

## بررسی مقایسه‌ای بیان ژن AXIN2 در انواع پولیپ‌های روده بزرگ

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۸ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۵/۳۱

**زمینه و هدف:** بیشتر سرطان‌های روده بزرگ از پولیپ‌ها منشا می‌گیرند. بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در رشد و توسعه تومور بر روی پولیپ‌های روده بزرگ می‌تواند عاملی برای تشخیص روند بدخیمی پولیپ‌ها باشد. AXIN2، ژن هدف مسیر Wnt می‌باشد و سطح هسته‌ای  $\beta$ -catenin را تنظیم می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های روده بزرگ و ارتباط آن با ویژگی‌های پاتولوژیک پولیپ بود.

**روش بررسی:** جامعه مورد بررسی مراجعین دارای پولیپ روده بزرگ، به بیمارستان طالقانی تهران، از مهر ماه ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ بودند. تعداد ۴۴ نمونه بیوپسی پولیپ و ۱۰ نمونه بافت نرمال به همراه مشخصات دموگرافیک و بالینی بیماران جمع‌آوری و میزان بیان ژن AXIN2، به روش Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج توسط ABI Prism 7500 Sequence Detection System (SDS) software, version 2.1.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City CA, USA) و GraphPad Prism, version 3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) آنالیز و تغییرات بیان ژن در گروه‌های مختلف پولیپ نسبت به بافت نرمال با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  بررسی شد.

**یافته‌ها:** داده‌ها، نشان‌دهنده افزایش بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های روده بزرگ نسبت به بافت نرمال ( $RQ > 2$ ) بود، که در پولیپ‌های آدنوما به‌طور معناداری از گروه هایپرپلاستیک بیشتر بود ( $P = 0/015$ ). همچنین فعالیت AXIN2 در ناحیه کولون، برخلاف رکتوم، نسبت به بافت نرمال بالاتر بود.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان می‌دهند که الگوی بیانی AXIN2، در روند شکل‌گیری پولیپ از بافت نرمال، تغییر چشمگیری می‌کند. بیان افزایش یافته این ژن می‌تواند به‌عنوان یک مارکر تفکیکی در جداسازی پولیپ‌های آدنوما از هایپرپلاستیک، مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر، محل قرارگیری پولیپ در سطح فعالیت AXIN2 موثر می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** ژن AXIN2، پولیپ روده، سرطان روده بزرگ، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ریل تایم.

مینا گل محمدی<sup>۱</sup>

حمید اسدزاده عقدایی<sup>۱</sup>

حسین مقصودی<sup>۲</sup>

احسان ناظم‌الحسینی مجرد<sup>۳\*</sup>

۱- مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

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

\* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، خیابان شهید اعرابی، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد.

تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۵۱۸

E-mail: ehsanmojarad@gmail.com

### مقدمه

می‌باشد. وجود پولیپ در روده بزرگ و طی روند توالی آدنوما به کارسینوما یکی از عمده‌ترین دلایل بروز سرطان روده بزرگ است، از این‌رو ارزیابی شاخصه‌های پاتولوژیکی پولیپ‌های خوش‌خیم و بدخیم اهمیت بسزایی دارد.<sup>۱,۲</sup> مسیرهای مولکولی بسیاری در ایجاد سرطان روده بزرگ نقش دارند که این مسیرها شامل جهش‌ها و تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌باشند، مسیر پیام‌رسانی Wnt یکی از مهمترین و ابتدایی‌ترین رویدادهای ژنتیکی در شکل‌گیری سرطان روده بزرگ

سرطان روده بزرگ سومین عامل مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان می‌باشد. بر اساس گزارش مرکز ملی سرطان ایران، سرطان روده بزرگ سومین سرطان شایع در بین زنان ایرانی و پنجمین سرطان در مردان است.<sup>۱</sup> سرطان روده بزرگ از اندک بدخیمی‌های قابل پیشگیری است که این مهم با تشخیص زودرس امکان‌پذیر

کلسیمی هستند که به‌عنوان میانجی اتصال بین سلول‌ها و ماتریکس پروتئین‌های ساختمانی اطراف آن‌ها عمل می‌کنند. برهم‌کنش بین  $\beta$ -catenin و Cadherin نشان از نقش مسیر پیام‌رسانی Wnt/APC در تنظیم سازمان‌یابی درون سلولی است.<sup>۶</sup> مسیر Wnt در سرطان‌های مختلف به طرق متفاوتی دچار اختلال می‌شود. در بافت اپیتلیوم روده بزرگ تخریب مسیر متعارف Wnt گویا یکی از گام‌های ضروری اولیه تومورزایی است.<sup>۷</sup>

