

بررسی کمی بیان ژن Bid در نمونه بیوپسی پولیپ‌های آدنوماتوز روده بزرگ

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۰ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۶ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴

زمینه و هدف: اکثر سرطان‌های روده بزرگ از پولیپ‌ها منشا می‌گیرند. بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در رشد و توسعه تومور بر روی پولیپ‌های روده بزرگ می‌تواند عاملی برای تشخیص روند بدخیمی پولیپ‌ها باشد. یکی از عوامل سرطان، اختلال در عملکرد آپوپتوز می‌باشد. Bid، یکی از مهمترین عوامل این مسیر، رابط بین مسیر خارجی و مسیر داخلی آپوپتوز می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی بیان کمی رونوشت ژن Bid در پولیپ‌های آدنوماتوز روده بزرگ نسبت به افراد سالم بود.

روش بررسی: جامعه مورد بررسی مراجعین دارای پولیپ روده بزرگ، به بیمارستان آیت الله طالقانی تهران، از اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۳ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۵ بودند. در این پژوهش تحلیلی-توصیفی تعداد ۲۲ نمونه بیوپسی پولیپ آدنوماتوز، به همراه ۱۰ نمونه بافت از افراد سالم به عنوان گروه کنترل همراه با اطلاعات دموگرافیک و بالینی جمع‌آوری گردید. میزان بیان ژن Bid به روش qReal-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها با استفاده از SDS GraphPad Prism, version 5 (GraphPad software, version 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) و Software Inc., La Jolla, CA, USA) آنالیز و تغییرات بیان ژن توسط روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارزیابی شد.

یافته‌ها: بر پایه مطالعه qReal-time PCR، افزایش بیان ژن Bid در نمونه‌های بافت پولیپ آدنوماتوز افراد بیمار نسبت به نمونه بافت افراد نرمال مشاهده شد ($RQ > 2$). همچنین پولیپ‌های موجود در کولون بالا رو، کولون افقی، کولون پایین رو و رکتوم افزایش بیان نسبت به گروه کنترل نشان دادند، اما در بخش سیگموئید روده تغییر بیانی نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن Bid در پولیپ آدنوماتوز نسبت به بافت نرمال افراد سالم، نشان می‌دهد احتمالاً در پاسخ به شروع دیسپلازی و اختلال در چرخه آپوپتوز این ژن با افزایش بیان سعی در جبران وقوع آپوپتوز دارد.

کلمات کلیدی: پولیپ آدنوماتوز، آپوپتوز، ژن Bid، سرطان کولورکتال.

فاطمه سادات کیا^۱

احسان ناظم الحسینی مجرد^۲

فلورا فروزش^{۱*}

۱- گروه ژنتیک، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه سرطان، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان دکتر شریعتی، خیابان خاقانی (زرکند)، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد تهران.

تلفن: ۰۲۱-۲۲۰۰۶۶۶۰

E-mail: f8forouzes@ gmail.com

مقدمه

آمده از سرطان روده نشان می‌دهد که حدود ۳۰ تا ۴۰٪ موارد این سرطان در سنین پایین‌تر از ۵۰ سال بوده و سابقه خانوادگی از نظر وجود سرطان‌های غیرروده‌ای و همچنین روده‌ای در بین افراد مبتلا بیشتر است و این خود مؤید وجود الگوی اپیدمیولوژی متفاوت با

سرطان روده بزرگ، سومین سرطان شایع در سراسر جهان در مردان و زنان است. در سال‌های اخیر در کشور ما آمارهای به دست

BID یک پروتیین "BH3-only" می‌باشد که اندازه‌ی آن ۲۲ کیلودالتون است و با دیگر پروتیین‌های خانواده‌ی Bcl2 از نظر دارا بودن ناحیه‌ی BH3 که القاء کننده‌ی مرگ سلول می‌باشد شباهت دارد. BID نقش منحصر به فردی در سیگنالینگ ایفا می‌کند، چرا که، مسیر سیگنالینگ گیرنده‌ی مرگ (مسیر داخلی) که به واسطه‌ی پروتیین‌های Bcl2 انجام می‌شود، متصل می‌کند. اتصال گیرنده‌ی مرگ، کاسپاز ۸ را فعال می‌کند که آن BID را می‌شکافد و بخش C ترمینال BID، که به آن tcBID می‌گویند، آزاد شده و در آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری شرکت می‌کند.^{۱۴و۱۳}

