

## بررسی مقایسه ای سطح RNA ژن CTGF در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ و افراد سالم

### چکیده

**زمینه:** بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در رشد و توسعه سرطان روده بزرگ می‌تواند عاملی برای تشخیص روند بدخیمی این تومور باشد. ژن Connective Tissue Growth Factor (CTGF) کد کننده پروتئینی وابسته به ماتریکس خارج سلولی (ECM) و عضو خانواده پروتئینی CCN می‌باشد که نقش اساسی در فیبروز، التهاب و بازسازی بافت همبند در انواع بیماری‌ها از جمله سرطان دارد و برای تکثیر سلولی، چسبندگی و گسترش سلول در طول پاتوژنز مهم است. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن CTGF در سطح mRNA در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ می‌باشد.

**روش کار:** جامعه مورد بررسی تعداد ۱۲۲ بلوک پارافینه بافت بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به همراه نمونه‌ی نرمال مرتبط بیماران از بیمارستان طالقانی و شهدا تهران به همراه ۲۰ بلوک پارافینه بافت افراد نرمال بود. میزان تغییرات بیان ژن CTGF بر اساس  $2^{-\Delta\Delta CT}$  به روش Re-al-time PCR و با نرم افزار REST و نرم افزار Prism مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین از نرم افزار Linreg برای محاسبه کارآمدی پرایمر استفاده شد.

**یافته‌ها:** افزایش بیان ژن CTGF در سلول‌های بافت توموری نسبت به نمونه‌های بافت نرمال مجاور افزایش معنی‌داری داشت. این افزایش بیان در گروه تومور نیز بطور معنادار بیشتر از گروه کنترل طبیعی بود ( $P < 0.0001$  و  $RQ > 2$ ). همچنین افزایش بیان این ژن در تومورهایی که در سمت چپ روده هستند نسبت به تومورهایی که در سمت راست روده هستند، معنی‌دار بود.

**نتیجه گیری:** یافته‌ها نشان می‌دهند که الگوی بیان ژن CTGF، در روند شکل‌گیری سرطان از بافت طبیعی، تغییر چشمگیری می‌کند. بنابراین ژن CTGF با توجه به نقش اساسی که در فیبروز، التهاب و بازسازی بافت همبند دارد، می‌تواند در روند انواع بیماری‌ها از جمله سرطان مهم واقع گردد.

**واژگان کلیدی:** ژن CTGF، سرطان روده بزرگ، Relative quantification

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد ژنتیک ملکولی، بخش بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار ژنتیک، بخش بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> استادیار بیماری‌های گوارش، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های گوارش، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

\* نشانی نویسنده مسئول:

بزرگراه چمران، خیابان یمن، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

نشانی الکترونیکی: hamid.assadzadeh@gmail.com

## مقدمه

بالای مسیر EMT، TGF- $\beta$  و ارتباط قوی بین بیان CCN2 و زیرمجموعه CMS4 سرطان کولورکتال از مهمترین عوامل این پیش آگهی ضعیف عنوان شده‌اند. با توجه به بیان بالای CCN2 در CRC در زیرمجموعه CMS4 و نقش تعیین‌کننده آن در فیروز بافت، تحقیق بیشتری برای تعیین ارزش CCN2 به عنوان نشانگر و هدف بالقوه درمانی در CRC در زیر مجموعه مزانشیم مهاجم مورد نیاز می‌باشد (۴).

TGF- $\beta$  متعلق به خانواده بزرگ پروتئین‌های نظارتی ساختاری شامل بیش از ۴۰ پروتئین است و به عنوان یک القاء‌کننده قوی در رشد فیبروبلاست‌های کلیوی کشف شده است (۶ و ۵). به دلیل نقش برجسته آن در تنظیم رشد سلول، تمایز و مهاجرت، TGF- $\beta$  به عنوان عامل ضروری برای پیشرفت سرطان تعیین شده است (۷). بیشتر پاسخ‌های TGF- $\beta$  شامل تحریک CTGF در برخی از سطوح مانند تحریک اجزای ECM، ترویج فیبروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها، آستروسیت‌ها، بهبود زخم و فیروز است (۸).

CTGF پروتئین وابسته به ماتریکس خارج سلولی (ECM) دارای وزن مولکولی ۳۶-۳۸ کیلودالتون و عضو خانواده پروتئین CCN است (۹).

بیش از ۲۰ سال از زمان کشف فاکتور رشد بافت همبند (CTGF) از سلول‌های اندوتلیالی ورید نافی (Umbilical vein) انسان می‌گذرد (۹). بر خلاف نام اصلی آن پیشنهاد شده است که CTGF یک عامل رشد واقعی نیست، بلکه یک پروتئین Matricellular است که نقش مهمی در فیروز، التهاب و بازسازی بافت دارد. CTGF برای دخالت خود در بازسازی بافت همبند در بیماری‌های مختلف از جمله سرطان شناخته شده است. CTGF یک هدف رونویسی TGF- $\beta$  است که فاکتورهای رشد، پروتئین ماتریکس خارج سلولی و مولکول‌های سطح سلولی از جمله پروتئین‌ها را درگیر می‌کند، بنابراین سیگنال‌ها را در مسیرهای چندگانه تعدیل می‌کند. CTGF ممکن است به پیشرفت سرطان کولورکتال به ویژه در زیرمجموعه CMS4 کمک کند. در Stage‌های پیشرفته سرطان کولورکتال، افزایش سطح mRNA و پروتئین CTGF یکی از اهداف مهم رونویسی TGF- $\beta$  بوده و CTGF را از طریق سیگنال Psmad2/3 متعارف (Cononical) فعال می‌کند (۴). هشت پروتئین Smad در پستانداران وجود دارد که ۶ مورد آن‌ها عملکرد اثرگذار دارند که شامل Smad1 تا Smad5 و Smad8 (همچنین به عنوان Smad9 شناخته شده است) می‌باشند و دو مورد آن یعنی Smad6 و Smad7 مهارکننده هستند (۱۰ و ۹).

