مطالعه ايمنوهيستوشيمي بتا-كاتنين در كارسينوم تجربي كولون موش صحرائي

يوسف دوستار[۱*]، داريوش مهاجري[۱]، فاطمه فتحي آذر[۲]، علي ناموران[۳]

۱. گروه پاتوبيولوژي، دانشكده دامپزشكي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد تبريز، تبريز، ايران
۲. دانشكده داروسازي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز، تبريز، ايران
۳. دانش‌آموخته دامپزشكي، دانشكده دامپزشكي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد تبريز، تبريز، ايران
*نويسنده مسئول مكاتبات: vetdoustar@yahoo.com
(دريافت مقاله: ۸۷/۱۰/۲۸، پذيرش نهايي: ۸۸/۷/۶)

چكيده
آدنوكارسينوم كولون و ركتوم يكي از معمول‌ترين و درمان‌پذيرترين موارد بدخيمي‌هاي دستگاه گوارش مي‌باشند. تحقيقات اخير در مورد سرطان‌هاي كولون و ركتوم نشانگر موتاسيون ژن بتا-كاتنين و تجمع درون هسته‌اي آن در سلول‌هاي هيپرپلاستيك مي‌باشد. بنابراين، احتمالاً پروتئين بتا-كاتنين مي‌تواند به عنوان يك شاخص پيشگوئي و تشخيصي مهم در اين بيماري مطرح باشد. هدف از اين مطالعه، ارزيابي بيان پروتئين بتا-كاتنين هسته‌اي در سلول‌هاي هيپرپلاستيك كولون متعاقب تيمار با ۱و۲ دي‌متيل هيدرازين مي‌باشد. در اين مطالعه ۵۶ سر موش صحرائي نر نژاد ويستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۳۰۰-۲۰۰ گرم انتخاب و به‌طور تصادفي در دو گروه مساوي تيمار و شاهد تقسيم گرديدند. در گروه تيمار جهت القاء كارسينوم كولون از ۱و۲ دي‌متيل هيدرازين به ميزان ۴۰ ميلي‌گرم براي هر كيلوگرم وزن بدن به مدت ۴ هفته و هر هفته دو تزريق به روش زير جلدي استفاده گرديد. به گروه شاهد مشابه گروه تيمار سالين نرمال تزريق گرديد. پس از گذشت ۸ هفته از بافت كولون ديستال هر دو گروه جهت تهيه مقاطع ريزبيني و انجام ايمنوهيستوشيمي نمونه‌برداري به عمل آمد. ايمنوهيستوشيمي نمونه‌ها نشان داد كه ميزان پديداري پروتئين بتا-كاتنين هسته‌اي در گروه تيمار به طور معني‌داري بيشتر از گروه شاهد مي‌باشد ($p<0/01$). مطالعه حاضر نشان مي‌دهد كه بيان بتا-كاتنين هسته‌اي در موارد هيپرپلازي و نئوپلازي كولون مي‌تواند افزايش يابد.
مجله دامپزشكي دانشگاه آزاد اسلامي واحد تبريز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۲، ۴۵۷-۴۵۱.
كلمات كليدي: كولون، كارسينوم، بتا-كاتنين، ايمنوهيستوشيمي

مقدمه
سرطان روده بزرگ دومين دليل مرگ و مير ناشي از سرطان در دنيا است. طبق آمار ارائه شده، سالانه اين سرطان مسئول مرگ ۱۹۰۰۰ نفر در انگلستان، ۸۵۰۰۰ نفر در اروپا و ۶۱۰۰۰ نفر در ايالات متحده است (۱، ۲، ۳، ۴ و ۲۴). در ايران آمار قابل استنادي براي ميزان وقوع سرطان وجود ندارد ولي براساس آن‌چه از منابع برمي‌آيد بيشترين درصد سرطان مربوط به دستگاه گوارش و به خصوص روده بزرگ است و درصد بالايي از بدخيمي‌ها و مرگ و مير را در ايران شامل مي‌شود. ميزان بالاي چربي و پروتئين جيره باعث افزايش وقوع سرطان روده بزرگ مي‌شود (۲ و ۸)، اين درحالي است كه به نظر مي‌رسد تغذيه با چربي پايين، فيبر بالا، كلسيم بالا و مصرف مقدار زياد سبزيجات در غذاي روزانه باعث كم شدن ميزان بروز سرطان روده بزرگ مي‌شود. مطالعات آزمايشگاهي حاكي از ارتباط بين فاكتورهاي تغذيه و سرطان روده بزرگ دارد (۱۴، ۱۵ و ۱۶). با اين وجود مكانيسم حمايتي اجزاي اشاره شده هنوز به درستي مشخص نشده