AXIN از اعضای مهم مسیر متعارف Wnt می‌باشد که فعالیت این سیگنال را در غیاب لیگاند Wnt مهار می‌کند. در واقع نقش مهمی در تنظیم پایداری  $\beta$ -catenin ایفا می‌کند. بنابراین فرض بر آن شده است که افزایش بیان ژن AXIN2 در سطح RNA بر روی پولیپ‌های روده بزرگ، می‌تواند فاکتوری مناسب جهت بررسی میزان بدخیمی پولیپ و در نهایت تشخیص زودهنگام سرطان روده بزرگ باشد. در مطالعات گسترده‌ای که بر روی بیماری‌های مختلف از جمله سرطان روده بزرگ انجام شده، مشخص شده است که بیان ژن AXIN2 در سلول‌های توموری نسبت به بافت نرمال افزایش داشته است.<sup>۸</sup> در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های سرطانی آملوبلاستوما بیان پروتئین  $\beta$ -catenin و AXIN2 به‌طور چشمگیری بیشتر از بافت نرمال ارزیابی شده است.<sup>۹</sup>

ارتباط وقوع جهش بر روی ژن AXIN2 در گسترش سرطان روده بزرگ بین جمعیت کشمیری نشان داده است که جهش در ژن AXIN2 مانند موتاسیون G>T، Novel بر روی کدون G695T اگرچه ۷ ممکن است یک عامل مستعد کننده به سرطان روده بزرگ در جمعیت کشمیری باشد.<sup>۱۰</sup> نظر به اینکه بسیاری از موارد ابتلا به سرطان روده بزرگ از پولیپ‌های کوچکی در این ناحیه که آدنوما نامیده می‌شود، ایجاد می‌گردند.<sup>۱۱</sup>

بنابراین انجام مطالعات مولکولی به منظور یافتن ژنی که پتانسیل سرطانی شدن پولیپ‌ها را ارزیابی کند از اولویت‌های پژوهشی برخوردار می‌باشد.<sup>۱۲</sup> مطالعات نشان داده‌اند که الگوهای متفاوتی از بیان ژن AXIN2 بین تومورهای انسانی و بافت نرمال وجود دارد.<sup>۱۴</sup> مطالعه حاضر با هدف ارزیابی پروفایل بیانی ژن AXIN2 در پولیپ‌های دیسپلاستیک یا آدنوماتوز و غیر دیسپلاستیک یا هیپرپلاستیک و همچنین بافت نرمال جهت بررسی ارزش بیان این ژن به‌عنوان یک مارکر تشخیصی زودهنگام انجام گردید.

است. خانواده Wnt شامل ۱۹ گلیکوپروتئین ترشحی است که نقش حیاتی در تنظیم فرآیندهای مختلف مانند تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و خودنوسازی سلول‌های بنیادی ایفا می‌کند.<sup>۴</sup>

گیرنده بالادستی مسیر Wnt/APC پروتئینی تراغشایی به نام Frizzled است. برخلاف گیرنده‌های تیروزین کیناز، به‌نظر می‌رسد که Frizzled پس از اتصال به غشاء با نوع دیگری از پروتئین‌های با چربی تغییر شکل یافته تراغشایی به‌نام پروتئین هم‌خانواده‌ی گیرنده چربی (LRP) همراه می‌شود. باور بر این است که این پروتئین به‌عنوان یک کمپلکس کمک گیرنده با Frizzled عمل می‌کند و پروتئین درون سلولی به‌نام Dishevelled را فعال می‌کند. یکی از نتایج حایز اهمیت فعال شدن مسیر Wnt/APC پایداری پروتئینی به‌نام  $\beta$ -catenin است. در نبود پیام بالادستی، چندین پروتئین در سیتوپلاسم گرد هم جمع شده و یک کمپلکس تجزیه شامل پروتئین AXIN، APC، CK1،  $\beta$ -catenin را تشکیل می‌دهند. برای GSK3 $\beta$  و CK1 که سرین و ترونین کیناز می‌باشند یک داربست ساختمانی را تشکیل می‌دهد. کمک فعال‌کننده نسخه‌برداری مهمی به نام  $\beta$ -catenin به واسطه فسفریله شدن متوالی توسط CK1 و GSK3 $\beta$  و سپس یوبی کوئیتینه شدن توسط این کمپلکس دستخوش تغییرات شیمیایی می‌شود.

