

تشخیص میکرومتاستاز با مارکر MUC2 در نمونه‌های خون و مغز استخوان بیماران سرطان پستان با روش Real-Time PCR

نگار خازن^۱، دکتر اردشیر قوام زاده^۲، دکتر آنا بویاجیان^۳،

دکتر گوهر مگردیچیان^۴، دکتر کامران علی مقدم^۵، دکتر سید حمیداله غفاری^۶

چکیده

زمینه و هدف: گسترش تومور از طریق سیستم گردش خون به اندامهای دورتر مهم‌ترین دلیل مرگ در بیماران سرطان پستان می‌باشد. در نتیجه نیاز فوری برای ایجاد روشهای حساس جهت تشخیص سلولهای توموری در خون محیطی (PB) Peripheral blood و مغز استخوان (BM) Bone marrow بیماران وجود دارد. هدف از این مطالعه تشخیص میکرومتاستاز با استفاده از مارکر MUC2 در این بیماران می‌باشد.

روش بررسی: این بررسی نمونه‌های PB و BM ۵۰ بیمار پس از جراحی و قبل از درمان اولیه جمع آوری شد. از موسین^۲ (MUC2) به عنوان تومور مارکر استفاده شد. Real-Time PCR برای سنجش MUC2 با استفاده از سایبر گرین (SYBR Green) انجام گرفت. ۲۰ نمونه PB از افراد سالم به عنوان کنترل جمع آوری گردید. از HPRT به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

یافته‌ها: MUC2 در ۸ (۱۶٪) نمونه‌های PB و BM افراد مبتلا تشخیص داده شد. در نمونه‌های کنترل MUC2 مثبت نبود. همچنین ارتباط مثبت بودن MUC2 با عود بیماری بررسی شد. در بیمارانی که عود در آنها مشاهده شده است درصد مثبت بودن این تومور مارکر نسبت به بیمارانی که عود در آنان گزارش نشده است بیشتر می‌باشد. بین مثبت بودن MUC2 و عود بیماری ارتباط معنی داری از نظر آماری در BM به دست آمد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که MUC2 می‌تواند به عنوان تومور مارکر مناسب جهت تشخیص میکرو متاستاز در مراحل اولیه بیماری و همچنین پیش بینی عود استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سلولهای توموری، MUC2، RT-PCR

* نویسنده مسئول :

دکتر سید حمید اله غفاری ؛

مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند

سلولهای بنیادی دانشگاه علوم پزشکی

تهران

Email :
Shghaffari200@yahoo.com

- دریافت مقاله : بهمن ۱۳۹۰ - پذیرش مقاله : تیر ۱۳۹۱

مقدمه

سرطان پستان یکی از بدخیمی‌های بافت‌های اپی تلیالی و از جمله رایج ترین سرطانات در دنیا می‌باشد. این بدخیمی در بین زنان ساکن کشورهای توسعه یافته شیوع بالاتری دارد (۲ و ۱). بر طبق آمار ارائه شده از انجمن سرطان آمریکا در سال ۲۰۱۰ حدود ۲۰۷۰۹۰ مورد جدید از سرطان تهاجمی پستان در این کشور گزارش شده است (۳). سرطان پستان در ایران نسبت به کشورهای غربی شیوع کمتری دارد، اما در چند دهه اخیر شیوع آن در

^۱ کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده زیست شناسی مولکولی و سلولی، آکادمی علوم ارمنستان، ایروان، ارمنستان

^۲ استناد خون و انکولوژی، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلولهای بنیادی، دانشگاه علوم

پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ استناد گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی سلولی و مولکولی،

آکادمی علوم ارمنستان، ایروان، ارمنستان

^۴ استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده زیست شناسی مولکولی و سلولی، آکادمی علوم ارمنستان،

ایروان، ارمنستان

^۵ دانشیار خون و انکولوژی، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلولهای بنیادی، دانشگاه

علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۶ دانشیار ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلولهای بنیادی، دانشگاه علوم

پزشکی تهران، تهران، ایران

است، بنابراین تشخیص و اندازه‌گیری کمی سلولهای توموری منتشر شده در نمونه‌های خون افراد مبتلا، می‌تواند یک روش تشخیصی آسان و مناسب برای تعیین پیش‌آگهی و موثر بودن درمان محسوب شود(۹).

موسینها به عنوان رسپتورهای سطح سلولی در هدایت سیگنالهای سلولی که در پاسخ به محرک‌های خارجی ایجاد شده‌اند و سبب تکثیر، تمایز و آپوپتوز در سلولها می‌شوند نقش دارند. همچنین مشخص شده است که در سرطانهای مختلف به خصوص از نوع آدنو کارسینوما سطح ترشح موسین افزایش می‌یابد(۱۰).