است. به‌نظر مي‌رسد تجمع سلول‌هاي داراي جهش در روده بزرگ و رکتوم باعث ايجاد تومور و بدخيمي مي‌شود (۹). سرطان روده بزرگ يکي از مهم‌ترين عوامل مرگ و مير در مردان و زنان در شهرهاي صنعتي است (۲ و ۱۲). بتا-کاتنين يک مولکول مرکزي يا اصلي در مسير پيام‌رساني داخل سلولي است که پيشتر به عنوان عامل دخيل در سرطان‌زايي يا تومورزايي انواع سرطان‌هاي دستگاه گوارشي از جمله سرطان معده و کولون شناخته شده بود. مطالعات پيشين درباره سرطان کولون، ارتباط بين پيدايش بتا-کاتنين هسته‌اي، وخامت بيماري و بقاء ضعيفتر بيماران مبتلا به سرطان کولون را نشان داده است. براساس پژوهش‌هاي انجام شده، نقش بتا- کاتنين در سرطان کولون و رکتوم را به تنهايي نمي‌توان از طريق مسير پيام‌رسان wnt تشريح کرد. اين پروتئين مي‌تواند يک نقش آلترناتيو داشته باشد که با تمايز سلول‌هاي سرطاني و پيش‌بيني بهتر براي بيماري در ارتباط است. بايستي خاطر نشان نمود که بر اساس نتايج مطالعه Wanitsuwan و همکاران وي در سال ۲۰۰۸، پديداري بيش از حد بتا- کاتنين به‌صورت تجمع هسته‌اي آن در پيشگوئي نتايج سرطان‌هاي کولورکتال بسيار حائز اهميت مي‌باشد (۲۲)، با توجه به اين‌که بروز و تجمع شکل هسته‌اي اين پروتئين مي‌تواند يک شاخص تشخيصي خوبي براي موارد کارسينوم کولون باشد. هدف از انجام اين مطالعه، بررسي ميزان پديداري پروتئين بتا-کاتنين به روش ايمونوهيستوشيمي در کارسينوم تجربي کولون موش صحرائي مي‌باشد.

مواد و روش‌کار

موش‌هاي صحرايی نر نژاد ويستار از دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تبريز خريداري و در شرايط ۵ حيوان در هر قفس و نيز با سيکل ۱۲ ساعت تاريکي و ۱۲ ساعت روشنايي و درجه حرارت ۲±۲۲ سانتی‌گراد و رطوبت ۱۰%±۵۵ نگه-داري شدند.

طراحي آزمايش:

در اين مطالعه تعداد ۵۶ سر موش صحرائي نر نژاد ويستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۳۰۰-۲۰۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی در دو گروه مساوي تيمار و شاهد تقسيم گرديدند. در گروه تيمار جهت القاء کارسينوم کولون از ۱و۲ دي متيل هيدرازين به ميزان ۴۰ ميلي‌گرم/کيلوگرم وزن بدن به‌مدت ٤ هفته و هر هفته دو تزريق به روش تزريق زيرجلدي استفاده گرديد. در گروه شاهد مشابه گروه تيمار سالين نرمال تجويز گرديد. پس از گذشت ٤ هفته از بافت کولون ديستال هر دو گروه جهت تهيه مقاطع ۳ ميکروني و انجام ايمنوهيستوشيمي نمونه برداري به-عمل آمد.

روش القاي کارسينوم تجربي کولون در موش صحرائي:

جهت ايجاد تجربي سرطان روده بزرگ در جوندگان از ماده ۱،۲-dimethylhydrazine (DMH) استفاده مي‌شود که قابليت سرطان‌زائي در روده بزرگ و کوچک را داشته و با القاي کريپت‌هاي نابجا در روده و متعاقب آن ايجاد تومور همراه است و روش استاندارد مطالعه تجربي سرطان روده بزرگ است (۸، ۹ و ۱۷).

جهت ارزيابي اثرات DMH کريپت‌هاي نابجاي ايجاد شده (Aberrant Crypt Foci ACF) مورد بررسي قرار مي‌گيرد. کريپت‌هاي نابجا در روده از عوامل مستعد کننده روده براي ايجاد آدنوم و آدنوکارسينوم بوده و از طريق بررسي آنها مي‌توان در شناسايي زود هنگام سرطان کمک گرفت. براي القاء کارسينوم کولون، ماده شيميائي ۱و۲ دي متيل هيدرازين با دز ۴۰

ميليگرم براي هر كيلوگرم وزن بدن و محلول در EDTA به روش زير جلدي تزريق گرديد. تزريق هر هفته دو بار تزريق با فاصله مساوي و به‌مدت ۸ هفته انجام شد (٦، ١٤ و ١٩).