هدف از این مطالعه بررسی تغییرات کمی بیان ژن Bid به‌عنوان مولکول رابط بین مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز در پولیپ‌های آدنوماتوز روده بزرگ در مقایسه با بافت روده نرمال افراد سالم به عنوان نمونه کنترل بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تحلیلی-توصیفی و نوع انتخاب و نمونه‌گیری در این مطالعه تصادفی بوده است که از افراد دارای پولیپ روده بزرگ بین سال‌های ۹۳ تا ۹۵ جهت درمان یا تشخیص به بیمارستان آیت الله طالقانی تهران مراجعه کرده بودند، انجام شد. پس از انجام غربالگری و بررسی‌های لازم در نهایت تعداد ۲۲ نفر که دارای پولیپ‌های آدنوماتوز در روده بزرگ بودند و نیز تعداد ۱۰ نمونه سالم به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. داده‌های دموگرافیک شامل سن و جنس از پرونده بیماران استخراج گردید. از ۲۲ نفر افرادی که دارای پولیپ‌های آدنوماتوز در روده بزرگ بودند، با میانگین سنی ۵۲ سال، پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی (بر اساس استاندارد هلسینکی، مصوبه کمیته اخلاق پزشکی) نمونه بافت تهیه شد.

از نمونه‌های بافت، RNA توسط Total RNA extraction kit (Yekta Tajhiz Azma, Cat # YT 9065) استخراج شد. برای استخراج RNA، محلول PBS که بافت مورد نظر (۳۰ mg) در آن قرار داشت خارج شد و بر روی بخار سرد نیتروژن مایع، که در حال تصعید است، لیز شدند.

از نمونه‌های بافت لیز شده اضافه گشت. محلول RB buffer (β -ME adds) به بافت لیز شده اضافه گشت.

کشورهای غربی می‌باشد. آمارها نشان می‌دهد، شیوع بیماری در کشور ما رو به افزایش است و به‌عنوان یکی از مهمترین سرطان‌ها در هر دو جنس مطرح می‌باشد. عمده دلیل بروز سرطان روده بزرگ، وجود پولیپ در روده بزرگ و طی کردن مسیر آدنوما به کارسینوما تبدیل پولیپ‌های خوش‌خیم به بدخیم می‌باشد.^۱ پولیپ‌های نئوپلاستیک (آدنوماتوز)، پتانسیل بدخیمی دارند و به‌عنوان یک فاکتور مهم در گسترش سرطان کولورکتال در نظر گرفته می‌شوند، به همین دلیل ارزیابی و شناسایی این پولیپ‌ها در مراحل اولیه دارای اهمیت است.^۲ پولیپ‌های نئوپلاستیک از سلول‌های اپیتلیال مخاط روده سرچشمه گرفته‌اند.^۳ این پولیپ‌ها از لحاظ بافت‌شناسی شبیه به دیسپلازیا می‌باشند. با بزرگ شدن آدنوماها بهتر و آسان‌تر به بافت‌های اطراف حمله می‌کنند و در این حالت به آن‌ها پولیپ‌های بدخیم گفته می‌شود.^{۴-۶} در نتیجه اغلب پولیپ‌های آدنوماتوز در سرطان کولورکتال دخالت دارند. در مطالعات اولیه که در سال‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ انجام شد، Shinya و همکارانش نشان دادند که چگونگی تغییرات ژنتیکی می‌تواند منجر به پیشرفت تومورهای کولورکتال و تغییر توالی از آدنوما به کارسینوما شوند.^{۷و۶}

توانایی فرار از آپوپتوز یکی از علت‌های تغییر فیزیولوژی سلول و ایجاد سرطان می‌باشد.^{۹-۷} نقص در آپوپتوز نقش مهمی در تشکیل تومورها و ایجاد نئوپلازی بازی می‌کند و به‌هم خوردن تنظیم آن باعث مقاومت به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌شود. این روند ممکن است باعث افزایش متاستاز بشود.^{۸و۱۰} تدابیر آپوپتوتیک برای کشتن سلول‌های تومورها، شامل القای مستقیم مولکول‌های پروآپوپتوتیک و تعدیل پروتیین‌های آنتی‌آپوپتوتیک یا بازسازی عملکرد ژن‌های مهار کننده رشد تومورها است.^{۱۱و۱۲}

آپوپتوز طی دو مسیر اصلی اتفاق می‌افتد. مسیر خارجی از طریق گیرنده مرگ FAS آغاز می‌شود. مسیر داخلی باعث آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن پیام‌های مرگ می‌شود. هر دو مسیر یک وجه اشتراک دارند که آن فعال کردن کاسپازها است. یک گروه از پروتیین‌های مهم تشکیل دهنده مسیر داخلی، پروتیین‌های خانواده Bcl2 هستند. خانواده Bcl2 خود شامل دو گروه است: اعضای آنتی‌آپوپتوتیک؛ شامل Bcl2، Bclw، Bclx1 و اعضای پروآپوپتوتیک، شامل Bid و Bim، Bax، Puma، Noxa، Bax، Bak می‌باشند.^{۱۳و۱۲و۱۰و۹}

استفاده از Gene Runner software, version 3.05 (http://www.generunner.com) انجام شد.

