

Ubiquitin D gene expression in types of leukemia

Ali Hossein yazdi¹, Elham Moslemi^{1*}, Reza Mahmoudi Lamouki³, Afsoon Taghavi⁴, Amir Izadi⁵

1. Department of Biology, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5. Young Researcher and Elite Club, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran.

(Received:2017/02/22

Accept: 2017/03/21)

Abstract

Background: Research has shown that the expression of UBD (Ubiquitin D) is effective in causing cancer. UBD relationship between states with advanced stages of cancer cell differentiation and expression, which probably UBD involved in the progression of carcinogenesis. Overexpression of UBD is related to p53, which subsequently progress to cancer. The purpose of this study is evaluation of Ubiquitin D gene expression in leukemia patient as a biomarker for detection of disease and its progression in patients as well.

Methods: In this study 100 patients with leukemia blood samples and 100 blood samples from healthy people between ages 36 to 74 were collected. RNA is then extracted and cDNA synthesis to enzyme MMuLV and Random hexamer primers Oligo dt was done. UBD specific primers were designed using Primer Express software and gene expression levels UBD by $\Delta\Delta ct$ (relative) were measured.

Results: UBD average increase gene expression in individuals less than 50 years equal to 5.82, $P < 0.0001$ and in more than is 50 years is 2.10, $P < 0.0001$. 1.70 the lowest expression in CML and in ALL highest expression 7.97 than their on normal average and the mean UBD gene overexpression in AML patients in this group of CLL equal to 3.21 and 4.94 (p -value < 0.0001) was observed against.

Conclusion: UBD can be examined until perhaps as a biomarker for diagnosis of leukemia proposed to be used. So, we can evaluate the expression of the genes used to diagnose leukemia. However, more studies than the current application procedures, in cancer that has a lot of technical errors that were used in this study and prove its accuracy and sensitivity is required.

Keywords: UBD, leukemia, Real Time PCR, Gene expression

* Corresponding Author: Elham Moslemi
Email: Elham_moslemi60@yahoo.com

بررسی بیان ژن یوبیکوئیتین D در انواع سرطان خون

علی حسین یزدی^۱، الهام مسلمی^{۲*}، رضا محمودی لموکی^۳، افسون تقوی^۴، امیر ایزدی^۵

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
- ۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
- ۳- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران
- ۴- مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۵- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱/۱۶

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۴

چکیده:

سابقه و هدف: تحقیق‌ها نشان داده میزان بیان *UBD (Ubiquitin D)* در ایجاد سرطان موثر است. ارتباط مابین بیان *UBD* با تمایز سلولی و مراحل پیشرفته سرطان بیان می‌کند که به احتمال *UBD* در پیشرفت کارسینوزن دخالت دارد. افزایش *UBD* با بیان $p 53$ مرتبط بوده که به تسریع پیشرفت سرطان منجر می‌شود. در این مطالعه تغییرهای بیان ژن *UBD* به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص و بررسی پیشرفت بیماری در افراد مبتلا به سرطان خون بررسی شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه خون افراد مبتلا به سرطان خون و ۱۰۰ نمونه خون افراد سالم، در بازه سنی ۳۶ تا ۷۴ سال جمع‌آوری شد. سپس *RNA* نمونه‌ها استخراج و سنتز *cDNA* به کمک آنزیم *MMuLV* و پرایمرهای *Random hexamer* و *Oligo dt* انجام شد. پرایمرهای ویژه *UBD* با کمک نرم‌افزار *Primer Express* طراحی شد و میزان بیان ژن *UBD* با روش (روش نسبی) سنجیده شد.

