مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن *CD44* در افراد مبتلابه سرطان ریه در استان تهران

زهرا احمدزاده چالشتری، نوشا ضیاء جهرمی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: *CD44* یک پروتئین سلولی است که در رابطه با سرطان‌زا بودن در دهه گذشته به‌شدت موردمطالعه قرار گرفته است بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژن *CD44* در افراد مبتلابه سرطان ریه است.

مواد و روش‌ها: ۳۰ نمونه بافتی از تومور ریه و ۳۰ نمونه از بافت‌های سالم ریه اخذ شد. RNA نمونه‌ها استخراج و برای سنتز cDNA مورداستفاده قرار گرفت. آزمون Real Time RT-PCR با ژن کنترل داخلی *GAPDH* برای ارزیابی میزان بیان ژن *CD44* مورداستفاده قرار گرفت.

نتایج: میزان بیان ژن *CD44* در بافت‌های توموری، مردان، گروه سنی بالای ۶۰ سال، افراد سیگاری و تومور آدنوما به ترتیب ۲/۱، ۱/۴، ۱/۱، ۱/۹ و ۱/۱ برابر نمونه‌های سالم، زنان، گروه سنی زیر ۶۰ سال، افراد غیر سیگاری و تومور SCC بود.

نتیجه‌گیری: التهاب ایجادشده در اثر سرطان ریه، سبب افزایش تولید فاکتور التهابی *CD44* و درنتیجه افزایش بیان آن شد. ارزیابی میزان بیان ژن *CD44* می‌تواند به‌عنوان مارکری برای پیش‌بینی وقوع سرطان ریه مورداستفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان ریه، *CD44*، بیان ژن، Real Time RT-PCR

مقدمه

سرطان ریه بیش از ۱/۸ میلیون مورد سرطانی است که به‌تازگی تشخیص داده شده‌اند (۱۳ درصد از کل موارد سرطان تشخیص داده‌شده است) و سالانه ۱/۶ میلیون مورد مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان (۱۹/۴ درصد از کل موارد) را به خود اختصاص می‌دهد. تعداد تخمینی موارد جدید سرطان ریه در ایالات‌متحده در سال ۲۰۱۴، ۲۲۴۲۱۰ مورد با ۱۵۹۲۶۰ مورد مرگ‌ومیر تخمینی بود. گرچه بروز سرطان ریه در کشورهای توسعه‌یافته رو به کاهش است اما این میزان‌ها در کشورهای کمتر توسعه‌یافته (آفریقا، آمریکای جنوبی، اروپای شرقی و چین) در حال افزایش هستند. درواقع، در سال ۲۰۱۲، ۵۸ درصد از ۱/۸ میلیون مورد تخمینی جدید در سراسر جهان، در مناطق کمتر توسعه‌یافته اتفاق افتاد. شاید توجیه احتمالی این یافته آن است که این کشورها قوانین آسان‌تری برای استعمال دخانیات دارند. بااین‌وجود بالاترین میزان بروز سرطان ریه در مردان در آمریکای شمالی، اروپا، شرق آسیا، آرژانتین و اروگوئه و کمترین میزان در مناطق اطراف صحرای آفریقاست. در زنان بالاترین میزان سرطان ریه در آمریکای شمالی، شمال اروپا، استرالیا[۵] نیوزلند و چین است. دراین‌بین فراوانی تومورهای آدنوما (Adenoma) و اسکواموس سل کارسینوما (Squamouis cell carcinoma (SCC)) در این بافت بیشتر از انواع آن‌ها گزارش‌شده است (۶-۱).

آنتی‌ژن CD44 یک گلیکوپروتئین سطح سلولی است که در تعاملات سلولی، چسبندگی سلولی و مهاجرت درگیر است. در انسان، آنتی‌ژن CD44 توسط ژن CD44 در کروموزوم ۱۱

***نویسندگان مسئول: نوشا ضیاء جهرمی**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران Email: Nooshazia.59@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6114-7060

کدگذاری می‌شود. CD44 به‌عنوان HCAM (مولکول چسبندگی سلول خودمانی)، Pgp-1 (گلیکوپروتئین ۱ فاگوسیتیک)، آنتی‌ژن Hermes، گیرنده لنفوسیت خودی، ECM-III و HUTCH-1 نیز نام‌گذاری می‌شود (۵، ۶).

CD44 در طیف گسترده‌ای از عملکردهای سلولی ازجمله فعال‌سازی لنفوسیت، گردش خون و انقباضات، خونریزی و متاستاز تومور شرکت می‌کند (۴، ۵). CD44 گیرنده اسید هیالورونیک است و همچنین می‌تواند با دیگر لیگاندها مانند استئوپونتین، کلاژن و ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) تعامل داشته باشد. عملکرد CD44 توسط تغییرات پس از ترجمه‌ای posttranslational آن کنترل می‌شود. یک تغییر مهم شامل سیالوفوکوزیلات گسسته‌ای است که گلیکوفرم اتصال‌دهنده CD44 selectin تحت عنوان HCELL (برای سلول Hematopoietic Cell E-selectin / L-selectin Ligand) نامیده می‌شود (۴، ۹-۷).

