مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۲/هفته سوم خرداد ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۳

بررسی ارتباط بیان ژن PTEN با شاخص‌های پاتولوژی در بیماران مبتلا به سرطان پستان با روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر رحیم گل‌محمدی[۱]، دکتر محمد شفیع مجددی[۲]، دکتر اکبر پژهان[۳]، دکتر مهدی نیکبخت دستجردی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سرطان پستان آسیب‌های ژنتیکی و عوامل اپی ژنتیکی نقش اصلی را دارند. پروتئین PTEN (Phosphatase and tensin homolog) که محصول ژن PTEN می‌باشد، مهم‌ترین عامل سرکوب کننده‌ی تومور است که با روش ایمونوهیستوشیمی قابل ردیابی است. هدف از این مطالعه، تعیین میزان بیان ژن PTEN با شاخص‌های آسیب‌شناسی و بافتی در سرطان پستان می‌باشد.

روش‌ها: این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی بر روی تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی مبتلا به سرطان پستان که در سال‌های ۹۲-۱۳۸۹ به بیمارستان‌های شهر سبزوار مراجعه کرده بودند، انجام شد. بعد از ثابت کردن نمونه‌ها در فرمالین، پاساژ بافتی و مقطع‌گیری انجام شد. سپس اسلایدها با هماتوکلیسن و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. تشخیص آسیب‌شناسی توسط دو پاتولوژیست به صورت جداگانه انجام گرفت. بیان ژن PTEN بعد از ماسک‌زدایی با روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی اختصاصی (Primary specific rabbit monoclonal PTEN antibody) در نمونه‌ها مشخص شد و با میکروسکوپ نوری از اسلایدها تصویر گرفته شد. داده‌ها با آزمون χ^2 و آزمون Fisher's exact تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی بدخیمی مورد مطالعه، ۷۰ نمونه (۷۰ درصد) با بیان ژن PTEN همراه بودند و ۳۰ مورد (۳۰ درصد) فاقد بیان ژن PTEN بودند. در حالی که تمام نمونه‌های غیر سرطانی (نمونه‌های سالم) با بیان بالای ژن PTEN همراه بودند. بین درجه‌ی تمایز و مرحله‌ی تومور ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵۰$)؛ اما بین بیان بالای ژن PTEN با مرحله‌ی تومور ارتباط معنی‌داری وجود داشت. بین بیان بالای ژن PTEN با درجه‌ی پایین تومور نیز ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P > ۰/۰۵۰$). میزان بیان ژن PTEN در تومورهای مهاجم مجرا نسبت به تومورهای غیر مهاجم سرطان پستان کمتر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه‌ی حاضر، بیان ژن PTEN در بیمارانی که در درجه‌ی بالای بیماری قرار داشتند، کمتر مشاهده شد. بنابراین، عدم بیان ژن PTEN در نمونه‌های سرطانی، می‌تواند نشانه‌ای از پیش‌آگهی بد قلمداد شود.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، ایمونوهیستوشیمی، بیان ژن PTEN

ارجاع: گل‌محمدی رحیم، مجددی محمد شفیع، پژهان اکبر، نیکبخت مهدی. **بررسی ارتباط بیان ژن PTEN با شاخص‌های پاتولوژی در بیماران مبتلا به سرطان پستان با روش ایمونوهیستوشیمی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۲): ۵۲۳-۵۱۴

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۲- استادیار، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۴- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رحیم گل محمدی
Email: rahimgolmohammadi@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان یکی از مهم‌ترین بدخیمی‌های عمومی زنان در ایالات متحده‌ی امریکا محسوب می‌شود (۱). از هر ۸ تا ۱۲ نفر در کشورهای غربی، یک نفر به سرطان پستان مبتلا می‌شود؛ به طوری که سرطان پستان دومین عامل مرگ در زنان است (۳-۲). در آسیا، میزان شیوع سرطان پستان در سال‌های اخیر رو به افزایش می‌باشد (۴) و میانگین سن شروع سرطان پستان در ایران نیز کاهش یا فته است (۵). کارسینوم پستان اغلب به دو شکل غیر مهاجم و مهاجم دیده می‌شود. موارد غیر مهاجم حدود ۳۰-۱۵ درصد تمام سرطان پستان را به خود اختصاص می‌دهند که شامل کارسینوم داخل مجرایی (DCIS یا Ductal carcinoma in situ) و کارسینوم لوبولی (LCIS یا Lobular carcinoma in situ) است. کارسینوم‌های مهاجم پستان که حدود ۸۵-۷۰ درصد بقیه‌ی سرطان‌های پستان را به خود اختصاص می‌دهند، شامل کارسینوم مهاجم مجرایی (NST یا Invasive ductal carcinoma no special type) و کارسینوم مهاجم لوبولی (Invasive lobular carcinoma) ILC یا NLC می‌باشند (۶).

