

ارزیابی بیان Bmi-1، به عنوان یک نشانگر مولکولی جدید در تشخیص و گروه‌بندی تومورهای مثانه

افسانه ملک‌زاده‌شفاوردی^۱، سیدجواد مولی^{۲*}، امیرمحسن ضیایی^۳، یاسر اطلسی^۴، مهشید ملکوتیان^۱، احمدرضا بهرامی^۵

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های کلیوی و مجاری ادراری لبافی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- استادیار، انستیتو بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۶/۱۳

دریافت مقاله: ۸۶/۳/۲۹

چکیده

هدف: هم‌نوشتار بافتی نتیجه سازوکارهای تنظیمی شدیدی است که خودبازسازی، تمایز و پیشگیری از پیری سلولی زود هنگام و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بنیادی را کنترل می‌کند. Bmi-1 یک پروتئین مهارکننده رونویسی از خانواده پروتئین‌های پلی‌کمب، مهارکننده ژن‌هایی است که پیری و مرگ سلولی را القا می‌کنند و بیان غیرطبیعی آن می‌تواند در بروز سرطان دخالت داشته باشد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های توموری و غیرتوموری مثانه از بیمارستان لبافی‌نژاد تهیه شد. RNA استخراج شده از هر نمونه به وسیله روش RT به cDNA تبدیل و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های Bmi-1 و $\beta 2m$ ، به‌عنوان کنترل داخلی، تکثیر گردید؛ همچنین تولید و توزیع درون سلولی پروتئین Bmi-1 به وسیله روش وسترن‌بلات و ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: برای تعیین نقش Bmi-1 در سرطان مثانه، بیان Bmi-1 در بافت‌های توموری و غیرتوموری مثانه مورد بررسی قرار گرفت. RT-PCR یک محصول ۶۸۳ جفت بازی منطبق با اندازه مورد انتظار برای قطعه طراحی شده Bmi-1 را تولید کرد. ماهیت قطعه تکثیر شده به وسیله تعیین توالی تأیید گردید. میانگین سطح بیان Bmi-1 در بافت توموری بسیار بالاتر از بافت‌های غیر توموری است و بین میانگین بیان ژن و مرتبه تومور اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). همچنین بیان ژن در سطح پروتئین به وسیله روش‌های وسترن‌بلات و ایمونوهیستوشیمی تأیید شد.

نتیجه‌گیری: جایگاه مهارکننده توموری Cdkn2a (جایگاه Ink4a/Arf) دو پروتئین p16ink4a و p14arf را کد می‌کند. Ink4a و Arf به ترتیب، نقش مهمی در مسیرهای رتینوبلاستوما (pRB) و p53 بازی می‌کنند. Bmi-1 مهارکننده قوی هر دو مسیر می‌باشد و بنابراین بررسی نقش این ژن در فرایند سرطانی شدن سلول‌ها، حائز اهمیت است. در این تحقیق برای اولین بار بیان Bmi-1 و ارتباط آن با بدخیمی‌های مثانه گزارش می‌شود.

کلید واژگان: Bmi-1، نشانگر تومور، سرطان مثانه، بیان ژن، RT-PCR.

۱- مقدمه

سرطان مثانه از سرطان‌های بسیار شایع در ایران و جهان می‌باشد [۱]. این بیماری، همانند دیگر بدخیمی‌های دوران پیری، نتیجه انباشته شدن تغییرات اکتسابی در DNA است. این تغییرات ممکن است به صورت فعال‌سازی بیش از حد انکوژن‌ها (Oncogenes)، از دست رفتن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور، نقص مکانیسم‌های ترمیم DNA، تغییرات اپی‌ژنتیکی (Epigenetic) و یا ترکیب متنوعی از این تغییرات باشد [۲].

عموماً سیستوسکوپی (Cystoscopy) و سلول‌شناسی ادرار به عنوان استاندارد طلایی، برای تشخیص و پیگیری تومورهای مثانه مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف اولیه این آزمایش‌ها تشخیص آسیب‌های سطحی و پهن، قبل از بروز تهاجم به بافت‌های اطراف است [۳]. حساسیت سیستوسکوپی مرسوم ۴۷/۲٪ تا ۵۳٪ است [۴]. با توجه به اینکه این روش اساساً یک ارزیابی با چشم غیر مسلح است، تفاوت‌پذیری شخصی و بین شخصی زیادی در نتایج خود دارد و لذا ممکن است دلیلی برای کمبود اطلاعات در مورد حساسیت و ویژگی آن باشد. همچنین این رویه تهاجمی، دردناک و گران است. سلول‌شناسی ادرار در آشکارسازی آسیب‌های درجه بالا کاملاً مؤثر است و وسیله مهمی جهت غربالگری و کنترل روند بیماری در طی مرحله پیگیری است. ویژگی این آزمایش ۹۵٪ تخمین زده می‌شود اما حساسیت آن تنها در حدود ۶۰-۴۰٪ است [۵،۳].

