

## بررسی بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در شهر اصفهان توسط روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر مهدی نیکبخت دستجردی<sup>۱</sup>

### چکیده

**مقدمه:** ژن TSLC1 (Tumor suppressor in lung cancer 1)، یک مهارکننده تومور است. برای بررسی ارتباط بروز TSLC1 و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، بروز این پروتئین را در بافت‌های سرطانی کولورکتال و بافت‌های سالم مجاور آن بررسی نمودیم.

**روش‌ها:** بروز TSLC1 در ۱۰۰ نمونه‌ی سرطان کولورکتال که پیش از آن از آن‌ها بلوک پارافینی تهیه شده بود و ۱۰۰ نمونه‌ی بافت سالم مجاور همان نمونه‌های توموری با روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط بین بروز پروتئین با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژی بررسی شد. سن، جنس و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژی مورد توجه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** TSLC1 در تمام بافت‌ها بروز پیدا کرده بود. از بین نمونه‌های سرطانی ۷۱ درصد کاهش بروز پروتئین TSLC1 را نسبت به بافت سالم مجاور نشان دادند. بروز پروتئین TSLC1 با مرحله‌ی سرطان، متاستاز به غدد لنفاوی و محل تومور ارتباط معنی‌داری داشت.

**نتیجه‌گیری:** بروز پروتئین TSLC1 ممکن است یک مارکر بیولوژیک مطلوب باشد و به عنوان یک عامل پیش‌آگهی دهنده مفید برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال محسوب شود.

**واژگان کلیدی:** TSLC1، سرطان کولورکتال، ژن مهارکننده تومور، ایمونوهیستوشیمی

### مقدمه

سیتوپلاسمی و غشایی می‌باشد. حوزه‌ی سیتوپلاسمی آن دارای یک Protein 4.1-binding motif و یک PDZ-binding motif می‌باشد که هر دو دارای وظایف مهمی در عملکرد TSLC1 هستند (۳).

موتاسیون‌های غیر فعال‌کننده‌ی TSLC1 نادر است، در حالی که LOH در محل استقرار این ژن (11q23.2) شایع می‌باشد؛ به طوری که در ۴۲ درصد از سرطان‌های ریه، ۳۳ درصد از سرطان‌های کبد و ۱۷ درصد از سرطان‌های پانکراس یافت شده است. همچنین Hypermethylation ناحیه‌ی پروموتور TSLC1 در حدود ۴۰ درصد از سرطان‌های ریه، ۱۵ تا ۳۰ درصد از سرطان‌های کبد، معده، پانکراس، سینه، نازوفارنکس و پروستات و نیز ۳۵ تا ۶۰ درصد از

ژن جدید (Tumor suppressor in lung cancer 1) TSLC1 که نام دیگر آن IGSF4 می‌باشد، یک مهارکننده‌ی تومور با عملکردهای متعددی در تنظیم تهاجم سلولی است. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱۱ (11q23.2) قرار دارد، ناحیه‌ای که اغلب در سرطان‌های مختلف دچار LOH (Loss of heterozygosity) می‌شود (۱-۲).

ژن TSLC1 یک گلیکوپروتئین 75 KDa را کد می‌نماید که مشابهت زیادی با مولکول‌های چسباننده‌ی سلولی مثل NCAM-1 و NCAM-2 دارد. گلیکوپروتئین TSLC1 در ضخامت غشای سلولی قرار دارد و شامل سه حوزه‌ی (Domain) خارج سلولی،

<sup>۱</sup> دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهدی نیکبخت دستجردی

Email: nikbakht@med.mui.ac.ir

سرطان‌های گردن رحم مشاهده شده است (۴). در حالی که در مورد درگیری ژن TSLC1 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال گزارش‌های کمی ارائه شده است (۵). اگر چه عملکرد TSLC1 هنوز به طور کامل مشخص نشده است، ولی مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان داده است که این پروتئین نه تنها القاکننده‌ی آپوپتوز می‌باشد بلکه در تنظیم چسبندگی بین سلولی و حرکت سلولی نقش ایفا می‌نماید (۶).

کاهش بیان TSLC1 در مرحله‌ی پیشرفته‌ی سرطان ریه همراه با پیش‌آگهی ضعیف این تومور گزارش شده است؛ به طوری که با کاهش بیان TSLC1 میزان مرگ و میر در این نوع تومور افزایش می‌یابد. مشاهدات دیگر نیز نشان داده است که میزان بیان TSLC1 با قدرت تهاجمی تومور مرتبط می‌باشد؛ به طوری که با کاهش بیان این پروتئین، قدرت تهاجمی تومور افزایش می‌یابد و به نواحی دیگر متاستاز می‌دهد (۴). در ۸۳ درصد موارد ارتباط سرطان نازوفارنکس و متاستاز به غدد لنفاوی با کاهش بیان و یا فقدان بیان TSLC1 گزارش شده است (۷).

