

بررسی بیان تومور مارکر سیتوکراتین ۱۹ در رده های سلولی لومینال A سرطان پستان ریحانه سلیمانی^۱، دکتر مانا علومی^{۲*}، دکتر رضا مهدیان^۲، سعیده کیوانی قمصری^۱، نسربین کریمی^۱

۱-بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲-بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سیتوکراتین ها (CKs) بزرگترین زیرگروه پروتئین های رشته ای بینابینی می باشند که در حین سرطانی شدن پروفایل اصلی بیانشان مرتب دچار تغییر می شود. سیتوکراتین ۱۹ (CK19) یکی از پروتئین های مهم اسکلت سلول های اپی تلیالی است که به عنوان مارکر سلول اپی تلیالی در بیش از ۹۰٪ سرطان های پستان دیده می شود. در این پژوهش بیان مارکر CK19 در رده های سلولی لومینال A با روش Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) بررسی شده است.

مواد و روش ها: رده های سلولی MCF7 و T47D که رده های سلولی سرطان پستان می باشند خریداری و طبق پروتکل مربوطه کشت داده شدند. پس از شمارش و جمع آوری، RNA آن ها استخراج شد. RNA حاصله برای ژن های Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) به عنوان ژن مرجع و سیتوکراتین ۱۹ (CK19) به عنوان ژن هدف با روش Real time PCR تکثیر شد. از روش $\Delta\Delta C_t$ برای کمی کردن بیان CK19 استفاده شد به این صورت که ابتدا ΔC_t برای GAPDH و CK19 در هر رده سلولی به طور جداگانه محاسبه شد و سپس با توجه به ΔC_t نمونه کالیبراتور بیان ژن هدف به طور کمی گزارش گردید. **یافته ها:** روش فوق قادر است بیان تومور مارکر CK19 را در سلول ها گزارش کند. از طرف دیگر، این تومور مارکر در رده های سلولی MCF7 و T47D بیان یکسانی را نشان داد.

نتیجه گیری: بیان تومور مارکر CK19 در رده های سلولی لومینال A به طور تقریبی به یک میزان می باشد. طبقه بندی رده های سلولی به کمک مارکر های مولکولی می تواند در تحقیقات سرطانی از اهمیت به سزایی برخوردار بوده و در جهت شناسایی و درمان این بیماری رهگشا باشد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، سیتوکراتین، رده سلولی، لومینال A

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع ترین سرطان ها در دنیاست. به طور معمول تشخیص بیماری در مراحل اولیه آن از اهمیت خاصی برخوردار است. این امر در ارتباط با بیماری هایی نظیر سرطان که هنوز راه حل قطعی و مشخصی برای درمان آن ها وجود ندارد از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است تا جایی که تشخیص دیر هنگام این بیماری به میزان قابل توجهی اثر اقدامات درمانی را کاهش می دهد (۱۳).

یکی از روش های رایجی که برای تشخیص سرطان به کار می رود روش های آزمایشگاهی است که با استفاده از تومور مارکرها صورت می گیرند (۱۳). سیتوکراتین ها (CKs) بزرگترین زیرگروه پروتئین های رشته ای بینابینی می باشند که بیش از ۲۰ نوع مختلف هستند (۵). در حین سرطانی شدن پروفایل اصلی بیان CK دچار تغییر می شود تا جایی که گاهی انواع مختلف سرطان های پستان را بر اساس الگوهای مختلف بیان سیتوکراتین ها از یکدیگر تشخیص می دهند (۱۴).

سیتوکراتین ۱۹ (CK19) یکی از پروتئین های مهم اسکلت سلول های اپی تلیالی است که به صورت پروتئین کامل از سلول های توموری زنده آزاد می شود و در روند متاستاز در بیماران سرطان پستان نقش ایفا می کند (۱). بیان CK19 به عنوان مارکر سلول اپی تلیالی در بیش از ۹۰٪ سرطان های پستان دیده می شود (۷).