یافته‌ها: میانگین افزایش بیان ژن *UBD* در افراد کمتر از ۵۰ سال برابر با $0.00015/82$ و در افراد بیشتر از ۵۰ سال برابر با $0.00012/10$ است. $P < 0.0001$ در گروه *CML* کمترین میزان بیان $1/70$ برابر و در گروه *ALL* بیشترین میزان بیان $7/97$ برابر به صورت میانگین نسبت به نرمال وجود دارد و میانگین افزایش بیان ژن *UBD* در افراد گروه *CLL* برابر با $3/21$ و در گروه *AML* برابر با $4/94$ ($P \text{ value} < 0.0001$) برابر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: ژن *UBD* می‌تواند بررسی بیشتری شود تا شاید بتواند به عنوان یک بیومارکر پیشنهادی برای تشخیص سرطان خون استفاده شود. بنابراین می‌توان ارزیابی میزان بیان این ژن را برای تشخیص ابتلا به سرطان خون مورد استفاده قرار داد. به هر حال مطالعه‌های بیشتری نسبت به روش‌های کاربردی فعلی، در تشخیص سرطان که دارای خطاهای زیادی نسبت به تکنیکی که در این مطالعه استفاده شده و اثبات دقت و حساسیت آن لازم است.

واژگان کلیدی: *UBD*، سرطان خون، *Real Time PCR*، بیان ژن

مقدمه:

این سلول‌های خون عملکرد صحیحی نسبت به سلول‌های نرمال نداشته و باعث می‌شوند، تولید سلول‌های سفید خون طبیعی متوقف شده و توانایی فرد را در مقابله با بیماری‌ها به حداقل می‌رساند (۳). لوسمی مغز استخوان به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شوند، براین اساس چهار نوع لوسمی وجود دارد: (*ALL*، *CLL*، *AML*، *CML*) (۴). از علائم رایج شروع این بیماری کاهش وزن و بی‌اشتهایی است ولی ۴۰ درصد بیماران بدون علامت بوده و در این دسته از بیماران صرفاً شمارش غیر طبیعی

سرطان خون (*Leukemia*) یکی از شایع‌ترین انواع بدخیمی در کودکان است که با بروز تقریبی ۴۰ در هر یک میلیون نفر حدود ۳۰ درصد کل موارد سرطان در کودکان زیر ۱۵ سال را شامل می‌شود (۲ و ۱). در این بیماری اثر تکثیر و تکامل ناقص گویچه‌های سفید خون و مغز استخوان ایجاد می‌شود. در این بیماری مغز استخوان به صورت غیر عادی، مقدار بسیار زیادی سلول خونی تولید می‌کند (۲).

نویسنده مسئول: الهام مسلمی
پست الکترونیک: elham_moslemi60@yahoo.com

بیان ژن UBD در افراد کمتر از ۵۰ سال برابر با $0.00015/82$ و در افراد بیشتر از ۵۰ سال برابر با $0.00012/10$ است. در بررسی نتایج بین دو گروه زن و مرد ارتباط معناداری مشاهده نشد $P < 0.0001$ و با جنسیت بیماران میانگین میزان بیان ژن UBD افزایش معناداری نشان نداد (شکل ۴).

بحث:

در این مطالعه برای نخستین بار اقدام به شناسایی mRNA ژن UBD در نمونه‌های خون افراد دارای سرطان خون شد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که UBD به عنوان یک شاخص در تشخیص سرطان خون به ویژه برای بررسی نوع سرطان خون (ALL، CLL، AML، CML) حائز اهمیت است. ارتباط ما بین بیان UBD با تمایز سلولی و مراحل پیشرفت سرطان، بیان می‌کند که به احتمال UBD در پیشرفت کارسینوژنز دخالت دارد.