از طرف دیگر، در سرطان معده میزان Hypermethylation ژن‌های مهارکننده‌ی تومور از جمله ژن TSLC1 که باعث کاهش بروز TSLC1 می‌گردد با افزایش سن افزایش می‌یابد (۸). همچنین در سرطان ریه فقدان بروز TSLC1 در مردان مبتلا به این نوع سرطان بیشتر از زنان مبتلا دیده شده است (۴). به علاوه، در این نوع سرطان احتمال عود بیشتر و نیاز به استفاده از روش‌های درمانی اضافی جهت کنترل بیماری در بیمارانی که میزان بروز پروتئین در آن‌ها پایین تر می‌باشد، دیده شده است (۹).

Cell adhesion molecules در عملکردهای متقابل

بین سلولی و عملکردهای متقابل سلول با ماتریکس خارج سلولی نقش ایفا می‌نمایند. مدارک متعددی نشان می‌دهند که بروز تغییرات در ویژگی‌های چسبندگی سلول‌های سرطانی دارای نقشی محوری در ایجاد، پیشرفت و متاستاز سرطان است. فقدان چسبندگی بین سلولی و جدا شدن سلول‌ها از غشای قاعده‌ای زیرین، به سلول‌های سرطانی امکان می‌دهد تا از ناحیه‌ی اولیه‌ی خود رها شده، ماتریکس خارج سلولی را تخریب نمایند و در نهایت یک فنوتیپ تهاجمی کسب کنند و به بافت‌های اطراف خود متاستاز دهند. ژن TSLC1 جزئی از 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 و باعث بروز فنوتیپ بدخیم و متاستاز گردد (۶).

با توجه به این که سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌های بدخیم در اصفهان می‌باشد و مهم‌ترین فاکتور تعیین‌کننده‌ی پیش‌آگهی در این سرطان، حضور و توسعه‌ی متاستاز است؛ بنابراین تعیین بروز ژن TSLC1 به عنوان یکی از اجزای Cell adhesion molecules می‌تواند نقش مهمی در تعیین پیش‌آگهی داشته باشد. همچنین تعیین میزان بروز این پروتئین در غربال‌گری بیمارانی که احتمال عود بیماری در آن‌ها بیشتر است، به منظور کاربرد روش‌های درمانی اضافی اهمیت دارد.

### روش‌ها

مواد و وسایلی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. مواد و وسایل مورد استفاده

نام دستگاه و یا مواد شرکت سازنده یا فروشنده کشور سازنده		
گزیلن	MERCK	آلمان
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MERCK	آلمان
سیترات سدیم	MERCK	آلمان
DAB	SIGMA	آلمان
GOAT SERUM	MERCK	آلمان
اتانول ۹۹	MERCK	آلمان
اتانول مطلق	MERCK	آلمان
هماتوکسیلین	SIGMA	آلمان
انوزین	MERCK	آلمان
پارافین	MERCK	آلمان
Boric acid	MERCK	آلمان
EDTA	MERCK	آلمان
Tris	MERCK	آلمان
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MERCK	آلمان
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK	آلمان
مونوکلونال آنتی بادی	SIGMA	آلمان
کیت Detection	SIGMA	آلمان
Superblock	SIGMA	آلمان
ایتلان	SIGMA	آلمان
لامل	SIGMA	آلمان
لام	SIGMA	آلمان

الف) آماده سازی بافت (Tissue processing):

- ۱) پارافین زدایی از نمونه های موجود در بلوک های پارافینی
- ۲) آب گیری نمونه ها توسط اتانول های صعودی (۷۰، ۹۵ و ۹۹ درصد)
- ۳) شفاف سازی نمونه ها توسط گزیلن
- ۴) قالب گیری مجدد نمونه ها به وسیله پارافین ب) برش گیری:
  - برش های بافتی به ضخامت ۳-۴ میکرون تهیه شد.
  - ج) رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی:
    - ۱) پارافین زدایی توسط غوطه ور سازی نمونه ها در گزیلن
    - ۲) آب دهی توسط اتانول های نزولی (۹۹، ۹۵ و ۷۰ درصد)
    - ۳) Antigen retrieval که به مدت بیست دقیقه در دمای ۹۸ درجه ی سانتی گراد در بافر ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم در یک اون میکروویو انجام گرفت.
    - ۴) توسط آنزیم تریپسین (۱:۱۵۰) عمل هضم به مدت ۱۰ دقیقه برای TSLC1 انجام شد.
    - ۵) در مرحله ی بعد به منظور توقف فعالیت Endogenous peroxide برش ها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۳ درصد انکوبه گردید.
    - ۶) سه مرتبه شستشو در PBS (Phosphate buffered saline)
    - ۷) به منظور مهار اتصال Ig غیر اختصاصی برش ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول PBS محتوی BSA (Bovine serum albumin) ۲ درصد انکوبه شد.
    - ۸) نمونه ها با آنتی بادی اولیه ( Rabbit polyclonal anti-TSLC1) با رقت ۱:۱۵۰۰ به مدت یک شب در درجه ی حرارت ۴ درجه ی سانتی گراد انکوبه گردید.