روش انجام ايمنوهيستوشيمي:

١- تهيه بلوك پارافيني ٢- برش به ضخامت ٣ ميكرون و قرار دادن مقاطع بر روي لام سايلين ٣- پارافين زدائي ٤- قرار دادن مقاطع در مايكروويو ٥- قرار گرفتن مقاطع در دماي اتاق به‌مدت ١٥ دقيقه ٦- شستشوی بافت‌ها در آب جاري ٧- شستشو در بافر TBS ٨- پوشاندن لام‌ها با آب اكسيژنه ٩- شستشو با بافر TBS ١٠- پوشاندن لام‌ها با منوكلونال آنتي-بادي بتا-كاتنين موش به همراه آنتي سرم آنتي‌بتا-كاتنين خرگوش (ساخت كمپاني DAKO) ١١- قرار دادن مقاطع در دماي اتاق به‌مدت ٣٠ دقيقه ١٢- شستو با بافر TBS ١٣- پوشاندن سطح لام‌ها با پليمر نشان‌دار شده با پراكسيداز ١٤- شستشو با بافر TBS ١٥- پوشاندن سطح لام‌ها با كروموژن+سوبسترا ١٦- شستشو با بافر TBS ١٧- رنگ آميزي هماتوكسيلين و مونته كردن (١٨، ٢٠ و ٢٢).

روش نمونه‌برداري و آناليز آماري داده‌ها:

آناليز آماري در مطالعه حاضر با آزمون t (*t*-Test) مستقل به انجام رسيد. بر اساس جدول كوهن و ضريب اثر ٠/٥، توان آزمون (١- beta) ٩٠ درصد و α=٠/٠٥ حداقل حجم نمونه ٢٨ مورد انتخاب گرديد. براي بيان كمي تغييرات كيفي حاصله، از روش رتبه‌بندي تراكم پروتئين بتا-كاتنين مطابق جدول ١ استفاده گرديد.

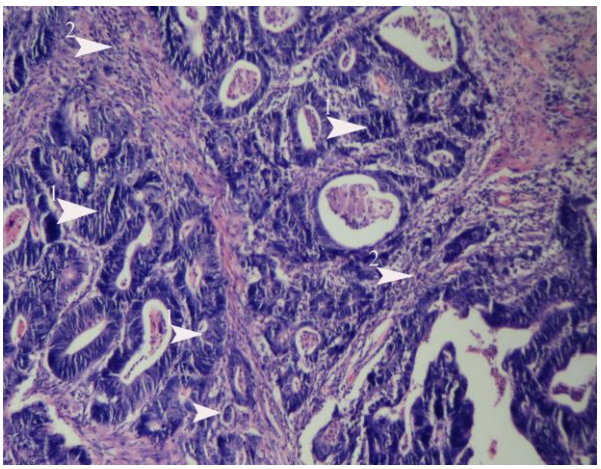
جدول ١- روش رتبه‌بندي تراكم پروتئين بتا-كاتنين

	ميزان بسيار كم حضور پروتئين	ميزان كم حضور پروتئين - بتا-	ميزان متوسط حضور پروتئي	ميزان زياد حضور پروتئين
ميزان حضور پروتئين بتا-كاتنين	٠	١	٢	٣

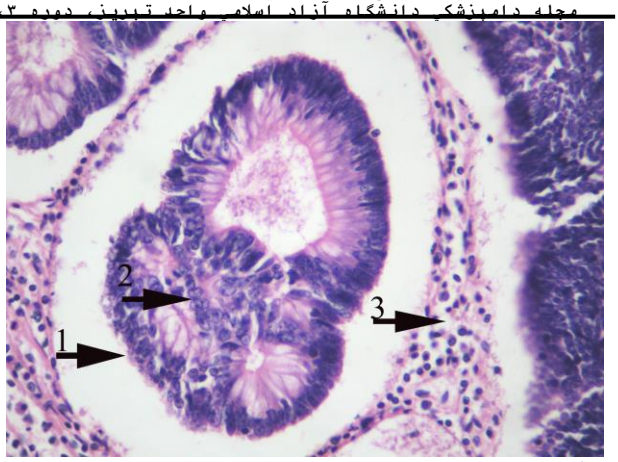
	- بتا-كاتنين	كاتنين	ن - بتا-كاتنين	- بتا-كاتنين
ميزان حضور پروتئين بتا-كاتنين	٠	١	٢	٣

نتايج

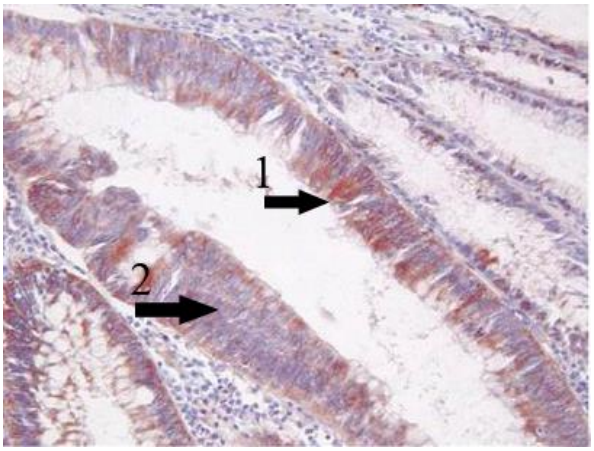
مطالعات ريزبيني بافت اپي‌تليوم كولون موش صحرائي گروه تيمار نشانگر اپي‌تليوم هيپرپلاستيك و مناطق ACF (Aberrant crypt foci) (نگاره‌هاى ١ و ٢) به همراه ارتشاح سلول‌هاي تك‌هسته‌اي بود. در مطالعات ايمونوهيستوشيمي، ميزان پروتئين بتا-كاتنين در مقاطع بافتي كولون موش‌هاي صحرائي گروه تيمار پس از دريافت ٨ هفته‌اي ١و٢ دي متيل هيدرازين نسبت به گروه شاهد تغييرات معني‌داري را نشان داد، به طوری كه تراكم بتا-كاتنين در مخاط كولون گروه شاهد بسيار ملايم بود (نگاره‌هاى ٣ و ٤).



