



بررسی تغییرات میزان بیان ژن *CUL3* در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال و پولیپ در ایران

زهرا طاهری^۱، شیوا ایرانی^{۱*}، حمید اسدزاده عقدایی^۲، محمدحسین مدرسی^۳، زهرا نورمحمدی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: shi_irani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۰

چکیده

سرطان روده بزرگ یا کولورکتال (CRC) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های کشنده است که در اثر عوامل محیطی و ژنتیکی ایجاد می‌گردد. نظر به فراوانی رو به افزایش CRC در سراسر جهان و به ویژه در ایران، اهمیت تحقیقات بر روی CRC به طور گسترده‌تری مشخص می‌گردد. مطالعه اخیر به منظور شناسایی بیومارکر جدید، بر روی مسیرهای ملکولی دخیل در کارسینوژنز سرطان روده، که تشخیص و درمان سرطان را بهبود بخشد، متمرکز شده است. سرطان روده بزرگ حاصل دیسپلازی در زوائد اولیه روده که به نام پولیپ شناخته می‌شوند، ایجاد می‌گردد، این زوائد اولیه از لحاظ مورفولوژیکی و مکانیسم‌های ملکولی و توانایی ایجاد سرطان روده ناشناخته و متفاوت می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن *CUL3* در پولیپ‌ها و سرطان کولورکتال می‌باشد. در این مطالعه مقطعی، ۲۰۸ نمونه بیوپسی بافتی کولورکتال از جمله ۳۴ نمونه بافت توموری، ۶۰ ضایعه پیش سرطانی با بافت مجاورشان و ۲۰ نمونه بافت نرمال جمع‌آوری شد. بیان ژن *CUL3* با روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان mRNA ژن *CUL3* بین بافت‌های پولیپ و نمونه‌های مجاورشان مشاهده نشد ($p = 0/35$). نتایج ما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *CUL3* بین بافت‌های توموری و نمونه‌های نرمال مجاورشان ($p = 0/89$) و همچنین بین گروه‌های توموری و پولیپی نشان نداد ($p = 0/48$). *CUL3* ممکن است از طریق تحریک تخریب پروتئوزومال سرکوبگرهای مختلف تومورها و یا انکوژن‌ها نقش مهمی در تنظیم سرطان و پیشرفت CRC ایفا کند. مطالعات بر روی سوبستراهای اثر پذیر توسط *CUL3* در سرطان کولورکتال حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، پولیپ، *CUL3*، کولون، رکتوم.

مقدمه

(۱۲). سرطان روده بزرگ یا کولورکتال (Colorectal Cancer یا CRC) که همچنین به نام‌های سرطان کولون، سرطان رکتوم نیز شناخته می‌شود، شایع‌ترین تومور بدخیم است که از سلول‌های اپیتلیال در روده بزرگ یا راست روده توسعه و شروع به پیشرفت

سرطان یک اختلال ژنتیکی است که در آن کنترل نرمال رشد و تقسیم سلول از بین می‌رود و شامل همه انواع تومورهای بدخیم می‌شود که با نام نئوپلاسم شناخته می‌شود و در اثر پخش شدن به سایر ارگان‌ها و ایجاد متاستاز، از دلایل عمده‌ی مرگ می‌باشند



می‌کند (۲۰). CRC سومین نوع معمول سرطان در سراسر جهان است. نرخ وقوع سرطان روده و کولون توسط موسسه ملی سرطان آمریکا (National Cancer Institute) تا پایان سال ۲۰۱۴ میلادی، ۱۳۶۸۳۰ مورد و میزان مرگ و میر ناشی از آن در حدود ۵۰ هزار نفر، تخمین زده شده بود (۳).

در ایران نیز بر اساس برآورد سالانه حدود ۵۰۰۰ مورد جدید از سرطان روده بزرگ در کشور تشخیص داده می‌شود (۲۱). به طور دقیق‌تر، بر اساس آمار منتشر شده توسط وزارت بهداشت ایران، در سال ۱۳۸۴، میزان مرگ و میر به علت این نوع سرطان، ۱۱۳۰ نفر شامل ۴۵۰ زن و ۶۸۰ مرد بوده است (۱۶).

خطر CRC در جمعیت عمومی حدود ۵ درصد است که به تدریج با سن افزایش می‌یابد (۱۸). بر مبنای توسعه تکنولوژی‌های مبتنی بر ژنوم مشخص شده است که CRC را می‌توان به عنوان یک بیماری ناهمگن با نرخ بقای متفاوت شامل ۹۰ درصد نرخ بقای پنج ساله برای بیماران در مراحل اولیه‌ی سرطان و ۱۰ درصد برای کسانی که مبتلا به سرطان متاستاتیک به نواحی دوردست می‌باشند، در نظر گرفت که این امر نیاز مبرم شناسایی بیومارکرهایی مفید برای تشخیص زودهنگام این بیماری را خاطر نشان می‌کند (۴، ۱۷).

به توده‌های خوش‌خیم کولون، پولیپ گفته می‌شود. پولیپ‌های کولون در واقع رشد فزاینده سلول‌های سنگفرشی (مخاطی روده) هستند، که در جدار روده بزرگ یا راست روده اتفاق می‌افتد (۲۲).