با توجه به محدودیت‌های تشخیصی سیستوسکوپی و سلول‌شناسی ادرار، تلاش‌های زیادی برای شناسایی نشانگرهای مولکولی تومور، که بتواند به دقت ماهیت زیستی بالقوه متنوع تومورهای مثانه را پیش بینی کند و اجازه طبقه‌بندی بیماران را برای انتخاب مناسب‌تر درمان فراهم سازد، در جریان است. در حال حاضر، حضور و توانایی پیش‌آگهی (Prognosis) چندین نشانگر مولکولی در سرطان

مثانه، مورد بررسی قرار گرفته است؛ ولی تاکنون هیچ کدام از این نشانگرها نتوانسته‌اند جایگزین مطمئنی برای روش‌های مرسوم فعلی باشند [۶،۳].

پروتئین‌های گروه پلی‌کمب (Polycomb) بخشی از یک سازوکار تنظیم ژنی را تشکیل می‌دهند که سرنوشت سلولی را در حین تکوین طبیعی و پیشرفت آسیب‌شناسی تعیین می‌کنند [۷]. این سازوکار وابسته به تغییرات اپی‌ژنتیکی بر روی دنباله‌های هیستونی (Histone) است که بر اثر تقسیمات سلولی به ارث می‌رسند و از این رو عملاً به عنوان حافظه سلولی رفتار می‌کنند. این حافظه سلولی بر وقایع کلیدی در تکوین موجود نظارت داشته و از سوی دیگر در کنترل رشد و تمایز طبیعی سلول مشارکت می‌کند [۹،۸]. اختلال در تنظیم بیان ژن‌های پلی‌کمب، متعاقباً اختلال در ساختار کروماتین (Chromatin) و وضعیت متیلاسیون (Methylation) آن را به دنبال داشته و با تکثیر لجام گسیخته سلول‌های سرطانی مرتبط می‌باشد [۱۰،۸].

Bmi-1، یکی از اعضای خانواده گروه پلی‌کمب است که برای خودبازسازی بن‌یاخته‌های بالغ بافتی و نیز برای تکثیر سلول‌های سرطانی در این بافت‌ها، ضروری می‌باشد [۱۱،۹]. Bmi-1 خودبازسازی بن‌یاخته‌ها را تا حدودی به وسیله مهار بیان مهارکننده‌های تومور Ink4a (p16) و Arf (Alternative reading frame) تقویت می‌کند [۱۲]. این دو ژن به صورت گسترده‌ای در تومورهای مختلف، دستخوش حذف و یا غیر فعال شدن می‌شوند [۱۳،۱۴].

در این تحقیق، میزان شایستگی سنجش Bmi-1 در تومورهای مثانه به عنوان یک نشانگر مولکولی جدید در شناسایی موارد جدید و عودکننده سرطان مثانه و نیز عاملی به منظور طبقه‌بندی دقیق‌تر بیماران برای انتخاب درمان مناسب با استفاده از روش‌های RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)، ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) و انجام وسترن‌بلات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان Bmi-1 در نمونه‌های توموری مثانه به مراتب بیشتر از نمونه‌های غیر توموری می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های انسانی مورد استفاده در این تحقیق تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و با توجه به علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی، در فاصله زمانی اردیبهشت ماه تا اسفند ماه ۱۳۸۵ از مرکز پزشکی شهید دکتر لبافی‌نژاد، جمع‌آوری شدند و در سه زیرگروه قرار گرفتند: (۱) از نمونه بافت توموری افرادی که سرطان مثانه در آنها کشف شده، و به منظور درمان سرطان در طی عمل برداشت مثانه به‌دست آمده و یا مازاد بر احتیاج نمونه‌برداری مثانه آنها که در حین عمل TURBT (Transurethral Resection of a Bladder Tumor) گرفته شده است، به عنوان نمونه توموری استفاده شد. (۲) از نمونه‌برداری بافت سالم حاشیه توموری این افراد که در نقاطی دور از محل تومور قرار داشتند برای مقایسه نیز، نمونه‌برداری شد (به عنوان گروه حاشیه توموری). (۳) نمونه‌برداری مثانه از افرادی که مشکوک به سرطان مثانه و یا جزء موارد عودکننده آن نبودند و برای انجام برداشت پروستات باز به علت بزرگی خوش‌خیم پروستات بعد از گرفتن اجازه از بیمار تحت عمل قرار گرفته بودند (گروه طبیعی).

در مجموع ۶۸ نمونه توموری، حاشیه توموری و همچنین طبیعی جمع‌آوری شد. مازاد نمونه‌برداری بافتی این افراد، در میکرولوله (Microtube) استریل و عاری از آرناز (RNase) و در تانک ازت قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها تا مرحله استخراج RNA، در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج RNA کل (Total RNA)

RNA کل با استفاده از محلول RNX plus (Cinnagen) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، و نیز گزارش قبلی [۱۵]، استخراج گردید.

۲-۳- بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

غلظت ۱٪ از RNA تهیه شد و جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمد. غلظت RNA برحسب $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ محاسبه شد. ژل آگارز یک درصد با بافر TBE (Tris-borate-EDTA) تهیه و در هر چاهک ۵ میکرولیتر از نمونه به‌علاوه ۲ میکرولیتر بافر لودکننده (Loading buffer) (برمو فل بلو ۲۵ درصد، زیلن سیانول ۲۵ درصد و گلیسرول ۳۰ درصد) ریخته شد و به مدت ۱ ساعت و با ولتاژ ۶۰ تا ۷۰ ولت الکتروفورز گردید. ژل در محلول اتیدیوم برماید (Ethidium bromide) ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه و سپس در زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفت.

