاسبه شد. این کار با استفاده از منحنی‌های تکثیر PCR که توسط دستگاه Real time تهیه می‌شود و نرم‌افزار دستگاه CORBET انجام شد. برای هر ژن، میزان تعدیل شده‌ی بیان mRNA بر حسب درصد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۵):

$$\text{بیان} = [2^{-(\text{Ct of gene of interest} - \text{Ct of GAPDH})} \times 100\%]$$

نسبی mRNA (درصد)

محاسبات آماری

برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. در تمامی آزمون‌های استفاده شده، $P = ۰/۰۵$ ملاک عمل قرار گرفت. برای محاسبه‌ی حساسیت (Sensitivity)، ویژگی (Specificity)، ارزش اخباری مثبت (Positive predictive value)، ارزش اخباری منفی (Negative predictive value) و صحت (Accuracy) جواب آزمایش، از فرمول‌های زیر استفاده شد (۸). در این محاسبات، جواب گزارش‌های پاتولوژی به عنوان آزمایش استاندارد در نظر گرفته شد که حقیقی یا کاذب بودن نتایج بیان mRNA در مقایسه با گزارش‌های پاتولوژی سنجیده شد.

$$\text{Sensitivity (\%)} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

$$\text{Specificity (\%)} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

$$\text{PPV (\%)} = \frac{TP}{TP + FP} \times 100$$

$$\text{NPV (\%)} = \frac{TN}{TN + FN} \times 100$$

$$\text{Accuracy (\%)} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \times 100$$

بحث

در تحقیق حاضر مشخص شد که بیان نسبی mRNA ژن FHL1 در تومورهای بدخیم خیلی کمتر از خوش خیم بود و این تفاوت در سطح $P = 0/019$ معنی دار بود؛ به طوری که شاید بتواند به عنوان یک نشان زیستی برای افتراق تومورهای بدخیم از خوش خیم تیروئید قابل استفاده شود. این نتیجه تأیید کننده‌ی گزارش Fryknas و همکاران است. در مطالعه‌ی آن‌ها برای شناسایی نشانگرهای زیستی جدید برای افتراق تومورهای بدخیم از خوش خیم فولیکولار تیروئید که با روش میکروآرری انجام داده بودند، چندین ژن را معرفی کرده بودند و بهترین این ژن‌ها، FHL1 معرفی شده بود که بیان mRNA آن در تومورهای بدخیم فولیکولار تیروئید نسبت به

خوش خیم کاهش می‌یافت (۱۵). مطالعه‌ی Fryknas و همکاران تنها مطالعه‌ای بود که بر روی تیروئید انجام شده بود. اما چندین مطالعه‌ی دیگر بر روی انواع مختلف سرطان‌ها از جمله پروستات، کلیه، پستان (۱۶) و معده (۱۷) نشان دادند که در تمام این نوع سرطان‌ها بیان mRNA این ژن در تومورهای بدخیم نسبت به گروه خوش خیم و بافت طبیعی کاهش بیان دارد و به عنوان یک نشان زیستی خوب برای تشخیص بدخیمی‌ها معرفی شده بود. گزارش شده است که بیان ژن FHL1 در تعدادی از سرطان‌ها از جمله آستروسایتوما، هپاتوکارسینوما، آدنوکارسینومای ریه، سرطان پروستات و ملانوما کاهش می‌یابد (۱۸).

جدول ۱. مقدار بیان نسبی mRNA ژن FHL1 در تومورهای خوش خیم و بدخیم تیروئید

مقدار P	درصد بیان نسبی mRNA		تعداد	نوع تومور
	میانگین \pm انحراف معیار	کمینه - بیشینه		
0/019	0/50 \pm 0/53	0/02-2/42	25	بدخیم
	5/29 \pm 9/89	0/37-8/40	25	خوش خیم

جدول ۲. نتایج صحت تشخیص تومورهای خوش خیم و بدخیم بر اساس بررسی بیان نسبی mRNA ژن FHL1