سپس از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI، توسط Primer BLAST و Nucleotide BLAST درستی و اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، مورد تایید قرار گرفت (جدول ۲). به منظور انجام واکنش Real-time PCR از دستگاه ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) و روش SYBR® Green Real-time PCR master mixes (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) استفاده گردید. بر اساس دستورکار SYBR Premix Ex Taq™ II Kit (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) مخلوط واکنش با استفاده از SYBR Green و پرایمرهای فرادست و فرودست، cDNA و آب مقطر استریل دو بار تقطیر آماده شد. اجزای واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ μl تهیه شد که شامل بافر 2X، ۱۰ μl، ROX(IX)، ۰/۳ μl، پرایمر فرادست (10 pmol)، ۱ μl، پرایمر فرودست (10 pmol)، ۱ μl، آب دیونیزه، ۲/۷ μl و cDNA الگو، ۵ μl بود.

واکنش‌ها به صورت دوتایی به همراه یک واکنش بدون الگو (NTC) برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام گردید. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش Real-time PCR یکسان و به صورت زیر انجام شد:

واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، واسرشتگی در دمای ۹۵ °C به مدت پنج ثانیه، اتصال و گسترش در دمای ۱۰ °C به مدت ۳۴ ثانیه صورت گرفت. این سه مرحله طی ۴۰ سیکل تکرار شد.

پس از انجام واکنش Relative quantitative real-time PCR، داده‌های خام به صورت Ct و Relative quantification (RQ) از دستگاه استخراج شد و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم گراف توسط GraphPad Prism, version 3.05 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) انجام شد. بررسی میزان تغییرات بیان ژن مورد مطالعه در این بررسی نسبت به گروه کنترل با روش Fold change یا $2^{-\Delta\Delta CT}$ صورت گرفته است.

روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ به منظور محاسبه تغییرات کمی در میزان بیان ژن انجام شده است و سطح بیان mRNA ژن‌های هدف با مقدار RQ مورد محاسبه قرار گرفت. میزان تغییرات بیان ژن هدف در پولیپ‌ها با بیان

روی Filter column منتقل شد و به مدت دو دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. ۳۵۰ μl اتانول ۷۰٪ به محلول اضافه گردید و ورتکس انجام شد. محلول به RB mini column انتقال داده شد و با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. این فیلتر حاوی RNA نهایی بود. سپس با بافر شستشو، شستشو داده شد و در نهایت RNA تخلیص شده در ۷۰ °C - نگهداری شدند. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن به ترتیب توسط روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید. برای سنتز cDNA، غلظت ۲۰۰۰ ng از RNA های استخراج شده با کیفیت مناسب (نسبت جذب نوری A260/A280 بالای ۱/۸) مورد استفاده قرار گرفت و بر اساس کاردستور ۶۱۱۰ PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) سنتز انجام شد. به منظور Unfold کردن RNA، به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ °C قرار داده شد، سپس بلافاصله روی یخ منتقل گردید تا در این وضعیت به طور ثابت باقی بماند. سپس Master mix بر اساس کاردستور کیت آماده شد و به تیوب حاوی RNA اضافه شد. در نهایت cDNA سنتز شده در دمای ۲۰ °C - نگهداری شدند.

برای تایید درستی سنتز cDNA، PCR با یک ژن خانه‌داری، (ژن GAPDH) انجام شد (جدول ۱). اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ μl تهیه شد که شامل بافر 10X، ۲/۵ μl، آنزیم Taq پلیمرز، ۰/۲۵ μl، dNTP (10mM)، ۰/۵ μl، MgCl2 (50 mM)، ۰/۷۵ μl، پرایمر فرادست (10 pmol)، ۱ μl، پرایمر فرودست (10 pmol)، ۱ μl، آب دیونیزه، ۱۷ μl و cDNA، ۲ μl بود.

۹۵ °C به مدت پنج دقیقه، ۳۵ سیکل به ترتیب ۹۵ °C به مدت ۳۵ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۵ ثانیه و طولی سازی نهایی نیز طی یک سیکل در دمای ۷۲ °C به مدت پنج دقیقه انجام شد. پس از اتمام واکنش، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۱۰ ولت به ازای هر سانتی متر ژل، الکتروفورز گردید.

