

بررسی مقایسه‌ای بروز پروتئین مهار کننده‌ی تومور DAL-1 در نمونه‌های سرطانی و سالم تخمدان

دکتر مهدی نیکبخت دستجردی^۱، زهرا عبدالعالی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژن DAL-1 (Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1) که بر روی کروموزوم شماره‌ی ۱۸ (18p11.3) واقع است، به عنوان یک ژن مهار کننده‌ی تومور شناخته می‌شود. این ژن از اجزای Cell adhesion molecules است که در سازمان‌دهی اسکلت سلولی با ایجاد اتصالات محکم بین سلولی نقش ایفا می‌نماید. غیر فعال شدن این ژن می‌تواند چسبندگی بین سلولی و نیز اتصال بین غشا و اسکلت سلولی را از بین ببرد، باعث بروز بدخیمی و متاستاز گردد. این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای بروز پروتئین مهار کننده‌ی تومور DAL-1 در نمونه‌های سرطانی و سالم تخمدان انجام گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه، از ۶۰ نمونه‌ی سرطانی تخمدان و ۶۰ نمونه‌ی بافت سالم مجاور از همان نمونه‌ها استفاده شد. همچنین، از روش ایمونوهیستوشیمی برای بررسی بروز پروتئین DAL-1 استفاده گردید. بررسی درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Motic Advanced Plus 2 انجام شد. حضور رنگ قهوه‌ای سیتوپلاسم، همراه با رنگ قهوه‌ای غشا و یا بدون آن، برای بیان DAL-1 مثبت در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور، به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0/001$). همچنین، کاهش بیان این پروتئین از لحاظ آماری به طور معنی‌داری با متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط بود ($P = 0/036$).

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش بروز پروتئین DAL-1 در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم در این مطالعه، به نظر می‌رسد بیان پروتئین DAL-1 بتواند با پاتوژنز سرطان تخمدان مرتبط باشد. از طرف دیگر، فقدان یا کاهش بروز معنی‌دار این پروتئین در نمونه‌های سرطانی با متاستاز به غدد نشان می‌دهد که می‌توان DAL-1 را به عنوان یک نشان‌گر تشخیصی برای بیماران مبتلا به سرطان تخمدان مورد استفاده قرار داد.

واژگان کلیدی: سرطان تخمدان، ژن DAL-1، ژن مهار کننده‌ی تومور، ایمونوهیستوشیمی

ارجاع: نیکبخت دستجردی مهدی، عبدالعالی زهرا. بررسی مقایسه‌ای بروز پروتئین مهار کننده‌ی تومور DAL-1 در نمونه‌های

سرطانی و سالم تخمدان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۰): ۱۳۳۹-۱۳۵۰

مقدمه

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های شناخته شده در طب، سرطان است که مسؤول ۲۰/۰-۱۲/۵۰ درصد از

موارد مرگ و میر می‌باشد. بر طبق گزارش انجمن بهداشت آمریکا، ۷/۶ میلیون نفر بر اثر سرطان در سال ۲۰۰۷ مرده‌اند. از این‌رو، تشخیص به موقع و

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای به شماره‌ی ۳۹۰۶۰۷ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: nikbakht@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهدی نیکبخت دستجردی

این مرحله‌بندی برای تعیین پیش‌آگهی و بقای طولانی مدت بیمار و همچنین در انتخاب رژیم درمانی مناسب بعد از جراحی، بسیار مهم و اساسی می‌باشد. منشأ بیش از ۹۰ درصد سلول‌های سرطانی تخمدان، از سلول‌های پوششی یا اپی‌تلیالی سطح تخمدان است و در ۹۵-۹۰ درصد موارد، از نوع اسپورادیک (Sporadic) و مابقی ارثی می‌باشد (۴-۵).

از طرف دیگر، پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های مهارکننده تومور، رشد بیش از حد سلولی را مهار کرده، باعث ثبات در نقشه‌ی ژنومی می‌شوند (۷). در این میان، می‌توان به ژن DAL-1 (Differentially Expressed in Adenocarcinoma of the Lung) اشاره کرد که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره‌ی ۱۸ (۱۱p۱۱/۳) واقع است و ابتدا به وسیله‌ی RT-PCR (Real time polymerase chain reaction) به عنوان یک قطعه ژن ۷۵۰ جفت باز شناسایی شد. این پروتئین، متعلق به Protein ۴/۱ superfamily می‌باشد که تشکیل دهنده‌ی گروهی از پروتئین‌های اسکلتی غشا می‌باشند.

تجزیه و تحلیل‌های بعدی نشان داد که DAL-1 بیان‌کننده‌ی قطعه‌ای از ژن پروتئین ۴/۱B می‌باشد و این پروتئین، القاکننده‌ی آپوپتوز است و چسبندگی سلولی را به ماتریکس خارج سلولی کنترل می‌نماید. با هم تراز کردن DAL-1 و پروتئین ۴/۱B، نشان داده شد که پروتئین ۴/۱B حاوی توالی‌های منحصر به فردی است که در DAL-1 یافت نمی‌شود. این ژن، یک حذف در C-terminal domain و N- و همچنین حذف‌های داخلی در درون U₂ و SAB domain دارد (شکل ۱). با وجود این حذف‌ها، DAL-1 تمام خصوصیات لازم برای مهار کنندگی تومور را مانند پروتئین ۴/۱B دارا می‌باشد.

درمان زودرس سرطان اهمیت زیادی دارد و یکی از اهداف مهم تحقیقاتی، شناسایی افراد در معرض خطر، قبل از ابتلا به سرطان می‌باشد (۱).