امروزه کشت سلولی در محیط آزمایشگاه به عنوان ابزاری برای

*آدرس نویسنده مسئول: بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

آدرس پست الکترونیکی: manaooloomi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۶/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۷

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره ششم. شماره بیست و سوم تابستان ۱۳۹۵ بررسی بیان نومورمارکر ...

تحقیقات سرطان به کار برده می شود. رده های سلولی گرفته شده از سرطان های ابتدایی و یا تومورهای متاستاتیک زمینه مناسبی را برای بررسی های زیستی، تغییرات ژنتیکی مرتبط با شکل گیری تومور و رشد آن در محیط آزمایشگاه مهیا ساخته اند. در آزمایشگاه، سرطان پستان اغلب توسط رده های سلولی ثبت شده و به عنوان مدل برای این بیماری قرار داده می شود (۸).

روش کار

رده های سلولی و استخراج RNA

رده های سلولی پستانی MCF7 و T47D با منشا اپی تلیالی یکسان از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران خریداری شدند. این رده های سلولی طبق پروتکل های مربوطه کشت داده شدند و پس از شمارش توسط لام نئوبار جمع آوری شدند. برای این که مقایسه رده های سلولی مورد نظر با شرایط یکسانی انجام پذیرد فاکتورهای حاوی تعداد برابر سلول از هر رده سلولی جهت تخلیص انتخاب شدند. رده های سلولی مورد نظر با تعداد $10^6 \times 0.7$ برای تخلیص انتخاب گردید. RNA طبق دستورالعمل کیت FaSt Pure RNA ساخت شرکت (TAKARA) استخراج گردید. کیفیت mRNA توسط ژل الکتروفورز و دستگاه فتونانودراپ بررسی گردید.

(Real-time PCR) Real-time Polymerase

Chain Reaction

توالی ژن CK19 به عنوان ژن هدف و توالی ژن (GAPDH) عنوان ژن مرجع از سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> اخذ گردید. پس از انتخاب پرایمر توالی آن ها از طریق شرکت تکاپوزیست به شرکت سازنده (BioNEER) سفارش داده شد. توالی پرایمرها به همراه مشخصاتشان در جدول ۱ آمده است.

نام پرایمر	توالی پرایمر	Tm	GC %	پرایمر	طول قطعه
CK19-F	GAAGAACCATGAGGAGGAAATCA	۵۵/۹	۴۲/۵	۲۳	۱۲۹
CK19-R	ACCTCATATGGCTTCGCAATGT	۵۷/۲	۴۵/۵	۲۲	۱۲۹
GAPDH-R	ACACCCACTCCTCCACCTTTTG	۵۹/۸	۵۷	۲۱	۱۱۲
GAPDH-F	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	۵۹/۶	۵۷	۲۱	۱۱۲

جدول ۱. مشخصات پرایمر های مورد استفاده در این تحقیق

برای انجام Real-time PCR در این مطالعه از کیت One Step SYBR PrimeScript RT-PCR استفاده شد. برای هر واکنش One step SYBR RT-PCR Buffer به میزان $10 \mu\text{l}$ آنزیم PrimeScript RT و Taq DNA Polymerase هر کدام به میزان $10 \mu\text{l}$ و RNA توتال به مقدار $2 \mu\text{l}$ اضافه شد و به کمک آب RNase Free حجم نهایی واکنش به $20 \mu\text{l}$ رسانده شد. واکنش های Real-time به صورت دوتایی انجام شد و حداقل سه بار تکرار شد. برنامه زمانی - دمایی برای ژن های مورد بررسی به شرح زیر بود:

رقت سازی RNA

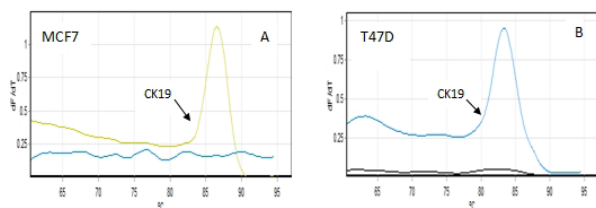
RNA استخراج شده از رده سلولی کالبراتور (T47D) در محدوده ۲۰ Pg تا $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ تهیه شد. نمودارهای استاندارد برای هر دو ژن ترسیم شد. به کمک نرمال کردن با ژن مرجع، بیان سیتوکراتین ۱۹ در رده سلولی MCF7 نسبت به نمونه کالبراتور سنجیده شد.