این تغییرات به منزله‌ی علامت‌های مولکولی عمل می‌کنند که  $\beta$ -catenin را هدف تجزیه پروتئوزوم قرار دهند. در این صورت، از آن‌جا که  $\beta$ -catenin برای اتصال به خانواده فاکتورهای نسخه‌برداری TCF/LEF در سلول‌های تحریک نشده در دسترس نمی‌باشد، ژن‌های هدفی که تحت تنظیم  $\beta$ -catenin و TCF هستند مهار می‌شوند. فعال شدن Dishevelled با اتصال لیگاند، منجر به مهار فعالیت کینازی GSK3 می‌گردد. در نتیجه،  $\beta$ -catenin از کمپلکس تجزیه کننده جدا شده، پایدار می‌گردد و به هسته منتقل می‌شود.  $\beta$ -catenin هسته‌ای با خانواده فاکتور سلول T (TCF) فاکتورهای رونویسی همراه می‌شود و آن‌ها را فعال می‌کند. TCF ای که توسط  $\beta$ -catenin فعال می‌شود، فاکتور رونویسی c-MYC و پروتئین تنظیم‌کننده‌ی چرخه سلولی Cyclin-D را که در تحریک رشد سلولی کاربرد دارد و ژن‌های هدف دیگر مانند AXIN2 را هدف قرار می‌دهد.  $\beta$ -catenin افزون بر فاکتورهای رونویسی TCF در هسته، با پروتئین‌های سیتوپلاسمی به‌نام Cadherin نیز همراه می‌شود. Cadherin‌ها پروتئین‌های وابسته به

## روش بررسی

این مطالعه از نوع تحلیلی-توصیفی بود که در افراد دارای پولیپ روده بزرگ که بین سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ جهت درمان یا تشخیص به بیمارستان آیت‌الله طالقانی تهران مراجعه کرده بودند، انجام شد. بیماران پس از انجام کولونوسکوپی و تایید نتایج حاصل توسط پاتولوژیست به منظور بررسی‌های ژنتیکی در این طرح پژوهشی معرفی شدند. در این مطالعه از تمامی بیماران رضایت‌نامه کتبی دریافت و در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت یا عدم شرکت در این مطالعه توضیح داده شد. همگی بیماران توسط پزشک آموزش دیده مورد مشاوره قرار گرفته و داده‌های دموگرافیک، کلینیکی و شرح حال از ایشان کسب گردیده و در فرم‌های مربوطه وارد گردید.

پس از انجام غربالگری و بررسی‌های لازم در نهایت تعداد ۴۴ نفر که دارای پولیپ در روده بزرگ بودند و نیز تعداد ۱۰ نمونه بافت نرمال به عنوان نمونه کنترل، جامعه مورد مطالعه را تشکیل دادند، که بلافاصله پس از نمونه‌گیری توسط تانک ازت به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استفاده در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند. معیارهای ورود افراد مورد مطالعه، شامل بیماران بالای ۵۰ سال بود که با مشاوره در مرکز پیشگیری و تشخیص زودرس سرطان روده بزرگ مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت انجام کولونوسکوپی انتخاب و به واحد کولونوسکوپی معرفی شده بودند و داده‌های بالینی، سابقه خانوادگی و معاینات ایشان لزوم کولونوسکوپی را تایید کرده و توسط پزشک به واحد کولونوسکوپی معرفی شدند، در صورت مشاهده‌ی توده پولیپ مانند در حین کولونوسکوپی این بیماران، دو نمونه یکی برای بخش پاتولوژی و دیگری جهت تست‌های مولکولی گرفته شده بود. تمامی نمونه‌ها در بخش پاتولوژی پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی توسط پاتولوژیست مورد مطالعه و از لحاظ بافت شناسی نوع پولیپ مشخص گردید. افرادی که تحت کولونوسکوپی قرار گرفتند ولی با نظر تیم پزشکی امکان نمونه گرفتن از ایشان میسر نبود و همین‌طور بیمارانی که داده‌های کلینیکی و پاتولوژی آن‌ها معتبر نبود و یا نمونه‌ی پاتولوژی حاصل از کولونوسکوپی ایشان در دسترس نبود جز معیارهای خروج افراد بیمار از مطالعه بودند. RNA به وسیله کیت شرکت یکتا تجهیز

آزمایش (Total RNA Extraction mini kit for isolation RNA from

Blood, Cultured cell, Tissue, Bacteria, Yeast. YTA. Iran) شماره سریال YT9065 بر اساس دستورکار مربوطه استخراج شد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۲٪ و برای تعیین کمیت، غلظت و OD نمونه‌ها توسط طیف سنجی نوری با استفاده از NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) در طول موج ۲۶۰ nm اندازه‌گیری شد. بنابراین برای تعیین کیفیت میزان خالص بودن RNA نسبت بهینه OD260/280 بین ۱/۸-۲ می‌باشد و نسبت‌های دیگر نشان‌دهنده آلودگی RNA با DNA و یا پروتئین می‌باشد، لازم به یادآوری است در تمام واکنش‌ها غلظت‌های مشابهی از RNA نمونه‌های مختلف استفاده شد، اصطلاح عمل RNA adjusting (normalizing) انجام گرفت. سپس DNA مکمل به وسیله 2-step RevertAid Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) با شماره سریال K1691 بر اساس دستورکار از روی نمونه‌های RNA استخراج شده، ساخته شد. واکنش cDNA سازی در دو میکس که میکس اول حاوی ۵  $\mu\text{l}$  RNA، ۱  $\mu\text{l}$  پرایمر رندوم هگزامر (۰/۲  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) و ۶/۵  $\mu\text{l}$  آب عاری از آنزیم RNase ساخته شد و واکنش به مدت پنج دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  به منظور باز شدن ساختارهای ثانویه RNA و سهولت اتصال پرایمر انجام شد.