مسیر TGF- $\beta$  رگ‌زایی لنف و نفوذ و فعال شدن استروما را تنظیم می‌کند که ممکن است در القای CTGF موثر باشد (۴). CTGF به اجزای ECM مانند فیبرونکتین، اگرکان (aggrecan) و HSPGs متصل می‌شود. اتصال CTGF به اجزای ECM برای

سرطان کولون (CRC) Colorectal cancer سومین بدخیمی شایع تشخیص داده شده در جهان است. برآورد می‌شود ۹۴۵ هزار مورد جدید از CRC تشخیص داده می‌شود و در حدود ۴۹۲ هزار مرگ به موجب این سرطان در سال رخ می‌دهد (۱).

سرطان کولورکتال یک بدخیمی خاموش و بی صدا شناخته می‌شود و افرادی را درگیر می‌کند که شاید هیچ شاخص قابل توجهی مانند خونریزی یا درد شکم ندارند و از آن بدتر بدخیمی در آنها وقتی تشخیص داده می‌شود که رشد تومور به اندازه‌ای است که درمان را سخت می‌نماید. با این حال، میزان بروز و مرگ و میر در طول دو دهه گذشته رو به کاهش است که عمدتاً به دلیل توجه به غربالگری، تشخیص زودرس، و معرفی درمان‌های جدید و موثر در کنترل متاستاز می‌باشد (۲). بقاء بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ تحت تاثیر میزان پیشرفت بیماری قرار دارد. اکثر سرطان‌های روده بزرگ از رشد نامتوازن و غیرسرطانی یک پولیپ آغاز می‌شوند و اگر این پولیپ یا پولیپ‌ها از روده خارج شوند ممکن است از بوجود آمدن سرطان جلوگیری شود. از این‌رو است که غربالگری این بدخیمی هم در کاهش بروز و هم در میزان مرگ ناشی از این سرطان موثر است (۱).

در یک کنسرسیوم تاکسونومی در سال ۲۰۱۵ تومورهای روده بزرگ به چهار زیر گروه مولکولی متمایز (CMSs) Consensus Molecular Subtype دسته‌بندی شدند که هر کدام ویژگی‌های خاص خود را دارد (۳).

تومورهای CMS1 غالباً با فنوتیپ ناپایداری ریزماهوره ای (MSI) و با فعال بودن مسیرهای ایمنی مشخص می‌شوند. این گروه بهترین پاسخ را به درمان‌های متکی به مهار بازرس‌های ایمنی دارند. همچنین فعالیت ژن‌های مسیر Matrix Metalloproteinase (MMP) در این گروه مشهود است و از طرفی وجود جهش‌های متعدد در این تومورها باعث تولید آنتی ژن‌های جدید می‌گردد.

تومورهای CMS2 با تمایز اپیتلیالی و فعال بودن مسیرهای مولکولی WNT و MYC مشخص می‌شود. تومورهای CMS3 با شیوع بالای جهش در ژن KRAS و فعالیت مسیرهای مرتبط با متابولیک مشخص می‌شود. همچنین تومورهای CMS3 دارای بی‌ثباتی کروموزومی بالا (CIN) می‌باشند. و در نهایت تومورهای CMS4 بیان بالای ژن‌هایی که در Epithelial-to-Mesenchymal transition (EMT) و TGF- $\beta$  (Transforming growth factor) رگ‌زایی و بازسازی ماتریکس خارج سلولی دخیل هستند، مشخص می‌شوند. تومورهای CMS4 همچنین دارای چگالی بالایی از فیبروبلاست‌های مرتبط با تومور هستند (۴). مطالعاتی نشان داده‌اند که بقای بیماران در این زیر گروه مولکولی آخر از سه گروه دیگر پایین‌تر است و تومورهایی با فنوتیپ CMS4 تمایل بسیاری به متاستاز دارند. فعالیت

در این کوهورت ۱۲۲ نمونه روده بزرگ که از لحاظ پاتولوژی مورد تأیید بودند به همراه نمونه نرمال مرتبط آنها به صورت تصادفی انتخاب گردیده و جامعه مورد مطالعه را تشکیل دادند. اطلاعات جمعیت شناختی مانند سن، جنس، دارا بودن سابقه‌ی ابتلا به بیماری خاص و همچنین اطلاعات بالینی مانند محل، مرحله و تمایز تومور از پرونده پزشکی بیمار استخراج و ثبت گردید. هیچ کدام از بیماران قبل از عمل وارد هیچ گونه پروسه‌ای از جمله رادیوتراپی و شیمی درمانی نشده بودند.

