

تعیین سطح بیان ژن‌های E-cadherin و Vimentin در نمونه‌های توموری بیماران مبتلا به سرطان تخمدان

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۵ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۶ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴

زمینه و هدف: مطالعات نشان داده‌اند که در اکثر سرطان‌های اپی‌تلیالی بیان فاکتورهای مزانشیمی مثل Vimentin افزایش یافته و بیان فاکتورهای اپی‌تلیالی مثل E-cadherin کاهش می‌یابد، که در نتیجه آن تبدیل فنوتیپ اپی‌تلیالی به مزانشیمی (EMT) رخ می‌دهد. هدف از این پژوهش تعیین سطح بیان این ژن‌ها در بافت تومورال و مقایسه و یافتن ارتباط آن‌ها با پدیده EMT و پیشرفت بیماری بر اساس مقایسه یافته‌های بالینی و مورفولوژیک بود.

روش بررسی: مطالعه Case series از بهمن ۱۳۹۴ تا شهریور ماه ۱۳۹۵، بر روی ۷۰ نمونه موجود در تومور بانک انستیتو کانسر انجام گرفت. نمونه‌های مربوط به بیماران مبتلا به سرطان تخمدان که به منظور جراحی به انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) مراجعه کرده بودند از نظر میزان بیان دو ژن E-cadherin و Vimentin با روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت و داده‌ها مورد بررسی‌های آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: میان سطح بیان ژن Vimentin با Stage تومور ($P=0/026$) و متاستاز ($P=0/009$) ارتباط معناداری مشاهده شد. بین بیان ژن Vimentin با درجه تومور ($P=0/207$)، سن ($P=0/11$)، سایز تومور ($P=0/71$) و سابقه ابتلای خانوادگی ($P=0/6$) ارتباط معناداری وجود نداشت. بین بیان ژن E-cadherin با متاستاز ارتباط معناداری داشت ($P=0/027$)، بین بیان ژن E-cadherin با درجه تومور ($P=0/690$)، Stage ($P=0/753$)، سن ($P=0/09$)، سایز تومور ($P=0/537$) و سابقه ابتلای خانوادگی ($P=0/56$) ارتباط معناداری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: مطالعه فوق نشان‌دهنده تغییر بیان هر دو ژن Vimentin و E-cadherin در سلول‌های توموری تخمدان به عنوان فاکتورهای مهم در روند تبدیل اپی‌تلیال به مزانشیمی و بارز بودن این تفاوت در مراحل بالینی و پاتولوژی مختلف بود.

کلمات کلیدی: تبدیل اپی‌تلیالی به مزانشیمی، اپی‌کادرین، سرطان اپی‌تلیالی تخمدان، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ویمنتین.

سیده حکیمه رضازاده^۱

رضا شیرکوهی^{۲*}، عبدالحمید انگجی^۳

سید یوسف سیدنا، امیر نادر امامی

رضوی^۲

۱- گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سرطان، انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده

علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۴- گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده

زیستی، دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، مجتمع

بیمارستانی امام خمینی (ره)، انستیتو کانسر ایران، مرکز تحقیقات بیولوژی سرطان.

تلفن: ۶۶۹۱۴۵۴۵ - ۰۲۱

E-mail: rshirkoohi@tums.ac.ir

مقدمه

مرحله‌ی پیشرفته زمانی که سلول‌های سرطانی در حال مهاجرت کردن و تهاجم به سایر بافت‌ها و اندام‌ها هستند، تشخیص داده می‌شود.^۱ سرطان‌های اپی‌تلیال تخمدان به دلیل آن که تا هنگام متاستاز کمابیش بدون علامت باقی می‌مانند، رایج‌ترین بدخیمی‌های تخمدان هستند که بیش از دو سوم بیماران در هنگام تشخیص در مراحل

در بین همه سرطان‌های زنان، بدخیمی‌های تخمدان بیشترین بحث‌های بالینی را به خود اختصاص داده‌اند، سرطان تخمدان یک بیماری متاستازی پیشرو است.^۱ سرطان تخمدان اغلب دیر و در

متاستاتیک درگیر می‌شود بر اساس مشاهده‌ای است که سلول‌های اپی‌تلیالی کارسینومایی با پتانسیل متاستازی افزایش یافته، مارکرهای مزانشیمی مانند Vimentin را نشان می‌دهند، همچنین بیان بالای β -catenin و کاهش مولکول‌های چسبنده سلول‌های اپی‌تلیالی مانند E-cadherin در این سلول‌های کارسینومایی وجود دارد.^{۱۰}

هدف از مطالعه یافتن ارتباط میان فاکتورهای موثر در پدیده‌ی گذر اپی‌تلیال-مزانشیمال و ارتباط با پیشرفت بیماری بر اساس مقایسه یافته‌های بالینی و مورفولوژیک بود.