طراحی پرایمر: در این مطالعه ژن Bid به عنوان ژن هدف و ژن بتا 2 میکروگلوبولین (β2m) به عنوان کنترل داخلی در روش Real-time PCR استفاده شد. ابتدا توالی ژن‌ها از سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) و Ensembl (http://www.ensembl.org/) به دست آمد. طراحی پرایمرها با

جدول ۱: مشخصات پرایمر GAPDH

پرایمرها	توالی	نوکلئوتید	GC%	دمای ذوب	اندازه محصول	کد ژن
پرایمر فرادست GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	۱۹	۵۷/۹	۵۶/۲	۲۳۶ جفت باز	۱۰۰۱۴۲۷۷
پرایمر فرودست GAPDH	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	۲۰	۴۵	۵۲/۸		

جدول ۲: مشخصات پرایمرها

پرایمرها	توالی	نوکلئوتید	GC%	دمای ذوب	اندازه محصول	کد ژن
پرایمر فرادست ژن Bid	5'_AAGTGGCTGGGCTGGCAAG_3'	۱۹	۶۳/۲	۶۲/۲	۱۳۷ جفت باز	AF250233.1
پرایمر فرودست ژن Bid	5'_CCAGTGGCGACAGAATCCG_3'	۱۹	۶۳/۲	۵۹/۹		
پرایمر فرادست ژن β2m	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'	۲۵	۴۰	۶۰/۳	۸۶ جفت باز	KP129981.1
پرایمر فرودست ژن β2m	5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAG-3'	۲۱	۵۷/۴	۶۰/۳		

ژن کنترل داخلی (بتا ۲ میکروگلوبین) نرمالیزه شد و با میزان تغییر بیان ژن در گروه کنترل به صورت نسبی بررسی شد. در واقع ارتباط معنادار میان گروه‌های مختلف نمونه با گروه کنترل توسط مقادیر RQ مورد سنجش قرار گرفت. بدین صورت که $RQ < 0.5$ بیانگر کاهش بیان ژن و $RQ > 2$ افزایش بیان ژن را نشان می‌دهد. همچنین $2 < RQ < 0.5$ نشان دهنده این است که تغییر در بیان ژن نسبت به گروه کنترل به صورت نرمال بوده است. با بهره‌گیری نمودار نتایج حاصل از Real-time PCR

رسم گردید.

جدول ۳: اطلاعات دموگرافی و توصیفی و داده‌های مربوط به فراوانی پولیپ‌های آدنوماتوز در نواحی مختلف روده

مشخصات	متغیر	فراوانی (درصد)
جنس	مرد	۱۴ (۶۳/۶)
	زن	۸ (۳۷/۶)
سن	کمتر از ۵۰ سال	۹ (۴۰/۹)
	بالای ۵۰ سال	۱۳ (۵۹/۰۹)
سابقه خانوادگی	دارد	۸ (۳۶/۳۶)
	ندارد	۱۴ (۶۳/۶۳)
محل قرارگیری پولیپ‌ها	کولون بالا رونده	۴ (۱۸/۱۸)
	کولون افقی	۶ (۲۷/۲۷)
	کولون پایین رونده	۵ (۲۲/۲۲)
	سیگموئید	۱ (۴/۵)
	رکتوم	۶ (۲۷/۲۷)

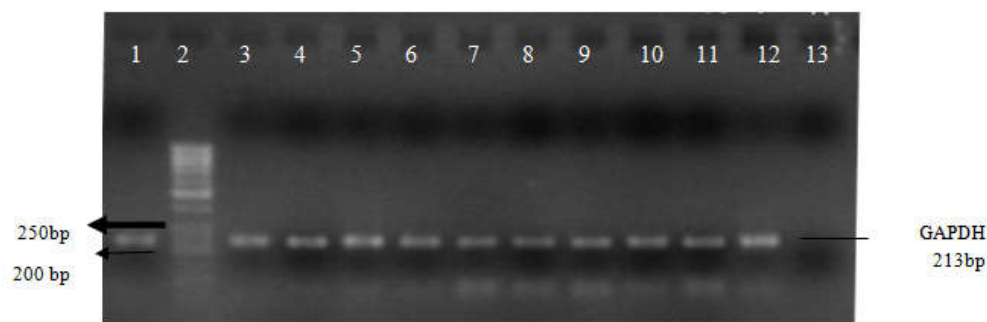
یافته‌ها

داده‌های دموگرافی و بالینی مربوط به ۲۲ بیمار دارای پولیپ آدنوماتوز که از پرونده بیماران استخراج گردید، در جدول ۳ آورده شده است.