بلافاصله نمونه‌ها به مدت دو دقیقه بر روی یخ قرار گرفتند و سپس مواد میکس دوم که شامل ۴  $\mu\text{l}$  بافر 5X، ۱  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (RiboLock™, Thermo Fisher Scientific, Germany)، ۲ میکرولیتر dNTP (10mM) و ۱  $\mu\text{l}$  آنزیم RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )، به اندازه ۸  $\mu\text{l}$  به نمونه‌های میکس اول اضافه شد تا به حجم کلی ۲۰  $\mu\text{l}$  برسد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای  $42^{\circ}\text{C}$  به منظور ساخت cDNA انجام شد و در نهایت میکروتیوب‌های حاوی نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند تا آنزیم RT غیرفعال شود. در نهایت محصولات واکنش در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند. توالی پرایمرهای forward: 5'-GTCTCTACCTCATTTCCCGAGAAC-3' و reverse: 5'-CGAGATCAGCTCAGCTGCAA-3' برای ژن AXIN2 با طول قطعه ۸ جفت باز و ژن  $\beta$ -catenin با توالی پرایمرهای

کالیبراتور به صورت نسبی بررسی شده است. در واقع ارتباط معنادار میان گروه‌های مختلف پولیپ با نمونه کنترل توسط مقادیر RQ مورد سنجش قرار گرفته است. بدین صورت که  $RQ < 0.5$  بیانگر کاهش بیان ژن و  $RQ > 2$  افزایش بیان ژن و همچنین  $0.5 < RQ < 1.9$  (RQ) میان  $0.5$  تا  $1/999$  نشان می‌دهد که تغییرات در بیان آن ژن نسبت به نمونه کنترل به صورت نرمال بوده و تغییری نداشته است. افزون‌بر این با بهره‌گیری از نرم‌افزار Prism منحنی نتایج حاصل از Real-time PCR رسم گردید و  $P < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شده است.

### یافته‌ها

در این بررسی تعداد ۴۴ نفر که دارای پولیپ در روده بزرگ بودند و نیز تعداد ۱۰ نمونه بافت نرمال به‌عنوان نمونه کنترل، جامعه مورد مطالعه را تشکیل داده‌اند. داده‌های دموگرافیک و بالینی مربوط به بیماران دارای پولیپ که تحت کولونوسکوپی قرار گرفتند، از پرونده بیماران و سامانه الکترونیکی استخراج و ثبت گردید. این داده‌ها افزون بر مشخصات دموگرافیک، بیماری‌های جانبی و داشتن سابقه خانوادگی، محل و مشخصات پاتولوژی پولیپ خارج شده با کولونوسکوپی را نیز شامل شد. همچنین داده‌های بالینی و دموگرافیک افراد سالم نیز ثبت گردید. از ۴۴ فرد مورد مطالعه، نیمی مرد و نیمی را زن تشکیل می‌دادند. اطلاعات مربوط به محل و مشخصات پاتولوژی پولیپ‌ها در جدول ۱ بیان شده است.

در این مطالعه به منظور بررسی تغییرات میزان بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های نواحی مختلف روده از روش Fold change استفاده شده است. در نمودار ۱ نتایج حاصل از میزان بیان ژن AXIN2 در تعدادی از نمونه‌ها نشان داده شده است که در این شکل گراف قرمز مربوط به بیان ژن AXIN2 و گراف زرد مرتبط با بیان ژن  $\beta$ -actin می‌باشد.

به‌منظور حصول اطمینان از حضور پیک‌های غیراختصاصی پرایمر AXIN2 از تکنیک Melt curve analysis استفاده شد. نمودار ۲ نقطه ذوب را نشان داده است.

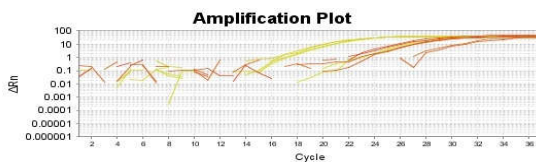
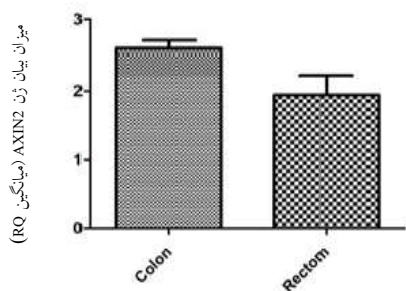
میزان تغییرات بیان ژن AXIN2 در انواع مختلف پولیپ در نمودار ۳ نشان داده شده است. بر اساس نمودار ۳ در هر دو گروه پولیپ‌های آدنوما و هایپرپلاستیک، افزایش بیان ژن AXIN2 نسبت به

