(مقالهٔ پژوهشی)

بررسی کارایی پروفایل بیانی ژن‌های CCND2، PLAB، PCSK2 و FHL1 جهت افتراق تومورهای کارسینوم پاپیلاری تیروئید از تومورهای خوش‌خیم

جواد محمدی اصل[1*]، غلامعباس دیناروند[2]، ندا گلچین[3]، نادر صاکی[4]، نسترن رنجبری[5]، ایران رشیدی[6]

۱- استادیار ژنتیک پزشکی
۲- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی
۴- دانشیار گوش ،حلق و بینی
۵- استادیار پاتولوژی
۶- دانشیار پاتولوژی

۴,۲,۱- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳-آزمایشگاه ژنتیک پزشکی نور، اهواز، ایران.
۶, ۵-گروه پاتولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
جواد محمدی اصل؛ مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۳۰۶۰۲۴۳
Email: mohammadiasl@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: نمونه‌برداری سوزنی (FNA) بهترین روش برای تشخیص قبل از جراحی تومورهای تیروییدی است که به طور گسترده برای بیماران انجام می-شود، اما متأسفانه برای حدود ۲۰٪ موارد، جواب به صورت مشکوک و یا حد واسط گزارش می‌شود. همچنین با توجه به جواب‌های مثبت و منفی کاذب که گزارش می‌شوند، نیاز به وجود بیومارکر احساس می‌شود تا صحت آزمایش تشخیص قبل از جراحی را بهبود بخشد. هدف از این تحقیق بررسی بیان نسبی mRNA ژن‌های CCND2، *PLAB*، *PCSK2* و *FHL1* جهت افتراق تومور خوش‌خیم و تومور بدخیم از نوع پاپیلاری تیروییدی کارسینوما می-باشد.

روش بررسی: ۵۰ نمونه از بیماران با تومورهای بدخیم تیروییدی (۲۵ نمونه) و تومورهای خوش‌خیم تیروییدی (۲۵ نمونه) از بین کل بیماران مراجعه‌کننده به این تحقیق وارد شدند، برای استخراج RNA از نمونه‌های پارافینه شده و همچنین برای ساخت cDNA از کیت استفاده شد. واکنش Real Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت و از مخلوط واکنش Real Time PCR حاوی مادهٔ فلورسانس سایبر گرین استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان نسبی mRNA سه ژن *CCND2*، *PLAB* و *PCSK2* کارآیی خوبی برای افتراق نداشتند، اما بررسی بیان نسبی mRNA ژن *FHL1* توانست ۲۱ مورد بدخیم را افتراق دهد، اگرچه تعداد ۴ مورد هم به صورت مثبت کاذب تشخیص داده شدند.

نتیجه‌گیری: بررسی بیان نسبی RNA ژن *FHL1* نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی جهت افتراق تومورهای پاپیلاری تیروییدی کارسینوما از خوش‌خیم کارآیی بیشتری دارد.

کلید واژگان: بیومارکر، بیان نسبی mRNA، پاپیلاری تیروییدی کارسینوما، ژن *FHL1*

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۳/۲۸ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۲/۱۲/۴ اعلام قبولی: ۱۳۹۳/۳/۱۹

مقدمه

سرطان‌های غدهٔ تیرویید ۹۰٪ سرطان‌های سیستم اندوکرین را شامل می‌شوند و مسئول ۶۳٪ از مرگ‌های ناشی از وقوع سرطان در سیستم اندوکرین می‌باشند (۱). گزارش شده است که نیمی از جمعیت عمومی افراد بالغ در سطح زیر بالینی (Subclinical) دارای ندول تیرویید هستند (۲) و چون فقط ۱۰٪ از این ندولها واقعاً بدخیم خواهند بود به همین دلیل آزمایش‌های قبل از عمل جراحی برای افتراق خوش‌خیم و یا بدخیم بودن آنها تکامل یافته است (۳). بقای ۱۰ سالهٔ سرطان تیرویید در افراد بالغ میان‌سال ۸۰ تا ۹۶٪ است. عود مجدد در ۵ تا ۲۰٪ از موارد پاپیلاری تیرویید کارسینوما دیده می‌شود. عود مجدد ممکن است که ناشی از درمان ناقص اولیه و یا به دلیل وجود تومور با سلول‌های خیلی مهاجم باشد (۴). متاستاز دور دست معمولاً در ۱۰ تا ۱۵ درصد موارد پاپیلاری تیرویید کارسینوما رخ می‌دهد و میزان بقای ۱۰ سالهٔ بعد از کشف متاستاز دور دست حدود ۴۰٪ است (۴).