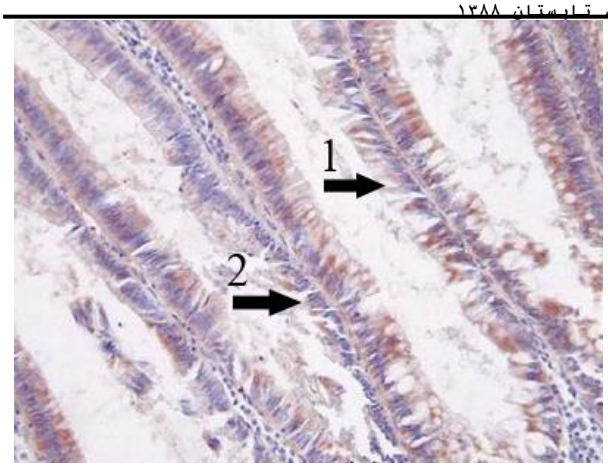
نگاره١- نماي ريزبيني از بافت اپي‌تليوم كولون موش صحرائي گروه تيمار كه در آن مقاطع متعدد كريپت‌هاي هيپرپلاستيك (Aberrant crypt foci) (پيكان‌هاي ١) به همراه ارتشاح سلول‌هاي تك‌هسته‌اي (پيكان‌هاي ٢) قابل مشاهده مي‌باشد (رنگ‌آميزي هماتوكسيلين-ائوزين، بزرگنمائي٤٠×).



نگاره۲- نماي ريزبيني از بافت اپيتليوم كولون موش صحرائي گروه تيمار كه در آن مقاطع كريپتهاي هيپرپلاستيك (Aberrant crypt foci) (پيكان ۱) با رشد هيپرپلاستيك سلولي (پيكان ۲) به همراه ارتشاح سلولهاي تك-هسته اي (پيكان ۳) در پيرامون آنها كريپتها قابل رويت ميباشد (رنگآميزي هماتوكسيلين-ائوزين، بزرگنمائي۴۰۰×).



نگاره۳- نماي ريزبيني از بافت اپيتليوم كولون موش صحرائي گروه تيمار كه در آن پروتئين بتا-كاتنين در مخاط كولون به رنگ قهوه اي روشن (پيكان ۱) و پروليفراسيون سلولهاي اپيتليالي (پيكان ۲) قابل رويت ميباشد. (ايمنوهيستوشيمي پروتئين بتا-كاتنين، بزرگنمائي۴۰۰×). پديداري بتا- كاتنين به‌وسيله آنتي بادي مونوكلونال آنتي بتا-كاتنين موش و آنتي سرم آنتي بتا-كاتنين خرگوش.



نگاره۴- نماي ريزبيني از بافت اپيتليوم كولون موش صحرائي گروه شاهد كه در آن پروتئين بتا-كاتنين در مخاط كولون به رنگ قهوه اي روشن (پيكانهاي ۱ و ۲) قابل رويت ميباشد. (ايمنوهيستوشيمي پروتئين بتا-كاتنين، بزرگنمائي۴۰۰×). ايمنوهيستوشيمي پروتئين بتا-كاتنين. پديداري بتا- كاتنين به-وسيله آنتي بادي مونوكلونال آنتي بتاكاتنين موش و آنتي سرم آنتي بتا-كاتنين خرگوش.

تجزيه و تحليل آماري دادهها:

دادههاي حاصل در هر دو گروه تيمار و شاهد، توسط نرم افزار spss ويرايش ۱۳ و آزمون *t*-Test مورد تجزيه و تحليل قرار گرفت. اختلاف ميانگين تغييرات پروتئين بتا-كاتنين بين گروههاي تيمار و شاهد معنيدار($p<0,01$) بود كه در جدول ۲ آورده شده است.

جدول۲- ميانگين تغييرات پروتئين بتا-كاتنين در بافت كولون موشهاي گروه تيمار و شاهد.