روش بررسی

در این مطالعه به صورت تصادفی از بانک ملی تومورال ایران، انستیتو کانسر دانشگاه علوم پزشکی تهران نمونه‌های بیوپسی افراد مبتلا به سرطان تخمدان که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند و نمونه کنترل از بافت سالم حاشیه تومور از بهمن ۱۳۹۴ تا شهریورماه ۱۳۹۵ جهت مطالعات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. تعداد نمونه‌های مورد بررسی ۷۰ مورد نمونه کارسینوم تخمدان و بافت حاشیه‌ی آن به منظور کنترل کار بود، نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب شد و تنوع نمونه به صورتی بود که نمونه‌ها شامل سنین، Stage و Grade مختلف بودند و از آن‌جایی که تعداد متداول نمونه برای بررسی بیان ژن حداقل ۳۰ نمونه می‌باشد، می‌توان گفت نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه نماینده جامعه آماری سرطان تخمدان بودند. با توجه به این که مطالعه‌ی انجام شده Case series بوده بافت‌های توموری با بافت نرمال به منظور مقایسه در گروه‌های مختلف (سن، سابقه خانوادگی، سایز تومور، Stage، Grade، متاستاز) نرمالایز شد. بافت‌های طبیعی و توموری در دمای 80°C - نگهداری شدند. داده‌های هیستوپاتولوژی بیماران از جمله سن، سابقه خانوادگی، سایز تومور، Stage، Grade، متاستاز از بانک ملی تومورال ایران، انستیتو کانسر دانشگاه علوم پزشکی تهران دریافت شد. توالی آغازگرها با استفاده از Primer express software, version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) طراحی شد و اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های هدف به وسیله‌ی NCBI Primer-Blast Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) آزمایش گردید.^{۱۱}

پیشرفته بیماری هستند.^۳ اگرچه با شیمی‌درمانی و جراحی میزان بقا در پنج سال اخیر افزایش چشمگیری داشته است، با این وجود میزان درمان قطعی در مراحل بالینی مختلف سرطان تخمدان کمتر از ۴۰٪ می‌باشد.^۱ میزان بقا در ۲۰٪-۱۵ افراد مبتلا از زمانی که بیماری تشخیص داده می‌شود پنج سال محاسبه شده است.^۴

تشخیص بد این بیماری می‌تواند ناشی از فقدان ابزارهای غربالگری مناسب برای تشخیص اولیه، علایم غیراختصاصی و مقاومت به درمان باشد. سرطان تخمدان در بین کل سرطان‌های موجود پنجمین عامل مرگ ناشی از سرطان به حساب می‌آید، از این روست که کشنده‌ترین سرطان زنانه است.^۵ سرطان تخمدان در زنان ایرانی هشتمین سرطان شایع است، میزان بقای پنج ساله بیماران مبتلا به سرطان تخمدان در ایران ۶۱٪ تخمین زده می‌شود، همچنین در کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی نیز از سرطان‌های شایع به حساب می‌آید.^۶

میزان بقا در زنان مبتلا به سرطان تخمدان بستگی دارد که سرطان آن‌ها در چه مرحله بالینی تشخیص داده شود، زنانی که سرطانشان در مراحل اولیه تشخیص داده می‌شود میزان بقای بیشتر از پنج سال خواهند داشت. امروزه درمان استاندارد و عمده برای بیماران شامل شیمی‌درمانی و جراحی است که اکثر آن‌ها (بیشتر از ۷۰٪) بهبود یافته اما در ۹۰٪ بهبود یافته‌ها عود مجدد گزارش شده که در این زمان بیماری غیر قابل درمان است که به منظور جلوگیری از این رخداد تشخیص اولیه و زودهنگام بسیار حیاتی است.^۷

علاوه بر سن، در ابتلا افراد به سرطان تخمدان سابقه ابتلای خانوادگی، هورمون‌ها، رژیم غذایی، موقعیت شغلی، آلاینده‌های زیست محیطی و جهش‌های ژنتیکی از عوامل خطر محسوب می‌شوند.^۸ گذر از حالت اپی‌تلیال به مزانشیمال یک فرآیند کلیدی دخیل در پیشرفت سرطان است که در طی آن سلول‌ها طی یک انتقال از فنوتیپ اپی‌تلیالی به فنوتیپ مزانشیمی با تهاجم و تحرک بیشتر تغییر می‌کنند. گذر اپی‌تلیال-مزانشیمال (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) یک فرآیند فیزیولوژیک است که در طول رشد و نمو جنین و گاهی اوقات در بزرگسالان، برای مثال در هنگام بهبود زخم رخ می‌دهد، از مشخصه‌های اصلی گذر از اپی‌تلیال به مزانشیمال کاهش بیان ژن E-cadherin و افزایش بیان ژن Vimentin است.^۹ این عقیده که گذر اپی‌تلیال-مزانشیمال در تشکیل سلول‌های سرطانی

