Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.42; No.4; 2019

Evaluation of *P53* and *MICAL-2* Gene Expression and Mutations in Gastric Cancer Patients in Kerman

Saeedeh Salari[1], Mehdi Mahmoodi[1], Masoud Torkzadeh Mahani[2], Nahid Askari[2*], Mohammadreza Hajizadeh[1], Nadieh Baniasadi[3], Reza Malekpour[4], Alireza Khoshdel[1]

1. Department of Clinical Biochemistry, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
2. Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
3. Department of Internal Medicine and Gastroenterology, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran
4. Department of Pathology, Kerman University of Medical Sciences, Iran

(Received: 2018/05/22 Accept: 2018/10/29)

Abstract

Background: *Stomach cancer is one of the most common cancers after lung cancer and the second cause of cancer deaths worldwide. Changes in the expression level of genes are one of the most important factors in cancers. Among them p53 and MICAL-2 were found to have changes in their expression levels. P53 gene plays an important role as a tumor suppressor along with regulating the cell cycle. MICAL-2 encodes monooxygenase which raises F-actin depolymerization. Increased expression of this gene involves the conversion of mesenchymal cells to epithelial which has been associated with metastasis. Considering that the MICAL-2 gene had not previously been studied with P53 gene at the same time in gastric cancer, the present study was conducted to evaluate the expression level of P53 and MICAL-2 genes in stomach cancer patients in Kerman.*

Materials and Methods: *A case-control study was designed to determine the changes in the expression level of P53 and MICAL-2 genes. A total of 30 tumor tissues and marginal non-tumor control tissues were obtained from patients. Total mRNA of the samples was extracted, and then, after cDNA synthesis, Real Time RT-qPCR, PCR-SSCP, and sequencing were performed to measure the gene expressions. T-test and ANOVA were used for data analysis.*

Results: *The expression levels of p53 gene were 0.38 and 0.47 in cancerous tissues whereas they were 2.04 and 3.11 in normal tissues for exon 6 and 7, respectively. But the results indicated that exons 4 and 5 were not statistically different in normal and cancerous tissues. For MICAL-2, the expression level in tumor had a 2.2-fold increase in comparison with normal tissues. Therefore, it was found that the expression levels of p53 and MICAL-2 genes were significantly higher in tumor tissues compared to those from normal tissues ($P<0.05$). On the other hand, sequencing results demonstrated missense and deletion mutations in exon 4.*

Conclusion: *Considering the changes in the expression of P53 and MICAL2 genes in gastric cancer, changes in the expression of the genes can be used as biomarker in individuals with family history of this problem, because diagnosis of cancer in the early stages can definitely result in better response to therapies.*

Keywords: *Gastric cancer; P53; MICAL-2; Real Time RT-qPCR; PCR-SSCP; Kerman*

* *Corresponding Author: Nahid Askari*
Email: nahidaskari@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-23]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۲، شماره ۴، ۱۳۹۷، صفحات ۲۴۷ تا ۲۵۳

بررسی میزان تغییر بیان و جهش‌های ژن‌های *P53* و *MICAL2* در مبتلایان به سرطان معده در شهر کرمان

سعیده سالاری ، مهدی محمودی[۱]، مسعود ترکزاده ماهانی[۲]، ناهید عسکری*[۳] ، محمد رضا حاجی‌زاده[۱]، نادیه بنی‌اسدی[۴] ، رضا ملک‌پور[۵] ، علیرضا خوشدل[۱]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۲- گپژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
۴- گروه بیماری‌های داخلی و فوق تخصص گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی بم، بم، ایران
۵- گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۸/۷

چکیده:

سابقه وهدف: سرطان معده شایع‌ترین سرطان بعداز سرطان ریه و دومین عامل مرگ ومیر ناشی ازسرطان درجهان است. تغییردرسطح بیان ژن‌ها یکی ازمهم‌ترین عوامل در بروز سرطان است. از جمله ژن‌هایی که سطح بیان آن‌ها درسرطان، تغییر می کند می‌توان به *P53* و *MICAL2* اشاره کرد. ژن *P53* ، یکی ازمهم‌ترین ژن‌هایی است که در ممانعت ازبروز سرطان اهمیت داشته و در تنظیم چرخه سلولی نقش دارد. ازسوی دیگر،*MICAL2* کدکننده آنزیم مونواکسیژناز است ناپایداری*F*-اکتین می‌شود. افزایش بیان این ژن درتبدیل سلول‌های مزانشیال به اپی‌تلیال در بافت سرطانی انسان و متاستاز نقش مهمی برعهده دارد. باتوجه به اینکه بررسی ژن *MICAL-2* همزمان با ژن *P53* در سرطان معده تاکنون انجام نگرفته است، این مطالعه باهدف تعیین میزان تغییر بیان اگزون‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ ژن *P53* و *MICAL2* برای اولین باردر مبتلایان سرطان معده در شهر کرمان درسال ۱۳۹۶-۱۳۹۵بااستفاده ازروش‌های*Time Real RT-qPCR* و *PCR-SSCP* انجام شد.

