مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن CCAT2 به‌عنوان مارکر مولکولی جدید در تومورهای پستان

سمیرا کاظم زاده، اسماعیل بابائی*، محمدعلی حسینپورفیضی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: lnc-CCAT2 یک RNA غیر کد کننده پروتئین است که به میزان بالایی در انواع بافت‌ها و رده‌های سلول سرطانی بیان می‌گردد. به دلیل شیوع روزافزون تومورهای پستان در سال‌های اخیر، در این پژوهش صلاحیت بیان ژن CCAT2 به‌عنوان مارکر مولکولی احتمالی در تشخیص و درمان تومورهای پستان ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها: درمجموع ۳۵ نمونه توموری و ۳۵ نمونه طبیعی مربوط به حاشیه‌ی تومور با استفاده از روش کمی Real-time PCR موردمطالعه قرار گرفتند و ژن β_2 میکروگلوبولین (β_2m) به‌عنوان کنترل داخلی به کار گرفته شد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار spss و sigmaplot مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که بیان ژن CCAT2 در نمونه‌های توموری پستان نسبت به نمونه‌های غیر توموری حاشیه‌ای، به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: این نتایج، استفاده از ژن CCAT2 را به‌عنوان مارکر تشخیصی در تفکیک و شناسایی بافت‌های توموری پستان از انواع غیر توموری نشان می‌دهد. ازاین‌رو می‌تواند در کنار سایر روش‌های مرسوم تشخیصی آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات بیشتر درزمینه توان بیومارکری این ژن در دست انجام است.

کلمات کلیدی: CCAT2، PCR کمی، RNA غیر کد کننده، سرطان پستان

مقدمه

سرطان پستان یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در میان زنان است. بر اساس آمارهای سازمان جهانی بهداشت از هر ۸ تا ۱۰ زن، یک نفر دچار سرطان پستان می‌شود. بر اساس آمارهای ایران، در کشور ما از هر ۱۰ تا ۱۵ زن احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان وجود دارد، اما سن بروز سرطان پستان در زنان ایران دست‌کم یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه‌یافته است. میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است (۱).

این سرطان یک بیماری به‌شدت ناهمگن است که در اثر متقابل عامل‌های خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و منجر به تجمع پیش‌رونده‌ی تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول‌های سرطان پستان می‌شود. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عامل‌های خطر تأکید دارد، وجود سابقه خانوادگی سرطان پستان، قوی‌ترین عامل خطر برای این بیماری به شمار می‌آید. تقریباً ۲۰ درصد همه‌ی سرطان‌های پستان را انواع خانوادگی تشکیل می‌دهند و ازنظر بیماری‌زایی، وابستگی خاصی به ژن مستعد کننده ویژه آن بیماری دارند (۲).

استعداد ابتلا به سرطان، تااندازه‌ای ناشی از توارث عامل‌های ژنتیکی قابل‌توجهی است که بسته به نوع سرطان متفاوت می‌باشند. به نحو شگفت‌انگیزی، شمار زیادی از مطالعات همراهی گسترده ژنومی (GWAS)، جایگاه‌های خطر مرتبط سرطان را در خارج از نواحی کدکننده‌ی پروتئین شناسایی کرده‌اند (۳). این مطالعات به شناسایی lncRNAهایی منجر شد که از جایگاه‌های غیر کدکننده خطرزا برای سرطان رونویسی می‌شوند که SNPهای موجود در آن‌ها بااستعداد ابتلا به سرطان همراه است. کشف اینکه lncRNAها تنظیم‌کننده‌های کلیدی در رشد و

*نویسنده مسئول: **اسماعیل بابائی**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
Email: babaei@tabrizu.ac.ir