در سرطان پستان، مجموعه‌ای از عوامل محیطی و ژنتیکی نقش دارند. ژن‌هایی که در سرطان پستان فعال می‌شوند، در دو دسته قرار می‌گیرند: گروه اول ژن‌های مهار کننده‌ی تومور (Tumor suppressor) که مانع پیشرفت تومور می‌شوند مانند ژن P۵۳ (۸-۷) و PTEN. گروه دیگر، ژن‌هایی هستند که جهش آن‌ها باعث پیشرفت و یا تسریع تومور می‌گردد (۹).

ژن PTEN یک ژن مهار کننده‌ی تومور است که بر روی کروموزوم ۱۰q۲۳ قرار دارد و از ۱۱ اگزون تشکیل شده است. مطالعات جدید روی این ژن متمرکز شده است. ژن PTEN در بعضی از تومورهای بدخیم از جمله سرطان پستان غیر فعال می‌شود (۱۰).

نقش عملکردی این ژن، القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد. محصول ژن PTEN در تولید سیگنال‌های کموتاکسی و مهار تکثیر سلولی نقش دارد؛ به طوری که گزارش شده است که اختلال عملکردی آن منجر به افزایش اندازه‌ی سلول‌های اپی تلیال در ناحیه‌ی هیپر پلازی پروستات در موش می‌شود و پس از مدتی (۱۴-۱۰ ماه) عدم بیان ژن PTEN در بافت خوش‌خیم، موجب تبدیل آن به کارسینومای مهاجم پروستات (Invasive prostate carcinoma) شده است (۱۱).

در پژوهش Wang و همکاران در زمینه‌ی سرطان پروستات مشاهده شد که ژن PTEN روی کموتاکسی سلول‌های سرطانی، پاسخ‌های متعدد سلولی را تنظیم می‌کند (۱۱) و مطالعات In vitro نشان می‌دهد که تزریق PTEN به موش‌های فاقد بیان ژن PTEN، موجب کاهش متاستاز سلول‌های سرطانی به ریه می‌گردد (۱۲). اختلال عملکردی ژن PTEN نه تنها همراه با چندین سرطان همراه می‌شود؛ بلکه می‌تواند منجر به بیماری‌های قلبی و عروقی، دیابت، پارکینسون و اسکیزوفرنی شود (۱۳).

با توجه به نقش‌های مختلف عملکردی ژن PTEN مطالعات جدید تکمیلی نیاز است تا مکانیسم این ژن بهتر مشخص شود (۱۴). عدم بیان ژن PTEN ناشی از جهش ژن PTEN است که منجر به اختلال عملکردی ژن و افزایش قدرت تهاجمی تومور می‌شود و جهش ژن PTEN اغلب با از دست رفتن

عمل پروتئین همراه است. پروتئین PTEN که محصول ژن PTEN است، با روش ایمونوهیستوشیمی قابل تعیین می‌باشد (۱۵).

از آن جا که ژن PTEN نقش یک سرکوب کننده‌ی تومور را به عهده دارد و جهش آن با متاستاز سریع بعضی تومورها همراه است (۱۶)، اما مشخص نیست که بین شاخص‌های بافتی و آسیب‌شناسی در سرطان پستان با بیان ژن PTEN ارتباطی وجود دارد یا خیر؟ به علاوه این که آیا بررسی بیان ژن PTEN می‌تواند در فرایند تشخیصی و درمانی بیماران مبتلا به سرطان کمک کننده باشد یا خیر؟ از این رو، مطالعه‌ی حاضر طراحی شد تا میزان بیان ژن PTEN در بیماران مبتلا به سرطان پستان با شاخص‌های پاتولوژی و بافتی بررسی شود.