نمونه‌برداری سوزنی (Fine Needle Aspiration) بهترین روش برای تشخیص قبل از عمل تومورهای بدخیم تیرویید است که به طور گسترده برای بیماران انجام می‌شود، اما متأسفانه برای حدود ۲۰٪ از موارد (محدودهٔ بین ۹/۲ تا ۴۲٪) جواب قطعی گزارش نمی‌شود و به‌صورت مشکوک و یا حد واسط گزارش می‌شوند (۵-۷). ریسک بدخیمی در نمونه‌های FNA که مشکوک به سرطان بین ۱۰ تا ۴۰٪ گزارش می‌شوند، لذا تمام بیماران نیازمند برداشت ندول مشکوک خواهند بود تا جواب دقیقتر با بررسی نمونه‌های بیوپسی پاتولوژی مشخص شود و فقط در حدود ۲۰٪ از این نمونه‌های مشکوک دارای نئوپلاسم بدخیم خواهند بود (۶). از طرف دیگر در ۱۰٪ از موارد FNA جواب‌های منفی کاذب گزارش می‌شود که منجر به تشخیص دیر هنگام سرطان و در نتیجه، درمان دیر هنگام می‌شود و این امر بر روی سیر بیماری تأثیر منفی می‌گذارد (۶). بنابراین با توجه به دلایل فوق‌الذکر که چون با انجام FNA نمی‌توان تمام سرطان‌های تیرویید را شناسایی کرد و همچنین به دلیل وجود موارد منفی کاذب که گزارش می‌شوند، نیاز به وجود آزمایش‌های مولکولی بر اساس بررسی نشانگرهای زیستی مناسب احساس می‌شود تا به وسیلهٔ آنها بتوان صحت آزمایش‌های تشخیص سرطان تیرویید را در قبل از عمل، بهبود بخشید (۶). این میدان فعال در مطالعات سرطان‌شناسی است تا انجام جراحی‌های غیر ضروری را در این دسته از بیماران کاهش دهد (۸، ۹).

تاکنون هیچ نشان زیستی منفردی که بتواند تمام تومورهای خوش‌خیم را از بدخیم افتراق دهد، شناخته نشده است و به همین دلیل از ترکیب‌های انواع مختلف نشانگرهای زیستی استفاده می‌شود تا بهترین نتایج به دست آید (۱۰). مطالعات گسترده در بررسی میزان بیان mRNA در ژن‌های مختلف در انواع سرطان‌ها منجر به شکل‌گیری این ایده شده است که از تفاوت بیان ژن‌ها در سطح mRNA به عنوان نشان زیستی جدید مولکولی برای افتراق سلول‌های سرطانی استفاده شود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ انجام شد، از نحوهٔ بیان ۴ ژن برای ارتقای تشخیص تومورهای فولیکولار کارسینومای تیرویید استفاده شده بود و نتایج رضایت‌بخش بودند (۱۱).

ژن (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 2) *PCSK2*: این ژن که PC2 یا کانورتاز پیش‌هورمون هم نامیده می‌شود در کروموزوم شمارهٔ ۲۰ و در موقعیت 20p11.2 قرار دارد و از ۱۲ اگزون تشکیل شده است. این پروتئین یک کانورتاز پیش‌پروتئین است و همچنین یک آنزیم فعال کنندهٔ پیش_انسولین است که نقش مهمی را در کنترل بیوسنتز انسولین به عهده دارد. همچنین این پروتئین در فعال کردن چندین هورمون نقش دارد و پیش‌هورمون‌ها را به فرم فعال تبدیل می‌کند.

ژن *CCND2* (Cyclin D2): این ژن در کروموزوم شمارهٔ ۱۲ و در محل 12p13 قرار دارد و دارای ۵ اگزون است و کد کنندهٔ سیکلین D2 است. انواع سیکلین کنترل کنندهٔ کینازهای CDK هستند که مراحل مختلف چرخهٔ سلولی را با بیان و تجزیه شدن خود کنترل می‌کنند. انواع مختلفی از سیکلین وجود دارند و سیکلین D2 با کیناز CDK4 , CDK6 وارد عمل می‌شود و در کنترل چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ گذر از G1 به S، عمل خود را انجام می‌دهد. بیان بالای این ژن در تومورهای تخمدان و بیضه مشاهده شده است.

ژن (Placental bone morphogenesis protein): نام‌های دیگر این ژن *GDF15* و *PLAB* یا *MIC*-1 می‌باشد و عضوی از خانواده تغییر دهندهٔ فاکتور رشد بتا می‌باشد و تکامل بافتی را مدیریت می‌کند. این ژن بر روی کروموزوم شمارهٔ ۱۹ در محل 19p13.2 قرار دارد و از دو اگزون تشکیل شده است که به وسیلهٔ یک اینترون ۳ کیلو بازی از همدیگر جدا شده‌اند (۱۲).