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه ی سرطان کولورکتال که پیش از آن از آن ها بلوک پارافینی تهیه شده بود، به عنوان گروه آزمایش و ۱۰۰ نمونه ی بافت سالم مجاور همان نمونه های توموری به عنوان گروه شاهد استفاده شد. نمونه های سرطانی کولورکتال (صرف نظر از فامیلی بودن یا نبودن آن ها) وارد مطالعه شدند. انواع خوش خیم تومور یا پولیپ های ناحیه ی کولون، بیماری التهابی روده (Inflammatory bowel disease یا IBD) و Hamartoma از مطالعه خارج شدند. پس از تأیید تشخیص پاتولوژی مراحل زیر جهت تهیه ی لام ایمونوهیستوشیمی به ترتیب انجام گرفت:

درصد (نمره ۳)

۲) درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده بین ۵۰-۱۶ درصد (نمره ۲)

۳) درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده بین ۱۵-۱ درصد (نمره ۱).

پس از آن نمرات مربوط به شدت رنگ‌آمیزی و درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در همدیگر ضرب شد و نمره‌ی نهایی هر بافت مشخص گردید و بر این اساس نمونه‌های سرطانی به سه گروه تقسیم شدند:

۱) گروه ++ که میزان بروز پروتئین در آن مشابه بافت سالم مجاور بود (نمرات به دست آمده در بافت سرطانی بین ۶ تا ۸ بود).

۲) گروه + که میزان بروز پروتئین در آن نسبت به بافت سالم مجاور کاسته شده بود (نمرات به دست آمده در بافت سرطانی بین ۳ تا ۵ بود).

۳) گروه - که رنگ‌آمیزی قابل ردیابی نداشت (نمرات به دست آمده در بافت سرطانی کمتر از ۳ بود).

اطلاعات به دست آمده از طریق نرم‌افزار SPSS، (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه‌ی بین نمونه‌های توموری و سالم و نیز ارتباط بین بروز پروتئین با نوع، محل و مرحله‌ی تومور و ارتباط بین بروز پروتئین با سن و جنس بیمار از طریق آزمون  $\chi^2$  مشخص گردید. در صورت فراهم نبودن شرایط آزمون  $\chi^2$  از آزمون Fisher's exact استفاده شد. مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

#### یافته‌ها

خصوصیات کلینیکوپاتولوژی نمونه‌های فوق که شامل سن، جنس، محل، مرحله و نوع تومور می‌باشد در

۹) آغشته‌سازی ملایم نمونه‌ها با HCL ۵ صدم مولار

۱۰) نمونه‌ها با آنتی‌بادی ثانویه (Biotinylated goat anti rabbit Ig G) به مدت ۳۰ دقیقه در درجه‌ی حرارت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

۱۱) نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در Straptavidin-bioti peroxidase انکوبه گردید.

۱۲) واکنش کرو موژنیک توسط Diaminobenzidine انجام شد.

۱۳) رنگ‌آمیزی مخالف نیز با Hematoxilin انجام گردید.

۱۴) در نهایت نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

۱۵) در گروه‌های کنترل منفی از PBS به جای آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده شد.

د) بررسی میکروسکوپی مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی:

هر یک از لام‌های نشان‌دار شده با آنتی‌بادی در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی  $10 \times 400$  فیلد مختلف برای شمارش ۱۰۰ سلول در هر فیلد مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق شدت رنگ‌آمیزی سلول‌های بافت توموری و بافت سالم مجاور، سلول‌ها به سه گروه تقسیم بندی شد:

۱) سلول‌های با بیشترین شدت رنگ‌آمیزی (نمره ۲)

۲) سلول‌های با شدت رنگ‌آمیزی کمتر (نمره ۱)

۳) سلول‌های رنگ‌آمیزی نشده (نمره ۰)

بر اساس درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در بافت توموری و بافت سالم مجاور نیز سلول‌ها به سه گروه تقسیم‌بندی شد:

۱) درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده بین ۱۰۰-۵۱

جدول ۲ ثبت شده است.