روش‌ها

این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی روی تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی مبتلا به سرطان بافت پستان مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر سبزوار انجام شد. در مطالعه‌ی حاضر از بافت مجاور سالم به عنوان نمونه‌ی شاهد استفاده شد. ترتیب مراحل انجام کار به طور خلاصه به شرح زیر بود:

نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند. پاساژ بافتی به وسیله‌ی دستگاه Tissue processing انجام شد و بعد از انفیلتراسیون نمونه‌ها در پارافین مذاب، نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری شدند. مقاطع ۴ میکرونی از تمام نمونه‌ها با میکروتوم دوار Litze تهیه شد. لام‌های (اسلاید) حاوی نمونه با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. در صورت تشخیص بدخیمی توسط دو متخصص آسیب‌شناسی (دو سو کور) و تعیین درجه‌ی بافتی که بر اساس میتوز پلی مورفیسم، وجود یا عدم وجود غدد در نمونه‌ها بود، تومورها به درجات ۱ تا ۳ تقسیم‌بندی شدند.

بیان ژن PTEN به ترتیب زیر در نمونه‌ها انجام شد.

جهت انجام ایمونوهیستوشیمی دما و غلظت‌های آنتی بادی بر طبق دستور کیت انجام گرفت؛ اما برای ماسک‌زدایی محل شاخص‌های آنتی‌ژنیک نمونه‌ها، ازمیکروویو وب افرسیترات با حرارت ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. برای مهار فعالیت اندوژناز پراکسیداز به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۳ درصد آب اکسیژنه قرار داده شد و دوباره لام‌ها ۵ بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد. با آنتی بادی اولیه (Primary specific rabbit monoclonal PTEN antibody) ساخت شرکت Novocastra (Newcastle, UK) روی لام‌ها چکانده شد و سه بار با بافر فسفات سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) شستشو داده شد و سپس از آنتی بادی ثانویه استفاده شد (توضیح این که اسلایدها برای عبور از هر مرحله به مرحله‌ی بعدی، سه بار با بافر فسفات سالین شستشو داده می‌شدند).

از استرپتوآویدین متصل به HRP (Horseradish peroxidase) که قادر است دی‌آمینوبنزیدین (DAB یا ۳,۳'-Diaminobenzidine) را اکسید کند، برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها استفاده شد و با میکروسکوپ نوری بررسی و تصویر گرفته شد. سلول‌هایی که کمتر از ۱۰ درصد رنگ گرفته بودند، منفی قلمداد شدند و آن‌هایی که بیش از ۱۰ درصد رنگ قهوه‌ای به خود گرفته بودند، مثبت قلمداد شدند و با در نظر گرفتن بیان و عدم بیان ژن PTEN اسلایدها به درجات مثبت و منفی تقسیم شدند

(۱۷، ۱۵). سپس از اسلایدها با میکروسکوپ نوری ۲ Advanced motic plus تصویر گرفته شد. اسلایدها توسط دو نفر به طور جداگانه بررسی شدند.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۱/۵ (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های χ^2 و Fisher's exact تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

الف- یافته‌های دموگرافیک، آسیب‌شناسی و بافتی

میانگین سن بیماران مبتلا به سرطان پستان ۱۳/۸۶ ± ۴۷/۱۱ سال و حداقل و حداکثر سن به ترتیب ۲۵ و ۸۲ سال بود. از تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی بدخیمی، ۸۲ مورد از نوع کارسینوم مهاجم مجرایی، ۱۳ نمونه از نوع کارسینوم لوبولی غیر مهاجم و ۵ نمونه از نوع کاسینوم لوبولی مهاجم بودند.

تعداد ۳۲ نمونه در مرحله‌ی صفر بیماری (Carcinoma in situ) بودند؛ یعنی سلول‌های سرطانی محدود به یک لوبول و یک مجرا بود و بافت‌های چربی اطراف، آلوده به سلول‌های سرطانی نبودند. ۴۴ مورد در مرحله‌ی ۱ (Stage I) از نظر پیشرفت بیماری قرار داشتند و گره‌های لنفاوی به سلول‌های سرطانی گرفتار نشده بودند. در ۱۴ نمونه، گره‌های لنفاوی و بافت‌های مجاور به سلول‌های بدخیم آلوده شده بودند؛ یعنی در مرحله‌ی ۲ (Stage II) از نظر پیشرفت بیماری قرار داشتند. ۶ نمونه در مرحله‌ی ۳ (Stage III) بیماری قرار داشتند و تعداد ۴ نمونه در مرحله‌ی ۴ و پیشرفت بدخیمی قرار داشتند؛ یعنی به بافت‌های دیگر متاستاز (Stage IV) داده بودند (جدول ۲).