روش تعیین کمی بیان ژن هدف با روش Real-time PCR

روش معمول برای انجام محاسبات روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ می باشد، با توجه به این که کارایی PCR برای هر دو ژن (هدف و مرجع) برابر می باشد، در این تحقیق از همین روش استفاده شده است. به این صورت که ابتدا ΔC_T برای GAPDH و CK19 در هر رده سلولی به طور جداگانه محاسبه شد و سپس با توجه به ΔC_T نمونه کالبراتور بیان این ژن به طور کمی گزارش شد.

یافته ها

آنالیز تفکیک دمایی (منحنی ذوب محصول) در انتهای PCR مشخص می کند که تنها یک محصول منفرد تکثیر یافته است. نتایج منحنی های ذوب مربوط به ژن CK19 حاصل از رده های سلولی مورد مقایسه در این تحقیق در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. منحنی ذوب مربوط به ژن CK19 همراه نمونه Not (NTC) template Control آنها در رده های سلولی. A: در رده سلولی MCF7. B: در رده سلولی T47D. وجود تنها یک منحنی با یک پیک مشخص دلیل بر اختصاصی بودن محصول PCR دارد. منحنی افقی مربوط به نمونه NTC می باشد.

منحنی های ذوب رده های سلولی مورد بررسی تنها یک منحنی با یک پیک مشخص را نشان می دهند که دلیل بر اختصاصی بودن محصول PCR است.

یکی از راه های اثبات برای بررسی این که یک سنجش PCR درست انجام شده یا خیر تهیه رقت های متوالی از الگو و استفاده

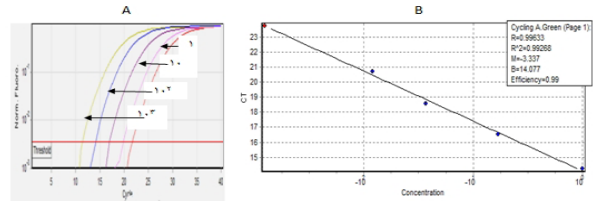
(۱۱). بیماران این گروه به نسبت سایرین پیش آگهی بهتری را از خود نشان می دهند و به هورمون درمانی جواب می دهند (۱۰). در بررسی هالیدی و همکارانش که بر روی رده های سلولی سرطان پستان صورت گرفته، رده های سلولی T47D و MCF7 جزء گروه لومینال A دسته بندی شده اند (۸). در پژوهش ریاض و همکارانش که ۵۱ رده سلولی سرطان پستان را از نظر مولکولی مورد بررسی قرار دادند رده های سلولی مورد نظر جزء لومینال A معرفی می شوند. از ویژگی های گروه لومینال A می توان به بیان گیرنده های سطحی در آن ها اشاره نمود به این صورت که از نظر بیان گیرنده استروژن (ER) و گیرنده پروژسترون (PR) مثبت می باشند در حالی که گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی نوع ۲ انسانی (HER2) در آن ها بیان نمی شود (۱۲).