(MUC2) گلیکوپروتئینی است که در سطح بسیاری از سلولهای اپی‌تلیالی وجود دارد و در شرایط طبیعی به عنوان محافظ در این سلولها نقش دارد. همچنین در تمایز سلولهای اپی‌تلیالی و تعادل چسبندگی موثر می‌باشد(۱۱ و ۱۲). هدف ما در این بررسی سنجش mRNA مربوط به MUC2 برای تشخیص و بررسی کمی سلولهای توموری منتشر شده در خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا با استفاده از تکنیک Quantitative Real-Time PCR است.

روش بررسی

این مطالعه آینده‌نگر پس از موافقت کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و اخذ رضایت از بیماران، بر روی نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان ۵۰ فرد مبتلا به سرطان پستان از نوع کارسینوم مجاری (Ductal breast cancer) که به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی از سال ۸۴ تا ۸۹ مراجعه کرده بودند، صورت گرفت. نمونه‌گیری اولیه پس از عمل جراحی لامپکتومی و قبل از ادجوانت تراپی و نمونه

بین زنان در ایران افزایش یافته است. از طرفی نسبت سنی زنانی که در ایران به این بیماری مبتلا می‌شوند ۱۰ سال نسبت به سایر کشورها پایین‌تر می‌باشد و از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر زن ایرانی ۲۴ نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند(۴). در حال حاضر اقدام درمانی اولیه برای سرطان پستان، جراحی و شیمی‌درمانی می‌باشد(۵). در بسیاری از افراد بعد از عمل جراحی، عود بیماری دیده می‌شود که در بیشتر موارد منجر به مرگ می‌شود(۶ و ۷). از دلایل عود مجدد بیماری پس از جراحی، وجود متاستاز پنهان می‌باشد. در طی جریان متاستاز، سلولهای سرطانی از تومور اولیه جدا شده و به ارگانهای دیگر مهاجرت می‌کنند. وجود این سلولهای توموری موجود در خون که به سلولهای توموری گردش‌یافته یا Circulating Tumor Cells(CTC) معروف هستند، می‌تواند به عنوان یک فاکتور مهم در تشخیص اولیه متاستاز تلقی شود. همچنین مغز استخوان جایگاهی است که سلولهای توموری مشتق شده از سرطانهایی با منشا اپیتلیالی مانند سرطان پستان را در خود جای می‌دهد(۸).

این سلولهای توموری که به سلولهای توموری پراکنده یا Dissminated Tumor cells(DTC) معروف هستند، می‌توانند برای مدتی در آنجا پنهان باشند و سپس به ارگانهای دورتر مهاجرت کنند. بنابراین، از این سلولها می‌توان به عنوان یک فاکتور تشخیصی دیگر متاستاز در سرطان پستان استفاده نمود. با توجه به این که سرطان پستان جزء سرطانهایی با منشا اپی‌تلیالی می‌باشد، در نتیجه می‌توان از تومور مارکرهایی که بر روی این سلولهای اپی‌تلیالی بیان می‌شوند و بیان آنها بر روی سلولهای خونی مشاهده نشده، برای تشخیص این سلولهای توموری استفاده نمود. مطالعات سیتولوژیک نشان داده است که سلولهای منتشر شده از تومورهای اپی‌تلیالی در خون و مغز استخوان افراد مبتلا قابل تشخیص

گیری دوم ۲-۳ ماه پس از ادجوانت تراپی انجام گرفت.

نسبت مرد به زن ۱ به ۴۹، میانگین سن ۴۵ سال و محدوده سنی ۲۸-۶۷ سال بود. همچنین ۲۰ نمونه خون محیطی از افراد نرمال (بدون هر نوع سرطان اپی تلیالی) و با جلب توافق به عنوان کنترل در این مطالعه استفاده شد. از هر یک از افراد سالم و بیمار حدود ۱۰ میلی لیتر خون محیطی در لوله EDTA دار جمع آوری شد. همچنین حدود ۵ میلی لیتر از نمونه مغز استخوان از افراد مبتلا به سرطان پستان گرفته شد. برای اطمینان از عدم آلودگی با سلول‌های اپیتلیال در زمان نمونه گیری، ۱-۲ میلی لیتر اولیه نمونه به دور ریخته شد. پس از تعویض سرنگ، نمونه گیری ادامه یافت. سلولهای تک هسته‌ای از نمونه خون محیطی و مغز استخوان تیمار شده با EDTA بر روی گرایانت محلول فایکول جدا شدند.

سلولها چندین بار با بافر نمکی فسفات PBS شستشو شدند و برای جمع آوری رسوب سلولی جهت استخراج RNA سلولها به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

RNA کل با استفاده از ماده (Tripure (Roche, Germany) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری (USA, Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, دانسیته نوری (OD) ۲۸۰ و ۲۶۰ محاسبه شد. برای ساخت cDNA در این پژوهش از کیت PrimeScript™ RT reagent cDNA synthesis kit (Takara, Japan) استفاده شد. یک میکروگرم از RNA تام استخراج شده به عنوان الگو برای ساخت cDNA استفاده شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس، مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پرایمرهای مورد نیاز برای ژنهای MUC2 و HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase) تهیه شدند و برای اطمینان از صحت آنان از برنامه Primer blast استفاده شد.