جدول ۱. توزیع فراوانی بیان ژن PTEN بر اساس درجه‌ی تمایز تومور در سلول‌های سرطانی بافت پستان

PTEN / درجه	مثبت فراوانی (درصد)	منفی فراوانی (درصد)	تعداد کل فراوانی (درصد)
درجه‌ی ۱	۱۴ (۱۴)	۳ (۳)	۱۷ (۱۷)
درجه‌ی ۲	۴۵ (۴۵)	۷ (۷)	۵۲ (۵۲)
درجه‌ی ۳	۱۱ (۱۱)	۲۰ (۲۰)	۳۱ (۳۱)
تعداد کل	۷۰ (۷۰)	۳۰ (۳۰)	۱۰۰ (۱۰۰)

بین درجه‌ی بالای تومور و بیان ژن PTEN در بافت بدخیم غده‌ی پستان، ارتباط معکوس و معنی‌داری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). بدین معنی که در تومورهای درجه‌ی بالا، بیان ژن PTEN کمتر می‌باشد.

جدول ۲. ارتباط بین مرحله‌ی تومور با بیان ژن PTEN در سلول‌های سرطانی بافت پستان

PTEN / مرحله	مثبت فراوانی (درصد)	منفی فراوانی (درصد)	تعداد کل فراوانی (درصد)
مرحله‌ی صفر	۲۴ (۲۴)	۸ (۸)	۳۲ (۳۲)
مرحله‌ی ۱	۳۶ (۳۶)	۸ (۸)	۴۴ (۴۴)
مرحله‌ی ۲	۹ (۹)	۴ (۵)	۱۴ (۱۴)
مرحله‌ی ۳ و ۴	۱ (۱)	۹ (۹)	۱۰ (۱۰)
تعداد کل	۷۰ (۷۰)	۳۰ (۳۰)	۱۰۰ (۱۰۰)

بین مرحله‌ی تومور و بیان ژن PTEN در بافت بدخیم غده‌ی پستان ارتباط معکوس و معنی‌داری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). بدین معنی که بیان ژن PTEN در تومورهایی که در مرحله‌ی بالایی از پیشرفت قرار می‌گیرند، کمتر می‌باشد.

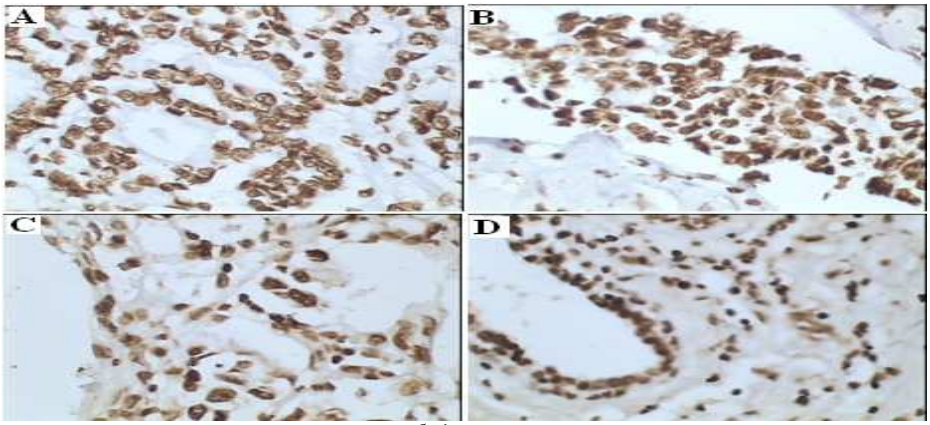
سلول‌های بدخیمی در دو بیمار به اندام تنفسی ریه و یک مورد به پستان مجاور و یک مورد به کبد سرایت کرده بود. از نظر درجه‌ی تمایز بافتی، ۱۷ مورد در درجه‌ی ۱، ۵۲ مورد در درجه‌ی ۲ و ۳۱ مورد در درجه‌ی ۳ از نظر پیشرفت بافتی و آسیب‌شناسی قرار داشتند.

ب- یافته‌های بیان ژن PTEN در نمونه‌های مورد مطالعه

تعداد ۷۰ نمونه‌ی بدخیم (۷۰ درصد) با بیان بالای ژن PTEN همراه بودند. ۳۰ مورد (۳۰ درصد) از نمونه‌های بدخیم، فاقد بیان ژن PTEN بودند و تمام نمونه‌های غیر سرطانی (نمونه‌های سالم) با بیان بالای ژن PTEN همراه بودند. بین درجه‌ی تمایز و مرحله‌ی تومور، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵۰$). همچنین بین بیان بالای ژن PTEN با مرحله‌ی تومور، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($P > ۰/۰۰۱$)؛ به طوری که از تعداد ۷۰ نمونه‌ی مثبت که با بیان بالای ژن PTEN بودند، ۲۴ مورد در مرحله‌ی صفر بیماری قرار داشتند، ۳۶ مورد در مرحله‌ی ۱، ۹ نمونه در مرحله‌ی ۲ و ۱ نمونه در مرحله‌ی ۳ بیماری قرار داشتند. بیمارانی که در مرحله‌ی پیشرفت بیماری (مرحله‌ی ۴) قرار داشتند، فاقد بیان ژن PTEN بودند (جدول ۱).