ژن *PLAB* یک پروتئین را کد می‌کند که بخشی از خانوادهٔ TGF-b است و نشان داده شده است که از آپپتوز از طریق مسیر پیام‌رسانی AKT جلوگیری می‌کند. اهمیت فعال‌سازی مسیر سیگنالی AKT در سرطان‌زایی فولیکولار تیرویید کارسینوما قبلاً به اثبات رسیده است (۵). بررسی بیان mRNA ژن *PLAB* به همراه دو ژن دیگر به نام‌های *CCND2* و *PCSK2* با کمک Real Time PCR به عنوان نشانگرهای زیستی در افتراق تومورهای تیرویید نشان داده بود که توانایی خوبی در افتراق تومورهای تیرویید از نوع فولیکولار را دارد (۳).

ژن *FHL1* (Four and a half LIM domains 1): این ژن بر روی کروموزوم X و در محل Xq26 قرار دارد و شمارهٔ شناسایی (GeneID) آن ۲۲۷۳ و از ۷ اگزون تشکیل شده است. محصول آن از رشد سلول‌های سرطانی از طریق مسیر پیام‌رسانی مشابه با TGFb جلوگیری می‌کند. این ژن کنترل‌کنندهٔ پرولیفراسیون، تکامل و آپپتوز سلولی است. ۳ عضو این خانواده، پروتئین‌هایی به نام *FHL1* و *FHL3* , *FHL2* را کد می‌کنند که با Smad2، Smad3 و Smad4 اتصال فیزیکی و عملکردی برقرار می‌کنند. اما نقش دقیق این ژن در تکامل سرطان هنوز مشخص نشده است (۱۳).

با توجه به کاستی‌هایی که نمونه‌برداری سوزنی در تشخیص تومورهای بدخیم تیرویید دارد، نیاز به نشانگرهای زیستی که بتوانند تومورهای بدخیم تیرویید را از خوش‌خیم افتراق دهند، احساس می‌شود. این نشانگرهای زیستی که بر اساس اختلالات ایجاد شده در مادهٔ ژنتیکی استوار هستند، چون با مقادیر کم RNA قابل انجام هستند، به طور بالقوه دارای کاربردهایی بالینی خواهند بود. لذا تصمیم گرفته شد تا نشانگرهای زیستی متعدد بیان mRNA بر روی بیوپسی‌های تومورهای پاپیلاری تیرویید کارسینوما انجام شود تا کارآیی آنها در افتراق از تومورهای خوش‌خیم ارزیابی گردد تا در صورت موفقیت‌آمیز بودن، در تحقیقات بعدی کارآیی آنها در نمونه‌برداری‌های سوزنی سنجیده شود و با این کار بتوان به تشخیص دقیق‌تر نمونه‌برداری‌های سوزنی کمک کرد و از انجام عمل‌های تیروییدکتومی غیر ضروری کاست. هدف از انجام این مطالعه، تعیین تغییرات بیان mRNA در ژنهای *CyclinD2, PLAB, PCSK2* , *FHL1* در تومورهای پاپیلاری تیرویید کارسینوما به عنوان تومور مارکر مناسب تشخیص افتراقی بین تومورهای خوش‌خیم و بدخیم تیروئید است.

روش بررسی

۱- انتخاب بیماران

۵۰ نمونه از بیماران مراجعه‌کننده طی سال ۱۳۹۱ به مرکز درمانی امام خمینی شهر اهواز با تومورهای بدخیم تیرویید (۲۵ نمونه) و تومورهای خوش‌خیم تیرویید (۲۵ نمونه) که نمونه‌های پاتولوژیکی آنها با قاطعیت قابل تشخیص بود از بین کل بیماران مراجعه‌کننده به این تحقیق وارد شدند. لازم به ذکر است که بر اساس

تشخیص پاتولوژیست قبلی و با تأیید پاتولوژیست‌های همکار طرح لام‌ها با تشخیص قطعی به مطالعه وارد شدند و تمام لام‌هایی که تشخیصی قطعی نداشتند، از مطالعه خارج شدند. بلوک‌های پارافینی بعد از بازبینی مجدد توسط یک پاتولوژیست، مناسب‌ترین آنها انتخاب شدند. سه نمونه که در گزارش پاتولوژی هیچ ضایعهٔ خوش‌خیم یا بدخیم گزارش نشده بود، به عنوان بافت نرمال انتخاب شدند.

