

Role of BAX, BCL-2, and MICAL-2 Genes in Esophageal Cancer

Nahid Askari^{1*}, Sara Shafieipour², Morteza Aghajanpour³

1. Department of Biotechnology, Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

2. Gastroenterology and Hepatology Research Center, Institute of Basic and Clinical Physiology Science, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Research Institute for Gastroenterology and Liver, Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2018/12/3

Accept: 2019/05/29)

Abstract

Background: Esophageal cancer is one of the most common gastrointestinal tract cancers. In cancer cells, interactions take place between apoptosis and cell proliferation and there is a positive correlation between BAX and BCL-2 genes expression levels and cancerous process. The MICAL-2 gene encodes monooxygenase enzyme which causes F-actin instability. Increasing the expression of this gene plays an important role in Epithelial-mesenchymal transition in cancerous tissue and consequently causes metastases. Since no study of MICAL-2, BAX, and BCL2 genes in esophageal cancer has been reported, the present study aimed to determine the expression of these genes in esophageal cancer patients in Kerman, Iran, in 2017-2018 using Real Time RT-qPCR.

Materials and Methods: A case-control study was designed to determine the changes in the expression level of BAX, BCL2, and MICAL-2 genes. A total of 40 samples (20 fresh tissues and 20 Paraffin Embedded tissues) and marginal non-tumor control tissues were obtained. First, total mRNAs of the samples were extracted, and then after cDNA synthesis, the expression rates of MICAL2, BAX, and BCL2 were determined using Real-Time RT-qPCR. The data were analyzed using descriptive and deductive statistic methods (Generalized Linear Models) at $\alpha < 0.05$ via SPSS software (v.20).

Results: The expression levels of MICAL2 (1.2%) and BCL2 (2.04%) in patients with esophageal cancer were higher than those of normal tissues, while BAX (0.46%) gene expression in the normal tissue was higher than that of the cancerous ones. In the pathologic study, it was found that 62.5% of the samples were esophageal squamous cell carcinoma.

Conclusion: Regarding the changes in the expression of BAX, BCL2, and MICAL2 genes in esophageal cancer, for determination of the expression level in individuals who have a family history of this problem, these genes can be used as biomarkers, because the diagnosis of cancer in the early stages have definitely a better response to therapies.

Keywords: Esophageal cancer; BAX, BCL2, MICAL2; Real Time RT-qPCR; Kerman

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Kerman University of Medical Science approved the study.

* Corresponding: Nahid Askari
Email: nahidaskari@gmail.com
n.askari@kgut.ac.ir

بررسی نقش ژن های *BCL-2*، *BAX* و *MICAL2* در مبتلایان به سرطان مری

ناهید عسکری^{۱*}، سارا شفیعی پور^۲، مرتضی آقاچان پور^۳

۱- گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

۲- مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده فیزیولوژی پایه و بالینی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳- پژوهشگاه گوارش و کبد بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۲۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۱/۲۷

چکیده:

سابقه و هدف: سرطان مری یکی از سرطان های شایع دستگاه گوارش است. در سرطان تعادل بین تکثیر سلول و آپاتوز به هم می خورد، در نتیجه ارتباط مستقیمی بین بیان ژن های *BAX* و *BCL-2* و فرآیند سرطانی شدن وجود دارد. ژن *MICAL*-۲ کدکننده آنزیم مونوآکسیژناز است که سبب ناپایداری *F-اکتین* می شود. افزایش بیان این ژن در تبدیل سلول های مزانشیال به اپیتلیال در سرطان و در نتیجه متاستاز نقش دارد. از آنجا که بررسی ژن *MICAL*-۲ همزمان با ژن های *BAX* و *BCL2* در سرطان مری تاکنون انجام نشده، این مطالعه باهدف تعیین میزان تغییر بیان این ژن ها در مبتلایان سرطان مری در شهر کرمان در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ با استفاده از روش *Time Real RT-qPCR* انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه موردی-شاهدی بیان ژن های *BAX* و *BCL2* و *MICAL2* بررسی شد. ۴۰ نمونه (۲۰ نمونه از بافت تازه و ۲۰ نمونه از بافت پارافینه) شامل بافت توموری و بافت حاشیه سالم آن از بیماران تهیه و پس از استخراج *RNA* کل، *cDNA* ساخته شده با تکنیک *Time Real RT-qPCR* میزان تغییر بیان ژن های *MICAL2*، *BAX* و *BCL2* تعیین شد. تجزیه و تحلیل داده های مربوط به میزان بیان ژن های *BAX* و *BCL2* و *MICAL2* به عنوان متغیرهای مستقل، با استفاده از نرم افزار آماری *SPSS* (نسخه ۲۰) و آمار توصیفی و آمار استنباطی (مدل های تعمیم یافته خطی) با در نظر گرفتن سطح معناداری $p > 0/05$ انجام شد.

یافته ها: در بیماران مبتلا به سرطان مری، میزان بیان ژن های *BCL2* (۲/۰۴ درصد) و *MICAL2* (۱/۲ درصد) در نمونه های توموری بیشتر از بافت نرمال و مقدار بیان ژن *BAX* (۱۷۶/۰ درصد) دریافت نرمال بیشتر از بافت سرطانی بود. در بررسی پاتولوژیک مشخص شد حدود ۶۲/۵ درصد از نمونه ها از نوع کارسینوم سلول سنگفرشی مری بودند.

نتیجه گیری: به نظر می رسد از تغییر بیان ژن های *BCL2*، *BAX* و *MICAL2* در افرادی که سابقه خانوادگی دارند، می توان به عنوان یک بیومارکر استفاده کرد؛ چرا که تشخیص سرطان در مراحل اولیه، به طور قطع با پاسخ به درمان بهتری همراه است.