پروتکل انجام مطالعه به تصویب کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید و با شماره پژوهشی ۹۴۶ و کد اخلاق ۱۳۹۵-۱۳۶ ثبت گردید.

بلوک های پارافینه توسط پاتولوژیست دیده شد و قسمت سرطانی و قسمت نرمال آن مشخص highlight گردید و پس از جداسازی با تیغ، داخل میکروتیوب ریخته شد و جهت استخراج RNA استفاده گردید.

جهت مطالعه بیان ژن در سطح mRNA، RNA کلی سلول ها توسط کیت RNeasy FFPE کمپانی Qiagen از بلوک های پارافینه‌ی بافت توموری و نرمال روده‌ی بزرگ بیماران آدنوکارسینوما استخراج گردید

و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۲% و برای تعیین کمیت، غلظت و OD نمونه‌ها توسط طیف سنجی نوری با استفاده از Nano Drop Spectrophptmeter Technologies, Ter-)

(mo ND1000) در طول موج ۲۶۰ nm اندازه‌گیری شد. لازم به یادآوری است در تمام واکنش‌ها از غلظت‌های مشابهی از RNA نمونه‌های مختلف استفاده شد و عمل (normalizing) RNA adjusting انجام گرفت. سپس DNA مکمل به وسیله کیت شرکت یکتا تجهیز RNeasy FFPE Kit (۷۳۵۰۴) بر اساس دستور

کار از روی نمونه های RNA استخراج شده، ساخته شد. واکنش cDNA سازی در دو میکس که میکس اول حاوی ۷ μl RNA 1 μM (50 μM) پرایمر رندوم هگزامر، ۴/۵ μl DEPS water (آب عاری از آنزیم RNase ساخته شد و واکنش به مدت پنج دقیقه

در دمای ۷۰ C درجه سانتی گراد به منظور باز شدن ساختارهای ثانویه و سهولت اتصال پرایمر انجام شد. بلافاصله نمونه ها به مدت دو دقیقه بر روی یخ قرار گرفتند و سپس مواد میکس دوم که شامل ۴ μl بافر X ۵، ۰/۵ μl RNasin (۴۰ u /μl) (Yekta Tajhiz Azma YT4500)، 1 μl dNTP (10Mm) و 1 μl از

M-MLV به میکس اول اضافه گردید تا به حجم کلی ۲۰ μl برسد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه PCR به منظور ساخت cDNA انجام شد و در نهایت به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا آنزیم غیر فعال شود. در نهایت محصولات واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتی

گراد نگهداری شدند. توالی پرایمرهای Forward: CTGGAA- گراد نگهداری شدند. توالی پرایمرهای

عملکرد CTGF در چسبندگی، تحرک سلول و همچنین نقش آن به عنوان واسطه حرکت ECM در طی بازسازی بافت در شرایط فیزیولوژیکی است (۸).

به عنوان یک پروتئین ترشخی، بسیاری از توابع CTGF در ECM انجام می شود. ECM و دیگر سلول های طبیعی اطراف تومور به طور کلی به عنوان میکرومحیط (Microenvironment) تومور شناخته شده است. CTGF، میکرومحیط تومور را با تغییر رگ زایی (Angiogenesis) و تهاجم به بافت های جدید تغییر می دهد (۱۱).

CTGF به نظر می رسد که نقش مهمی در تعداد زیادی از فرایندهای بیولوژیکی فعال در مراحل مختلف در طول تکامل دارد. CTGF با تکامل تومورها و متاستاز ارتباط مثبت و منفی دارد. به عنوان مثال در حالی که بیان CTGF موجب افزایش کارسینوم سلول های

کبدی و مراحل اولیه کارسینوم کولون می شود، به نظر می رسد که اثر محافظتی در برابر متاستاز در مراحل بعدی سرطان روده بزرگ (CRC) دارد (۸).

در سرطان هایی که بیان CTGF بالاتری نسبت به بافت نرمال دارند، بیان این ژن، مهاجرت را افزایش می دهد. این مورد در گلیوما، سرطان معده، کارسینوم هپاتوسلولار، ملانوم بدخیم و سرطان پانکراس دیده می شود (۱۱).

با توجه به ارتباط قوی بین بیان ژنی CTGF و زیرمجموعه CMS4 سرطان کولورکتال، CTGF می تواند یک هدف مهم برای درمان باشد. بیان بالای CCN2 در CRC در زیر مجموعه CMS4 و نقش تعیین کننده آن در فیبروز بافت، تحقیق بیشتری را برای تعیین ارزش

CTGF به عنوان نشانگر و هدف بالقوه درمانی در سرطان های کولورکتال و در زیر مجموعه مزانشیم مهاجم نیاز دارد (۴).

هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن CTGF در سطح RNA در بافت توموری سرطان روده بزرگ نسبت به بافت نرمال و مشخص کردن ارتباط آن با وضعیت کلینیکی و تاثیر آن در بقای بیماران

است.