۲-۴- طراحی آغازگر (Primer)

در این تحقیق، ژن $\beta 2\text{m}$ ($\beta 2$ microglobulin) به عنوان کنترل داخلی انتخاب و از همان آغازگرهایی، که به وسیله بابایی و همکاران بر روی ژن $\beta 2\text{m}$ انسانی طراحی شده بود [۱۶]، استفاده شد. برای طراحی آغازگر روی ژن Bmi-1 انسان، توالی‌های مورد نیاز از طریق سایت NCBI (National Center of Biotechnology Information) [۱۷] و با شماره‌های دستیابی (Accession number) U380403 برای ژن و NM_005180 برای mRNA به‌دست آمد. به منظور انجام واکنش PCR، یک جفت آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Genrunner نگارش ۳/۰۲، (شرکت Hastings Software) طراحی شد. توالی و مشخصات آغازگرها به ترتیب زیر است:

آغازگر بالا دست Bmi-1 :

۵'- GAG GGT ACT TCA TTG ATG CCA C -۳'

آغازگر پایین دست Bmi-1 :

۵'- CCA GTT CTC CAG CAT TTG TCA G -۳'

واکنش، یک چرخه طویل شدگی نهایی (۷۲ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۰ دقیقه اجرا و محصول PCR با ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بررسی شد.

۶-۲- تعیین توالی محصول PCR

به منظور تأیید هویت قطعات حاصل از PCR، محصول ۶۸۳ نوکلئوتیدی PCR به وسیله شرکت تکاپوزیست، تعیین توالی گردید. کاوش این توالی در سایت NCBI مشخص کرد که توالی مربوطه، متعلق به ژن Bmi-1 می باشد.

۷-۲- وسترن بلات

برای استخراج پروتئین کل از بافت های توموری مئانه، ابتدا حدود ۱۰ میلی گرم از بافت های مورد نظر توزین و سپس حدود ۳۰۰ میکرولیتر از بافر RIPA (Radio Immunoprecipitation) به علاوه ۱ میکرولیتر از PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) $200 \times$ به هر نمونه اضافه گردید. در ادامه بافت به وسیله یکنواخت ساز (Homogenizer) دستی به مدت حداقل ۵ دقیقه روی یخ یکنواخت شد. برای تهیه عصاره سلولی از رده سلولی NT2، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول RIPA به ازاء هر یک میلیون سلول استفاده و غلظت پروتئین استخراج شده به وسیله روش بردفورد (Bradford) تعیین گردید. ضمن آنکه الکتروفورز نمونه ها با ژل کوچک ($10 \times 8 \text{ cm}$) پلی آکریل آمید ۱۲/۵٪ و ولتاژ ۸۰-۱۰۰ ولت (به مدت حدود ۲/۵ ساعت) انجام شد. سپس پروتئین ها به وسیله الکتروفورز به غشاء PVDF (Polyvinylidene Fluoride) از نوع هیندپی (Hyband-P) (Amersham) انتقال یافته و به مدت ۱ ساعت و طبق توصیه شرکت سازنده در محلول مسدود کننده کیت ECL (Advance ECL Blocking Agent; Amersham Bioscience) برای مهار واکنش زمینه انکوبه شدند. پس از دو بار شستشو در محلول بافر فسفات سالین توییین (PBS-T)، بلات (Blot) مربوطه در دمای اتاق و همراه حرکت مداوم در پادتن های اولیه بر علیه Bmi-1 (Abcam، انگلستان)، با رقت ۱/۲۰۰۰ و به مدت ۳ ساعت و یا β -actin (prosci، آمریکا)، با رقت ۱/۲۰۰۰ و به مدت ۱ ساعت و در پادتن های ثانویه متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) (Sigma، آمریکا) با

ناحیه ای که با این جفت آغازگر قابل تکثیر می باشد از نوکلئوتید ۵۷۰ تا ۱۲۵۳ cDNA Bmi-1 انسانی با طول ۶۸۳ جفت باز است.

آغازگر بالا دست $\beta 2m$:

۵'- CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG -۳'

آغازگر پایین دست $\beta 2m$:

۵'- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC -۳'

ناحیه ای که با این جفت آغازگر قابل تکثیر است، از نوکلئوتید ۹۴ تا ۲۸۵ $\beta 2m$ cDNA انسانی با طول ۱۹۱ جفت باز می باشد.

آغازگرهای یاد شده و نیز آغازگر الیگومر تیمیدین (Oligo-dT) با طول ۱۸ نوکلئوتید به وسیله شرکت MWG (High Purified Salt Free) HPSF آلمان و با درجه خلوص ساخته شدند. در مورد کلیه آغازگرها، جستجو با استفاده از نرم افزار کاوش (Blast) [۱۸] با ژنوم انسان انجام شد تا از یکتا بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم انسان نشان داد که کلیه آغازگرها محل باند شدن منحصر به فردی را دارا می باشند.