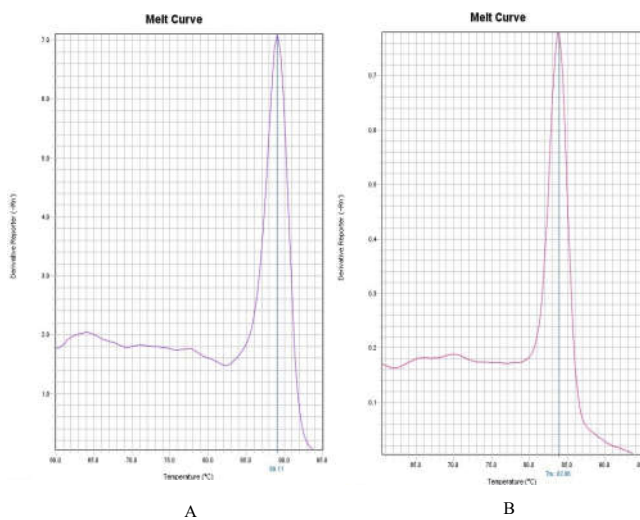
همچنین ۲۲ نمونه پولیپ آدنوماتوز مورد مطالعه از قسمت‌های متفاوت روده بزرگ شامل کولون بالا رونده، افقی، پایین رونده، سیگموئید و بخش رکتوم بود که تعداد و درصد آن‌ها در جدول ۳ نمایش داده شده است. نتایج بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراجی توسط NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher



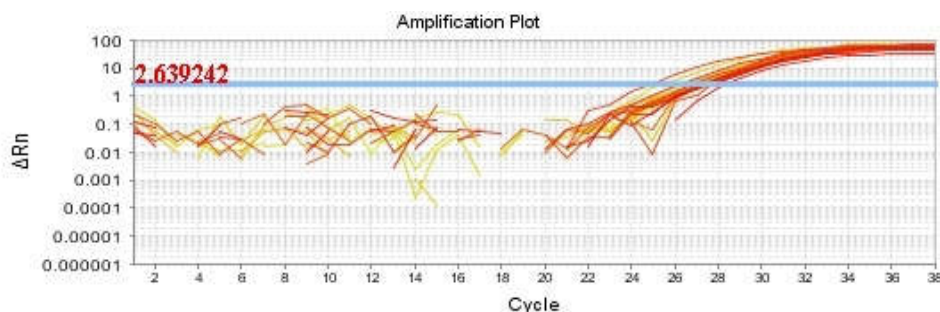
شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن GAPDH نمونه‌های بافت پولیپ آدنوماتوز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک‌های ۱ تا ۲۲: محصول PCR از cDNA بافت پولیپ آدنوماتوز افراد بیمار، چاهک L: مارکر (100bp) (#SM0321)، چاهک‌های pc: کنترل مثبت، چاهک nc: کنترل منفی. قطعه باند مورد نظر ۲۳۶ جفت باز می‌باشد. (در چاهک‌هایی که با علامت - نشان داده شده، نمونه‌های الکتروفورز نشده است).



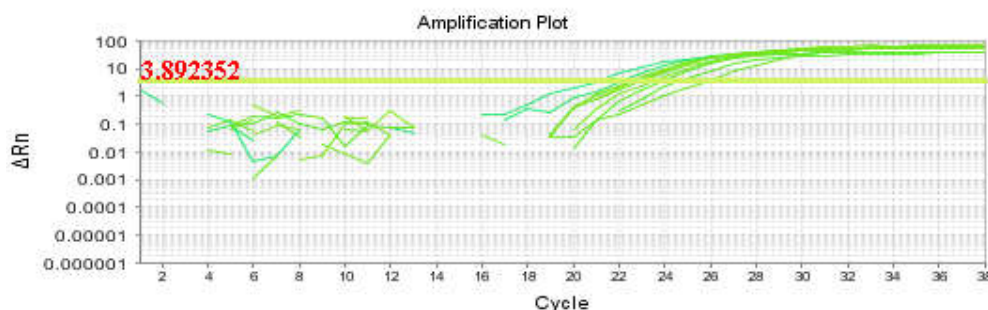
شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن GAPDH نمونه‌های بافت نرمال بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک ۱: محصول PCR از cDNA بافت فرد نرمال، چاهک ۲: مارکر (50bp) (#SM1133)، چاهک‌های ۳ الی ۱۲: محصول PCR از cDNA بافت فرد نرمال، چاهک ۱۳: کنترل منفی. قطعه باند مورد نظر ۲۳۶ جفت باز می‌باشد.



نمودار ۱: منحنی ذوب مربوط به پرایمر Bid (A): منحنی ذوب مربوط به پرایمر Bid (B): منحنی ذوب مربوط به پرایمر $\beta 2m$



نمودار ۲: منحنی تصاعدی (Amplification plot) حاصل از Real-time PCR ژن Bid برحسب (سیکل- ΔRn) برای نمونه‌های مربوط به نمونه بافت پولیپ آدنوماتوز و نمونه بافت افراد نرمال. خط قرمز افقی مربوط به خط حد آستانه می‌باشد. سیکل حد آستانه (ct) برای نمونه‌ها توسط دستگاه محاسبه شده است و ۲/۶۳۹۲۴۲ می‌باشد.