مواد و روش‌ها: دراین مطالعه موردی-شاهدی بیان ژن‌های *P53* و *MICAL2* بررسی شد. ۳۰ نمونه شامل نمونه بافت توموری معده و نمونه بافت حاشیه سالم آن از بیماران تهیه شد *RNA* . کل استخراج شده، سپس*cDNA* ساخته شد. درنهایت با تکنیک‌های *Time Real RT-qPCR* و *PCR-SSCP*واستفاده ازروش توالی‌یابی بیان ژن‌های *MICAL2*و *P53* تعیین شد. برای تجزیه وتحلیل میزان بیان ژن‌ها ازآزمون آماری*Test-T* و *ANOVA* استفاده شد.

یافته‌ها: طبق نتایج به دست آمده، در بیماران مبتلا به سرطان معده، میزان بیان اگزون شش دربافت سالم ۰/۳۸ و دربیماران ۲/۰۴ و میزان بیان اگزون هفت در بافت سالم ۰/۴۷و دربیماران ۳/۱۱ بود، ولی اگزون‌های چهارو پنج ژن *P53* تغییر معناداری نداشت. همچنین افزایش بیان ژن *MICAL2* دربافت توموری ۲/۲ برابر بافت سالم بود و مشخص شد میزان بیان ژن‌های *P53* و *MICAL2* دربافت توموری، به مراتب بیشتر ازبافت سالم اطراف تومور است($P<0.05$). از سوی دیگر، براساس روش توالی‌یابی مشخص شد که دراگزون چهاردو نوع جهش از نوع حذف و بدمعنی وجود دارد.

نتیجه‌گیری: باتوجه به تغییرات در بیان ژن‌های *P53*و *MICAL2* درسرطان معده می‌توان از تغییر بیان ژن‌ها درافرادی که سابقه خانوادگی دارند، به عنوان یک بیومارکر استفاده کرد. چراکه تشخیص سرطان در مراحل اولیه، به‌طور قطع باپاسخ به درمان بهتری همراه است.

واژگان کلیدی: سرطان معده، ژن *MICAL2*، *P53*، تکنیک *PCR-SSCP*، *Time Real RT-qPCR*، کرمان
Gastric cancer, P53 , MICAL-2, Real Time RT-qPCR, PCR-SSCP کرمان

مقدمه:

سرطان یک بیماری پیچیده ژنتیکی است که بعد از بیماری‌های قلبی -عروقی، دومین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است[۱]. سرطان معده یکی از علل عمده مرگ و میر ناشی از سرطان در کل دنیاست و در حال حاضر پس از سرطان ریه، مقام دوم را دارد. آدنوکارسینوما شایع‌ترین فرم سرطان معده است و عفونت ناشی از هلیکوباکترپیلوری، مصرف دخانیات، رژیم غذایی پر نمک و عدم دریافت کافی آنتی‌اکسیدان از عوامل ابتلا به این بیماری در ایران گزارش شده‌اند[۲]. حدود ۹۵درصد سرطان‌های معده را آدنوکارسینوم‌ها تشکیل می‌دهند. آدنوکارسینوم‌های معده به دو گروه تقسیم می‌شوند: نوع منتشر که در آن چسبندگی سلولی وجود ندارد و بنابراین تک تک سلول‌ها با ارتشاح به جدار معده باعث افزایش

نویسنده مسئول: ناهید عسکری
پست الکترونیک: *gh_kaka@yahoo.com*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-23]

ضخامت آن می‌شوند. بدون اینکه توده مجزایی تشکیل دهند و نوع روده‌ای که با سلول‌های نئوپلاستیک به هم چسبیده مشخص می‌شود که ساختار توبولی شبیه غده تشکیل می‌دهند[۳]. از جمله عوامل سرطان‌زا، عوامل محیطی و ژنتیکی هستند که با ایجاد نقص در عملکرد ژنوم موجودات، باعث سرطانی شدن سلول می‌شوند. در این میان ژن‌های پروتوانکوژن مانند ژن Ras و ژن‌های مهارکننده تومورمانند ژن *P53*، را می‌توان نام برد [۴]. امروزه کشف ژن‌هایی مانند *P53* و HER-2/neu این احتمال را به وجود آورده است که شاید سیر بالینی و پیش آگهی سرطان معده را بتوان بهتر از قبل پیشگویی کرد. با توجه به مطالعه‌های انجام شده روی جهش‌های ژنی، *P53*ژن قابل توجه‌ترین ژن جهش یافته در بدخیمی‌ها از جمله سرطان معده است[۵]. پروتئین *P53* یک پروتئین سرکوبگر تومور است که توسط ژن T*P53* که روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ (۱۷p۱۳,۱) قرار دارد کد می‌شود. اگزون شماره یک و قسمت اعظم اگزون شماره ۱۱ در ژن *P53* در mRNA کد نمی‌شوند، در حالی که منطقه Hotspot ژن روی اگزون‌های پنج، هشت قرار گرفته است. این ناحیه کدون‌های مربوط به اسیدهای آمینه شماره ۳۰۷– ۱۱۰ را شامل می‌شود و بیش از ۹۰ درصد جهش‌ها روی این ناحیه اتفاق می‌افتد[۶].

