



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ دکترای حرفه ای رشته‌ی پزشکی

عنوان:

بررسی ارتباط مسیر پیام‌رسانی WWOX/Mir-24 با فرایند انتقال سلول‌ها از حالت

اپیتلیالی به مزانشیمی (EMT) در سرطان معده

نگارش:

اشکان سالم

استاد راهنما:

دکتر فرهاد جدی

اساتید مشاور:

دکتر عباس یزدان‌بد

دکتر نرگس سوزن‌گر

دی ماه ۱۴۰۲

شماره پایان‌نامه: ۰۱۱۳۴

تشکر:

بر خود واجب می‌دانم از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر فرهاد جدی که به عنوان استاد راهنما در مراحل مختلف این پایان‌نامه همواره با سعه‌صدر و گشاده‌رویی در کنار من بودند و در طول مدت تحصیل از راهنمایی‌های اخلاقی و علمی ایشان بهره‌جسته‌ام تشکر و قدردانی نمایم .

همچنین از بزرگواری‌ها و حمایت‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر عباس یزدان‌بد و سرکار خانم دکتر نرگس سوزن‌گر که به عنوان اساتید مشاور مسئولیت سنگینی را قبول زحمت فرمودند، تشکر کرده و برای ایشان طول عمر توأم با سربلندی را آرزومندم.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

چکیده ۱۰

فصل اول: مقدمه

۱-۱: مقدمه ۴

۲-۱: بیان مسأله ۴

۱-۳: اهداف و فرضیات طرح ۱۳

۱-۳-۱: اهداف کلی ۱۳

۱-۳-۲: اهداف اختصاصی ۱۳

۱-۳-۳: اهداف کاربردی ۱۴

۱-۴: فرضیات یا سوالات طرح ۱۴

۱-۵: تعاریف واژه اختصاصی ۱۴

فصل دوم: مرور متون

۲-۱: مبانی نظری ۱۷

۲-۱-۱: سرطان معده ۱۷

۲-۱-۲: WWOX ۴۲

۲-۱-۳: MicroRNA ۴۵

۲-۱-۴: انتقال اپیتلیال - مزانشیمی ۴۷

۲-۲: مرور متون ۶۵

فصل سوم: مواد و روش کار

- ۳-۱: نوع پژوهش ----- ۷۳
- ۳-۲: جامعه آماری، روش نمونه گیری، حجم نمونه ----- ۷۳
- ۳-۳: روش گرد آوری اطلاعات ----- ۷۴
- ۳-۴: روش اجرای طرح و تکنیکهای مورد استفاده material & methods ----- ۷۴
- ۳-۴-۱: ارزیابی بیان ژن با روش Real-time PCR ----- ۷۴
- ۳-۴-۲: استخراج MicroRNA ----- ۸۵
- ۳-۵: طرح مطالعه ----- ۸۹
- ۳-۶: روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری ----- ۹۰
- ۳-۷: ملاحظات اخلاقی ----- ۹۰

فصل چهارم: نتایج

- ۱-۴: اطلاعات دموگرافیک پژوهش ----- ۹۴
- ۴-۲: مقایسه میزان بیان WWOX در نمونه های توموری بیماران مبتلا به سرطان معده با نمونه های حاشیه تومور ----- ۹۵
- ۴-۳: مقایسه میزان بیان Mir-24 در نمونه های توموری بیماران مبتلا به سرطان معده با نمونه های حاشیه تومور ----- ۹۶
- ۴-۴: تعیین میزان بیان فاکتور اپی تلیالی E-cadherin در نمونه های توموری بیماران مبتلا به سرطان معده ----- ۹۷
- ۴-۵: تعیین میزان بیان فاکتورهای مزانشیمال Twist، Vimentin و SNAIL در نمونه های توموری بیماران مبتلا به سرطان معده ----- ۹۸
- ۴-۶: ارتباط بیان ژن های مختلف با ژن WWOX در ناحیه توموری ----- ۱۰۰
- ۷-۴: ارتباط بین بیان Mir-24 و ژن های مختلف ----- ۱۰۱

۴-۸: بیان ژن های مورد نظر در قسمت تومور و حاشیه آن بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و

پاتولوژیکی ----- ۱۰۲

۴-۸-۱: بیان WWOX ----- ۱۰۲

۴-۸-۲: بیان MIR-24 ----- ۱۰۴

۴-۸-۳: بیان E-cadherin ----- ۱۰۶

۴-۸-۴: بیان Snail ----- ۱۰۸

۴-۸-۵: بیان Twist ----- ۱۱۰

۴-۸-۶: بیان Vimentin ----- ۱۱۲

۴-۹: ارتباط بیان ژن های WWOX و MIR-24 با درجه بندی و مرحله بندی سرطان معده ----- ۱۱۴