از مهم‌ترین علت‌های مرگ و میر ناشی از سرطان دستگاه تناسلی زنانه، سرطان تخمدان می‌باشد. این سرطان، ششمین سرطان شایع در زنان است (۲). از علل افزایش بروز این سرطان، می‌توان به افزایش سن، مصرف سیگار و الکل، قاعدگی زودرس و یائسگی دیررس، ناباروری و همچنین سابقه‌ی خانوادگی اشاره کرد. در حالی که حاملگی، شیردهی و استفاده از قرص‌های ضد بارداری، بروز سرطان تخمدان را کاهش می‌دهند (۳).

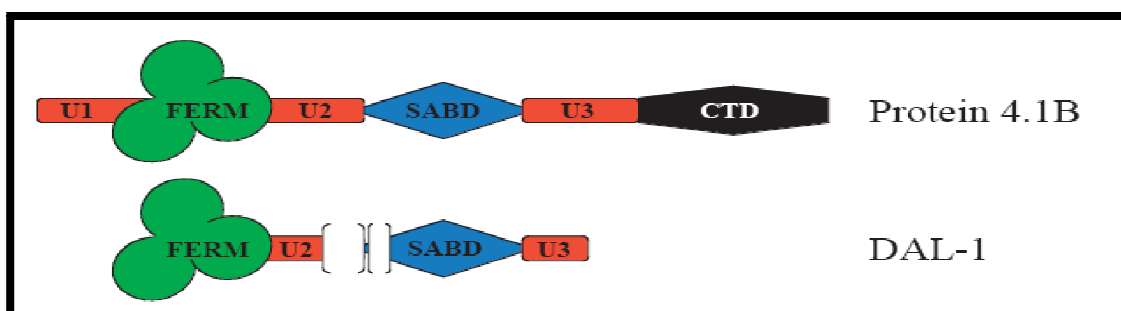
همچنین بروز آن بر اساس نژاد و منطقه‌ی جغرافیایی متفاوت می‌باشد؛ به این صورت که شیوع آن در آمریکا، کانادا و اروپای شمال غربی بالا و در آمریکای لاتین پایین است (۴).

سرطان تخمدان اغلب به صورت توده‌ی کیستی در لگن دیده می‌شود. در بیشتر موارد، کیست‌های تخمدان با گذشت زمان برطرف می‌شوند. اما گاهی پزشک، کیستی را مشاهده می‌کند که با گذشت زمان از بین نرفته یا بزرگ‌تر شده است. تومور بدخیم تخمدان، می‌تواند رشد کند و به اندام‌های مجاور تخمدان‌ها نظیر لوله‌های فالوپ و رحم حمله کند و از طریق دستگاه لنفاوی، در غدد لنفاوی ناحیه‌ی لگن، شکم و قفسه‌ی سینه منتشر شود. همچنین این سلول‌های سرطانی به وسیله‌ی جریان خون به اعضای از بدن نظیر کبد یا ریه‌ها و از طریق عروق لنفاوی به کلیه‌ی متاستاز می‌دهند (۴-۵).

بر اساس یافته‌های جراحی، تومور بر طبق اندازه، گسترش و محل، مرحله‌بندی می‌شود (جدول ۱) (۶).

جدول ۱. مرحله‌بندی (Staging) تومور تخمدان بر اساس (Federation of gynecology and obstetrics) FIGO

| | |
|--|--|
| Stage ۱- تومور محدود به تخمدان یا تخمدان‌ها می‌باشد. | |
| ۱A | فقط یک تخمدان توسط تومور تحت تأثیر قرار گرفته و کپسول تخمدان دست نخورده است. هیچ توموری در سطح تخمدان تشخیص داده نشده است. |
| ۱B | سلول‌های بدخیم در آسیت یا شستشوی صفاقی قابل شناسایی نیستند. هر دو تخمدان درگیر هستند، اما کپسول تخمدان دست نخورده است. |
| ۱C | هیچ توموری در سطح تخمدان تشخیص داده نشده است. سلول‌های بدخیم در آسیت یا شستشوی صفاقی، قابل شناسایی نیستند. تومور محدود به یک یا هر دو تخمدان با هر یک از موارد زیر است: کپسول تخمدان پاره شده است. تومور در سطح تخمدان تشخیص داده شده است. سلول‌های بدخیم مثبت در آسیت یا شستشوی صفاقی شناسایی شده‌اند. |
| Stage ۲- تومور یک یا هر دو تخمدان را درگیر کرده و به لگن گسترش یافته است. | |
| ۲A | تومور تخمدان به رحم یا لوله‌ی فالوپ گسترش یافته و یا کاشته شود. |
| ۲B | سلول‌های بدخیم در آسیت یا شستشوی صفاقی قابل شناسایی نیستند. تومور به دیگر اعضا در لگن گسترش یافته است. |
| ۲C | سلول‌های بدخیم در آسیت یا شستشوی صفاقی قابل شناسایی نیستند. تومور در ۲A/B تعریف شده است و سلول‌های بدخیم در آسیت یا شستشوی صفاقی شناسایی شده‌اند. |
| Stage ۳- درگیری یک یا هر دو تخمدان و متاستاز صفاقی خارج از لگن با تأیید میکروسکوپی و/یا متاستاز لنفاوی منطقه‌ای / متاستاز به کپسول کبد | |
| ۳A | متاستاز صفاقی میکروسکوپی فراتر از لگن |
| ۳B | متاستاز صفاقی میکروسکوپی فراتر از لگن، ۲ cm یا کمتر در بزرگ‌ترین ابعاد |
| ۳C | متاستاز صفاقی میکروسکوپی فراتر از لگن، بیش از ۲ cm در بزرگ‌ترین ابعاد و/یا متاستاز به غدد لنفاوی منطقه‌ای |
| Stage ۴- متاستاز دور دست فراتر از حفره‌ی صفاقی و متاستاز به پارانشیم کبد | |



