

Correlation of Colorectal Cancer Stem Cell Marker CD24 Expression with Clinicopathologic Features and Survival of Patients with Colorectal Cancer from Sari, Iran

Anahita Nosrati¹, Farshad Naghshvar², Zhila Torabizadeh³, Fatemeh Salehi⁴

Original Article

¹ Assistant Professor, Department of Pathology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pathology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Pathology, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran

⁴ Resident, Department of Pathology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

ABSTRACT

Background:

Cancer stem cells are a subgroup of tumor cells that have the capability for self-renewal and differentiation and are characterized by multiple markers. Several studies have been conducted to identify these cells in colorectal cancer, including stem cell marker CD24. This study has evaluated the association of CD24 expression with clinicopathologic features and survival in an immunohistochemical (IHC) study that compared colorectal cancer tissues with adjacent normal tissues.

Materials and Methods:

The expression of CD24 in 50 paraffin embedded samples of colorectal cancer and adjacent normal tissue in patients referred to Imam Khomeini Hospital, Sari, Iran was examined by IHC. We studied the relationship between clinical and pathological features as well as the patient's condition in terms of metastasis, recurrence, type of treatment and death due to cancer treatment.

Results:

The 50 cases studied included 25 males and 25 females with a mean age of 57.64 ± 9.13 years (range: 28-93 years). There were 3 mucinous carcinoma and 47 adenocarcinoma samples. CD24 was positive in 29 cases and negative in 21 cases. CD24 expression correlated with combined surgery and chemotherapy treatment ($p=0.04$). A correlation existed with patient survival but it was not statistically significant. The mean survival time of patients according to CD24 expression was 26.64 ± 18.15 in cases that were CD24 negative and 41.75 ± 28.67 months in cases that were CD24 positive. Correlation of CD24 expression with other clinicopathologic factors was not significant ($p>0.05$).

Conclusion:

We have observed a relationship between the clinicopathologic feature of combined surgery and chemotherapy treatment to colorectal cancer stem cell marker expression. A nonsignificant correlation also existed with patient survival. To confirm these results, we recommend additional studies with larger sample sizes.

Keywords: Colorectal cancer; Cancer stem cells; CD24; Clinicopathologic; Relapse; Metastasis

please cite this paper as:

Nosrati A, Naghshvar F, Torabizadeh Zh, Salehi F. Correlation of Colorectal Cancer Stem Cell Marker CD24 Expression with Clinicopathologic Features and Survival of Patients with Colorectal Cancer from Sari, Iran. *Govaresh* 2014;19:86-94.

Corresponding author:

Zhila Torabizadeh, MD

Department of Pathology, Mazandaran University
of Medical Sciences, Sari, Iran

Telefax: +98 151 2222981

E-mail: zhtorabi@yahoo.com

Received: 10 Apr. 2014

Edited: 24 May 2014

Accepted: 25 May 2014

ارتباط بیان مارکر سلولهای بنیادی CD24 با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک و بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

آناهیتا نصرتی^۱، فرشاد نقشوار^۲، ژیلا ترابی زاده^۳، فاطمه صالحی^۴

^۱ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۲ استاد، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۳ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۴ دستیار تخصصی، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

سلول بنیادی سرطان (cancer stem cell) زیرگروهی از سلول های توموری می باشد که با توان خودنوسازی و توانایی تمایز چند رده ای مشخص می شوند. شناسایی این سلول ها در سرطان کولورکتال با بروز یک یا چند مارکر سطح سلولی در بررسی های متعددی انجام شده است، که از جمله مارکرهای سلول های بنیادی به کار رفته CD24 است. برای بررسی ارتباط این مارکر با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک و بقای بیماران بروز این پروتئین رادربافت های سرطانی کولورکتال وبافت های سالم مجاور آن بررسی شد.

روش بررسی:

بروز CD24 در ۵۰ بلوک پارافینی نمونه های سرطان کولورکتال و بافت نرمال مجاور تومور در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی شهر ساری با روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط بین ویژگی های بالینی و پاتولوژیک و هم چنین وضعیت بیمار از نظر متاستاز، عود، نوع درمان و مرگ ناشی از تومور بررسی شد.