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱: بحث ----- ۱۱۶

۵-۲: محدودیت های پژوهش ----- ۱۲۰

۵-۳: نتیجه گیری ----- ۱۲۱

۵-۴: پیشنهادات برای پژوهش های بعدی ----- ۱۲۳

۵-۵: ترجمان دانش ----- ۱۲۴

منابع ----- ۱۲۵

ضمایم ----- ۱۳۹

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

- شکل ۳-۱. جدا سازی فاز در استخراج RNA ----- ۷۵
- شکل ۳-۲: الکتروفورز نمونه های RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ ----- ۷۹
- جدول ۳-۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده ----- ۸۲
- جدول ۳-۲: مقادیر لازم به ازای هر واکنش QPCR ----- ۸۳
- جدول ۳-۳: برنامه دمایی و زمانی مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی ----- ۸۴
- جدول ۳-۴: مقادیر و مواد لازم جهت سنتز اختصاصی cDNA ----- ۸۷
- جدول ۳-۵: شرایط دمایی واکنش سنتز cDNA ----- ۸۷
- جدول ۳-۶: مقادیر و مواد لازم برای انجام PCR TIME-REAL ----- ۸۸
- جدول ۳-۷: شرایط دمایی واکنش REAL-TIME PCR ----- ۸۹
- جدول ۳-۸: جدول متغیر های مطالعه ----- ۹۲
- جدول ۴-۱: اطلاعات دموگرافیک، بالینی و پاتولوژی پژوهش ----- ۹۴
- نمودار ۴-۱: مقایسه بین بیان WWOX در نمونه های توموری و حاشیه تومور ----- ۹۵
- نمودار ۴-۲: مقایسه بین بیان MIR-24 در نمونه های توموری و حاشیه تومور ----- ۹۶
- نمودار ۴-۳: مقایسه بین بیان E-CADHERIN در نمونه های توموری و حاشیه تومور ----- ۹۷
- نمودار ۴-۴: مقایسه بین بیان TWIST در نمونه های توموری و حاشیه تومور ----- ۹۸
- نمودار ۴-۵: مقایسه بین بیان VIMENTIN در نمونه های توموری و حاشیه تومور ----- ۹۹
- نمودار ۴-۶: مقایسه بین بیان SNAIL در نمونه های توموری و حاشیه تومور ----- ۹۹
- جدول ۴-۲: همبستگی بین ژن های WWOX و MIR-24 ----- ۱۰۰
- نمودار ۴-۷: ارتباط بیان WWOX با MIR-24 ----- ۱۰۱

- جدول ۴-۴، بیان ژن WWOX ناحیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۲
- جدول ۴-۵، بیان ژن WWOX ناحیه حاشیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۳
- جدول ۴-۶، بیان ژن MIR-24 ناحیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۴
- جدول ۴-۷، بیان ژن MIR-24 ناحیه حاشیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۵
- جدول ۴-۸، بیان ژن E-CADHERIN ناحیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۶
- جدول ۴-۹، بیان ژن E-CADHERIN ناحیه حاشیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۷
- جدول ۴-۱۰، بیان ژن SNAIL ناحیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۸
- جدول ۴-۱۱، بیان ژن SNAIL ناحیه حاشیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۰۹
- جدول ۴-۱۲، بیان ژن Twist ناحیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۱۰
- جدول ۴-۱۳، بیان ژن Twist ناحیه حاشیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۱۱
- جدول ۴-۱۴، بیان ژن VIMENTIN ناحیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۱۲
- جدول ۴-۱۵، بیان ژن VIMENTIN ناحیه حاشیه تومور بر اساس عوامل دموگرافیک، بالینی و پاتولوژیکی -----۱۱۳
- جدول ۴-۱۶، ارتباط بیان ژن های WWOX و MIR-24 با درجه بندی و مرحله بندی سرطان معده -----۱۱۴

اختصارات:

ANOVA	Analysis of variance
BHLH	Basic helix-loop-helix
BIM	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
BLBC	Basal-like breast cancer
BMP	Bone morphogenetic protein
CAF	Cancer- associated fibroblasts
CDH	E-cadherin
cDNA	Complementary DNA
CNS	Central nervous system
CRC	Colorectal cancer
CRPC	Castration resistant prostate cancer
CSC	Cancer stem cell
DMMR	Deficient mismatch repair
DFS	Disease free survival
EBV	Epstein-Barr virus
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EOC	Epithelial ovarian cancer
FAP	Familial adenomatous polyposis
FGF	Fibroblast growth factor
FHIT	Fragile Histidine Triad Diadenosine Triphosphatase
FIGC	Familial intestinal gastric cancer
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GAPPS	Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach
GC	Gastric Cancer
GEJ	Gastroesophageal junction