PCR برای ژن GAPDH در جدول ۲ آورده شده است. واکنش Real-time PCR در هر نمونه cDNA به منظور تعیین مقدار mRNA اولیه برای ژن‌های E-cadherin و Vimentin و ژن GAPDH، به عنوان ژن کنترل، با استفاده از SYBR Green qPCR master mix 2X (Yekta Duplicate Tajhiz Azma, Tehran, Iran, Cat # YT2551) با حجم نهایی ۱۰ μl شامل ۵ μl سایبرگرین، ۲ μl cDNA الگو، ۱ μl پرایمر پس رو و ۱ μl پرایمر پیش رو، ۲ μl آب مقطر مطابق با برنامه دمایی و زمانی جدول ۳ انجام شد و سپس به منظور به دست آوردن Cycle threshold (CT) هر ژن در هر یک از نمونه‌ها Threshold بین ۰/۰۳-۰/۰۵ قرار داده شد و به منظور اطمینان از اتصال اختصاصی پرایمرها منحنی ذوب بررسی گردید.

برای آنالیز آماری از روش آستانه مقایسه‌ای که بر پایه تعیین کمی میزان رونوشت است و در آن مقدار CT نمونه‌های مورد ارزیابی با مقادیر CT کنترل مورد مقایسه قرار می‌گیرد استفاده شد. پس از به دست آوردن CT هر ژن در هر یک از نمونه‌ها از فرمول:

$$\Delta CT = CT \text{ target gene} - CT \text{ reference gene}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ unknown sample} - \Delta CT \text{ Normal control}$$

استفاده گردید و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ Fold Change که نشان دهنده‌ی نسبت تغییرات به استاندارد می‌باشد بیان نسبی هر یک از ژن‌ها به دست آورده شد. واکنش‌ها برای هر نمونه به صورت Duplicate انجام شد. با استفاده از Rotor-Gene Q series software, version 1.7 (Qiagen GmbH, Hamburg, Germany) داده‌های ژن‌ها ارزیابی گردید. Threshold بین ۰/۰۳ و ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و برای ژن کنترل (GAPDH) CT value پیش از سیکل ۳۰ مورد قبول قرار گرفت، سپس نتایج حاصل با استفاده از SPSS software, version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) قرار گرفت، از تست Kolmogorov-Smirnov برای بررسی نرمال بودن توزیع نمونه‌ها استفاده شد.

همچنین از تست‌های Nonparametric Mann-Whitney U (معادل Independent samples t-test) و Kruskal-Wallis H استفاده شد و با استفاده از آزمون فرض که توسط P ارزیابی شد. اختلاف میان دو میانگین پذیرفته یا رد گردید، در این مطالعه $P \leq 0/05$ معنادار

توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است.

استخراج RNA از بافت با استفاده از RiboEx RNA extraction kit (GeneAll Biotechnology, Republic of Korea) ابتدا بافت تخمدان توسط تیغ بیستوری هموژن گردید، سپس به آن ۱ μl محلول RiboEx اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C انجام شد. سپس با افزودن ۲۰۰ μl کلروفرم و انکوباسیون در دمای اتاق به مدت دو دقیقه و سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ °C سه فاز تشکیل شد که فاز رویی حاوی RNA به میکروتیوب جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپرانول اضافه گردید. نمونه به مدت یک شب در ۲۰ °C- انکوبه و سپس سانتریفیوژ شد، به رسوب حاصل ۱ μl اتانول ۷۰٪ اضافه و در دور ۷۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید. در انتها پس از خشک شدن به منظور حل شدن رسوب حاصل DEPC-treated water اضافه شد. سپس RNA استخراج شده به منظور سالم بودن از نظر کیفیت و کمیت مورد ارزیابی قرار گرفت.

کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۱٪ و مشاهده‌ی باندهای 18s و 28s مربوط به RNA ریبوزومی بررسی شد و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر توسط Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) بررسی شد. سپس RNAها تا زمان استفاده در دمای ۸۰ °C- نگهداری شدند. سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده با استفاده از Total RNA extraction kit (Yekta Tajhiz Azma, Tehran, Iran) و با استفاده از آنزیم M-MLV RT در حضور پرایمرهای هگزامری تصادفی صورت گرفت.