نتایج بیان نسبی mRNA	تعداد/درصد
متغیر	
مثبت حقیقی (TP یا True-positive)	21
منفی حقیقی (TN یا True-negative)	21
مثبت کاذب (FP یا False-positive)	4
منفی کاذب (FN یا False-negative)	4
حساسیت (Sensitivity)	84/0%
ویژگی (Specificity)	84/0%
ارزش اخباری مثبت (PPV یا Positive predictive value)	84/0%
ارزش اخباری منفی (NPV یا Negative predictive value)	84/0%
صحت آزمایش	84/0%

گردد. انجام تحقیقات جدید در راستای روشن شدن مکانیسم دقیق آن در روند تومورزایی می‌تواند به دانش مولکولی روند تشکیل سرطان و یا درمان احتمالی آن از طریق این ژن کمک کند.

نتیجه‌گیری

در دنیای تشخیص بدخیمی و خوش‌خیمی در تومورهای تیروئید، معرفی نشان زیستی از اهمیت خاصی برخوردار است؛ چون با کاربرد آن‌ها در قبل از عمل جراحی و در کنار FNA، می‌توان به افتراق بهتر تومورهای بدخیم از خوش‌خیم تیروئید کمک کرد و از فراوانی عمل‌های جراحی غیر ضروری کاست. نشانگرهای زیستی که به عنوان نامزد معرفی شده‌اند، زیاد هستند؛ اما کارایی آن‌ها هنوز به اثبات نرسیده است. بررسی بیان نسبی mRNA ژن FHL1 نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی جهت افتراق تومورهای پاپیلاری تیروئید کارسینوما از خوش‌خیم کارایی بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از بیمارانی که اجازه دادند نمونه‌های پاتولوژیکی آن‌ها مورد بررسی مولکولی قرار بگیرد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

در تحقیقی در کشور سوئد برای افتراق تومورهای فولیکولار خوش‌خیم از بدخیم تیروئید از روش تجزیه و تحلیل میزان بیان نسبی mRNA تعدادی از ژن‌ها استفاده شد. در ابتدا با بررسی میکروآری (Microarray) برای جستجوی ژن‌های مناسب برای افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم تعدادی ژن نامزد شناسایی شدند. سپس برای تأیید کارایی آن‌ها، بیان نسبی با استفاده از Real time PCR مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. نتایج نشان داده بود که بیان mRNA 22 ژن در دو گروه تومورهای خوش‌خیم و بدخیم تیروئید تفاوت آشکاری دارد. در این بررسی، مشخص شد که ژنی به نام FHL1 بیشترین تفاوت بیان نسبی mRNA را در بین دو گروه تومورهای فولیکولار خوش‌خیم و بدخیم تیروئید دارد و با بررسی تعداد اندکی ژن مانند FHL1 امکان افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم تیروئید وجود دارد (۱۸).

محصول ژن FHL1 از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. بنابراین با کاهش بیان، باعث افزایش رشد سلولها می‌شود. اگر چه نقش دقیق آن در تکامل سلول‌های سرطانی هنوز مشخص نشده است (۱۵)، اما به دلیل درگیری آن در انواع مختلفی از سرطان‌ها، دارای توانایی بالقوه‌ای است تا به عنوان یک نشان زیستی خوب برای افتراق سلول‌های سرطانی معرفی

References

1. McCabe CJ. Novel molecular markers in thyroid cancer. *Endocrine Abstracts* 2005; 10: S7.
2. Schagdarsurengin U, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C, Dammann R. CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma. *Thyroid* 2006; 16(7): 633-42.
3. Weber F, Shen L, Aldred MA, Morrison CD, Frilling A, Saji M, et al. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5): 2512-21.
4. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer* 2007; 110(1): 38-46.
5. Shibru D, Hwang J, Khanafshar E, Duh QY, Clark OH, Kebebew E. Does the 3-gene