MICAL2 (Molecules Interacting with Casl) 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 باعث ناپایداری F–اکتین در اسکلت سلولی می‌شود کاتالیز می‌کند. بیان بالای این ژن نخستین بار در سلول های اپیتلیال سرطان‌های معده وکلیه دیده شد(۷).

درسلول‌های پستانداران سه نوع ایزوفرم از ژن MICAL وجود دارد. MICAL1 و *MICAL2* و MICAL3 که در تنظیم و سازماندهی اکتین نرمال و تنظیم کردن فیبرهای اکتینی نقش دارند. MICAL1 توسط قسمت C ترمینال خود، به صورت خودکار مهار می‌شود، اما *MICAL2* این خاصیت را ندارد و تنها در تنظیم میکروفیلامنت‌های اکتینی نقش دارد[۸].بنابراین انجام مطالعه‌های مولکولی برای یافتن ژنی که پتانسیل سرطانی شدن معده را ارزیابی کند از اولویت‌های پژوهشی است. بررسی بیان ژن‌های *MICAL2* و *P53* بین نمونه‌های تومور معده انسانی و بافت نرمال می‌تواند در این زمینه مفید باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی پروفایل بیانی این ژن‌ها در نمونه‌های سرطان معده و همچنین بافت نرمال برای بررسی ارزش بیان این ژن به عنوان یک مارکر تشخیصی زودهنگام انجام شد. در این راستا، با توجه به اهمیت این دو ژن (*P53* و *MICAL2*)در بروز انواع سرطان‌ها (از جمله سرطان معده) و متاستاز سلول‌های سرطانی، این مطالعه روی بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرمان برای بررسی میزان تغییر در بیان اگزون‌های ژن *P53* و *MICAL2* به کمک روش‌های PCR-SSCP، Time Real RT-qPCR انجام شد.

مواد و روش‌ها:

دراین مطالعه موردی – شاهدی که درسال ۱۳۹۶–۱۳۹۵ درآزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان انجام شد. در زمان نمونه‌گیری، اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلا بـه سرطان معده به دسـت آمد. پژوهش انجام شده و ابزار آن به تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان با کد اخلاق (کد: IR.RUMS. REC.۱۳۹۵,۶۳) رسید و اصول اخلاقی انجام پژوهش رعایت شد و برای رعایت قوانین اخلاق زیسـتی، قبـل از نمونه‌گیری از تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضـایتنامـه گرفتـه شد و سپس تعداد۳۰ نمونه از فرد بیمار مبتلا به سرطان معده که تحت جراحی در بیمارستان‌های کرمان(افضلی‌پور، فاطمه‌الزهرا (س)، پیامبر اعظم(ص) و ارجمند) قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شد. تشخیص و جداسازی بافت سالم از توموری توسط پاتولوژیست انجام گرفت. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش و استخراج RNA در محیط کشت MEMα (Minimum Essential Medium) در دمای –80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا به RNA آسیبی نرسد. بافت سالم اطراف تومور به عنوان گروه شاهد استفاده شد.

برای استخراج کل RNA و DNA، در ابتدا هاون مخصوص آزمایشگاه را ضدعفونی و اتوکلاو کرده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر قرار داده شد. نمونه بافت را با تیغ اسکالپل به صورت قطعه‌های ریز در آورده و در هاون با کمک نیتروژن مایع به طور کامل پودرکرده و به لوله میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و با استفاده از کیت(150402 -HB-KS-2080-e- publication No .Germany- AG) RNA، Analytik jena و DNA به صورت همزمان بر اساس دستورالعمل کیت از بافت سالم و سرطانی استخراج و کیفیت آن‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز مدل Agaro-Power از شرکت بیونیر(Bioneer) بررسی شد. همچنین کمیت و کیفیت RNA و DNA 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:

فاکتور رقت × 40 × A_{260} = غلظت RNA (µg/ml) (۹)

برای نمونه‌های RNA نسبت جذب A280/A260 باید در محدوده ۲ –۱/۸ قرار گیرد. A280/A260 پایین‌تر از ۱/۸ به طور کلی نشان‌دهنده آلودگی پروتئین در طی مراحل استخراج است.

غلظت نمونه های DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

فاکتور رقت × ۵۰ × $A_{۲۶۰}$ = غلظت (µg/ml) (۹)

توالی آغازگر (Primer) شامل توالی جلوبرنده و توالی معکوس برای تکثیر اگزون‌های شماره شش وهفت ژن*P53* و ژن *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 مربوطه متصل شوند.