پولیپ‌های نئوپلاستیک می‌توانند به CRC ختم شوند، رویدادی که باعث این تغییر شکل می‌شود، در ارتباط با توالی آدنوما به کارسینوما است (۲). سرطان کولون ناشی از تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سلول‌های اپیتلیالی کولون است که آنها را به کارسینوما تبدیل می‌کند (۱۳).

NRF2-KEAP1 یکی از مهم‌ترین مسیرهای بقا و دفاع سلول است. *NRF2* سلول‌ها و بافت‌ها را از اقسام داروهای سمی و کارسینوژن‌ها با افزایش بیان شماری از ژن‌های محافظ سلولی (cytoprotective)، حفاظت می‌کند (۲۳). *CUL3* رسپتور سوسترایی برای *KEAP1* است که فاکتور رونویسی *NRF2* را برای یوبی کوئیتینه شدن و تخریب هدف قرار می‌دهد. در نتیجه، تخریب *NRF2* به واسطه *CUL3* در پاسخ به استرس‌های سلولی که بقای سلول‌های طبیعی و سرطانی را تحت کنترل قرار می‌دهد، بسیار قابل توجه است (۵). کمپلکس‌های مولتی‌پروتئین Cullin-RING بزرگترین خانواده لیگازهای یوبی کوئیتین را تشکیل می‌دهند، که در آن یک Cullin خاص به عنوان داربست برای پیوند دو واحد عملکردی استفاده می‌شود. خانواده انسانی Cullin از هشت عضو تشکیل شده است که شامل *CUL1*، *CUL2*، *CUL3*، *CUL4A*، *CUL4B*، *CUL5*، *CUL7* و *CUL9* می‌باشد (۱۹).

CUL3، پروتئین حاوی دمین BTB به عنوان آداپتور برای اتصال با سوستر عمل می‌کند. *CUL3* برای کمپلکس‌های پروتئین لیگاز-یوبی کوئیتین‌های چندگانه که در تنظیم یوبی کوئیتینه کردن (ubiquitination) و همچنین فعالیت‌های تخریب پروتئازومی پروتئین هدف نقش دارند، بسیار عملکردی است (۱۹). بیماران سرطان روده بزرگ با کمبود علائم بالینی تا مراحل انتهایی مواجه می‌باشند، که این عامل منجر به تشخیص دیر هنگام و بروز پیش‌آگهی ضعیف و افزایش میزان مرگ و میر می‌شود. در حال حاضر تشخیص اولیه در بیماران، در ۸۰ درصد موارد منجر به درمان می‌شود، لذا شناسایی ابزارهای مناسب برای غربالگری سرطان روده بزرگ که ساده، مقرون به صرفه، اختصاصی و حساس باشند، یک اولویت اساسی می‌باشد.

می‌کند (۲۰). CRC سومین نوع معمول سرطان در سراسر جهان است. نرخ وقوع سرطان روده و کولون توسط موسسه ملی سرطان آمریکا (National Cancer Institute) تا پایان سال ۲۰۱۴ میلادی، ۱۳۶۸۳۰ مورد و میزان مرگ و میر ناشی از آن در حدود ۵۰ هزار نفر، تخمین زده شده بود (۳).

در ایران نیز بر اساس برآورد سالانه حدود ۵۰۰۰ مورد جدید از سرطان روده بزرگ در کشور تشخیص داده می‌شود (۲۱). به طور دقیق‌تر، بر اساس آمار منتشر شده توسط وزارت بهداشت ایران، در سال ۱۳۸۴، میزان مرگ و میر به علت این نوع سرطان، ۱۱۳۰ نفر شامل ۴۵۰ زن و ۶۸۰ مرد بوده است (۱۶).

خطر CRC در جمعیت عمومی حدود ۵ درصد است که به تدریج با سن افزایش می‌یابد (۱۸). بر مبنای توسعه تکنولوژی‌های مبتنی بر ژنوم مشخص شده است که CRC را می‌توان به عنوان یک بیماری ناهمگن با نرخ بقای متفاوت شامل ۹۰ درصد نرخ بقای پنج ساله برای بیماران در مراحل اولیه‌ی سرطان و ۱۰ درصد برای کسانی که مبتلا به سرطان متاستاتیک به نواحی دوردست می‌باشند، در نظر گرفت که این امر نیاز مبرم شناسایی بیومارکرهایی مفید برای تشخیص زودهنگام این بیماری را خاطر نشان می‌کند (۴، ۱۷).

به توده‌های خوش‌خیم کولون، پولیپ گفته می‌شود. پولیپ‌های کولون در واقع رشد فزاینده سلول‌های سنگفرشی (مخاطی روده) هستند، که در جدار روده بزرگ یا راست روده اتفاق می‌افتد (۲۲).

پولیپ‌های نئوپلاستیک می‌توانند به CRC ختم شوند، رویدادی که باعث این تغییر شکل می‌شود، در ارتباط با توالی آدنوما به کارسینوما است (۲). سرطان کولون ناشی از تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سلول‌های اپیتلیالی کولون است که آنها را به کارسینوما تبدیل می‌کند (۱۳).