## روش کار

این مطالعه یک مطالعه کوهورت گذشته نگر بود که از آرشیو بلوک های جراحی بیمارستان طالقانی و شهدا تهران بین سال های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۷ گرفته شد. معیارهای ورود افراد مورد مطالعه، بیماران ثبت شده در سامانه سرطان کولورکتال بیمارستان طالقانی

و بیمارستان شهدا بودند که مورد جراحی قرار گرفته و اطلاعات کلینیکی و پاتولوژی آنها معتبر و بلوک پاتولوژی جراحی آنها در دسترس بود و امکان پیگیری وضعیت حیات آنها وجود داشت.

معیارهای خروج را بیمارانی که اطلاعات کلینیکی و پاتولوژی آنها معتبر نبود و یا بلوک پاتولوژی جراحی آنها در دسترس نبود و امکان پیگیری وضعیت حیات آنها وجود نداشت، تشکیل دادند.

One-way ANOVA غیر پارامتریک Kruskal-Wallis برای مقایسه بیان ژن در بیش از دو متغیر مورد بررسی استفاده شد. جهت برآورد بقا کلی، رسم منحنی کاپلان مایر از نرم افزار Graphpad Prism ویرایش ۶ صورت گرفت و از تست Long-Rank برای مقایسه گروه های منحنی بقا استفاده شد. در تمام تجزیه و تحلیل ها سطح معنی دار آماری، ۵ درصد در نظر گرفته شد. برای بررسی متغیر های کیفی از آزمون آماری خی دو استفاده شده است.

### یافته‌ها

در این کوهورت گذشته نگر ۱۲۲ نمونه بلوک پارافینه روده بزرگ به همراه بلوک پارافینه نرمال مرتبط و ۲۰ بلوک بافت افراد نرمال به عنوان نمونه کنترل به صورت تصادفی انتخاب گردیده و جامعه مورد مطالعه را تشکیل دادند. اطلاعات جمعیت شناختی مانند سن، جنس، دارا بودن سابقه‌ی ابتلا به بیماری خاص و همچنین اطلاعات بالینی مانند محل، مرحله و تمایز تومور از پرونده پزشکی استخراج و ثبت گردید. اطلاعات ذکر شده در جدول ۱ بیان شده است.

جدول ۱: مشخصات دموگرافی و بالینی ۱۲۲ بیمار مورد مطالعه

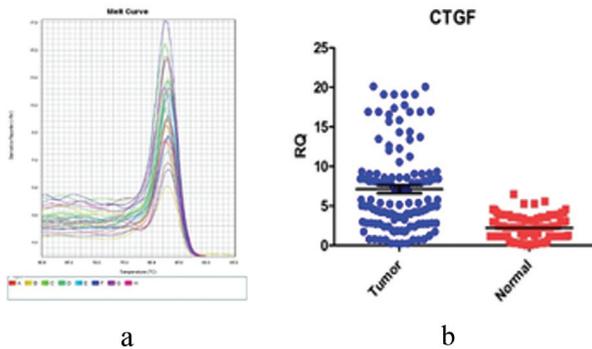
مشخصه دموگرافیک	انواع	تعداد(درصد)
جنس	مرد	۷۷ (۶۳/۱)
	زن	۴۵ (۳۶/۹)
سن	< ۶۰	۵۵ (۴۵/۱)
	≥ ۶۰	۶۷ (۵۴/۹)
محل	کولون راست	۳۱ (۲۵/۴)
	کولون چپ	۹۱ (۷۴/۶)
مرحله بندی تومور	I	۲۳ (۱۸/۹)
	II	۴۷ (۳۸/۵)
	III	۴۱ (۳۳/۶)
	IV	۱۱ (۹/۰)
تمایز	Poor	۱۷ (۱۳/۹۳)
	Moderate	۷۰ (۵۷/۴۰)
	Well	۳۵ (۲۸/۶۷)
اندازه تومور	≤ ۳	۹۳ (۷۶/۲)
	> ۳	۲۹ (۲۳/۸)
متاستاز به گره لنفی	بله	۷۴ (۶۰/۷)
	خیر	۴۸ (۳۹/۳)
شرایط حیاتی	زنده	۸۳ (۶۸/۰)
	فوت	۳۹ (۳۲/۰)
کموترابی	بله	۹۷ (۷۹/۵)
	خیر	۲۵ (۲۰/۵)
سابقه فامیلی	بله	۴۱ (۳۳/۶)
	خیر	۸۱ (۶۶/۴)
متاستاز	بله	۵۲ (۴۲/۶)
	خیر	۷۰ (۵۷/۴)
عود	بله	۲۸ (۲۳/۰)
	خیر	۹۴ (۷۷/۰)

Reverse: 5'-CGG-' و 'GAGAACATTAAGAAGGGC-3'-5' TATGTCTTCATGCTGGTGC-3 برای ژن CTGF با طول قطعه ۱۰۴ bp و ژن  $\beta$ -catenin با توالی پرایمرهای Forward: 5'-ATGTGGCCGAGGACTTTGATT-3 و Reverse: 5'-AGTGGGGTGGcTTTTAGGATG-3' با طول باند 110 bp توسط شرکت Tag Copenhagen طراحی گردید.