باتوجه به اهمیت تمایز موارد منفی حقیقی، استفاده از کنترل‌های داخلی ازاهمیت بالینی برخوردار است به همین دلیل بررسی اگزون‌های شش و هفت ژن *P53* و ژن *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:

در مرحله بعد، برای سنتز cDNA از کیت تاکارا (Japan) استفاده شد. سپس cDNA

پرایمر	توالی پرایمر	Tm(°C)	اندازه محصول(جفت باز)
β- actin	F:GGACATCCGCAAAGACCTGTA R:ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	۵۷	۱۸۹
MICAL2	F:CAACCCGTGTGTGTCTCATC R:GTGGATGCCTGGACAAAGTT	۵۸	۲۰۹
P53-4	F:AATGGATGATTTGATGCTGTCCC R:CGTGCAAGTCACAGACTTGGC	۵۷	۲۷۳
P53-5	F:TTCCTCTTCCTGCAGTACTC R:TCCGTCATGTGCTGTGACTG	۵۶	۱۸۴
P53-6	F: GCCATCTACAAGCAGTCACA R: GCCAGACCTAAGAGCAATCA	۵۸	۱۱۳
P53-7	F:TTGTCTCCTAGGTTGGCTCT R:CAAGTGGCTCCTGACCTGGA	۵۷	۱۱۰

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-23]

توسط آغازگرهای *P53* و *MICAL2* وژن مرجع بتااکتین از روش‌های Time Real RT-qPCR استفاده شد و میزان بیان mRNA ژن‌های مورد نظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Syber Green ارزیابی، و میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان ژن‌ها قابل ردیابی بود در(Threshold Cycle(Ct بررسی شد. در این روش تکثیر به طور کلی دارای حساسیت بالاست. این روش نیاز به فرآیندهای بعد از PCR (Post PCR) و آنالیز توسط ژل آگارز ندارد و از سرعت انجام زیادی برخوردار است، به طوری که می‌توان تا ۲۰۰ نمونه در روز را با یک دستگاه بررسی کرد و همچنین آلودگی کم است. تکثیر در هر زمان قابل مشاهده است. به عبارتی امکان مشاهده تصویر و مانیتورینگ لحظه به لحظه واکنش فراهم است و در هر چرخه امکان بررسی فرآیند تکثیر وجود دارد[۹]. کیت FastStart SYBR Green Master ROX Takara برای انجام این واکنش استفاده شد.

واکنش Real-time RT-qPCR برای اگزون‌های چهار، پنج، شش وهفت ژن *P53* در ۳۰ سیکل برای ژن *MICAL2* در۳۵ سیکل و حجم ۱۰ میکرولیتر با حضوریک میکرولیتر از DNA مکمل، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها و پنج میکرولیتر محلول کیت FastStart SYBR Green Master ROX Takara و ۳/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل در دستگاه (GENE 3000 Corbett-Real time ROTOR)مطابق برنامه جدول زیر اجرا شد (جدول زیر). سپس داده‌ها از دستگاه وارد نرم‌افزار LinReg PCR ویراست ۱۱ شد که در این نرم‌افزار برای هر نمونه CP) سیکلی که در آن منحنی تزاید خط آستانه را قطع می‌کند) و همچنین efficiency PCR مشخص شد.

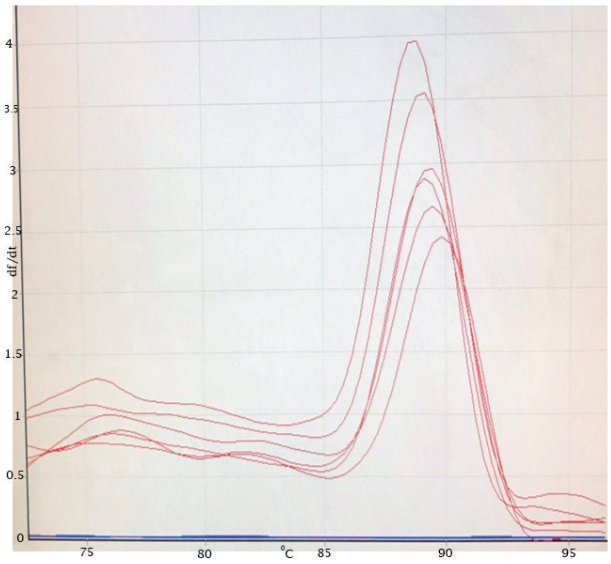
مراحل مختلف واکنش PCR ، زمان و دمای مربوط به هر مرحله

مراحل مختلف واکنش PCR		زمان	دما
۱	واسرشتگی اولیه	۵ دقیقه	°C 94
۲	واسرشتگی هر چرخه	۳۰ ثانیه	۹۴ °C
۳	اتصال پرایمر به توالی هدف	۲۵ ثانیه	۵۹–۶۱ °C براساس پرایمر
۴	امتداد و ساخت رشته جدید	۳۰ ثانیه	۷۲ °C
۵	آمادگی برای مرحله ذوب	۱ دقیقه	۷۲ °C
۶	افزایش دما از ۷۲ °C به ۹۹ °C	هر ۵ ثانیه ۱ درجه سانتی‌گراد افزایش	

از سوی دیگر برای محصول تکثیر شده PCR برای ژن‌های بررسی شده برای انجام الکتروفورزSSCP (Singel Strand Conformation) Polymorphism برای تک رشته‌ای شدن به مدت پنج دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد. سپس مطابق توسط ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد در ۱۵ ساعت با ولتاژ ۷۰ و در بافر۰/۶ TBE الکتروفوز (Bioneer Corp., Daejeon, Korea) انجام شد. پس از پایان الکتروفورز باندهای DNA با استفاده ازروش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. در مرحله بعد از انجام الکتروفورز SSCP و بررسی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره، برای تایید نتایج و موتاسیون احتمالی این ژن‌ها در سطح DNA از تکنیک توالی‌یابی (Bioneer, Korea) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری و بررسی دموگرافیک نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS(نسخه ۱۹,۰) (independent t-test) انجام شد ($p<0.05$).