تکثیر سلول‌ها هستند، با چشم‌اندازهایی به‌سوی کاربرد این مولکول‌ها به‌عنوان اهداف تشخیصی و درمانی همراه شده است. بسیاری ازlncRNAها مانند ARIL, HOTAIR به شیوه محدود به بافت و ویژه‌ی یک سرطان بیان می‌شوند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای پیش‌آگهی مفید استفاده کرد (۴). با توجه به گسترش روزافزون سرطان، تحقیقات گسترده‌ای برای کشف راه‌های پیشگیری و درمان آن و شناسایی داروهای مؤثر در این زمینه انجام می‌شود. بدین منظور استفاده از بیومارکرها از سال-های قبل مطرح بوده و در سال‌های اخیر اهمیت زیادی پیدا کرده است، چراکه دارای حساسیت و اختصاصیت بالائی نسبت به موارد مشابه روتین هستند. شمار lncRNAهایی که به‌عنوان مارکرهای زیستی در تشخیص و پیش‌آگهی کاربرد دارند، هرساله در حال افزایش است و برخی از آن‌ها برای استفاده بالینی مورد تائید قرارگرفته‌اند (۵). یکی از مزایای اصلی lncRNAها، پایداری بالا و حضور آن‌ها در مایعات بدن است، به‌ویژه زمانی که در ذرات ریزی مانند اگزوزوم‌ها و اجسام آپوپتوزی قرارگرفته‌اند، بنابراین با نمونه‌گیری کوچک از خون، ادرار و یا بزاق و در ادامه با بهره‌گیری از روش Real time-PCR می‌توان مقادیر آن‌ها را اندازه‌گیری کرد. برخی lnc-RNAها می‌توانند تنها به‌عنوان یک نشانگر زیستی تشخیصی یا تنها به‌عنوان عامل پیش‌آگهی عمل کنند. افزون بر کاربرد در موارد تشخیصی و عامل پیش‌آگهی، lnc-RNAها می‌توانند به‌مثابه نشانگرهای مفید در ارزیابی خطر سرطان عمل کنند (۵). اکثر lnc-RNAها با نقش تعیین‌کننده در عملیات تشخیص و پیش‌آگهی بر فرایندهای سلولی ایجادکننده فنوتیپ سرطانی، مانند تکثیر، تهاجم و بقا، تأثیر می‌گذارند. این امر پیشنهاد می‌کند که تغییر در سطوح بیان این lnc-RNAها، نه‌تنها یک علامت ثانویه از سرطان است، بلکه می‌تواند به‌طور مستقیم در آغاز و پیشرفت سرطان دخیل باشد (۶). ازجمله این lnc-RNA می‌توان به ژن CCAT2 اشاره کرد که به میزان بالایی در سلول‌ها و بافت‌های سرطانی یافت می‌شود، همچنین این ژن در انواعی از بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطانی ازجمله معده، روده، کبد و سلول‌های کارسینومای تهاجمی مجرایی و رده‌ی سلولی سرطانی پستان بیان می‌گردد (۷). اما در سلول‌های اپتلیال نرمال پستانی بیان کمتری دارد. CCAT2 یکی از جدیدترین اعضای خانواده‌ی lncها است و نقش مهمی در امبریوژنز اولیه و تنظیم تکثیر سلولی در سلول‌های بنیادین و سرطانی دارد و نیز در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی دارد.

هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی بیان ژن CCAT2 در نمونه‌های توموری سرطان پستان و مقایسه‌ی آن با نمونه‌های حاشیه‌ی غیر توموری است.

مواد و روش ها

نمونه‌گیری

نمونه‌های انسانی مورد نیاز این تحقیق از بیماران مراجعه‌کننده‌ی بیمارستان نورنجات تبریز جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها تحت نظارت جراح متخصص توراکس و با رضایت کامل بیماران از کسانی که تحت عمل جراحی بیوپسی یا انواع ماستکتومی سرطان پستان قرار گرفته بودند، جمع‌آوری‌شده و در لوله‌های عاری از RNase قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل شد و تا مرحله‌ی استخراج RNA در نیتروژن مایع نگه‌داری شدند. تعداد نمونه‌های موردنیاز جهت ارائه نتایج قابل‌قبول ازنظر آماری با توجه به مطالعات قبلی در این زمینه تعیین و درمجموع ۳۵ نمونه توموری و بافت‌های حاشیه‌ی تومور جمع‌آوری شد. نمونه‌های مربوط به حاشیه‌ی تومور از محل دور از تومور که به‌ظاهر فاقد درگیری توموری بود تهیه گردید.

استخراج RNA

RNAی کل (total RNA) با استفاده از محلول تریزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. به دلیل حساسیت کار با RNA ازنظر آلودگی با RNase جهت غیرفعال سازی این آنزیم کلیه‌ی لوازم مورداستفاده با محلول DEPC ۱٪ درصد تیمار گردید. پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با روش UV اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید.

تیمار با آنزیم DNase1 و واکنش رونویسی معکوس (Reverse transcription)

برای جلوگیری از آلودگی RNA حاصله با DNA، ابتدا مقادیر یکسان از RNAی اولیه (۱ میکروگرم) از هر نمونه با آنزیم DNase تیمار و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به cDNA تبدیل شدند.

طراحی پرایمر

در این تحقیق، ژن β_2m به‌عنوان کنترل داخلی انتخاب و از همان پرایمرهایی که توسط بابائی و همکاران بروی ژن β_2m انسانی طراحی شده بود، استفاده گردید. جهت تکثیر ژن CCAT2 از پرایمرهایی که برای نمونه‌های انسانی طراحی شده بود استفاده گردید (شماره دستیابی ژن CCAT2 و β_2m به

ترتیب NR_109834.1 و NM_004048 است). ویژگی این پرایمرها قرار داشتن آن‌ها روی اگزون جداگانه است، در این صورت محصول PCR که ناشی از آلودگی با DNAی ژنومی است قابل تکثیر نبوده و یا به دلیل تفاوت در اندازه‌ی قطعه تکثیرشده، از محصول RT-PCR قابل‌تمایز خواهد بود. توالی و جایگاه این پرایمرها در جدول۱ آورده شده است.