پس از آن به منظور انجام واکنش Realtime PCR از پلیت‌های Applied biosystem، ABI 7500 Sequence Detection System و روش SYBR Green بنا بر دستور کار کیت شرکت (SYBR Green Kit) Yekta Tajhiz Azma (YT2551) استفاده شد. در مطالعه حاضر به منظور بررسی و مقایسه میزان بیان ژن CTGF با بافت نرمال از روش Relative quantification استفاده شده است که در مطالعات بیان ژن مناسب‌ترین روش برای سنجش و مقایسه به‌شمار می‌آید. در این بررسی، روش Real time همراه با نرمالیزاسیون انجام گرفت. استفاده از ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی و نمونه‌های بافت نرمال به منظور کالیبراسیون، از بروز خطا در متد آنالیزی پژوهش به طور چشمگیری کاسته و کنترل داخلی مانع از موارد منفی کاذب در آزمایش می‌شود.

واکنش نمونه‌های مورد نظر طی مرحله ۴۰ چرخه و هر سیکل دارای ۳ مرحله به صورت زیر انجام پذیرفت. مرحله فعال‌سازی (Activation) در درمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و سپس دو رشته در مرحله (Denaturation) و دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ ثانیه از هم جدا شدند و در پایان مرحله اتصال پرایمرها (Primer annealing) و طول‌سازی (Extension) در دمای  $58^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۴ ثانیه انجام شد.

در مطالعه حاضر به منظور بررسی کیفیت و کارآمدی پرایمرها از نرم افزار Linreg استفاده شد. برای آنالیز میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه از Applied Biosystems 7500 Real - Time PCR استفاده شد. همچنین میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به بافت نرمال با متد Fold change یا ۲- مورد بررسی قرار گرفته و جهت آنالیز آماری از نرم افزار GraphPad Prism ویرایش ۶ استفاده شد. میزان تغییرات بیان ژن هدف در سرطان روده بزرگ با بیان ژن کنترل داخلی نرمال شده و با میزان تغییرات بیان ژن‌ها در نمونه کنترل یا کالیبراتور به صورت نسبی بررسی شده است. در واقع ارتباط معنا دار میان گروه‌های سرطان روده بزرگ با نمونه کنترل توسط مقادیر RQ مورد سنجش قرار گرفته است. بدین صورت که  $RQ < 0.5$  بیانگر کاهش بیان ژن و  $RQ > 2$  افزایش بیان ژن و همچنین  $RQ > 0.5$  نشان می‌دهد که تغییرات در بیان آن ژن نسبت به نمونه کنترل به صورت نرمال بوده و تغییری نداشته است. از t-test غیرپارامتریک Mann Whitney برای مقایسه بیان ژن در دو متغیر متفاوت، از t-test غیر پارامتریک Paired t-test برای مقایسه بیان ژن میان نمونه تومور و بافت نرمال بیمار و از تست



شکل ۱: a: منحنی ذوب ژن CTGF، b: بیان ژن CTGF در نمونه های تومور و نرمال بیمار

سنگفرشی زبان و سرطان مری نسبت به گروه کنترل طبیعی گزارش شد (۲۸-۳۰ و ۲۱).

در مطالعه حاضر، بیان ژن CTGF نسبت به فاکتورهای بالینی بررسی شد. نتایج به دست آمده در مورد ارتباط ژن CTGF با تومور در سرطان کولورکتال همراستا با مطالعات Guo و همکاران و Lad-wa و همکاران می باشد که ارتباط معنادار میان افزایش بیان ژن CTGF با Stage های پیشرفته و متاستاز گره های لنفاوی در سرطان کولورکتال را گزارش کردند (۱۵، ۱۲). همچنین ارتباط معنادار میان افزایش بیان ژن CTGF با تومورزایی و متاستاز توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز گزارش شد (۳۱). اگرچه نتایج عکس توسط Lin و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش شد که کاهش بیان ژن CTGF ارتباط معنادار با متاستاز گره های لنفاوی، عود مجدد بیماری و Stage بیماری داشت (۳۲).

این تناقض در سرطان های دیگر نیز مشاهده شده است. بطوری که افزایش بیان این ژن با پیشرفت تومور، متاستاز گره های لنفاوی و متاستاز به ارگان های دیگر در سرطان ها همراه بوده است (۲۴، ۲۶، ۲۷، ۳۳). در حالی که در مطالعات دیگر ارتباط معنادار میان کاهش بیان ژن CTGF با متاستاز گره های لنفاوی، Stage، عود مجدد تومور و تهاجم عروقی در سرطان های مختلف مشاهده شده است (۲۱، ۳۰، ۳۱، ۳۴).