پان و همکارانش میزان UBD در بافت افراد مبتلا به سرطان روده را با کمک تکنیک‌های qPCR و TMA (tissue microarray)، وسترن بلات و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بررسی کردند. نتایج مطالعه‌ها آن‌ها نشان داد که افزایش میزان سیتوپلاسمی UBD به طور مستقیم با مراحل بیماری و ایجاد متاستاز بستگی دارد. آن‌ها همچنین بیان کردند که میزان طول عمر در افراد مبتلا به سرطان روده UBD منفی به مراتب بیشتر از افراد UBD مثبت است (۲۵). نتایج مطالعه رن نشان داد که میزان بیان FAT10 از طریق گیرنده TNF (TNFR1) و مسیر NF- κ B افزایش می‌یابد. بنابراین درمان با TNF- α می‌تواند بیان FAT10 را نیز مهار کند (۲۶). Qing و همکارانش وابستگی افزایش بیان FAT10 و مرحله سرطان روده را بررسی کردند. آن‌ها از مقایسه سلول‌های مختلف با سلول‌ها در فازهای مختلف سرطان استفاده کردند و تکنیک‌های مورد استفاده آن‌ها ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ فلورسنت بود. مطالعه‌های آن‌ها نشان داد که افزایش بیان FAT10 از مرحله آدنومای دنداندار آغاز می‌شود و تا مراحل villous و villotubular و آدنوکارسینومای مهاجم ادامه می‌یابد (۲۷).

ایزدی و همکارانش مشخص کردند که ژن UBD در مراحل II و III سرطان روده در تکنیک RT-PCR تغییرهای بسیار زیادی دارد و مطالعه‌های آن‌ها نشان داد که ژن UBD در افراد بیمار ۹۷ درصد بیان می‌شود در حالی که این عدد در افراد سالم به ۵ درصد کاهش می‌یابد. UBD به عنوان یک شاخص در تشخیص سرطان روده به ویژه برای بررسی عود دوباره در بیماران در مراحل II و III بیماری به دنبال جراحی حائز اهمیت است. ارتباط مابین بیان UBD با تمایز سلولی و مراحل پیشرفته تومور بیان می‌کند که به احتمال UBD در پیشرفت کارسینوژنز دخالت دارد (۲۱).

Oliva و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مهار افزایش بیان UBD توسط TNF α و INF γ را بررسی کردند. آن‌ها بیان کردند که درمان توأم با TNF α و INF γ باعث کنترل بیشتر روند پیشرفت بیماری می‌شود (۲۸).

نتایج نشان داد که میزان mRNA مربوط به UBD در بافت‌های سرطانی و بافت‌های اطراف تومور افزایش یافته است. افزایش بیان UBD به ویژه در نمونه‌های افراد در مرحله II و III بیماری دیده شد (۲۱).

این مطالعه برای نخستین بار میزان بیان ژن UBD را در خون افراد مبتلا به سرطان خون در مقایسه با افراد نرمال بررسی کرده است. نتایج این مطالعه می‌تواند در پیشرفت پیش آگهی از سرطان موثر واقع شود. مطالعه حاضر و نیز گزارش‌های گذشته نشان می‌دهند که پیشگویی صحیح پیامد در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان مشکلی بالینی و پیچیده مطرح است. با وجود مطالعه‌های گسترده‌ای که در زمینه سرطان در سراسر جهان انجام گرفته، صحت عوامل تعیین شده همچنان جای تردید دارد. به علاوه، پیشرفت بیماری با افزایش خطر مرگ ناشی از این بیماری همراه هستند. انجام مطالعه‌های آتی برای تعیین نقش عوامل مختلف بالینی و آسیب شناختی برای شناخت پیش آگهی سرطان خون ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که ژن UBD می‌تواند بررسی بیشتری شود تا شاید بتواند به عنوان یک بیومارکر پیشنهادی برای تشخیص سرطان خون استفاده

GAPDH (شکل ۱) رسم شد که این امر تاییدی بر اتصال صحیح پرایمرها به ژن UBD و محصول PCR دقیقاً برای ژن مورد نظر است.