واکنش PCR

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس و به دست آمدن cDNA به‌منظور تکثیر قطعه موردنظر، واکنش PCR با استفاده از ۲/۵ µl از cDNA تهیه‌شده به همراه مواد زیر انجام گرفت:

بافر تکثیر (۱۰X)

- $MgCl_2$ (۵۰ mM)
- مخلوط dNTP (۱۰ mM)
- آنزیم Taq DNA Polymerase
- پرایمر Forward و Reverse (تکاپو زیست)
- آب تزریقی
- cDNA حاصل از واکنش RT-PCR و یا محصول PCR قبلی
- دستگاه ترمال سایکلر (SensoQuest-Germany)

پس از آماده ساختن حجم موردنظر جهت انجام واکنشPCR ، میکروتیوب در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد و یک سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ و ۲ دقیقه به ترتیب برای β2mو CCAT2 اجرا شد. این سیکل انعقاد اولیه، سبب منعقد شدنDNA ی الگو می‌گردد. واکنش PCR برای ژن‌های CCAT2و β2m با شرایط ۳۰ ثانیه دناچوریشن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد،۴۰ و ۳۰ ثانیه آنیلینگ در دمای ۶۰ و ۵۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای ژن‌های CCAT2 وβ2m و ۱ دقیقه اکستنشن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت، تعداد ۳۵ سیکل برای CCAT2 و ۳۰ سیکل برای β2m و یک سیکل اکستنشن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. واکنش PCR برای هر دو ژن CCAT2وβ2m در دو لوله‌ی جداگانه و در شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت. برای اطمینان از عدم آلودگی یک لوله نیز به‌عنوان کنترل منفی در هر واکنش بکار رفت که در آن بجایcDNA ، آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. بعد از انجام واکنش PCR برای اطمینان از تکثیر بهینه‌ی قطعه‌ی موردنظر محصول PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید. قطعه‌ی حاصل از پرایمرهای CCAT2 طولی به‌اندازه ۱۶۶ bp و قطعه β 2mطولی به‌اندازه ۱۹۱ bp بوده که از نوکلئوتید ۹۴ تا ۲۸۴ از توالی β2m cDNA انسانی با ۴۳/۵ درصد GC را شامل می‌شود.

جدول۱. توالی و جایگاه پرایمرها

نام ژن	نوع PCR	نوع پرایمر	توالی پرایمر
Lnc-RNA CCAT2	Real-Time PCR	Forward	5'- CTACCAGCAGCACCATTTCAG-3'
		Revers	5'- AAGTAGTTTCCATAGGTCTGA-3'
β_2m	Real-Time PCR	Forward	5'- CTACTCTCTCTTTCTGGCCTG-3'
		Revers	5'- GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3'

Real-time PCR

به‌منظور بررسی کمی بیان ژن‌های موردنظر، واکنش Real-time PCRبه روش SYBER Green انجام گرفت.

رنگ گزارشگر SYBER Green تنها به DNA دو رشته‌ای متصل شده و در این هنگام با جذب طول‌موج nm417 امواجی را در طول‌موج nm588 منتشر می‌کند که دستگاه ترموسایکلر این امواج را شناسایی کرده و اندازه‌گیری می‌کند. افزایش تعداد کپی‌های نمونه در هر چرخه با افزایش امواج منتشره از SYBER Green همراه بوده و همین امر اساس سنجش مقدار DNA تکثیر شونده خواهد بود. واکنش‌ها در میکروتیوب ۰/۲ و در دستگاه Rotor-gene 6000 انجام شد و کیت شرکت TAKARA در این تحقیق مورداستفاده قرار گرفت. واکنش‌ها در میکروتیوب های ۰/۱ مخصوص دستگاه Gene 6000-Rotor gene انجام شد و مواد زیر به میکروتیوب ها اضافه گردید:

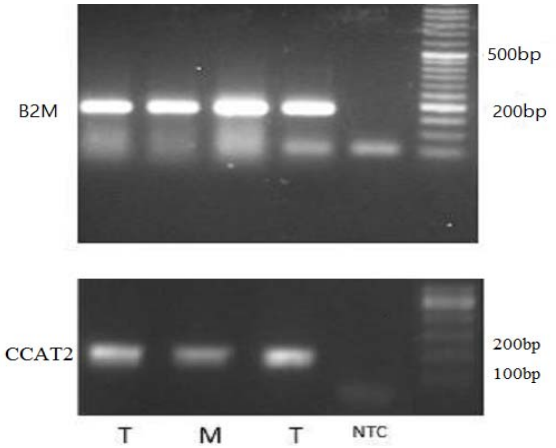
کیت SYBR Tag II: ۵ µl، ddH_2O:µl ۳/۵، پرایمر Forward: ۰/۴ µl، پرایمر Reverse: ۰/۳ µl، cDNA: 8/0 µl.

در این مطالعه از روش نسبی Normalization استفاده شد، بدین معنی که از رونوشت مربوط به یک ژن خانه‌دار جهت اصلاح خطاهای ناشی از نمونه‌برداری بهره‌گیری شد که رونوشت خانه‌دار مورداستفاده در این مطالعه β2m بود. قبل از انجام هرگونه PCR در دستگاه Real Time و به‌منظور حصول اطمینان از عدم تشکیل باندهای غیراختصاصی در یک شرایط دمایی و غلظتی مطمئن، ابتدا در دستگاه ترموسایکلر با استفاده از

Master Mix PCR (سیناژن) شرایط دمایی مناسب و شرایط غلظتی برای پرایمرها به دست آمد و سپس طبق این شرایط بهینه‌شده واکنش PCR در دستگاه Real Time، اجرا شد. محصولات PCR حاصل با الکتروفورز روی ژل آگارز دو درصد لود شدند. شرایط مناسب بعد از چندین مرحله گرادیان دمایی از ۵۸ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد و گرادیان‌های غلظتی از DNA الگو و پرایمرها حاصل شدند.