شکل ۱. تفاوت‌ها و شباهت‌های ساختاری DAL-1 و Protein 4.1B

بیان پروتئین DAL-1 ناشی از Hypermethylation نابه‌جا در ۵۵ درصد از سرطان‌های ریه و ۴۵ درصد از کارسینوماهای کلیه دیده شده است (۱۰). مدارک متعددی نشان می‌دهند که بروز تغییرات در ویژگی‌های

اولین بار عدم بیان این ژن در سلول‌های سرطانی تومور Non-small cell ریه نشان داد که عملکرد ژن DAL-1 به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی منفی رشد یا مهار کننده‌ی تومور می‌باشد (۸-۹). از طرفی، کاهش

معیارهای قابل قبول

(۱) معیارهای ورود به مطالعه: نمونه‌های با تشخیص سرطان تخمدان که بافت سالم مجاور آن نیز موجود باشد (صرف نظر از فامیلیال بودن یا نبودن آنها).
(۲) معیارهای خروج از مطالعه: نمونه‌های تخمدان با تشخیصی غیر از سرطان و یا نمونه‌های سرطانی تخمدان که بافت سالم مجاور آن در دسترس نباشد.

تهیه‌ی لام ایمونوهیستوشیمی

پس از تأیید تشخیص پاتولوژی نمونه‌ها توسط رنگ‌آمیزی H & E (Hematoxylin and eosin)، مراحل زیر جهت تهیه‌ی لام ایمونوهیستوشیمی به ترتیب انجام گرفت:

(الف) آماده‌سازی بافت: ابتدا نمونه‌ها توسط اتانول صعودی (۷۰، ۹۵ و ۹۹ درصد) آگیری، سپس توسط گزین شفاف سازی و در نهایت، به وسیله‌ی پارافین قالب‌گیری گردید.

(ب) برش‌گیری: در این مرحله، برش‌های بافتی به ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه شد.

(ج) رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی: در این مرحله، نمونه‌ها با غوطه‌ور سازی در گزینل، پارافین زدایی شده، بعد از آن توسط اتانول‌های نزولی (۹۹، ۹۵ و ۷۰ درصد) آب‌دهی شد. در مرحله‌ی بعد، به منظور توقف فعالیت Endogenous peroxide برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۰/۰۵ درصد انکوبه شد.

پس از آن، در آب جاری شستشو داده شد و به مدت ۱ دقیقه، در دمای ۹۸ درجه در بافر ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم در یک اون میکروویو، Antigen retrieval انجام گرفت. بعد از این مراحل، فعالیت Endogenous peroxide توسط سرم نرمال

چسبندگی سلول‌های سرطانی، دارای نقشی محوری در ایجاد، پیشرفت و متاستاز سرطان دارد.

بنابراین، فقدان چسبندگی بین سلولی و جدا شدن سلول‌ها از غشای قاعده‌ای زیرین، به سلول‌های سرطانی این امکان را می‌دهد تا از ناحیه‌ی اولیه‌ی خود رها شوند؛ ماتریکس خارج سلولی را تخریب نمایند و در نهایت، یک فنوتیپ مهاجمی کسب نمایند و به بافت‌های اطراف خود متاستاز بدهند (۱۱).

با توجه به این که سرطان تخمدان یکی از سرطان‌های بدخیم در شهرستان اصفهان می‌باشد، بررسی بروز ژن DAL-1 به عنوان یکی از اجزای Cell adhesion molecules، می‌تواند نقش مهمی در تعیین پیش‌آگهی داشته باشد.

روش‌ها

روش اجرا

مراحل مختلف اجرای این مطالعه به ترتیب زیر بود:

تعیین و تخمین حجم نمونه

بر اساس مطالعات قبلی، تعداد ۶۰ نمونه‌ی سرطانی و بافت طبیعی مجاور تومور برای این مطالعه در نظر گرفته شد. نمونه‌ها به صورت بلوک پارافینی آماده از بخش پاتولوژی بیمارستان الزهرا (س)، شهید بهشتی، دکتر شریعتی و مهرگان اصفهان تهیه گردید. برای این کار، ابتدا با حفظ اصول اخلاقی و حفظ مشخصات بیماران به پرونده‌های موجود در بایگانی بیمارستان‌ها بررسی و پس از تعیین افراد مبتلا، سن و شماره‌ی پاتولوژی آن‌ها نوشته شد. سپس لام‌ها و بلوک‌های آن‌ها از انبار مربوط بازیابی گردید. پس از آن به کمک پاتولوژیست، لام‌های سالم و سرطانی تعیین و اطلاعات کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌ها ثبت شد.

۲) کاهش بروز: ۵۰-۲۰ درصد سلول‌های سرطانی برای رنگ‌آمیزی (DAL-1) مثبت بودند.
 ۳) فقدان بروز: کمتر از ۲۰ درصد سلول‌های سرطانی در رنگ‌آمیزی (DAL-1) مثبت بودند.