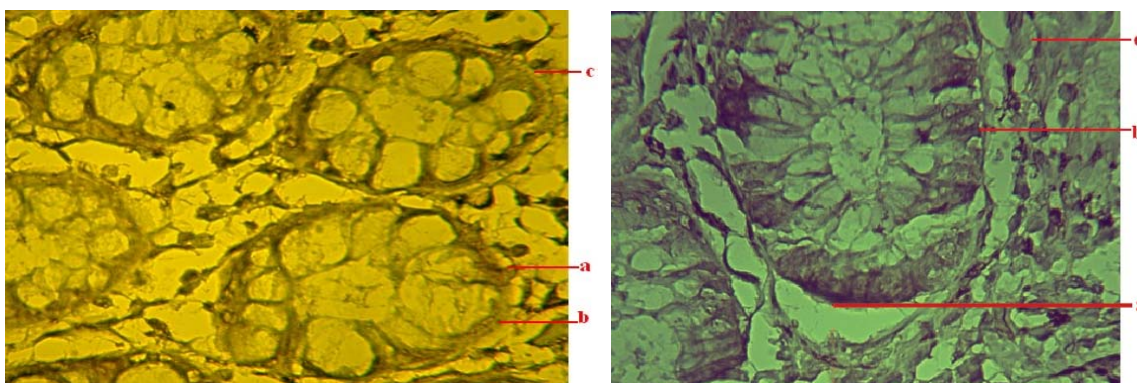
جدول ۲. نتایج کلینیکوپاتولوژی ۱۰۰ نمونه مبتلا به آدنوکارسینومای کولورکتال

تعداد	نمونه‌های سرطانی	
۶۰	مرد	جنس
۴۰	زن	
۵۸	$\geq 60$	سن
۴۲	$\leq 59$	
۱۰	آدنوکارسینومای موسینی	نوع تومور
۹۰	آدنوکارسینومای غیر موسینی	
۹۲	A-B	Dukes Stage
۸	C-D	
۴۳	۱	Grade
۳۸	۲	
۹	۳	
۶۹	کولون (پروگزیمال)	محل تومور
۳۱	رکتوسیگموئید (دیستال)	
۳۱	دارد	متاستاز به غدد
۶۹	ندارد	لنفوی

زنان مبتلا به این نوع سرطان  $14/65 \pm 63/15$  سال بود. در این مطالعه نمونه‌ها به روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد پروتئین و رنگ‌آمیزی DAB مورد بررسی قرار گرفت. روش ایمونوهیستوشیمی در همگی این نمونه‌ها به طور موفقیت‌آمیز انجام گرفت. بروز پروتئین TSLC1 به طور عمده سیتوپلاسمی بود. در کلیه نمونه‌ها اعم از سرطانی و سالم سه دسته سلول قابل مشاهده بود: دسته‌ی اول شامل سلول‌هایی بود که به شدت رنگ قهوه‌ای گرفته بود، دسته‌ی دوم شامل سلول‌هایی بود که شدت رنگ‌آمیزی در آن‌ها کمتر بود و دسته‌ی سوم سلول‌هایی بود که رنگ قهوه‌ای نگرفته بود (شکل ۱).

بر اساس درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده و نیز شدت رنگ‌آمیزی هر بافت، نمره‌ی نهایی آن‌ها تعیین گردید. نمره‌ی نهایی بافت‌های سالم بین ۶ تا ۸ قرار گرفت. در مورد پروتئین TSLC1 از بین ۱۰۰ نمونه‌ی سرطانی مورد مطالعه در ۲۹ نمونه بروز پروتئین مشابه بافت سالم مجاور تومور (گروه ++ ) بود؛ یعنی نمرات به دست آمده در بافت سرطانی بین ۶ تا ۸ قرار

در نمونه‌های مورد مطالعه، متوسط سن مردان مبتلا به سرطان کولورکتال  $28/13 \pm 66/17$  و متوسط سن



شکل ۱. بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌های بافت سرطانی و بافت سالم مجاور تومور

در کلیه نمونه‌ها اعم از سرطانی و سالم سه دسته سلول قابل مشاهده است: دسته‌ی اول شامل سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها به شدت رنگ قهوه‌ای گرفته است (a)، دسته‌ی دوم شامل سلول‌هایی که شدت رنگ‌آمیزی هسته در آن‌ها کمتر است (b) و دسته‌ی سوم سلول‌هایی که هسته‌ی آن‌ها رنگ قهوه‌ای نگرفته است (c).  
بزرگ‌نمایی  $\times 400$

1-B: بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌ی سالم مجاور تومور

1-A: بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌ی سرطانی

و. یکی از نمونه‌ها نیز در مرحله‌ی D بود. اختلاف بروز پروتئین بین نمونه‌ها در مراحل A و B و نیز نمونه‌های در مراحل D و C معنی‌دار بود ( $P = 0/05$ ) (جدول ۴).