بررسی کمی بیان ژن

برای بررسی کمی میزان بیان CCAT2 بین دو گروه توموری و حاشیه توموری روش‌های مختلفی وجود دارد. با توجه به ماهیت تحقیق که یک بررسی نسبی بیان بین دو گروه است، تجزیه‌وتحلیل اطلاعات خام حاصل از quantitative Real Time RT-PCR به روش pfaffl انجام گرفت.



شکل۱. الکتروفورز حاصل از محصولات PCR ژن β2m و CCAT2

آنالیز آماری

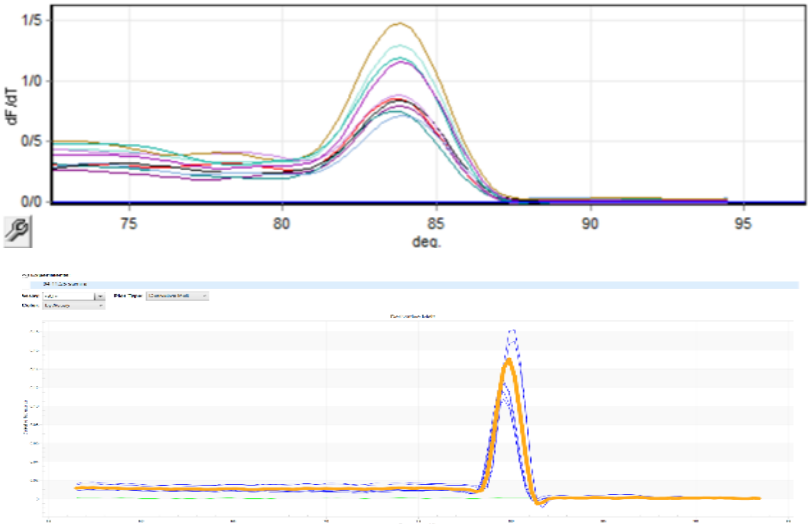
به‌منظور آنالیز آماری، میزان بیان ژن CCAT2 با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA یک‌طرفه و نرم‌افزار Sigmaplot در گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

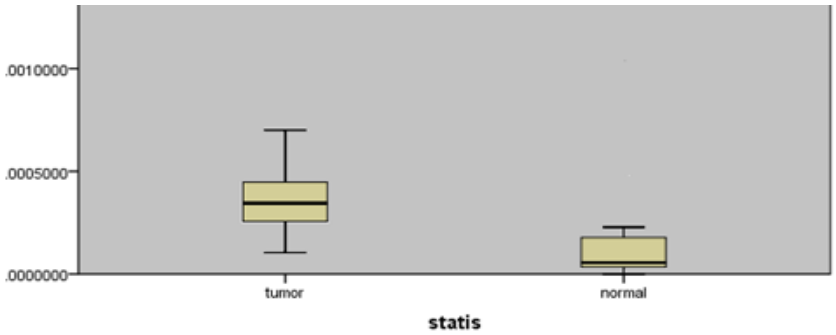
در این تحقیق ۳۵ نمونه‌ی توموری پستان و نمونه‌ی مربوط به بافت‌های حاشیه‌ی تومور از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان نورنجات تبریز موردمطالعه قرار گرفتند. به‌منظور بررسی بیان ژن CCAT2 در بافت‌های توموری پستان و حاشیه‌ی توموری بیماران و ارزیابی پتانسیل آن به‌عنوان یک تومور مارکر یا به‌عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی در تعیین شدت درجه تومورها و یا تعیین روند تغییر بیان آن‌ها در طی پیشرفت مراحل توموری، از روش Real Time PCR استفاده شد. بدین منظور ۳۵ بافت توموری پستان و حاشیه توموری مربوطه از مراحل مختلف توموری (stage I, II & III) انتخاب گردیدند و از این بافت‌های منجمد شده RNA استخراج شد. در این بررسی، از مرحله یک توموری ۱۰ نمونه، از مرحله دو توموری ۱۱ نمونه و از مرحله سه توموری ۱۲ نمونه موردمطالعه قرار گرفتند. به‌منظور اطمینان از عدم تجزیه RNAهای استخراج‌شده، کیفیت و کمیت آن‌ها به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری توسط پیکودراپ موردبررسی قرار گرفت. در بررسی ژل، دو باند ۱۸s و ۲۸s RNAهای ریبوزومی به دلیل غلظت بالا، در سلول، به‌وضوح قابل‌مشاهده هستند و بیانگر سالم بودن RNA و یا عدم تجزیه آن می‌باشند.