۵-۲- واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction)

واکنش RT بر روی RNA کل هر نمونه انجام گرفت. بدین ترتیب که به ۲ میکرولیتر از محصول واکنش RT، بافر تکثیر ۱۰X (Cinnagen) ۲/۵ میکرولیتر، مخلوط dNTP (۱۰mM) (Eurobio) ۰/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq پلیمرز (Taq Polymerase) (Cinnagen) ۰/۲ واحد و مخلوط آغازگرها (بالادست و پایین دست $10 \mu\text{M}$) هر کدام ۰/۵ میکرولیتر و آب تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه شد و ۲۸ چرخه برای Bmi-1 و ۳۲ چرخه برای $\beta 2m$ به شرح زیر انجام گرفت: واسرشتگی (Denaturation) (۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه)، جفت شدگی (Annealing) (۵۹ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه) و طویل شدگی (Extension) (۷۲ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه) در دستگاه ترمال سایکلر اجرا و در انتهای

نشده است).

۲-۳- بررسی بیان Bmi-1 در نمونه‌های توموری و غیر توموری مثانه

در مجموع ۶۸ نمونه توموری، حاشیه توموری و همچنین طبیعی جمع‌آوری شد. محدوده سنی افرادی که از آنها نمونه گرفته شده بود، بین ۳۳ تا ۸۰ سال بود. برای کسب اطمینان از یکسان بودن RNA بکار رفته در هر واکنش، از ژن $\beta 2m$ به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید و برای هر نمونه، واکنش RT-PCR با شرایط یکسان (به جز تعداد چرخه PCR) برای دو ژن Bmi-1 و $\beta 2m$ (در دو لوله جداگانه) انجام شد. همچنین در هر آزمایش و در کنار نمونه‌های تحت بررسی، یک لوله نیز به عنوان کنترل منفی انتخاب که در آن به جای نمونه cDNA، از آب استریل استفاده شد.

در مجموع بیان ژن Bmi-1 به صورت نیمه کمی در ۴۰ نمونه توموری، ۲۰ نمونه حاشیه توموری و ۸ نمونه طبیعی مثانه مورد مطالعه قرار گرفت. در تمام این نمونه‌ها باند ۱۹۱ نوکلئوتیدی $\beta 2m$ تعیین گردید. شدت باندهای Bmi-1 و $\beta 2m$ برای هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار Uvitec مشخص و نسبت بیان Bmi-1/ $\beta 2m$ به عنوان شاخص شدت بیان ژن در نظر گرفته شد. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است بیان محصول PCR ۶۸۳ جفت بازی در اکثر نمونه‌های توموری و نیز در تعدادی از نمونه‌های حاشیه توموری و طبیعی مشاهده می‌شود. با وجود این، سطح بیان در نمونه‌های توموری به طرز بارزی بیشتر از نمونه‌های غیر توموری می‌باشد (شکل ۱). آزمایش برای کلیه نمونه‌ها حداقل دو بار انجام شد که جواب‌های نسبتاً مشابهی در کلیه تکرارها به دست آمد.

رقت $1/42000$ و به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. سرانجام پروتئین‌های متصل به بلات به وسیله کیت (Advance ECL western Blot detection) آشکارسازی گردید.

۲-۸- ایمونوهیستوشیمی

بلوک‌های پارافینه تومورهای مثانه از آرشیو بیمارستان لبافی‌نژاد جمع‌آوری و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتری از آنها تهیه و بر روی لام‌های آغشته به پلی‌ال-لایزین (Poly L-lysine) قرار داده شد. این لام‌ها جهت واکنش ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار گرفتند. در این تحقیق از پادتن‌های موشی منوکلونال Bmi-1 (Abcam، انگلستان) با رقت ۱ به ۲۰۰، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به عنوان پادتن اولیه و از پادتن خرگوشی ضد موش، متصل به HRP (Dako، دانمارک) با رقت ۱ به ۵۰۰ و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به عنوان پادتن ثانویه استفاده گردید. ضمناً در نمونه کنترل منفی، شرایط مشابهی، به جز حذف پادتن اولیه، لحاظ شد.

۳- نتایج

۳-۱- بهینه‌سازی واکنش PCR

تعیین تعداد دور مناسب PCR برای ژن‌های Bmi-1 و $\beta 2m$ باید به گونه‌ای باشد که هم بیان کم در برخی نمونه‌ها (مانند نمونه‌های نرمال) تشخیص داده شود و هم تکثیر ژن در نمونه‌هایی که بیان بالا را دارند، وارد مرحله کفه نشده و در مرحله انفجاری باقی بماند. برای این منظور، ابتدا نمونه‌ای از مخلوط cDNAهای توموری و غیر توموری، که بیان میانگینی را از ژن مورد نظر داشته باشد، تهیه شد و سپس PCR در چرخه‌های مختلف بر روی آن انجام گرفت. نتایج این مرحله حاکی از آن بود که تعداد چرخه مناسب جهت تکثیر Bmi-1 و $\beta 2m$ به ترتیب ۲۸ و ۳۲ چرخه می‌باشد (نتیجه نشان داده