جدول ۴. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌های سرطانی با مرحله‌ی تومور

مقدار P	مرحله‌ی تومور				بروز پروتئین TSLC1
	A (درصد)	B (درصد)	C (درصد)	D (درصد)	
	۲۱ (۳۷/۵)	۱۲ (۳۳/۳)	۰ (۰)	۰ (۰)	++
	۳۳ (۵۸/۹)	۲۲ (۶۱/۱)	۴ (۵۷/۱)	۱ (۱۰۰)	+
۰/۰۵	۲ (۳/۶)	۲ (۵/۶)	۳ (۴۲/۹)	۰ (۰)	-
	۵۶	۳۶	۷	۱	جمع کل

محل تومور در ۶۹ نمونه در ناحیه‌ی کولون (پروگزیمال) و در ۳۱ نمونه در ناحیه‌ی رکتوم و سیگموئید (دیستال) بود. جدول ۵ فراوانی بروز پروتئین را بر اساس محل تومور نشان داده است.

جدول ۵. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 در نمونه‌های سرطانی با محل تومور

مقدار P	محل تومور		بروز پروتئین TSLC1
	رکتوسیکموئید (دیستال) (درصد) تعداد	کولون (پروگزیمال) (درصد) تعداد	
	۴ (۱۲/۹)	۲۵ (۳۶/۲)	++
	۲۱ (۶۷/۷)	۴۲ (۶۰/۹)	+
< ۰/۰۱۷	۶ (۱۹/۴)	۲ (۲/۹)	-
	۳۱	۶۹	جمع کل

همان‌طور که در جدول دیده می‌شود اختلاف بروز پروتئین بین تومورهای این دو ناحیه معنی‌دار بود ( $P < 0/017$ ).

جدول ۶ فراوانی بروز پروتئین را به تفکیک جنس نشان می‌دهد.

داشت. بروز پروتئین در ۶۳ نمونه نسبت به بافت سالم مجاور تومور کاهش یافته بود (گروه +)، یعنی نمرات به دست آمده در بافت سرطانی بین ۳ تا ۵ بود. در تعداد ۸ نمونه نیز بروز پروتئین در بافت تومور نسبت به بافت سالم کاهش چشمگیر داشت (گروه -)؛ به طوری که نمرات به دست آمده در بافت سرطانی کمتر از ۳ بود. به طور کلی از بین نمونه‌های سرطانی ۷۱ نمونه (۷۱ درصد) به طور متوسط و شدید کاهش بروز پروتئین TSLC1 را نسبت به بافت سالم مجاور نشان دادند.

از ۱۰۰ نمونه‌ی مورد مطالعه، تعداد ۱۰ نمونه از نوع آدنوکاسینوما موسینی و بقیه‌ی نمونه‌ها از نوع آدنوکاسینوما غیر موسینی بودند. در مورد بروز پروتئین TSLC1 از بین نمونه‌های آدنوکاسینوما غیر موسینی، تعداد ۷ نمونه در گروه (-)، تعداد ۲۶ نمونه در گروه (++) و تعداد ۵۷ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. از بین نمونه‌های آدنوکاسینوما موسینی نیز تعداد ۱ نمونه در گروه (-)، تعداد ۳ نمونه در گروه (++) و تعداد ۶ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. اختلاف بروز پروتئین TSLC1 بین این دو نوع تومور معنی‌دار نبود ( $P = 1$ ) (جدول ۳).

جدول ۳. بروز پروتئین TSLC1 در آدنوکاسینوما موسینی

مقدار P	آدنوکاسینوما غیر موسینی		بروز پروتئین TSLC1
	موسینی (درصد) تعداد	آدنوکاسینوما غیر موسینی (درصد) تعداد	
	۲۶ (۲۸/۹)	۳ (۳۰)	++
	۵۷ (۶۳/۳)	۶ (۶۰)	+
۱	۷ (۷/۸)	۱ (۱۰)	-

۵۶ نمونه در مرحله‌ی A، ۳۶ نمونه B، ۷ نمونه C

جدول ۹. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 با متاستاز به غدد لنفاوی

مقدار P	متاستاز به غدد لنفاوی		بروز پروتئین TSLC1
	بدون متاستاز (درصد) تعداد	با متاستاز (درصد) تعداد	
	۲۸ (۴۰/۶)	۳ (۹/۷)	++
	۳۸ (۵۵/۱)	۲۳ (۷۴/۲)	+
< ۰/۰۰۲	۳ (۴/۳)	۵ (۱۶/۱)	-
	۶۹	۳۱	جمع کل

بروز پروتئین TSLC1 بر اساس وجود متاستاز به غدد لنفاوی در جدول ۹ نشان داده شده است.

همان گونه که در جدول مشاهده می شود اختلاف بروز پروتئین بین تومورها بر اساس متاستاز به غدد لنفاوی معنی دار بود ( $P < ۰/۰۰۲$ ).