به منظور تایید cDNA سنتز شده برای ژن 3-Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH) که یک Housekeeping gene است PCR معمولی انجام شد. به این منظور از پرایمرهای این ژن و Master mix (Ampliqon, Copenhagen, Denmark) که حاوی مواد مورد نیاز Polymerase chain reaction (PCR) است استفاده شد. مخلوطی به حجم ۲۰ μl شامل ۱۰ μl مستر میکس Ampliqon، ۲ μl cDNA الگو، ۱ μl پرایمر پس رو و ۱ μl پرایمر پیش رو و ۶ μl آب مقطر تهیه شد و محصول روی ژل آگارز ۲٪ ران شد. چرخه حرارتی

جدول ۴: داده‌های مربوط به مرحله و درجه بالینی بیماران

درجه	فراوانی	درصد	مرحله	فراوانی	درصد
درجه ۱	۸	۱۱/۴	مرحله ۱	۳۰	۴۲/۹
درجه ۲	۱۳	۱۸/۶	مرحله ۲	۱۶	۲۲/۹
درجه ۳	۱۹	۲۷/۱	مرحله ۳	۱۳	۱۸/۶
درجه ۴	۱۲	۱۷/۱	مرحله ۴	۱۱	۱۵/۷
ناشناخته	۱۸	۲۵/۷	ناشناخته	-	-

جدول ۵: داده‌های مربوط به سابقه ابتلای خانوادگی و متاستاز بیماران

سابقه خانوادگی	فراوانی	درصد	متاستاز	فراوانی	درصد
منفی	۵۲	۷۴/۳	M0	۶۲	۸۸/۶
مثبت	۱۸	۲۵/۷	M1	۸	۱۱/۴

جدول ۶: بررسی رابطه بین بیان ژن Vimentin در مرحله‌های بالینی مختلف

نمونه‌ها ۱ و ۲	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
مرحله‌های ۲ و ۴	۱۲/۸۸۶	۷/۹۷۱	۱/۶۱۷	۰/۱۰۶	۰/۶۳۶
مرحله‌های ۳ و ۴	۱۵/۹۴۴	۸/۳۳۷	۱/۹۱۲	۰/۰۵۶	۰/۳۳۵
مرحله‌های ۱ و ۴	۲۱/۵۳۶	۷/۱۷۳	۳/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۱۶
مرحله‌های ۲ و ۳	-۳/۰۵۸	۷/۵۹۹	-۰/۴۰۲	۰/۶۸۷	۱/۰۰۰
مرحله‌های ۱ و ۲	۸/۶۵۰	۶/۳۰۰	۱/۳۷۳	۰/۱۷۰	۱/۰۰۰
مرحله‌های ۱ و ۳	۵/۵۹۲	۶/۷۵۸	۰/۸۲۸	۰/۴۰۸	۱/۰۰۰

با توجه به نمودار ۱ در Low stage افزایش بیان این ژن و در High stage کاهش بیان این ژن مشاهده شد. با توجه به معنادار بودن رابطه بیان ژن Vimentin با مرحله تومور جهت مقایسه‌های دوگانه در مرحله‌های متفاوت از Dunn's test استفاده شد (نمودار ۲) که بر این اساس، تفاوت معناداری در بیان ژن در مرحله ۱ و مرحله ۴ مشاهده شد ($P=۰/۰۱۶$) (جدول ۶). بر اساس نتایج آزمون Kruskal-Wallis، رابطه معناداری بین بیان ژن Vimentin و درجه تومور مشاهده نشد ($P=۰/۲۰۷$). با توجه به نمودار ۳ در Low grade افزایش بیان این ژن و در High grade کاهش بیان این ژن مشاهده شد. بررسی وضعیت رابطه ژن E-cadherin با مرحله تومور بیانگر عدم وجود رابطه معنادار

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

ژن	پرایمرهای Forward & Reverse
Vimentin	Forward: 5'-GGCTCAGATTCAGGAACAGC-3' Reverse: 5'-AGCCTCAGAGAGGTCAGCAA-3'
E-cadherin	Forward: 5'-GAATGACAACAAGCCCGAAT-3' Reverse: 5'-TTTGTCCAGGGAGCTCAGGAT-3'
GAPDH	Forward: 5'-TCACCAGGGTGTCTTTAAC-3' Reverse: 5'-GACAAGCTCCCGTTCTCAG-3'

جدول ۲: چرخه حرارتی PCR برای ژن GAPDH

PCR Cycle	Number of cycle	Temperature	Duration of Cycle
Initial denaturation	۱	۹۵ °C	۲ min
Denaturation	۲۵-۳۵	۹۵ °C	۳۰ sec
Annealing		۵۷ °C	۳۰ sec
Extension		۷۲ °C	۳۰ sec
Final extension	۱	۷۲ °C	۵ min

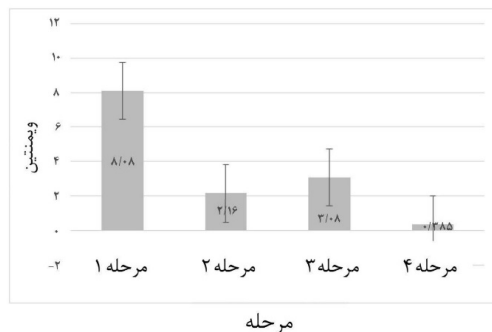
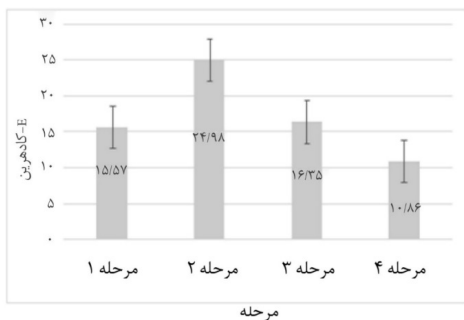
جدول ۳: سیکل‌ها و دماهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