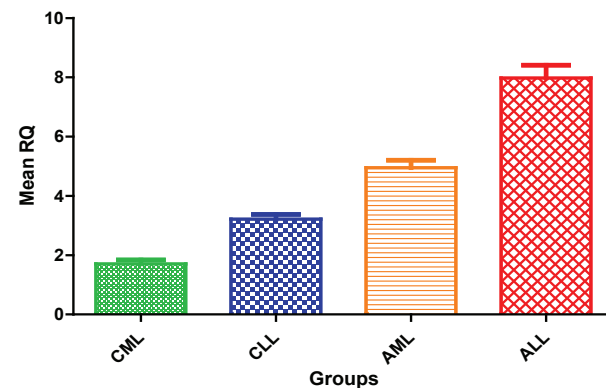
پس از انجام واکنش تکثیر، ct نمونه‌ها با دستگاه محاسبه و به (Relative quantification) RQ یا میزان بیان تبدیل شد و اندازه‌گیری میزان بیان ژن با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد (شکل ۱). میزان بیان نمونه‌های بیمار به صورت مقایسه‌ای با نمونه‌های نرمال مقایسه شد که در این امر نتایج به دست آمده نسبت به میزان بیان همان ژن در بافت نرمال است. RQ نمونه‌ها از دستگاه برداشته شد و نتایج به دست آمده با نرم افزار Prism 5 GraphPad رسم شد (شکل ۲).

بررسی نتایج ژن یوبی کوئیتین D در نمونه‌های نرمال و نمونه‌های افراد مبتلا به سرطان خون به وسیله Real Time PCR: همان طور که

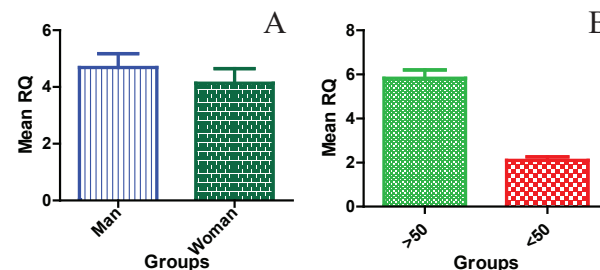
نتایج نشان می‌دهد میزان بیان ژن UBD در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم افزایش بیان داشته و این افزایش بیان طبق نمودار بالا که به وسیله برنامه آنالیز کننده دستگاه real time PCR (ABI) انجام شده است، نشان می‌دهد که در نمونه ۴۵ بیشترین افزایش بیان وجود دارد و به طور تقریبی ۱۱ برابر نمونه نرمال افزایش بیان پیدا کرده است، که این نمونه در گروه ALL نیز قرار دارد. در نمونه ۴۳ کمترین افزایش بیان وجود دارد که این نمونه در گروه CML قرار داشته و بیان آن نسبت به نمونه نرمال بسیار کم افزایش یافته است.

در بررسی نوع سرطان خون افراد مشخص شد که افراد در گروه CML کمترین میزان بیان $1/70$ برابر و در گروه ALL بیشترین میزان بیان $7/97$ برابر به صورت میانگین نسبت به نرمال وجود دارد و میانگین افزایش بیان ژن UBD در افراد گروه CLL برابر با $3/21$ و در گروه AML برابر با $4/94$ ($P \text{ value} < 0.0001$) برابر مشاهده شد. بنابراین می‌توان بیان نمود که گروه بیماری بسیار در میزان بیان ژن UBD موثر بوده و نقش مهمی در شناسایی سرطان خون بر عهده دارد و دارای ارتباط معناداری بین نوع سرطان خون و میزان بیان ژن UBD مشاهده می‌شود (شکل ۳).

در بررسی سن و با تفکیک افراد به دو گروه بیشتر از ۵۰ سال و کمتر از ۵۰ سال مشخص شد که ارتباط معناداری بین این دو گروه وجود دارد و میانگین افزایش



شکل ۳. میزان بیان ژن یوبی کوئیتین D در بیماران دارای سرطان خون بر اساس گروه بیماری



شکل ۴. میزان بیان ژن UBD در بیماران دارای سرطان خون
A: بر اساس گروه سنی B: بر اساس جنسیت

در این مطالعه استفاده شده لازم است تا بتوان دقت و صحت این بیومارکر را به عنوان یکی از فاکتورهای موثر در تشخیص سرطان، برای پیش‌بینی سرطان خون استفاده کرد.