یافته‌ها:

بر اساس بررسی‌های آماری و بر اساس ویژگی‌های دموگرافیک و بالینی بیماران انجام شده در این مطالعه، مشخص شد که میزان ابتلا به سرطان معده در جمعیت بررسی شده در مردان دو برابر زنان بود. 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. در بررسی پاتولوژیک نیز مشخص شد که حدود ۹۳/۳ درصد از نمونه‌ها از نوع آدنوکارسینوما بودند(جدول–۱). منحنی ذوب در PCR time Real بیانگر TM محصول تکثیرشده 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 *P53* در اگزون شماره چهار است(نمودار–۱).



نمودار–۱.منحنی ذوب: پیک‌های تند و دمای TM یکسان برای تمامی نمونه‌ها بیانگر صحت و اختصاصیت واکنش برای پرایمرهای طراحی شده است.

از سوی دیگر، ctهای به دست آمده نمونه‌های توموری و سالم آنالیز شد و تفاوت معناداری در میزان بیان ژن‌های *MICAL2* و *P53* در افراد بیمار و گروه سالم مورد مطالعه وجود داشت که این معنادار بودن نیز با نرم‌افزار SPSS آزمون Test-T independent تایید شد.

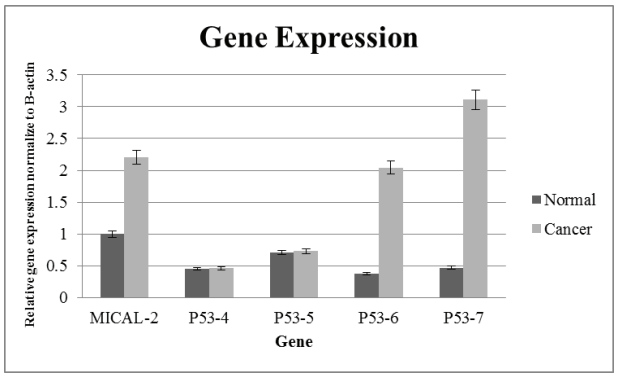
همچنین نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادکه افزایش میزان بیان اگزون شش ژن *P53* در بافت توموری ۲/۰۴ برابر بافت سالم و میزان بیان اگزون هفت ژن *P53* و در بافت توموری ۳/۱۱ برابر بافت سالم بود. از سوی دیگر، افزایش بیان ژن *MICAL2* دربافت توموری۲/۲ برابر بافت سالم بود (نمودار–۲).

–

جدول –۱. بررسی ویژگی‌های دموگرافیک و بالینی بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرمان

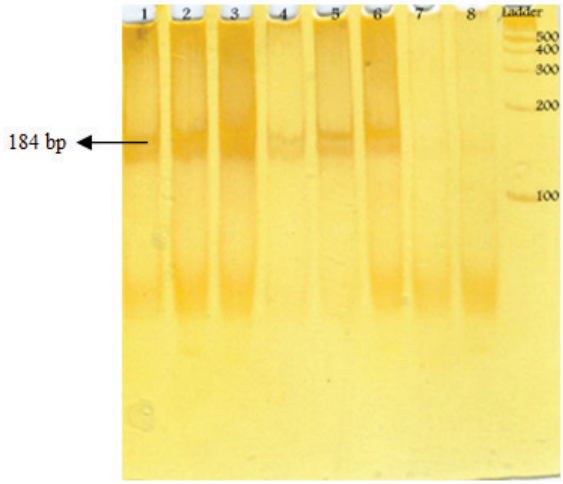
خصوصیات	تعداد	درصد
سن:		
≤۶۰	۱۷	۵۶/۶
>۶۰	۱۳	۴۳/۳
جنس:		
مرد	۲۰	۶۶/۶
زن	۱۰	۳۳/۳
نوع پاتولوژی تومور:		
آدنوکارسینوما	۲۸	۹۳/۳
لنفوم	۰	
GIST	۲	۶/۶

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-23]

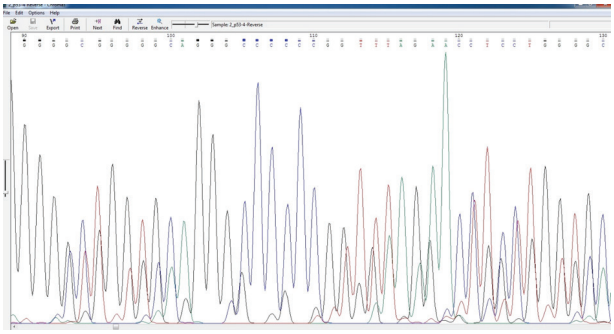


نمودار-۲. میزان بیان ژن‌های *P53* و *MICAL-2* در بافت‌های سالم و سرطانی

نتایج نشان داد که بر اساس روشPCR-SSCP، سه نمونه در اگزون چهار ،دو نمونه در اگزون پنج، دو نمونه در اگزون شش و در یک در اگزون هفت، جهشی از نوع حذف مشاهده شد (شکل-۲)، اما بر اساس بررسی دقیق‌تر نتایج از روش توالی‌یابی استفاده و مشخص شد که در اگزون شماره چهار در دو عدد از نمونه‌ها حذف (deletion) کدون‌های ۲۵۰ تا ۲۵۳ انجام گرفته و در یک نمونه نیز جهش بد معنی (missense) در کدون شماره ۲۴۸ مشاهده شد که در جدول شماره ۴ نشان داده شده است (شکل-۱).