در سال ۲۰۰۸ یا کوولو و همکارانش بیان تومور مارکر سیتوکراتین ۱۹ را با روش Real-time PCR در رده سلولی T47D اثبات کردند (۹). هم چنین در سال ۲۰۰۹ گروهی از پژوهشگران آلمانی با چندین روش از جمله فلوسایتومتری و وسترن بلات ادعا کردند رده سلولی MCF7 سیتوکراتین ۱۹ را بیان می کند (۱). در تحقیقی که بورگنا و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بر روی رده های سلولی پستان انجام دادند بیان CK19 در این رده های سلولی جزء ویژگی های اپی تلیالی این سلول ها ذکر شده اند (۲). در سال ۲۰۱۳ گروهی از محققین در آتن بیان CK19 را با روش PCR در بیماران بررسی کردند. آن ها رده سلولی MCF7 را به عنوان استاندارد مثبت این ژن در نظر گرفته اند (۱۵).

نتایج برای رده سلولی های MCF7 و T47D نشان می دهد که این رده های سلولی نه تنها از نظر بیان ژن CK19 مثبت می باشند بلکه از نظر کمی بیان یکسانی از این ژن را دارا هستند. این که بیان ژن CK19 در این دو رده سلولی در یک سطح می باشد می تواند به دلیل ویژگی های مولکولی مشابه آن ها باشد. همان طور که گفته شد هر دوی این دو رده سلولی جزء گروه لومینال A هستند و ER⁺/PR⁺/Her2⁻ می باشند (۶).

در تحقیقی که روی سلول های ER⁺/PR⁺ و رابطه شان با سلول های بنیادی اپی تلیوم پستان انسان سالم انجام شد، نتایج نشان داد سلول های ER⁺/PR⁺ به طور همزمان با بیان ER/PR مارکر CK19 را نیز بیان می کنند (۳). در پژوهشی که با عنوان «تنظیم بیان ژن CK19 به وسیله استروژن در سلول های سرطان پستان» به چاپ رسیده دانشمندان ژن های تحت اثر مستقیم استروژن در بیماران سرطان پستان را شناسایی کردند و دریافتند که در رده سلولی MCF7 سیتوکراتین ۱۹ تحت تنظیم مکانیسمی سریع و به طور مستقیم با استروژن تنظیم می شود. بیان ژن کراتین ۱۹ توسط استروژن می تواند به دلیل مشارکت

از این نتایج برای رسم منحنی استاندارد می باشد. به کمک منحنی استاندارد دامنه غلظت الگو و میزان بازده PCR برای ژن مرجع و ژن هدف تعیین شد. شکل ۲ نتایج حاصل از رقت های متوالی برای رسم منحنی استاندارد در رده سلولی کالیبراتور را نشان می دهد.

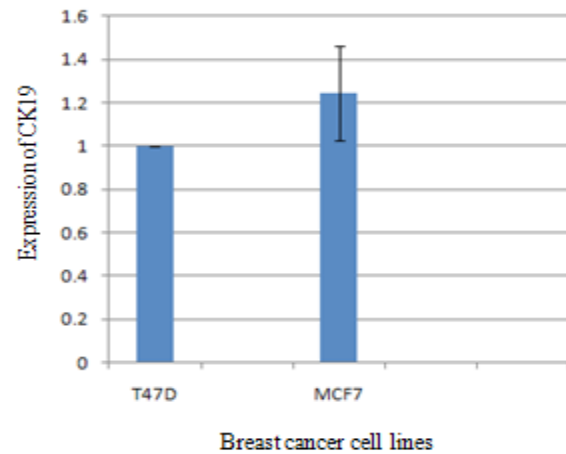


شکل ۲. منحنی های رقت سازی RNA مربوط به ژن CK19 در رده سلولی T47D. A: منحنی های تکثیر. B: منحنی استاندارد. رقت ها به صورت ۱/۱۰ تهیه شده اند.

مقادیر به دست آمده از مقایسه بیان ژن CK19 در این دو رده سلولی در زیر آمده است (جدول ۲). نتایج ما به طور تقریبی بیان یکسانی از ژن CK19 در رده های سلولی که با ژن GAPDH نرمال شده اند را نشان می دهد (نمودار ۱).