متغيرهاي وابسته	خطاي استاندارد	انحراف از معيار	ميانگين
بتا-كاتنين گروه شاهد	۰/۱۲۰۴	۰/۶۳۷۲	۰/۹۶۴۳
بتا-كاتنين گروه تيمار	۰/۱۴۶۰	۰/۷۷۲۴	۲/۳۲۱*

*:$p<0,01$ در مقايسه با گروه شاهد

بحث و نتيجه‌گيري

بتا-كاتنين يک مولكول مركزي يا اصلي در مسير پيام‌رساني داخل سلولي پيشتر به عنوان عامل دخيل در سرطان‌زايي يا تومورزايي انواع سرطان‌هاي دستگاه گوارشي از جمله سرطان معده و كولون شناخته شده بود. مطالعات پيشين درباره سرطان كولون، ارتباط و توافق مابين پيدايش بتا-كاتنين هسته‌اي، وخامت بيماري و بقاء ضعيفتر را نشان داده است (۲۱). براساس نتايج Wanitsuwan و همكاران وي در سال ۲۰۰۸، پديداري بيش از حد بتا-كاتنين به‌صورت تجمع هسته‌اي آن در پيشگوئي نتايج سرطان‌هاي كولوركتال بسيار حائز اهميت مي‌باشد (۲۲).

Yasuhiro و Hideki در سال ۲۰۰۳ بيان نمودند كه آنزيم گليكوژن سنتتاز كيناز ۳ با پروتئين آدنوماتوز پلي‌پوزيس كولي و پروتئين آگزين باعث فسفوريلاسيون بخش N-ترمينال (سرين/ترئونين) پروتئين بتا-كاتنين گرديده و پس از تداخل پروتئين F-box دگرداسيون پروتوزومي صورت گرفته و پروتئين بتا-كاتنين در هسته سلول رها و با فاكتور سلول‌هاي تي يا TCF باند مي‌شود (۲۳). هرگونه موتاسيون در ژن‌هاي مسير فوق مي‌تواند باعث تجمع غيرطبيعي اين پروتئين در هسته سلول گردد كه در موارد تغييرات ديسپلاستيك اپي‌تليوم كولون تجمع پروتئين بتا-كاتنين در كانون كريپيت‌هاي نابجا (نگاره‌هاى ۱ و ۲) وجود دارد كه به‌نام (BCAC) Beta-catenin-accumulated crypt خوانده مي‌شود.

Brabetz و همكاران در سال ۲۰۰۰ به پديداري بيش از اندازه اين پروتئين در هسته و ارتباط آن با اندازه نئوپلاسم‌ها اشاره نمودند (۳). Hideki و Yasuhiro در سال ۲۰۰۳ در مورد تراكم بتا-كاتنين در اپي‌تليوم ديسپلاستيك كولون با نتايج مطالعه حاضر همخوانى دارد (۲۳).

تحقيقات نشان داده است كه ژن APC يا Adenomatous Polyposis Coli به‌عنوان يك ژن ساپرس كننده رشد تومور مي‌باشد كه نه تنها در اكثريت موارد كارسينوم كولون موتاسيون آن معلوم شده است، بلكه در ساير موارد سرطاني نظير كارسينوم كبد نيز موتاسيون آن تشخيص داده شده است. محصول ژن APC، پروتئيني است به وزن ۳۱۲ كيلو دالتون كه داراي دومن‌هاي متعددي است كه از آن طريق با ساير پروتئين‌ها شامل پروتئين بتا-كاتنين، آكسين، CTBC، Asefs، IQGAP۱ و ميكروتوبول باند مي‌باشد. نقش ديگري كه براي APC بيان شده اتصال و مهاجرت سلولي، سازماندهي آكتين و شبكه ميكروتوبولي سلول‌ها است (۱، ۷ و ۱۶).

Carmen و همكاران وي در سال ۲۰۰۱ و Nelson در سال ۱۹۹۷ اثرات القائي ۱و۲ دي‌متيل هيدرازين در كارسينوم كولون و پديداري پروتئين بتا-كاتنين هسته‌اي را تفسير نمودند (۶ و ۲۴). طبق نظر ايشان ۱و۲ دي‌متيل هيدرازين از طريق ايجاد موتاسيون در ژن مولد پروتئين بتا-كاتنين باعث القا كارسينوم كولون در روده موش صحرائي مي‌گردد. آنها بر اين باور بودند كه كارسينوم كولون عمدتاً در اثر موتاسيون ژني ايجاد مي‌گردد، مخصوصاً ژن‌هايي كه در ترميم و رپليكاسيون DNA موثر مي‌باشند. از بين اين ژن‌ها مي‌توان ژن APC يا آدنوماتوز پلي‌پوزيس كولي را نام برد كه ۸۵-۸۰ درصد موارد كارسينوم كولون مربوط به موتاسيون ژن فوق مي‌باشد كه در مطالعه حاضر احتمالاً موتاسيون ژن