نمودار ۳: منحنی تصاعدی (Amplification plot) حاصل از Real-time PCR ژن $\beta 2m$ برحسب (سیکل- ΔRn) برای نمونه‌های مربوط به نمونه بافت پولیپ و نمونه بافت افراد نرمال. خط زرد افقی مربوط به خط حد آستانه می‌باشد. سیکل حد آستانه (ct) برای نمونه‌ها توسط دستگاه محاسبه شده است و ۳/۸۹۲۳ می‌باشد.

کنترل مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی نتایج مشخص شد تغییرات بیان ژن Bid در نمونه‌های پولیپ آدنوماتوز نسبت به نمونه‌های افراد نرمال افزایش بیان دارد ($2 > \text{میانگین RQ}$) که از نظر آماری معنادار است ($P=0/0139$). در رابطه با شاخص جنس افزایش بیان ژن Bid در هر دو جنس مردان و زنان حاوی پولیپ، افزایش بیان در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (بیان در هر دو جنس ≤ 2 برابر بافت نرمال). اما بیان این ژن در میان دو جنس تفاوت معناداری نداشت ($P=0/052$). ارتباط بین شاخص سن با تغییرات بیان ژن Bid بررسی شد که با توجه به این نتایج در هر دو گروه افراد بالای ۵۰ سال و زیر ۵۰ سال دارای پولیپ، افزایش بیان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (تغییرات

به بافت افراد نرمال در شکل ۲ نشان داده شده است. باند مورد نظر، ۲۳۶ جفت باز می‌باشد. به منظور حصول اطمینان از نبود پیک‌های غیراختصاصی، عدم وجود ساختارهای ثانویه پرایمر در محصولات Real-time PCR و تولید قطعات اختصاصی، منحنی ذوب رسم شد (نمودار ۱). نتایج منحنی ذوب نشان داد که هر دو جفت پرایمر Bid و $\beta 2m$ به صورت اختصاصی عمل می‌کند.

نتایج و منحنی تکثیر ژن‌های Bid و $\beta 2m$ با استفاده از Real-time PCR که در نمودارهای ۲ و ۳ آورده شده است، نشان داد که تکثیر به خوبی صورت گرفته است. میزان بیان ژن Bid در نمونه‌های پولیپ آدنوماتوز به صورت مقایسه‌ای با نمونه‌های افراد نرمال به‌عنوان گروه

به شروع دیسپلازی و اختلال در چرخه آپوپتوز این ژن با افزایش بیان سعی در جبران وقوع آپوپتوز را دارد. این الگوی تغییر و افزایش بیان در بافت پولیپ نسبت به فرد سالم دارای اهمیت است.

در این پژوهش، میان شاخص‌های دموگرافیک همچون سن و جنس و بیان ژن *Bid*، به‌عنوان یک فاکتور آنتی آپوپتوتیک و موثر در ایجاد بدخیمی، ارتباط معناداری مشاهده نشد. در سال ۲۰۱۶ Peyravian و همکارانش، در بررسی بیان ژن CD86 در پولیپ‌های روده بزرگ به این نتیجه دست یافتند که بیان این ژن در افراد بالای ۵۰ سال به‌طور معناداری بیش از افراد با سن کمتر از ۵۰ سال می‌باشد که در واقع بیان ژن مورد مطالعه در آن پژوهش با شاخص سن ارتباط معناداری را نشان داد.^{۱۶}

در مطالعه حاضر پولیپ‌های مستقر در قسمت‌های مختلف روده افزایش بیان معنادار را نسبت به گروه کنترل نشان دادند، در حالی‌که در پولیپ‌های موجود در بخش سیگموئید روده تغییر بیان نسبت به بافت نرمال مشاهده نشد که احتمالاً می‌تواند به دلیل کم بودن تعداد پولیپ از این ناحیه باشد (جدول ۳). بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات Borroff و همکارانش مبنی بر میزان تشخیص پولیپ و آدنوما در بخش‌های پروگزیمال و دیستال کولون، پولیپ‌های موجود در بخش ابتدایی و پروگزیمال کولون بیشتر به آدنوما متمایل بودند. همچنین بیشتر پولیپ‌های کولون راست، از نوع آدنوما بودند، در حالی‌که در رکتوم و سیگموئید اینگونه نبود.^{۱۷} میان پولیپ‌های آدنوماتوز نواحی مختلف روده در این بررسی تفاوت معناداری در میزان بیان ژن *Bid* دیده نشد. لازم به یادآوری است که در مطالعه حاضر تغییر بیان ژن *Bid* در پولیپ‌هایی که هنوز وارد مرحله سرطانی نشده‌اند مورد بررسی قرار گرفته است، درحالی‌که مطالعات زیادی از جمله Galon و همکارانش تفاوت‌های بیولوژیکی گسترده‌ای را میان تومورهای کولون و رکتوم نشان داده‌اند.^{۱۸} Dimberg و همکارانش نیز در بررسی تغییرات بیان ژن Cyclooxygenase-2 در جایگاه‌های مختلف روده بزرگ افراد مبتلا به سرطان، به افزایش قابل توجه بیان این پروتئین در تومورهای رکتوم پی بردند.^{۱۹}