- diagnostic assay accurately distinguish benign from malignant thyroid neoplasms? *Cancer* 2008; 113(5): 930-5.
6. Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. Diagnostic and prognostic value of angiogenesis-modulating genes in malignant thyroid neoplasms. *Surgery* 2005; 138(6): 1102-9.
 7. Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA, et al. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(7): 4011-8.
 8. Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65(5): 660-6.
 9. Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal* 2006; 3: 10.
 10. Asa SL. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. *Endocr Pathol* 2005; 16(4): 295-309.
 11. Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RM, Peterson B, et al. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J Clin Invest* 2004; 113(8): 1234-42.
 12. Ding L, Wang Z, Yan J, Yang X, Liu A, Qiu W, et al. Human four-and-a-half LIM family members suppress tumor cell growth through a TGF-beta-like signaling pathway. *J Clin Invest* 2009; 119(2): 349-61.
 13. Song Q, Wang D, Lou Y, Li C, Fang C, He X, et al. Diagnostic significance of CK19, TG, Ki67 and galectin-3 expression for papillary thyroid carcinoma in the northeastern region of China. *Diagn Pathol* 2011; 6: 126.
 14. Nikiforov YE: Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol Suppl* 2011; 2: 34-43.
 15. Fryknas M, Wickenberg-Bolin U, Goransson H, Gustafsson MG, Foukakis T, Lee JJ, et al. Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors. *Tumour Biol* 2006; 27(4): 211-20.
 16. Li X, Jia Z, Shen Y, Ichikawa H, Jarvik J, Nagele RG, et al. Coordinate suppression of Sdpr and Fhl1 expression in tumors of the breast, kidney, and prostate. *Cancer Sci* 2008; 99(7): 1326-33.
 17. Sakashita K, Mimori K, Tanaka F, Kamohara Y, Inoue H, Sawada T, et al. Clinical significance of loss of Fhl1 expression in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(8): 2293-300.
 18. Shen Y, Jia Z, Nagele RG, Ichikawa H, Goldberg GS. SRC uses Cas to suppress Fhl1 in order to promote nonanchored growth and migration of tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66(3): 1543-52.

The Diagnostic Value of Gene Expression of FHL1 in the Differential Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma and Benign Tumors

Javad Mohammadi-Asl PhD¹, Gholamabbas Dinarvand MSc², Neda Golchin MSc³,
Nader Saki MD⁴, Nastran Ranjberri MD⁵, Iran Rashidi MD⁶

Original Article

Abstract

Background: Fine needle aspiration (FNA) is the best method for diagnosis of thyroid tumors before surgery and is performed widely for patients; but in about 20% of cases, the test answer is reported as suspicious or intermediate. The aim of this study was to evaluate the mRNA expression of gene FHL1 as a tumor marker in differentiating benign and malignant tumors of papillary thyroid carcinoma.

Methods: 50 patients from Ahvaz hospitals (Iran) with malignant (25 cases) and benign (25 cases) thyroid tumors were enrolled in this study. RNA was extracted from paraffin samples with specific kit and the kit was used for cDNA synthesis. Real time polymerase chain reaction (PCR) were consisted of 20 micro liters of the reaction mixture containing the fluorescent Cyber Green.

Findings: The relative mRNA expression of FHL1 gene in the malignant group (0.05%) was significantly lower than that in the benign group (5.29%) ($P = 0.019$). Receiver operating characteristic (ROC) analysis showed that the gene has a good performance for differentiation between benign and malignant thyroid tumors, with area under the curve (AUC) of 0.92. Sensitivity and specificity of FHL1 gene expression as a diagnostic test were 84% and 84%, respectively,

Conclusion: Gene expression of FHL1 is more efficient to differentiate papillary thyroid carcinoma from benign tumors.

Keywords: Biomarkers, Relative expression of mRNA, Papillary thyroid carcinoma

Citation: Mohammadi-Asl J, Dinarvand GhA, Golchin N, Saki N, Ranjberri N, Rashidi I **The Diagnostic Value of Gene Expression of FHL1 in the Differential Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma and Benign Tumors.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(266): 2113-21

1- Assistant professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2- Department of Clinical Biochemistry, Cancer Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

3- Department of Biochemistry, Noor Medical Genetics Laboratory, Ahvaz, Iran

4- Associate Professor, Department of Ear, Nose and Throat, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

5- Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

6- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Javad Mohammadi-Asl PhD, Email: mohammadiasl@gmail.com