شکل-۱. تصویر الکتروفورز SSCP محصول اگزون پنج ژن *P53* با اندازه ۱۸۴ جفت باز مشخص شده است.



شکل-۲. تصویر مربوط به توالی‌یابی اگزون پنج ژن *P53*

جدول-۲. جهش‌های مشخص شده در اگزون شماره چهار ژن *P53* با استفاده از روش توالی‌یابی

شماره کدون	تغییر توالی	نوع جهش	TM
۲۵۰-۲۵۳	CCATCCTCA	حذف	۴
۲۴۸	CGC-àCAG	بد معنی	۴

بحث:

در این مطالعه بیان اگزون‌های ژن *P53* و *MICAL2* مربوط به بافت توموری و بافت سالم مجاور آن، در افراد مبتلا به سرطان معده با استفاده از روش Real Time RT-qPCR بررسی شد که در نتیجه مشخص شد بیان ژن *MICAL2* و اگزون‌های ژن *P53* در بافت توموری، به مراتب بیشتر از بافت سالم اطراف تومور است. از سوی دیگر، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میانگین سنی بیماران مطالعه شده ۶۳ سال است شایع‌ترین گروه سنی درگیر گروه سنی۹۰-۶۰ سال است و اکثر بیماران مرد بودند. در مطالعه انجام شده از نظر فراوانی یافته‌های پاتولوژی سرطان معده، بیشتر بیماران مبتلا به آدنوکار سینوما بودند. از میان افرادی که مبتلا به سرطان معده، ۱۶/۶ درصد مبتلا به نوع روده‌ای (Intestinal) و ۱۰درصد مبتلا به (Diffused Type) نوع منتشر و ۷۳/۳درصد از نوع نامشخص بودند. سرطان بعد از بروز یک سری تغییرات از جمله جهش‌های متوالی در ژن‌ها اتفاق می‌افتد و هر جهش هم تا حدی تغییرات جدیدی را در سلول به وجود می‌آورد[۱۱].از سوی دیگر، آپوپتوز فرآیند فیزیولوژیکی است که موجب 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 غیره مسیرهای مختلف آپوپتوز را فعال می‌کنند[۱۲]. پروتئین‌های مختلفی در القا آپوپتوز نقش دارند که می‌توان به *P53* اشاره کرد. ژن *P53* یک ژن سرکوبگر تومور است و نقش بسیار مهمی در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ایفا می‌کند. این ژن مانند یک نگهبان برای سلول است و فرآیند همانندسازی را در DNA آسیب دیده سلول مهار می‌کند. *P53* در تنظیم ژن‌های پیش آپوپتیک متعددی دخیل است و در صورت ایجاد آسیب برگشت‌ناپذیری به DNA، فعال شده و منجر به القای فرآیند آپوپتوز می‌شود. یکی از نقش‌های ژن *P53*، تنظیم بیان ژن به عنوان عامل رونویسی است. چنان‌چه این ژن مستقیم به DNA وصل شود، رونویسی را فعال می‌کند. جهش‌های کوچک در ردیف‌های بازی ژن *P53*، توانایی اتصال پروتئین *P53* به ردیف‌های بازی ویژه DNA را به شدت کاهش می‌دهند. پروتئین *P53* به دلیل داشتن سازوکار عملکردی چندگانه در فعال کردن پروتئین‌های درگیر در ترمیم DNA آسیب دیده، القای توقف چرخه سلولی در نقطه کنترلی GI/S و القای آپوپتوز در صورتی که آسیب‌های وارد شده به DNA جبران ناپذیر باشند، به عنوان ژن ضد سرطانی شناخته شده است[۱۳]. از سوی دیگر، *MICAL2* ژنی است که محصول آن تبدیل سلول‌های مزانشیال به اپی‌تلیال را در بافت سرطانی انسان کنترل می کند و در تنظیم میکروفیلامنت‌های اکتینی نقش دارد و تغییر در بیان آن سبب ایجاد متاستاز در سرطان می‌شود. در نتیجه، تغییر در *P53* و *MICAL2* به عنوان یک شاخص مهم در سرطان‌های مختلف است[۱۴ و ۱۵]. رونویسی بالای ژن *P53* باعث بیان بیش از حد این ژن می‌شود. این افزایش رونویسی در اثر جهش‌های فعال‌کننده در ژن‌های کنترل کننده بیان ژن *P53* است. در هر مرحله از تومورزایی بررسی بیان اونکوژن‌ها، پروتواونکوژن ها و سرکوب کننده‌های تومور اهمیت قابل توجهی دارد. محصول این ژن است که از طریق آپوپتوز از تشکیل تومور و انتشار سلول‌هایی که از نظر ژنتیکی آسیب دیده‌اند، جلوگیری می‌کند. اختلال، غیرفعال شدن یا موتاسیون آن به دلیل جهش این ژن، می‌تواند به رشد کنترل نشده سلول‌ها و در نتیجه ایجاد سرطان منجر شود[۱۶].

