

مقاله پژوهشی

تعیین سطح بیان ژن fgf-9 در نمونه‌های سرمی بیماران مبتلا به سرطان ریه

فاطمه سادات علوی مقدم^۱، مهرداد هاشمی^{۲*}، الهام سیاسی^۳

^۱ گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
^۲ دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۳ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

* Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷

چکیده

سابقه و هدف: سرطان ریه یکی از علل عمده مرگ و میر ناشی از سرطان است. فعال‌سازی سیگنال‌های fgf از جمله fgf-9 در بیماری‌زایی چندین سرطان، از جمله سرطان ریه نقش دارد. همچنین fgf-9 ممکن است یک شاخص برای پیش‌آگهی باشد و با میزان بقا در بیماران مبتلا به NSCLC مرتبط است. بنابراین در این تحقیق میزان بیان ژن fgf-9 در سرم افراد مبتلا به سرطان ریه بررسی گردید.

روش بررسی: در این تحقیق، ۵۰ نمونه سرم افراد سالم و ۵۰ نمونه سرم افراد مبتلا به NSCLC از مراجعین به بیمارستان مسیح دانشوری تهران تهیه و توسط پرسشنامه‌هایی، اطلاعات فردی و کلینیکوپاتولوژیکی افراد مورد مطالعه جمع‌آوری شد. سپس جداسازی پلاسما، استخراج RNA، سنتز cDNA، طراحی پرایمرها انجام و میزان تغییرات بیان fgf-9 در سرم افراد سالم و مبتلا به سرطان ریه توسط روش Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای آنالیز نتایج از نرم‌افزار REST استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه در سرم افراد مبتلا به مراحل اول تا سوم متاستاز، بیان ژن fgf-9 اختلاف معنی‌داری نداشت اما در سرم افراد مبتلا به مرحله چهارم متاستاز، میزان بیان ژن fgf-9 به مقدار ۴/۴۶ برابر نسبت به نمونه‌های نرمال کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، در صورت تایید این نتایج در نمونه‌های بیشتر، احتمالاً درآینده می‌توان از بررسی میزان بیان ژن fgf-9 موجود در سرم افراد، برای پیش‌بینی مرحله متاستاز سرطان ریه استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: سرطان ریه، سرم، متاستاز، ژن fgf-9.

مقدمه

ژن $fgf-9^3$ ، ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی شماره ۹ بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۳ (13q12.11) قرار دارد. [۲۳]

$fgf-9$ یکی از اعضای خانواده فاکتور رشد فیبروبلاستی $(fgf)^4$ است. فاکتورهای رشد فیبروبلاستی یک گروه از فاکتورهای رشد پپتیدی چند منظوره هستند. فعال‌سازی غیر طبیعی مسیرهای سیگنالینگ فاکتور رشد فیبروبلاستی برای هومئوستازی بافت، ترمیم، آنژیوژنز و ارگانوژنز مورد نیاز است و همچنین در سرطان‌زایی نیز دخالت دارد که نشان دهنده نقش بالقوه آن به عنوان یک هدف برای مداخله درمانی است. بیان نادرست $fgf-9$ در تومورهای مختلفی مانند سینه، پروستات و سرطان ریه شناسایی شده است که نشان دهنده نقش بیومارکری آن در سرطان‌های مختلف است. [۲۲، ۸]

به دلیل اینکه تقریباً ۴۰٪ از NSCLCها در مرحله پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند و نرخ بقا کلی، تقریباً ۱۵٪ در ۵ سال است. همچنین با توجه به بالا بودن میزان ابتلا و میزان عود بیماری، بررسی بیشتر تغییرات کلیدی مولکولی در NSCLC، برای تشخیص به موقع و پیش آگهی پیش‌بینی شده است. [۱۲] با توجه به قابلیت تشخیص بیان ژن‌ها در سرم و از آنجایی که نمونه‌های سرم به دلیل دسترسی آسان به آن‌ها، برای مطالعات بیومارکر مفید می‌باشند، بنابراین در این مطالعه، میزان بیان ژن $fgf-9$ در سرم بیماران مبتلا به سرطان ریه اندازه‌گیری گردید.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه، از مراجعین به بیمارستان مسیح دانشوری تهران، ۵۰ نمونه سرم افراد سالم و ۵۰ نمونه سرم افراد مبتلا به NSCLC تهیه گردید و ابتدا از آن‌ها برای ورود به مطالعه حاضر، رضایت نامه اخذ گردید. نمونه‌گیری به صورت تصادفی انجام و نمونه‌های بیمار از تمام مراحل بیماری (مراحل اول تا چهارم سرطان) تهیه شدند. سپس میزان بیان ژن $fgf-9$ در سرم افراد سالم و سرم افراد مبتلا به

سرطان ریه به عنوان نتیجه‌ای از انباشت چندین تغییر ژنتیکی سوماتیکی (۱۰ تا ۲۰ جهش) است که شامل ژن‌های حیاتی هستند و محصولات پروتئینی آن‌ها، تکثیر، تمایز و آپوپتوز را کنترل می‌کنند. این ژن‌ها شامل پروتو آنکوژن‌ها (تنظیم کننده‌های رشد مثبت)، ژن‌های سرکوب کننده تومور (تنظیم کننده‌های رشد منفی) و ژن‌های درگیر در کنترل آپوپتوز هستند. [۱۸]