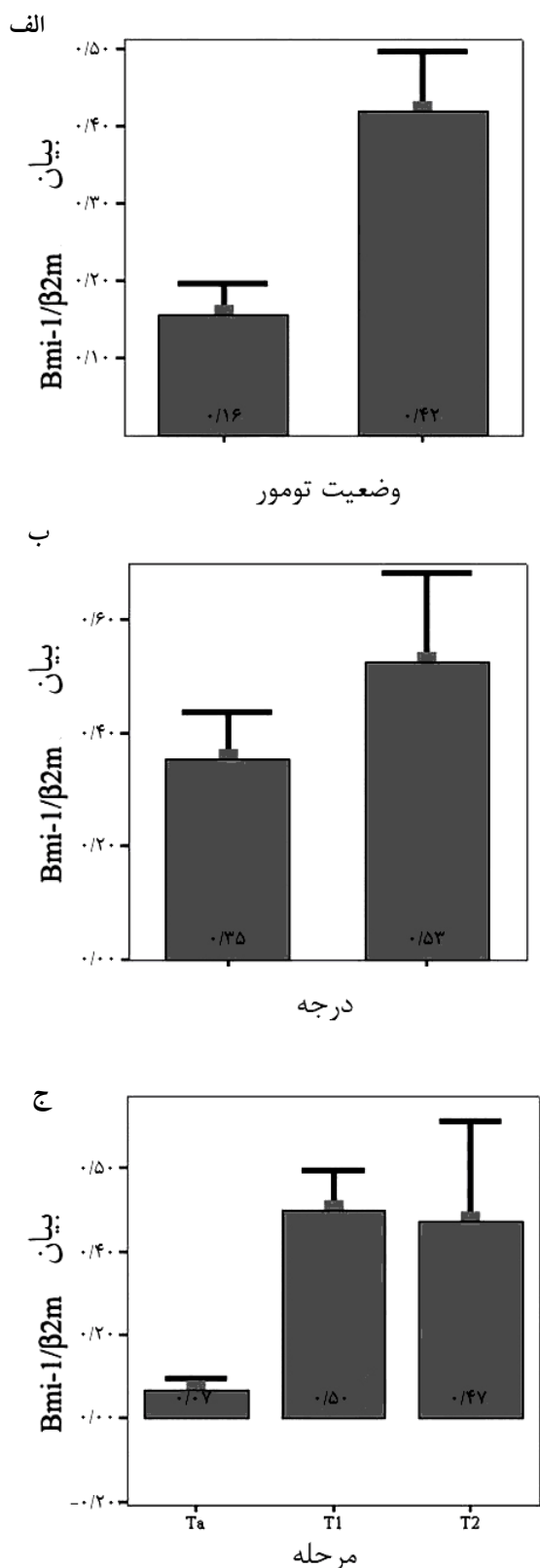
شکل ۱ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های $\beta 2m$ و Bmi-1 در نمونه‌های تعدادی از بیماران مبتلا به سرطان مثانه (T) و نمونه‌های حاشیه توموری همان بیماران (M)

۳-۳- آنالیز آماری بیان ژن Bmi-1 در گروه‌های

توموری و غیرتوموری مثانه

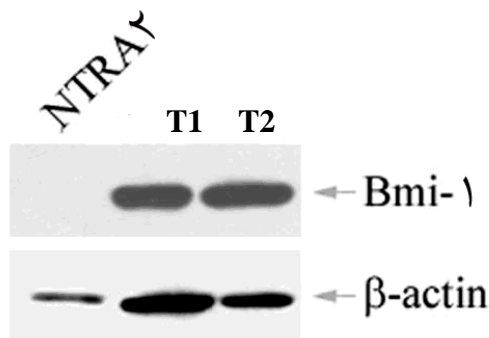
به منظور آنالیز آماری بیان Bmi-1 در گروه‌های مختلف مورد بررسی، از نرم‌افزار SPSS استفاده و میانگین بیان Bmi-1 در گروه توموری، گروه حاشیه توموری و گروه طبیعی تعیین شد. این میانگین به ترتیب برای این گروه‌ها ۰/۴۱۹۳، ۰/۱۷۵۷ و ۰/۱۰۶۳ بود. برای مقایسه میانگین بیان ژن Bmi-1 در دو گروه حاشیه توموری و طبیعی از آزمون من‌ویتینی (Mann-Whitney) استفاده گردید. با توجه به نتایج این آزمون، بین میانگین بیان ژنی دو گروه یاد شده، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. ضمناً با توجه به کوچک بودن جمعیت نمونه‌های به ظاهر نرمال و یکسان بودن تقریبی میانگین آنها با میانگین گروه حاشیه توموری، از مجموع این نمونه‌ها به عنوان نمونه‌های غیرتوموری برای مقایسه با نمونه‌های توموری شد (شکل ۲- الف).

در آنالیز آماری با توجه به سطح معنی‌داری آزمون T مستقل (Independent sample T-Test)، اختلاف معنی‌داری در میانگین بیان Bmi-1 بین دو گروه توموری و غیرتوموری وجود دارد ($p < 0/05$)؛ به طوری که بیان میانگین Bmi-1 در گروه توموری حدوداً ۳ برابر بیان متوسط در گروه غیرتوموری است. برای مقایسه سطح بیان Bmi-1 در دو درجه (Grade) پایین و بالای توموری و با توجه به اینکه آزمون نیکویی برازش (Goodness of fit) بیان می‌کند که داده‌ها در این دو درجه طبیعی هستند ($p > 0/05$)، از آزمون T مستقل استفاده شد. با توجه به نتایج این آزمون میانگین بیان ژن Bmi-1 در درجات توموری پایین و بالا، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۲- ب). ($p > 0/05$)



شکل ۲ نمایش هیستوگرام نتایج به دست آمده از RT-PCR بر روی ژن Bmi-1 بیان نسبی Bmi-1 در (الف) گروه‌های توموری و غیرتوموری، (ب) درجات پایین و بالا و (ج) مرتبه‌های مختلف توموری نشان داده شده است.