HCC	Hepatocellular carcinoma
HDGC	Hereditary diffuse gastric cancer
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte growth factor
HGSOC	High grade serous ovarian cancer
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IHC	Immunohistochemistry
ILK	Integrin Linked Kinase
JPS	Juvenile polyposis syndrome
LEF	lymphoid enhancer factor
MET	Mesenchymal–epithelial transition
Mir	MicroRNA
MMP	Matrix Metalloproteinase
NSCLC	Non-small cell lung cancer
Pax2	Paired box gene 2
PDGF	Platelet-derived growth factor
PJS	Peutz–Jeghers syndrome
PSA	Prostate-specific antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RISC	RNA-induced Silencing Complex
ROR	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
SIP1	Smad interacting protein 1
skp	S-phase kinase-associated protein
SOCS6	Suppressor of cytokine signaling 6
TGFβ	Transforming growth factor beta
Wt1	Wilms' Tumour gene 1
WWOX	WWcontaining - domain oxidoreductase
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox

بررسی ارتباط مسیر پیام رسانی WWOX/Mir-24 با فرایند انتقال سلول ها از حالت

اپیتلیالی به مزانشیمی (EMT) در سرطان معده

چکیده

زمینه: تغییرات در سطح بیان ژن WWOX به عنوان سرکوبگر تومور نقش مهمی در بسیاری از سرطان های انسانی دارد و مطالعات نشان داده است با پیشرفت سرطان میزان بیان آن کاهش می یابد. همچنین نقش Mir-24 در انواعی از سرطان ها از جمله سرطان معده (که در دسته میکرو RNA های انکومیر، onco-miR، قرار دارد) از طریق تاثیر در بیان ژن های مهارکننده سرطان ثابت شده است. متاستاز و سرطانی شدن ارتباط نزدیکی با فرآیند EMT و تغییراتی که سلول ها در طی آن کسب میکنند (از جمله افزایش ظرفیت مهاجرت و مقاومت در برابر آپوپتوز) دارد.

هدف: این مطالعه با هدف تعیین ارتباط مسیر پیام رسانی WWOX/Mir-24 با فرایند انتقال سلول ها از حالت اپیتلیالی به مزانشیمی (EMT) در سرطان معده و همچنین بررسی همبستگی آنها با معیارهای بالینی و پاتولوژیکی در بیماران مبتلا به سرطان معده انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۴۵ نفر از بیماران واجد شرایط اندوسکوپی با جواب پاتولوژی تاییدکننده سرطان انتخاب شدند. نمونه های بیوپسی به روش اندوسکوپی از ناحیه توموری و حاشیه تومور (با فاصله حداقل ۵cm) بیماران اخذ گردید و سپس میزان بیان ژن ها و Mir-24 در این نمونه ها از طریق Real-time PCR مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. برای بررسی رخداد EMT در سلول های توموری و مقایسه آن با سلول های حاشیه تومور، بیان ژن E-cadherin بعنوان مارکر سلول اپیتلیالی و بیان ژنهای Twist، Vimentin و SNAIL بعنوان مارکرهای سلول مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد میزان بیان Mir-24 در ناحیه تومور به مراتب بیشتر از میزان بیان آن در حاشیه تومور بوده است ($P \text{ value} < 0/05$) و همچنین بیان ژن مهار کننده تومور WWOX در ناحیه توموری کمتر از حاشیه تومور بود اما این اختلاف در دو گروه معنادار نبود. آزمون همبستگی نشان داد در نمونه های توموری، افزایش بیان Mir-24 ارتباط معکوسی با کاهش بیان E-cadherin داشت ($r = -0/356$ ، $p < 0/0008$). همچنین، همبستگی معنی داری بین اندازه تومور با بیان SNAIL وجود داشت و میزان بیان Vimentin به طور معنی داری با متاستاز به نواحی دور ارتباط داشت (آزمون کای دو، تمام موارد $P \text{ value} < 0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته های ما نشان میدهد بررسی میزان بیان Mir-24 و WWOX که در بروز سرطان دخیل هستند می تواند از نظر بالینی و برای پی بردن به ویژگی های سرطان معده مهم باشد. همچنین مهار Mir-24 ممکن است بتواند در کاهش بروز سرطان و متاستاز از طریق کاهش اثر مهاری آن بر روی ژن های سرکوبگر تومور نقش موثر و مفیدی ایفا کند.

کلمات کلیدی: WWOX، Mir-24، EMT، سرطان معده