تجزیه و تحلیل یافته‌ها

اطلاعات به دست آمده از طریق نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL)، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه‌ی بین بروز پروتئین در نمونه‌های سرطانی با بروز پروتئین در نمونه‌های بافت سالم مجاور تومور از طریق χ^2 مشخص گردید. $P < 0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه، از ۶۰ نمونه‌ی سرطانی تخمدان و ۶۰ نمونه‌ی بافت سالم مجاور همان نمونه‌ها و از روش ایمونوهیستوشیمی برای بررسی بروز پروتئین DAL-1 استفاده شد.

همچنین از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار Motic Advanced Plus² برای بررسی درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده از مقاطع بافتی استفاده شد که در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت، عکس‌برداری انجام و جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده گردید. در این بررسی، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد. درصد سلول‌هایی که به رنگ قهوه‌ای رنگ‌آمیزی شده بود، تعیین گردید و بر اساس سه گروه درجه‌بندی شده و بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی و بافت‌های طبیعی مجاور بررسی شد.

حضور رنگ قهوه‌ای سیتوپلاسم همراه با رنگ قهوه‌ای غشا و یا بدون آن، هر دو برای بیان DAL-1 مثبت در نظر گرفته شد (شکل‌های ۲ و ۳).

۱۰ درصد (Goat) در (Tris-buffered saline) TBS به مدت پنج دقیقه متوقف شد و سپس سرم اضافی برداشته و آنتی‌بادی اولیه با رقت ۱:۲۰۰ به مدت یک ساعت در درجه‌ی حرارت 4°C اضافه شد. مراحل بعدی، شامل شستشو با TBS دو بار و هر بار پنج دقیقه، انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱:۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه و شستشوی مجدد با TBS دو بار و هر بار، پنج دقیقه بود.

همچنین واکنش کروموزنیک توسط Diaminobenzidine انجام پذیرفت. رنگ‌آمیزی مخالف نیز با Hematoxilin انجام شد و در نهایت، نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد که در گروه‌های شاهد منفی، از PBS (Phosphate buffered saline) به جای آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده گردید.

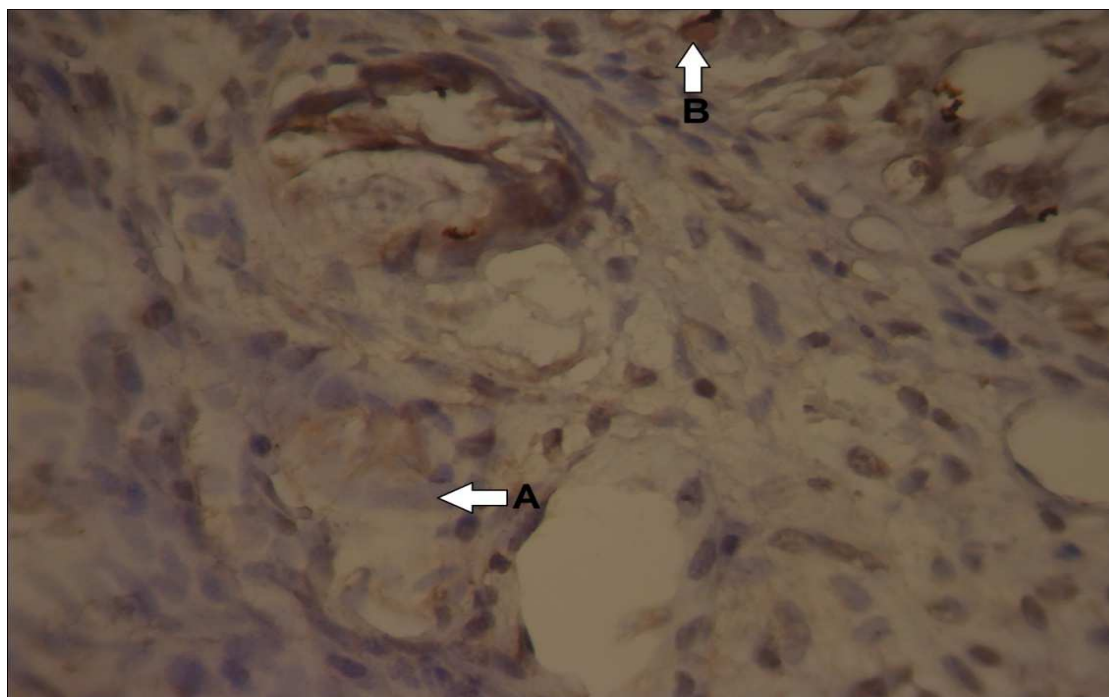
بررسی میکروسکوپی مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی

مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی به منظور بررسی میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری و به کارگیری نرم‌افزار Motic advance plus² در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویربرداری شد، سپس جهت بررسی کمی، از مانیتور LCD استفاده گردید.