واژگان کلیدی: سرطان مری، ژن *BCL2*، *BAX*، *MICAL2*، *Time Real RT-qPCR*، کرمان

مقدمه:

سرطان های انسانی تغییرهای ژنتیکی در ژن های مرتبط با سرطان است. سرطان مری، از شایع ترین سرطان ها و ششمین سرطان منجر به مرگ در دنیاست. این سرطان، یکی از سرطان های با پیشروی سریع و پیش آگهی ضعیف و میزان بقای این بیماران بعد از تشخیص کمتر از پنج سال است [۱]. فقدان علائم زودرس اولیه و ماهیت این سرطان، سبب می شود که بیماران به طور معمول وقتی به پزشک مراجعه کنند که بیماری در مراحل پیشرفته ای است و روش های درمانی، در به دست آوردن دوباره سلامتی و بهبود کیفیت زندگی آنان کمک

سرطان بیماری پیچیده ژنتیکی است که بعد از بیماری های قلبی - عروقی دومین عامل مرگ و میر

پس از این مکانیسم ها شناخته شده اند اما تا کنون موفقیت قابل ملاحظه ای برای درمان این بیماری بدخیم حاصل نشده است. پیشرفت های جدید در علم ژنتیک نشان داده است که چندین جهش، حذف ژنتیکی و تغییر در بیان ژن های مرتبط با سرطان، سبب سرطان می شود. این امر نشان می دهد که یکی از علل اصلی

نویسنده مسئول: ناهید عسکری
 پست الکترونیک: nahidaskari@gmail.com
 n.askari@kgut.ac.ir

اطلاعات براساس مطالعه‌های معتبر و مشابه انتخاب شدند. سپس تعداد ۴۰ نمونه شامل: ۲۰ نمونه مربوط به بافت تازه بعد از عمل جراحی و ۲۰ نمونه مربوط به بلوک‌های پارافینه از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان‌ها) از فرد بیمار مبتلا به سرطان مری که در بیمارستان‌های کرمان (افضلی پور، فاطمه‌الزهرای (س)، پیامبر اعظم (ص) و ارجمند) تحت جراحی قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شد. تشخیص و جداسازی بافت سالم از توموری توسط پاتولوژیست انجام شد. نمونه‌های گرفته شده از بافت تازه تا زمان انجام آزمایش و استخراج RNA در محیط کشت MEMα (Minimum Essential Medium) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا به RNA آسیدی نرسد. بافت سالم اطراف تومور به عنوان گروه شاهد استفاده شد.

برای مقطع‌گیری از نمونه‌ها برای استخراج RNA و پارافین زدایی بافت‌های پارافینه، مقطع‌گیری از بلوک پارافینه اصلی انجام شد. ابتدا قبل از مقطع‌گیری به مدت ۲۴ ساعت بلوک‌ها در دمای ۲۰- درجه قرار داده شد تا برش‌ها به خوبی انجام شود و سپس از هر بلوک مقاطع پنج میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم مقطع‌گیری شد. استخراج RNA از بافت پارافینه توسط کیت RNeasy FFPE® بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از پارافین زدایی مراحل استخراج Total RNA تمامی بافت‌ها استخراج و سنتز cDNA با استفاده از RNAهای استخراج شده انجام شد. کیفیت RNA روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز مدل Agarose-Power از شرکت بیونیر (Bioneer) بررسی شد. همچنین، کمی و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت‌های A280/A260 برای بررسی آلودگی‌های پروتئینی و متابولیت‌های ثانویه انجام شد.

غلظت نمونه‌های RNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فاکتور رقت} = A_{260} \times 40 \times \text{غلظت RNA } (\mu\text{g/ml}) [9]$$

برای نمونه‌های RNA نسبت جذب A280/A260 باید در محدوده ۲-۱/۸ قرار گیرد. A_{280}/A_{260} پایین‌تر از ۱/۸ به طور کلی نشان‌دهنده آلودگی پروتئین در مراحل استخراج است.

توالی آغازگر (Primer) شامل توالی جلوبرنده و توالی معکوس برای تکثیر ژن‌های BCL-2, BAX, و MICAL2 با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شد و برای اطمینان بیشتر، درصد GC، دمای Tm و نداشتن دایمر با همدیگر، این پرایمرها با برنامه Gene Runner (Hasting Software, Inc 1994) بررسی شدند. همچنین پرایمرها طوری طراحی شد که فقط به توالی مورد نظر در رونوشت مربوط متصل شوند.

سپس با استفاده از تکنیک Real-time RT-qPCR تغییرهای بیانی ژن‌های BAX, BCL-2 و MICAL2 در سطح RNA در سرطان مری بررسی شد. باتوجه به اهمیت تمایز موارد منفی حقیقی، استفاده از کنترل‌های داخلی از اهمیت بالینی برخوردار است. به همین دلیل بررسی ژن‌های BCL-2, BAX, و MICAL2 نسبت به غلظت ژن بتا‌اکتین (β -actin) گزارش شد و از بتا‌اکتین به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد (جدول زیر).

توالی پرایمرهای استفاده شده به شرح زیر بود:

پرایمر	توالی پرایمر	Tm(°C)	اندازه (محصول جفت باز)
β -actin	F:GGACATCCGCAAAGACCTGTA R:ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	۵۷	۱۸۹
MICAL2	F:CAACCCGTGTGTGCTCATC R:GTGGATGCCTGGACAAAGTT	۵۸	۲۰۹
BCL2	F:GTGGATGACTGAGTACCTGA R:AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	۶۲	۱۱۹
BAX	F:TTTGCTTCAGGGTTTCATCC R:CAGCTCCATGTTACTGTCCA	۵۷	۱۵۴