در بررسی با اسپکتروفتومتری نیز برای هر نمونه نسبت جذب نوری A_{260}/A_{280} بین ۱/۷ و ۲ به دست آمد که نشان‌دهنده درجه‌ی بالای خلوص RNAها و نیز آغشتگی اندک آن‌ها با پروتئین‌ها و DNA ژنومی است. دمای اتصال مناسب پرایمرها معین شد دمای ۵۸ مناسب برای هر دو نوع پرایمر به دست آمد. همچنین مقدار مناسب پرایمر برای جلوگیری از تشکیل پرایمر دایمر CCAT2 و β2m برابر ۰/۲ و ۰/۳ میکرولیتر از پرایمر در حجم ۱۰ میکرولیتر واکنش تعیین شد. طول قطعه حاصل از تکثیر با پرایمرهای CCAT2 ۱۶۶ جفت باز و β2m ۱۹۹ جفت باز بود (شکل۱). به‌منظور ارزیابی بیان ژن CCAT2 به‌عنوان تومور مارکر مولکولی در بافت‌های توموری-حاشیه توموری پستان و امکان بهره‌گیری از آن، به‌عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی دهنده در شناسایی درجات مختلف توموری، بیان این ژن در مراحل مختلف، با استفاده از روش Real Time PCR (کمی) موردمطالعه قرار گرفت. برای بررسی کمی میزان بیان ژن توسط این روش، به دست آوردن دو پارامتر کارایی (E) و چرخه‌ای که در آن میزان نشر فلورسنت از خط آستانه عبور می‌کند (Ct)، برای ژن موردنظر در گروه‌های موردمطالعه و نیز همین دو پارامتر برای ژن مرجع (β2m) ضروری است. در مرحله بعد با استفاده از مقادیر عددی این پارامترها و معادله pfaffl، میزان تغییرات بیان ژن موردنظر به‌صورت نرمالایز شده به دست می‌آید. در تمام نمونه‌ها، از ژنβ2m به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد و واکنش RT-PCR برای ژن β2m و CCAT2 در دو تیوب جداگانه و با شرایط یکسان برای PCR انجام گرفت. همچنین در هر آزمایش در کنار نمونه‌های تحت بررسی، یک تیوب نیز به‌عنوان کنترل منفی در واکنش PCR انتخاب گردید که در آن به‌جای نمونه

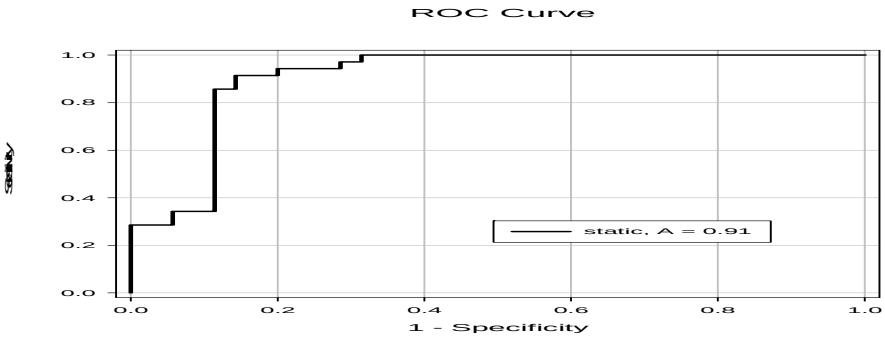
RNA، از آب استریل استفاده شد. پیک مربوط به ژن β2m (T_M=83) در تمام نمونه‌ها مشاهده گردید ولی نمونه‌های کنترل منفی هیچ پیکی را نشان ندادند. واکنش PCR برای ژن CCAT2 توسط پرایمرهای طراحی شده صورت گرفت و پیکی با (T_M= 79) آشکارسازی شد (نمودار ۱). پس از انجام PCR، با استفاده از میانگین Ctها در هر گروه برای هر دو ژن β2m و ژن CCAT2 نسبت تغییرات بیان به دست آمد. بررسی با نرم‌افزار REST نشان داد که بیان در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های حاشیه



نمودار ۱– الف) نمونه‌ای از منحنی ذوب ژن β2m ب) نمونه‌ای از منحنی ذوب ژن CCAT2 توسط دستگاه Real-time PCR



نمودار۲– مقایسه بیان ژن CCAT2 در دو گروه توموری (Tumor) و حاشیه‌ی تومور (margin) در نمودار box plot



نمودار۳– میزان اختصاصیت مربوط به ژن lnc-CCAT2 در سرطان پستان در نرم‌افزار سیگماپلات

توموری افزایش معنی‌داری با بازه اطمینان P value=0.001، CI=95% نشان داد. چون p<0.05 است، تفاوت میانگین‌های CCAT2 در دو گروه توموری و حاشیه توموری معنی‌دار است. همان‌گونه که در نمودارهای ۲ و ۳ ملاحظه می‌شود بیان ژن CCAT2 با دارا بودن مقدار ۰/۹۱ در مقایسه با بالاترین مقدار ۱ دارای حساسیت و اختصاصیت خوبی بوده و با توجه به این ویژگی‌ها می‌تواند در تشخیص نمونه‌های توموری در مقایسه با حاشیه‌ی توموری در سرطان پستان مفید باشد؛ بنابراین می‌تواند به‌عنوان تومور مارکر احتمالی در نظر گرفته شود.