۲ – مایکرو دایسکشن

برای انجام مایکرو دایسکشن در ابتدا به وسیلهٔ میکروتوم برش‌های ۶ میکرونی از بلوک‌های پارافینی داده شد. سپس این برش‌ها در یک محیط عاری از RNase بر روی لام‌های مخصوص مایکرو دایسکشن گذاشته شدند. این لامها دارای یک لایهٔ نازک فیلم بوده و قبل از استفاده، مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول پلی‌الایزین روی آنها گذاشته شده بود تا بافت‌ها بهتر به لایهٔ فیلم بچسبند. از هر بلوک دو عدد لام برای استخراج RNA در نظر گرفته شدند و یک لام هم با رنگ هماتوکسلین ائوزین (Sigma) رنگ‌آمیزی شد تا در زمان مایکرو دایسکشن به عنوان راهنما برای شناسایی محدودهٔ سلول‌ها استفاده شود. لام‌های مخصوص برای استخراج RNA در فریزر $-۸۰^{o}C$ نگهداری شدند.

۳- استخراج RNA از نمونه‌های پارافینی و ساخت cDNA

برای استخراج RNA از نمونه‌های مایکرو دایسکت شده از کیت شرکت Roche به نام High Pure RNA Paraffin Kit استفاده شد. برای ساخت cDNA از کیت شرکت Qiagen به نام QuantiTech RT بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای ساخت cDNA از ۱ میکروگرم RNA به عنوان الگو استفاده شد. در مرحلهٔ اول در تیوبهای مخصوص PCR به نمونه‌های RNA ۲ میکرولیتر gDNA eliminator اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند و بعد از آن نمونه‌ها بر روی یخ گذاشته شدند. به محلول ۴ میکرولیتر آنزیم RT و ۱ میکرولیتر پرایمر و ۴ میکرولیتر بافر 5X اضافه شد و با کمک دستگاه ترموسیکلر تیوبها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه انکوبه شدند. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر آب به cDNAها اضافه شد و تا زمان استفاده، در فریزر $-۸۰^{o}C$ بایگانی شدند.

۴- آزمایش Real Time PCR

واکنش Real Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و به‌صورت دوپلیکیت انجام گرفت. از مخلوط واکنش Real Time PCR که دارای مادهٔ فلورسانس سایبر گرین و محصول شرکت TAKARA به نام SYBR ™Premix Ex Taq® استفاده شد، زیرا نسبت به مخلوط واکنشی رنگ EvaGreen جواب‌های بهتری به دست آمده بود.

در هر تیوب واکنش، مواد با مقادیر زیر اضافه شد:

1-PreMix 2X	10 µl
2-primer 2mM each	1 µl
3-D.W	7 µl
4-cDNA	2µl

واکنش‌های Real Time PCR هم با دستگاه مارک CORBET به‌نام Rotor-Gene 6000 انجام شد. چرخهٔ دمایی به صورت ۱۰ ثانیهٔ ۹۵ درجه، سپس ۴۵ سیکل شامل ۵ ثانیهٔ ۹۵ درجه، ۱۵ ثانیهٔ ۶۰ درجه و ۱۰ ثانیهٔ ۷۲ درجه بود. در انتهای هر سیکل در دمای ۷۲ درجه، نورسنجی با نور سبز و طول موج تابش ۴۷۰ و بازتاب ۵۱۰ نانومتر انجام می‌گرفت. سپس منحنی ذوب از دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه محاسبه می‌شد.

۵- بررسی بیان نسبی mRNA چهار ژن *CCND2* و *PCSK2* و *PLAB* و *FHL1*

برای بررسی بیان چهار ژن *CCND2, PLAB, PCSK2, FHL1* با تکنیک Real Time PCR از پرایمری‌هایی استفاده شد که با کمک سایت اینترنتی Primer3 طراحی شده بودند. پرایمرها طوری طراحی شدند که هر کدام در اگزون جداگانه‌ای قرار بگیرند تا از

تکثیر DNA ژنومیک جلوگیری شود. طول محصول PCR کمتر از ۸۰ جفت باز طراحی گردید تا برای تکثیر نمونه‌های پارافینی مشکلی ایجاد نگردد. از ژن *GAPDH* به عنوان کنترل استفاده شد. ردیف بازی پرایمرها و طول قطعهٔ تکثیر شده در جدول ۱ ارائه شده است. بعد از انجام موفقیت‌آمیز PCRها، مقدار Cycle threshold Ct که نماینگر سیکل آستانه‌ای PCR است محاسبه شد. این کار با استفاده از منحنی‌های تکثیر PCR که توسط دستگاه Real Time تهیه می‌شود و نرم‌افزار دستگاه CORBET انجام شد. برای هر ژن میزان تعدیل شده بیان mRNA بر حسب درصد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۵):