توموری که پیشتر بیان Bmi-1 در سطح mRNA آنها مورد تأیید قرار گرفته بود، ژن Bmi-1 در سطح پروتئین نیز بیان می‌شود. برای نمونه کنترل منفی، از عصاره سلولی رده سلولی NT2 (NTERA2) استفاده شد. این رده سلولی از انواع رده‌های سرطان‌زای جنینی (Embryonic Carcinoma) بوده و حالت تمایز نیافته جنینی را نشان می‌دهد. ضمن آنکه نتایج پیشین حاصل از RT-PCR بر روی این سلول‌ها، نشان داده بود که در این سلول‌ها Bmi-1 بیان نمی‌شود (نتیجه نشان داده نشده است). همان‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، هیچ‌گونه علامتی مبنی بر بیان پروتئین در این سلول‌ها مشاهده نگردید.



شکل ۳ بررسی بیان Bmi-1 در سطح پروتئین در دو نمونه توموری مثانه (T1، T2) و نیز رده سلولی NTRA2 به کمک روش وسترن‌بلات. بیان کنترل داخلی (β -actin) در تمام نمونه‌ها و بیان Bmi-1 تنها در نمونه‌های توموری نشان داده شده است.

به منظور تعیین توزیع داخل سلولی پروتئین Bmi-1، بلوک‌های پارافینه از آرشیو بیمارستان لبافی‌نژاد جمع‌آوری و برش‌های ۵ میکرومتری از آنها تهیه شد. با توجه به میزان بسیار اندک پادتن Bmi-1 موجود، تلاش گردید تا از نمونه‌هایی در این روش استفاده شود که بیان بالای Bmi-1 پیشتر در آنها به وسیله RT-PCR تأیید شده بود. نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی نشان داد که پروتئین Bmi-1 عموماً دارای توزیع هسته‌ای در سلول‌های توموری می‌باشد (شکل ۴-الف).

به منظور بررسی حساسیت و دقت پادتن، از هر نمونه یک لام نیز به عنوان کنترل منفی تهیه گردید. نمونه‌های

برای مقایسه میانگین بیان ژن در سه مرتبه Ta، T1 و T2 به دلیل ناهمگنی واریانس، از آزمون‌های نیرومند رابوست (Robust) و ولچ (Welch) استفاده گردید. با توجه به سطح معنی‌داری این آزمون، بین میانگین بیان ژن و مرتبه تومور (stage) اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). شکل ۲-ج). در ادامه برای تعیین عامل اختلاف از مقایسه زوجی LSD استفاده شد. براساس نتایج این آزمون می‌توان گفت:

۱- مرتبه Ta با میانگین ۰/۰۶۹۱، بیان بسیار کمی از ژن Bmi-1 را نشان می‌دهد.

۲- مرتبه‌های T1 و T2 با میانگین‌های ۰/۵ و ۰/۴۷ در گروه با میانگین بیانی بالا قرار می‌گیرند؛ به عبارت دیگر می‌توان گفت دو مرتبه T1 و T2 در میانگین بیان ژنی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند ($p > 0.05$)، ولی هر کدام از این مرتبه‌ها با مرتبه Ta اختلاف معنی‌داری دارند ($p < 0.05$).

۳-۴- تأیید ماهیت Bmi-1 به کمک تعیین توالی ژنی

به منظور کسب اطمینان از هویت قطعات تکثیر شده با PCR و تأیید ماهیت باندهای مشاهده شده، محصولات PCR، تعیین توالی شده و با توالی گزارش شده در NCBI برای ژن Bmi-1 مقایسه شدند. نتایج، حاکی از تکثیر اختصاصی Bmi-1 و صحت واکنش PCR می‌باشد (نتیجه نشان داده نشده است).

۳-۵- تأیید بیان Bmi-1 در سطح پروتئین

برای تأیید بیان Bmi-1 در سطح پروتئین و نیز تعیین توزیع درون سلولی پروتئین در سلول‌های توموری، از روش‌های وسترن‌بلات و ایمونوهیستوشیمی استفاده گردید. نتایج حاصل از وسترن‌بلات حاکی از وجود تنها یک تک باند قوی (حدوداً ۴۵ کیلو دالتونی) در نمونه توموری بود که با اندازه مورد انتظار پروتئین Bmi-1 برابر بود (شکل ۳). این یافته تأیید کرد که در نمونه‌های