سرطان ریه علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان است و میزان بروز آن در مردان و زنان سراسر جهان بالاست. بطوریکه تعداد موارد جدید تشخیص داده شده در سراسر جهان، ۱/۸ میلیون مورد و تعداد موارد مرگ و میر، ۱/۶ میلیون مورد مرگ می‌باشد. [۱۵، ۴] با توجه به آمارهای موجود، میزان بروز سرطان ریه به طور پیوسته در زنان و مردان ایرانی افزایش یافته است. مطالعات نشان دادند که میزان بروز آن در مردان ایرانی ۶/۳۳ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد که در مقایسه با کشورهای توسعه یافته، کم است و میزان بروز آن در زنان ایرانی ۲/۵۷ در هر ۱۰۰۰۰۰ است که نسبت به مردان، کمتر است. [۴]

از لحاظ بافت شناسی، ۸۵٪ از سرطان‌های ریه، شامل سرطان‌های سلول غیر کوچک ریه^۱ (NSCLCs) و ۱۵٪ از آن‌ها شامل سرطان‌های سلول کوچک ریه^۲ (SCLCs) می‌شوند. SCLCها به طور مکرر متاستاز می‌دهند. [۱۶، ۳] NSCLC، ناهمگونی مولکولی قابل توجهی دارد. انواع اصلی NSCLC عبارتند از: ۱- آدنوکارسینوما که ۳۲٪-۴۰٪ از سرطان‌های ریه را تشکیل می‌دهند ۲- کارسینوم سلول‌های سنگفرشی که ۳۰٪-۲۵٪ از سرطان‌های ریه را تشکیل می‌دهند و کارسینوم سلول بزرگ که ۱۶٪-۸٪ از سرطان‌های ریه را تشکیل می‌دهند. [۲۴، ۲۵، ۹]

بیشتر موارد سرطان ریه به علت توتون و تنباکو یا محصول دیگری که نیکوتین دارد، ایجاد می‌شوند. در افراد سیگاری در مقایسه با افراد غیر سیگاری، خطر ابتلا به سرطان ریه، ۲۰ برابر افزایش می‌یابد. [۷، ۱]

³ fibroblast growth factor 9

⁴ fibroblast growth factor

¹ Non small cell lung cancers

² small cell lung cancers

طراحی گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه، House keeping Gene، ژن U6 بود.

بررسی کارایی پرایمرها و انجام واکنش Real time PCR
کارایی پرایمرهای طراحی شده، تعیین گردیده و منحنی استاندارد برای هر کدام از پرایمرها رسم گردید. برای این کار، ابتدا از cDNA های ساخته شده پنج رقت تهیه گردید. سپس واکنش Real time PCR (BIONEER) - کره جنوبی) به صورت دو بار تکرار، برای این رقت‌ها همراه با هر کدام از پرایمرها به صورت جداگانه، انجام شد. در پایان، منحنی استاندارد برای هر پرایمر، بر اساس مقادیر Ct به دست آمده در مقابل رقت‌های مورد استفاده رسم گردید. با استفاده از شیب خط منحنی به دست آمده (Slope) و رابطه $E=10^{(-1/\text{slope})}$ ، بازده واکنش (E) برای هر پرایمر محاسبه شد.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در Real Time PCR

Primer name	Sequence	Amplicon
fgf-9 F	5'- CTTTGCTTAGAATATCCTTA -3'	132 bp
fgf-9 R	5'- AGTGACCACCTGGGTCAGTCC -3'	132 bp
U6 F	5'-GCTTCGGCAGCACATATAC-3'	137 bp
U6 r	5'-ATTCCGTTTCTGGGAGGG-3'	137 bp

اندازه‌گیری میزان بیان ژن fgf-9 با تکثیر توسط واکنش Real time PCR، بر اساس روش استاندارد و به صورت نسبی انجام شد. تعیین کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله‌ی اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه‌ی اتصال رنگ Eva Green با استفاده از دستگاه ExicyclerTM 96 bioneer (کره جنوبی) نوع ثابت انجام گرفت. اجزای واکنش برای هر نمونه مطابق پروتکل کیت Eva Green (Universal RT microRNA qPCR Kit Master Mix 10 μ l، cDNA (20 ng/ μ l) 5 μ l، Sterilized 3 μ l و specific primers (10 pmol) (distilled water) ساخته شده توسط Exiqon - دانمارک، به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه و با برنامه حرارتی یکسان برای تکثیر ژن fgf-9 و ژن مرجع، در دستگاه قرار داده شدند. هر سیکل واکنش شامل چهار مرحله‌ی انکوبه ۱-

سرطان ریه به صورت کمی مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه به صورت توصیفی-تحلیلی انجام گرفت.

طراحی پرسشنامه

بعد از اخذ رضایت نامه از افراد برای ورود به تحقیق حاضر، برای ثبت اطلاعات فردی و کلینیکی پاتولوژیکی، پرسشنامه ای طراحی و اطلاعاتی شامل نام و نام خانوادگی، تاریخ مراجعه، سن، جنس، شغل، مصرف دخانیات (نوع و مدت)، مدت بیماری، محل سکونت، نوع تومور، مرحله تومور، سابقه خانوادگی بیمار، سابقه بیماری دیگر، تومور اولیه و تومور پس از درمان در آن ثبت گردید.