نام پرایمر	توالی
MUC2-F	TCCATCCTGCTGACCATCAA
MUC2-R	GTAGGCATCGCTCTTCTCAATGA
HPRT-F	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT
HPRT-R	AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA

تمام واکنش‌های Real-Time PCR در دستگاه ABI (Applied Biosystems StepOne Plus, Foster City, CA, USA) انجام شد.

در این مطالعه از Precision™ 2X q PCR Master mix (Primer design, United Kingdom) استفاده شد. شرایط دمایی Real-Time PCR شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت واسرشت شدن اولیه، ۴۰ سیکل هر کدام شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه جهت واسرشت شدن، ۶۰ درجه

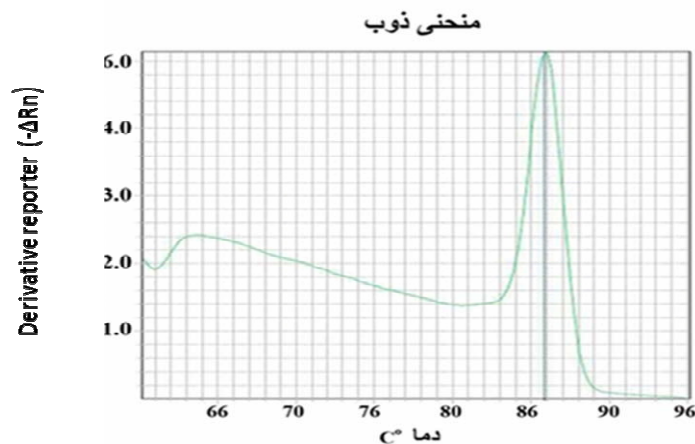
سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای annealing و تکثیر (Extension) می‌باشد. برای بررسی ارتباط بین وجود این تومور مارکر (MUC2) و عود بیماری و همچنین ارتباط بین خصوصیات کلینیکی و پاتولوژی و مثبت بودن MUC2 در خون و مغز استخوان بیماران از آزمون Pearson's chi-squared test در این مطالعه استفاده شد. آنالیز آماری توسط نرم افزار SPSS (Version 18, Chicago, IL, USA) انجام

mRNA در نمونه مغز استخوان و خون محیطی به طور مشترک یافت شد؛ و در بقیه بیماران این تومور مارکر یا تنها در خون محیطی و یا در مغز استخوان تشخیص داده شد. در هیچ کدام از نمونه‌های خون محیطی افراد سالم که به عنوان کنترل استفاده شده بودند mRNA MUC2 مثبت گزارش نشد که این نشانگر اختصاصی بودن بالای تکنیک به کار رفته می‌باشد.

گرفت و p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان مقدار معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در ۵۰ نمونه خون محیطی افراد مبتلا، ۸ (۱۶٪) نمونه mRNA مربوط به MUC2 تشخیص داده شد و در ۵۰ نمونه مغز استخوان این افراد نیز در ۸ (۱۶٪) آنها mRNA مربوط به MUC2 بدست آمد. همچنین در بین ۵۰ بیمار مورد بررسی، در ۳ بیمار MUC2



نمودار: منحنی ذوب MUC2 که تک دمایی و دارای پیک مشخص می‌باشد

(اندازه گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف)

حاصل از PCR برای ژن MUC2 به صورت تک پیک (peak) و تیز (sharp) به دست آمد (نمودار ۱).

برای تعیین اختصاصیت پرایمر، منحنی ذوب نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت که وجود پیک مشخص بیانگر اختصاصیت پرایمر می‌باشد. منحنی ذوب

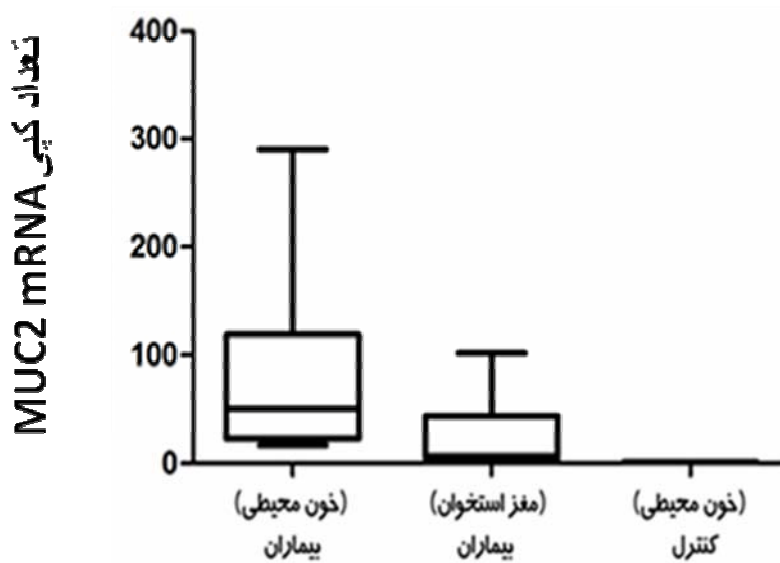
جدول ۱: فراوانی نمونه‌های مثبت از نظر وجود mRNA MUC2 در افرادی که بیماری آنها عود یافته