بیان نسبی mRNA (درصد) $= [\ 2^{-(\text{Ct of gene of interest - Ct of GAPDH})} \times 100\% \ ]$

۶- محاسبات آماری

برای انجام محاسبات آماری از نسخهٔ ۱۶ نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای مقایسهٔ بیان ژن‌های یادشده در دو گروه خوش‌خیم و بدخیم از آزمون t استفاده شد. در تمامی آزمون‌های استفاده شده ارزش p برابر ۰/۰۵ ملاک عمل قرار گرفت.

جدول ۱ : ردیف بازی پرایمرها و طول محصول PCR در آزمایش بررسی بیان نسبی mRNA

نام ژن	ردیف بازی پرایمر	طول قطعه (bp)
CCND2	F: GCTGGCTAAGATCACCAACACA R : CCTCAATCTGCTCCTGGCAA	62
PLAB	F : CTGCAGTCCGGATACTCACG R : AGAGATACGCAGGTGCAGGT	68
FHL1	F: GCCAACACCTGTGTGGAAT R: GCCAGAAGCGGTTCTTATAGTG	76
PCSK2	F: CAGAACACGGCTTTGGAGTC R: TGCAAGGCCATTGTGATAAA	74
GAPDH	F : ATGGGGAAGGTGAAGGTCG R: GTTAAAAGCAGCCCTGGTGA	72

یافته‌ها

بررسی بیان نسبی mRNA در ژن CCND2

نتایج بررسی بیان نسبی mRNA ژن CCND2 در دو گروه خوش‌خیم و بدخیم در شکل ۱ ارائه شده و مشخص شد که در گروه تومورهای بدخیم میزان بیان نسبی mRNA بالاتر از گروه تومورهای خوش‌خیم بود ۹/۳٪ در مقایسه با ۶/۰۷٪). اگرچه بیان ژن CCND2 در گروه بدخیم مقداری بالاتر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود (p=۰/۱۶).

بررسی بیان نسبی mRNA در ژن PLAB

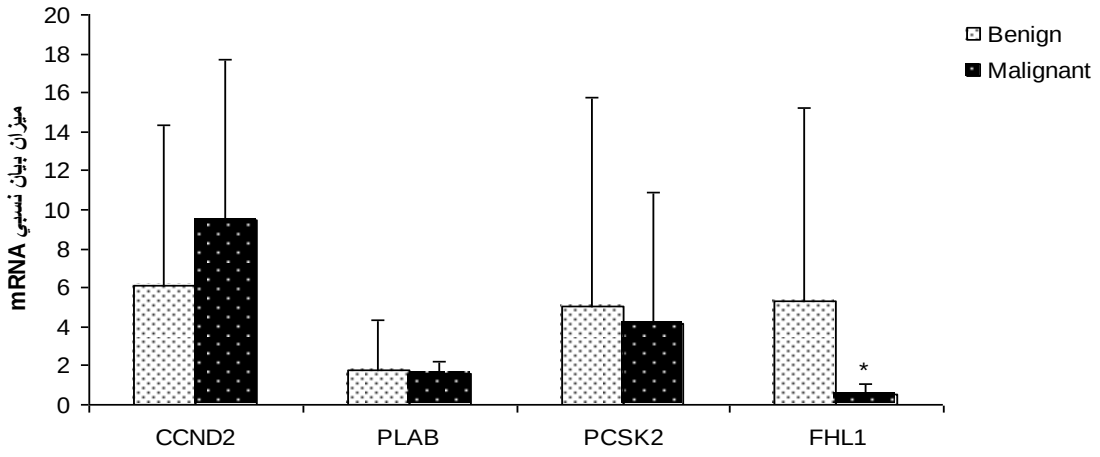
نتایج بررسی بیان نسبی mRNA ژن PLAB در دو گروه خوش‌خیم و بدخیم در شکل ۱ ارائه شده و مشخص شد که در گروه تومورهای بدخیم میزان بیان نسبی mRNA به مقدار ناچیزی پایین‌تر از گروه تومورهای خوش‌خیم بود (۱/۵۹٪ در مقایسه با ۱/۸۳٪) اما این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود (p=۰/۶۵).