خون‌گیری

خون‌گیری از افراد بیمار و کنترل توسط مسئول خون‌گیری آزمایشگاه بیمارستان مسیح دانشوری انجام گرفت و مقدار ۵ml خون گرفته شده از افراد در لوله ضد انعقاد EDTA ریخته شد.

جداسازی پلاسما

پلاسمای خون با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار (HANIL - کره جنوبی) در دمای ۴ °C به مدت زمان ۱۵ دقیقه با دور ۱۹۰۰rpm جداسازی و در میکروتیوب‌های RNase free ریخته و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۸۰ °C - (JAL-ایران) نگهداری شد.

استخراج miRNA از پلاسما، بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده، سنتز cDNA

برای بررسی بیان ژن، RNA از پلاسما طبق پروتکل کیت کپاژن آلمان (Qiagen) استخراج گردید. پس از استخراج RNA، برای بررسی کمی و کیفی آن به ترتیب از روش اسپکتروفتومتری (آمریکا، ThermoFisher) و الکتروفورز ژل آگاروز (ایران-Padideh Nojen pars) استفاده شد. سپس cDNA (DNA مکمل) از روی نمونه‌های RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Thermo Scientific) سنتز شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از سایت NCBI و نرم‌افزار Allele ID

آمد. نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰، خلوص اسیدهای نوکلئیک استخراجی را نشان می‌دهد. در تحقیق ما نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ بود. شکل ۲ بررسی کمیت RNAهای استخراج شده توسط دستگاه نانو دراپ را نشان می‌دهد.

نتایج بررسی میزان کارایی پرایمرها

برای محاسبه میزان کارایی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، از روش رقت‌سازی cDNA نمونه‌ها استفاده شد. نتایج در نمودار ۱ آورده شده است.

نتایج بررسی و تایید سنتز cDNA و انجام Conventional PCR

بعد از بررسی و تعیین کارایی پرایمرهای استفاده شده در تحقیق حاضر، از روش conventional PCR (چین- BIOERE) استفاده شد و اختصاصیت آن‌ها تایید گردید. شکل ۲ نتایج مربوط به تایید اختصاصیت پرایمرها را برای برخی از نمونه‌ها نشان داده است.

نتایج بیان ژن fgf-9 با روش Real time PCR

بعد از انجام Conventional PCR و مشاهده باندهای مورد نظر که اختصاصیت پرایمر را نشان داد از روش qRT-PCR استفاده شد و بیان ژن fgf-9 بررسی گردید. این تست برای هر نمونه به صورت سه بار تکرار انجام شد. برای آنالیز نتایج از نرم افزار REST استفاده شد.

۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲-۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۳-۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴-۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. پس از انجام واکنش، میزان بیان با روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار REST، محاسبه آماری انجام شد. در روش Real time PCR گروه کنترل شامل دو گروه بود: ۱- U6 که لاین سلولی رفرنس می‌باشد و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته می‌شود، یعنی افرادی که مبتلا به سرطان ریه هستند. ۲- کنترل منفی، یعنی افراد سالمی که سرطان ریه ندارند.

یافته‌ها

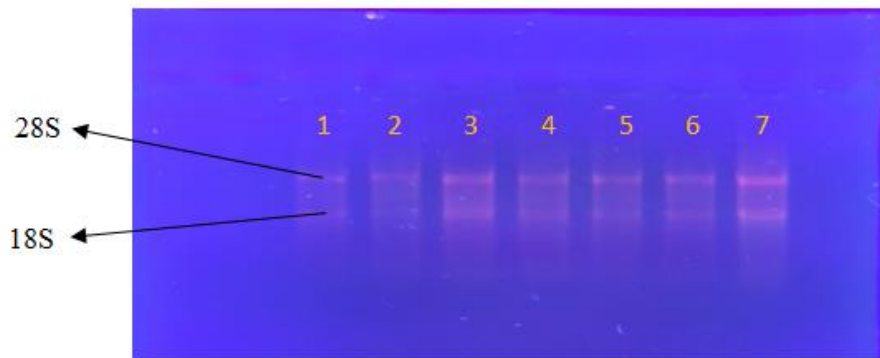
اطلاعات بیماران: از سامانه الکترونیکی بخش سرطان بیمارستان اطلاعات دموگرافی و بالینی بیماران استخراج گردید. در جدول ۲ اطلاعات دموگرافی بیماران نشان داده شده است.