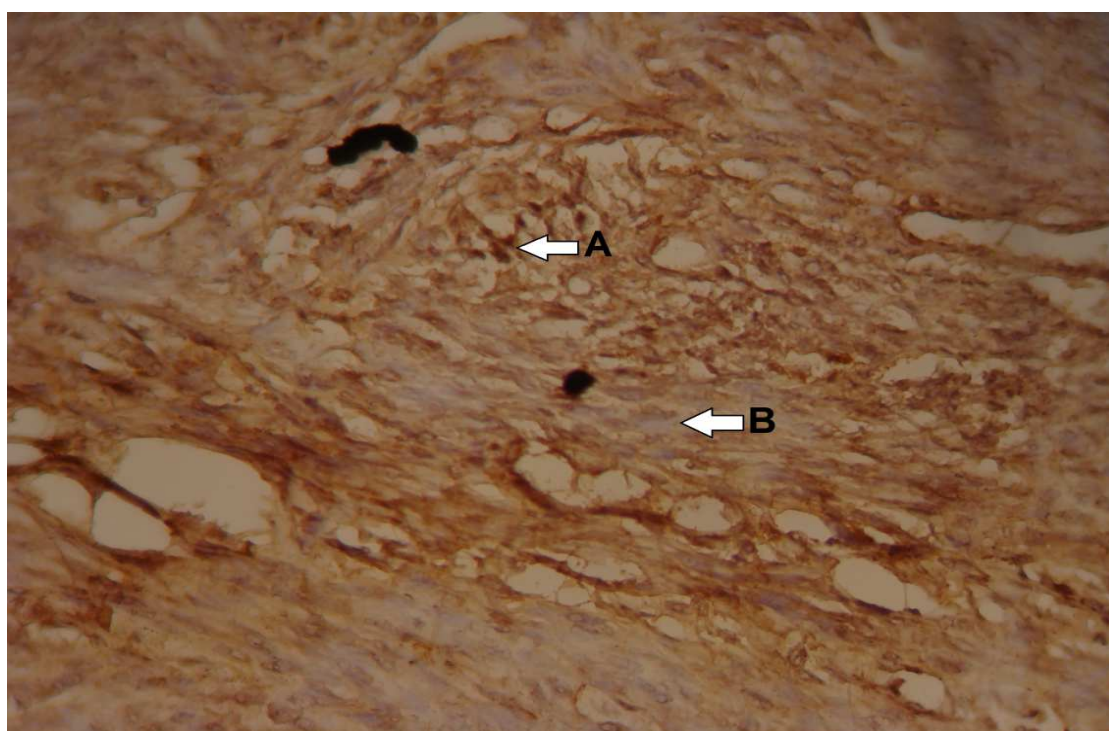
در این بررسی، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش شد و درصد سلول‌هایی که رنگ قهوه‌ای گرفته بود، تعیین گردید و شمارش سلول‌های رنگ‌آمیزی شده بدون اطلاع قبلی از هویت نمونه‌ها توسط دو نفر انجام گرفت.

بر همین اساس، نمونه‌ها به سه گروه تقسیم شدند:

۱) بروز طبیعی: بیش از ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی در رنگ‌آمیزی (DAL-1) مثبت بودند.



شکل ۲. بروز پروتئین DAL-1 در یک نمونه از بافت سرطانی تخمدان. A، بخش اعظم سلول‌ها به رنگ آبی (عدم بروز پروتئین) و B بخش کمتری از سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای (بروز پروتئین) رنگ‌آمیزی شده‌اند (بزرگ‌نمایی $\times 400$).



شکل ۳. بروز پروتئین DAL-1 در یک نمونه از بافت سالم تخمدان. A، بخش اعظم سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای (بروز پروتئین) و B، بخش کمتری از سلول‌ها به رنگ آبی (عدم بروز پروتئین) رنگ‌آمیزی شده‌اند (بزرگ‌نمایی $\times 400$).

جدول ۲. بروز پروتئین DAL-1 در نمونه‌های سرطانی (مورد) و بافت سالم مجاور تومور (شاهد). کاهش معنی‌دار بروز پروتئین در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده شد (آزمون χ^2).

| نمونه‌ها | تعداد کل | فقدان بروز (تعداد (درصد)) | کاهش بروز (تعداد (درصد)) | بروز طبیعی (تعداد (درصد)) | مقدار P |
|----------|----------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------|
| شاهد | ۶۰ | ۰ (۰) | ۰ (۰) | ۶۰ (۱۰۰) | < ۰/۰۰۱ |
| مورد | ۶۰ | ۱۳ (۲۱/۷) | ۱۳ (۲۱/۷) | ۱۷ (۲۸/۳) | |

جدول ۳. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌های سرطانی (آزمون χ^2)

| ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک | تعداد کل | فقدان بروز (تعداد (درصد)) | کاهش بروز (تعداد (درصد)) | بروز طبیعی (تعداد (درصد)) | مقدار P |
|----------------------------|-----------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------|
| سن | | | | | |
| ≥ ۵۰ سال | ۳۲ (۵۳/۳) | ۷ (۲۱/۹) | ۱۴ (۴۳/۸) | ۱۱ (۳۴/۴) | ۰/۲۶۰ |
| < ۵۰ سال | ۲۸ (۴۶/۷) | ۶ (۲۱/۴) | ۱۶ (۵۷/۲) | ۶ (۲۱/۴) | |
| متاستاز به غدد لنفاوی | | | | | |
| بدون متاستاز | ۲۶ (۴۳/۳) | ۳ (۱۱/۵) | ۱۲ (۴۶/۲) | ۱۱ (۴۲/۳) | * ۰/۰۳۶ |
| دارای متاستاز | ۳۴ (۵۶/۷) | ۱۰ (۲۹/۴) | ۱۸ (۵۳/۰) | ۶ (۱۷/۶) | |
| Stage | | | | | |
| I | ۱۰ (۱۶/۷) | ۰ (۰) | ۵ (۵۰/۰) | ۵ (۵۰/۰) | ۰/۱۱۰ |
| II | ۶ (۱۰/۰) | ۱ (۱۶/۷) | ۳ (۵۰/۰) | ۲ (۳۳/۳) | |
| III | ۳۵ (۵۸/۳) | ۹ (۲۵/۷) | ۱۷ (۴۸/۶) | ۹ (۲۵/۷) | |
| IV | ۹ (۱۵/۰) | ۳ (۳۳/۳) | ۵ (۵۵/۶) | ۱ (۱۱/۱) | |

* بین کاهش بیان پروتئین DAL-1 و متاستاز به غدد لنفاوی رابطه‌ی معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد.