حذف شدند. نمونه‌ها شامل بافت تازه از زوائد روده شامل پولیپ‌های اولیه و همچنین بافت تازه از تومور سرطانی روده بود و همچنین بافت نرمال از فاصله ۱ تا ۱۰ سانتی‌متر از زوائد برداشته شد. همه نمونه‌ها از نظر هیستوپاتولوژیکی بررسی گردید و تغییرات مرتبط توسط پاتولوژیست گزارش شد. بر طبق نظر پاتولوژیست نمونه‌های بافتی بیماران به سه گروه نمونه‌ها پولیپ، نرمال و تومور تقسیم‌بندی شدند. اطلاعات بالینی و دموگرافیک شامل سن، جنس، دیابت، استعمال سیگار، فشارخون، سابقه خانوادگی، IBD (Inflammatory Bowel Disease)، نوع نئوپلاسم، پاتولوژی، محل رخداد پس از فرایند کولونوسکوپی از مدارک بیماران به دست آمد.

استخراج RNA از بافت تازه و تعیین کیفیت و غلظت RNA استخراج شده با روش نورسنجی:

استخراج RNA از نمونه‌های بافتی توسط کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) بر اساس پروتوکول مربوطه انجام گرفت. خلوص نمونه‌های RNA استخراج شده و همچنین غلظت بهینه و مناسب RNA بررسی شد. در این راستا برای تعیین غلظت نمونه‌های RNA از دستگاه 2000 Thermo Scientific NANODRAP استفاده شد. نمونه‌هایی که نسبت A260/A280، بین 1.8 تا 2 بودند، برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفتند.

cDNA سازی توسط تکنیک RT-PCR: دو

میکروگرم از توتال RNA استخراجی از هر نمونه با استفاده از پرایمر راندوم هگزانوکلوئوتید (Hexanucleotides random) به کمک کیت Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase طبق دستورالعمل، cDNA سازی انجام شد و در منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در مرحله‌ی بعد از ساخت cDNA، طراحی پرایمر انجام گردید.

به علت نقش بالقوه مسیر *NRF2/KEAP1* در تومورزایی، بقاء، رشد سلول‌های سرطانی، متاستاز و همچنین نقش در مقاومت دارویی، بررسی بیان ژن کلیدی *CUL3* درگیر در این مسیر، در انواع پولیپ‌ها و بافت‌های توموری روده بزرگ و بافت‌های سالم و مقایسه این اطلاعات با ویژگی‌های کلینوپاتولوژیکی و تدوین اطلاعاتی از نقش فعالیت این ژن‌ها در ایجاد، پیشرفت و توسعه سرطان کولورکتال از مرحله پولیپ تا ایجاد سرطان‌های متاستاتیک مورد هدف قرار گرفت. همچنین بررسی اختصاصیت بافتی تغییرات و ارائه‌ی بیومارکری برای پیش‌آگهی و تشخیص در زوائد اولیه‌ی پیش‌سرطانی کولون و در سرطان کولورکتال مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه و روند نمونه‌گیری: در این مطالعه مقطعی - زمانی (cross-sectional)، تعداد ۲۰۸ نمونه پاتولوژی (۳۴ نمونه توموری، ۶۰ نمونه پولیپ به همراه بافت‌های مجاورشان و ۲۰ نمونه بافت نرمال) مربوط به بیماران دارای علائم گوارشی که در سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶ به بیمارستان طالقانی مراجعه کردند، جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. قبل از گرفتن نمونه‌های بافتی، رضایت نامه آگاهانه از افراد شرکت کننده اخذ گردید. این مطالعه توسط کمیته اخلاقی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران با کد اخلاقی IR.SBMU.RIGLD.REC.1395.925 تصویب گردید. معیار ورود به مطالعه، انجام کولونوسکوپی برای هر دو گروه و جواب مثبت پاتولوژی برای گروه بیمار و جواب پاتولوژی منفی برای گروه سالم بود. هیچ یک از بیماران تحت شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی قرار نگرفته بودند و انواع دیگری از سرطان را نداشتند. همچنین بیمارانی که تابعیت ایرانی نداشتند، از مطالعه



ثانیه بود (مرحله Aneling) و برای مرحله extention ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ ثانیه تعریف شد. در نهایت برای آنالیز منحنی ذوب از ۷۲ تا ۹۷ درجه سانتی‌گراد با افزایش (Rising value) ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر سیکل اجرا شد.

آنالیز آماری: آنالیز آماری با به کار بردن نرم‌افزار آماری نسخه SPSS 19 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اطلاعات کمی به شکل میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شد. برای آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمی بیان ژن، اطلاعات بیان ژن *CUL3* برابر BACTIN به عنوان ژن مرجع نرمال شد. اطلاعات آنالیزی با به کار بردن متد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و log آن نمایش داده شد. Graph Pad Prism7 (Graph Pad Inc., USA) برای آنالیز آماری بیانی ژن مورد استفاده قرار گرفت و معناداری اختلافات برای بیان ژن بین گروه کنترل و گروه مورد به وسیله آزمون آماری T مورد تخمین قرار گرفت. $p < 0/05$ به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

طراحی پرایمر: توالی‌های ژن‌های مورد نظر از پایگاه داده NCBI تهیه گردید و طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Blast صورت گرفت. در این مطالعه برای جلوگیری از تکثیر DNA ژنومی، سعی گردید تا پرایمرهای بالادست و پایین‌دست روی اگزون‌های جداگانه یا مرز اگزون طراحی شوند.