Cycle step	Temp.	Time	Cycles
Initial Denaturation	۹۵ °C	۳ Min	Hold
Denature	۹۵ °C	۱۰ Sec	۴۰ Cycles
Anneal/Extend	۶۰ °C	۲۵ Sec	

شناخته شد. در صورت معنادار بودن از Corrected Dunn's test که برای مقایسه‌های چندگانه تعدیل شده است، استفاده شد. لازم به یادآوری است که هیچ نمونه‌ای بدون رضایت بیمار وارد طرح نشدند.

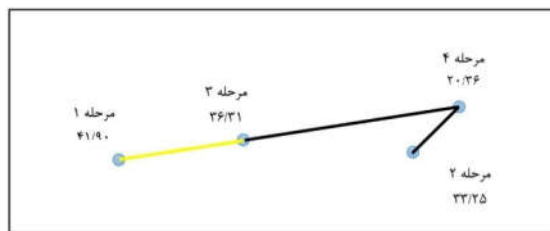
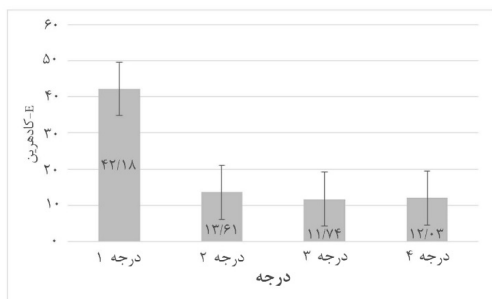
یافته‌ها

در این مطالعه میانگین سن بیماران ۴۷، حداقل سن ۱۵ و حداکثر سن بیماران ۸۳ سال بود، تعداد افراد زیر ۴۰ سال ۲۵ مورد و بالای ۴۰ سال ۴۵ مورد بود. سایر داده‌های دموگرافی بیماران در جدول ۴ و جدول ۵ آورده شده است. بر اساس نتایج آزمون رابطه معناداری بین بیان ژن Vimentin و مرحله تومور مشاهده شد ($P=۰/۰۲۶$). همچنین



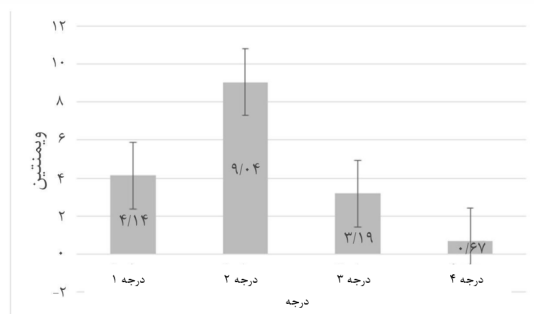
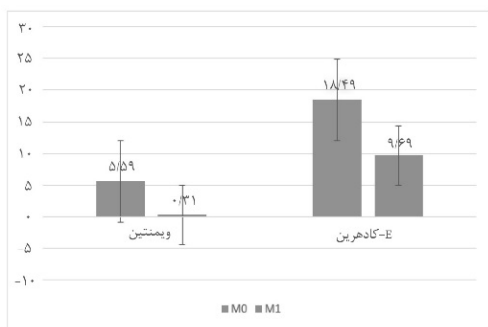
نمودار ۴: میزان بیان ژن E-cadherin در مرحله‌های بالینی مختلف را نشان می‌دهد.

نمودار ۱: میزان بیان ژن Vimentin در مرحله‌های بالینی مختلف را نشان می‌دهد.



نمودار ۵: میزان بیان ژن E-cadherin در درجه‌های پاتولوژی مختلف را نشان می‌دهد.

نمودار ۲: مقایسه دوگانه مرحله‌های متفاوت ژن Vimentin



نمودار ۶: میزان بیان Vimentin و E-cadherin در M0 و M1

نمودار ۳: میزان بیان ژن Vimentin در درجه‌های پاتولوژی مختلف را نشان می‌دهد.

اپی‌تلیالی و افزایش بیان مارکرهای مزانشیمی در EMT نقش دارند، میان بیان Slug و Vimentin با Stage، درگیری غدد لنفاوی ارتباط معناداری نشان داده شد و به‌عنوان بیومارکرهای بالقوه برای پیش‌بینی بیماران با متاستاز و تشخیص ضعیف در سرطان کولورکتال (CRC) معرفی شدند.^{۱۴}

دلیل اختلاف‌های موجود می‌تواند ناشی از این باشد که علاوه بر ژن‌های Vimentin و E-cadherin فاکتورهای دیگری نیز در مسیر گذر اپی‌تلیال-مزانشیمال و متاستاز و پیشرفت سرطان دخیل هستند، همچنین تعداد نمونه‌های مورد مطالعه و تفاوت در روش بررسی می‌تواند در به وجود آمدن این اختلاف تاثیرگذار باشد.