اندکی می‌کند [۲]. با توجه به کشندگی بالای این بیماری در مراحل انتهایی، چنانچه این بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، نسبتی از افراد ممکن است از مدت زمان بقای بیشتری نسبت به سایرین برخوردار شوند یا حتی بهبود یابند [۳]. از آنجا که بروز این سرطان با افزایش سن بیشتر می‌شود؛ به طوری که بیشترین شیوع در سن ۵۰ تا ۷۰ سالگی است و این بیماری در مردان شایع‌تر از زنان است، می‌توان با استفاده از سابقه ژنتیکی بیماران نسبت به پیش‌آگهی آن‌ها در افراد با سابقه ژنتیکی میزان بقای افراد در معرض ابتلا با تشخیص زود هنگام بیماری افزایش داد [۴]. از سوی دیگر ژن MICAL-2 ژنی است که محصول آن تبدیل سلول‌های مزانشیال به اپی‌تلیال را در بافت سرطانی انسان کنترل می‌کند و همچنین واکنش‌های اکسیداسیون و احیای اکتین را که سبب ناپایداری F-اکتین در اسکلت سلولی می‌شود، کاتالیز می‌کند [۵]. بنابراین نقش مهمی در متاستاز سلول‌های سرطانی دارد. درسلول‌های پستانداران سه نوع ایزوفرم از ژن MICAL وجود دارد. MICAL-1، MICAL-2، و MICAL-3 که در تنظیم و سازماندهی اکتین نرمال و تنظیم کردن فیبرهای اکتینی نقش دارند. MICAL-1 توسط قسمت C ترمینال خود، به صورت خودکار مهار می‌شود اما MICAL-2 این خاصیت را ندارد و تنها در تنظیم میکروفیلانمنت‌های اکتینی نقش دارد [۶]. از سوی دیگر، آپوپتوز به مرگ برنامه‌ریزی شده ژنتیکی سلول گفته می‌شود که در بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش مهمی ایفا می‌کند. پروتئین BAX به عنوان پروتئین کلیدی در آپوپتوز القا شده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوز عمل کرده و BCL-2 یک اثر آنتی‌آپوپتوتیک در پاسخ به محرک‌های مختلف آپوپتوز از طریق جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری دارد. ژن‌های BAX و BCL-2 از جمله ژن‌های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز به شمار می‌روند [۷]. از آنجا که در سلول‌های سرطانی تعادل بین تکثیر و آپوپتوز به هم خورده و سلول‌ها برای رشد و تکثیر بی‌رویه خود نیاز به مهار آپوپتوز دارند، ارتباط مستقیمی میان بیان این ژن‌ها و فرآیند سرطانی شدن وجود دارد [۸]. بنابراین بررسی تغییرهای بیانی این ژن‌ها می‌تواند از جمله هدف‌های درمانی یا تشخیصی در مطالعه‌های سرطان به شمار می‌رود. از این رو در این مطالعه تغییرهای بیانی ژن‌های BAX و BCL-2 و نسبت BAX/BCL-2 در سلول‌های سرطانی مری و همچنین وجود ارتباط معنادار میان این تغییرها و پارامترهای مختلف بیماری از جمله سن و جنس بیماران، مرحله بیماری، وضعیت تمایز یافتگی، اندازه و مکان تومور اولیه بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

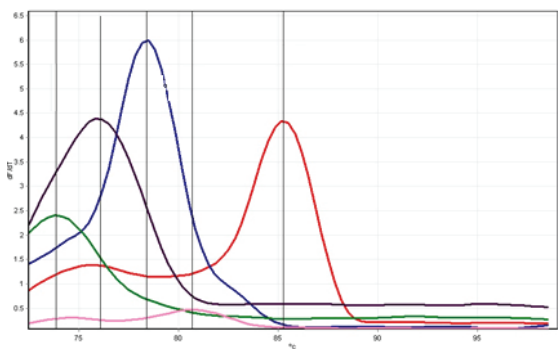
این مطالعه موردی-شاهدی در آزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ انجام شد. در زمان نمونه‌گیری، اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلایان به سرطان مری به دست آمد. پژوهش انجام شده و ابزار آن از سوی کمیته اخلاق با کد (IR.RUMS.REC.1395.63) تایید شد و با رعایت اصول اخلاق زیستی، قبل از نمونه‌گیری از تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضایتنامه گرفته شد. در این فاز و برای پیشگیری از بروز خطا و انجام دقیق و صحیح کار در مرحله جمع‌آوری داده‌ها، معیارهای ورود به مطالعه و خروج از مطالعه تعیین شد. معیار ورود به مطالعه عبارت بود از: تمامی افرادی که با تشخیص پزشک مبتلا به سرطان مری بوده و در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ نمونه برداری از مری آن‌ها انجام شده و برای نمونه‌گیری رضایت آگاهانه داشتند؛ به طوری که بیمار بی‌شک باید در یکی از بیمارستان‌های شهر کرمان در بخش جراحی پذیرش شده باشد و همچنین نمونه او باید برای تشخیص دقیق به بخش پاتولوژی ارجاع داده شده باشد، در غیر این صورت، توانایی ورود به مطالعه را نداشتند.

معیار خروج از مطالعه نیز عبارت بود از: رضایت نداشتن بیماران برای نمونه‌گیری، نمونه‌برداری از مری بیماران دلیل دیگری غیر از سرطان داشته باشد و همچنین اگر نمونه‌برداری از مری در صورت عود دوباره پس از درمان انجام می‌شد، در این صورت، افراد از مطالعه خارج می‌شدند.