### بحث

در سرطان های کولورکتال تعدادی از ژن های مهارکننده ی تومور دچار تغییر می شوند که یکی از آن ها ژن TSLC1 است. TSLC1 که تحت نام های IGSF4, CADM1, necl-2, RA175, sglGSF و synCAM1 نیز شناخته می شود، بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ی ۱۱ (11q23.2) واقع است و به عنوان یک ژن مهار کننده ی تومور ابتدا در سرطان ریه شناسایی شد. TSLC1 می تواند رشد تومور را از طریق فعالیت ضد تزایدی و پروآپوپتوتیک مهار نماید. فقدان فعالیت TSLC1 می تواند منجر به متاستاز سلول های سرطانی شود (۱۰، ۲).

Mao و همکاران نشان دادند که بخش های FERM-binding و PDZ-interacting در ناحیه ی سیتوپلاسمی، برای عملکرد مهارتی این ژن اهمیت حیاتی دارند (۱۱). نتایج ایمونوهیستوشیمی ما نشان داد که TSLC1 هم در غشای سلولی و هم در

جدول ۶. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 در نمونه های سرطانی با

مقدار P	جنس بیمار		بروز پروتئین TSLC1
	زنان (درصد) تعداد	مردان (درصد) تعداد	
	۱۱ (۲۷/۵)	۱۸ (۳۰)	++
	۲۷ (۶۷/۵)	۳۶ (۶۰)	+
۰/۷۸۷	۲ (۵)	۶ (۱۰)	-
	۴۰	۶۰	جمع کل

نتایج ارتباط بروز پروتئین با سن بیمار نیز در جدول ۷ نشان داده شده است.

جدول ۷. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 در نمونه های سرطانی با

مقدار P	سن بیمار		بروز پروتئین TSLC1
	بیشتر از ۶۰ سال (درصد) تعداد	کمتر از ۵۹ سال (درصد) تعداد	
	۱۷ (۲۹/۳)	۱۲ (۲۸/۶)	++
	۳۷ (۶۳/۸)	۲۶ (۶۱/۹)	+
۰/۹۳۶	۴ (۶/۹)	۴ (۹/۵)	-
	۵۸	۴۲	جمع کل

همان گونه که در جدول مشاهده می شود بین بروز پروتئین و سن بیماران ارتباط معنی داری وجود نداشت. نتایج نشان داد که بین بروز پروتئین با Grade تومور در نمونه های آدنوکارسینوما ی غیر موسینی ارتباط معنی داری وجود داشت (جدول ۸).

جدول ۸. ارتباط بروز پروتئین TSLC1 در نمونه های سرطانی با

مقدار P	Grade تومور			بروز پروتئین TSLC1
	۱ (درصد) تعداد	۲ (درصد) تعداد	۳ (درصد) تعداد	
	۱۶ (۳۷/۲)	۴ (۱۰/۵)	۲ (۲۲/۲)	++
	۲۶ (۶۰/۵)	۳۱ (۸۱/۶)	۳ (۳۳/۳)	+
< ۰/۰۰۲	۱ (۲/۳)	۳ (۷/۹)	۴ (۴۴/۴)	-
	۵۴	۳۴	۹	جمع کل

پیش‌آگهی ضعیف‌تری را برای بیمار ارائه نماید. بنابراین TSLC1 می‌تواند در یکی از مسیرهای عمده‌ی رشد تومور در سرطان کولورکتال انسانی نقش ایفا کند.

در مطالعات مربوط به ژن‌های مهارکننده با توجه به این که این ژن‌ها اغلب در آپوپتوز سلولی ناشی از نقص DNA فعال هستند و سلول‌های معیوب را از چرخه‌ی سلولی خارج می‌نمایند، عواملی که بیان این ژن‌ها را کاهش می‌دهند می‌توانند باعث پیشرفت تومور از مراحل و درجات اولیه به مراحل و درجات پیشرفته شوند و بدین ترتیب می‌توانند به عنوان یک مارکر برای تعیین پیش‌آگهی مد نظر باشند و بنابراین در تومورهای با درجه‌ی بدخیمی بیشتر انتظار می‌رود که کاهش بیان پروتئین بیشتر باشد. در این مطالعه نیز کاهش بروز پروتئین در نمونه‌های با مرحله و درجه‌ی پیشرفته و تومورهای دارای متاستاز به غدد لنفاوی بیشتر مشاهده شده است.

کاهش بروز TSLC1 در سرطان اولیه‌ی کبد، پانکراس، پروستات و پستان و در رده‌های سلولی سرطانی دیگر مشتق از سرطان‌های مری، معده، کولون، تخمدان و آندومتر هم دیده شده است که نشان می‌دهد که کاهش بروز این پروتئین در دیگر سرطان‌های انسانی نیز دخیل است (۲۱-۱۷).