نحوه انجام Real time PCR: برای بررسی سطوح بیان mRNA ژن *CUL3* از تکنیک Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) استفاده شد که با استفاده از کیت تجاری (Takara SYBER Premix Ex TaqII و با دستگاه Real-Time PCR Rotor gene 6000 انجام شد. سطح نسبی بیان ژن‌ها با مقایسه ژن رفرنس BACTIN به عنوان کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

شرایط سیکل دمایی Real time PCR برای ژن *CUL3* به قرار ذیل بود: یک مرحله ۹۵ درجه سانتی-گراد برای ۳۰ ثانیه به جهت فعال‌سازی آغازی آنزیم پلیمراز، در ادامه ۴۰ سیکل که شامل ۹۵ درجه سانتی-گراد برای ۵ ثانیه و ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن با تکنیک Real time PCR

نام ژن	توالی پرایمر
<i>CUL3 F</i>	5' - CCAACACAGCGGGTTCTTAC -3'
<i>CUL3 R</i>	5' - CTCTCTGGGTCGGATTCAC -3'
β -ACTIN F	5' - GATTCCTATGTGGGCGACGA-3'
β -ACTIN R	5' - GTACATGGCTGGGGTGTGA-3'

جدول ۲- مواد موجود در مستر میکس واکنش Real - Time برای ژن‌های مورد بررسی

مقدار	مواد داخل مستر میکس
۱۰ میکرولیتر	SYBER
۱ میکرولیتر	پرایمر Reverse (۱۰ pM)
۱ میکرولیتر	پرایمر Forward (۱۰ pM)
۷ میکرولیتر	آب RNAase Free
۱ میکرولیتر	cDNA نمونه رقیق شده با آب



نتایج

نشان دهنده اختصاصی بودن شرایط انجام Real time PCR برای این ژن می‌باشد.

الگوی بیان ژن *CUL3* در نمونه‌های تومور و پولیپ و بافت نرمال مجاور: مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *CUL3* در گروه پولیپ در مقایسه با گروه نرمال مجاورش که در برابر *BACTIN* به عنوان ژن مرجع نرمال شده است، در شکل A-2 نشان داده شده است. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان mRNA ژن *CUL3* بین بافت‌های پولیپ و نمونه‌های مجاورشان مشاهده نشد ($p = 0/35$). در مقایسه بیان ژن *CUL3* در نمونه‌های تومور و نرمال مجاورش بیان mRNA ژن *CUL3* در گروه توموری نسبت به نرمال دچار تغییرات قابل توجهی نشده بود ($p = 0/89$) (شکل B-2). در مقایسه بیان mRNA ژن *CUL3* در نمونه‌های تومور و پولیپ تفاوت بیان mRNA ژن *CUL3* از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p = 0/48$) (شکل C-2).