CD44 یک مولکول سطحی چند سلولی و چندمنظوره است که در تکثیر سلولی، تمایز سلولی، مهاجرت سلولی، آنژیوژنز، ارائه سیتوکین‌ها، کموکاین‌ها و عوامل رشد به گیرنده‌های مربوطه و داکینگ پروتئازها در غشای سلولی و همچنین در سیگنالینگ برای بقای سلول نقش دارد. تمام این خواص بیولوژیکی برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی سلول‌های طبیعی ضروری است، اما آن‌ها همچنین با فعالیت‌های پاتولوژیک سلول‌های سرطانی مرتبط هستند. آزمایش‌ها در حیوانات نشان داده است که هدف قرار دادن CD44 توسط آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن اولیگونوکلئوتید و پروتئین‌های محلول در CD44 به‌طور قابل‌توجهی فعالیت‌های بدخیم نئوپلاسم‌های مختلف را تحت تأثیر قرار می‌دهد و بر عوامل ضد CD44 تأثیر می‌گذارد. جالب‌توجه است که سطح بالایی از CD44 چسبندگی سلول‌های لوسمی برای تولید لوسمی ضروری است. علاوه بر این، چون تغییرات جایگزین و اصلاح posttranslational تولید بسیاری از توالی‌های CD44 مختلف، ازجمله، توالی‌های خاص تومور، تولید عوامل خاص تومور ضد CD44 ممکن است رویکرد درمانی واقعی باشد. بااین‌حال، در بسیاری از سرطان‌ها (سرطان کلیه و لنفوم غیرهوچکین استثنا است)، سطح بالایی از بیان CD44 همیشه با نتیجه نامطلوب همراه نیست. برعکس، در تعدادی از نئوپلاسمات تعدیل CD44 با یک نتیجه مطلوب همراه است. علاوه بر این، در بسیاری موارد، گروه‌های تحقیقاتی مختلف که درزمینه‌ی مشابه بیماری‌های نئوپلاستیکی تحقیق می‌کنند، نتیجه‌های متضادی را در مورد ارتباط بین بیان CD44 و پیش‌آگهی بیماری، به‌احتمال‌زیاد با توجه به تفاوت روش‌شناسی، به دست آوردند. این مشکلات باید قبل از اعمال درمان ضد CD44 به سرطان‌های انسان حل شود (۴، ۵، ۹). CD44 یک پروتئین سلولی است که در رابطه با سرطان‌زا بودن در دهه گذشته به‌شدت موردمطالعه قرارگرفته است. این امر در طی پاسخ‌های التهابی و نارسایی‌های سلولی در طول پیشرفت تومور تغییر می‌کند. برخی از ایزوفرم‌ها مربوط به سلول‌های خاص سرطانی هستند. افزایش ایزوفرم‌های خاص CD44 در برخی از تکثیرهای لوسمی مشخص می‌شود. بیشترین داده‌های منتشرشده نشان‌دهنده نقش جزئی CD44 در سلول‌های سرطانی یا در تهاجم است، بااین‌حال، هنوز عدم اطمینان در مورد مکانیسم دقیق که توسط CD44 در رشد سرطان و یا پاسخ التهابی شرکت می‌کند وجود ندارد. این بررسی بر روی شیوع CD44 در سلول‌های سرطانی تمرکز دارد (۵، ۷، ۱۰). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که واریانت‌های متفاوت ژن *CD44* و خصوصاً *CD44v6* نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارند (۱۱، ۱۲)؛ بنابراین در پژوهش حاضر از واریانت *CD44v6* با کد شناسایی NM_001202555.2 استفاده شد.

با توجه به‌وفور سرطان ریه در بین اکثر آحاد جامعه و نقش ژن CD44 در ایجاد سایر انواع سرطان‌ها، مطالعه حاضر برای اولین بار باهدف ارزیابی بیان ژن CD44 در نمونه‌های سرطان ریه و بافت مجاور آن (بافت سالم) در سنین و جنس‌های مختلف با استفاده از Real Time RT-PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

جامعه موردمطالعه

بررسی حاضر مطالعه کاربردی و پژوهشی از نوع موردی-شاهدی است که در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با کد (IR.IAU.SJHK.REC.1397.031) به تصویب رسیده است. در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه بافت ریه از بیماران مبتلابه سرطان ریه و ۳۰ نمونه از بافت‌های سالم ریه این بیماران از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به‌صورت جداگانه و در فلاسک‌های مخصوص حمل نمونه بافتی در عرض ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. لازم به ذکر است که از تمامی افرادی که برای شرکت در این پژوهش رضایت کامل داشتند، پس از اخذ رضایت‌نامه نمونه‌ها

توسط متخصصان پاتولوژی بیمارستان‌های مسیح، خاتم‌الانبیا و آتیه تهران اخذ گردیدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از ترایزول انجام شد و بررسی کیفی و کمی آن با استفاده از ژل الکتروفورز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ انجام شد و به‌منظور حذف حضور DNA احتمالی در نمونه‌ی RNA استخراج‌شده تیمار با آنزیم DNaseI انجام شد. به‌منظور استخراج cDNA از نمونه‌های RNA، میزان ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج‌شده مورداستفاده قرار گرفت. برای این منظور، از کیت استخراج cDNA شرکت Geneall و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به این صورت که ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج‌شده با ۶ میکرولیتر از آب مقطر استریل مخلوط و محتویات با ۰/۵ میکرولیتر DNTPs و ۰/۵ میکرولیتر OligDT مخلوط شد. این محلول به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد. پس از گذشت این زمان، برای هر واکنش ۱ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر dtt، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم RTase و ۰/۵ میکرولیتر RNAse inhibitor تهیه شد. پس از انجام این مراحل، محلول باقی‌مانده در هر میکروتیوب به‌عنوان cDNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام واکنش Real Time RT-PCR نگهداری می‌شود.

طراحی پرایمر و تکنیک Real Time RT-PCR

در مطالعه حاضر از زوج پرایمرهای ارائه‌شده در جدول ۱ به‌منظور ارزیابی میزان بیان ژن CD44 با واریانت ۶ و کنترل داخلی GAPDH در نمونه‌های cDNA استخراج‌شده از RNAهای نمونه‌های بافت تومور سرطان ریه و همچنین نمونه‌های ریه سالم استفاده شد. به‌منظور طراحی پرایمر، توالی ژن‌های موردنظر از سایت NCBI استخراج شدند. سپس در قسمت Exon موجود در سایت، طراحی پرایمرها انجام پذیرفت. همچنین در این مطالعه از تکنیک Real Time –RT PCR (دستگاه روتور ژن ۶۰۰۰) به‌منظور سنجش کمی و سطح بیان ژن CD44 استفاده شد. واکنش Real Time RT-PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر Master mix، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها و درنهایت ۱ میکرولیتر cDNA انجام پذیرفت.