MCF7		T47D		C _T ΔΔ	Ratio
CK19	GAPDH	CK19	GAPDH		
۱۹/۵۹	۱۴/۹۲	۲۰/۲۴	۱۵/۴۵	۰/۱۲	۱/۰۹

جدول ۲. مقادیر به دست آمده از مقایسه بیان ژن CK19 در رده های سلولی با نمونه کالیبراتور. در این تحقیق از روش 2^{-ΔΔC_T} استفاده شده است.



نمودار ۱. بیان CK19 بین دو رده سلولی نرمال شده با GAPDH. دو رده سلولی بیان یکسانی از تومور مارکر کراتین ۱۹ را نشان دادند.

بحث

مطالعه ها بر مبنای آنالیز کل ژنوم با استفاده از روش microarray، انقلابی در درک ما از دانش سرطان پستان به وجود آورد و منجر به کشف پنج گروه متمایز از سرطان پستان شد. هر کدام از این گروه ها فنوتیپ و علائم بالینی خاصی نسبت به سایرین نشان دادند یکی از این گروه ها لومینال A می باشد

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره ششم . شماره بیست و سوم تابستان ۱۳۹۵ بررسی بیان تومورمارکر ... در اسکلت سلولی و سازمان یابی مجدد ماتریکس هسته ای باشد که از این طریق توانایی متاستاز در سلول های سرطانی ER⁺ در مواجهه با استروژن افزایش می یابد (۴).

نتایج به دست آمده در پژوهش فوق نشان می دهد که بیان تومور مارکر CK19 در رده های سلولی لومینال A به طور تقریبی به یک میزان بوده و طبقه بندی رده های سلولی بر اساس مارکرهای مولکولی به خصوص مارکر CK19 می تواند در تحقیقات سرطانی از اهمیت به سزایی برخوردار باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و مساعدت های جناب آقای دکتر فرهنگ وهاب پور، سرکار خانم دکتر اعظم بوالحسنی، مسئولین محترم بخش کورفسیلمتی و نیز همکاران بخش بیولوژی مولکولی کمال تشکر را می نمایم.

منابع

1. Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Slijper M, et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2009; 11: R39.
2. Borgna S, Armellin M, di Gennaro A, Maestro R, Santarosa M. Mesenchymal traits are selected along with stem features in breast cancer cells grown as mammospheres. *Cell Cycle*. 2012; 11: 4242-51.
3. Braun S, Pantel K, Muller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*. 2000; 342: 525-33.
4. Choi I, Gudas LJ, Katzenellenbogen BS. Regulation of keratin 19 gene expression by estrogen in human breast cancer cells and identification of the estrogen responsive gene region. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 164: 225-37.
5. Chu P, Weiss L. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40: 403-39.
6. Crowe DL, Milo GE, Shuler CE. Keratin 19 Downregulation by Oral Squamous Cell Carcinoma Lines Increases Invasive Potential. *J Dent Res*. 1999; 78: 1256-63.
7. Fujisue M, Nishimura R, Okumura Y, et al. Clinical Significance of CK19 Negative Breast Cancer. *Cancers*. 2012; 5: 1-11.
8. Holliday D, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*. 2011; 13: 215.
9. Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, et al. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 107: 145-54.
10. Kwan M, Kushi L, Weltzien E, et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Research*. 2009; 11: R31.
11. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 83: 249-89.
12. Riaz M, van Jaarsveld M, Hollestelle A, et al. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast Cancer Research*. 2013; 15: R33.
13. Salehi Nodeh A, Ghafouri S, Razavi S, et al. [Assessment of TPS tumor marker with ELISA for early detection and monitoring of Breast Cancer]. *payavard*. 2008; 2: 84-8. (full text in Persian)
14. Shao MM, Chan S, Yu AC, et al. Keratin expression in breast cancers. *Virchows Arch*. 2012; 461: 313-22.
15. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, et al. Real-Time Quantification of CK-19 mRNA-Positive Cells in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients Using the Lightcycler System. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 5145-51.