در مطالعه حاضر ارتباط معناداری میان بیان ژن CTGF و بقای کلی بیماران مشاهده شد که افزایش بیان این ژن با بقای کوتاه تر در بیماران همراه بود. اگر چه نتایج متفاوت با مطالعه حاضر در سرطان کولورکتال توسط Lin و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش شد که کاهش بیان این ژن با بقا ضعیف همراه بود (۳۲). اما مطالعات دیگری که بر روی سرطان کولورکتال صورت گرفته، نشان دهنده ارتباط معنادار میان افزایش بیان ژن CTGF با بقای ضعیف در بیماران است (۳۷-۳۵ و ۱۳). این تناقض در سرطان های دیگر نیز مشاهده می شود، همانطور که کاهش بیان ژن CTGF با بقا ضعیف در سرطان های ریه و تخمدان همراه بود (۲۱، ۲۸، ۳۸). در حالی که

در این مطالعه به منظور بررسی تغییرات میزان بیان ژن CTGF در نواحی مختلف روده در سرطان روده بزرگ از روش Fold change استفاده شده است. به منظور حصول اطمینان از حضور پیک های غیراختصاصی پرایمر CTGF از تکنیک Melt curve analysis استفاده شد. منحنی نقطه ذوب در شکل ۱-a نشان داده شده است. میزان تغییرات بیان ژن CTGF در نمونه های توموری و نرمال شکل ۱-b نشان داده شده است. بر اساس شکل ۱-b در نمونه های بافت توموری افزایش بیان ژن CTGF نسبت به بافت نرمال مشاهده شد (افزایش بیان بیشتر از ۲ برابر بافت نرمال) که این افزایش بیان در گروه تومور به طور معنادار و چشمگیری بیشتر از گروه نرمال بوده است ( $p < 0.0001$ ).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن CTGF نسبت به فاکتورهای بالینی نشان داده است که میزان تغییرات بیان ژن با موقعیت تومور ( $p=0.0035$ )، درجه تومور ( $p=0.0002$ )، مرحله تومور ( $p<0.0001$ )، متاستاز گره های لنفاوی ( $p=0.0055$ )، متاستاز تومور ( $p=0.0442$ ) از لحاظ بالینی معنادار بوده ولی نسبت به سایر تومور معنادار نبوده است ( $p=0.0702$ ). جدول ۲ نتایج کلی بررسی بیان ژن با معیارهای بالینی را نشان می دهد. شکل ۲ تحلیل نتایج را به صورت گراف نشان می دهد.

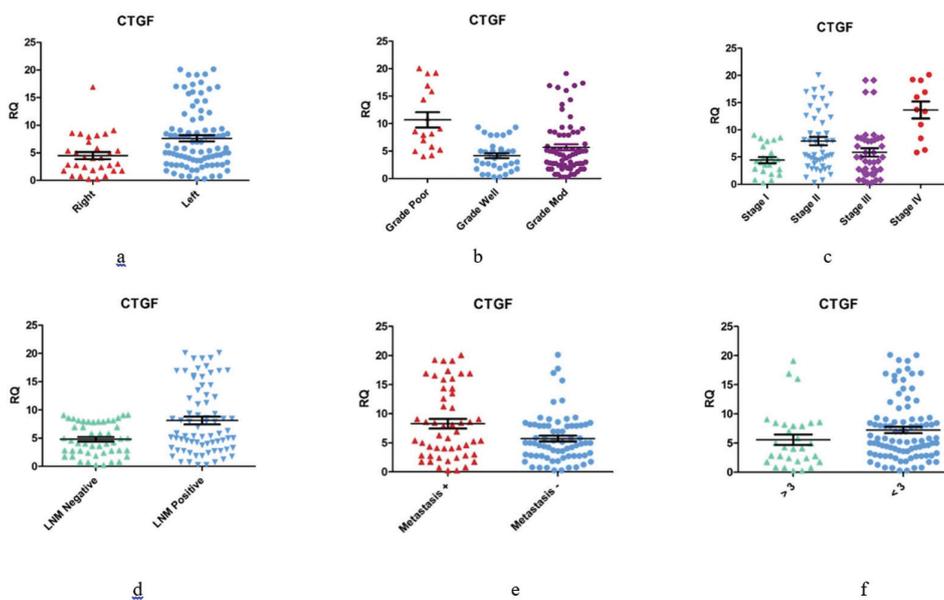
همچنین میان بیان ژن CTGF و بقا کلی بیماران ( $p=0.01$ ) از لحاظ آماری ارتباط معنادار مشاهده شد و افزایش بیان ژن CTGF با بقای ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ همراه بود (شکل ۳).

## بحث

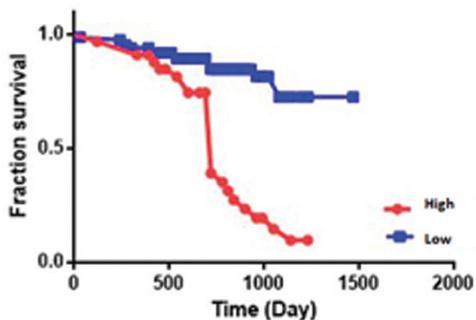
در مطالعه حاضر فرض گردید که بررسی میزان تغییرات بیان ژن CTGF در سطح mRNA در سرطان کولورکتال، می تواند فاکتور مناسبی جهت پیش آگهی در این سرطان باشد. بنابراین میزان تغییرات بیان ژن CTGF در نمونه های سرطانی و گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. بر پایه نتایج موجود در مطالعه انجام شده، در نمونه های بافت توموری افزایش بیان ژن CTGF نسبت به بافت نرمال بیماران مشاهده شد که این افزایش بیان در گروه تومور به طور معنادار و چشمگیری بیشتر از گروه کنترل طبیعی بود. بنابراین شاید بتوان از آن به عنوان یک مارکر پیش آگهی دهنده در این سرطان استفاده کرد. مطالعات دیگر که به منظور بررسی بیان ژن CTGF در سرطان کولورکتال انجام شده، از نتایج این مطالعه حمایت می کنند که سطح بیان ژن CTGF در نمونه های توموری افزایش پیدا می کند (۱۵-۱۲). افزایش قابل توجه بیان ژن CTGF در سرطان دیگر از جمله سرطان های پانکراس (۱۶، ۱۷)، سرطان پروستات (۱۸)، سرطان کیسه صفرا (۱۹، ۲۰)، سرطان پستان (۲۱)، کارسینوم پاییلاری تیروئید (۲۲)، ملانوما (۲۳، ۲۴)، استئوسارکوما (۲۵)، کارسینوم سنگفرشی زبان (۲۶) و سرطان آندومتر (۲۷) مشاهده شده است. اگر چه در مطالعاتی نیز، کاهش بیان ژن CTGF در سلول های سرطانی ریه، کارسینوم