و مقایسه آنها با بیمارانی که عود مجدد بیماری در آنها گزارش نشده است

تومور مارکر	نمونه	تعداد بیماران		P-value
		N=۵۰		
		عود یافته N=۱۵	بدون عود N=۳۵	
MUC2	PB	۳ (۲۰٪)	۵ (۱۴٪)	۰/۴
	BM	۶ (۴۰٪)	۲ (۶٪)	۰/۰۲

این مطالعه، اختلاف معنی داری را از نظر آماری نشان نداد. در صورتی که در ۶ (۰/۰۶) نمونه مغز استخوان این دسته از بیماران این تومور مارکر مثبت گزارش شد که از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($P < 0/05$). نتایج در جدول ۱ خلاصه شده است.

همچنین در افرادی که بیماری آنها عود مجدد یافته بود، از نظر مثبت بودن این مارکر در نمونه های خون محیطی و مغز استخوان آنها بررسی انجام گرفت. از میان ۱۵ بیمار که عود بیماری در آنها طی ۵ سال گزارش شد، در ۳ (۰/۲۰) نمونه خون محیطی این بیماران این تومور مارکر مثبت گزارش شد.



نمودار ۲: تعداد کپی MUC2 mRNA در نمونه های BM و PB بیماران مبتلا به سرطان پستان و مقایسه با گروه کنترل

پاتولوژی مانند درگیری گره های لنفاوی، اندازه تومور، موقعیت گیرنده های استروژن و پروژسترون، تهاجم عروقی و گیرنده HER-2/neu صورت گرفت و مشخص شد که ارتباط معنی داری از نظر آماری وجود ندارد که نتایج آن در جدول ۲ خلاصه شده است.

نمودار ۲ تعداد کپی MUC2 mRNA را در نمونه های خون و مغز استخوان بیماران نشان می دهد. همانطور که نمودار نشان می دهد تغییر زیادی در تعداد کپی MUC2 در بیماران و گروه کنترل مشاهده می شود. مقدار کپی MUC2 mRNA در بیماران نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می دهد.

همچنین بررسی از نظر آماری بین مثبت بودن این تومور مارکر و بعضی از مشخصات کلینیکی و

جدول ۲: مشخصات کلینیکی و پاتولوژی بیماران و ارتباط آنان با مثبت بودن mRNAUC2 نمونه های خون و مغز استخوان						
خصوصیات	خون محیطی			مغز استخوان		
	(کل بیماران) تعداد %	MUC2 + mRNA تعداد %	P	(کل بیماران) تعداد %	MUC2 + mRNA تعداد %	P
تعداد بیماران	۵۰-۱۰۰	۸-۱۶		۵۰-۱۰۰	۸-۱۶	
سن						
میانگین	۴۵	۴۰		۴۵	۴۵	
دامنه	۲۸-۶۷	۳۰-۶۷		۲۸-۶۷	۳۰-۶۴	
موقعیت گره های لنفاوی						
مثبت	۲۰-۴۰	۴-۲۰		۲۱-۴۲	۴-۲۰	
منفی	۱۹-۳۸	۲-۱۰	۰/۲	۱۹-۳۸	۲-۱۰	۰/۳
نامشخص	۱۱-۲۲			۱۰-۲۰		
اندازه تومور						
>5cm	۷-۱۴	۲-۲۸		۷-۱۴	۱-۱۴	
<5cm	۳۶-۷۲	۴-۱۱	۰/۲	۳۶-۷۲	۶-۱۷	۰/۶
نامشخص	۷-۱۴			۷-۱۴		
موقعیت گیرنده استروژن						
مثبت	۳۱-۶۲	۵-۱۶		۳۱-۶۲	۴-۱۳	
منفی	۱۶-۳۲	۱-۶	۰/۲	۱۶-۳۲	۳-۱۹	۰/۴
نامشخص	۳-۶			۳-۶		
موقعیت گیرنده پروژسترون						
مثبت	۳۰-۶۰	۶-۲۰		۳۰-۶۰	۵-۱۷	
منفی	۱۸-۳۶	۱-۶	۰/۱	۱۸-۳۶	۳-۱۷	۰/۶
نامشخص	۲-۴			۲-۴		
موقعیت گیرنده Her2/neu						
مثبت	۲۵-۵۰	۳-۱۲		۲۵-۵۰	۴-۱۶	
منفی	۱۹-۳۸	۳-۱۶	۰/۴	۱۹-۳۸	۴-۲۱	۰/۴
نامشخص	۶-۱۲			۶-۱۲		
عود						
مثبت	۱۵-۳۰	۳-۲۰		۱۵-۳۰	۶-۴۰	۰/۰۲
منفی	۳۵-۷۰	۵-۱۴	۰/۴	۳۵-۷۰	۲-۶	
تهاجم عروقی						
مثبت	۲۶-۵۲	۳-۱۱		۲۶-۵۲	۶-۲۳	
منفی	۹-۱۸	۲-۲۲	۰/۴	۹-۱۸	۱-۱۱	۰/۴
نامشخص	۱۵-۳۰			۱۵-۳۰		