همچنین بین بیان بالای ژن PTEN با درجه‌ی تومور، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۰۱$)؛ بدین ترتیب، در نمونه‌های درجه‌ی ۳، بیان ژن PTEN کمتری مشاهده شد (جدول ۱). بیان ژن PTEN در تومورهای مرحله‌ی پیشرفت بیماری (متاستاز)، کمتر بود. همچنین در تومورهای بدخیمی مهاجم مجرایی، عدم بیان ژن PTEN در ۲۸ نمونه (۲۸ درصد) و در تومورهای غیر مهاجم در ۲ نمونه (۲ درصد) بود؛ یعنی بین نوع تومور و عدم بیان ژن PTEN ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۴۰$).

در رنگ‌آمیزی اختصاصی، سلول‌های سرطانی که با بیان ژن PTEN همراه بودند، رنگ قهوه‌ای را به خود گرفتند (شکل ۱- A و B). میزان بیان ژن PTEN در نمونه‌های بدخیمی که درجه‌ی بالاتری داشتند، کمتر بود (شکل ۱- C). در رنگ‌آمیزی اختصاصی بافت سالم سلول‌های زمینه‌ای و مجرای غده‌ی پستان، بیان بالای ژن PTEN مشاهده شد (شکل ۱- D).



شکل ۱. مقطع عرضی ۴ میکرونی از بافت سرطانی غده‌ی پستان. رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمونوهیستوشیمی (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ×)
تصویر A. درجه‌ی ۱، تصویر B. درجه‌ی ۲ و تصویر C. درجه‌ی ۳ سلول‌های بدخیم را نشان می‌دهد که در آن‌ها بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها، ژن PTEN را بیان می‌کنند (نقاط قهوه‌ای رنگ). تصویر D. بافت سالم غده‌ی پستان را نشان می‌دهد.

بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بین کاهش بیان ژن PTEN و درجه‌ی تومور ارتباط معنی‌داری وجود دارد. بدین ترتیب بیان ژن PTEN در تومورهای توسعه یافته‌ی سرطان پستان که از نظر تهاجمی در درجه‌ی بالاتری قرار داشتند، کمتر بود. مطالعه‌ی Wikman و همکاران در زمینه‌ی سرطان پستان نشان داد که احتمال متاستاز سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر از جمله مغز در بیمارانی که ژن PTEN در آن‌ها بیان نشود، بیشتر است (۱۷). این یافته با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ی حاضر ۷۰ درصد از تومورهای بدخیم با بیان ژن PTEN و ۳۰ درصد فاقد بیان این ژن بودند. نمونه‌های منفی از نظر بیان ژن PTEN بیشتر در بیمارانی مشاهده شد که در مرحله‌ی بالاتر بیماری قرار داشتند.

گزارش Yang و همکاران در چین نشان داد که از ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان، ۲۴ مورد (۴۸ درصد) از بیماران فاقد بیان ژن PTEN بودند (۱۶). مطالعه‌ی حاضر با این تحقیق از دو جنبه تفاوت دارد: میزان بیان ژن PTEN و حجم نمونه؛ در مطالعه‌ی حاضر بیان ژن PTEN در ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان انجام شده است، در حالی که در تحقیق پیش‌گفته، بر روی ۵۰ نمونه‌ی بدخیمی انجام گرفته است. از طرفی، این احتمال نیز داده می‌شود که تفاوت در میزان بیان ژن PTEN مرتبط به عوامل جغرافیایی باشد.

در مطالعه‌ی Zhou و همکاران در زمینه‌ی سرطان خون، مشاهده شد که بیماران با بیان ژن PTEN، به داروی Doxorubicine حساس هستند؛ در حالی که بیماران فاقد بیان این ژن و یا با کاهش بیان این ژن، به داروی Doxorubicine مقاوم هستند (۱۸). مطالعه‌ی Zhou و همکاران نشان داد که عدم بیان ژن PTEN با مقامت دارویی همراه است. ذکر این نکته ضروری است که محصول ژن PTEN از طریق مهار MDM۲ (Mouse double minute ۲ homolog) و فعالیت چند ژن دیگر از جمله P۵۳، فرایند مرگ فیزیولوژی را فراهم می‌سازد؛ به طوری که با از دست رفتن بیان ژن PTEN در آپوپتوز سلول‌های بدخیم مقاومت ایجاد می‌شود (۱۸).