بررسی بیان نسبی mRNA در ژن PCSK2

نتایج بررسی بیان نسبی mRNA ژن PCSK2 در دو گروه خوش‌خیم و بدخیم در شکل ۱ ارائه شده است. اگرچه بیان ژن PCSK2 در گروه بدخیم مقداری پایین‌تر بود (۴/۱۹٪ در مقایسه با ۵/۰۷٪) اما تفاوت بیان نسبی mRNA ژن PCSK2 بین دو گروه خوش‌خیم و بدخیم از نظر آماری معنادار نبود (p=۰/۷۳).

بررسی بیان نسبی mRNA ژن FHL1

نتایج بررسی بیان نسبی mRNA ژن FHL1 در دو گروه خوش‌خیم و بدخیم در شکل ۱ ارائه شده است. بیان نسبی mRNA در ژن FHL1 در گروه بدخیم برابر ۰/۵۰٪ بود در حالی که در گروه خوش‌خیم این میزان خیلی بالاتر بود (۵/۲۹٪) و تفاوت بین این دو گروه معنادار بود (p=۰/۰۱۹).



شکل ۱: نمودار میله‌ای نشان‌دهندهٔ میانگین بیان نسبی mRNA ژن‌های CCND2، PLAB، PCSK2 و FHL1 نسبت به ژن GAPDH در تومورهای خوش‌خیم و بدخیم تیرویید

بحث

بررسی بیان این سه ژن در تومورهای تیرویید در دو مطالعهٔ جداگانه بررسی شده است. در مطالعهٔ اول که در سال ۲۰۰۵ نتایج آن گزارش شده است با بررسی بر روی تومورهای تیرویید از جنس فولیکولار (FTC و FA) به این نتیجه رسیدند که بیان این سه ژن در دو گروه تومورهای FTC و FA با هم خیلی تفاوت دارند. به طوری که در FTC نسبت به FA ژنهای *CCND2* ۱۰/۲ برابر کاهش، *PLAB* ۵/۵ برابر افزایش و *PCSK2* ۲۶۳ برابر کاهش بیان داشتند. بررسی هر سه ژن فوق با همدیگر امکان افتراق تومورهای FTC از FA را در بیشتر موارد فراهم آورده بود. افتراق تومورهای FTC از FA با بررسی هیستوپاتولوژی مقداری مشکل است و با کمک این بررسی مولکولی، امکان افتراق آنها بهتر می‌شد (۳).

در مطالعهٔ بعدی در سال ۲۰۰۸ توسط شیبرو (Shibru) و همکارانش با بررسی بیان نسبی mRNA این سه ژن بر روی ۱۲۳ نمونهٔ بدخیم (من‌جمله ۵۴ نمونه PTC) و ۱۳۸ نمونهٔ خوش‌خیم به این نتیجه رسیدند که بیان نسبی mRNA سه ژن *CCND2*، *PLAB* و *PCSK2* در تومورهای بدخیم نسبت به گروه خوش‌خیم تفاوت معنی داری دارد اما برای افتراق مناسب نبود(۵).

نتایج پژوهش حاضر هم نشان داد که بیان این سه ژن در گروه بدخیم با گروه خوش‌خیم تفاوت معناداری ندارد که با نتایج مطالعهٔ شیبرو همخوانی دارد. اما با نتایج مطالعهٔ وبر (Weber) و همکارانش متناقض است. دلیل احتمالی تناقض بین نتایج ما با مطالعهٔ وبر این است که بررسی آنها بر روی تومورهای از جنس FTC و FA بوده است که مسیر پیام‌رسانی متفاوتی عامل ایجاد آنهاست و با مسیر پیام‌رسانی تومورهای PTC کاملاً تفاوت دارد. در تومورهای FTC مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt و برای تومورهای PTC مسیر پیام‌رسانی MAP Kinase (Ras→Raf→MEK→MAP kinase/ERK) دخالت دارد (۱۴). بنابراین وجود تفاوت بیان mRNA این سه ژن در دو نوع توموری که از نظر مسیر پیام‌رسانی کاملاً متفاوت هستند، دور از انتظار نیست.

نتایج پژوهش حاضر با شیبرو که گزارش کرده بود با بررسی بیان نسبی mRNA این سه ژن امکان افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم تیرویید وجود ندارند، هم‌خوانی دارد و تأییدکننده نتایج آنهاست.

اگرچه ترکیب سه ژن *CSK2*، *PLAB* و *CCND2* به عنوان ژن‌های نامزد که در تومورهای تیرویید قابل هستند، به‌عنوان نشان زیستی معرفی شده‌اند، ولی تحقیق حاضر نشان داد که بررسی بیان mRNA این سه ژن برای افتراق تومورهای پاپیلاری تیرویید کارسینوما از خوش‌خیم تیرویید کارآیی ندارند.