پس از تعیین مراحل یاد شده در این قسمت از انجام طرح ابزار و فرآیند جمع‌آوری

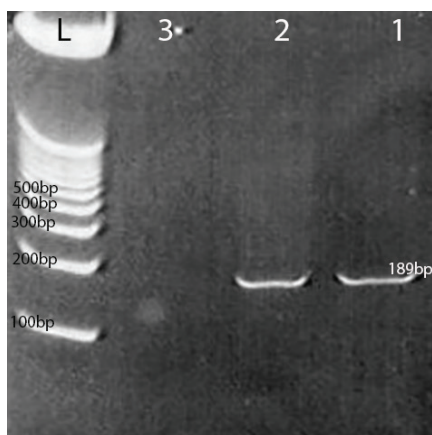
شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز یک درصد نمونه RNA استخراج شده

منحنی ذوب در Real time PCR بیانگر TM محصول تکثیر شده در واکنش، وجود یا نبود پرایمر دایمر یا محصول غیراختصاصی است که به ازای شدت فلورسنت در مقابل دما توسط دستگاه رسم می‌شود. تصویر زیر نمونه‌هایی از منحنی ذوب به مربوط Real time PCR برای ژن *BAX*، *BCL2*، *MICAL2* و β -Actin است (نمودار ۱). همان‌طور که در شکل نشان داده شده است فقط یک محصول اختصاصی برای هر ژن تکثیر شده است.



نمودار ۱- منحنی ذوب تغییرهای محصول‌های Realtime RT qPCR برای ژن‌های β -actin (رنگ قرمز)، *BCL-2* (آبی)، *BAX* (بنفش)، *MICA2* (سبز) وجود یک قله برای هر محصول نشان می‌دهد که فقط یک محصول اختصاصی برای هر ژن تشکیل شده است.

برای اطمینان از محصول‌های دستگاه Realtime RT qPCR، نمونه‌های بررسی شده برای وجود و تکثیر صحیح cDNA با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (درصد ۱/۵) بررسی شدند (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج الکتروفورز ژل آگارز (درصد ۱/۵) برای اطمینان از تکثیر cDNA محصول‌های Realtime RT qPCR ژن بتا اکتین با اندازه ۱۸۹ جفت باز برای چاهک‌های شماره ۱ و ۲ و چاهک شماره ۳ به عنوان کنترل منفی بدون cDNA

آنالیز آماری داده‌ها نشان‌دهنده ۱/۲ درصد افزایش بیان در ژن *MICA2* و ۲/۰۴ درصد افزایش بیان ژن *BCL-2* و همچنین ۰/۷۶ درصد کاهش بیان ژن *BAX* بود (نمودار ۲). ارتباط معناداری در سطح ۵ درصد میان تفاوت بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* بین سلول‌های تومورال و نرمال در هر دو نوع کارسینوم سلول سنگفرشی مری و آدنوکارسینوم مری وجود داشت. گرچه در میزان تغییر

سطوح بیان ژن‌ها با روش Real Time RT-qPCR استفاده از مسترمیکس سایبرگرین شرکت یکتا تجهیزآزما و به وسیله دستگاه (GENE 3000 Corbett-Real time ROTOR) اجرا شد. سپس داده‌ها از دستگاه وارد نرم‌افزار LinReg PCR ویراست ۱۱ شد که در این نرم‌افزار برای هر نمونه CP سیکلی که در آن منحنی تزیاید خط آستانه را قطع می‌کند) و همچنین efficiency PCR مشخص شد. برای بررسی آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS استفاده شد (نسخه ۲۰) برای تمامی محاسبه‌ها انجام شده، $p \leq 0.05$ به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد.

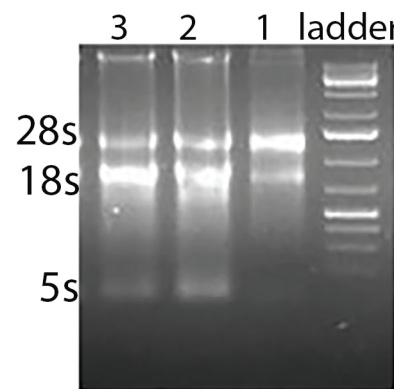
یافته‌ها:

بر اساس بررسی‌های آماری و بر اساس ویژگی‌های دموگرافیک و بالینی بیماران به نظر می‌رسد میزان ابتلا به سرطان مری در جمعیت بررسی شده در مردان ۲/۶ برابر زنان باشد. علاوه بر این، بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد که میزان ابتلا در مردان در سنین پایین‌تری نسبت به زنان است و محدوده سنی گسترده‌تری را نیز شامل می‌شوند. به طور کلی سرطان مری، دو نوع اصلی کارسینوم سلول سنگفرشی مری یا carcinoma cell Squamous و آدنوکارسینوم مری یا adenocarcinoma Esophageal را شامل می‌شود. در بررسی پاتولوژیک نیز مشخص شد که حدود ۶۲/۵ درصد از نمونه‌ها از نوع کارسینوم سلول سنگفرشی مری بودند (جدول ۱).

جدول ۱- بررسی ویژگی‌های دموگرافیک و بالینی بیماران مبتلا به سرطان مری در شهر کرمان

شاخص‌های اپیدمیولوژیک	فراوانی
سن	$50 >$ ۲۷±/۲۳
	$50 <$ ۱۳±/۱۰۹
جنس	مرد ۲۹±/۱۰۳
	زن ۱۱±/۷۴
نوع پاتولوژی تومور	کارسینوم سلول سنگفرشی مری آدنوکارسینوم مری ۲۵۰±/۶۸ ۱۵±/۷۳

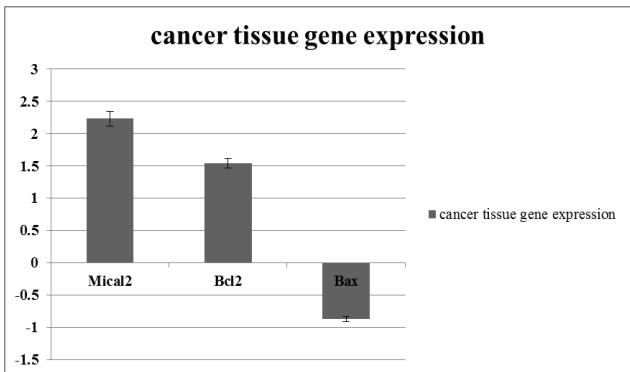
برای نمونه‌های RNA نسبت جذب A_{280}/A_{260} در محدوده ۲-۱/۸ قرار داشت و بررسی نمونه‌ها بر روی ژل آگارز نیز نشان‌دهنده نبود آلودگی بود (شکل ۱-).