منابع:

- Kim, Andrea S., David A. Eastmond, and R. Julian Preston. "Childhood acute lymphocytic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 613, no. 2 (2006): 138-160.
- Belson, Martin, Beverly Kingsley, and Adrianne Holmes. "Risk factors for acute leukemia in children: a review." *Environmental health perspectives* (2007): 138-145.
- Valbuena, Jose R., Marco Herling, Joan H. Admirand, Anthony Padula, Dan Jones, and L. Jeffrey Medeiros. "T-cell prolymphocytic leukemia involving extramedullary sites." *American journal of clinical pathology* 123, no. 3 (2005): 456-464.
- Mahmoud Abadi, A. "Leukemia (Blood cancer)." Mashhad: Kerdegari Publisher (2008): 11-55.
- Sessions, Jolynn. "Chronic myeloid leukemia in 2007." *American Journal of Health-System Pharmacy* 64, no. 15 (2007): S4.
- Alsayyad, Jamal, and Randah Hamadeh. "Cancer incidence among the Bahraini population: a five-year (1998-2002) experience." *Hematology/oncology and stem cell therapy* 1, no. 3 (2008): 175-182.
- Faderl, Stefan, Moshe Talpaz, Zeev Estrov, Susan O'Brien, Razelle Kurzrock, and Hagop M. Kantarjian. "The biology of chronic myeloid leukemia." *New England Journal of Medicine* 341, no. 3 (1999): 164-172.
- Mousavi, Seyed Mohsen, Mohamad Mehdi Gouya, Rashid Ramazani, Masood Davanlou, Nilofar Hajisadeghi, and Zahra Seddighi. "Cancer incidence and mortality in Iran." *Annals of Oncology* 20, no. 3 (2009): 556-563.
- Swaminathan, Rajaraman, Ranganathan Rama, and Viswanathan Shanta. "Childhood cancers in Chennai, India, 1990-2001: incidence and survival." *International Journal of Cancer* 122, no. 11 (2008): 2607-2611.
- Podvin, Danise, Carrie M. Kuehn, Beth A. Mueller, and Michelle Williams. "Maternal and birth characteristics in relation to childhood leukaemia." *Paediatric and perinatal epidemiology* 20, no. 4 (2006): 312-322.
- Karimi, Mehran, Davood Mehrabani, Hooman Yarmohammadi, and Farideh Safaei Jahromi. "The prevalence of signs and symptoms of childhood leukemia and lymphoma in Fars Province, Southern Iran." *Cancer detection and prevention* 32, no. 2 (2008): 178-183.
- Daling, Janet R., Patricia Starzyk, Andrew F. Olshan, and Noel S. Weiss. "Birth weight and the incidence of childhood cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 72, no. 5 (1984): 1039-1041.
- Zack, Matthew, Hans-Olov Adami, and Anders Ericson. "Maternal and perinatal risk factors for childhood leukemia." *Cancer research* 51, no. 14 (1991): 3696-3701.
- Niederhuber, John E., James O. Armitage, James H. Doroshow, Michael B. Kaslan, and Joel E. Tepper. *Abeloff's clinical oncology*. Elsevier Health Sciences, 2013.
- Petridou, E., D. Trichopoulos, K. Revinthi, D. Tong, and E. Papatoma. "Modulation off birthweight through gestational age and fetal growth." *Child: care, health and development* 22, no. 1 (1996): 37-53.