reverse:5'-ATGTGGCCGAGGACTTTGATT -3' forward:5'-AGTGGGGTGGcTTTAGGATG-3' با طول باند ۱۱۲ جفت باز توسط Primer Express software, version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) پس از آن به‌منظور انجام واکنش Real-time PCR از ABI Prism® 7500 Sequence Detection System, (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) SYBR Green و روش SYBR Premix Ex Taq™ II استفاده شد. واکنش برابر با دستورکار SYBR Green Kit (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) تهیه شد. در مطالعه حاضر به منظور بررسی و مقایسه میزان بیان پولیپ‌ها با بافت نرمال از روش کمی سنجی نسبی Relative quantification استفاده شده است که در مطالعات بیانی مناسب‌ترین روش برای سنجش و مقایسه به‌شمار می‌آید.

در این بررسی، روش Real-time همراه با نرمالیزاسیون انجام گرفته است. استفاده از ژن بتا‌اکتین به‌عنوان کنترل داخلی و نمونه‌های بافت نرمال به منظور کالیبراسیون، از بروز خطا در متد آنالیزی پژوهش به طور چشمگیری کاسته و کنترل داخلی مانع از موارد منفی کاذب در آزمایش شده است.

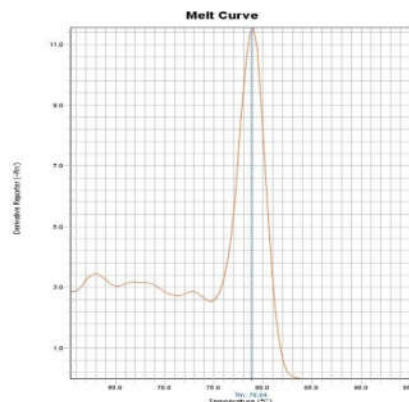
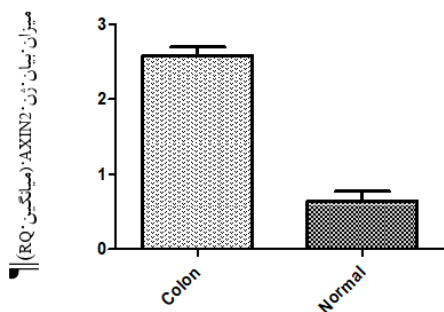
واکنش نمونه‌های مورد نظر طی ۳۷ چرخه و هر سیکل دارای ۳ مرحله به‌صورت زیر انجام پذیرفت: مرحله فعال‌سازی (Activation) در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و سپس دو رشته در مرحله (Denaturation) و دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت پنج ثانیه از هم جدا شدند و در پایان مرحله اتصال پرایمرها (Primer annealing) و طول‌سازی (Extention) در دمای  $58^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۴ ثانیه انجام شد.

در مطالعه حاضر برای آنالیز میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه از ABI Prism 7500 Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) و جهت آنالیز آماری از GraphPad Prism, version 3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) استفاده شد. همچنین میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به بافت نرمال با متد Fold change یا  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  با فرض برابری راندمان تکثیر (Efficiency) بین ژن موردنظر و مرجع مورد بررسی گرفته است. میزان تغییرات بیان ژن‌های هدف در پولیپ‌ها با بیان ژن کنترل داخلی نرمالیز شده و با میزان تغییرات بیان ژن‌ها در نمونه کنترل یا



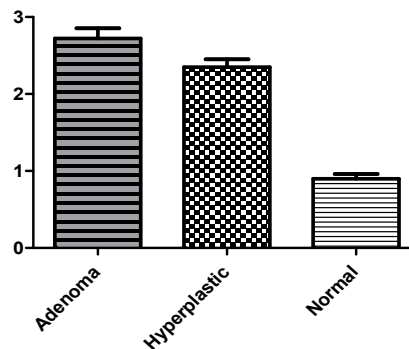
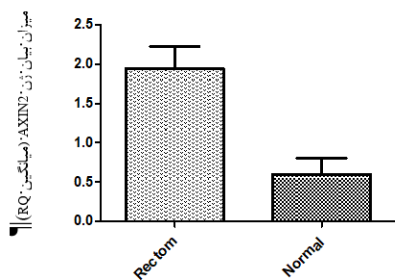
نمودار ۱: تکثیر ژن AXIN2 در نمونه‌های مختلف

نمودار ۴: بررسی میزان تغییرات بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های واقع در بخش‌های مختلف روده بزرگ.  $RQ > 2$  افزایش بیان ژن AXIN2 در ناحیه کولون نسبت به بافت نرمال.  $0.5 < RQ < 1/9$  عدم تغییر در میزان بیان ژن AXIN2 در ناحیه رکتوم نسبت به بافت نرمال.