تنها ۲۵ درصد) مبتلایان می‌باشد (۵). با وجود بهبود در عمل جراحی و پاسخ اولیه‌ی خوب بیماران به شیمی درمانی مبتنی بر پلاتین، میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان تخمدان برای بیش از سه دهه پس از تشخیص، بهبود کمی داشته است (۱۲).

از آن جایی که این سرطان همانند سرطان‌های دیگر از یک روند تدریجی شروع، پیشرفت موضعی و در نهایت متاستاز پیروی می‌کند، شناسایی مارکرهای ژنتیکی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۱۳).

پروتئین DAL-1 یکی از این مارکرها است. عملکرد مهارکنندگی تومور DAL-1/Protein 4/1B در مطالعات اخیر اثبات شده است. دانشمندان با استفاده از آنتی بادی‌های خاص، مشاهده کرده‌اند که پروتئین 4/1B یک مولکول kDa ۱۴۵-۱۲۵ می‌باشد

در تحقیق حاضر، بیان این پروتئین در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < ۰/۰۰۱$) (جدول ۲). همچنین کاهش بیان این پروتئین از لحاظ آماری به طور معنی‌داری با متاستاز به غدد لنفاوی ($P = ۰/۰۳۶$) مرتبط بود (جدول ۳).

بحث

از آن جایی که تومور تخمدان، از مهم‌ترین علت‌های مرگ و میر ناشی از سرطان دستگاه تناسلی زنان و فاقد علائم زودرس قابل شناسایی می‌باشد، این بدخیمی در بیشتر بیماران مبتلا، در مراحل یا Stage‌های بالاتری تشخیص داده می‌شود و به دنبال آن تحت درمان قرار می‌گیرد که نتیجه‌ی آن بقای نه چندان زیاد (بقای ۵ ساله

را با هفت کروموزوم (۴، ۵، ۶، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۸)، که اغلب در سرطان‌های اولیه‌ی تخمدان به طور متعدد حذف می‌شدند، گزارش کرده‌اند (۱۹-۱۶).

آن‌ها دریافتند که کروموزوم ۱۸ باعث مهار شدن فنوتیپ نئوپلاستیک رده‌های سلولی سرطان تخمدان می‌شود (۲۱-۲۰). یکی از ژن‌های کاندید بر روی کروموزوم ۱۸ در تحقیق مذکور، EPB۴۱L۳ یا DAL-۱ بوده است که ارزیابی عملکردی بیشتر درباره‌ی تومورهای اولیه‌ی تخمدان انجام گرفت و در مدل‌های سه بعدی از سرطان تخمدان، منجر به ارایی‌ی شواهد متعددی از نقش DAL-۱ در پیشرفت سرطان تخمدان شد. آن‌ها این ژن را، یک ژن کاندید مهار کننده‌ی تومور سرطان تخمدان شناسایی کردند. این ژن به صورت گسترده در رده‌های سلول سرطانی تخمدان و بافت‌های اولیه‌ی تومور در مقایسه با سلول‌های اپی‌تلیال طبیعی تخمدان، متیله شده و بیان این ژن در ۶۵ درصد کل تومورهای مهاجم اولیه‌ی تخمدان و در ۷۹ درصد رده‌های سلول‌های سرطانی تخمدان از دست رفته است (۱۳).

از طرفی، بیان مجدد ژن در مدل‌های سه بعدی سلول‌های سرطانی تخمدان، باعث مهار شدن رشد و افزایش آپوپتوز آن‌ها شده است. بر اساس این مطالعه، که تجزیه و تحلیل‌های آن بر اساس عملکردهای شناخته شده و آنالیز مولکولی چندین رده سلول سرطانی تخمدان بوده است، DAL-۱ قوی‌ترین و مهم‌ترین کاندید در این میان بوده است. اما این امکان وجود دارد که ژن‌های دیگر شناخته شده یا حتی ژن ناشناسی، عامل اصلی مهار شدن تومور باشند. بر اساس نظر آن‌ها، پیگیری یک یا چند ژن دیگر شناخته شده (اگر نقشی در سرطان زایی در تخمدان

که در غشای پلاسمایی نزدیک نقاط تماس سلول به سلول لوکالیزه می‌شود و این، نشان دهنده‌ی نقش این پروتئین در فرایندهای واسطه‌ای سلول-غشا است. این حقیقت که بیان بیش از حد DAL-۱ باعث اختلال در حرکت سلول و در هم گسیختگی اکتین اسکلت سلولی در طی گسترش سلول می‌شود، مؤید این ایده نیز می‌باشد. فقدان هتروزیگوتی (LOH یا Loss of heterozygosity) در محل ۱۱p۱۱/۳، جایی که نقشه‌ی ژن DAL-۱ موجود می‌باشد، در ۳۸ درصد تومورهای ریه، مغز و پستان یافت شده است. علاوه بر این، ورود مجدد DAL-۱ به سلول‌های سرطانی ریه‌ی فاقد این ژن و رده‌های سلولی منتزیوما، باعث کاهش تکثیر سلولی شده است (۱۴).