نتایج این پژوهش در بررسی ژنتیکی بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرمان، مشابه نتایج Sancholi و همکارانش است که نشان دادند بیان ژن *P53* در بیماران مبتلا به سرطان مری، افزایش بیان نشان می‌دهد[۱۷]. Davidoff و همکارانش افزایش بیان ژن *P53* در بیماران مبتلا به سرطان پستان را اثبات کردند[۱۸].

نتایج Corry و همکارانش که از این روش استفاده کرده بودند نشان داد که افزایش

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-23]

بیان ژن *P53* در بیماران مبتلا به سرطان مری رخ داده است[۱۹]. مطالعه‌ای توسط Maehare و همکاران با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی و آنتی‌بادی مونوکلونال روی اهمیت پیش‌آگهی بیان پروتئین*P53* در بافت‌های توموری مبتلایان به سرطان معده انجام شد و در آن بیان *P53* ارتباط نزدیکی با سرطان‌های پیشرفته معده که با نتایج ما در افزایش بیان *P53* یکسان بود[۲۱]. در مطالعه‌ای که توسط Meng و همکاران روی سرطان اولیه پستان انجام شد، ۶۱ درصد جهش را در اگزون‌های ۸–۵ ژن *P53* مشاهده کردند[۲۲]. طبق گزارش‌های Shiao در ایتالیا، میزان جهش در ژن *P53* مبتلایان به سرطان معده ۶۶ درصد گزارش شد[۲۳]. طبق مطالعه‌های Uchino و همکاران، میزان ۲۵ درصد جهش را در سرطان اولیه معده و ۴۲درصد در سرطان پیشرفته معده گزارش کردند[۲۴]. Joshaghani و همکارانش مطالعه‌ای را برای تعیین جهش‌های ژن *P53* در مبتلایان سرطان معده سه مرکز بیمارستانی در تهران به روش PCR-SSCP انجام دادند که در آن میزان بروز جهش در ژن *P53* در سرطان معده ۲۰/۵ درصد به دست آمد که بیانگر فراوانی متوسط جهش ژن*P53* در جامعه مورد مطالعه است[۲۵]. اما Luinetti و همکاران میزان جهش در ژن *P53* حتی در سرطان پیشرفته معده را ۲۶ درصد گزارش کردند[۲۶]. در مطالعه Ho میزان بیان ژن‌های MICAL1 و *MICAL2* در رده سلول‌های مثانه بسیار بیشتر از سلول‌های طبیعی بود. تفاوت تحقیق ذکرشده با تحقیق حاضر در نوع سلول‌های سرطانی بود اما نتایج هردو مطالعه بیانگر افزایش بیان ژن *MICAL2* در سرطان است[۲۷]. بیان ژن *MICAL2* با روش‌های RT-PCR و ایمنو هیستوشیمی توسط Mariotti بررسی شد که نتیجه آن بیان بالای این ژن در سلول‌های سرطانی در مرحله ابتدای تهاجم بود که با یافته‌های این پژوهش به طورکامل همخوانی دارد[۲۸]. بنابراین بر اساس مطالعه‌های جدید مشخص شده است که *MICAL2* به طور گسترده‌ای در تومور بیان می‌شود، به طوری که پیشرفت تومور را تسریع کرده و به عنوان عامل جدید پیشرفت تومور شناخته می شود[۲۹]. از طرفی مطالعه‌های بسیاری نشان داده‌اند که گرچه تعداد زیادی از ژن‌ها در بدخیمی‌های انسانی، چندین برابر تقویت می‌شوند و در نیجه برای بررسی موتاسیون ژنی، تاکنون مطالعه‌های فراوانی روی سرطان‌های مختلف بدن انسان انجام شده است اما در میان ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی، قابل توجه‌ترین ژن موتاسیون یافته مهار کننده رشد سلولی در بدخیمی‌ها ژن *P53* است[۳۰ و ۳۱] که درهمین راستا در این پژوهش نیز میزان تغییرات بیان آن مطالعه و بررسی شد، چرا که این ژن در بررسی پاسخ به درمان بیماران از اهمیت زیادی برخوردار است، ولی از آنجا که در بررسی بدخیمی‌ها، میزان متاستاز نیز از اهمیت زیادی برخوردار است همراه با ژن *P53* میزان تغییر در بیان ژن *MICAL-2* نیز بررسی شد تا احتمال هجوم سلول‌های سرطانی به بخش‌های دیگر نیز مطالعه دقیق‌تری شود.