کاهش می دهد (۲۱).

در این مطالعه از روش سنجش با استفاده از DNA-binding agent (SYBR green) استفاده شد. از جمله مزایای این روش، راحت و حساس بودن آن است.

هدف از انجام این مطالعه ایجاد و بهینه کردن Quantitative Real-Time PCR برای به حداقل رساندن پرایمر دایمر و محصول غیراختصاصی

بحث و نتیجه گیری

Real-Time PCR تکنیک تشخیص کمی RNA و DNA می باشد که تلفیقی از PCR با کارایی بالا و حساسیت بالای آنالیز می باشد. عدم نیاز به روش های آنالیز پس از تکثیر (Post PCR analysis) نظیر ژل الکتروفورز برای آنالیز محصول از مزایای مهم Real-Time PCR محسوب می شود که این امر احتمال آلودگی و ایجاد نتایج مثبت کاذب را

است که با استفاده از SYBR green برای سنجش بیان MUC2 mRNA در نمونه های خون محیطی و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان پستان به کار می رود (۳۰).

تکنیک مولکولی Real-Time PCR در تشخیص سلولهای توموری موجود در خون بیماران نسبت به تکنیکهای سلولی مانند ایمونوهیستوشیمی (IHC) immunocytochemical از حساسیت بالاتری برخوردار است (۱۵-۱۳). به طوری که در روش IHC تعداد یک یا دو سلول توموری در بین 10^6 سلول نرمال قابل تشخیص می باشد (۱۶). در حالیکه با استفاده از روش RT-PCR می توان یک سلول توموری را در بین 10^7 سلول نرمال خون تشخیص داد (۱۷ و ۱۸). سنجش مارکرهای اپیتلیالی برای تشخیص میکرو متاستاز در سرطانهای مختلف از جمله سرطان پستان با استفاده از متد RT-PCR طی سالهای اخیر مورد بررسی قرار گرفته است (۲۱-۱۹). مشخص شده است که تشخیص سلولهای پراکنده توموری (CTCs) در خون محیطی و (DTCs) در مغز استخوان از طریق سنجش بیان mRNA مارکرهای اپیتلیالی، با استفاده از روش RT-PCR در تشخیص زود هنگام متاستاز در سرطانهای اپی تلیالی یک روش موثر می باشد (۲۲ و ۷). طی سالهای اخیر مطالعات زیادی با استفاده از تومور مارکرهای اپی تلیالی مانند سیتوکراتین ۱۹ (CK19) و با استفاده از روشهای Real-Time PCR ایمونوهیستوشیمی بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام گرفته است و ارتباط عود بیماری و مرگ و میر بیماران و وجود سلولهای توموری موجود در خون و مغز استخوان افراد مبتلا نشان داده شده است. در بسیاری از این بررسی ها ارتباط معنی داری از نظر وجود این سلولهای توموری و عود مجدد و مرگ و میر بیماران مشاهده می شود (۲۵-۱۳).

در بررسی که Stathopoulou و همکاران (۲۰۰۲) بر روی ۱۴۸ بیمار سرطان پستان که در مراحل اولیه بیماری قرار داشتند انجام گرفت، از تومور مارکر CK19 برای شناسایی CTCs در PB بیماران استفاده گردید. نتایج نشان داد بیمارانی که از نظر وجود این تومور مارکر مثبت بودند در معرض بالاتری از عود و کوتاه بودن دوره بهبودی قرار دارند (۲۵).