نتایج استخراج RNA و تعیین کمیت و کیفیت آن

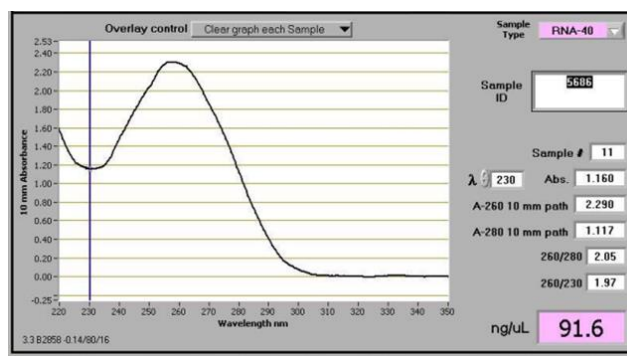
کیفیت RNAهای استخراج شده از سرم خون با روش الکتروفورز ژل آگاروز بررسی و حضور باندهای 18S و 28S ریبوزومی برای تعدادی از نمونه‌ها در شکل ۱ نشان داد، RNAهای استخراج شده کیفیت مناسبی داشتند. برای بررسی کمیت RNAهای استخراج شده، محاسبه نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ توسط دستگاه نانو دراپ (اسپکتروفتومتر) صورت گرفت و غلظت RNA بدست

جدول ۲: اطلاعات دموگرافی بیماران

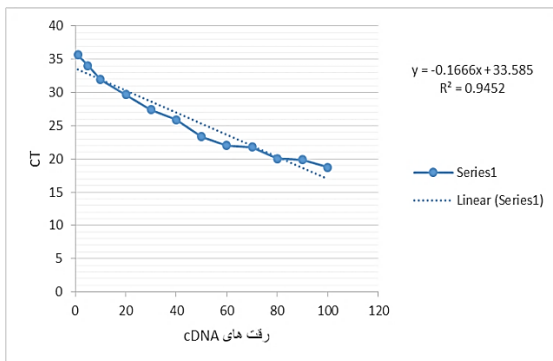
مشخصات	متغیر	فراوانی (درصد)
جنس	مرد	۳۵ نفر مرد (۷۰٪)
	زن	۱۵ نفر (۳۰٪)
مصرف دخانیات	مصرف کننده	۳۶ نفر (۷۲٪)
	عدم مصرف	۱۴ نفر (۲۸٪)
سابقه ابتلا به سرطان در خانواده	دارد	۲۲ نفر (۴۴٪)
	ندارد	۲۸ نفر (۵۶٪)
سن	۶۱-۷۰ سال	۲۳ نفر (۴۶٪)



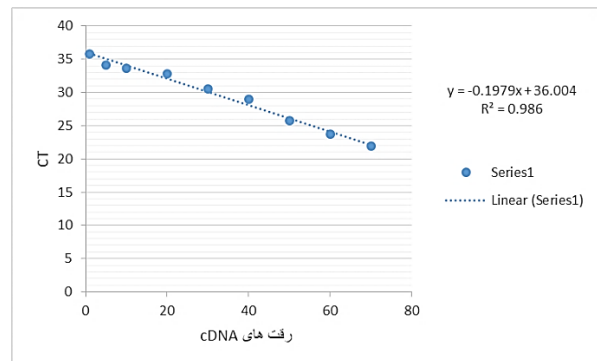
شکل ۱: الکتروفورز ژل آگاروز برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، شماره ۱-۶: نمونه ها، شماره ۷: مارکر



شکل ۲: استفاده از نانودراپ برای بررسی کمیت RNA استخراج شده



کارایی پرایمر اختصاصی ژن U6: ۹۴%

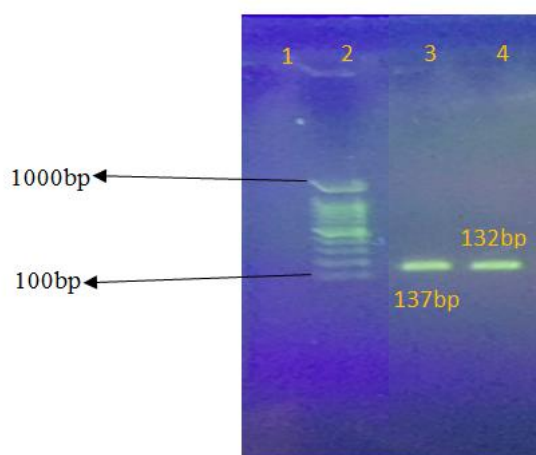


کارایی پرایمر اختصاصی ژن fgf-9: ۹۸%

نمودار ۱: بررسی کارایی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده ژن fgf-9 و ژن U6.

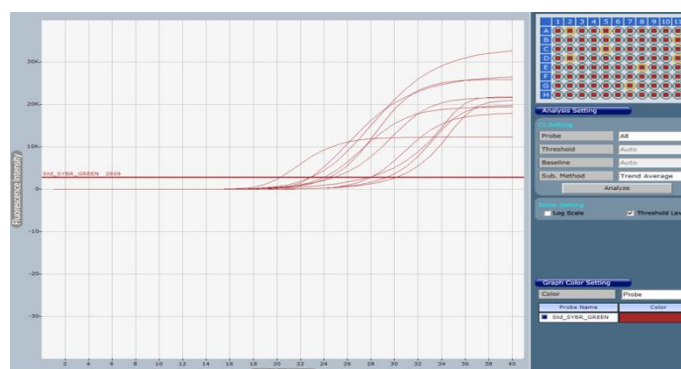
همچنین با توجه به نمودار ۲ و ۳، میزان بیان ژن fgf-9 در سرم بیماران مبتلا به مرحله چهارم بیماری نسبت به نمونه‌های سرم نرمال با سطح معنادار $P < 0/05$ ، کاهش معنی دار داشت. میزان بیان ژن fgf-9 در سرم بیماران مبتلا به مرحله چهارم بیماری به مقدار $4/46$ برابر نسبت به نمونه‌های نرمال، کاهش معنی دار ($P < 0/05$) داشت.