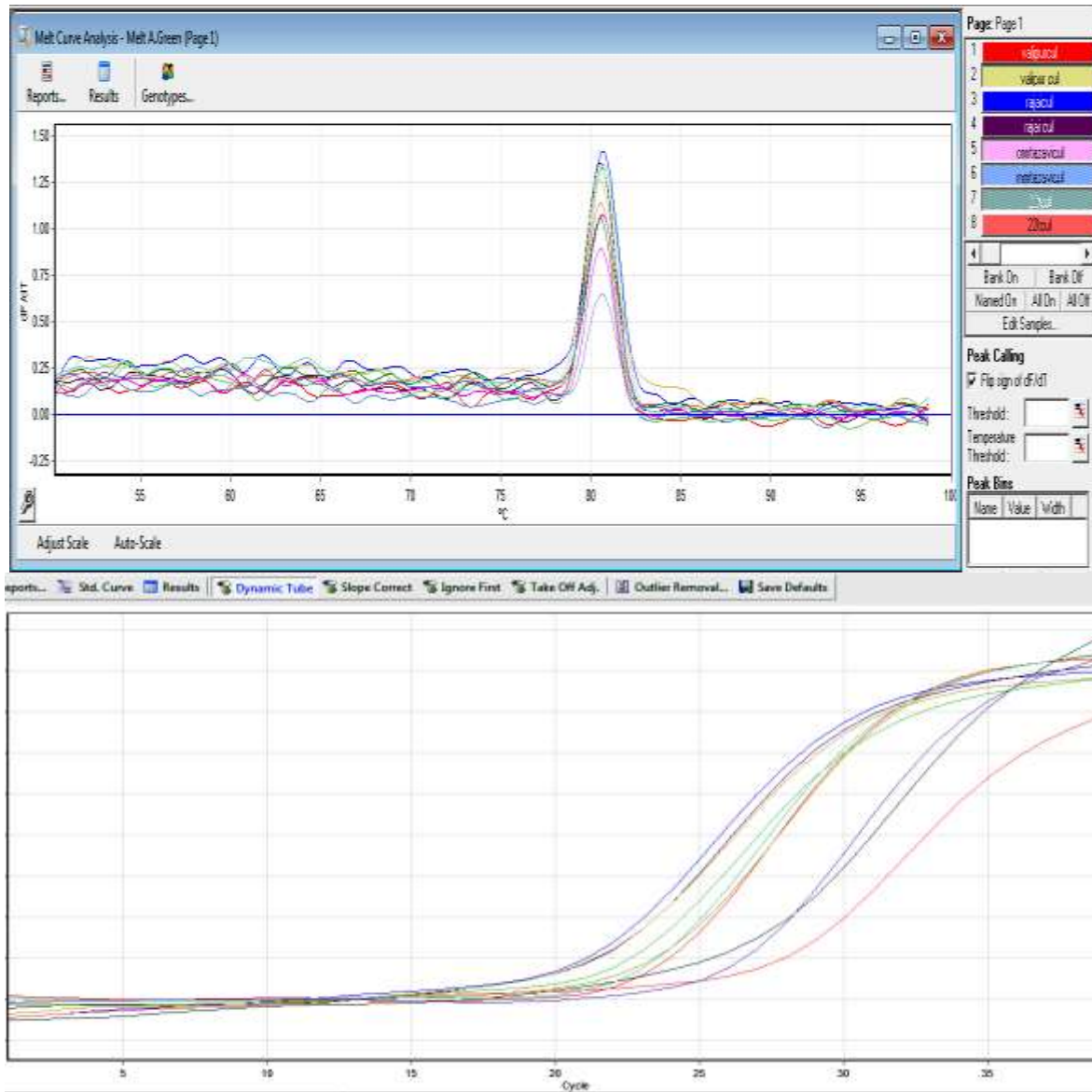
اطلاعات آماری کلی از افراد مورد مطالعه: این مطالعه بر روی ۲۰۸ نمونه که شامل بافت‌های کولورکتال و بافت‌های مجاورش بود انجام شد (۵۸ مرد و ۵۶ زن). میانگین سنی بیماران با پولیپ و تومور و همچنین افراد نرمال به ترتیب $58/6 \pm 12/7$ ، $53/7 \pm 9/2$ و $61 \pm 9/2$ سال بود. همچنین شاخص توده بدنی (BMI) در گروه‌های فوق به ترتیب $2/8 \pm 25/2$ ، $2/9 \pm 24/9$ و $3/8 \pm 26/3$ کیلوگرم بر متر مربع بود. جزئیات بیشتر در خصوص ویژگی‌های دموگرافیک و کلینوپاتولوژیکی در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که در جدول ۳ مشخص شده، نمونه‌ها شامل ۸۴ مورد (۷۳/۷ درصد) از کولون و ۳۰ مورد (۲۶/۳ درصد) نمونه از رکتوم بود و اغلب شرکت‌کنندگان در این پژوهش سابقه خانوادگی، دیابت، فشارخون، بیماری‌های التهابی روده را نداشتند.

انجام q-RT PCR: منحنی تکثیر و ذوب مربوط به ژن *CUL3* را می‌توان در شکل ۱ مشاهده نمود که