همچنین با توجه به مطالعات صورت گرفته میان بیان ژن E-cadherin و متاستاز گره لنفاوی ارتباط معناداری گزارش شد، با توجه به نتایج به دست آمده ژن E-cadherin در Stage و Grade بالاتر و MI کاهش بیان را نسبت به Stage و Grade پایین‌تر و M0 نشان داد، این کاهش بیان می‌تواند نشان‌دهنده‌ی نقش این ژن در فرآیند تبدیل فنوتیپ اپی‌تلیالی به مزانشیمی (EMT) و افزایش تهاجم و تحرک و متاستاز باشد و همچنین می‌تواند در پیش‌آگهی سرطان اپی‌تلیال تخمدان نقش داشته باشد.

در مطالعه‌ای توسط Zhang و همکاران با بررسی بر روی سرطان تخمدان، گفته شد که در بافت‌های سرطانی تخمدان سطح بیان HIF-1 α ، Snail و E-cadherin با عوامل پاتولوژیک بالینی ارتباط معناداری دارند. همچنین بین سطح بیان E-cadherin و Snail هم بستگی منفی، و بین سطح بیان HIF-1 α و Snail هم بستگی مثبت وجود دارد. HIF-1 α قادر به سرکوب بیان E-cadherin از طریق افزایش بیان Snail است که در نتیجه آن تهاجم و متاستاز در سرطان تخمدان رخ می‌دهد.^{۱۵}

Jiang و همکاران، گزارش کردند FANS پدیده EMT را از طریق تنظیم رونویسی E-cadherin افزایش می‌دهد و بیان بیش از حد FANS موجب متاستازی شدن سلول‌های سرطانی از طریق کاهش بیان E-cadherin در رده‌های سلولی سرطان تخمدان در هر دو سطح mRNA و پروتیین می‌شود.^{۱۶}

Lau و همکاران اظهار داشتند که FGF2 موجب افزایش تهاجم سلول‌های سرطان تخمدان به واسطه‌ی کاهش بیان E-cadherin از طریق فعال‌سازی PI3K/AKT/MTOR و MAPK/ERK سیگنالینگ و

معنادار بین ژن E-cadherin و مرحله تومور بود ($P=0/753$). همچنین با توجه به نمودار ۴ در Low stage افزایش بیان این ژن نسبت به High stage مشاهده شد.

بر اساس نتایج آزمون رابطه معناداری بین بیان ژن E-cadherin و درجه تومور مشاهده نشد ($P=0/690$). همچنین با توجه به نمودار ۵ در Low grade افزایش بیان ژن E-cadherin نسبت به High grade مشاهده شد.

از آزمون Mann-Whitney جهت بررسی رابطه بیان این دو ژن با متاستاز استفاده شد، بر اساس نتایج بین بیان ژن Vimentin با متاستاز رابطه معناداری مشاهده شد ($P=0/009$). همچنین بین بیان ژن E-cadherin با متاستاز رابطه معناداری مشاهده شد و سطح معناداری آن گزارش شد. با توجه به نمودار ۶ ژن‌های Vimentin و E-cadherin در M0 افزایش بیان و در M1 کاهش بیان را نشان دادند. همچنین با توجه به نتایج بین بیان ژن E-cadherin با سن ($P=0/09$)، سایز تومور ($P=0/537$) و سابقه ابتلای خانوادگی ($P=0/56$) ارتباط معناداری مشاهده نشد، همچنین بین بیان ژن Vimentin با سن ($P=0/11$)، سایز تومور ($P=0/71$) و سابقه ابتلای خانوادگی ($P=0/6$) ارتباط معناداری مشاهده نشد.

بحث

در مطالعه‌ای که توسط Li و همکاران با روش ایمونوهیستوشیمی روی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان صورت گرفت، نشان داده شد که بیان هم زمان Twist2/Vimentin یک شاخص پیش‌آگهی مستقل در بیماران مبتلا به سرطان اپی‌تلیال تخمدان است. Twist2، EMT را از طریق کاهش بیان E-cadherin در سلول‌های اپی‌تلیالی و افزایش بیان Vimentin در سلول‌های مزانشیمی تنظیم می‌کند که ممکن است در پیشرفت و پیش‌آگهی سرطان تخمدان نقش داشته باشد.^{۱۲}

Liu و همکاران با روش ایمونوهیستوشیمی با بررسی بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان گزارش کردند که بیان بالای Slug و Vimentin و بیان پایین E-cadherin با Grade بافت‌شناسی، متاستاز گره لنفاوی، Stage TNM و متاستاز عروق لنفاوی در ارتباط است.^{۱۳} Toiyama و همکاران با بررسی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال اظهار داشتند که Slug و Vimentin از طریق کاهش بیان مارکرهای