برنامه دمایی جهت تکثیر ژن‌های CD44 و GAPDH به‌صورت مشابه شامل یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۴۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه بود. درنهایت میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین ΔΔCT با استفاده از فرمول 2-ΔΔCT محاسبه شد.

روش‌ها و تست‌های آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌های انجام‌شده در نرم‌افزار Microsoft Office Excel گردآوری‌شده و توسط نرم‌افزار SPSS شماره ۲۳ آنالیز شدند. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون‌های کولموگروف–اسمیرنف و شاپیرو ارزیابی شد. روش آماری تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، آزمون t-test بود. درنهایت P ۰/۰۵ value≤ به‌عنوان حد معناداری شناخته شد.

نتایج

ارزیابی کیفیت RNA

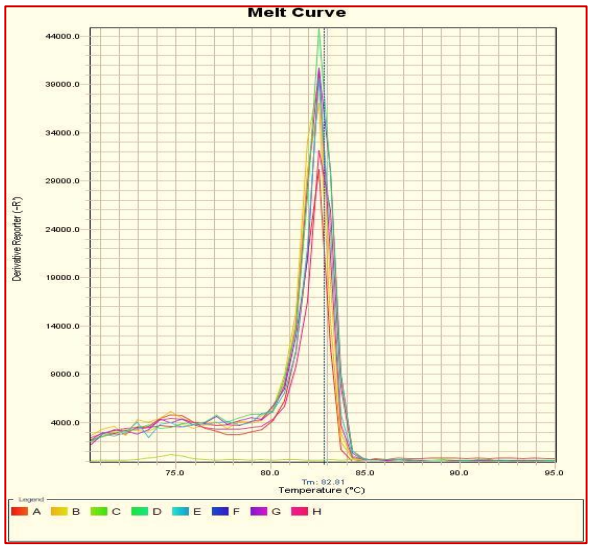
شکل ۱ کیفیت RNA استخراج‌شده از نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. وجود باندهای روشن، شفاف و شارپ برای نمونه‌های RNA نشان‌دهنده کیفیت قابل‌قبول نمونه‌های RNA استخراج‌شده است.

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورداستفاده جهت واکنش Real Time RT-PCR

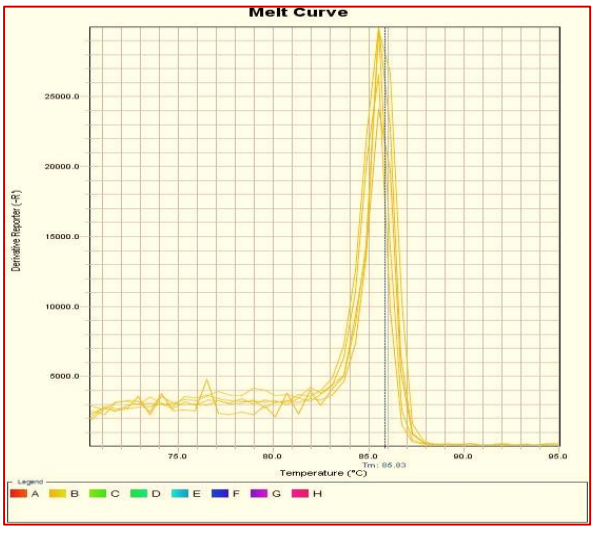
نام ژن	توالی پرایمر (’5-’3)	دما (درجه سانتی‌گراد)
CD44	F:CAGTCAACAGTCGAAGAAGGTG R:GACCATTTCCTGAGACTTGCTG	60
GAPDH	F:AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R: CATACTCAGCACCAGCATCACC	61



شکل ۱- نمونه‌هایی از ارزیابی کیفیت RNA استخراج‌شده از نمونه‌های بافتی



شکل ۲- منحنی ذوب ژن CD44



شکل ۳- منحنی ذوب ژن GAPDH

بررسی بیان ژن *CD44* در نمونه‌های توموری و سالم

اشکال ۲ و ۳ به ترتیب منحنی‌های ذوب ژن‌های CD44 و GAPDH را نشان می‌دهند.

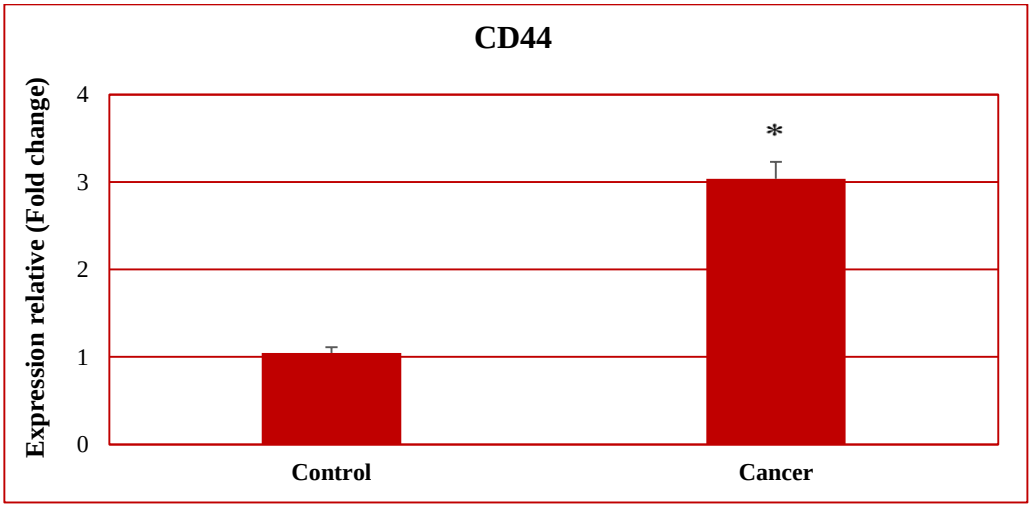
بررسی بیان ژن *CD44* در دو گروه موردمطالعه با استفاده از Real Time RT-PCR نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد میانگین بیان نسبی *CD44* در نمونه‌های توموری نسبت به بافت سالم افزایش معناداری داشته است (P =۰/۰۱۲). نمودار تغییرات بیان ژن *CD44* در نمونه‌های توموری نسبت به بافت سالم در نمودار ۱ نشان داده‌شده است. همچنین بررسی پارامتر فولد چنج (Fold change) برای ژن *CD44* در دو گروه موردبررسی نشان داد که میزان بیان این ژن در بافت‌های توموری به میزان ۲/۱ برابر، بافت‌های سالم بوده است.