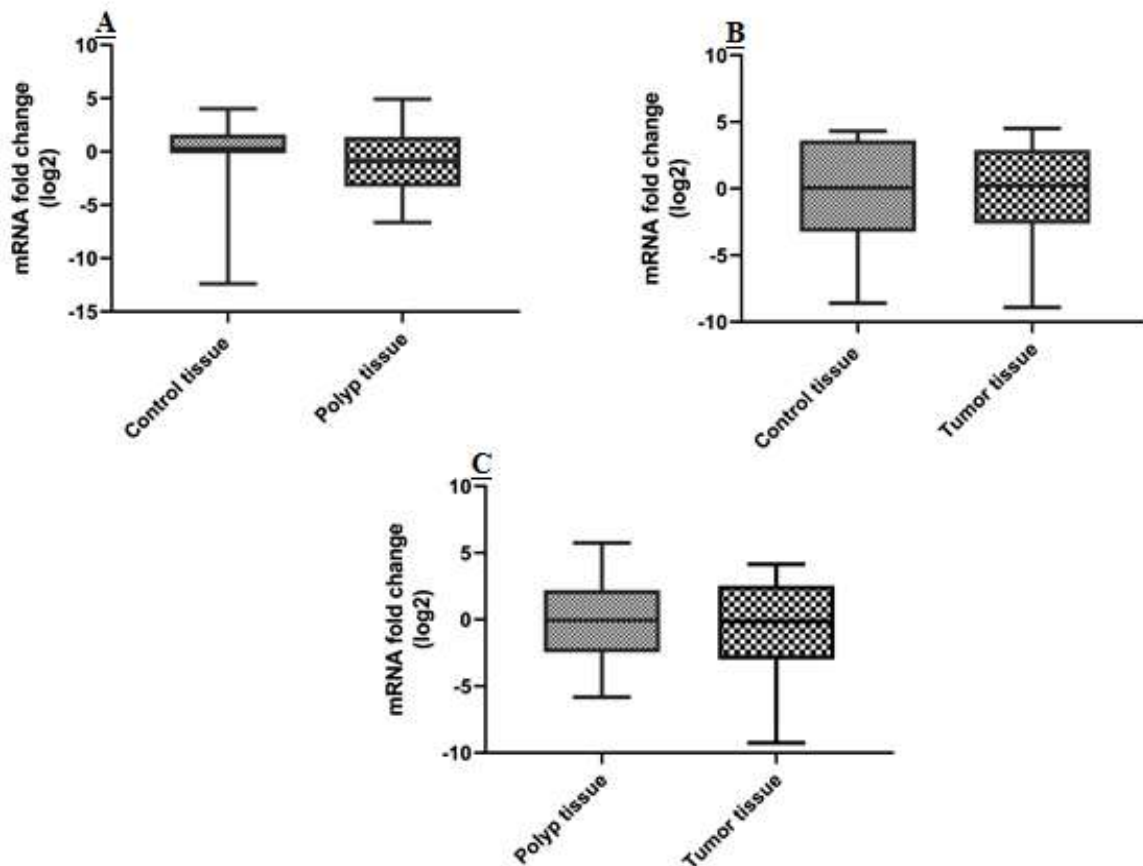


جدول ۳- فراوانی ویژگی‌های کلینوپاتولوژیکی و دموگرافیک از بیماران ایرانی با و بدون CRC

p-value	متغیرها	پولیپ (n = ۶۰)	تومور (n = ۳۴)	نرمال (n = ۲۰)
۰/۵۴	سن** (میانگین \pm انحراف معیار)	۵۸/۶ \pm ۱۲/۷	۶۱ \pm ۱۳/۷	۵۷/۳ \pm ۹/۲
۰/۲۶	نمایه توده بدن** (میانگین \pm انحراف معیار)	۲۵/۲ \pm ۲/۸	۲۴/۹ \pm ۲/۹	۲۶/۳ \pm ۳/۸
۰/۱۹	جنس* (درصد)			
	زن	۲۷(۴۵/۰٪)	۲۱(۶۱/۸٪)	۸(۴۰/۰٪)
	مرد	۳۳(۵۵/۰٪)	۱۳(۳۸/۰٪)	۱۲(۶۰/۰٪)
۰/۵۰	سابقه خانوادگی* (درصد)			
	خیر	۴۷(۷۸/۳٪)	۲۸(۸۲/۴٪)	۱۸(۹۰/۰٪)
	بله	۱۳(۲۱/۷٪)	۶(۱۷/۶٪)	۲(۱۰/۰٪)
۰/۱۰	مصرف سیگار* (درصد)			
	خیر	۵۴(۹۰/۰٪)	۲۵(۷۳/۵٪)	۱۷(۸۵/۰٪)
	بله	۶(۱۰/۰٪)	۹(۲۶/۵٪)	۳(۱۵/۰٪)
۰/۰۰۸	جایگاه* (درصد)			
	کولون	۵۱(۸۵/۰٪)	۱۹(۵۵/۹٪)	۱۴(۷۰/۰٪)
	رکتوم	۹(۱۵/۰٪)	۱۵(۴۴/۱٪)	۶(۳۰/۰٪)
۰/۱۴	بیماری‌های التهابی روده* (درصد)			
	خیر	۵۳(۸۸/۳٪)	۲۸(۸۲/۴٪)	۲۰(۱۰۰/۰٪)
	بله	۷(۱۱/۷٪)	۶(۱۷/۶٪)	۰(۰/۰٪)
۰/۵۷	فشار خون* (درصد)			
	خیر	۴۸(۸۰/۰٪)	۳۰(۸۸/۲٪)	۱۶(۸۰/۰٪)
	بله	۱۲(۲۰/۰٪)	۴(۱۱/۸٪)	۴(۲۰/۰٪)
۰/۷۴	ابتلا به دیابت* (درصد)			
	خیر	۵۱(۸۵/۰٪)	۲۸(۸۲/۴٪)	۱۸(۹۰/۰٪)
	بله	۹(۱۵/۰٪)	۶(۱۷/۶٪)	۲(۱۰/۰٪)



شکل ۱- منحنی تکثیر و ذوب مربوط به ژن *CUL3*



شکل ۲- نمودار نشانگر، میانگین \pm انحراف معیار ارزش $\Delta\Delta\text{ct}$ مربوط به بیان mRNA ژن *CUL3*

(A): بیان نسبی *CUL3* بین گروه پولیپ در مقایسه با بافت سالم مجاور رابطه معناداری یافت نشد ($p = 0/35$): بیان نسبی

CUL3 بین گروه تومور در مقایسه با بافت سالم مجاور دچار تغییرات قابل توجهی نشده بود ($p = 0/89$): بیان نسبی

CUL3 بین گروه تومور در مقایسه با گروه پولیپ رابطه معناداری یافت نشد ($p = 0/48$)