بحث و نتیجه گیری

سرطان پستان از شایع‌ترین بدخیمی‌های زنان بوده و مرتبط با نرخ بالای مرگ‌ومیر در آن‌ها است. ازآنجایی‌که این سرطان می‌تواند اثرات روحی و جسمانی نامطلوبی بر فرد مبتلا در پی داشته باشد و او را از روند زندگی طبیعی بازدارد تحقیق و تلاش جهت کنترل و غربالگری آن حائز اهمیت است. در حال حاضر سرطان پستان با استفاده از معاینات جسمی و تصاویر حاصل از تکنیک‌هایی ازجمله ماموگرافی و سی‌تی‌اسکن تشخیص داده می‌شود (۸). بااین‌وجود تکنیک‌های تصویربرداری موجود حساسیت کافی برای آشکار نمودن توده‌های کوچک و در مراحل اولیه بیماری را ندارند. همچنین ناهمگونی بالای تومورهای پستانی و در برخی موارد نیز شباهت بالای تومورهای بدخیم و خوش‌خیم، تشخیص به‌موقع تومورهای بدخیم و طبقه‌بندی مناسب آن‌ها را با مشکل مواجه کرده است و بنابراین تعیین درمان مناسب برای هر بیمار نیز با مشکل مواجه می‌شود. درنتیجه، تلاش برای شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی جهت تشخیص افتراقی انواع تومورهای پستانی و همچنین انتخاب روش درمانی مناسب‌تر بر اساس آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به عبارتی جستجوی مارکرهای مولکولی که بتوانند به تشخیص این سرطان در مراحل پیشرفته اولیه، درک بهتری از رفتار سلول‌های سرطانی و درنهایت انتخاب بهترین روش درمانی برای هر بیمار، کمک‌کننده‌ای بسیار حائز اهمیت است (۹). در سال‌های اخیر نیز تلاش‌های زیادی به‌منظور کشف مارکرهای مولکولی که بتوانند به‌عنوان فاکتور کمکی تشخیصی و پیش‌آگهی دهنده در کنار سایر روش‌های پاتولوژیکی به کار گرفته شوند، انجام شده است. از مهم‌ترین مارکرهای مولکولی موردتوجه، تومورمارکرها هستند که به‌نوعی در بروز و پیشروی سرطان دخیل هستند و به‌طور مستقیم توسط تومور یا سلول‌های طبیعی در اثر پاسخ به حضور تومور تولید می‌شوند. در شرایط حضور سرطان، این تومور مارکرها در سطوح بسیار بالاتری تولید می‌شوند. اکثر تومورماکرها از جنس پروتئین هستند (۱۰). بااین‌حال اخیراً از تغییر در DNA و الگوی بیان ژنی نیز به‌عنوان تومور مارکر بهره می‌برند. ژن‌ها و انکوژن‌های متعددی در ارتباط با وقوع سرطان پستان شناخته شده‌اند که یکی از مهم‌ترین ژن‌ها، ژن‌های غیر کد کننده بوده که CCAT2 هم جزء این گروه است (۱۱).

مشابه با پروژه حاضر مطالعات بسیاری برای ارزیابی میزان بیان CCAT2 بر روی بافت‌های سرطان‌های مختلف ازجمله سرطان پانکراس، سرطان معده، سرطان شش، سرطان پستان، انجام شده است. Kim و همکاران میزان بیان ژن CCAT2 بافت پانکراس را در بیماران سرطانی و افراد سالم جامعه آمریکا را با روش Real-time PCR بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان این ژن در بافت پانکراس سرطانی شده نسبت به کنترل افزایش یافته است و با خاموشی این ژن در بافت سرطانی با siCCAT2 نشان دادند که CCAT2 نقش مهمی در سرطان پانکراس بازی می‌کند.

Wang Cy و همکاران در مطالعه‌ای همراهی بیان ژن CCAT2 در سرطان معده با تهاجم و متاستاز را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان این ژن در سرطان گاستریک افزایش می‌یابد و همچنین میزان بیان آن باقدرت تهاجم و متاستاز رابطه مستقیم دارد (۱۲).

Chen.S و همکاران طی مطالعه‌ای تحت عنوان CCAT2 در پیش‌بینی پیش‌آگهی ضعیف و تنظیم رشد و متاستاز در سل لاین‌های سرطان ریه نقش CCAT2 در سرطان شش و پیشرفت متاستازی آن به این نتیجه رسیدند که بیان این ژن هم در مراحل پیش متاستازی و هم متاستاز سرطان شش‌ها افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی نقش و توانایی CCAT2 درحرکت و تهاجم سلول‌های سرطانی و پیشرفت آن است (۱۳).

Ling H و همکاران در طی پروژه‌ای تحت عنوان بررسی نقش CCAT2 در مرحله شروع متاستاز در سرطان پستان با روش Real-time PCR نشان دادند که میزان بیان این ژن در مرحله شروع سرطان بافت پستان و مرحله متاستاز در مقایسه با بافت سالم افزایش می‌یابد (۱۴).