بررسی تأثیر جنسیت فرد مبتلابه سرطان در تغییرات بیان ژن *CD44*

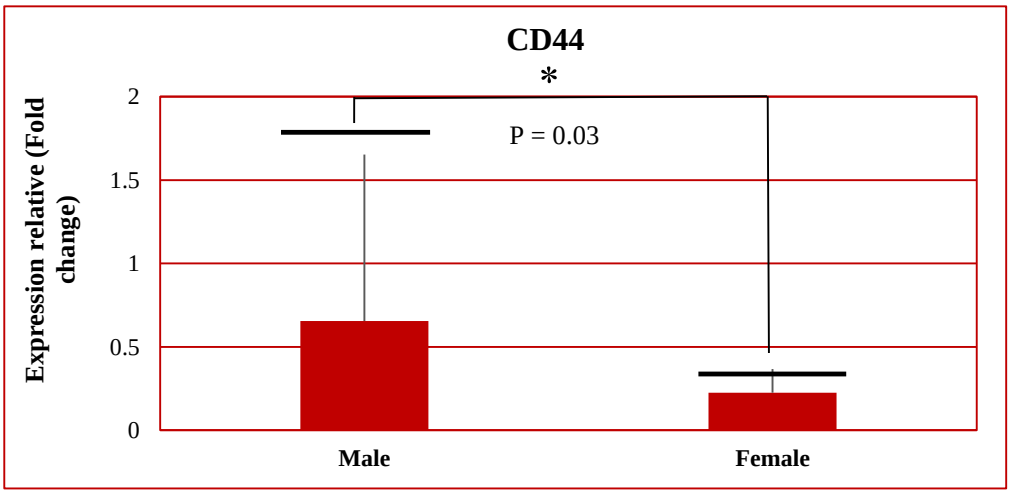
از سوی دیگر جهت بررسی تأثیر جنسیت بر تغییرات بیان ژن CD44، میزان بیان نسبی ژن *CD44* در بافت‌های توموری مردان و زنان بیمار مقایسه شد. نتایج آنالیز بیانی در این دو گروه نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد دو گروه ازلحاظ میزان بیان ژن *CD44* دارای تفاوت معناداری می‌باشند (P =۰/۰۳). نمودار تغییرات نسبی بیان ژن *CD44* در نمونه‌های مردان و زنان بیمار در نمودار ۲ نشان داده‌شده است. همچنین بررسی پارامتر فولد چنج برای ژن *CD44* در دو گروه موردبررسی نشان داد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های مردان به میزان ۱/۴ برابر، نمونه‌های متعلق به زنان بوده است.

ارتباط بین بیان ژن CD44 در گروه‌های سنی مختلف

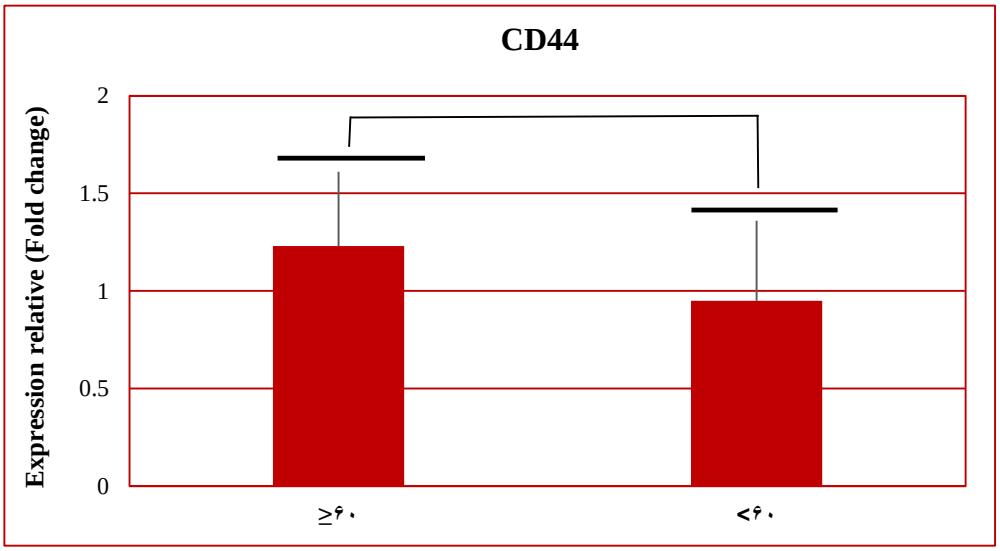
جهت بررسی تأثیر سن بر بیان ژن *CD44* افراد مطالعه به دو بالای ۶۰ سال و زیر ۶۰ سال طبقه‌بندی‌شده و میزان بیان ژن CD44 در بافت‌های توموری این دو گروه موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن *CD44* به‌صورت غیر معناداری در افراد با سن بالای ۶۰ سال افزایش پیدا می‌کند (P =۰/۶۲۰). نمودار تغییرات نسبی بیان ژن CD44 در گروه‌های سنی بالای ۶۰ سال و زیر ۶۰ سال در نمودار ۳ نشان داده‌شده است. همچنین بررسی پارامتر فولد چنج برای ژن *CD44* در دو گروه موردبررسی نشان داد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های متعلق به افراد با سن بالاتر از ۶۰ سال به میزان ۱/۱ برابر، نمونه‌های متعلق به افراد با سن کمتر از ۶۰ سال بوده است.