بحث

(۱۱). شیوع سرطان روده بزرگ در ایران نیز در حال افزایش است و با توجه به نسبت بالای جمعیت جوان در ایران، انتظار می‌رود در سال‌های آینده با توجه به مسن تر شدن جمعیت کشور شاهد رشد شیوع انواع مختلف سرطان، مانند سرطان کولورکتال باشیم. بر اساس آمار منتشر شده توسط وزارت بهداشت ایران در سال ۱۳۸۴ سالیانه ۱۱۳۰ نفر شامل ۶۸۰ مرد و ۴۵۰ زن به دلیل ابتلا به این نوع سرطان فوت می‌کنند (۲۱). با وجود اینکه در حال حاضر برای غربالگری سرطان کولورکتال، کولونوسکوپی دقیق‌ترین روش

با وجود پیشرفت‌های فراوان در علوم مختلف در طی سال‌های اخیر، سرطان همچنان از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده‌ی زندگی بشر محسوب می‌شود. سرطان کولورکتال (CRC) سومین بدخیمی شایع منجر به مرگ ناشی از سرطان در جهان می‌باشد، به طوری که در بین سرطان‌های دستگاه گوارش مقام اول را حتی قبل از سرطان معده دارد (۲). طبق برآوردی که در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت، سرطان کولورکتال علت ۱/۲ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان و دلیل ۶۰۸۷۰۰ مورد، مرگ در این سال در سراسر جهان بوده است



ارتباط با رفتار توموری و پاسخ‌های درمانی نیز ارائه شده است.

Grau و همکاران نشان دادند که بیان بیش از حد *CUL3* مسئول پیشرفت، متاستاز و نتیجه بالینی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان مثانه است (۸).

به طور مشابه، داده‌های جمع‌آوری شده توسط Huo و همکارانش نشان دادند که افزایش بیان *CUL3* با تهاجم و متاستاز در سرطان پستان ارتباط دارد (۱۰).

از طرفی وانگ و همکارانش نشان دادند که *CUL3* نقش مهمی در تکثیر سلولی سرطان روده بزرگ از طریق هدف قرار دادن متیونین آدنوزیل ترانسفراز $\text{H}\alpha$ برای تخریب به واسطه یوبی‌کوئیتین شدن دارد (۲۵).

از سوبسترای دیگر یوبی‌کوئیتین لیگاز *CUL3-KEAP1* می‌توان به *IKK β* اشاره کرد که از طریق فعال شدن مسیر *NF- κ B* در توسعه و پیشرفت تومور نقش دارد.

Lee و همکارانش با حذف *KEAP1* منجر به تثبیت و تجمع *IKK β* و افزایش متعاقب فاکتورهای رگ‌زایی وابسته به *NF- κ B* شدند. بنابراین، اختلال در تنظیم ubiquitination از *IKK β* با واسطه *CUL3* احتمالاً یک عامل موثر در ایجاد تومور است (۱۴).

بر اساس نتایج ما، بیان *CUL3* در بافت نئوپلاستی روده‌ی بزرگ رابطه معناداری نشان نداد.

نتیجه‌گیری

ژن *CUL3* ممکن است نقش متمایزی در تنظیم سرطان‌زایی و پیشرفت در این بدخیمی از طریق تخریب به واسطه‌ی Ubiquitination از ژن‌های مختلف سرکوبگر تومور یا آنکوژن‌ها داشته باشد، لذا مطالعات بیشتری بر روی سوبستراهای اثرپذیر توسط *CUL3* در سرطان کولورکتال لازم می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از تمام افرادی که در این مطالعه مشارکت نمودند کمال قدردانی و تشکر را داریم. این پروژه توسط

می‌باشد، اما این روش علاوه بر پرهزینه بودن، تهاجمی و پیچیده نیز می‌باشد (۲۴). از طرفی تشخیص زودهنگام نئوپلاسم‌های روده‌ی بزرگ حائز اهمیت بالقوه‌ای می‌باشد، زیرا مرگ و میر را کاهش داده و میزان بقا در بیماران CRC را افزایش می‌دهد (۱، ۷). بنابراین، یافتن یک بیومارکر برای تشخیص سرطان در مراحل اولیه، نگرانی عمده در این زمینه است. پروتئولیز پروتئین‌های سلولی وابسته به یوبی-کوئیتین نقش حیاتی در حفظ تعادل بین رشد طبیعی و تکثیر کنترل نشده ایفا می‌کند. *CUL3* از لیگازهای یوبی‌کوئیتین متعلق به کمپلکس‌های مولتی‌پروتئین Cullin-RING می‌باشد، *KEAP1* آداپتور سوبسترای *CUL3* است. در شرایط پایه کمپلکس *CUL3-KEAP1* می‌تواند *NRF2* را هدف قرار داده و منجر به تخریب وابسته به یوبی‌کوئیتین شود. در نتیجه، تخریب *NRF2* به واسطه *CUL3* در پاسخ به استرس‌های سلولی که بقای سلول‌های طبیعی و سرطانی را تحت کنترل قرار می‌دهد، بسیار قابل توجه است و می‌تواند اثرات عمیقی بر تومورزایی ایجاد کند (۵).

بر مبنای مطالعات انجام شده مشخص شده است که *CUL3* اغلب در برخی از بدخیمی‌های انسانی مثل سرطان مثانه (۸)، سرطان پستان (۹)، سرطان پروستات (۲۶) و سرطان‌های روده بزرگ (۲۵) دچار کاهش بیان می‌شود.