فوق در اثر ۱و۲ دي‌متيل هيدرازين روي داده است. با وجود اين، مطالعات نشان داده است موتاسيون ژن آدنوماتوز پلي‌پوزيس كولي و ژن پروتئين بتا-كاتنين يا CTNNB۱ از دلايل اصلي و موثر در بروز كارسينوم كولون مي‌باشد. محصول ژن CTNNB۱ پروتئين بتا-كاتنين مي‌باشد كه يك پروتئين اتصالي كادهريني بوده و در اتصال بين سلولي نقش دارد. اما نقش ديگري كه براي اين پروتئين در نظر گرفته مي‌شود، فعال كننده ترانس-كريپتاسيون سلولي بوده و آن اغلب زماني است كه اين پروتئين در هسته سلول با خانواده TCF/LEF يا فاكتور سلول‌هاي لنفوسيتي تي/فاكتور مشوق لنفوئيدي تشكيل كمپلكس مي‌دهد. ميزان بتا-كاتنين در سيتوزول سلول از طريق آبشار مسير سيگنال‌هاي ترانسدوكسيون Wnt در مجموعه يا كمپلكس پروتئيني شامل APC، Axin و GSK-۳β يا سرين گليكوژن كيناز سنتتاز تري‌بتا افزايش مي‌يابد. در موتاسيون ژن CTNNB۱ بخش مهمي از آنزيم GSK-۳βسرين/ترئونين تغييرات پيدا كرده كه محل استقرار پروتئين بتا-كاتنين مي‌باشد كه نتيجه آن تجمع كمپلكس پروتئين بتا-كاتنين+TCF/LEF در هسته سلول‌هاي ديسپلاستيك مي‌باشد. در مطالعه حاضر نيز در گروه تيمار با ۱و۲ دي متيل هيدرازين، ميزان پديداري پروتئين بتا-كاتنين نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بيشتر مي-باشد (٦). بنابراين، پديداري پروتئين بتا-كاتنين هسته‌اي در سلول‌هاي سرطاني كولون مي‌تواند به عنوان يك شاخص تشخيصي خوب مطرح باشد (٥، ٦، ١٠، ١١ و ١٧).

Korinek و همكارانش تجمع بتا-كاتنين و Tcf-٤ را كه در بافت اپيتليالي كولون پديدار مي‌شود تشريح و نشان دادند كه hTcf-٤ در هسته سلول‌هاي سرطاني كولون با بتا-كاتنين ارتباط پايدار و ثابت برقرار و اساساً فعال مي‌باشد. با وجود اين، پروتئين APC باعث انفصال بتا-كاتنين از hTcf-٤ و در نتيجه منجر به توقف فعاليت رونويسي آن مي‌شود. از آنجايي كه تصور بر اين بود كه غير فعال شدن ژن APC به عنوان ژني كه مهار كننده تومورهاست منجر به نئوپلازي در ناحيه كولورکتال مي‌شود، از يافته‌هاي Korinek و همكارانش در سال ۲۰۰۵ چنين برمي‌آيد كه بتا-كاتنين در رشد نئوپلاستيك كولون دخيل مي‌باشد كه در مطالعه حاضر نيز ميزان تراكم آن در گروه تيمار بيشتر بوده و نشانگر تجمع زياد اين پروتئين در سلول‌هاي ديسپلاستيك اپي‌تليوم كولون مي‌باشد كه با نتايج آنها هم‌خواني دارد (۱۳، ۲۰ و ۲۱). Sparks و همكارانش در سال ۱۹۹۸ گزارش كردند كه شايد دو مسير براي غير فعال شدن اثرات مهاري و بازدارندگي APC وجود داشته باشد كه اين امر مي‌تواند با ايجاد جهش ژني در خود پروتئين APC و يا ايجاد جهش در بتا-كاتينن اتفاق افتد. معلوم شده است كه سلول‌هاي توموري كولورکتال جهش‌هايي دارند كه منجر به تغييرات و جابجايي‌هاي اساسي در مواضع فسفريلاسيون بتا-كاتنين مي‌شود. اين يافته‌ها حاكي از آن است كه APC ، بتا- كاتينن و Tcf-٤ در ايجاد تومورهاي كولورکتال دخيل هستند و هرچه تغييرات ديسپلاستيك در روند رشد سرطاني اپي‌تليوم كولون كمتر باشد، به همان نسبت بيان پروتئين بتا-كاتنين كم و منظم‌تر مي‌باشد، در حالي كه در موارد تغييرات ديسپلاستيك تراكم آن قابل توجه مي‌باشد (٤، ٩، ١٣ و ١٧). با مطالعه‌اي كه Brembeck و Rosario در سال ۲۰۰٦ انجام دادند، بيان