نمودار ۱- بیان نسبی ژن CD44 در نمونه‌های توموری و سالم



نمودار ۲- بیان نسبی ژن CD44 در نمونه‌های توموری زنان و مردان بیمار



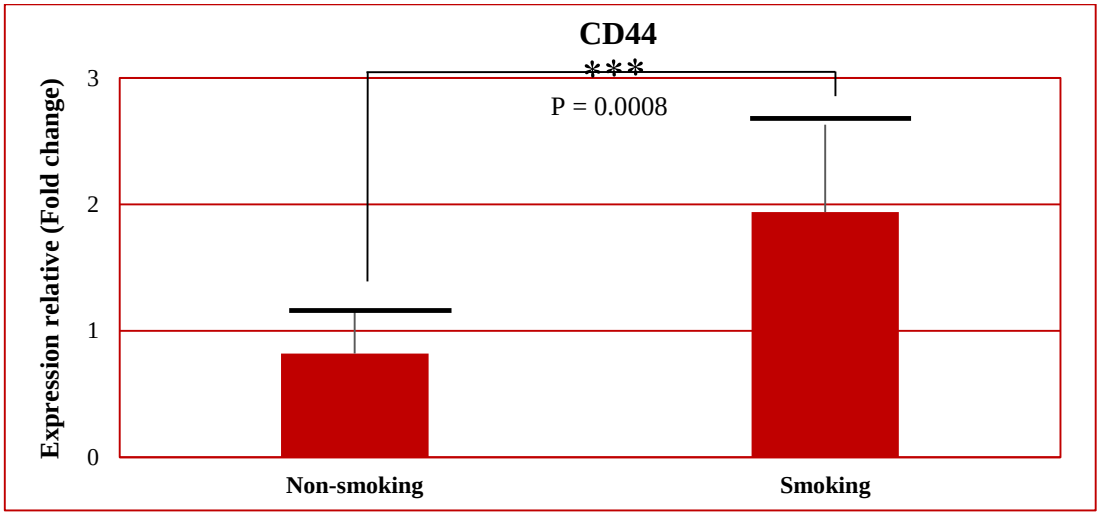
نمودار ۳- بیان نسبی ژن CD44 در نمونه‌های توموری افراد با سن زیر ۶۰ سال و بالای ۶۰ سال

ارتباط بیان ژن *CD44* در بافت‌های توموری با سیگار کشیدن

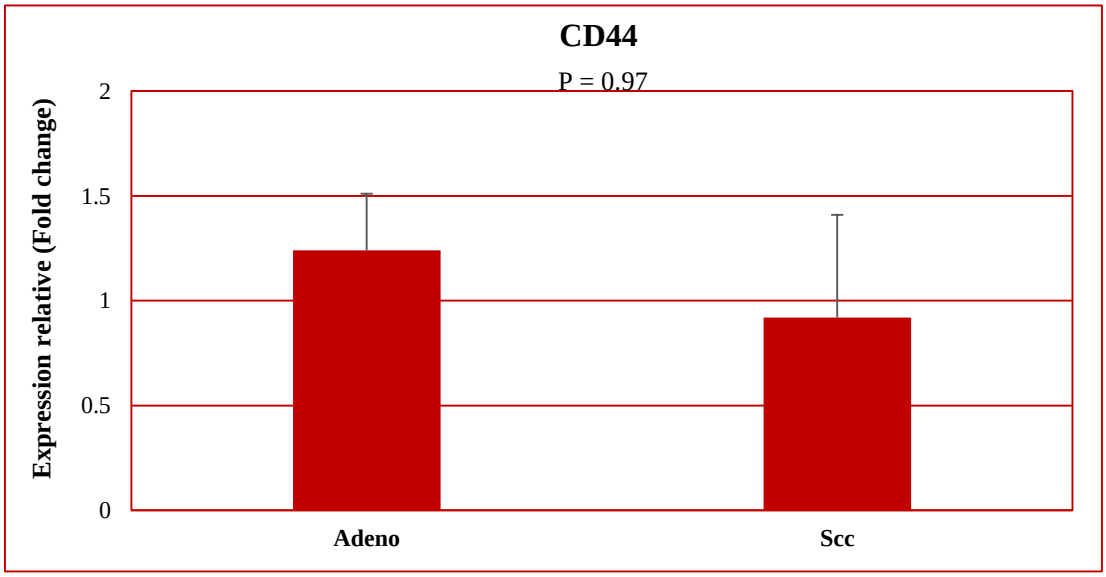
جهت بررسی تأثیر سیگار بر بیان ژن *CD44* افراد مطالعه به دو گروه سیگاری و غیر سیگاری طبقه‌بندی‌شده و میزان بیان ژن CD44 در بافت‌های توموری این دو گروه موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن *CD44* به‌صورت معناداری در افراد سیگاری افزایش پیدا می‌کند (P =۰/۰۰۰۸). نمودار تغییرات نسبی بیان ژن CD44 در نمونه‌های افراد سیگاری و غیر سیگاری در نمودار ۴ نشان داده‌شده است. همچنین بررسی پارامتر فولد چنج برای ژن *CD44* در دو گروه موردبررسی نشان داد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های متعلق به افراد سیگاری به میزان ۱/۹ برابر، نمونه‌های متعلق به افراد غیر سیگاری بوده است.