دو پروتئین فاکتورهای مرتبطی با هم هستند که فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را تنظیم می‌کنند. مشخص شده است که سرطان در اثر اختلال در چند فاکتور و ژن‌های مختلف به وجود می‌آید، بنابراین پیدا کردن ارتباط این فاکتورها در انواع متفاوت سرطان ضروری است. در سلول‌های پستانداران، BAX و BAK پروتئین‌های اصلی BH123 هستند و حداقل یکی از آن‌ها برای اجرای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی آپوپتوز لازم است. فعال‌سازی پروتئین‌های BAX و BAK وابسته به پروتئین‌های پروآپوپتوتیک BH3 only فعال شده است. در پاسخ به استرس‌های شبکه اندوپلاسمی، کلسیم به درون سیتوپلاسم آزاد شده و در نتیجه سبب فعال شدن مسیر داخلی آپوپتوز وابسته به مسیر میتوکندریایی از طریق BAX و BAK می‌شود که مکانیزم دقیق آن مشخص نیست. پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک BCL2 مانند خود BCL2 و BclX2 همچنین به طور گسترده در سطح غشای خارجی میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی و غشای هسته واقع شده‌اند؛ به طوری که کل غشا را حفظ می‌کنند. تومورها می‌توانند آپوپتوز را از طریق افزایش بیان تنظیم‌کننده‌های ضد آپوپتوزی (BCL2 و BCLxL) یا به واسطه سیگنال‌های حیات (LGF1/2) از طریق کاهش فاکتورهای آپوپتوتیک (puma، Bax، BIM)، آپوپتوز را مهار کنند. Liu و همکاران ۲۰۱۲ نشان دادند که ژنوتیپ A-938A ژن BCL2 با سرطان مری مرتبط است [۱۱]. علاوه بر این، بر اساس مطالعه‌های Farkas و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که نسبت BAX / BCL2 با اثربخشی شیمی درمانی و پیش‌بینی نتایج در بیماران مبتلا به سرطان مری ارتباط دارد [۱۲]. از سوی دیگر، انتقال اپیتلیال-مزانشیمی به عنوان یک فرآیند اساسی برای رشد و نمو جنین، بهبود زخم و بیماری‌های فیبروتیک بحرانی تشخیص داده شده است. شواهد پسین نشان می‌دهد که فعال شدن نابجای فرآیند انتقال اپیتلیال-مزانشیمی در مری انسان با سرطان مری و پیشرفت تومور ارتباط نزدیکی دارد. *MICAL2* ژنی است که محصول آن تبدیل سلول‌های مزانشیال به اپیتلیال را در بافت سرطانی انسان کنترل می‌کند و همچنین واکنش‌های اکسیداسیون و احیای اکتین را که سبب ناپایداری F-اکتین در اسکلت سلولی می‌شود کاتالیز می‌کند [۱۳]. از آنجا که سرطان مری ششمین عامل مرگ در جهان است و با وجود روش‌های مختلف درمانی، عمر مفید این افراد بعد از تشخیص بیماری کمتر از پنج سال است. با شناسایی مسیرهای مولکولی می‌توان افراد خانواده‌های درگیر را پیگیری کرد و مراحل پیشگیری، شناسایی و پاسخ به درمان را انجام داد. در سال‌های گذشته، محققان برای کشف رابطه بین ویژگی‌های بیولوژیکی سرطان و ارتباط این ویژگی‌ها با نتایج بالینی بیماران مطالعه‌های بسیاری انجام داده‌اند. در همین راستا، پیشرفت‌های پسین در زمینه ژنتیک مولکولی نشان داده است که تغییرهای ژنتیکی می‌تواند زمینه ساز بروز سرطان باشد [۱۴]. بسیاری از مطالعه‌های بیان ژن که در سرطان مری انجام شده است، بر آنند که الگوهای خاص سطوح رونویسی ژن در بافت‌ها و سلول‌های سرطانی را بررسی کنند تا بتوانند درک کامل‌تری از مکانیسم‌های پاتولوژیک پیچیده درگیر در سرطان مری داشته باشند. Uchikado و همکاران در سال ۲۰۰۶، با استفاده از تراشه‌های الیگونوکلئوتیدی DNA که شامل مجموع ۱۷,۰۸۶ پروب برای بررسی ژن‌ها بود، ژن‌های مرتبط با متاستاز گره لنفاوی در سرطان مری را بررسی کردند [۱۵]. یکی دیگر از مطالعه‌های انجام شده برای پیدا کردن رابطه بین میزان بیان ژن و متاستاز سرطان مری توسط Wong و همکاران ارائه شده است که پس از مقایسه داده‌ها با داده‌های متقابل مربوط به پروتئین پروتئین مشخص شد، ۱۸ ژن به عنوان ژن‌هایی هستند که بیان آن‌ها در سرطان مری تغییر می‌کند و ده عدد از این ژن‌ها با متاستاز تومور مری مرتبط بودند [۱۶]. Fanoodi و همکاران در سال ۲۰۱۵ میزان تغییر بیان ژن P21 سرطان مری را بررسی کردند که نتایج نشان‌دهنده نبود تغییر معنادار بیان ژن p21 در گروه بیمار و سالم بود (p > ۰.۰۵) و اختلاف معناداری بین بیان ژن در دو جنس زن و مرد نیز مشاهده نشد [۱۷]. علاوه بر این، Mir و همکاران در سال ۲۰۱۸ بیان ژن EGFR در بیماران مبتلا به سرطان مری بررسی کردند و نتایج مطالعه‌های آن‌ها نشان داد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های سرطانی ۴/۲ برابر نسبت بافت نرمال افزایش داشته است [۱۸].