نمودند که پروتئین بتا-کاتنین یک پروتئین چند منظوره ۸۸ کیلودالتوني است که نه‌تنها به همراه پروتئین کادهرین در اتصال بین سلولي نقش دارد، بلکه در موارد کارسینوم کولون به عنوان یک شاخص تشخیصي و پیشرفت رشد تومور مي‌تواند اهمیت داشته باشد (٤). در مطالعه حاضر که به روش استفاده از آنتي بتاکاتنین (ایمنوهیستوشیمي M٣٥٣٩) میزان تراکم این پروتئین سنجیده شد، اختلاف میانگین بروز این پروتئین در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد معني‌دار و نشانگر اثر القائي ١و٢ دي متیل هیدرازین در کارسینوم کولون و پدیداري پروتئین بتا-کاتنین بود (نگاره‌هاي ٣ و ٤). بنابراین باتوجه به نتایج مطالعه حاضر مي‌توان اظهار داشت که پدیداري بتا-کاتنین هسته‌اي مي‌تواند در کارسینوم کولون افزایش یابد. شاید لازم است مطالعاتي تکمیلي با فرضیات دقیق و بیان متغیرهاي موثر کمي و کیفي انجام پذیرد تا راهگشاي سایر فعالیت‌هاي پژوهشي باشد.

کلمات اختصاری:

APC: ***APC*** (adenomatous polyposis coli) gene.
Ras: ***Ras*** superfamily of small GTPases**.**
Src: ***Src*** is a protein kinase found at elevated levels in pre-malignant colorectal tissues**.**
MOLT -٤: (Human acute lymphoblastic leukemia cell line) Whole Cell
MTT/Tetrazolium: The ***MTT*** (C, N-diphenyl-N'-٤, ٥-dimethyl thiazol ٢ yl ***tetrazolium*** bromide)
Wnt: ***Wnt*** genes in human ***colon carcinoma*** tissue and normal ***colon*** mucosa.
TCF/LEF: The founding members of the ***TCF/ LEF*** family of transcription factors.
FAP: Familial Adenomatose Polyposis.
AP-١: Transcriptase Factor.
CREB: CAMP response element binding.
ETS-١: ETS transcriptions factors, such as ***ETS ١,*** regulate numerous genes.
DPC٤: tumor-suppressor gene.
bMB٤: Bone Morphogenic Protein-٤.
E٢A: immunoglobulin enhancer binding factors E١٢/ E٤٧.
CIP١/WAFT: Two variants of the ***CIP ١/WAFt*** gene occur together and are associated with human cancer.
CTNNB١: Beta Catenin Protein
GSK-٣β: Glycogen Serine Kinase-٣

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت پژوهشي دانشگاه آزاد اسلامي واحد تبریز صمیمانه قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

١. Aoki, K. and Taketo, M. (٢٠٠٧): Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene J. Cell Sci., ١٢٠: ٣٣٢٧-٣٣٣٥.
٢. Bird, R.P. (١٩٩٥): Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. Cancer Letters, ٩٣: ٥٥-٧١.
٣. Brabetz, T., Jung, H., Faller, G. and Kichner, T. (٢٠٠٠): Expression of nuclear β-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity colorectal adenoma. Am. J. Pathol., ١٥٦: ٨٦٥-٨٧٠.
٤. Brembeck, F.H. and Rosario, M. (٢٠٠٦): Birchmeier W. Balancing cell adhesion and wnt signaling, the key role of β-catenin. Curr. Opin. Gen. Dev., ١٦: ٥١-٥٩.
٥. Chithra, V. and Leelamma, S. (٢٠٠٠): Coriandrum sati٦um — effect on lipid metabolism in ١, ٢-dimethyl hydrazine induced colon cancer. Journal of Ethnopharmacology, ٧١: ٤٥٧-٤٦٣.
٦. Carmen, A., Meirong, Xu., Gayle, A. and Roderick, H. (٢٠٠١): Dashwood. ß-Catenin mutation in rat colon tumors initiated by ١, ٢-dimethylhydrazine and ٢-amino-methylimidazo [٤, ٥-f] quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-٣-carbinol carcinogenesis. food and chemical toxicology, ٢: ٣١٥-٣٢٠.
٧. Dias, M.C., Spinardi-Barbian, A.L.T., Rodrigues, M.A.M., Camargo, J.L.V., Teran, E. and Barbisan, L.F. (٢٠٠٦): Lack of chamopreventive effect of ginger on colon carcinogenesis induced by ١, ٢-dimethylhydrazine in rats.food and chemical toxicology, ٤٤: ٨٧٧-٨٨٤.
٨. Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (١٩٩٠): A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, ٦١: ٧٥٩-٧٦٧.
٩. Goss, K.H. and Groden, J. (٢٠٠٠): Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. J. Clin. Oncol., ١٨: ١٩٦٧-١٩٧٩.