در مطالعه دیگری که توسط Nikos Xenidis و همکاران صورت گرفت طی مدت ۳۲ ماه تعداد ۱۶۷ بیمار مبتلا به سرطان پستان با استفاده از تومور مارکر CK19 برای تشخیص CTCs در PB مورد بررسی قرار گرفتند. در ۳۶٪ (۲۱٪) از بیماران، این تومور مارکر مثبت گزارش شد. پس از پیگیری مجدد در ۲۰٪ (۱۲٪) آنها عود بیماری مشاهده گردید که ۱۶٪ (۴٪) از آنها جزء گروهی بودند که در ابتدا از نظر وجود سلولهای پراکنده توموری مثبت گزارش شده بودند. همچنین در ۸٪ (۴/۸٪) از بیماران مرگ و میر مشاهده شد که از این تعداد ۷٪ (۸۷٪) جزء گروهی بودند که از نظر وجود این سلولها مثبت گزارش شده بودند (۲۶). این یافته ها با نتایجی که حاصل از مطالعه Saloustros (۲۰۱۱) و Benoy (۲۰۰۶) می باشد، مطابقت دارد (۲۷ و ۲۴). در بسیاری از مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که وجود سلولهای توموری پراکنده در مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان پستان، ارتباط زیادی با عود و کاهش زمان زنده ماندن این بیماران دارد (۲۸). علاوه بر تشخیص، حضور یا عدم حضور سلولهای توموری منتشر شده در خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطانهای اپی تلیالی، به نظر می رسد که تعداد سلولهای منتشر شده نیز از نظر کلینیکی دارای اهمیت می باشد. Harbeck نشان داد که تعداد سلولهای منتشر شده در مغز استخوان با میزان عود در افراد مبتلا به سرطان پستان ارتباط دارد، در

و مثبت بودن آن در بیمارانی که پس از این مدت بیماریشان عود یافته بود مشخص شد که در نمونه خون محیطی ۲۰ درصد از این بیماران که از ابتدا از نظر وجود این تومور مارکر مثبت گزارش شده بودند و نمونه مغز استخوان ۴۰ درصد از آنها، بیان این تومور مارکر مثبت ارزشیابی گردید که البته در BM از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۱). این نتایج با مطالعاتی که توسط دیگر محققان انجام گرفته است، مشابه می‌باشد. به طور مثال IH Benoy در مطالعه‌ای که بر روی PB و BM، ۱۴۸ بیمار سرطان پستان برای تشخیص CTCs و DTCs از طریق سنجش دو تومور مارکر CK19 و ماماگلوبین (hMAM) انجام داد، یافته‌های او نشان داد که بین کوتاه بودن دوره بهبودی و مثبت بودن این دو تومور مارکر در BM از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود دارد، در صورتی که در PB از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد که این نتایج با مطالعات Pierga و همکارانش مشابهت دارد (۳۴ و ۲۷). در مطالعه‌ای که آنها بر روی PB و BM، ۱۱۴ بیمار سرطان پستان با استفاده از روش IHC انجام دادند، سلولهای مثبت از نظر وجود CK19 در ۲۸ (۲۴/۵٪) نمونه PB و ۶۷ (۵۹٪) نمونه BM مشاهده شد، همچنین در این مطالعه مشخص شد که بین مثبت بودن این تومور مارکر و کوتاه بودن دوره بهبودی ارتباط زیادی وجود دارد، که از نظر آماری اختلاف معنی داری در BM مشاهده شد. در بسیاری از مطالعات انجام گرفته مشخص شد که BM در مقایسه با PB از ارزش تشخیصی بالاتری برخوردار است (۳۵ و ۲۵ و ۱۵ و ۱۳).

همچنین در این مطالعه با بررسی مشخصات کلینیکی و پاتولوژی بیماران و ارتباط با مثبت بودن این تومور مارکر مشخص شد که از نظر آماری ارتباط معنی داری وجود ندارد که این یافته‌ها با نتایج

مطالعه‌ای که انجام گرفت عود بیماری پس از گذشت ۵ سال در بیمارانی که از نظر وجود این سلولها مثبت بودند ۳ برابر بیشتر از بیمارانی بود که منفی گزارش شده بودند (۲۹). در بررسی دیگری که Range K و همکارانش انجام دادند مشخص شد که وجود DTCs در BM بیماران سرطان پستان ارتباط زیادی با عود بیماری دارد، در بررسی که آنان با روش Real-Time PCR بر روی ۱۹۵ بیمار سرطان پستان انجام دادند پس از پی گیری ۷۲ ماه (۷۹٪) بیمار از ۲۴ بیماری که در ابتدا از نظر وجود سلولهای توموری در BM مثبت بودند عود بیماری گزارش شد در صورتی که در بیمارانی که از نظر وجود این سلولهای توموری منفی بودند تنها در ۲۰ (۱۲٪) از ۱۷۱ بیمار عود مشاهده شد، نتایج با بررسی‌هایی که توسط Stephan Braun و Sven Becker صورت گرفته مطابقت دارد (۳۲-۳۰).