از مطالعه‌های دیگر، Joshi و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان ژن‌های TS1، GSTP1 و

بیان ژن‌های مطالعه شده بین دو گروه کارسینوم سلول سنگفرشی مری و آدنوکارسینوم مری تفاوت معناداری از نظر آماری وجود نداشت (p < ۰.۰۵)، اما در آنالیز نسبت BAX/BCL-2، میان مقادیر به دست آمده برای این نسبت و سن بیماران و نوع تومور اولیه ارتباط معنادار مشاهده شد. با توجه به این نتایج نسبت BAX/BCL-2 با بالا رفتن سن افزایش یافته و در تومورهای نوع آدنوکارسینوم این نسبت بیشتر بود. بنابراین سن بیمار و نوع تومور می‌توانند در مطالعه‌های مربوط به یافتن مارکرهای موثر سرطانی بسیار حایز اهمیت باشند.



نومدار ۲- میزان افزایش بیان ژن‌های BCL2 و *MICAL-2* و کاهش بیان ژن BAX در بافت سرطانی

بحث:

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، میزان ابتلای مردان به سرطان مری حدود ۲/۶ برابر زنان بود. به طور کلی بر اساس پژوهش‌های انجام شده، میزان ابتلا به سرطان مری در مردان بیشتر از زنان گزارش شده است و نسبت جنسی (مرد و زن) از دو تا چهار بار متفاوت است. با این حال، در بعضی از مناطق به طور مساوی در مردان و زنان اتفاق می‌افتد [۱۰].

در این مطالعه بیان ژن‌های BCL 2، BAX 2- و *MICAL2* مربوط به بافت توموری و بافت سالم مجاور آن، در افراد مبتلا به سرطان مری با استفاده از روش Real Time RT-qPCR بررسی شد که در نتیجه مشخص شد بیان ژن *MICAL2* و BCL2 در بافت توموری، به مراتب بیشتر از بافت اطراف تومور است اما میزان بیان ژن BAX در بافت توموری کمتر از بافت سالم بود. از سوی دیگر، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اکثر بیماران مرد (۷۲/۵ درصد) بودند و ۶۷/۵ درصد افراد در سن بالای ۵۰ سالگی به سرطان مری مبتلا شده بودند. در مطالعه انجام شده از نظر فراوانی یافته‌های پاتولوژی سرطان مری، اکثر بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی مری بودند (۶۲/۵ درصد).

به طور کلی، سرطان بعد از بروز یکسری تغییرها از جمله تغییر میزان بیان در ژن‌ها اتفاق می‌افتد که تا حدی تغییرهای جدیدی را در سلول به وجود می‌آورد [۱۱]. از سوی دیگر، آپوپتوز فرآیندی است که سبب کنترل تعداد سلول‌ها در بافت‌ها و اندام‌ها می‌شود. هر سلول به طور ژنتیکی دارای عواملی است که می‌تواند آن را به طرف مرگ برنامه‌ریزی شده هدایت کند. آپوپتوز تمایز سلولی و پاسخ‌های ایمنی را نیز تنظیم می‌کند. عوامل خارج سلولی نظیر استرس‌های مختلف سلولی و... مسیرهای مختلف آپوپتوز را فعال می‌کنند ژن‌های مختلفی در القای آپوپتوز نقش دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به BAX، BCL-2 اشاره کرد. به نظر می‌رسد ژن BCL2 نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد. مشاهده شده که در انواع مختلف افراد مبتلا به سرطان، بیان ژن BCL2 افزایش می‌یابد محصول ژن BCL2 در تحریک رشد، بقا و مهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نقش ایفا می‌کند. در حالی که پروتئین BAX سبب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها شده و عملکردی برخلاف پروتئین BCL2 دارد. پروتئین‌های BCL2 و BAX ساختارهای همودایمر و هتروداایمر را تشکیل می‌دهند. این

میزان بیان BCL2 و MICAL2 در بافت سرطانی بیشتر از بافت سالم و میزان بیان BAX در بافت سالم بیشتر بود. از سوی دیگر مشخص شد که ژن MICAL2 به طور گسترده‌ای در تومور بیان می‌شود، به طوری که پیشرفت تومور را تسریع کرده و می‌تواند به عنوان عامل پیشرفت تومور به بافت‌های دیگر شناخته شود. از طرفی مطالعه‌های بسیاری نشان داده‌اند که گرچه تعداد زیادی از ژن‌ها در بدخیمی‌های انسانی، چندین برابر تقویت می‌شوند و در نتیجه برای بررسی بیان ژنی، تاکنون مطالعه‌های فراوانی روی سرطان‌های مختلف بدن انسان انجام شده است اما در میان ژن‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز و مرگ سلولی از جمله BCL2 و BAX قابل توجه‌ترین ژن‌ها هستند که در همین راستا در این پژوهش نیز میزان تغییرهای بیان آن‌ها مطالعه و بررسی شد، چرا که این ژن‌ها در بررسی پاسخ به درمان بیماران از اهمیت زیادی برخوردار هستند، ولی از آنجا که در بررسی بدخیمی‌ها، میزان متاستاز نیز اهمیت زیادی دارد، همراه با ژن‌های BCL2 و BAX میزان تغییر در بیان ژن MICAL2 نیز بررسی شد تا احتمال هجوم سلول‌های سرطانی به بخش‌های دیگر نیز دقیق‌تر مطالعه شود.

بنابراین با توجه به مطالعه حاضر و سایر تحقیق‌های انجام شده در رابطه با بررسی ژن‌های موثر در مسیر آپوپتوز و همچنین ژن‌های دخیل در میزان متاستاز، می‌توان تصمیم‌های منطقی در زمینه درمان بهتر انواع سرطان را اتخاذ کرد.