M Qiu و همکاران ژن CCAT2 را در سلول‌ها بافت سرطانی ریه بررسی کردند که افزایش بیان معنی‌دار این ژن را یافتند. همچنین با بررسی رده سلولی مربوط به این نوع سرطان به تأثیر

افزایش بیان این ژن درحرکت و تهاجم سلول‌های متاستاز داده پی بردند (۷).

ZhangX و همکاران با ارزیابی بیان ژن CCAT2 در کارسینومای سلول سنگفرشی مری افزایش بیان معنی‌دار آن را در سلول‌های سرطانی یافتند (۱۵).

Zhou و همکاران در پروژه‌ای تحت عنوان نقش CCAT2 به‌عنوان یک انکوژن در کارسینوم هپاتوسلولار، تنظیم تکثیر سلولی، مهاجرت و آپوپتوز نقش انکوژنی این ژن را به اثبات رساندند و به این نتیجه رسیدند که این ژن در تکثیر سلولی و مهاجرت سلول‌های سرطانی نقش عمده‌ای دارد (۱۶).

در سال ۲۰۱۵، Cai Y و همکاران با استفاده از تکنیک Real-time PCR بیان این ژن را در کارسینومای پستان مورد بررسی قرار دادند (۱۷)، در سال ۲۰۱۳ نیز Redis RS و همکاران بیان CCAT2 را مطالعه و آن را به‌عنوان یک مارکر پیش‌آگهی دهنده مفید برای سرطان پستان معرفی کردند. همچنین ارتباط بیان آن‌ها با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکال به‌ویژه مراحل مختلف توموری، اندازه تومور و نیز سایز تومور در برخی مطالعات گزارش شده است. در مطالعه‌ی Redis RS و همکاران ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن CCAT2 و اندازه‌ی تومور یا مرحله‌ی کلینیکی، همچنین درگیری غدد لنفاوی به دست نیامد (۱۴).

در مطالعه حاضر سطح بیان نسبی ژن CCAT2 در نمونه‌های توموری و حاشیه توموری هر فرد ارزیابی شد و ارتباط معنی‌داری در رابطه با تغییر بیان این ژن در نمونه‌های توموری نسبت به بافت حاشیه‌ای با $P<0.01$ دیده شد که حاکی از نقش بسیار مهم این ژن در سرطان پستان است.

همان‌طور که بیان شد همانند مطالعه حاضر در مطالعات انجام‌شده بر روی بافت‌های سرطان‌های مختلف ازجمله: سرطان پانکراس، سرطان معده، سرطان شش، سرطان پستان، افزایش بیان ژن CCAT2 در همه انواع را یافتند. هم‌چنین در این مطالعات انجام شده بر روی جمعیت‌های متفاوت ارتباطاتی بین افزایش بیان ژن مذکور و مراحل پاتولوژیکی پیشرفته توموری و سایر پارامترهای کلینیکی-پاتولوژیکی مشاهده شده که نشان می‌دهند ژن CCAT2 علاوه بر نقشی که در تومورزایی دارد، یک فاکتور یا بیومارکر مولکولی پیش‌آگهی دهنده پیامدهای نامطلوب بدخیمی‌ها نیز می‌تواند باشد.

درمجموع نتایج حاصل از ارزیابی ژن CCAT2 به‌عنوان مارکر مولکولی در تومورهای پستان نشان داد که:

با احتمال زیاد CCAT2 یک مارکر تکثیری است، یعنی هر زمان رشد سلول زیاد باشد بیان این ژن افزایش می‌یابد و زمانی که بیان آن مهار شود باعث کاهش تکثیر سلولی و تمایز سلول‌های پیش ساز و سرطانی می‌شود.

بیان این ژن در بافت توموری سرطان پستان بیشتر از حاشیه تومور است؛ بنابراین می‌توان گفت که این ژن با احتمال زیاد می‌تواند به‌عنوان یک مارکر مناسب برای تکثیر سلول‌ها و پیشرفت تومور به سمت بدخیمی باشد؛ زیرا همگام با پیشرفت تومور به‌سوی مراحل بالاتر بیان ژن CCAT2 نیز افزایش می‌یابد.

ازآنجاکه این ژن در پیشروی تومور از مراحل پایین‌تر به مراحل بالاتر فرم بدخیمی دخیل است، بنابراین با احتمال زیاد، با مهار بیان این ژن از طریق روش‌های مولکولی مانند RNAi می‌توان از پیشرفت این تومورها به مراحل بالاتر بدخیمی و متاستاز جلوگیری کرد.

این نتایج استفاده از این ژن را به‌عنوان مارکر تشخیصی در تفکیک و شناسایی بافت‌های توموری از غیر توموری مؤثر می‌داند و همچنین فاکتور بالقوه پیش‌آگهی دهنده‌ی تعیین شدت‌های مختلف توموری در کارسینومای پستان را ممکن می‌سازد که می‌تواند در کنار روش‌های دیگر آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. قابل‌ذکر است که ارزیابی بیان این ژن به‌عنوان مارکر مولکولی در تومورهای پستان در ایران و شمال غرب کشور، برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته است و لازم است که نمونه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گرفته تا بتواند نتایج قابل‌اطمینان‌تری را ازنظر آماری ارائه داد.