ارتباط بیان ژن *CD44* با منشأ بافت‌های توموری

به‌منظور بررسی تأثیر منشأ بافت توموری بر بیان ژن *CD44* افراد مطالعه به دو گروه افراد دارای تومورهای آدنو و SCC طبقه‌بندی‌شده و میزان بیان ژن *CD44* در بافت‌های توموری این دو گروه موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در سطح آماری ۹۵ درصد میزان بیان ژن *CD44* در دو گروه دارای تفاوت معناداری نمی‌باشند (P =۰/۹۷). نمودار تغییرات نسبی بیان ژن *CD44* در نمونه‌های تومور با منشأ آدنو و SCC در نمودار ۵ نشان داده‌شده است. همچنین بررسی پارامتر فولد



نمودار ۴- بیان نسبی ژن CD44 در نمونه‌های توموری افراد سیگاری و غیر سیگاری



نمودار ۵- بیان نسبی ژن CD44 در نمونه‌های توموری با منشأ آدنو و SCC

چنج برای ژن *CD44* در دو گروه موردبررسی نشان داد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های توموری دارای منشأ آدنو به میزان ۱/۱ برابر، نمونه‌های دارای منشأ SCC بوده است.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن *CD44* در نمونه‌های اخذشده از بافت تومور ریه در مقایسه با نمونه‌های اخذشده سالم بیشتر بود. همچنین میزان بیان این ژن در بیماران مرد، بیماران باسابقه مصرف سیگار، بیماران با سن بالاتر از ۶۰ سال و درنهایت بیماران مبتلابه تومور ریه از نوع آدنو بیشتر از سایر گروه‌های موردمطالعه بود.

CD44 خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌های اتصالی سطح سلول است که توسط ژن واحدی بر کروموزوم ۱۱ ساخته می‌شوند. پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که مولکول *CD44* در دو مرحله از آبشار تهاجمی شامل اتصال به ماتریکس خارج سلولی و تحرک سلول‌های سرطانی نقش مهمی دارد. همچنین، در متاستاز، سلول‌های توموری موجود در گردش باید به آندوتلیوم اتصال یابند که بر اساس مدل‌های تجربی، این کار باواسطه افزایش بروز *CD44* بر سطح سلول‌های توموری انجام می‌شود. ژن *CD44* با چندین مولکول ازجمله کلاژن، فیبرونکتین و لامنین واکنش می‌دهد و این ارتباط متقابل نقش مهمی در پیشرفت سرطان توسط افزایش تکثیر سلول، مهاجرت و متاستاز دارد. مطالعات نشان داده است که خاموش شدن ژن *CD44* سبب تخریب تکثیر سلول‌های سرطانی و کاهش مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۳). حضور فعال این ژن در سرطان‌های ریه (۱۳)، پستان (۱۴)، معده (۱۵)، پروستات (۱۶)، مثانه (۱۷)، مغز استخوان (۱۸)، خون (۱۹) و روده (۲۰) به اثبات رسیده است. مطالعات مختلفی به‌منظور ارزیابی ارتباط بین میزان بیان ژن *CD44* در افراد مبتلابه سرطان ریه انجام پذیرفته است.

Hu و همکاران در سال ۲۰۱۸ اقدام به مطالعه میزان بیان ژن CD44 در افراد مبتلابه سرطان ریه از نوع سلول‌های سرطانی ریه غیر کوچک (NSCLC) با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن *CD44* در افراد مبتلابه سرطان ریه با سن بالاتر از ۶۰ سال و کمتر از ۶۰ سال، مردان و زنان و درنهایت در بیماران باسابقه مصرف سیگار و بدون سابقه مصرف سیگار به ترتیب ۷۱/۴۰ و ۶۵/۴۰ درصد (P=۰/۵۳۲)، ۶۸/۱۰ و ۶۸/۱۰ درصد (P=۱/۰۰۰) و درنهایت ۶۶/۷۰ و ۶۹/۲۰ درصد (P=۰/۷۹۱) بود. نتایج این محققان همچنین نشان داد که میزان بیان ژن *CD44* در نمونه‌های سرطان ریه از نوع اسکواموس کارسینوما، آدنوکارسینوما، آدنو اسکواموس کارسینوما و کارسینوئید به ترتیب ۷۰/۸۰ درصد، ۵۲/۶۰ درصد، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود بااین‌وجود هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری بین میزان بیان ژن *CD44* و نوع سرطان ریه مشاهده نشد (P=۰/۲۱۱) (۶). نتایج این مطالعه در ارتباط با سن و نوع توده توموری سرطان ریه با نتایج مطالعه ما همخوانی داشت. دلیل اختلاف در برخی از نتایج این محققین با نتایج مطالعه حاضر احتمالاً تفاوت در نوع تومور، منطقه جغرافیایی انجام مطالعه و دقت روش استفاده‌شده برای تعیین میزان بیان ژن *CD44* است. محققان این مطالعه افزایش در بیان ژن *CD44* را به‌عنوان یک فاکتور ضعیف برای پیش‌بینی NSCLC معرفی نمودند. بااین‌وجود اثرات افزایش در میزان بیان ژن *CD44* و ایجاد سرطان (۲۱)، مهاجرت سلول‌های سرطانی (۲۲) و متاستاز بافت سرطانی به بافت‌های سالم (۲۳) توسط سایر محققین به اثبات رسیده است. Leung و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که سلول‌های مثبت ازنظر *CD44* نسبت به سلول‌های منفی ازنظر این ژن، هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط طبیعی از خاصیت تومور زایی بیشتری برخوردار هستند (۲۴). Penno و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که میانگین میزان بیان ژن *CD44* در افراد مبتلابه سرطان ریه NSCLC اسکواموس، سلول بزرگ و آدنو و همچنین SCLC کلاسیک و واریانت به ترتیب ۹۰، ۹۱/۷۹ و ۹۵/۶۲ درصد و ۷۷/۶۶ و ۰/۵۲ درصد بود که نشان‌دهنده ارتباط بالای بیان این ژن با سرطان ریه از نوع سلول‌های غیر کوچک توموری است (۲۵). Ariza و همکاران در سال ۱۹۹۵ اقدام به مطالعه اثر بیان ژن *CD44* روی پیشرفت هر دو نوع سرطان ریه NSCLC و SCLC نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که واریانت‌های *CD44V6*، *CD44V3* و *CD44s* از میزان بیان بالاتری در نمونه‌های اخذشده از بافت تومور ریه از نوع NSCLC نسبت به SCLC برخوردار بودند. نام بردگان استفاده از این بیومارکرها را برای تشخیص زودهنگام سرطان ریه از نوع سلول‌های غیر کوچک اختصاصی و کاربردی اعلام نمودند (۲۶). نتایج مشابه در ارتباط با تأثیر افزایش بیان ژن *CD44* روی