نتیجه‌گیری:

در این مطالعه بررسی بیان BCL2 و BAX و MICAL2 در سرطان مری بررسی شد که با توجه به تغییر در بیان این ژن‌ها، می‌توان با تعیین تغییر میزان بیان آن‌ها در افرادی که سابقه خانوادگی دارند در پیش‌آگهی بیماری و بررسی امکان درمان کمک کرد. تشخیص سرطان در مراحل اولیه، به‌طور قطع با پاسخ به درمان بهتری همراه است. تغییر در بیان ژن‌های مطالعه شده می‌تواند به عنوان نتیجه موثر در پیش‌آگهی یا در مداخله درمانی مفید واقع شود و مطالعه‌های بیشتر برای تعیین دقیق مکانیسم عمل این ژن‌ها به عنوان ژن‌های موثر در سرطان مری، نیاز است. سیر صعودی پژوهش‌های سرطان نشانگر اهمیت روزافزون این حوزه در ایران است. با توجه به رشد جهانی پژوهش‌های مولکولی در رابطه با سرطان و اهمیت مشارکت تحقیقاتی بین‌المللی، امید است با استفاده از نتایج این تحقیق‌ها، برای شناسایی دقیق‌تر مکانیسم این بیماری و انتخاب روش درمانی مناسب، بتوان در جهت افزایش طول عمر بیماران و کاهش هزینه‌های درمانی اقدام کرد.

تشکر و قدردانی:

از کارشناسان آزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان و بخش جراحی و پاتولوژی بیمارستان‌های شهر کرمان که در تمامی مراحل برای جمع‌آوری نمونه و انجام پژوهش کمک شایانی کردند، سپاسگزاری می‌شود.

ERCC1 در بیماران درمان شده سرطان مری برای ارزیابی ارتباط بین نشانگرهای مولکولی مرتبط با مقاومت شیمیایی و بقا در بیماران مبتلا به سرطان مری تحت درمان با درمان سه گانه را بررسی کردند [۱۹].

در بررسی انجام شده توسط Su و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان تغییر در بیان ژن‌های (KRT4، FSCN1، KRT14، FADD، LAMC2، CDC25B) در سرطان مری را در رابطه با فنوتیپ‌های مشاهده شده بررسی کردند و بر اساس نتایج حاصل از مطالعه‌های آن‌ها مشخص شد که میزان بیان این ژن‌ها در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه نرمال تغییر می‌کند [۲۰]. بر اساس مطالعه دیگری که Hsia و همکاران در سال ۲۰۰۱ روی میزان بیان ژن‌های P53، BAX، BCL2 در سرطان مری انجام دادند، مشخص شد که بیان ژن BCL2 روی میزان زنده ماندن افراد بعد از برداشتن تومور اولیه، اثر منفی دارد، بنابراین بیان ژن BCL2 می‌تواند به عنوان عاملی در بررسی کلینیکی بیماران در سرطان مری استفاده شود [۲۱]. از سوی دیگر کاهش بیان ژن BAX در مبتلایان به سرطان مری که تحت درمان با استفاده از سیس پلاتین و ۵-فلوروراسیل قرار گرفته‌اند با پاسخ به درمان کمتری همراه است. بنابراین، بررسی بیان این ژن می‌تواند در انتخاب روش درمانی مناسب برای بیماران مفید باشد [۲۲]. به‌تازگی مشخص شده است که میزان چندشکلی و تغییرهای تک نوکلئوتیدی (SNP) ژن BAX به میزان بیان این ژن در سرطان مری بستگی دارد که عامل تأثیرگذار برای میزان بقای بیمار است و ممکن است به عنوان یک شاخص برای ارزیابی و پیش‌آگهی در سرطان مری استفاده شود [۲۳]. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش نیز میزان بیان ژن BAX در مبتلایان به سرطان مری نسبت به حالت نرمال تغییر کرد که می‌تواند در مورد خود این بیماران در مراحل بعدی با استفاده از روش توالی‌یابی یا استفاده از روش PCR-RFLP [۲۳] نوع ژنوتیپ فرد را مشخص کرد؛ چراکه بر اساس پژوهش انجام شده توسط Sun و همکاران (۲۰۱۸) ژنوتیپ‌های AA، AG نسبت به ژنوتیپ GG در ژن BAX پاسخ به درمان بهتر و میزان طول عمر بیشتری داشتند. علاوه بر این می‌توان با مشخص کردن ژنوتیپ افراد خانواده مبتلان به سرطان مری، در صورت بروز تومور، مراحل درمان را در مسیر مطلوبی هدایت کرد.

به طور کلی در جهان شایع‌ترین نوع سرطان مری از نظر بافت شناسی، کارسینوم سلول سنگفرشی مری است اما در ۱۵ سال گذشته وقوع آدنوکارسینومای مری در کشورهای غربی افزایش یافته و در میزان کارسینوم سلول سنگفرشی مری کاهش یافته یا در حالت ثابت قرار دارد. در ایران، اغلب بیماران سرطانی مربوط به شمال و شمال شرقی هستند و مطابق تحقیق منتشر شده توسط انستیتو سرطان ایران، شیوع سرطان مری بیشتر از نوع کارسینوم سلول سنگفرشی مری بوده و بیشترین میزان گسترش آن به ترتیب مربوط به استان‌های گلستان (۳۱ درصد)، مازندران (۱۲/۹ درصد) و استان گیلان (۸/۷ درصد) است ولی به طور کلی در ایران شیوع آدنوکارسینومای مری کمتر از کشورهای غربی است [۲۴].

در پژوهش انجام شده مشخص شد که میزان بیان ژن‌های BCL2 و BAX و MICAL2 در نمونه‌های سرطانی نسبت به بافت سالم متفاوت بود، به طوری که

ON SURVIVAL OF PATIENTS WITH ESOPHAGEAL CANCER USING WEIBULL OR LOG-NORMAL CURE MODELS.