اگرچه Sanz-Pamplona و همکارانش که به بررسی تفاوت‌های پروفایل بیانی بین تومورهای کولون و رکتوم پرداختند، مطابق با یافته‌های ما، دریافتند در سرطان کولورکتال از نوع MSS تغییرات اساسی رونوشتی بین تومورها با منشاء کولون یا رکتوم وجود ندارد.^{۲۰}

بیان ژن در هر دو گروه سنی ≤ 2 برابر بافت نرمال). اما در مقایسه میان دو گروه، میزان بیان ژن *Bid* در افراد بالای ۵۰ سال با افراد زیر ۵۰ سال تفاوت معناداری وجود نداشت ($P=0/8675$).

به منظور بررسی ارتباط میان تغییرات بیان ژن *Bid* در پولیپ‌های قرار گرفته در نواحی مختلف کولون و رکتوم آنالیز آماری انجام شد. بر اساس نتایج این بررسی در پولیپ‌های موجود در مکان‌های کولون بالا رو، کولون افقی، کولون پایین رو و رکتوم افزایش بیان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (تغییرات بیان ژن در بافت‌های مطرح شده ≤ 2 برابر بافت نرمال) که افزایش بیان معنادار بود ($P<0/05$). اما در بخش سیگموئید روده تغییر بیانی نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (تغییرات بیان ژن در پولیپ‌های بخش سیگموئید ۰/۵ تا ۱/۹ برابر بافت نرمال) ($P=0/48$). تغییرات بیان ژن *Bid*، میان پولیپ‌های آدنوماتوز نواحی مختلف روده بزرگ مورد بررسی قرار گرفت، نتایج اختلاف معناداری را میان این گروه‌ها نشان نداد ($P=0/32$).

بحث

با توجه به نقش کلیدی و دو جانبه‌ی پروتئین BID در آپوپتوز در مطالعه حاضر فرض گردید بررسی میزان تغییرات بیان این ژن در ضایعات پیش سرطانی (پولیپ آدنوماتوز) می‌تواند فاکتوری مناسب جهت تشخیص زود هنگام و غربالگری برای سرطان روده بزرگ باشد، از این‌رو در این مطالعه تغییرات بیان رونوشت ژن *Bid*، در پولیپ آدنوماتوز روده بیماران در مقایسه با بافت نرمال افراد سالم مورد ارزیابی قرار گرفت.

در سال ۲۰۰۲ Krajewska و همکارانش بیان پروتئین BID را در انواع سرطان‌های انسانی با روش ایمونوهیستوشیمیایی بررسی کردند و نشان دادند که در سرطان‌های مختلف و مراحل مختلف پیشرفت تومور، بیان این پروتئین به‌طور آشکارا تغییر می‌کند.^{۱۰} در پژوهش حاضر که میزان بیان ژن *Bid* در بیماران دارای پولیپ آدنوماتوز و بافت افراد سالم با روش Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت، نشان داد که رونوشت ژن *Bid* در نمونه‌های پولیپ آدنوماتوز نسبت به نمونه‌های بافت افراد نرمال به‌طور معناداری افزایش بیان داشت ($P<0/05$). با توجه به نقش این پروتئین در آپوپتوز، افزایش بیان در پولیپ آدنوماتوز نسبت به بافت نرمال نشان می‌دهد، احتمالاً در پاسخ

افراد سالم، نشان می‌دهد احتمالاً در پاسخ به شروع دیسپلازی و اختلال در چرخه آپوپتوز این ژن با افزایش بیان سعی در جبران وقوع آپوپتوز دارد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه در مقطع کارشناسی ارشد است که با حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران انجام شده است.

لازم است در مطالعات آتی افزون بر سنجش سطح RNA ژن Bid، میزان بیان پروتیین آن نیز بررسی شود. به‌منظور بررسی‌های مستندتر، بالا بردن حجم نمونه مانند استفاده از پولیپ‌های مبتلایان در غربالگری‌های کشوری نیز توصیه می‌گردد.