نمودار ۲: نقطه ذوب مربوط به ژن AXIN2

نمودار ۵: بررسی میزان تغییرات بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های واقع در کولون نسبت به بافت نرمال



نمودار ۶: بررسی میزان تغییرات بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های واقع در رکتوم نسبت به بافت نرمال

نمودار ۳: میزان تغییرات بیان ژن AXIN2 در دو گروه پولیپ‌های آدنوما و هایپرپلاستیک.  $RQ > 2$  افزایش بیان ژن AXIN2 در انواع پولیپ نسبت به بافت نرمال

جدول ۱: داده‌های مربوط به محل و مشخصات پاتولوژی پولیپ‌ها

داده‌ها	فراوانی	درصد
انواع پولیپ	۳۰	۶۷/۱۸
	۱۴	۳۱/۸۱
	۳۴	۷۷/۲۷
درجه تمایز بافت	۵	۱۱/۳۶
(دیسپلازی)	۵	۱۱/۳۶
اندازه (mm)	۳۷	۸۴
	۶	۱۳/۶۳
	۳۹	۸۷/۶۳
محل قرارگیری	۵	۱۱/۳۶
	۴۴	۱۰۰/۱۰۰
مجموع		

شد که این افزایش بیان در پولیپ‌های آدنوما به‌طور معناداری بیشتر از گروه هایپرپلاستیک بوده است ( $P=0/015$ ). با توجه به اینکه بیان این ژن در هر دو نوع پولیپ افزایش داشته است به‌احتمال نقص در این ژن از همان ابتدای روند تغییر در بافت روده بزرگ ایجاد شده و بنابراین شاید بتوان از آن به‌عنوان یک مارکر تشخیصی زود هنگام استفاده کرد. Schaal و همکاران نیز مطابق با مطالعه‌ی حاضر گزارش کردند که میزان بیان ژن AXIN2 در دو سطح RNA و پروتیین در سلول‌های توموری سرطان روده بزرگ در مقایسه با بافت نرمال به‌طور چشمگیری افزایش یافته است ( $P<0/001$ ). بر خلاف یافته‌های مطالعه حاضر در مطالعه Schaal و همکاران ارتباطی بین بیان AXIN2 با پارامترهای کلینیکالی مانند درجه بندی بافتی، تهاجم وریدی، جایگاه تومور و بقای بیماران مشاهده نشد<sup>۸</sup> در حالی که در مطالعه حاضر در گروه پولیپ‌های ناحیه کولون افزایش بیان نسبت به بافت نرمال مشاهده گردید، اما در پولیپ‌های قرار گرفته در رکتوم تغییری در میزان بیان ژن نسبت به بافت نرمال مشاهده نشد، با توجه به افزایش بیان ژن AXIN2 به‌احتمال پولیپ‌های قرار گرفته در کولون مسیری متفاوت از پولیپ‌های رکتوم را در رشد و گسترش تومورزایی در پی می‌گیرند.

افزایش بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های هایپرپلاستیک و آدنوما که در این مطالعه مشاهده شده است شاید بیانگر این موضوع باشد که این ژن می‌تواند در روند تغییر شکل و بدخیمی بافت روده بزرگ

بافت نرمال مشاهده شد (افزایش بیان بیشتر از ۲ برابر بافت نرمال) که این افزایش بیان در گروه آدنوما به‌طور معنادار و چشمگیری بیشتر از گروه هایپرپلاستیک بوده است ( $P=0/015$ ).

ارتباط میان تغییرات بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های قرار گرفته در ناحیه کولون و رکتوم روده بزرگ در نمودار ۴ نشان داده شده است. مطابق نمودار ۵ افزایش بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های قرار گرفته در کولون نسبت به بافت نرمال به‌طور معناداری مشاهده شده است (تغییرات بیان ژن در پولیپ‌های کولون  $<2$  بافت نرمال).

اما با توجه به نمودار ۶ در بخش رکتوم روده تغییری در میزان بیان ژن AXIN2 نسبت به بافت نرمال مشاهده نشد (تغییرات بیان ژن در پولیپ‌های رکتوم ۰/۵ تا ۱/۹ برابر بافت نرمال).