نتایج میزان بیان ژن مورد بررسی با توجه به مرحله سرطان میزان بیان ژن fgf-9 مورد بررسی در نمودار ۲ مشخص شده است. با توجه به نمودار ۲ میزان بیان ژن fgf-9 در سرم بیماران مبتلا به مرحله اول تا سوم بیماری نسبت به نمونه‌های سرمی نرمال، اختلاف معنی دار نداشت.



شکل ۳: نتیجه Conventional PCR با پرایمرهای اختصاصی

ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۳: محصول PCR مربوط به U6، ستون ۴: محصول PCR مربوط به fgf-9



شکل ۴: نمودار مربوط به نتایج Real Time PCR

هر منحنی مربوط به یک واکنش جداگانه است که پس از انجام واکنش، CT مربوطه توسط دستگاه محاسبه می‌گردد.

نمودار ۳: نتایج بیان ژن‌های کاندید مربوط به نمونه‌های Stage IV

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
fgf9 Stage IV	TRG	0.98	0.224	0.028 - 1.834	0.009 - 5.149	0.024	DOWN
U6 Stage IV	REF	0.94	1.000				

Legend: P(H1) – Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

TRG – Target

REF – Reference

در آنها تومور شروع شده ممکن است تعداد کمی جهش داشته باشند اما زمانی که تومور بزرگ می‌شود ممکن است سلول‌ها جهش اضافی کسب کنند. [۱۰]

در حال حاضر کشورهای کم درآمد و کشورهای با درآمد متوسط، سالانه بیش از ۵۰ درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان ریه را تشکیل می‌دهند. در آمریکا، سرطان ریه و برونش در مردان و زنان، به ترتیب ۱۴ و ۱۲ درصد از

بحث و نتیجه گیری

دهه‌ها تحقیق نشان داده سرطان ریه شامل فرآیند چند مرحله‌ای است بطوریکه تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی باعث آسیب DNA در سلول‌های اپیتلیال ریه سالم شده و آن را تبدیل به سرطان می‌کند. مشخص نیست که تمام سلول‌های اپیتلیال ریه دچار این تغییرات می‌شوند و یا اینکه دسته‌ای از این سلول‌ها به این تغییرات حساسند. بعلاوه سلول‌هایی که

به سرطان ریه، تفاوت معنی داری بین سابقه ابتلا به سرطان ریه در بین اعضای خانواده با میزان ابتلای فرد به سرطان ریه وجود ندارد. همچنین ۴۶ درصد افراد مبتلا به سرطان ریه در محدوده سنی ۶۱ تا ۷۰ سال هستند، در نتیجه میزان ابتلا به این سرطان در سنین پیری بیشتر است.

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که افزایش مقادیر ژن *fgf-9*، رشد سلول‌های سرطانی سنگفرشی ریه، میتوز و تهاجم آن‌ها را به طور قابل ملاحظه ای کاهش می‌دهد. [۲۲] در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن *fgf-9* تنها در مرحله چهارم بیماری که مرحله متاستاز می‌باشد، کاهش معنی دار ($P < 0/05$) داشته است و این کاهش باعث افزایش تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی ریه می‌شود.

Gan و همکاران در سال ۲۰۱۶ دریافتند که بیان ژن *fgf-9*، با معکوس کردن اثرات سرکوب کنندگی تومور، به طور قابل توجهی در بیماری‌زایی سرطان روده بزرگ نقش دارد. [۲] Ren و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای انجام دادند و نشان دادند کم کردن بیان ژن *fgf-9* در سرطان معده منجر به کاهش رشد سلول و القاء آپوپتوز می‌شود. بنابراین *fgf-9* ممکن است نقش انکوژنی مهمی در سلول‌های سرطانی معده داشته باشد. [۱۳] همانطور که از نتایج تحقیق حاضر بدست آمده است کاهش بیان ژن *fgf-9* باعث پیشرفت سرطان ریه می‌شود.

Sun و همکاران در سال ۲۰۱۵ دریافتند که ژن *fgf-9* یک فاکتور رشد جدیدی است که بیش از حد در فیبروبلاست‌های مرتبط با سرطان^۱ (CAFs) بیان شده و فعالیت ضد آپوپتوزی و قابلیت تهاجمی سلول‌های سرطانی معده را افزایش می‌دهد. [۱۹] در تحقیق ما نتایج نشان داد که بیان ژن *fgf-9* در سرم افرادی که در مرحله متاستاتیک سرطان ریه بودند، کاهش معنی دار ($P < 0/05$) داشته است. مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که سیگنالینگ از طریق فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGF2، FGF9) و گیرنده‌های آن‌ها به‌عنوان عامل مهمی، در بیماری‌زایی و پیشرفت سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه (SCLCs) نقش دارد. [۲۶] Ishioka و همکاران نیز در

کل سرطان‌های تشخیص داده شده را شامل می‌شوند. [۱۱،۲۱]