امید است در نهایت بتوان از این تغییر الگوی بیان به عنوان بیومارکر تشخیصی به منظور غربالگری استفاده نمود. بر اساس مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن Bid در پولیپ آدنوماتوز نسبت به بافت نرمال

References

- Wexner SD, Cohen SM, Ulrich A, Reissman P. Laparoscopic colorectal surgery: are we being honest with our patients? *Dis Colon Rectum* 1995;38(7):723-7.
- Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2014;2(1):1-15.
- Diamond SJ, Enestvedt BK, Jiang Z, Holub JL, Gupta M, Lieberman DA, et al. Adenoma detection rate increases with each decade of life after 50 years of age. *Gastrointest Endosc* 2011;74(1):135-40.
- Liljegren A, Lindblom A, Rotstein S, Nilsson B, Rubio C, Jaramillo E. Prevalence and incidence of hyperplastic polyps and adenomas in familial colorectal cancer: correlation between the two types of colon polyps. *Gut* 2003;52(8):1140-7.
- Goldstein NS, Bhanot P, Odish E, Hunter S. Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2003;119(6):778-96.
- Shinya H, Wolff WL. Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg* 1979;190(6):679-83.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411(6835):342-8.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21(3):485-95.
- Adachi S, Leoni LM, Carson DA, Nakahata T. Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. *Acta Haematol* 2004;111(1-2):107-23.
- Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2012.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000;7(12):1166-73.
- Katz C, Zaltsman-Amir Y, Mostizky Y, Kollet N, Gross A, Friedler A. Molecular basis of the interaction between proapoptotic truncated BID (tBID) protein and mitochondrial carrier homologue 2 (MTCH2) protein: key players in mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 2012;287(18):15016-23.
- Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, Hedayat H, Monks A, Bettendorf H, et al. Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia* 2002;4(2):129-40.
- Peyravian N, Asadzadeh H, Nazemalhosseini Mojarad E, Hashemi M, Razavi MD. Expression of CD86 Co-stimulatory gene in colon polyps. *Koomesh* 2016;18(1):13-24.
- Boroff ES, Gurudu SR, Hentz JG, Leighton JA, Ramirez FC. Polyp and adenoma detection rates in the proximal and distal colon. *Am J Gastroenterol* 2013;108(6):993-9.
- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014;232(2):199-209.
- Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Soderkvist P. Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut* 1999;45(5):730-2.
- Sanz-Pamplona R, Cordero D, Berenguer A, Lejbkiewicz F, Rennert H, Salazar R, et al. Gene expression differences between colon and rectum tumors. *Clin Cancer Res* 2011;17(23):7303-12.

A quantitative investigation of the *Bid* gene expression in biopsies from colorectal adenomas

Fateme Sadat Kia M.Sc.
Student¹
Ehsan Nazemalhosseini-
Mojarad Ph.D.²
Flora Forouzesh Ph.D.^{1*}

1- Department of Genetics, Tehran
Medical Sciences Branch, Islamic
Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Cancer,
Gastroenterology and Liver Disease
Research Center, Research Institute
for Gastroenterology and Liver
Diseases, Shahid Beheshti
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran.

* Corresponding author: Dr. Shariati
Ave., Khaghani St. (Zargandeh), Tehran
Medical Sciences Branch, Islamic Azad
University, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-22006660
E-mail: f8forouzesh@gmail.com

Abstract

Received: 01 Nov. 2017 Revised: 08 Nov. 2017 Accepted: 6 May 2018 Available online: 14 May 2018

Background: Most of colorectal cancers arise from intestinal polyps. Evaluating of the expression level of genes that are involved in tumors growth and development, may consider as diagnostic factor of malignancy in the polyps. Failure of apoptosis is one of the causes of cancers. One of the key molecules in this pathway is *Bid* gene which connects the extrinsic to the intrinsic apoptosis pathways. The aim of this study was to investigate the quantitative expression of *Bid* gene in colorectal adenomatous polyps compared to control group.

Methods: The investigated population was chosen from the cases with colonic polyps that referred to the Taleghani Hospital, Tehran, Iran, from April 2014 to May 2016. 22 biopsy samples from patients with adenomatous polyps and 10 samples from healthy individuals as control group were selected. Demographic and clinical properties were collected from patients' files. The *Bid* gene expression was evaluated using Real-time PCR by ABI 7500 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Results were analyzed by the ABI 7500 system SDS version 2.3 and GraphPad Prism, version 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The expression changes of the intended gene in target groups were compared with the normal tissues using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ equation.

Results: Based on the quantitative real-time PCR, the gene expression of *Bid* gene significantly increased in adenomatous polyps in comparison with the control group (healthy individuals) ($RQ > 2$). Also, polyps were seen in ascending colon, transverse colon, descending colon and rectum showed increased expression compared to control group, but in the sigmoid section of the intestine, there was no change in expression of *Bid* gene compared to control group.

Conclusion: According to the present study, the expression of *Bid* gene increased in adenomatous polyps, compared with the normal tissue (healthy group). It suggests that *Bid* gene by increasing the expression in response to the onset of dysplasia and disruption of the apoptotic cycle, it tries to compensate for the apoptosis.

Keywords: adenomatous polyps, apoptosis, *Bid* gene, colorectal cancer.