## بحث

در مطالعه حاضر فرض گردید که بررسی میزان تغییرات بیان ژن AXIN2 در سطح RNA بر روی پولیپ‌های روده بزرگ، می‌تواند فاکتوری مناسب جهت بررسی میزان بدخیمی پولیپ و در نهایت تشخیص زود هنگام سرطان روده بزرگ باشد. بنابراین میزان تغییرات بیان ژن AXIN2 در گروه‌های مختلف پولیپ مورد ارزیابی قرار گرفته است. بر پایه نتایج موجود در مطالعه انجام شده، افزایش بیان ژن AXIN2 در هر دو گروه پولیپ‌های آدنوما و هایپرپلاستیک مشاهده

آدنوما به کارسینوما می‌باشد، فعال شدن این مسیر و در پی آن افزایش بیان AXIN2 به احتمال با وقوع بدخیمی در ارتباط است. افزایش بیان AXIN2 در پولیپ‌های هایپرپلاستیک و آدنوما در نتیجه‌ی مطالعه صورت گرفته این احتمال را وجود می‌آورد که افزایش بیان این ژن یکی از ابتدایی‌ترین رویدادهای تشکیل پولیپ در افراد مستعد می‌باشد و شاید مطالعه در مورد دلایل این افزایش بیان راه‌کارهای ارزنده‌ای در مورد روش‌های مولکولی پیشگیری ارایه دهد. در واقع یافتن این مارکر مولکولی در کنار داده‌های پاتولوژی، به افتراق پولیپ‌های سرطانی کمک شایانی می‌کند. لزوم اثبات این فرضیه، بررسی بیان پروتیین مذکور با یکی از روش‌های سنجش میزان پروتیین همچون ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات می‌باشد که لازم است در مطالعات بعدی افزون بر سنجش سطح RNA این ژن و نیز ژن‌های دخیل در این مسیر ژنتیکی، میزان بیان پروتیین آن نیز بررسی شود. همچنین به منظور انجام بررسی‌های دقیق‌تر بالابردن حجم نمونه نیز توصیه می‌گردد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که افزایش بیان ژن AXIN2 یکی از ابتدایی‌ترین وقایع بیولوژیکی در تغییر سلول نرمال و شکل‌گیری پولیپ می‌باشد و از آنجایی که بافت پولیپ پس از مدتی توانایی تبدیل به بافت سرطانی را دارد، تغییر بیان ژن AXIN2 می‌تواند بیومارکری برای تشخیص زودرس سرطان روده بزرگ باشد.

سپاسگزاری: مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی مقایسه‌ای بیان ژن AXIN در انواع پولیپ‌های روده بزرگ" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۴ و کد ۷۸۹ می‌باشد که با مساعدت پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

دخیل باشد، همانطور که Kim در بررسی خود بیان داشت که P53 بیان ژن AXIN2 را در سلول‌های سرطانی روده بزرگ مهار می‌کند و از دست رفتن عملکرد P53، فعالیت پایدار AXIN2 را با کاهش تنظیم رونویسی mir 34 القا می‌کند. mir 34 به‌طور مستقیم ناحیه 5'-UTR از رونوشت AXIN2 را هدف قرار می‌دهد و ترجمه پروتیین را مهار می‌کند. همچنین نشان دادند که افزایش بیان AXIN2 به تنهایی برای مهار mir 34 کافی است و در یک خودتنظیمی بیان پروتیین AXIN2 را القا می‌کند.<sup>۱۶</sup>

در مطالعه‌ای که توسط Wei و همکاران با تکنیک Real-time روش Fold change به بررسی و مقایسه میزان بیان ژن‌های  $\beta$ -catenin و AXIN2 میان سلول‌های سرطانی آملوبلاستوما پرداخته است، بیان  $\beta$ -catenin و AXIN2 به‌طور چشمگیری بیشتر از بافت نرمال ارزیابی شده است و در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بیان این دو ژن نیز به‌طور چشمگیری بیشتر از بافت نرمال بوده است و در نتیجه مشخص شده است که این دو ژن نقش موثری در تومورزایی و ایجاد بدخیمی در روند سرطان‌زایی آملوبلاستوما داشته‌اند، در نتیجه‌ی این مطالعه وقتی بیان  $\beta$ -catenin زیاد شود وارد هسته شده و در تجمع با TCF، AXIN2 را فعال می‌کند، بنابراین پژوهشگران بیان نمودند که این حالت مرتبط با وقوع آملوبلاستوما می‌باشد.<sup>۹</sup>

مطابق با مطالعه Wei، با توجه به اینکه در مطالعه حاضر افزایش بیان ژن AXIN2 در پولیپ‌های آدنوما و هایپرپلاستیک روده بزرگ مشاهده شده و پولیپ می‌تواند یکی از نشانه‌های اولیه‌ی ایجاد سرطان و بدخیمی در روده بزرگ باشد و از آنجا که AXIN2 ژن هدف مسیر Wnt که از ابتدایی‌ترین فرآیندهای سیگنالینگ در روند تبدیل