چندین مطالعه نشان داد که *fgf* ها و رسپتورهای فاکتور رشد فیبروبلاستی (*fgfr*) شامل *fgf-2*، *fgf-9*، *fgfr-1* و *fgfr-2* در لاین‌های سلولی NSCLC و بیماران مبتلا به سرطان ریه بیان شده‌اند. گزارش شده است که مهار سیگنال‌های *fgf/fgfr* باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. در موقع توسعه ی ریه، *fgf-9* در اپیتلیوم بیان شده است و نقش مهمی در تمایز و تکثیر اپیتلیوم دارد. [۱۲] *fgf-9* برای توسعه مولکول‌های مزانشیمی نیز ضروری هستند. [۱۷]

به دلیل غیرتهاجمی بودن گرفتن سرم از افراد و با توجه اینکه جداسازی بیومارکرها و نتیجه‌گیری از آن راحت است، اگر بدنیم در سرم افراد مبتلا به سرطان، بیان چه ژن‌هایی تغییر کرده است (کم یا زیاد شده است) در آینده می‌توان به تشخیص سرطان کمک شود. بنابراین هدف مطالعات، استفاده از نمونه‌های سرمی بوده است.

در این مطالعه از روش Real time PCR استفاده گردید و بررسی میزان بیان ژن *fgf-9* انجام شد. داده‌های مطالعه حاضر نشان داد، بیان ژن *fgf-9* در سرم افراد مبتلا به مراحل اول تا سوم سرطان نسبت به نمونه‌های سرمی نرمال تفاوت معنی داری ندارند اما در سرم بیماران مبتلا به مرحله چهارم، میزان بیان ژن *fgf-9* به مقدار ۴/۴۶ برابر نسبت به سرم افراد نرمال کاهش معنی دار ($P < 0/05$) داشت. بنابراین با توجه به نتایج تحقیق حاضر و با بررسی و تایید این یافته‌ها در نمونه‌های بیشتر، نتیجه‌گیری می‌شود که احتمالاً بررسی بیان ژن *fgf-9* را می‌توان برای پیش بینی مرحله متاستاز در سرطان ریه پیشنهاد داد. مهار بیان *fgf-9* باعث افزایش تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطانی ریه می‌شود.

اطلاعات دموگرافی بیماران نشان داد رابطه معنی داری بین جنسیت و مصرف دخانیات با ابتلا به سرطان ریه وجود دارد به طوری که از ۵۰ فرد مبتلا، ۷۰ درصد مرد بوده‌اند و همین‌طور از ۵۰ فرد مبتلا، ۷۲ درصد مصرف دخانیات داشته‌اند. در عین حال، از نظر دارا بودن سابقه خانوادگی ابتلا

¹ Cancer-associated fibroblasts

شد که کاهش بیان ژن fgf-9 در مرحله متاستاتیک سرطان ریه می‌تواند قابل توجه باشد.

Schmid و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعه ایی انجام دادند و دریافتند که فاکتور رشد فیروبلاستی ۹ (fgf-9) در نمونه‌های سرطانی تخمدان آندومتریوز^۱ بیش از حد بیان شده است. [۱۴] در مطالعه‌ی ما کاهش بیان ژن fgf-9 در مرحله چهارم سرطان مشاهده شد که این کاهش باعث پیشرفت بیماری و افزایش متاستاز می‌شود.

یافته‌های این مطالعه نشان داد، میزان بیان ژن fgf-9 در سرم افراد مبتلا به مراحل اول تا سوم سرطان ریه تفاوت معنی‌داری ندارند و از آنها برای غربالگری نمی‌توان استفاده نمود اما در نمونه‌های سرمی مرحله چهارم متاستاز، بیان این ژن کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) دارد و احتمالاً می‌تواند توسط آن روند درمان و میزان متاستاز بافت توموری در بیماران بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

براساس تحقیقات انجام گرفته و از آنجایی که گرفتن سرم راحت و استفاده از آن بهتر است، همچنین به دلیل اینکه ژن‌ها در سرم قابل شناسایی‌اند، بنابراین پیشنهاد می‌شود از بررسی بیان ژن‌های موجود در سرم برای تشخیص و درمان سرطان ریه استفاده شود. نتایج این مطالعه، تغییر معنی‌دار ($P < 0/05$) بیان ژن fgf-9 را در مرحله متاستاز نشان داد. بنابراین شاید این ژن بتواند به عنوان کاندید مناسبی برای بررسی پیشرفت متاستاز و غربالگری سرطان ریه استفاده گردد. بنابراین مطالعه بر روی نمونه‌های بیشتری لازم است.

تشکر و قدردانی

مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که ما را در به انجام رساندن این مطالعه، حمایت کردند، اعلام می‌داریم.

References

سال ۲۰۱۵ دریافتند، القاء FGF9 در ریه‌های بالغ منجر به ایجاد سریع آدنوکارسینوم در مدل خاصی از موش می‌شود. [۵] در مطالعه ما کاهش بیان ژن fgf-9 در سرم مرحله چهارم بیماری باعث پیشرفت بیماری شد.