شود. بنابراین می‌توان ارزیابی میزان بیان این ژن را برای تشخیص ابتلا به سرطان خون مورد استفاده قرار داد. به هر حال مطالعه‌های بیشتری نسبت به روش‌های کاربردی در تشخیص سرطان که دارای خطاهای زیادی نسبت به تکنیکی که

- Ma, Xiaomei, Catherine Metayer, Monique B. Does, and Patricia A. Buffler. "Maternal pregnancy loss, birth characteristics, and childhood leukemia (United States)." *Cancer causes & control* 16, no. 9 (2005): 1075-1083.
- Hjalgrim, Lisa Lyngsie, Tine Westergaard, Klaus Rosstgaard, Kjeld Schmiegelow, Mads Melbye, Henrik Hjalgrim, and Eric A. Engels. "Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies." *American journal of epidemiology* 158, no. 8 (2003): 724-735.
- Karimi, Mehran, and Hooman Yarmohammadi. "Seasonal variations in the onset of childhood leukemia/lymphoma: April 1996 to March 2000, Shiraz, Iran." *Hematological oncology* 21, no. 2 (2003): 51-55.
- Menegaux, Florence, Andrew F. Olshan, Joseph P. Neglia, Brad H. Pollock, and Melissa L. Bondy. "Day care, childhood infections, and risk of neuroblastoma." *American journal of epidemiology* 159, no. 9 (2004): 843-851.
- Buffler, Patricia A., Marilyn L. Kwan, Peggy Reynolds, and Kevin Y. Urayama. "Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence." *Cancer investigation* 23, no. 1 (2005): 60-75.
- Izadi A, Moslemi E, Poorhosseini SM, Yassae VR, Kheiri HR, Elikai HR. "UBD identify in paraffin tissues in patients with colorectal cancer." *Journal of Isfahan Medical School* 32, no. 291(2014): 1-10.
- Lee, Caroline GL, Jianwei Ren, Ian SY Cheong, Kenneth HK Ban, London LPJ Ooi, Soo Yong Tan, Alison Kan et al. "Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers." *Oncogene* 22, no. 17 (2003): 2592-2603.
- Lukasiak, Sebastian, Claudia Schiller, Peter Oehlschlager, Gunter Schmidtke, Petra Krause, Daniel F. Legler, Frank Autschbach, Peter Schirmacher, Kai Breuhahn, and Marcus Groettrup. "Proinflammatory cytokines cause FAT10 upregulation in cancers of liver and colon." *Oncogene* 27, no. 46 (2008): 6068-6074.
- Ji, Feng, Xi Jin, Chun-Hua Jiao, Qin-Wei Xu, Zi-Wei Wang, and Yue-Liang Chen. "FAT10 level in human gastric cancer and its relation with mutant p53 level, lymph node metastasis and TNM staging." *World journal of gastroenterology: WJG* 15, no. 18 (2009): 2228.
- Yan, D. W., D. W. Li, Y. X. Yang, J. Xia, X. L. Wang, C. Z. Zhou, J. W. Fan et al. "Ubiquitin D is correlated with colon cancer progression and predicts recurrence for stage II-III disease after curative surgery." *British journal of cancer* 103, no. 7 (2010): 961-969.
- Ren, Jianwei, Yu Wang, Yun Gao, Shalin BK Mehta, and Caroline GL Lee. "FAT10 mediates the effect of TNF- α in inducing chromosomal instability." *Journal of cell science* 124, no. 21 (2011): 3665-3675.
- Qing, Xin, Babara A. French, Joan Oliva, and Samuel W. French. "Increased expression of FAT10 in colon benign, premalignant and malignant epithelial neoplasms." *Experimental and molecular pathology* 90, no. 1 (2011): 51-54.
- Oliva, Joan, Fawzia Bardag-Gorce, Barbara A. French, Jun Li, Laron McPhaul, Fataneh Amidi, Jeniffer Dedes, Amir Habibi, Sheila Nguyen, and Samuel W. French. "Fat10 is an epigenetic marker for liver preneoplasia in a drug-primed mouse model of tumorigenesis." *Experimental and molecular pathology* 84, no. 2 (2008): 102-112.