ژن PTEN از طریق یک نقش سیگنالی آنتاگونیستی فسفاتیدیل اینوزیتول، موجب مهار فعالیت MDM۲ می‌شود؛ در نتیجه پروتئین این ژن در سیتوپلاسم باقی می‌ماند و توسط آنزیم‌ها تجزیه می‌گردد. ژن MDM۲ یک انکوپروتئین است و موجب بی‌اثر کردن فعالیت ژن P۵۳ می‌شود؛ در حالی که ژن PTEN موجب حفظ عملکرد ژن P۵۳ می‌گردد. در نتیجه، بیان ژن PTEN موجب حساس شدن تومور به شیمی درمانی می‌شود (۲۰-۱۹).

مطالعه‌ی Zhang و همکاران در مورد سرطان پستان، نشان داد که از ۱۴۶ بیمار مبتلا به سرطان پستان، ۸۴ نمونه (۵۷/۵ درصد) با بیان ژن PTEN همراه بودند، در حالی که تمام نمونه‌های سالم با بیان ژن PTEN همراه بودند (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر نیز تمام نمونه‌های سالم با بیان ژن PTEN همراه بودند که از این نظر با مطالعه‌ی پیش‌گفته همخوانی دارد؛ اما در مورد میزان بیان ژن PTEN در نمونه‌های بدخیم در دو ناحیه‌ی متفاوت جغرافیایی، کمی تفاوت دارد (۷۰ درصد در مطالعه‌ی حاضر در مقابل ۵۷/۵ درصد).

مطالعات جدید نشان می‌دهد که مکانیسم‌های

مختلف ژنتیکی و غیر ژنتیکی از جمله عوامل اپی ژنتیکی در تنظیم و عملکرد ژن PTEN نقش دارند که بعضی از این عوامل، هنوز شناخته نشده‌اند و مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است (۲۲). توصیه می‌شود بیان ژن PTEN در سرطان پستان در چندین ناحیه‌ی جغرافیایی بررسی شود. آنالیزهای جامع از ژن PTEN نشان می‌دهد که ژن PTEN نه تنها یک مهار کننده‌ی تومور می‌باشد، بلکه در پیش‌آگهی سرطان پستان نیز نقش دارد (۲۳).

در مطالعه‌ی حاضر، بیان ژن PTEN در بیمارانی که در مرحله‌ی پیشرفت بیماری قرار داشتند (Stage IV)، منفی بود. احتمال داده می‌شود که سلول‌های بدخیمی که با عدم بیان ژن PTEN همراه باشند، به خاطر خارج شدن عوامل مهاری از چرخه‌ی تقسیم سلولی، سرعت تقسیم و افزایش تهاجم در سلول‌های بدخیم افزایش چشمگیری پیدا کند؛ به طوری که در مطالعه‌ی حاضر، میزان بیان ژن PTEN در تومورهای مهاجم مجرایی نسبت به تومورهای غیر مهاجم کمتر بود و این میزان از نظر آماری معنی‌دار بود. بنابراین احتمال می‌رود که یکی از دلایل افزایش تهاجم در تومور مهاجم مجرایی، عدم بیان ژن PTEN در این تومورها باشد.

مطالعه‌ی Jones و همکاران نشان می‌دهد که از دست رفتن کامل عملکردی پروتئین PTEN در تومورها، موجب افزایش قدرت تهاجمی می‌شود. همچنین به طور معنی‌داری رسپتورهای استروژن کاهش می‌یابند (۲۳). در مطالعه‌ی حاضر، میزان بیان ژن PTEN در تومورهای بدخیم پستان که در درجه‌ی بالاتر قرار داشتند، کمتر بود. این مطالعه با تحقیق Jones و همکاران (۲۳) همخوانی دارد. محصول ژن PTEN در تنظیم استرس‌های اکسیداتیو سلولی و مرگ سلولی (آپوپتوز) فعال می‌باشد (۲۵-۲۴) و مطالعات جدید دیگر نشان می‌دهند که برای ارزیابی بقا، می‌توان از ژن PTEN به عنوان یک نشانگر استفاده کرد (۲۶). از طرفی، محصول ژن PTEN روی بیان ژن‌های دیگر که در سرطان پستان برای پاسخ درمانی مهم هستند، تأثیر می‌گذارد. هر چند که بعضی از این اعمال ژن هنوز شناخته نشده است (۲۷).