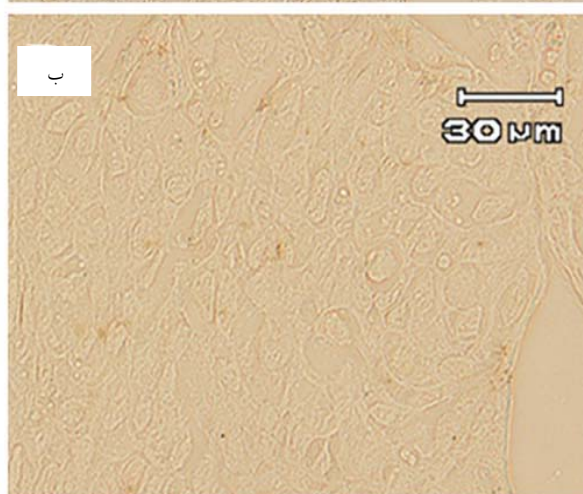
Bmi-1 یک مهارکننده رونویسی است که در فرایندهای متعددی، از جمله تومورزایی درگیر می‌باشد. افزایش بیان Bmi-1 در تعدادی از سرطان‌ها تأیید شده است [۱۹-۲۳]. با وجود این در مورد نقش احتمالی این ژن در تومورزایی مثانه، هیچ‌گونه اطلاعی در دست نیست. به همین دلیل تلاش شد تا بیان این ژن در سطح mRNA و پروتئین در بافت‌های توموری و طبیعی مثانه بررسی و مقایسه گردد. جایگاه (Locus) مهارکننده توموری Cdkn2a (جایگاه Ink4a/Arf) دو پروتئین p16ink4a و p14arf را کد می‌کند. Ink4a و Arf، به ترتیب نقش مهمی در مسیرهای رتینوبلاستوما (Retinoblastoma) (pRB) و p53 بازی می‌کنند. این دو مسیر از جمله مهمترین مسیرهایی هستند که در فرایند سرطانی شدن، دچار آسیب کمتر شود [۱۱، ۲۴]. Bmi-1، مهارکننده قوی هر دو مسیر می‌باشد و بنابراین، بررسی نقش این ژن در فرایند سرطانی شدن سلول‌ها در تومورهای مختلف، حائز اهمیت است.

نتایج این تحقیق حاکی از آن است که:

۱- Bmi-1 به صورتی متمایز در بافت‌های توموری و غیر توموری بیان می‌شود؛ در نتیجه این ژن می‌تواند هدف مناسبی جهت شناسایی و غربالگری، تعیین پیش‌آگهی و درمان هدفمند موارد جدید و عودکننده سرطان مثانه باشد.

۲- بیان Bmi-1 به طور قابل ملاحظه‌ای در بافت‌های توموری، بیشتر از بافت‌های طبیعی وحاشیه توموری است. این یافته نشان می‌دهد که بیش بیان Bmi-1، در سلول‌های توموری به واسطه مهار بیان ژن‌های Ink4a و Arf و همچنین اختلال در مسیرهای رتینوبلاستوما و p53، احتمالاً باعث زمینه ایجاد یا پیشرفت فرایند تومورزایی می‌شود. البته، بیش بیان Bmi-1 در تمامی نمونه‌های توموری عمومیت ندارد و در چندین نمونه، سطح بیان این ژن، در نمونه توموری وحاشیه توموری تقریباً یکسان است. در توضیح این مشاهده باید یادآوری کرد که مهار جایگاه Ink4a/Arf تنها به وسیله تنظیم مهار Bmi-1 از طریق هیپرمتیلاسیون پروموتور

کنترل منفی، لام‌هایی هستند که در آنها، در مرحله انکوبه کردن به جای پادتن اولیه، از بافر مسدودکننده (Blocking buffer) استفاده شده است. نبود رسوب قهوه‌ای در رنگ‌آمیزی بدون پادتن اولیه، نشان دهنده اختصاصی بودن واکنش پادتن اولیه با پروتئین Bmi-1 می‌باشد (شکل ۴-ب).



شکل ۴ نتایج ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین Bmi-1 در مقاطع تهیه شده از بلوک‌های پارافینه نمونه‌های تومور مثانه. الف) Bmi-1 عمدتاً دارای توزیع هسته‌ای (پیکان) در سلول‌های توموری می‌باشد. ب) در مقطع کنترل منفی و در غیاب آنتی‌بادی اولیه بر علیه Bmi-1 هیچ‌گونه علامتی مشاهده نشد.

۴- بحث

در این تحقیق، شایستگی بیان ژن Bmi-1 به عنوان یک نشانگر مولکولی جدید در تشخیص موارد جدید و عودشونده سرطان مثانه، مورد توجه قرار گرفته است.

توموری تا حدودی بیشتر از سطح بیان *Bmi-1* در تومورهای با درجه پایین می‌باشد، ولی با توجه به حجم جمعیت مورد مطالعه، این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p > 0.05$). این یافته نیز در توافق با گزارش پیشین می‌باشد که در آن ارتباط معنی‌داری بین بیان *Oct-4* و درجه‌های پایین و بالای تومورهای مثانه، مشاهده نشده بود [۱۵].

بنابراین، با توجه به آنچه گفته شد، تعیین بیان (مخصوصاً تعیین بیان کمی به وسیله *Real-Time PCR*) می‌تواند به عنوان یک نشانگر تومور مولکولی در تشخیص و پیش‌آگهی تومورهای مثانه، جایگزین و یا مکمل روش‌های تشخیصی فعلی سرطان مثانه شود. همچنین بررسی جامع‌تر و کامل‌تر حساسیت و دقت این نشانگر تومور می‌تواند در درجه‌بندی صحیح تومور، راهگشای اتخاذ راهبردهای صحیح‌تر درمانی، به وسیله پزشک گردد.

۵- تشکر و قدردانی

در این تحقیق از کمک‌ها و مساعدت‌های خانم نسیم هاتفی بهره‌مند شده‌ایم که بدین وسیله از زحمات و مساعدت‌های ایشان سپاسگزاری می‌شود. ضمناً کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است.