پیشرفت سرطان ریه توسط محققان دیگری از کشورهای ژاپن (۲۷)، فنلاند (۲۸) انگلستان (۲۹) گزارش‌شده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن *CD44* در نمونه‌های تومور ریه بسیار بیشتر از نمونه‌های بافت‌های سالم ریه که سالم در نظر گرفته شدند، بود. احتمالاً عدم مهاجرت بافتی سلول‌های سرطانی با عدم متاستاز سلول‌های سرطانی بافت تومور به بافت‌های سالم دلیل اصلی این یافته بود. امکان دارد در اثر مطالعه بیشتر روی تعداد بسیار بیشتری از نمونه‌های بافت‌های سالم، میزان بیان ژن *CD44* در این نمونه‌ها بیشتر از میزان گزارش‌شده، به دست آید. با در نظر گرفتن این موضوع و همچنین کمتر بودن میزان بیان ژن *CD44* در نمونه‌های بافت‌های سالم ریه نسبت به نمونه‌های تومور ریه می‌توان نتیجه گرفت که بیان ژن *CD44* در سلول‌های در حال سرطانی شدن (بافت‌های سالم ریه که بیان بالاتری نسبت به بافت‌های سالم داشتند) کم است و درنتیجه احتمالاً از این ژن برای پیش‌بینی و تشخیص مراحل اولیه ایجاد سرطان نمی‌توان استفاده کرد. هرچند این نتیجه‌گیری بسیار زودهنگام و در حال حاضر جز فرضیات نویسندگان این طرح است و تأیید آن نیازمند انجام مطالعات بسیار گسترده‌تری است. از طرفی *CD44* یک فاکتور التهابی است و در زمان ایجاد التهاب و واکنش‌های التهابی در بدن افزایش بیان دارد؛ بنابراین کاملاً منطقی به نظر می‌رسد که مصرف سیگار سبب افزایش بیان ژن *CD44* در افراد سیگاری نسبت به افراد غیر سیگاری شده است. سیگار کشیدن با اثراتی که روی سلول‌های لایه مخاطی ریه می‌گذارد، سبب ایجاد التهاب در بافت ریه شده و بالطبع این رویه موجب افزایش بیان فاکتور *CD44* در بافت‌های ریه می‌شود. دلیل بالاتر بودن میزان بیان ژن CD44 در مردان نسبت به زنان در مطالعه حاضر احتمالاً استفاده بیشتر مردان از دخانیات، گرایش بیشتر در مردان به مصرف مشروبات الکلی و انجام رفتارهای پرخطر و ارتباط بیشتر آن‌ها با محیط آلوده بیرون از خانه (نقش آلودگی هوا) و تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین مردان و زنان است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن *CD44* در نمونه‌های تومور ریه نسبت به نمونه‌های سالم افزایش داشته است که می‌تواند به‌عنوان یک مارکر احتمالی برای تشخیص تومور ریه مورداستفاده قرار گیرد. همچنین نتایج ما نشان داد که میزان بیان ژن *CD44* در نمونه‌های اخذشده از بافت تومور افراد سیگاری از افراد غیر سیگاری بیشتر، افراد با سن بالاتر از ۶۰ سال از سایر گروه‌های سنی بیشتر، مردان از زنان بیشتر و درنهایت در افراد مبتلابه تومور آدنو از سایر انواع تومورها بیشتر بود. این نتایج علاوه بر نشان دادن نقش سن، جنسیت، نوع تومور و استعمال دخانیات به‌عنوان عواملی برای افزایش میزان بیان ژن‌های دخیل در ایجاد سرطان، به شکل مشخصی همبستگی بالای بین ژن *CD44* در بروز سرطان ریه نشان داد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که ارزیابی میزان بیان ژن *CD44* می‌تواند رهیافت مناسبی برای پیش‌بینی بروز و پیشرفت سرطان ریه باشد. ازجمله نقاط قوت پژوهش حاضر می‌توان به ارزیابی نقش جنس، سن، منشأ تومور و سابقه مصرف سیگار در میزان بیان ژن CD44 در افراد سالم و بیمار اشاره نمود که سبب تعیین اثرات فاکتورهای خطر احتمالی در جمعیت موردمطالعه شد. ضمناً تحقیق حاضر اولین مطالعه انجام پذیرفته درزمینه ارزیابی میزان بیان ژن CD44 به‌عنوان یک مارکر تشخیصی زودهنگام در افراد مبتلابه سرطان ریه بود. عدم ارزیابی هم‌زمان میزان بیان چندین ژن به‌عنوان مارکرهای تشخیصی در افراد مبتلابه سرطان ریه و همچنین عدم ارزیابی نقش سایر فاکتورهای خطر در میزان بیان این ژن، نقاط ضعف مطالعه حاضر بودند. پیشنهاد می‌شود نقش سایر ژن‌های محتمل به‌عنوان مارکرهای تشخیص زودهنگام سرطان ریه و همچنین سایر فاکتورهای خطر، مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است که مطالعه کاربردی و پژوهشی از نوع موردی-شاهدی بود و در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با کد (IR.IAU.SJHK.REC.1397.031) به تصویب رسیده است، بدین‌وسیله نویسندگان از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Cheng T-YD, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. The international epidemiology of lung cancer: latest trends, disparities, and tumor characteristics. Journal of Thoracic Oncology. 2016;11(10): 1653-71.
2. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest. 2013;143(5): e1S-e29S.
3. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. Translational lung cancer research. 2018;7(3):220.
4. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. Saudi medical journal. 2015;36(3): 273.
5. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. Frontiers in cell and developmental biology. 2017;5:18.
6. Hu B, Ma Y, Yang Y, Zhang L, Han H, Chen J. CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer. Oncology letters. 2018;15(4):5627-33.
7. Senbanjo LT, AlJohani H, Majumdar S, Chellaiah MA. Characterization of CD44 intracellular domain interaction with RUNX2 in PC3 human prostate cancer cells. Cell Communication and Signaling. 2019;17(1): 80.
8. Cherciu IF, Ivan ET, Burtea DE, Calita M, Pirici D, Margaritescu C, et al. Targeted Confocal Laser Endomicroscopy (CLE) for the Assessment of Putative Cancer Stem Cell Markers in Colorectal cancer-A Pilot Study. Surg Gastroenterol. 2017;22(4): 303-12.
9. Huang H-H, Wang Y-C, Chou Y-C, Yu M-H, Chao T-K. The combination of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) and CD44 is associated with poor outcomes in endometrial cancer. PloS one. 2018;13(10):1-10.
10. Shen S, Lu H, Liu L, Wang Y, Zhang C, Yang W, et al. The role of CD44 in Tumor-initiating Cells of Salivary Gland Pleomorphic Adenoma: more than a surface biomarker. Oral Diseases. 2020;2(4): 29-35.
11. Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, et al. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. Science. 1992;257(5070): 682-5.
12. Guo J-Y, Chiu C-H, Wang M-J, Li F-A, Chen J-Y. Proteoglycan serglycin promotes non-small cell lung cancer cell migration through the interaction of its glycosaminoglycans with CD44. Journal of biomedical science. 2020;27(1): 1-18.
13. Arnold CR, Mangesius J, Skvortsova I-I, Ganswindt U. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. Frontiers in Oncology. 2020;10:164.
14. Louderbough JM, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. Molecular Cancer Research. 2011;9(12):1573-86.
15. Wang W, Dong L-P, Zhang N, Zhao C-H. Role of cancer stem cell marker CD44 in gastric cancer: a meta-analysis. International journal of clinical and experimental medicine. 2014;7(12):5059.
16. Korski K, Malicka-Durczak A, Bręborowicz J. Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists. 2014;65(4):291-5.
17. Wu C-T, Lin W-Y, Chang Y-H, Chen W-C, Chen M-F. Impact of CD44 expression on radiation response for bladder cancer. Journal of Cancer. 2017;8(7): 1137.
18. Yin Q, Zhou YY, Wang P, Ma L, Li P, Wang XG, et al. CD44 promotes the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward glioma. Oncology letters. 2016;11(4): 2353-8.
19. Gutjahr JC, Greil R, Hartmann TN. The role of CD44 in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. Frontiers in immunology. 2015;6: 177.
20. Jing F, Kim HJ, Kim CH, Kim YJ, Lee JH, Kim HR. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. International journal of oncology. 2015;46(4): 1582-8.
21. Shinohara S, Hanagiri T, Taira A, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, et al. Immunohistochemical expression and serum levels of CD44 as prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer. Oncology. 2016;90(6): 327-38.
22. Li G, Gao Y, Cui Y, Zhang T, Cui R, Jiang Y, et al. Overexpression of CD44 is associated with the occurrence and migration of non-small cell lung cancer. Molecular medicine reports. 2016;14(4): 3159-67.