مطالعات Ohgino و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد، ژن fgf-9 در بیماران مبتلا به آدنوکارسینومای ریه زیاد بیان شده است و تغییر عملکرد ژن fgf-9، توسعه و پیشرفت آدنوکارسینومای ریه را کاهش می‌دهد. یافته‌ها نشان می‌دهد که مدت زمان بقای کلی در بیمارانی که بیان fgf-9 در آن‌ها زیاد بود در مقایسه با بیمارانی که بیان fgf-9 در آن کم بود، به طور قابل توجهی کوتاه‌تر است. [۱۲] نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) بیان ژن fgf-9 در مرحله چهارم بیماری باعث افزایش روند متاستاز می‌شود.

Teishima و همکاران در سال ۲۰۱۴ دریافتند که ژن fgf-9 می‌تواند با انتقال اپتیلیالی- مزانشیمی و تهاجم در سلول‌های سرطانی پروستات مرتبط باشد. ژن fgf-9 باعث افزایش خاصیت تکثیر و تهاجم در سلول‌های سرطانی پروستات در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. حضور سلول‌های سرطانی fgf-9 مثبت، همبستگی مثبتی را با عود سرطان پروستات پس از عمل جراحی نشان می‌دهد. [۲۰] همچنین Korc و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز نشان دادند، سرطان پروستات با بیان FGF-1، FGF-6، FGF-7، FGF-8، FGF-9 و مرتبط شده است. [۶] با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، بیان ژن fgf-9 در مرحله متاستاز، کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) داشته است که این کاهش باعث افزایش روند متاستاز سلول‌های سرطانی ریه می‌شود.

نتایج Yin و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهند که سیگنال FGF9-FGFR3 به‌عنوان یک مسیر اولیه انکوژنیک برای آدنوکارسینوم ریه می‌باشد. بیان FGF9 در لاین سلولی آدنوکارسینوما، خواص تهاجمی آن‌ها را در محیط آزمایشگاهی افزایش می‌دهد و بیان بالای FGF9 با افزایش مرحله تومور و متاستاز گره لنفوای مرتبط شده است. FGF9 به‌طور مستقیم و به‌طور غیر مستقیم باعث افزایش تکثیر اپی تلیوم ریه می‌شود. [۲۴] در تحقیق ما نتیجه‌گیری

¹ endometrioid ovarian cancer

- [1] Almasi Z., Salehiniya H., Amoori N., Enayatrad M. 2015, Epidemiology Characteristics and Trends of Lung Cancer Incidence in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17 (2):557-562.
- [2] Gan J., Hu CE. 2016, MicroRNA-486-5p targets FGF9 and inhibits colorectal cancer proliferation, migration and invasion. *Int J Clin Exp Pathol*, 9(5):5258-5266.
- [3] Guz M., Rivero-Müller A., OkoN E., Stenzel-Bembenek A., Polberg K., Slomka M., Stepulak A. 2014, MicroRNAs-Role in Lung Cancer. *Disease Markers*, 2014: 1-13.
- [4] Hassanipour S., Mokhtari A.M., Fathalipour M., Salehiniya H. 2017, THE INCIDENCE OF LUNG CANCER IN IRAN: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *World Cancer Research Journal*, 4(4): e980-7.
- [5] Ishioka K., Sejima K., Yasuda H., Hamamoto J., Hegab A., Tani T., Kuroda A., Arai D., Ohgino K., Sato T., Hideki T., Kawada I., Naoki K., Hayashi Y., Betsuyaku T. 2015, Abstract 3916: Oncogenic potential of FGF9 in lung cancer. *American Association for Cancer Research*, 75(15).
- [6] Korc M., E. Friesel R. 2009, The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth. *Curr Cancer Drug Targets*, 9(5): 639-651.
- [7] Kumar NM., Sai TNP., Sai PSA., Roy A., Paul S., Kumar A. 2017, Lifetime Chance of Getting Lung Cancer: A Review. *Journal of Cancer Clinical Trials*, 2(4): 1-4.
- [8] Lin M., Tsai CC., Chung CL., Chen PR., Sun HS., Tsai SJ., Huang BM. 2010, Fibroblast growth factor 9 stimulates steroidogenesis in postnatal Leydig cells. *international journal of andrology*, 33(3), 545-553.
- [9] Nadal E., Truini A., Nakata A., Lin J., Reddy RM., Chang AC., Ramnath N., Gotoh N., Beer DG., Chen G. 2015, A Novel Serum 4-microRNA Signature for Lung Cancer Detection. *Scientific Reports*, 5:12464:1-9.
- [10] Ndlovu R., Deng LC., Wu J., Li XK., Zhang JS. 2018, Fibroblast Growth Factor 10 in Pancreas Development and Pancreatic Cancer. *Front Genet*, 9(482).1-8.
- [11] Nowell PC. 1976, The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), PP. 23-8.
- [12] Ohgino K., Soejima K., Yasuda H., Hayashi Y., Hamamoto J., Naoki K., Arai D., Ishioka K., Sato T., Terai H., Ikemura S., Yoda S., Tani T., Kuroda A., Betsuyaku T. 2014, Expression of fibroblast growth factor 9 is associated with poor prognosis in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 83(1): 90-96.
- [13] Ren C., Chen H., Han C., Fu D., Wang F., Wang D., Ma L., Zhou L., Han D. 2016, The anti-apoptotic and prognostic value of fibroblast growth factor 9 in gastric cancer. *Oncotarget*, 7(24): 36655-36665.
- [14] Schmid S., Bieber M., Zhang F., Zhang M., He B., Jablons D., Teng NN. 2011, Wnt and hedgehog gene pathway expression in serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21(6): 975-980.
- [15] Shao Y., Liang B., Long F., Jiang SJ. 2017, Diagnostic MicroRNA Biomarker Discovery for Non-Small-Cell Lung Cancer Adenocarcinoma by Integrative Bioinformatics Analysis. *BioMed Research International*, 2017: 1-9.
- [16] Shen J., Jiang F. 2012, Applications of MicroRNAs in the Diagnosis and Prognosis of Lung Cancer. *Expert Opin Med Diagn*, 6(3): 197-207.
- [17] Siegel RL., Miller KD., Jemal A. 2017, Cancer Statistics 2017. *CA Cancer J Clin*, 67(1): 7-30.
- [18] Sozzi G. 2001, Molecular biology of lung cancer. *European Journal Of Cancer*, 37(7): S63-73.
- [19] Sun C., Fukui H., Hara K., Zhang X., Kitayama Y., Eda H., Tomita T., Oshima T., Kikuchi S., Watari J., Sasako M., Miwa H. 2015, FGF9 from cancer-associated fibroblasts is a possible mediator of invasion and anti-apoptosis of gastric cancer cells. *BMC Cancer*, 15:1-9.
- [20] Teishima J., Yano s., Shogi k., Hayashi T., Goto K., Kitano H., Oka K., Nagamatsu H., Matsubara A. 2014, Accumulation of FGF9 in Prostate Cancer Correlates with Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Induction of VEGF-A Expression. *ANTICANCER RESEARCH*, 34: 695-700.