در مطالعه‌ی Baig و همکاران در زمینه‌ی سرطان پستان، مشاهده شد که تغییرات ژنتیکی از جمله جهش در ژن PTEN (۲۹) که با سرطان پستان همراه می‌شود، با پیش‌آگهی بد همرا می‌گردد (۲۸). با توجه به این که سرطان پستان دومین سرطان کشنده در خانم‌ها می‌باشد و میانگین سن ابتلا به سرطان پستان در بعضی از نواحی رو به کاهش است، پیشنهاد می‌شود در کنار شاخص‌های پاتولوژی و بافتی، از عوامل پیش‌آگهی (نشانگرهای) جدید استفاده شود که بتواند وضعیت بیان ژن‌های مهار کننده یا تسریع کننده‌ی تومور را در سلول‌های بدخیم که در مرحله‌ی اولیه‌ی بیماری قرار دارند (به بافت‌های مجاور تجاوز نکرده‌اند) مشخص کند تا در فرایند درمانی و پیش‌آگهی به بیمار کمک کننده باشند.

در مطالعه‌ی حاضر، بیماران مبتلا به سرطان پستان که از نظر بیان پروتئین PTEN منفی بودند، در مرحله‌ی پیشرفت بیماری قرار داشتند. بنابراین می‌توان گفت که عدم بیان ژن PTEN در سرطان پستان، باعث تسریع رشد سلول‌های بدخیم می‌شود.

تشکر و قدردانی

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار به خاطر تصویب و تأمین هزینه‌های طرح، همچنین از

پاتولوژیست‌های محترم آقایان دکتر محمدرضا مهاجری و فرشاد معروضی و کارشناسان آزمایشگاه خانم‌ها لندرانی و محمودی به خاطر انجام بخشی از امور بافت‌شناسی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. Oncologist 2004; 9(6): 606-16.
2. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999; 8(10): 843-54.
3. Laurance J. Breast cancer cases rise 80% since Seventies. The independent Health & Wellbeing 2006; 9-29.
4. Lam WW, Fielding R, Ho EY. Predicting psychological morbidity in Chinese women after surgery for breast carcinoma. Cancer 2005; 103(3): 637-46.
5. Golmohammadi R, Pejhan A. The prognostic value of the P53 protein and the Ki67 marker in breast cancer patients. J Pak Med Assoc 2012; 62(9): 871-5.
6. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic Pathology. 8th ed. Cambridge, MA: Saunders; 2007.
7. Golmohammadi R, Namazi MJ, Nikbakht M, Salehi M, Derakhshan MH. Characterization and Prognostic Value of Mutations in Exons 5 and 6 of the p53 Gene in Patients with Colorectal Cancers in Central Iran. Gut Liver 2013; 7(3): 295-302.
8. Dastjerdi MN, Salahshoor MR, Mardani M, Rabbani M, Hashemibeni B, Gharagozloo M, et al. The apoptotic effects of sirtuin1 inhibitor on the MCF-7 and MRC-5 cell lines. Res Pharm Sci 2013; 8(2): 79-89.
9. de Assis LV, Isoldi MC. The function, mechanisms, and role of the genes PTEN and TP53 and the effects of asbestos in the development of malignant mesothelioma: a review focused on the genes' molecular mechanisms. Tumour Biol 2014; 35(2): 889-901.
10. Bogdanova N, Helbig S, Dork T. Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. Hered Cancer Clin Pract 2013; 11(1): 12.
11. Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. Cancer Cell 2003; 4(3): 209-21.
12. Wan W, Zou H, Sun R, Liu Y, Wang J, Ma D, et al. Investigate the role of PTEN in chemotaxis of human breast cancer cells. Cell Signal 2007; 19(11): 2227-36.
13. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. Ann Oncol 2009; 20(4): 648-54.
14. Boosani CS, Agrawal DK. PTEN modulators: a patent review. Expert Opin Ther Pat 2013; 23(5): 569-80.
15. Sakr RA, Barbashina V, Morrogh M, Chandarlapaty S, Andrade VP, Arroyo CD, et al. Protocol for PTEN expression by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human breast carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2010; 18(4): 371-4.
16. Yang J, Ren Y, Wang L, Li B, Chen Y, Zhao W, et al. PTEN mutation spectrum in breast cancers and breast hyperplasia. J Cancer Res Clin Oncol 2010; 136(9): 1303-11.
17. Wikman H, Lamszus K, Detels N, Uslar L, Wrage M, Benner C, et al. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients. Breast Cancer Res 2012; 14(2): R49.
18. Zhou M, Gu L, Findley HW, Jiang R, Woods WG. PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells. Cancer Res 2003; 63(19): 6357-62.
19. van den Broek AJ, Broeks A, Horlings HM, Canisius SV, Braaf LM, Langerod A, et al. Association of the germline TP53 R72P and MDM2 SNP309 variants with breast cancer survival in specific breast tumor subgroups. Breast Cancer Res Treat 2011; 130(2): 599-608.
20. Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. J Biol Chem 2002; 277(7): 5484-9.
21. Zhang HY, Liang F, Jia ZL, Song ST, Jiang ZF. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. Oncol Lett 2013; 6(1): 161-8.
22. Fata JE, Debnath S, Jenkins EC, Jr., Fournier MV. Nongenomic Mechanisms of PTEN