Semnani SH, Besharat S, Abdolahi N, Keshtkar AA, Kabir MJ, Fazel AR, Danesh A, Malekzadeh R. Factors associated with esophageal cancer in the southeast part of the Caspian Sea. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2005 Jan 15; 13(52):24-8.

Kollarova H, Machova L, Horakova D, Janoutova G, Janout V. EPIDEMIOLOGY OF ESOPHAGEAL CANCER-AN OVERVIEW ARTICLE. Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky

منابع:

Akbari MR, Malekzadeh R, Nasrollahzadeh D, Amanian D, Sun P, Islami F, Sotoudeh M, Semnani S, Boffeta P, Dawsey SM, Ghadirian P. Familial risks of esophageal cancer among the Turkmen population of the Caspian littoral of Iran. International journal of cancer. 2006 Sep 1; 119(5):1047-51.

Ghadimi MR, Rasouli M, Mahmoodi M, Mohammad K, Zeraati H. A COMPARATIVE STUDY OF IMPACT OF PERSONAL FACTORS

- University in Olomouc. 2007 Jun 1; 151(1).
- Mariotti S, Barravecchia I, Vindigni C, Pucci A, Balsamo M, Libro R, Senchenko V, Dmitriev A, Jacchetti E, Cecchini M, Roviello F. MICAL2 is a novel human cancer gene controlling mesenchymal to epithelial transition involved in cancer growth and invasion. *Oncotarget*. 2016 Jan 12; 7(2):1808.
- Giridharan SS, Rohn JL, Naslavsky N, Caplan S. Differential regulation of actin microfilaments by human MICAL proteins. *J Cell Sci*. 2012 Feb 1; 125(3):614-24.
- Ma, J., Wang, X. B., Li, R., Xuan, S. H., Wang, F., Li, X. H., ... & Li, L. (2017). RNAi-mediated TCF-3 gene silencing inhibits proliferation of Eca-109 esophageal cancer cells by inducing apoptosis. *Bioscience reports*, BSR20170799.
- Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*. 2004 Jan; 75(1):22-33.
- Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2007 Nov 1; 2007(11): pdb-ip47.
- Pera M, Pera M. Recent changes in the epidemiology of esophageal cancer. *Surgical oncology*. 2001 Nov; 10(3):81.
- Liu Z, Sun R, Lü W, Dang C, Song Y, Wang C, Zhang X, Han L, Cheng H, Gao W, Liu J. The-938A/A genotype of BCL2 gene is associated with esophageal cancer. *Medical Oncology*. 2012 Dec 1; 29(4):2677-83.
- Farkas R, Pozsgai E, Bellyei SZ, Cseke L, Szigeti A, Vereczkei A, Marton S, Mangel L, Horvath OP, Papp A. Correlation between tumor-associated proteins and response to neoadjuvant treatment in patients with advanced squamous-cell esophageal cancer. *Anticancer research*. 2011 May 1; 31(5):1769-75.
- Cai Y, Lu J, Tang F. Overexpression of MICAL2, a novel tumor-promoting factor, accelerates tumor progression through regulating cell proliferation and EMT. *Journal of Cancer*. 2018;9(3):521.
- Pakzad R, Mohammadian-Hafshejani A, Khosravi B, Soltani S, Pakzad I, Mohammadian M, Salehiniya H, Momenimovahed Z. The incidence and mortality of esophageal cancer and their relationship to development in Asia. *Annals of translational medicine*. 2016 Jan; 4(2).
- Uchikado Y, Inoue H, Haraguchi N, Mimori K, Natsugoe S, Okumura H, Aikou T, Mori M. Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*. 2006 Dec 1; 29(6):1337-47.
- Wong FH, Huang CY, Su LJ, Wu YC, Lin YS, Hsia JY, Tsai HT, Lee SA, Lin CH, Tzeng CH, Chen PM. Combination of microarray profiling and protein-protein interaction databases delineates the minimal discriminators as a metastasis network for esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*. 2009 Jan 1; 34(1):117-28.
- Fanoodi TS, Motalleb G, Moghadam AY, Talaei R. p21 gene expression evaluation in esophageal cancer patients. *Gastrointestinal Tumors*. 2015; 2(3):144-64.
- Mir Z, Motalleb G, Mazaheri M, Najafi S. EGFR expression evaluation in esophageal cancer patients. *jskums*. 2018; 19(6).
- Joshi MB, Shirota Y, Danenberg KD, Conlon DH, Salonga DS, Herndon JE, Danenberg PV, Harpole DH. High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clinical cancer research*. 2005 Mar 15; 11(6):2215-21.
- Su H, Hu N, Yang HH, Wang C, Takikita M, Wang QH, Giffen C, Clifford RJ, Hewitt SM, Shou JZ, Goldstein AM. Global gene expression profiling and validation in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its association with clinical phenotypes. *Clinical Cancer Research*. 2011 Mar 8; clincanres-2724.
- Hsia JY, Chen CY, Hsu CP, Shai SE, Yang SS, Chuang CY, Wang PY, Chen JT. Expression of apoptosis-regulating proteins p53, Bcl-2, and Bax in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Neoplasma*. 2001; 48(6):483-8.
- Kang SY, Han JH, Lee KJ, Choi JH, Park JI, Kim HI, Lee HW, Jang JH, Park JS, Kim HC, Kang S. Low expression of Bax predicts poor prognosis in patients with locally advanced esophageal cancer treated with definitive chemoradiotherapy. *Clinical cancer research*. 2007 Jul 15; 13(14):4146-53.
- Sun L, Wei L, Wei L, Li D. Correlation between Bax gene polymorphisms and esophagus cancer. *Oncology letters*. 2018 Dec 1; 16(6):7097-101.
- . Pera M. 2001. Recent changes in the epidemiology of esophageal cancer. *Surgical Oncology*, 10:81-90.