در سال‌های اخیر مشخص شده است که DAL-۱ با مولکول‌های ۳-۳-۱۴ (که در تنظیم چرخه‌ی سلولی نقش دارند) در هر دو محیط *In vivo* و *In vitro* واکنش می‌دهد. به علاوه، این واکنش مخصوص DAL-۱ می‌باشد و در سایر اعضای خانواده پروتئین ۴/۱B مشاهده نشده است. از آن جا که CD۴۴ و ۳-۳-۱۴ هر دو در مسیرهای سیگنالینگ میتوژنیک دخیل هستند، ممکن است همراهی پروتئین ۴/۱B با این پروتئین‌ها برای عبور سیگنال‌های مهار کننده‌ی رشد پروتئین ۴/۱B مهم باشد (۱۵).

در برخی مطالعات، دانشمندان از روش MMCT (Microcell-mediated chromosome transfer) برای شناسایی مناطق کروموزومی که در توسعه‌ی سرطان تخمدان نقش دارند، همچنین تشخیص کروموزوم‌ها و مناطق سواب کروموزومی که باعث سرکوب نئوپلاستیک در سلول‌های سرطان تخمدان می‌شوند، استفاده کرده‌اند. آن‌ها ارتباط سرطان تخمدان

داشته باشند)، نیاز به آنالیزهای عملکردی گسترده و اضافی دارد (۱۳).

در مطالعه‌ی حاضر، برای بررسی بروز پروتئین DAL-1 در سرطان تخمدان، بروز این پروتئین با رنگ‌آمیزی (Interstate highway construction) IHC در ۶۰ نمونه‌ی سرطانی بررسی شد و از ۶۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های توموری به عنوان نمونه‌ی شاهد استفاده شد. از اطلاعات کلینیکوپاتولوژیک نمونه‌ها نیز برای بررسی و ارتباط آن با نتایج رنگ‌آمیزی استفاده گردید.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در تمام بافت‌های طبیعی تخمدان، پروتئین DAL-1 در سطوح بالایی بروز کرده است. در مقابل، در گروه نمونه‌های سرطانی تخمدان، کاهش و یا فقدان بروز پروتئین مورد بحث، مشاهده گردید. از طرف دیگر، فقدان یا کاهش بروز این پروتئین به طور معنی‌داری در نمونه‌های سرطانی با متاستاز به غدد لنفاوی بیش از سایر نمونه‌ها بود. بنابراین، بر طبق این یافته‌ها، فقدان یا کاهش بروز پروتئین DAL-1 در سرطان تخمدان می‌تواند باعث یک اتفاق اکتسابی در سطح مولکولی باشد که توسط آن، سلول‌های سرطانی بیشتر در معرض متاستاز دور دست قرار می‌گیرند.

از طرف دیگر، پروتئین DAL-1 ممکن است عملکردی به عنوان Cell adhesion molecule داشته باشد و در نتیجه‌ی کاهش یا فقدان بیان آن، متاستاز دور دست اتفاق بیفتد.

اما طبق مطالعه و بررسی حاضر، رابطه‌ی معنی‌داری بین بروز این پروتئین و Stage‌های بالاتر بیماری وجود نداشت؛ در حالی که در مطالعه‌ی دیگر، بروز DAL-1، در Stage‌های بالاتر تومور

بیشتر بوده و با مراحل بالاتر تومور، رابطه‌ی معنی‌داری داشته است (۱۳).

مشابه با نتایج پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل ایمنووهیستوشیمی بیش از ۸۰۰ تومور تخمدان نشان داد که در حدود دو سوم از نمونه‌های سرطانی تخمدان، DAL-1 دچار کاهش بروز شده است؛ اما به شدت در اپیتلیوم طبیعی تخمدان بیان شده است (۲۲).

مطالعات قبلی نشان داده است که DAL-1 در منژیوما، سرطان ریه، پروستات و کبد، هایپر متیله می‌شود. دانشمندان شواهدی از هایپر متیلاسیون وسیع پروموتور DAL-1 در سرطان‌های اولیه‌ی تخمدان در مقایسه با سلول‌های طبیعی را مشاهده و اظهار کرده‌اند که این مشاهده، علت احتمالی کاهش DAL-1 در تومورهای تخمدان می‌باشد (۲۵-۲۳، ۱۰).

در پایان، باید به این نکته اشاره کرد که برای درک هر چه بهتر مکانیسم‌های احتمالی دیگر برای غیر فعال شدن این پروتئین و همچنین بررسی سریع‌تر و دقیق‌تر بروز این پروتئین در سرطان تخمدان، نیاز به تحقیقات و مطالعات بیشتری وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به کاهش بروز پروتئین DAL-1 در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم در این مطالعه، بیان پروتئین DAL-1 می‌تواند با پاتورژن سرطان تخمدان مرتبط باشد. از طرف دیگر، فقدان یا کاهش بروز این پروتئین، به طور معنی‌داری در نمونه‌های سرطانی با متاستاز به غدد لنفاوی بیش از سایر نمونه‌ها بوده است. بنابراین، می‌توان DAL-1 را به عنوان یک مارکر تشخیصی برای بیماران مبتلا به سرطان تخمدان مورد استفاده قرار داد.