Regulation. Int J Cell Biol 2012; 2012: 379685.
23. Jones N, Bonnet F, Sfar S, Lafitte M, Lafon D, Sierankowski G, et al. Comprehensive analysis of PTEN status in breast carcinomas. Int J Cancer 2013; 133(2): 323-34.
24. Kitagishi Y, Matsuda S. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging (Review). Int J Mol Med 2013; 31(3): 511-5.
25. Li Y, He L, Zeng N, Sahu D, Cadenas E, Shearn C, et al. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) signaling regulates mitochondrial biogenesis and respiration via estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). J Biol Chem 2013; 288(35): 25007-24.
26. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. Nat Rev Mol Cell Biol 2012; 13(5): 283-96.
27. Henle SJ, Carlstrom LP, Cheever TR, Henley JR. Differential role of PTEN phosphatase in chemotactic growth cone guidance. J Biol Chem 2013; 288(29): 20837-42.
28. Baig RM, Mahjabeen I, Sabir M, Masood N, Hafeez S, Malik FA, et al. Genetic changes in the PTEN gene and their association with breast cancer in Pakistan. Asian Pac J Cancer Prev 2011; 12(10): 2773-8.

Journal of Isfahan Medical School Received: 28.02.2014

Vol. 32, No. 282, 3rd Week, June 2014 Accepted: 23.04.2014

Immunohistochemical Evaluation of the Relationship of PTEN Gene Expression and Pathological Parameters in Patients with Breast Cancer

Rahim Golmohammadi PhD[1], Mohammad-Shafi Mojadadi PhD[2], Akbar Pejhan PhD[3], Mehadi Nikbakht-Dastjerdi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Genetic damages and epigenetic factors are important in invasive breast cancer. PTEN gene is one of the most important tumor suppressor genes. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein can be traced by immunohistochemistry methods. The purpose of this study was to determine the relationship of PTEN gene expression and pathological parameters in patients with breast cancer.

Methods: This descriptive analytical research was conducted on 100 cases with breast cancer admitted to a hospital in Sabzevar, Iran, during 2010-13. Samples were fixed in formalin; tissue processing and taking sections was done. Then, the slides were stained by hematoxylin and eosin. Malignancy was diagnosed by two pathologists blindly. Expression of PTEN gene was evaluated after antigen retrieval with primary specific rabbit monoclonal PTEN antibody using by immunohistochemical method. Photos were taken by light microscope. Data were analyzed using chi-square and Fisher's exact tests.

Findings: In 70 (70%) specimens, PTEN protein was detected. Protein stability was observed in total normal samples. No significant relationship was observed between the stage and grade of tumor, but there was significant relationship between PTEN gene expression and tumor grade and stage ($P < 0.05$). Over-expression of PTEN gene was lower in invasive ductal carcinoma compared to non-invasive breast cancers.

Conclusion: Our study showed that PTEN gene expression is low in patients with high-grade breast tumors. Therefore, we may conclude that low expression of PTEN gene is accompanied with bad prognosis in patients with breast cancer.

Keywords: Breast cancer, Immunohistochemistry, Over-expression of PTEN gene

Citation: Golmohammadi R, Mojadadi MSh, Pejhan A, Nikbakht-Dastjerdi M. **Immunohistochemical Evaluation of the Relationship of PTEN Gene Expression and Pathological Parameters in Patients with Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(282): 514-23

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
3- Associate Professor, Department of Physiological Sciences, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
4- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Rahim Golmohammadi PhD, Email: rahimgolmohammadi@yahoo.com