داروهای کمورادیوتراپی و متاستاز را دارد.^{۲۰} پیشنهاد می‌شود مطالعه بیان دو ژن E-cadherin و Vimentin در طیف گسترده‌تری از بیماران صورت گیرد، از سایر روش‌های بیان ژن استفاده شود و بررسی این دو ژن در سطح پروتئینی صورت گیرد، همچنین نقش این دو ژن به‌عنوان هدفی برای درمان سرطان تخمدان بررسی شود. از محدودیت‌های مطالعه صورت گرفته، کم بودن تعداد نمونه‌ها و یک‌دست نبودن داده‌ها، نبود بافت نرمال تخمدان و استفاده از بافت مجاور تومور می‌باشد. مطالعه فوق نشان‌دهنده تغییر بیان هر دو ژن E-cadherin و Vimentin به‌عنوان فاکتورهای دخیل در فرآیند EMT در سلول‌های توموری تخمدان و بارز بودن این تفاوت در مراحل بالینی و پاتولوژی مختلف بود.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی بیان عوامل مولکولی موثر در تغییر رفتار تهاجمی سلول‌های سرطانی در میان بیماران مبتلا به سرطان پستان و تخمدان" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۱۳۹۱ به کد ۲۰۵۶۷-۰۴-۹۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

تنظیم بالای Slug و ZEB1 می‌شود.^{۱۷} Song و همکاران با بررسی بر روی نمونه‌های بافتی و بافت مجاور نرمال بیماران مبتلا به سرطان حنجره با روش ایمونوهیستوشیمی اظهار داشتند که بین سطح بیان E-cadherin، N-cadherin و β -catenin با متاستاز غدد لنفاوی، Stage، درجه تمایز ارتباط معنی داری وجود داشت. بیان پایین E-cadherin و بیان بالای N-cadherin و β -catenin نقش مهمی در بروز و توسعه سرطان حنجره ایفا می‌کند و می‌تواند یک مرجع برای ارزیابی پیش‌آگهی بالینی باشد.^{۱۸}

Calangiu و همکاران از نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی صورت گرفته بر روی سرطان تیروئید بیان داشتند که بین E-cadherin، Vimentin و اندازه و گسترش تومور ارتباط معنادار وجود دارد. بین E-cadherin، Vimentin و سن، جنس و متاستاز گره لنفاوی و Stage تومور تفاوت معنادار وجود ندارد.^{۱۹} اختلاف‌های موجود در این مطالعه و مطالعات صورت گرفته می‌تواند ناشی از هتروژنی بافت سرطانی باشد، بافت توموری از جمعیت سلولی به نام سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) منشا می‌گیرد که قابلیت آغاز تومورزایی، حفظ بافت توموری، مقاومت به

References

1. Tiwari A, Hadley JA, Hendricks GL 3rd, Elkin RG, Cooper T, Ramachandran R. Characterization of ascites-derived ovarian tumor cells from spontaneously occurring ovarian tumors of the chicken: evidence for E-cadherin upregulation. *PLoS One* 2013;8(2):e57582.
2. Wang Y, Sheng Q, Spillman MA, Behbakht K, Gu H. Gab2 regulates the migratory behaviors and E-cadherin expression via activation of the PI3K pathway in ovarian cancer cells. *Oncogene* 2012;31(20):2512-20.
3. Zhao H, Yang Z, Wang X, Zhang X, Wang M, Wang Y, et al. Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of E-cadherin. *Exp Mol Med* 2012;44(11):633-41.
4. Abubaker K, Luwor RB, Zhu H, McNally O, Quinn MA, Burns CJ, et al. Inhibition of the JAK2/STAT3 pathway in ovarian cancer results in the loss of cancer stem cell-like characteristics and a reduced tumor burden. *BMC Cancer* 2014;14:317.
5. Buehler M, Tse B, Leboucq A, Jacob F, Caduff R, Fink D, et al. Meta-analysis of microarray data identifies GAS6 expression as an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Biomed Res Int* 2013;2013:238284.
6. Arab M, Khayamzadeh M, Tehranian A, Tabatabaefar M, Hosseini M, Anbiaee R, et al. Incidence rate of ovarian cancer in Iran in comparison with developed countries. *Indian J Cancer* 2010;47(3):322-7.
7. Berry NB, Bapat SA. Ovarian cancer plasticity and epigenomics in the acquisition of a stem-like phenotype. *J Ovarian Res* 2008;1:8.
8. Cook J. Family history of ovarian cancer. *Curr Obstet Gynecol* 2002;12(1):47-51.
9. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(18):3033-46.
10. Thompson EW, Torri J, Sabol M, Sommers CL, Byers S, Valverius EM, et al. Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. *Clin Exp Metastasis* 1994;12(3):181-94.
11. Abolhassani A, Riazi GH, Azizi E, Amanpour S, Muhammadnejad S, Haddadi M, et al. FGF10: Type III Epithelial Mesenchymal Transition and Invasion in Breast Cancer Cell Lines. *J Cancer* 2014;5(7):537-47.
12. Li X, Yang J, Wang X, Li X, Liang J, Xing H. Role of TWIST2, E-cadherin and Vimentin in epithelial ovarian carcinogenesis and prognosis and their interaction in cancer progression. *Eur J Gynaecol Oncol* 2016;37(1):100-8.
13. Liu T, Zhang X, Shang M, Zhang Y, Xia B, Niu M, et al. Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer. *J Surg Oncol* 2013;107(2):188-94.
14. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Goel A, et al. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2013;34(11):2548-57.
15. Zhang Y, Fan N, Yang J. Expression and clinical significance of hypoxia-inducible factor 1 α , Snail and E-cadherin in human ovarian cancer cell lines. *Mol Med Rep* 2015;12(3):3393-9.