جدول ۲: بررسی بیان ژن CTGF با فاکتورهای بالینی به وسیله نرم افزار Prism

Clinical		Number of value	Mean RQ	Std.Deviation	Std.Error	P value
Size	>3	30	5.571	4.907	0.8959	0.0702
	<3	92	7.240	5.217	0.5439	
Location	Right	31	4.504	3.585	0.6438	0.0035
	Left	91	7.619	5.406	0.5667	
Grade	Poor	17	10.69	5.693	1.381	0.0002
	Well	35	4.180	2.695	0.4555	
	Mod	70	5.681	4.751	0.5679	
Stage	I	23	4.456	2.688	0.5605	<0.0001
	II	47	7.954	5.307	0.7741	
	III	41	5.856	4.935	0.7707	
	IV	11	13.65	5.182	1.562	
Lymphnode metastasis	Negative	48	4.810	2.844	0.4105	0.0055
	Positive	74	8.140	5.893	0.6851	
Metastasis	Yes	52	8.282	6.053	0.8394	0.0442
	No	70	5.747	4.136	0.4943	



شکل ۲: نمودار های نقطه ای حاصل از آنالیز بیان ژن CTGF با فاکتورهای بالینی (a: موقعیت تومور، b: درجه تومور، c: مرحله تومور، d: متاستاز گره های لنفاوی، e: متاستاز تومور، f: سایز تومور)



a

بیان ژن CTGF			
Long Rank Test	No.	No of Event	P Value
High	34	24	0.01
Low	88	15	
95% CI of ratio	4.36-19.02		
Median survival (Day)	930		

b

شکل ۳: بررسی بیان ژن CTGF با بقای کلی بیماران به وسیله نرم افزار Prism (a) نمودار بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال براساس بیان بالا و پایین ژن CTGF، b: جدول ارتباط بیان ژن CTGF با بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال توسط تست Long Rank

می‌توان از سطح بیان این ژن به عنوان یک بیومارکر در سرطان کولورکتال استفاده کرد. در پایان این مطالعه پیشنهاد می‌گردد که با استفاده انتخابی از این نشانگر می‌توان با انجام یک تقسیم‌بندی مولکولی که نشانگرهای ژنتیکی در آن دخیل هستند، تومورهای کولورکتال را به گروه‌های مختلفی که از لحاظ بقاء و دیگر معیارهای بالینی متفاوت هستند، تقسیم بندی کرد.

در سرطان آندومتر ارتباط معنادار میان افزایش بیان این ژن با بقاء ضعیف گزارش شده است (۲۷).

## نتیجه گیری

با توجه به یافته‌های این مطالعه و ارتباط سطح mRNA ژن CTGF با فاکتورهای بالینی مانند موقعیت تومور، اندازه تومور، درجه تومور، مرحله تومور، متاستاز گره‌های لنفاوی، متاستاز تومور و میزان بقاء