نتیجه‌گیری:

در این مطالعه بررسی بیان اگزون‌های ژن *P53* و *MICAL-2* در سرطان معده بررسی شد که با توجه به تغییرات در بیان این ژن‌ها می‌توان با تعیین میزان بیان آن‌ها در افرادی که سابقه خانوادگی دارند در پیش آگهی بیماری و بررسی امکان درمان کمک کرد. چرا که تشخیص سرطان در مراحل اولیه، به‌طور قطع با پاسخ به درمان بهتری همراه است و تغییر در ژن‌های مورد مطالعه می‌تواند به عنوان نتیجه موثر در پیش‌آگهی یا در مداخله درمانی مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی:

از زحمت‌های استادان و کارکنان دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان برای تامین بودجه و دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان که در تمامی مراحل برای انجام پژوهش و تدوین آن کمک شایانی کرده‌اند سپاسگزاری می‌شود.

منابع:

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for hispanics/latinos, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2012 Sep 1;62(5):283-98.

Ilson DH, Bains M, Kelsen DP, O'Reilly E, Karpeh M, Coit D, Rusch V, Gonen M, Wilson K, Minsky BD. Phase I trial of escalating-dose irinotecan given weekly with cisplatin and concurrent radiotherapy in locally advanced esophageal cancer. Journal of clinical oncology. 2003 Aug 1;21(15):2926-32.

Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. The Lancet. 2016 Nov 26;388(10060):2654-64.

Lima VP, de Lima MA, André AR, Ferreira MV, Barros MA, Rabenhorst SH. H pylori (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. World journal of gastroenterology: WJG. 2008 Feb 14;14(6):884.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. Molecular Cell Biology (Lodish. Molecular Cell Biology, sixth ed. WH Freeman. 2007.

Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M. TP53 variations in human cancers: new lessons from the IARC TP53 database and genomics data. Human mutation. 2016 Sep;37(9):865-76.

Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer–a multivariate analysis. British journal of cancer. 1999 Feb 12;79(7-8):1255.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic acids research. 2009 Feb 22;37(6):e45-.

Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Quantitation of DNA and RNA. Cold Spring Harbor Protocols. 2007 Nov 1;2007(11):pdb-ip47.

Tommasi S, Abatangelo M, Lacalamita R, Montemurro S, Marzullo F, Paradiso A. Mutations spanning P53 exons 5–9 detected by non-isotopic RNAse cleavage assay and protein expression in human colon

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-23]

cancer. Cancer genetics and cytogenetics. 2001 Aug 1;129(1):40-2.

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. 2011 Jan 1:jcs-089367.

Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. Carcinogenesis. 2000 Mar 1;21(3):379-85.

Staal SP, Huebner K, Croce CM, Parsa NZ, Testa JR. The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. Genomics. 1988 Jan 31;2(1):96-8.

Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. Developmental cell. 2011 Jul 19;21(1):92-101.

Yu Q. Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer therapy. Drug Resistance Updates. 2006 Feb 1;9(1-2):19-25.

Motalleb G, Sancholi S, Yegane Moghadam A, Talaee R. P53 gene expression evaluation in patients with esophageal cancer using reverse transcriptase real time polymerase chain reaction. Pajoohandeh Journal. 2015 Aug 15;20(3):154-62.

Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991 Jun 1;88(11):5006-10.

Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene. 2003 Nov;22(53):8590.

Chiang PW, Beer DG, Wei WL, Orringer MB, Kurnit DM. Detection of erbB-2 amplifications in tumors and sera from esophageal carcinoma patients. Clinical cancer research. 1999 Jun 1;5(6):1381-6.

Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer–a multivariate analysis. British journal of cancer. 1999 Feb 12;79(7-8):1255.

Meng L, Lin L, Zhang H, Nassiri M, Morales AR, Nadji M. Multiple mutations of the p53 gene in human mammary carcinoma. Mutation Research/DNA Repair. 1999 Dec 7;435(3):263-9.

Shiao YH, Rugge MA, Correa PE, Lehmann HP, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. The American journal of pathology. 1994 Mar;144(3):511.

Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. International journal of cancer. 1993 Jul 9;54(5):759-64.

Joshaghani HR, Koochaki E, Amini R, Derakhshandeh P, Ehsani A, Shabani M, Kadivar M. Determination of P53 gene mutations in gastric cancer by PCR-SSCP. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2003 Sep 1;5(2):36-42.

Luinetti O, Fiocca R, Villani L, Alberizzi P, Ranzani GN, Solcia E. Genetic pattern, histological structure, and cellular phenotype in early and advanced gastric cancers: evidence for structure-related genetic subsets and for loss of glandular structure during progression of some tumors. Human pathology. 1998 Jul 1;29(7):702-9.

Ho JR, Chapeaublanc E, Kirkwood L, Nicolle R, Benhamou S, Lebret T, Allory Y, Southgate J, Radvanyi F, Goud B. Deregulation of Rab and Rab effector genes in bladder cancer. PloS one. 2012 Jun 19;7(6):e39469.

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.

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.

Kale A, Baker NE. Tumor evolution: Multiple induction mechanisms for cell competition. Molecular & Cellular Oncology. 2018 Aug 18:1-3.

Joerger AC, Fersht AR. The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. Annual review of biochemistry. 2016 Jun 2;85:375-404.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-23]