در مطالعه انجام گرفته برای تعیین اختصاصیت ژن MUC2 در نمونه‌های خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان پستان، وجود mRNA این ژن در نمونه‌های افراد سالم با تکنیک Real-Time PCR بررسی شد. در هیچ یک از نمونه‌های گروه کنترل mRNA MUC2 تشخیص داده نشد. که این بیانگر اختصاصیت بالای MUC2 برای تشخیص سلولهای توموری منتشر شده می‌باشد. این یافته‌ها با نتیجه مطالعه Berois مطابقت دارد (۳۳).

مطالعه ما نشان داد که بین نمونه‌های خون و مغز استخوان افراد بیمار از نظر بیان ژن MUC2 اختلاف زیادی وجود ندارد. تعداد نمونه‌های مثبت در خون محیطی و در مغز استخوان ۸ (۱۶٪) بوده است. در این مطالعه از بین ۸ نمونه BM مثبت برای MUC2 mRNA، ۳ نمونه در PB نیز مثبت بودند. از طرف دیگر در این مطالعه با پیگیری صورت گرفته طی ۵ سال و بررسی مجدد سنجش این تومور مارکر

استفاده از نمونه های بیشتر و مخصوصاً پیگیری دراز مدت بیماران وجود دارد. از آنجا که سلولهای توموری از نظر آنتی ژنی هتروژن می باشند، لذا به نظر می رسد که استفاده از چندین مارکر به طور همزمان جهت بررسی میکرومتاستاز می تواند ضریب اطمینان به نتایج حاصل و استفاده از آنها را در کلینیک افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت و کارکنان محترم مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند سپاسگزاری به عمل می آید.

دیگر پژوهش های انجام گرفته مشابهت دارد (۳۶، ۳۲ و ۲۷ و ۲۳). به طور کلی مطالعه ما نشان داد که MUC2 می تواند یک مارکر مناسب جهت بررسی حضور سلولهای سرطانی در خون و مغز استخوان افراد مبتلا به سرطان پستان به منظور تشخیص اولیه گسترش سلول های بدخیم از تومور اولیه محسوب شود. همچنین حضور سلولهای توموری موجود در PB و BM می تواند به عنوان یک فاکتور مستقل برای پیش بینی عود بیماری مورد استفاده قرار گیرد. اگر چه مطالعات متعددی با تکنیک های مختلف برای تشخیص میکرو متاستاز در سرطان های اپی تلیالی در نمونه خون یا مغز استخوان صورت گرفته است اما برای درک ارتباط بین سلولهای توموری منتشر شده در خون و مغز استخوان و بررسی پتانسیل متاستاتیک آنها نیاز به مطالعات مولکولی گسترده و همچنین

منابع

1. Lakhani S. The pathology of familial breast cancer: Morphological aspects. *Breast Cancer Research* 1999; 1(1): 31-5.
2. Gonzalez Angulo AM, Morales Vasquez F & Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 2007; 608(1): 1-22.
3. Graves H & Czerniecki BJ. Circulating tumor cells in breast cancer patients: an evolving role in patient prognosis and disease progression. *Patholog Res Int* 2011 Jan; 2011: 621090.
4. Ghiasvand R, Maram ES, Tahmasebi S & Tabatabaee SH. Risk factors for breast cancer among young women in southern Iran. *Int J Cancer* 2011; 129(6): 1443-9.
5. Hortobagyi GN & Piccart-Gebhart MJ. Current management of advanced breast cancer. *Semin Oncol* 1996 Oct; 23(5- 11): 1-5.
6. Muller P & Schlimok G. Bone marrow "micrometastases" of epithelial tumors: detection and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000 Nov; 126(11): 607-18.
7. Paterlini Brechot P & Benali NL. Circulating tumor cells(CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007 Aug; 253(2): 180-204.
8. Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE & Holen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol* 2004 Sep; 57(9): 903-11.
9. Hogan BV, Peter MB, Shenoy H, Horgan K & Hughes TA. Circulating tumour cells in breast cancer: Prognostic indicators, metastatic intermediates, or irrelevant bystanders?(Review). *Mol Med Report* 2008 Nov-Dec; 1(6): 775-9.