## منابع

- Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005;365(9454):153-65.
- Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(1):17-24.
- Vrieling A, Kampman E. The role of body mass index, physical activity, and diet in colorectal cancer recurrence and survival: a review of the literature. *Am J Clin Nutr* 2010;92(3):471-90.
- Ubink I, Verhaar ER, Kranenburg O, Goldschmeding R. A potential role for CCN2/CTGF in aggressive colorectal cancer. *J Cell Commun Signal* 2016;10(3):223-227.
- Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007;39(3):305-18.
- Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract* 2015;211(8):557-69.
- Seoane J, Gomis RR. TGF- $\beta$  Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9(12):a022277.
- Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA, Nguyen TQ, Arcolino FO, van den Heuvel L, et al. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biol* 2018;68-69:44-66.
- Vervoort SJ, Lourenço AR, Tufegdžić Vidaković A, Mocholi E, Sandoval JL, Rueda OM, et al. SOX4 can redirect TGF- $\beta$ -mediated SMAD3-transcriptional output in a context-dependent manner to promote tumorigenesis. *Nucleic Acids Res* 2018;46(18):9578-9590.
- Samanta D, Datta PK. Alterations in the Smad pathway in human cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:1281-93.
- Wells JE, Howlett M, Cole CH, Kees UR. Deregulated expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is linked to poor outcome in human cancer. *Int J Cancer* 2015;137(3):504-11.
- Guo Y, Li X, Lin C, Zhang Y, Hu G, Zhou J, et al. MicroRNA 133b inhibits connective tissue growth factor in colorectal cancer and correlates with the clinical stage of the disease. *Mol Med Rep* 2015;11(4):2805-12.
- Zhang SD, McCrudden CM, Yuen HF, Leung KL, Hong WJ, Kwok HF. Association between the expression levels of TAZ, AXL and CTGF and clinicopathological parameters in patients with colon cancer. *Oncol Lett* 2016;11(2):1223-1229.
- Lun W, Wu X, Deng Q, Zhi F. MiR-218 regulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via targeting CTGF. *Cancer Cell Int* 2018;18:83.
- Ladwa R, Pringle H, Kumar R, West K. Expression of CTGF and Cyr61 in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2011;64(1):58-64.
- Wenger C, Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Menke A, Ham-eister H, et al. Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1999;18(4):1073-80.
- Bennewith KL, Huang X, Ham CM, Graves EE, Erlner JT, Kam-bham N, et al. The role of tumor cell-derived connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in pancreatic tumor growth. *Cancer Res* 2009;69(3):775-84.
- Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD, Rowley DR. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65(19):8887-95.
- Alvarez H, Corvalan A, Roa JC, Argani P, Murillo F, Edwards J, et al. Serial analysis of gene expression identifies connective tissue growth factor expression as a prognostic biomarker in gallbladder cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(9):2631-8.
- Garcia P, Leal P, Alvarez H, Brebi P, Ili C, Tapia O, et al. Connective tissue growth factor immunohistochemical expression is associated with gallbladder cancer progression. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137(2):245-50.
- Chien W, O'Kelly J, Lu D, Leiter A, Sohn J, Yin D, et al. Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *Int J Oncol* 2011;38(6):1741-7.
- Cui L, Zhang Q, Mao Z, Chen J, Wang X, Qu J, et al. CTGF is overexpressed in papillary thyroid carcinoma and promotes the growth of papillary thyroid cancer cells. *Tumour Biol* 2011;32(4):721-8.
- Braig S, Wallner S, Junglas B, Fuchshofer R, Bosserhoff AK. CTGF is overexpressed in malignant melanoma and promotes cell invasion and migration. *Br J Cancer* 2011;105(2):231-8.
- Finger EC, Cheng CF, Williams TR, Rankin EB, Bedogni B, Tachiki L, et al. CTGF is a therapeutic target for metastatic melanoma. *Oncogene* 2014;33(9):1093-100.
- Tsai HC, Huang CY, Su HL, Tang CH. CTGF increases drug resistance to paclitaxel by upregulating survivin expression in human osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(5):846-54.
- Wu YL, Li HY, Zhao XP, Jiao JY, Tang DX, Yan LJ, et al. Mesenchymal stem cell-derived CCN2 promotes the proliferation, migration and invasion of human tongue squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2017;108(5):897-909.
- Dou J, Wang T, Wang X, Zhang Y. Correlation between over-expression of connective tissue growth factor, tumor progression, and clinical prognosis in endometrial cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(4):2100-2105.
- Chen PP, Li WJ, Wang Y, Zhao S, Li DY, Feng LY, et al. Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PLoS One* 2007;2(6):e534.
- Moritani NH, Kubota S, Nishida T, Kawaki H, Kondo S, Sugahara T, et al. Suppressive effect of overexpressed connective tissue growth factor on tumor cell growth in a human oral squamous cell carcinoma-derived cell line. *Cancer Lett* 2003;192(2):205-14.
- Zhen Y, Ye Y, Yu X, Mai C, Zhou Y, Chen Y, et al. Reduced CTGF expression promotes cell growth, migration, and invasion in naso-

pharyngeal carcinoma. PLoS One 2013;8(6):e64976.

31. Kim SK, Kim SY, Kim JH, Roh SA, Cho DH, Kim YS, et al. A nineteen gene-based risk score classifier predicts prognosis of colorectal cancer patients. Mol Oncol 2014;8(8):1653-66.

32. Lin BR, Chang CC, Che TF, Chen ST, Chen RJ, Yang CY, et al. Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer. Gastroenterology 2005;128(1):9-23.

33. Wang GB, Zhou XY, Yuan T, Xie J, Guo LP, Gao N, et al. Significance of serum connective tissue growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and relationship with angiogenesis. World J Surg 2010;34(10):2411-7.

34. Gardini A, Corti B, Fiorentino M, Altimari A, Ercolani G, Grazi GL, et al. Expression of connective tissue growth factor is a prognostic marker for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. Dig Liver Dis 2005;37(4):269-74.

35. Yuen HF, McCrudden CM, Huang YH, Tham JM, Zhang X, Zeng Q, et al. TAZ expression as a prognostic indicator in colorectal cancer. PLoS One 2013;8(1):e54211.

36. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Song C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med 2015;21(11):1350-6.

37. Yokota M, Kojima M, Higuchi Y, Nishizawa Y, Kobayashi A, Ito M, et al. Gene expression profile in the activation of subperitoneal fibroblasts reflects prognosis of patients with colon cancer. Int J Cancer 2016;138(6):1422-31.

38. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, et al. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. Cancer Res 2007;67(15):7095-105.