23. Liu Y, Qing H, Su X, Wang C, Li Z, Liu S. Association of CD44 gene polymorphism with survival of NSCLC and risk of bone metastasis. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. 2015;21:2694.
24. Leung EL-H, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP-C, Cheng LC, Sihoe AD-L, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. PloS one. 2010;5(11):45-55.
25. Penno MB, August JT, Baylin SB, Mabry M, Linnoila RI, Lee VS, et al. Expression of CD44 in human lung tumors. Cancer research. 1994;54(5):1381-7.
26. Ariza A, Mate JL, Isamat M, López D, Von Uexküll-Güldeband C, Rosell R, et al. Standard and variant CD44 isoforms are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. The Journal of pathology. 1995;177(4): 363-8.
27. Hirata T, Fukuse T, Naiki H, Hitomi S, Wada H. Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. Cancer research. 1998;58(6): 1108-10.
28. Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K. Expression of the potential cancer stem cell markers, CD 133, CD 44, ALDH 1, and β-catenin, in primary lung adenocarcinoma—their prognostic significance. Pathology international. 2012;62(12):792-801.
29. Ramasami S, Kerr KM, Chapman AD, King G, Cockburn JS, Jeffrey RR. Expression of CD44v6 but not E-cadherin or β-catenin influences prognosis in primary pulmonary adenocarcinoma. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 2000;192(4):427-32.

Original Article

Investigation of CD44 Gene Expression in People with Lung Cancer in Tehran

Ahmadzadeh Chaleshtari Z, Zia jahromi N*

Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 17 Aug 2020 Accepted: 18 Jan 2021

Abstract

Background & Objective: CD44 is a cellular protein that has been extensively studied for carcinogenicity over the past decade, so the aim of this study is to investigate the expression of CD44 gene in people with lung cancer.

Materials & Methods: 30 tissue samples were taken from the lung tumor and 30 samples were taken from healthy lung tissues. RNA samples were extracted and used for cDNA synthesis. The Real Time RT-PCR test with the GAPDH internal control gene was used to assess CD44 gene expression.

Results: CD44 gene expression in tumor tissues, men, age group over 60 years, smokers and adenoma tumor, respectively 1.2, 1.4, 1.1, 1.9 and 1.1 times higher than healthy samples, women, age group Under 60 years of age, non-smokers had SCC tumors.

Conclusion: Inflammation caused by lung cancer increased the production of CD44 inflammatory factor and thus increased its expression. Evaluating the expression of CD44 gene can be used as a marker to predict lung cancer.

Keywords: Lung cancer, CD44, gene expression, Real Time RT-PCR

***Corresponding Author: Zia jahromi Noosha**, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email:Nooshazia.59@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6114-7060

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 3074-3084