در تحقیق حاضر مشخص شد که بیان نسبی mRNA *ژن FHL1* در تومورهای بدخیم خیلی کمتر از خوش‌خیم بود و این تفاوت در سطح p=۰/۰۱۹ معنادار بود به‌طوری‌که شاید بتواند به عنوان یک نشان زیستی برای افتراق تومورهای بدخیم از خوش‌خیم تیرویید قابل استفاده شود. این نتیجه تأییدکنندهٔ گزارش فرایکناس (Fryknas) و همکارانش است. در مطالعهٔ آنها برای شناسایی نشانگرهای زیستی جدید برای افتراق تومورهای بدخیم از خوش‌خیم فولیکولار تیرویید که با روش میکروآرری انجام داده بودند، چندین ژن را معرفی کرده بودند و بهترین این ژنها، *FHL1* معرفی شده بود که بیان mRNA آن در تومورهای بدخیم فولیکولار تیرویید نسبت به خوش‌خیم کاهش می‌یافت (۱۵).

نتیجه‌گیری

مطالعهٔ فرایکناس و همکارانش تنها مطالعه‌ای بود که بر روی تیرویید انجام شده بود. اما چندین مطالعهٔ دیگر بر روی انواع مختلف سرطان‌ها از جمله: پروستات، کلیه، پستان (۱۶)، معده (۱۷) و کبد (۱۳) نشان داده‌اند که در

تمام این نوع سرطان‌ها بیان mRNA این ژن در تومورهای بدخیم نسبت به گروه خوش‌خیم و بافت طبیعی کاهش بیان دارد و به‌عنوان یک نشان زیستی خوب برای تشخیص بدخیمی‌ها معرفی شده بود.

محصول ژن *FHL1* از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند، بنابراین با کاهش بیان، باعث افزایش رشد سلول‌ها می‌شود. اگرچه نقش دقیق آن در تکامل سلول‌های سرطانی هنوز مشخص نشده است (۱۳). اما به‌دلیل درگیری آن در انواع مختلفی از سرطان‌ها، دارای توانایی بالقوه‌ای است تا به‌عنوان یک نشان زیستی خوب برای افتراق سلول‌های سرطانی معرفی گردد. همان‌طور که در مطالعهٔ محمدی اصل و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است، بیان این ژن برای تشخیص افتراقی ندول‌های تیروئید حساسیت و ویژگی مناسب دارد (۱۸).

انجام تحقیقات جدید در راستای روشن شدن مکانیسم دقیق آن در روند تومورزایی می‌تواند به دانش مولکولی روند تشکیل سرطان و یا درمان احتمالی آن از طریق این ژن کمک کند. در دنیای تشخیص بدخیمی و خوش-خیمی‌ها در تومورهای تیرویید، معرفی نشان زیستی از اهمیت خاصی برخوردار است، چون با کاربرد آنها در قبل از عمل جراحی و در کنار FNA می‌توان به افتراق بهتر تومورهای بدخیم از خوش‌خیم تیرویید کمک کرد و از فراوانی عمل‌های جراحی غیر ضروری کاست. نشانگرهای زیستی که به عنوان نامزد معرفی شده‌اند، زیاد هستند، اما کارآیی آنها هنوز به اثبات نرسیده است. بررسی بیان نسبی mRNA ژن *FHL1* نسبت به سایر ژن‌های مورد بررسی جهت افتراق تومورهای پاپیلاری تیرویید کارسینوما از خوش‌خیم کارآیی بیشتری دارد.

منابع

1-Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. Lancet 2013 Mar; 23: 1058-69.

2-Schagdarsurengin U O, Gimm H, Dralle C, Hoang-Vu, Dammann R. CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma. Thyroid 2006;16: 633-42.

3-Weber F, Shen L, Aldred MA, Morrison CD, Frilling A, Saji M, 'et al'. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 2512-21.

4-Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. Cancer 2007;110: 38-46.

5-Shibru D J, Hwang E, Khanafshar QY, Duh OH, Clark, Kebebew E. Does the 3-gene diagnostic assay accurately distinguish benign from malignant thyroid neoplasms?. Cancer 2008; 113: 930-5.

6-Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. Diagnostic and prognostic value of angiogenesis-modulating genes in malignant thyroid neoplasms. Surgery 2005; 138: 1102-9.

7-Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA,'et a'l. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 4011-8.

8-Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, 'et al'. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. Clin Endocrinol (Oxf) 2006; 65: 660-6.

9-Rowe LRM, Bentz BGM, Bentz JSM. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. Cytojournal 2006; 3: 10.

10-Asa SL. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. Endocr Pathol 2005; 16: 295-309.