۱۰. Hecht, A. and Kemler, R. (۲۰۰۰): Curbing the nuclear activities of ß-catenin: control over Wnt target gene expression. EMBO Rep., ۱: ۲٤-۲۸.
۱۱. Honmat, M. and Suzuki, Y. (۲۰۰۰): Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. British Journal of Cancer, ۸۲: ۱٦۸۹-۱٦۹۳.
۱۲. Kamaleeswari, M., Deeptha, K., Sengottuvelan, M. and Nalini, N. (۲۰۰٦): Effect of dietary caraway (Carum carvi L.) on aberrant crypt foci development, fecal steroids, and intestinal alkaline phosphatase activities in ۱،۲-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology, ۲۱٤: ۲۹۰-۲۹٦.
۱۳. Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., Van Wichen, D., De Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Clevers, H. (۲۰۰۵): Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science, ۲۱: ۱۷۸٤-۱۷۸۷.
۱٤. Manju, V. and Nalini, N. (۲۰۰۵): Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of ۱،۲ dimethylhydrazine-induced colon cancer. Clinica Chimica Acta., ۳۵۸: ٦۰-٦۷.
۱۵. Rodrigues, M.A.M., Silva, L.A.G., Salvadori, D.M.F., Camargo, J.L.V. and Montenegro, M.R. (۲۰۰۲): Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, ۳۵: ۳۵۱-۳۵۵.
۱٦. Roberts, J.D., Berndt, S., Marine, J. and Anastas, N. (۲۰۰۸): New regulators of Wnt/ {beta}-catenin signaling revealed by integrative molecular screening. Science Signaling, ۱: ۱۲-۱۸.
۱۷. Shibata, H.H., Takano, H. and Ito, M. (۲۰۰۷): β-Catenin is essential in intestinal adenoma formation. PNAS, ۱۰٤: ۱۸۱۹۹-۱۸۲۰٤.
۱۸. Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (۱۹۹۸): Mutational analysis of the APC/ß-Catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. Cancer Res., ۵۸: ۱۱۳۰-۱۱۳٤.
۱۹. Thurnherr, N., Deschner, E.E., Stonehill, E.H. and Lipkin, M. (۱۹۷۳): Induction of adenocarcinomas in the colon in mice by weekly injection of ۱،۲-dimethylhydrazine. Cancer Research, ۳۳: ۹٤۰-۹٤۵.
۲۰. Oyama, T., Yamada, K. and Hata, K. (۲۰۰۸): Further upregulation of beta-catenin/Tcf transcription is involved in the development of macroscopic tumors in the colon of ApcMin/+ mice. Carcinogenesis, ۲۹: ٦٦٦-٦۷۲.
۲۱. Polakis, P. (۲۰۰۰): Wnt signaling and cancer. Genes Dev., ۱٤: ۱۸۳۷-۱۸۵۱.
۲۲. Wanitsuwan, W., Kanngurn, S., Boonpipattanapong, T., Sangthong, R. and Sangkhathat, S. (۲۰۰۸): Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. World J. Gastroenterol., ۱٤(۳۹): ٦۰۵۲-٦۰۵۹.
۲۳. Yasuhiro, Y. and Hideki, M. (۲۰۰۳): Pre-cancerous lesions for colorectal cancer in rodent a new concept. Carcinogenesis, ۲٤: ۱۰۱۵-۱۰۱۹.
۲٤. Nelson, R.L. Dietary minerals and colorectal cancer. In: Rowland, I.R. (۱۹۹۱): Nutrition, Toxicity and Cancer. CRC Press, London, pp: ٤۹۱-۵۱۵.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. ۳, ۲: ٤۵۱-٤۵۷, ۲۰۰۹

Immunohistochemical study of β-catenin in experimental colon carcinoma of rat

Doustar, Y.[۱*], Mohajeri, D.[۱], Fathi Azar, F.[۲], Namvaran, A.[۳]

۱- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
۲- Faculty of Pharmacy, Medical Science of Tabriz University, Tabriz, Iran
۳-Graduate of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
**Corresponding author's email: vetdoustar@yahoo.com*
(Received: ۲۰۰۹/۱/۱۷, Accepted: ۲۰۰۹/۱۰/۲۸)

Abstract

Colorectal adenocarcinoma is one of the most prevalent and treatable malignancies of the gastrointestinal tract. Recent studies on colorectal neoplasia indicates β-catenin gene mutation and its intranuclear accumulation inside hyperplastic cells. Therefore, β-catenin may be an important prognosis and diagnostic index of this disease. The aim of this study is to evaluate the nuclear beta-catenin expression in hyperplastic cells of colon following treatment with ۱،۲-dimethylhydrazine. In this study, ٥٦ wistar male rats with the age of ۱۲ weeks and body weight of ۲۰۰-۳۰۰g were selected and randomly allocated into two equal treatment and control groups. In the treatment group, two subcutaneous injections of ۱،۲-dimethylhydrazine every week at a dose rate of ٤٠ mg/kg were used for ٤ weeks to induce colon carcinoma. The control group was given normal saline solution similarly. After ٨ weeks, tissues samples of distal colon were collected from both groups for preparation of tissue sections and immunohistochemistry. Immunohistopathological study of samples revealed that nuclear β-catenin expression in the treatment group was significantly higher than the control group (p<۰،۰۱). The study indicates that the expression of nuclear beta-catenin can increase in hyperplasia and neoplasia of colon.

Keywords: Colon, Carcinoma, β-catenin, Immunohistochemistry