(*Promotor Hypermethylation*) انجام نمی‌گردد، بلکه حذف جایگاه یاد شده و نیز جهش (*Mutation*) نقطه‌ای این ناحیه، از دیگر تغییرات ژنی هستند که در بیان ژن‌های *Ink4a* و *Arf* اختلال ایجاد می‌کنند [۱۴، ۱۳]. در این راستا حذف ژنی جایگاه *Ink4a/Arf* در حدود ۵۰٪ [۲۵] و نیز هیپرمتیلاسیون *CpG* در ناحیه پروموتور *P14ARF*، حدود ۱۸٪ و در ناحیه پروموتور *P16Ink4a* به میزان ۳۱-۵۶٪ [۲۷، ۲۶] در بیماران مبتلا به سرطان مثانه گزارش شده است. در همین زمینه ادعا شده است که از شدت متیلاسیون پروموتور این جایگاه می‌توان به عنوان یک نشانگر تومور در شناسایی و پیش‌آگهی تومورهای مثانه استفاده کرد [۲۷].

۳- در این تحقیق برای اولین بار ارتباط مستقیم سطح بیان *Bmi-1* با مرتبه تومور، گزارش می‌شود؛ به طوری که در مرتبه *Ta*، میزان بیان *Bmi-1* به نحو بارزی کمتر از شدت بیان در مرتبه‌های *T1* و *T2* می‌باشد. به عبارت دیگر، بیش بیان *Bmi-1* از وقایع آغازین تومورزایی مثانه نیست و بیشتر برای پیشرفت تومور مورد احتیاج می‌باشد. این یافته در توافق با گزارش‌های پیشین است که نشان می‌دهد جایگاه این ژن بر روی کروموزوم 10P در مرتبه‌های *T1* و *T2* (و نه *Ta*) دستخوش تغییرات افزایشی (*Gain*) می‌شود [۲۸].

۴- با وجود اینکه بیان *Bmi-1* در تومورهای با درجه بالای

۶- منابع

- [1] Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1998; 48(1): 6-29.
- [2] Reznikoff CA, Sarkar S, Jülicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, Newton MA. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol* 2000; 5(5): 191-203.
- [3] Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder tumor tests: Does their projected utility fulfill clinical necessity?. *J Urol* 2001; 165: 1067-77.
- [4] Schneeweiss S. Sensitivity analysis of the diagnostic value of endoscopies in cross-sectional studies in the absence of a gold standard. *Int J Tech Asses Health Care* 2000; 16(3): 834- 41.
- [5] Raab SS, Slagel DD, Jensen CS, Teague MW, Savell VH, Ozkutlu D, Lenel JC, Cohen MB. Low-grade transitional cell carcinoma of the urinary bladder: application of select cytologic criteria to improve diagnostic accuracy. *Mod Pathol* 1996; 9(3): 225-32.

- [6] Takashi M, Schenck U, Kissel K, Leyh H, Treiber U. Use of diagnostic categories in urinary cytology in comparison with the bladder tumor antigen (BTA) test in bladder cancer patients. *Int Urol Nephrol* 1999; 31(2): 189-96.
- [7] Gil J, Bernard D, Peters G. Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. *DNA and Cell Biology* 2005; 24 (2): 117-25.
- [8] Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, Van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004; 118: 409-18.
- [9] Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 700-7.
- [10] Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004; 18: 2315-35.
- [11] Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423(6937): 302-5.
- [12] Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, Depinho R, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene Bmi1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 1999; 397: 164-8.
- [13] Florl AR, Franke KH, Niederacher D, Gerharz CD, Seifert HH, Schulz WA. DNA methylation and the mechanisms of CDKN2A inactivation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Lab invest* 2000; 80: 1513-22.
- [14] Florl AR, Schulz WA. Peculiar structure and location of 9p21 homozygous deletion breakpoints in human cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37(2): 141-8.
- [15] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(7): 1598-1602.
- [16] Babaei E, Mowla SJ, Shariat Torbaghan S, Emadi Bayegi M. Detection of survivin gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissues of human osteosarcoma: its potential usefulness in diagnosis and prognosis of bone tumors. *Iranian Biomed J* 2006; 10(1): 39-45.
- [17] National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [18] Blast the human Genome: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/hBlast>
- [19] Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2002; 62(16): 4736-45.
- [20] Kim JH, Yoon SY, Kim CN, Joo JH, Moon SK, Choe IS, Choe YK, Kim JW. The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett* 2004; 203(2): 217-24.
- [21] Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt HJ, Gugger M, Kappeler A, Borner MM, van Lohuizen M, Betticher DC. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer* 2001; 84(10): 1372-6.
- [22] Song LB, Zeng MS, Liao WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL, Shao JY, Wu QL, Li MZ, Xia YF, Fu LW, Huang WL, Dimri GP, Band V, Zeng YX. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66(12): 6225-32.
- [23] Bea S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernández S, Fernandez PL, van Lohuizen M, Colomer D, Campo E. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 2001; 61(6): 2409-12.
- [24] Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 1999; 13: 2678-90.

- [25] Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns JP, Shaw ME, Law MG. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* 1994; 54(2): 531–8.
- [26] Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, Kubo H, Nishiyama K, Kawahara M, Nakagawa M. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339(3): 790–6.
- [27] Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Muñoz C, Chacón I, Sanchez R, Carballido J, Colás A, España P, Bonilla F. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res* 2003; 530(1-2): 9–17.
- [28] Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis* 2006; 27(3): 361–73.