11-Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RM, Peterson B, 'et al'. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. J Clin Invest 2004; 113: 1234-42.

12-Nikiforova M, Durso MB, Kelly LM, Nikiforov YE. Testing for 740 Mutations in Thyroid Samples Using Targeted Next Generation Sequencing Approach. In: 82nd Annual Meeting of the American Thyroid Association; 2012 Sep 19-23 ; Quebec, Canada; 2012. p. A-79.

13-Song Q, Wang D, Lou Y, Li C, Fang C, He X, 'et al'. Diagnostic significance of CK19, TG, Ki67 and galectin-3 expression for papillary thyroid carcinoma in the northeastern region of China. Diagn Pathol 2011; 6: 126.

14-Xing M. Recent advances in molecular biology of thyroid cancer and their clinical implications. Otolaryngol Clin North Am 2008; 41: 1135-46.
15-Fryknas M, Wickenberg-Bolin U, Goransson H, Gustafsson MG, Foukakis T, Lee JJ, ‘et al’. Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors. Tumour Biol 2006; 27: 211-20.
16-Li X, Jia Z, Shen Y, Ichikawa H, Jarvik J, Nagele RG, ‘et al’. Coordinate suppression of Sdpr and Fhl1 expression in tumors of the breast, kidney, and prostate. Cancer Sci 2008; 99: 1326-33.
17-Sakashita K, Mimori K, Tanaka F, Kamohara Y, Inoue H, Sawada T, ‘et al’. Clinical significance of loss of Fhl1 expression in human gastric cancer. Ann Surg Oncol 2008; 15: 2293-300.
18-Mohammadi-Asl J, Dinarvand GhA, Golchin N, Saki N, Ranjberi N, Rashidi I. The Diagnostic Value of Gene Expression of FHL1 in the Differential Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma and Benign Tumors. J Isfahan Med Sch 2014; 31(266): 1-9.

Evaluation of CCND2, PLAB, PCSK2 and FHL1 Genes Expression Efficiency to Differentiate between Papillary Thyroid Carcinoma and Benign Tumors

Javad Mohammadi-Asl [1*], Gholamabbas Dinarvand [2], Neda Golchin [3], Nader Saki [4], Nastran Ranjberi [5], Iran Rashidi [6]

1-Assistant Professor of Medical Genetics.
2-M.Sc of Clinical Biochemistry
3-M.Sc of Biochemistry.
4-Associate Professor of ENT.
5-Assistant Professor of Pathology.
6-Associate Professor of Pathology.

1,2,4-Cancer Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
3-Noor Medical Genetics Laboratory, Ahvaz, Iran.
5,6-Department of Pathology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

**Corresponding author:*
Javad Mohammadi-Asl;Cancer Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel:+989163060243
Email: mohammadiasl@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Fine needle aspiration (FNA) is the best method for sample collection in diagnosis of thyroid tumors before surgery which is performed widely for patients, but unfortunately for about 20% of cases, the test result is reported as suspicious or intermediate. Also, due to false positive and negative responses, there is a pressing need for a biomarker to improve the accuracy of preoperative tests. The aim of this study was to evaluate the relative mRNA expression of genes *CCND2*, *PLAB*, *PCSK2* and *FHL1* in differentiating benign and malignant tumors of papillary thyroid carcinoma.

Subjects and Methods: Fifty samples from patients with malignant thyroid tumors (25 cases) and benign thyroid tumors (25 cases) were enrolled in this study, RNA was extracted from paraffin samples with High Pure RNA Paraffin Kit and RNA extracted was used for cDNA synthesis. Real Time PCR reactions were performed in duplicate consists of 20 µl of the reaction mixture containing the fluorescent cyber green.

Results: The relative mRNA expression of *CCND2*, *PLAB* and *PCSK2* genes were not efficient for diagnosis. However, the relative mRNA expression of FHL1 gene could differentiate 21 malignant cases with 4 false positive results.

Conclusions: The relative mRNA expression of FHL1 gene is more efficient to differentiate papillary thyroid carcinoma from benign tumors.

Keywords: Biomarkers, Relative Expression of mRNA, Papillary Thyroid Carcinoma, FHL1 gene.

►*Please cite this paper as:*
Mohammadi-Asl J, Dinarvand GhA, Golchin N, Saki N, Ranjberi N, Rashidi I. Evaluation of Inferior Alveolar Canal position in Cross Sectional Cone Beam Computed Tomography Images. Jundishapur Sci Med J 2014;13(4):475-484

Received: June 18, 2013 **Revised: Feb 23, 2014** **Accepted: June 9, 2014**