## References

1. Pourhoseingholi MA, Zali MR. Colorectal cancer screening: Time for action in Iran. *World J Gastrointest Oncol* 2012;4(4):82-3.
2. Fong TV, Chuah SK, Chiou SS, Chiu KW, Hsu CC, Chiu YC, et al. Correlation of the morphology and size of colonic polyps with their histology. *Chang Gung Med J* 2003;26(5):339-43.
3. Liang JJ, Bissett I, Kalady M, Bennet A, Church JM. Importance of serrated polyps in colorectal carcinogenesis. *ANZ J Surg* 2013;83(5):325-30.
4. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127(3):469-80.
5. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13(1):11-26.
6. Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149(6):1192-205.
7. Behrens J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem Soc Trans* 2005 Aug;33(Pt 4):672-5.
8. Schaal U, Grenz S, Merkel S, Rau TT, Hadjihannas MV, Kremmer E, et al. Expression and localization of axin 2 in colorectal carcinoma and its clinical implication. *Int J Colorectal Dis* 2013;28(11):1469-78.
9. Wei Z, Zhong M, Guo Y, Wang Y, Ren M, Wang Z. Expression of  $\beta$ -catenin and AXIN2 in ameloblastomas. *Contemp Oncol (Pozn)* 2013;17(3):250-6.
10. Khan NP, Pandith AA, Hussain MU, Yousuf A, Khan MS, Wani KA, et al. Novelty of Axin 2 and lack of Axin 1 gene mutation in

- colorectal cancer: a study in Kashmiri population. *Mol Cell Biochem* 2011;355(1-2):149-55.
11. Hoseini S, Moaddabshoar L, Hemati S, Mohammadianpanah M. An overview of clinical and pathological characteristics and survival rate of colorectal cancer in Iran. *Ann Colorectal Res* 2014;2(1):e17264.
  12. Goldstein NS, Bhanot P, Odish E, Hunter S. Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2003;119(6):778-96.
  13. Goldman H, Ming S, Hickock DF. Nature and significance of hyperplastic polyps of the human colon. *Arch Pathol* 1970;89(4):349-54.
  14. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 2002;22(4):1184-93.
  15. Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2014; 2(1): 1–15.
  16. Kim NH, Cha YH, Kang SE, Lee Y, Lee I, Cha SY, et al. p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 2013;12(10):1578-87.



## Relative quantification of AXIN2 mRNA expression in different pathological types of colorectal polyps

Mina Golmohammadi M.Sc.<sup>1</sup>  
Hamid Asadzadeh Aghdaei  
M.D.<sup>1</sup>  
Hossein Maghsoudi Ph.D.<sup>2</sup>  
Ehsan Nazemalhosseini  
Mojarad Ph.D.<sup>3\*</sup>

1- Basic and Molecular  
Epidemiology of Gastrointestinal  
Disorders Research Center,  
Research Institute for  
Gastroenterology and Liver  
Diseases, Shahid Beheshti  
University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Payame  
Noor University, Tehran, Iran.

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

\* Corresponding author: Research  
Institute for Gastroenterology and Liver  
Diseases, Shahid A'arabi St., Yaman St.,  
Chamran Highway, Tehran, Iran.  
Tel: +98- 21- 22432518  
E-mail: ehsanmojarad@gmail.com

### Abstract

Received: 28 Apr. 2017 Revised: 13 Aug. 2017 Accepted: 21 Aug. 2017 Available online: 22 Aug. 2017

**Background:** Most of colorectal cancers (CRC) have originated from intestinal polyps. Evaluating of the expression level of genes that are involved in tumors growth and development, may consider as diagnostic factor of malignancy in the polyps. AXIN2 regulates the level of nuclear  $\beta$ -catenin in a negative-feedback loop there by being a negative regulator and target gene at the same time. The aims of current study were to examine the expression level of the AXIN2 in the colonic polyps and its linkage with the pathological features of the polyps.

**Methods:** In the present analytical-descriptive study, the investigated population was chosen from the cases with colonic polyps that referred to the Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Taleghani Hospital, Tehran, Iran, from October 2014 to April 2015. Forty four biopsy polyp samples and 10 normal tissue samples were collected, as well as the demographic and clinical properties of the patients and the expression level of AXIN2 gene was quantified by Real-time PCR. The outcomes were analyzed by the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (SDS) software, version 2.1.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) and GraphPad Prism, version 3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) Also, the expression changes of the intended gene in target groups were compared with the normal tissues using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  equation.

**Results:** The data showed enhanced level of the expression of AXIN2 gene in the colonic polyps in comparison to the normal tissues ( $RQ > 2$ ), which was significantly upper in adenoma polyps compared to the hyperplastic group ( $P = 0.015$ ). Also, unlike the rectum, the AXIN2 gene activity in colon area was higher than normal tissue.

**Conclusion:** The results of the current study show that the expression pattern of AXIN2 gene, was markedly changed during the transformation of the normal tissue to polyp. The increased expression level of this gene could be applied as a diagnostic marker in dissociation of the adenoma polyps from hyperplastic ones. On the other hand, the location of the polyps modulates the AXIN2 gene function. Taking together, evaluating the changes of AXIN2, has a precise diagnostic value in the CRC related studies.

**Keywords:** AXIN2 gene, colon polyps, colorectal cancer, reaction, real-time polymerase chain.