همچنین نشان داده شده که *CUL3* به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور در سرطان ریه (۶) و سرطان روده بزرگ (۲۵) نقش دارد. اخیراً Martinez و همکاران گزارش کرده‌اند که *CUL3* به همراه مسیر *NRF2* با پیش آگهی ضعیف در سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن مرتبط بوده است (۱۵) کاهش بیان *CUL3* می‌تواند با اثر بر مسیر *NRF2* اثرات عمیقی بر تومورزایی ایجاد کند. با این حال، گزارشات متناقضی در چندین تومور بدخیم همراه با بیان بیش از حد *CUL3* در



مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی
تهران حمایت شد.

منابع

8. Grau L., Luque-Garcia J.L., González-Peramato P., Theodorescu D., Palou J., Fernandez-Gomez J.M. 2013. A quantitative proteomic analysis uncovers the relevance of CUL3 in bladder cancer aggressiveness. *PLoS one*, 8(1): e53328.
9. Haagenson K.K., Tait L., Wang J., Shekhar M.P., Polin L., Chen W. 2012. Cullin-3 protein expression levels correlate with breast cancer progression. *Cancer Biology and Therapy*, 13(11):1042-1046.
10. Huo X., Li S., Shi T., Suo A., Ruan Z., Guo H. 2015. Cullin3 promotes breast cancer cells metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting BRMS1 for degradation. *Oncotarget*, 6(39): 41959.
11. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 61(2): 69-90.
12. Jemal A., Center M.M., DeSantis C., Ward E.M. 2010. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 19(8):1893-1907.
13. Lao V.V., Grady W.M. 2011. Epigenetics and colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(12): 686.
14. Lee D.F., Kuo H.P., Liu M., Chou C.K., Xia W., Du Y. 2009. KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF- κ B signaling by targeting IKK β . *Molecular Cell*, 36(1):131-140.
15. Martinez V.D., Vucic E.A., Thu K.L., Pikor L.A., Lam S., Lam W.L. 2015. Disruption of KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin ligase complex components by multiple genetic mechanisms: association with poor prognosis in head and neck cancer. *Head and Neck*, 37(5):727-734.
16. Montazer Haghighi M., Vahedi M., Mohebbi S.R., Pourhoseingholi M.A., Fatemi SR, Zali M.R. 2010. Evaluation of 4-year survival in familial and non familial
1. Bailey C.E., Hu C.Y., You Y.N., Bednarski B.K., Rodriguez-Bigas M.A., Skibber J.M. 2015. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surgery*, 150(1): 17-22.
2. Bazensky I., Shoobridge-Moran C., Yoder L.H. 2007. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors symptoms, and screening guidelines. *Medsurg Nursing*, 16(1): 46.
3. Center M.M., Jemal A., Smith R.A., Ward E. 2009. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 59(6): 366-378.
4. Coppedè F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L, 2014. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*: 20(4): 943.
5. Cullinan S.B., Gordan J.D., Jin J., Harper J.W., Diehl J.A. 2004. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19): 8477-8486.
6. Dorr C., Janik C., Weg M., Been R.A., Bader J., Kang R. 2015. Transposon mutagenesis screen identifies potential lung cancer drivers and CUL3 as a tumor suppressor. *Molecular Cancer Research*, 13(8): 1238-1247.
7. Edwards B.K., Ward E., Kohler B.A., Ehemann C., Zauber A.G., Anderson R.N. 2010. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, 116(3): 544-573.



22. Santero M., Lee D., 2007. Colon polyp symptoms, diagnosis and treatment. *MedicineNet.Com*.
23. Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M. 2011. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2): 123-140.
24. Triantafyllidis J.K., Vagianos C., Malgarinos G. 2015. Colonoscopy in colorectal cancer screening: Current aspects. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 6(3): 237-250.
25. Wang J., Zhu Z.H., Yang H.B., Zhang Y., Zhao X.N., Zhang M. 2016. Cullin 3 targets methionine adenosyltransferase II α for ubiquitylation-mediated degradation and regulates colorectal cancer cell proliferation. *The FEBS Journal*, 283(13): 2390-2402.
26. Yuan W.C., Lee Y.R., Huang S.F., Lin Y.M., Chen T.Y., Chung H.C. 2011. A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. *Cancer Cell*, 20(2): 214-228.
17. Mustafa M., Menon J., Muniandy R., Illzam E., Shah M., Sharifa A. 2016. Colorectal cancer: pathogenesis, management and prevention. *IOSR Journal of Dentistry Medical Sciences*, 15: 94-100.
18. Parker S.L., Tong T., Bolden S., Wingo PA, 1997. Cancer statistics, 1997. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 47(1): 5-27.
19. Petroski M.D., Deshaies R.J. 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(1): 9.
20. Riihimäki M., Hemminki A., Sundquist J., Hemminki K. 2016. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Scientific Reports*, 6: 29765.
21. Safaee A., Fatemi Seyed R., Ashtari S., Vahedi M., Moghimi-Dehkordi B., Zali R. 2012. Four years incidence rate of colorectal cancer in Iran: a survey of national cancer registry data-implications for screening. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(6): 2695-2698.