- [21] Torre LA., Siegel RL., Jemal A. 2016, Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*, 893:1-19.
- [22] Wang Q., Liu S., Zhao X., Wang Y., Tian D., Jiang W. 2017, MiR-372-3p promotes cell growth and metastasis by targeting FGF9 in lung squamous cell carcinoma, *Cancer Medicine*, 6(6):1323-1330.
- [23] Wu XI., Gu MM., Huang L., Liu XS., Zhang HX., Ding XY., Xu JQ., Cui B., Wang L., Lu SY., Chen XY., Zhang HG., Huang W., Yuan WT., Yang JM., Gu Q., Fei J., Chen Z., Yuan ZM., Wang ZG. 2009, Multiple Synostoses Syndrome Is Due to a Missense Mutation in Exon 2 of FGF9 Gene. *The American Journal of Human Genetics*, 85: 53-63.
- [24] Yin Y., Betsuyaku T., Garbow JR, Miao J., Govindan R., Ornitz DM. 2013, Rapid Induction of Lung Adenocarcinoma by Fibroblast Growth Factor 9 Signaling through FGF Receptor 3. *Cancer Research*, 73(18); 5730-41.
- [25] Zarogoulidis K., Zarogoulidis P., Darwiche K., Boutsikou E., Machairiotis N., Tsakiridis K., Katsikogiannis N., Kougioumtzi I., Karapantzios I., Huang H., Spyrtatos D. 2013, Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Dis*, 5(S4):S389-S396.
- [26] Zhang L., Yu H., Badzio A., Boyle TA., Schildhaus HU., Lu X., Dziadziuszko R., Jassem J., Varella-Garcia M., Heasley LE., Kowalewski AA., Ellison K., Chen G., Zhou C., Hirsch FR. 2015, Fibroblast Growth Factor Receptor 1 and Related Ligands in Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 10(7):1083-90.

Determination of the level of fgf-9 gene expression in serum samples of patients with lung cancer

Alavi Moghaddam F. S.¹, Hashemi M.^{2*}, Siyasi E.³

¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biologic Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

² Department of Genetics, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Microbiology, Faculty of Biologic Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

* Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

Received: January 2019

Accepted: March 2020

Abstract

Background: Lung cancer is one of the major causes of cancer deaths. The activation of fgf signals, including fgf-9, is involved in the pathogenesis of several cancers, including lung cancer. Also, fgf-9 may be an indicator for prognosis and is associated with survival rates in patients with NSCLC. Therefore, in this study, the rate of fgf-9 gene expression in the serum patients with lung cancer was investigated.

Analysis method: In this study, 50 serum samples of healthy subjects and 50 serum samples of NSCLC patients were collected from patients referring to Masih Daneshvari Hospital in Tehran and were collected by questionnaires, individual and clinical data of the subjects. Then, Plasma isolation, RNA extraction, cDNA synthesis, primer design were performed and the rate of changes of fgf-9 expression in the serum of healthy and lung cancer patients was evaluated using Real Time PCR. REST software was used to analyze the results.

Findings: In this study, the expression of fgf-9 gene was not significantly different in the serum of patients with the first to third stages of metastasis but in the serum of people with stage IV metastasis the level of expression of fgf-9 gene had a significant reduction of 4.46 ($P < 0.05$) times than normal samples.

Conclusion: According to the results of this study, if these results are confirmed in more samples, the level of the fgf-9 gene expression in the serum of individuals can probably be used in the future to predict the stage of metastasis of lung cancer.

Keywords: Lung cancer, serum, metastasis, fgf-9 gene.