همچنین گزارش شده است که کاهش بروز TSLC1 با جنس بیماران مبتلا به کارسینومای ریه مرتبط می‌باشد به طوری که مردان بیش از زنان دچار کاهش بروز شده‌اند. به علاوه پیش‌آگهی کاهش بروز در دو جنس متفاوت گزارش شده است (۴). در حالی که در مطالعه‌ی ما ارتباط معنی‌داری بین دو جنس در کاهش بروز TSLC1 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال مشاهده نشد. تفاوت مطالعه‌ی ما با این مطالعه

سیتوپلاسم بروز می‌نماید. یکی از دلایل احتمالی موقعیت سیتوپلاسمی TSLC1 این است که این پروتئین علاوه بر غشای سلولی در دستگاه گلژی و رتیкулوم اندوپلاسمیک نیز وجود دارد.

Kitamura و همکاران گزارش کردند که TSLC1 نه تنها در سیتوپلاسم بلکه همچنین در سطح سلول‌های آدنوکارسینومای ریه توزیع شده است (۱۲). با بررسی سطوح بیان TSLC1 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال ما دریافتیم که در ۷۱ درصد از نمونه‌های سرطانی بروز این پروتئین دچار کاهش شدید یا متوسط می‌گردد.

مطالعات نشان داده است که Methylation پروموتور TSLC1 در رده‌های سلولی و نمونه‌های سرطانی اولیه‌ی مختلف وجود دارد. نشان داده شده است که درمان با 5-aza-dc می‌تواند بیان TSLC1 را در سلول‌های سرطانی افزایش دهد که ثابت می‌کند که متیلشن پروموتور در خاموش شدن ژن TSLC1 در سرطان کولورکتال مؤثر است (۱۶-۱۳). ما وضعیت متیلشن نواحی CPG را در پروموتور TSLC1 بررسی نکردیم و لازم است در مطالعات آتی بدان توجه شود. با تعیین سطوح بروز TSLC1 در کارسینومای اولیه‌ی کولورکتال، مشابه مطالعات گذشته در نمونه‌های سرطانی ریه و مری (۱۶، ۱۰) ما نشان دادیم که کاهش سطح بروز TSLC1 در تومورهای با مرحله و درجه‌ی پیشرفته و نمونه‌های دارای متاستاز به غدد لنفاوی دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر نمونه‌ها می‌باشد که نمایانگر آن است که با توجه به آن که TSLC1 می‌تواند رشد و تهاجم تومور را مهار نماید، کاهش سطح بروز آن ممکن است درجه‌ی بدخیمی را در کارسینومای کولورکتال افزایش دهد و



باشد. یک مکانیسم عبارت است از ناپایداری کروموزومی که مربوط به سرطان‌های ناحیه‌ی دیستال کولون می‌باشد و مکانیسم دیگر ناپایداری میکروساتلیت است که در سرطان‌زایی ناحیه پروگزیمال کولون نقش ایفا می‌نماید.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما دریافتیم که کاهش سطح بروز پروتئین TSLC1 در تومورهای با مرحله‌ی پیشرفته و نمونه‌های دارای متاستاز به غدد لنفاوی دارای اختلاف معنی داری نسبت به سایر نمونه‌ها می‌باشد که نمایانگر آن است که کاهش سطح بروز این پروتئین ممکن است درجه‌ی بدخیمی را در کارسینومای کولورکتال افزایش دهد و پیش‌آگهی ضعیف‌تری را برای بیمار ارائه نماید. این مشاهدات نشان می‌دهد که با ارزیابی بروز این پروتئین در نمونه‌های سرطانی کولورکتال می‌توان اطلاعات ارزشمندی را در ارتباط با پیش‌آگهی بیماران به دست آورد و در جهت بهبود استراتژی‌های درمانی مورد استفاده قرار داد.

می‌تواند مربوط به نوع تومورهای مورد مطالعه باشد. کاهش سطح بروز پروتئین TSLC1 در تومورهای ناحیه‌ی رکتوسیگموئید دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به تومورهای ناحیه‌ی کولون بود به طوری که کاهش بیان این پروتئین‌ها به طور عمده در نمونه‌های سرطانی ناحیه‌ی دیستال دیده شد. در مورد کاهش بروز این پروتئین در نواحی مختلف روده‌ی بزرگ تاکنون گزارشی ارائه نشده است، ولی در مورد سایر پروتئین‌های مهارکننده‌ی تومور مثل پروتئین PTEN مطالعات متعددی انجام گرفته است. مشابه با نتایج ما، Rychahou و همکاران (۲۲) و همچنین Colakoglu و همکاران (۲۳)، به تازگی کاهش بیان پروتئین PTEN را در نمونه‌های سرطانی ناحیه‌ی دیستال یافتند. در حالی که بر خلاف یافته‌های ما، Jang و همکاران کاهش بروز پروتئین PTEN را به طور عمده در تومورهای ناحیه‌ی کولون (پروگزیمال) یافتند (۲۴). این یافته‌ها ممکن است با مکانیسم‌های ژنتیکی مختلفی که در سرطان‌زایی نوع اسپورادیک نواحی پروگزیمال و دیستال کولورکتال دخالت دارد مرتبط