10. Hollingsworth MA & Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004 Jan; 1(4): 45-60.
11. Santini D, Baldi A, Vincenzi B, Mellone P, Campioni M, Antinori A, et al. Mucin 2(MUC2) and mucin 5(MUC5) expression is not associated with prognosis in patients with radically resected ampullary carcinoma. *J Clin Pathol* 2007 Sep; 60(9): 1069-70.
12. Rakh EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D, Kurien T, Green AR, Paish EC, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol* 2005 Oct; 18(10): 1295-304.
13. Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, Cross NC & Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999 Mar; 17(3): 870-9.
14. Ikeda N, Miyoshi Y, Motomura K, Inaji H, Koyama H & Noguchi S. Prognostic significance of occult bone marrow micrometastases of breast cancer detected by quantitative polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA. *Jpn J Cancer Res* 2000 Sep; 91(9): 918-24.
15. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 1997 May; 33(6): 854-61.
16. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3(3): 165-73.
17. Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE & Moscinski LC. Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1996 Jan; 14(6): 1868-76.
18. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH & Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994 Mar; 12(3): 475-82.
19. Becker S, Becker Pergola G, Banys M, Krawczyk N, Wallwiener D, Solomayer E, et al. Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009 Sep; 117(2): 227-33.
20. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M & Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999 Jul; 17(7): 2015-9.
21. Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens MR, Van Den Bogaert W, Van Oosterom AT, et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol* 2001 Jan; 12(1): 39-46.
22. Schmitt M & Foekens JA. Circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients assessed by a novel RT-PCR test kit and comparison with status of bone marrow-disseminated tumor cells. *Breast Cancer Research* 2009; 11(5): 109.
23. Ismail MS, Wynendaele W, Aerts JL, Paridaens R, Gaafar R, Shakankiry N, et al. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumor cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 2004 Jan; 10(1): 196-201.

24. Saloustros E, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis K, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. *Breast Cancer Res* 2011 Jun; 13(3): 60.
25. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002 Aug; 20(16): 3404-12.
26. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006 Aug; 24(23): 3756-62.
27. Benoy IH, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van Dam P, Scharpe S, et al. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2006 Mar; 94(5): 672-80.
28. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ & Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991 Oct; 9(10): 1749-56.
29. Harbeck N, Untch M, Pache L & Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 1994 Mar; 69(3): 566-71.
30. Farmen RK, Nordgard O, Gilje B, Shammas FV, Kvaloy JT, Oltedal S, et al. Bone marrow cytokeratin 19 mRNA level is an independent predictor of relapse-free survival in operable breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 108(2): 251-8.
31. Becker S, Becker Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF & Fehm T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2006 May; 97(1): 91-6.
32. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000 Feb; 342(8): 525-33.
33. Berois N, Varangot M, Sonora C, Zarantonelli L, Pressa C, Lavina R, et al. Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA. *Int J Cancer* 2003 Feb; 103(4): 550-5.
34. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, De Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004 Feb; 10(4): 1392-400.
35. Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P, et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. *Eur J Cancer* 2000 Apr; 36(6): 717-23.
36. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, et al. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1997 Jan; 42(1): 23-30.

The Detection Of Micrometastases In Peripheral Blood And Bone Marrow Of Breast Cancer Patients Using Marker(MUC2) Real Time PCR

Khazan Negar¹(MSc.) - Ghavamzadeh Ardeshir²(M.D.) - Boyajyan Ana³(Ph.D)
Mkrtychyan Ghohar⁴(Ph.D) - Alimoghaddam Kamran⁵(M.D.)
Ghaffari Seyed Hamidollah⁶(Ph.D)

1 Master of Sciences in Genetics, Institute of Molecular Biology, National Academy of Science of Armenia, Yerevan, Armenia

2 Professor in Hematology-Oncology, Hematology-Oncology and BMT Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Professor, Molecular Biology Department, School of Molecular Biology, National Academy of Science of Armenia, Yerevan, Armenia

4 Assistant Professor, Biochemistry Department, School of Molecular Biology, National Academy of Science of Armenia, Yerevan, Armenia

5 Associate Professor in Hematology-Oncology, Hematology-Oncology and BMT Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6 Associate Professor in Molecular Genetics, Hematology-Oncology and BMT Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Feb 2012
Accepted : Jul 2012

Background and Aim: Tumor dissemination via blood to distant organs is the main cause of death. Therefore, there is a critical need to set up sensitive methods for the early detection of circulating tumor cells(CTCs) and disseminated tumor cells(DTCs) in peripheral blood (PB) and bone marrow(BM) specimens of breast cancer patients. The aim of this research is to study the detection of micrometastasis using MUC2 in such patients.

Materials and Methods: In this study, PB and BM samples were collected from 50 breast cancer patients after operation and before adjuvant therapy. Mucin 2 (MUC2) was used as a tumor marker and its transcript level in the sample patients was analyzed using gene specific, quantitative real-time PCR reaction with SYBR Green technology. Samples from 20 healthy individuals were used as negative controls. HPRT was used as a reference gene.

Results: MUC2 mRNA was detected in 8 (16%) of PB and BM samples. MUC2 mRNA was not detected in PB samples of healthy individuals. The relapse rate among MUC2-positive patients was higher than MUC2-negative patients; and it was statistically significant in BM ($P<0.05$).

Conclusion: This study shows that MUC2 can be a suitable marker for the detection of micrometastasis in breast cancer patients at early stages of cancer and that it may provide the basis for identifying women at risk of relapse.

Key words: Tumor Cells, MUC2, RT-PCR

* Corresponding Author:
Ghaffari SH ;
E -mail:
Shghaffari200@yahoo.com