تشکر و قدردانی

از همکاری بیماران محترم و خانواده‌های ایشان، کارکنان اتاق عمل و بخش پاتولوژی بیمارستان نور نجات تبریز و جناب آقای دکتر منتظری که در تهیه بافت کمک کردند، صمیمانه سپاسگزارم. این مقاله در صد و سی و پنجمین جلسه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز به شماره نامه ۵,۴,۳۲۹۵ مورخ ۱۳۹۲/۰۳/۱۹مورد تصویب قرار گرفته است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Forrest AP, Stewart HJ, Everington D, Prescott RJ, McArdle CS, Harnett AN, et al. Randomised controlled trial of conservation therapy for breast cancer: 6-year analysis of the Scottish trial. The Lancet. 1996;348(9029):708-13.
2. Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ullrich A, McGuire W. Human breast cancer: correlation of relapse and. science. 1987;3798106(177):235.
3. Muto T, Bussey H, Morson B. The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer. 1975;36(6):2251-70.
4. Necsulea A, Soumillon M, Warnefors M, Liechti A, Daish T, Zeller U, et al. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. Nature. 2014;505(7485):635-40.
5. Yang L, Lin C, Jin C, Yang JC, Tanasa B, Li W, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. Nature. 2013;500(7464):598-602.
6. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. Developmental cell. 2013;24(2):206-14.
7. Qiu M, Xu Y, Yang X, Wang J, Hu J, Xu L, et al. CCAT2 is a lung adenocarcinoma-specific long non-coding RNA and promotes invasion of non-small cell lung cancer. Tumor Biology. 2014;35(6):5375-80.
8. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian pacific journal of cancer prevention. 2004;5(1):24-7.
9. Montazeri A, Vahdaninia M, Harirchi I, Harirchi AM, Sajadian A, Khaleghi F, et al. Breast cancer in Iran :need for greater women awareness of warning signs and effective screening methods. Asia Pacific Family Medicine. 2008;7(1):1.
10. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. The oncologist. 2003;8(4):307-25.
11. Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, et al. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. Breast cancer research and treatment. 2008;112(3):533-43.
12. Wang C-Y, Hua L, Yao K-H, Chen J-T, Zhang J-J, Hu J-H. Long non-coding RNA CCAT2 is up-regulated in gastric cancer and associated with poor prognosis. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(1):779-85.
13. Cheng N, Li X, Zhao C, Ren S, Chen X, Cai W, et al. Microarray expression profile of long non-coding RNAs in EGFR-TKIs resistance of human non-small cell lung cancer. Oncology reports. 2015;33(2):833-9.
14. Bedrosian JW, Foekens JA, Berindan-Neagoe I, Calin GA. CCAT2, a novel long non-coding RNA in breast cancer: expression study and clinical correlations. 2013.
15. Zhang X, Xu Y, He C, Guo X, Zhang J, He C, et al. Elevated expression of CCAT2 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. Journal of surgical oncology. 2015;111(7):834-9.
16. Zhou N, Si Z, Li T, Chen G, Zhang Z, Qi H. Long non-coding RNA CCAT2 functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma, regulating cellular proliferation, migration and apoptosis. Oncology Letters. 2016;12(1):132-8.
17. Cai Y, He J, Zhang D. Long noncoding RNA CCAT2 promotes breast tumor growth by regulating the Wnt signaling pathway. OncoTargets and therapy. 2015;8:2657.

Original Article

Investigating the Expression of CCAT2 Gene as a New Molecular Marker in Breast Tumors

Kazemzadeh S, Babaei E*, Hosseinpoorfeyzi MA

Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University

Received: 24 Dec 2016 Accepted: 19 May 2017

Abstract

Background & Objectives: lnc-CCAT2 is a non-protein coding RNA, which is highly expressed in tissues and cancer cell types. Due to the increasing incidence of breast tumors in recent years, in this research, the qualification of CCAT2 gene expression is assessed as a potential molecular marker in the diagnosis and treatment of breast tumors.

Material & Methods: Totally, 35 breast tumor specimens and 35 non-tumoral ones related to the tumor margins were studied using quantitative real-time PCR method. Gene β_2m was used as the internal control. Obtained results were statistically analyzed Using the SPSS and sigmaplot software.

Results: The results showed that CCAT2 gene expression, significantly increased in breast tumor samples compared to marginal non-tumor specimens. ($P < 0.01$)

Conclusion: This results showed that CCAT2 gene can be applied as a diagnostic marker for the identification and diagnosis of breast tumor tissues and non-tumor types. Therefore, it can be used alongside other conventional Diagnostic Laboratorial methods. More studies are underway on the biomarking potentiality of this gene.

Key Words: Breast cancer, Non-coding RNA, Real-time PCR, CCAT2

***Corresponding Author: Esmaeil Babaei,** Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran.
Email: babaei@tabrizu.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2018): 573-581