References

- Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF. Cancer genetics and genomics. In: Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF, editors. Thompson and Thompson genetics in medicine. 6th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 2001. p. 125-50.
- Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, et al. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2001; 20(36): 5025-32.
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253(5020): 665-9.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253(5020): 661-5.
- Shahshahan Z. Distribution and staging of 250 patients with ovarian cancer. *Iran J Surg* 2013; 12(33): 30-4.
- Benedet JL, Bender H, Jones H, III, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 70(2): 209-62.
- Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 2006; 25(43): 5864-74.
- Tran YK, Bogler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* 1999; 59(1): 35-43.
- Gutmann DH, Hirbe AC, Huang ZY, Haipek CA. The protein 4.1 tumor suppressor, DAL-1, impairs cell motility, but regulates proliferation in a cell-type-specific fashion. *Neurobiol Dis* 2001; 8(2): 266-78.
- Tsujiuchi T, Sugata E, Masaoka T, Onishi M, Fujii H, Shimizu K, et al. Expression and DNA methylation patterns of Tslc1 and Dal-1 genes in hepatocellular carcinomas induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *Cancer Sci* 2007; 98(7): 943-8.
- Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, et al. Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2003; 98(5): 1002-7.
- Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004; 351(24): 2519-29.
- Dafou D, Grun B, Sinclair J, Lawrenson K, Benjamin EC, Hogdall E, et al. Microcell-mediated chromosome transfer identifies EPB41L3 as a functional suppressor of epithelial ovarian cancers. *Neoplasia* 2010; 12(7): 579-89.
- Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, Swanson PE, Lohse CM, Newsham IF, et al. Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(10): 872-9.
- Yu T, Robb VA, Singh V, Gutmann DH, Newsham IF. The 4.1/ezrin/radixin/moesin domain of the DAL-1/Protein 4.1B tumour suppressor interacts with 14-3-3 proteins. *Biochem J* 2002; 365(Pt 3): 783-9.
- Wan M, Sun T, Vyas R, Zheng J, Granada E, Dubeau L. Suppression of tumorigenicity in human ovarian cancer cell lines is controlled by a 2 cM fragment in chromosomal region 6q24-q25. *Oncogene* 1999; 18(8): 1545-51.
- Kruzelock RP, Cuevas BD, Wiener JR, Xu FJ, Yu Y, Cabeza-Arvelaiz Y, et al. Functional evidence for an ovarian cancer tumor suppressor gene on chromosome 22 by microcell-mediated chromosome transfer. *Oncogene* 2000; 19(54): 6277-85.
- Cao Q, Abeysinghe H, Chow O, Xu J, Kaung H, Fong C, et al. Suppression of tumorigenicity in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3 by microcell-mediated transfer of chromosome 11. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 129(2): 131-7.
- Stronach EA, Sellar GC, Blenkiron C, Rabiasz GJ, Taylor KJ, Miller EP, et al. Identification of clinically relevant genes on chromosome 11 in a functional model of ovarian cancer tumor suppression. *Cancer Res* 2003; 63(24): 8648-55.
- Yaqinuddin A, Abbas F, Naqvi SZ, Bashir MU, Qazi R, Qureshi SA. Silencing of MBD1 and MeCP2 in prostate-cancer-derived PC3 cells produces differential gene expression profiles and cellular phenotypes. *Biosci Rep* 2008; 28(6): 319-26.
- Yi C, McCarty JH, Troutman SA, Eckman MS, Bronson RT, Kissil JL. Loss of the putative tumor suppressor band 4.1B/Dal1 gene is dispensable for normal development and does not predispose to cancer. *Mol Cell Biol* 2005; 25(22): 10052-9.

22. Kobel M, Huntsman D, Gilks CB. Critical molecular abnormalities in high-grade serous carcinoma of the ovary. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: e22.
23. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, et al. Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(8): 2954-61.
24. Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, et al. Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 118(4): 916-23.
25. Schulz WA, Alexa A, Jung V, Hader C, Hoffmann MJ, Yamanaka M, et al. Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer* 2007; 6: 14.

Comparative Investigation of DAL-1 Tumor Suppressor Protein Expression in Cancerous and Normal Ovarian Specimens

Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD¹, Zahra Abdolali²

Original Article

Abstract

Background: DAL-1 (differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1), located on chromosome 18 (18p11.3), has been identified as a tumor suppressor gene. DAL-1 is one member of cell adhesion molecules, play role in cytoskeleton organization with intracellular tight junctions. Inactivation of this gene can destroy the intracellular and cell-cytoskeleton adhesion, which induces malignancy and metastasis. We aimed to compare the DAL-1 tumor suppressor protein expression in cancerous and normal ovarian specimens.

Methods: 60 samples of ovarian cancer and 60 adjacent normal tissues from the same tumor samples were used. Immunohistochemistry method used to investigate the expression of DAL-1 protein. For scrutiny of percentage of cells in stained tissue sections, we took advantage of optical microscope and motic advanced plus 2 software. The presence of brown cytoplasm, with or without brown membrane, was considered positive for the expression of DAL-1.

Findings: Significantly, expression of DAL-1 protein was reduced in tumoral tissues compared with adjacent normal tissues ($P < 0.001$). Also, the decrease of protein expression was statistically related with lymph node metastasis ($P = 0.036$).

Conclusion: According to the low incidence of DAL-1 protein in tumor samples compared to normal samples in this study, DAL-1 protein expression can be related with the pathogenesis of ovarian cancer. On the other hand, significantly relation of the absence or reduce expression of this protein in cancerous samples with lymph node metastasis reveals that DAL-1 can be used as a diagnostic marker for ovarian cancer patients.

Keywords: Ovarian cancer, DAL-1, Tumor suppressor gene, Immunohistochemistry

Citation: Nikbakht Dastjerdi M, Abdolali Z. Comparative Investigation of DAL-1 Tumor Suppressor Protein Expression in Cancerous and Normal Ovarian Specimens. J Isfahan Med Sch 2013; 31(250): 1339-50

* This paper is derived from a medical doctorate thesis No. 390607 in Isfahan University of Medical Sciences.
1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD, Email: nikbakht@med.mui.ac.ir