16. Jiang L, Wang H, Li J, Fang X, Pan H, Yuan X, et al. Up-regulated FASN expression promotes transcoelomic metastasis of ovarian cancer cell through epithelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Sci* 2014;15(7):11539-54.
17. Lau MT, So WK, Leung PC. Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells. *PLoS One* 2013;8(3):e59083.
18. Song P, Qian X, Zhou H, Shen X, Liu D, Feng A, et al. Expression of E-cadherin, N-cadherin, β -catenin and their clinical significance in laryngeal carcinoma. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2016;51(6):440-5.
19. Calangiu CM, Simionescu CE, Stepan AE, Cernea D, Zăvoi RE, Mărgăritescu C. The expression of CK19, vimentin and E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2014;55(3):919-25.
20. Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, et al. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* 2006;374:174-9.

Determination of E-cadherin and vimentin genes expression on the tumor specimens of ovarian cancer patients

Seyedeh Hakimeh Rezazadeh M.Sc.¹

Reza Shirkoohi MD., Ph.D.^{2*}

Abdolhamid Angaji Ph.D.³

Seyed Yusef Seyedena Ph.D.⁴

Amir Nader Emami Razavi Ph.D.²

1- Cell and Molecular Group, Azad University of North Tehran, Tehran, Iran.

2- Cancer Biology Research Center, Iran Cancer Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Life Sciences Kharazmi University, Tehran, Iran.

4- Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biology, Azad University of Tehran North, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Cancer Biology Research Center, Iran Cancer Institute, Keshavarz Blvd., Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66914545
E-mail: rshirkoohi@tums.ac.ir

Abstract

Received: 06 Aug. 2017 Revised: 13 Aug. 2017 Accepted: 6 May 2018 Available online: 14 May 2018

Background: Ovarian cancer is a leading metastatic disease. The epithelial ovarian cancer is one of the most common malignant cancers that usually remains asymptomatic up to metastasis stages, and most patient when diagnosed are in the advanced stage of the disease. Studies have shown that in the majority of epithelial cancers mesenchymal factor expression such as Vimentin increases, and the epithelial factor expression such as E-cadherin decreases, as a result, it causes an epithelial-mesenchymal transition (EMT). The aim of this study was to determine the expression level of these genes and association between EMT phenomenon and development of ovarian cancer based on clinical and morphological findings.

Methods: In the present case series study, 70 samples were chosen from the tumor Bank of Cancer Institute taken from patients at Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran. The amount of expression of two genes, E-cadherin and vimentin, was investigated by real-time PCR method from February 2016 to September 2017. The RNA extraction was done manually, and then cDNA synthesis was performed; In each sample the expression level of vimentin and E-cadherin was measured with real-time PCR method. The patient's clinical information with other data were analyzed with nonparametric statistical methods in SPSS software, version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results: There was a significant relationship between expression of vimentin gene and the stage ($P=0.026$) of the disease and metastasis ($P=0.009$), There was no significant relationship between vimentin gene expression and tumor grade ($P=0.207$), age ($P=0.11$), tumor size ($P=0.71$) and family history ($P=0.6$). There was a significant correlation between E-cadherin gene expression and metastasis ($P=0.027$), no significant correlation was found between E-cadherin gene expression with tumor grade ($P=0.690$), stage ($P=0.753$), age ($P=0.09$), tumor size ($P=0.537$) and family history ($P=0.56$).

Conclusion: According to the changes in expression of vimentin and E-cadherin genes in ovarian tumor cells, and association between these two genes with clinical and morphological findings and the role of these genes in the migration and invasion, we can use the both genes, vimentin and E-cadherin, as genes involved in the EMT process to assess disease progression and incidence of cell invasion in ovarian cancer.

Keywords: epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, ovarian epithelial cancer, polymerase chain reaction, vimentin.