### References

1. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2001; 27(4): 427-30.
2. Murakami Y, Nobukuni T, Tamura K, Maruyama T, Sekiya T, Arai Y, et al. Localization of tumor suppressor activity important in nonsmall cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14): 8153-8.
3. Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, et al. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 2002; 277(34): 31014-9.
4. Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, et al. Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance. *Cancer Sci* 2005; 96(8): 480-6.
5. Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, et al. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003; 107(1): 53-9.
6. Heller G, Geradts J, Ziegler B, Newsham I, Filipits M, Markis-Ritzinger EM, et al. Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 103(3): 283-91.
7. Lung HL, Cheung AK, Xie D, Cheng Y, Kwong FM, Murakami Y, et al. TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9385-92.

8. Matsubayashi H, Sato N, Brune K, Blackford AL, Hruban RH, Canto M, et al. Age- and disease-related methylation of multiple genes in nonneoplastic duodenum and in duodenal juice. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1): 573-83.
9. 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.
10. Murakami Y, Nobukuni T, Tamura K, Maruyama T, Sekiya T, Arai Y, et al. Localization of tumor suppressor activity important in nonsmall cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14): 8153-8.
11. Mao X, Seidlitz E, Truant R, Hitt M, Ghosh HP. Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene* 2004; 23(33): 5632-42.
12. Kitamura Y, Kurosawa G, Tanaka M, Sumitomo M, Muramatsu C, Eguchi K, et al. Frequent overexpression of CADM1/IGSF4 in lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383(4): 480-4.
13. Borinstein SC, Conerly M, Dzieciatkowski S, Biswas S, Washington MK, Trobridge P, et al. Aberrant DNA methylation occurs in colon neoplasms arising in the azoxymethane colon cancer model. *Mol Carcinog* 2010; 49(1): 94-103.
14. Heller G, Fong KM, Girard L, Seidl S, End-Pfutzenreuter A, Lang G, et al. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene* 2006; 25(6): 959-68.
15. Honda T, Tamura G, Waki T, Jin Z, Sato K, Motoyama T, et al. Hypermethylation of the TSLC1 gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 857-60.
16. Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, et al. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6320-6.
17. Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, et al. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(37): 35421-7.
18. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 2005; 106(3): 779-86.
19. Sussan TE, Pletcher MT, Murakami Y, Reeves RH. Tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1) alters tumorigenic growth properties and gene expression. *Mol Cancer* 2005; 4: 28.
20. Fukuhara H, Kuramochi M, Fukami T, Kasahara K, Furuhashi M, Nobukuni T, et al. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93(6): 605-9.
21. Allinen M, Peri L, Kujala S, Lahti-Domenici J, Outila K, Karppinen SM, et al. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34(4): 384-9.
22. Rychahou PG, Jackson LN, Silva SR, Rajaraman S, Evers BM. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. *Ann Surg* 2006; 243(6): 833-42.
23. Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Ezer A, Noyan T, et al. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *Am J Surg* 2008; 195(6): 719-25.
24. Jang KS, Song YS, Jang SH, Min KW, Na W, Jang SM, et al. Clinicopathological significance of nuclear PTEN expression in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology* 2010; 56(2): 229-39.

## Analysis of TSLC1 Expression in Colorectal Cancer Specimens by Immunohistochemistry

Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD<sup>1</sup>

### Abstract

**Background:** The tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) is a tumor-suppressor gene. We evaluated the correlation between TSLC1 expression and clinicopathological characteristics of colorectal cancer patients by comparing primary colorectal cancer and adjacent normal colorectal tissues.

**Methods:** TSLC1 expression was evaluated in 100 pairs of primary colorectal cancerous and corresponding normal colorectal tissues using immunohistochemical staining on paraffin-embedded sections. The correlation between immunohistochemical findings and clinicopathological factors was then investigated. Age, gender, and clinicopathological presentation of patients were also noted.

**Findings:** TSLC1 was expressed in all tissues. A 71%- down regulation of TSLC1 was colorectal cancer specimens compared to the matched normal tissues. There were statistically significant correlations between TSLC1 expression and stage, location, and lymph node metastasis.

**Conclusion:** TSLC1 expression may be a favorable biologic marker and a useful prognostic indicator in patients with colorectal cancer.

**Keywords:** TSLC1, Colorectal cancer, Tumor suppressor gene, Immunohistochemistry

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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