یافته ها:

۵۰ نمونه مورد بررسی (۲۵ مرد و ۲۵ زن) با میانگین سنی $64/57 \pm 13/9$ سال با دامنه ۲۸-۹۳ سال شامل ۳ موسینوس کارسینوما و ۴۷ آدنوکارسینوما بود. بروز مارکر CD24 در ۲۹ مورد منفی و ۲۱ مورد مثبت بود. ارتباط بیان CD24 با نوع درمان (جراحی و شیمی درمانی تواما) معنادار است. (p -value = ۰/۰۴) و ارتباط با بقای بیماران نیز هرچند غیر معنا دار ولی با تفاوت دیده شد. (میانگین زمان بقاء بیماران بر حسب بیان CD24، برای افراد منفی $26/64 \pm 18/15$ و در افراد مثبت $41/75 \pm 28/67$ ماه). بیان CD24 با سایر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک معنادار نبود. (p -value > ۰/۰۵)

نتیجه گیری:

در طی بررسی انجام شده ارتباط بین بیان مارکرهای سلولهای بنیادی سرطان کولورکتال با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک مشاهده نشد. برای تایید نتایج انجام مطالعات میدانی وسیعتری با تعداد نمونه بیشتر توصیه می گردد.

کلید واژه: سرطان کولورکتال، سلول بنیادی سرطان، CD24، کلینیکوپاتولوژیک، عود، متاستاز

گوارش / دوره ۱۹، شماره ۲ / تابستان ۱۳۹۳ / ۸۶-۹۴

زمینه و هدف:

سرطان کولورکتال به عنوان دومین تا سومین نوع شایع سرطان و همچنین یکی از دلایل اصلی علت مرگ و میر ناشی از سرطان در غرب شناخته شده است (۱) و مسئول بیش از پانصد هزار مرگ سالیانه در کل دنیا است. (۲) در حال حاضر سرطان کولورکتال سومین علت شایع بیماری های ناشی از سرطان را هم در زنان و هم در مردان در آسیا تشکیل می دهد و در حال حاضر شیوع سرطان در حال افزایش می باشد. (۳) در ایران

نویسنده مسئول: ژیلا ترابی زاده

ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، گروه پاتولوژی

تلفن و نمابر: ۰۱۵۱-۲۲۲۲۹۸۱

پست الکترونیک: zhtorabi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۱

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۳/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۴

جدول ۱: لیست مواد مورد استفاده در رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی

نام تجهیزات
گزیلن
H ₂ O ₂
سیتراسدیم
DAB
Detection Kit
اتانول ۹۹٪
هماتوکسیلین
اتانول مطلق
EDTA
پارافین
اٹوزین
لام و لامل
Boric acid
مونوکلونال آنتی بادی
Superblock
اینتلان

و با توجه به عدم پاسخ درمانی مناسب و یکسان در بیماران با مرحله و میزان تمایز مشابه، این مطالعه جهت شناسایی سلول های بنیادی سرطان در سرطانهای کولورکتال با کمک روش ایمنوهیستوشیمی در رابطه با تعیین ارتباط CD24 با پارامترهای کلینیکو پاتولوژیک و بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام گردیده است.

روش بررسی:

مواد مورد استفاده:

این مطالعه با استفاده از مواد و تجهیزات اشاره شده در جدول ۱ انجام شد.

بیماران و نمونه ها:

در این مطالعه بلوکهای پارافینی ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال تشخیص داده شده طی سالهای ۸۱ تا ۹۱ در بیمارستان امام خمینی شهر ساری استفاده شد. تایید تشخیص و تکمیل داده های کلینیکوپاتولوژیک آنها با استفاده از لامهای هماتوکسیلین اٹوزین موجود در پایگانی، گزارش پاتولوژی، پرونده بیمارستانی و همچنین تماس با بیماران انجام شد. پارامتر های کلینیکو پاتولوژیک شامل سن، جنس، محل، نوع تومور، عمق تهاجم، متاستاز لنف نود و متاستاز دوردست (شامل کبد) مرحله، درجه تمایز تومور، تهاجم عروقی و لنفاتیک، نوع درمان، عود، بقای بیمار (مدت زمان

سومین سرطان شایع در مردان و چهارمین سرطان شایع در زنان (به جز سرطان پوست) سرطان کولورکتال می باشد و میزان شیوع آن نسبت به سال های قبل در حال افزایش می باشد. (۴) (۵۰۰۰۰ مورد جدید در سال) در سال های اخیر از مفهومی با عنوان Cancer Stem Cell (CSC) صحبت شده است که به زیرگروهی از سلولهای تومورال گفته می شود که دارای ویژگی های سلولهای بنیادی یعنی توانایی خودسازی^۱ و تمایز بوده و اولین بار در سال ۱۹۹۷ برای بدخیمی های خونی و سپس در بسیاری از تومورهای توپر (solid) از جمله سرطان کولون بیان شد. (۸-۵)

شناسایی این سلول ها در سرطان کولون CO-CSC با بروز یک یا چند مارکر سطح سلولی، طی مطالعات فراوان صورت گرفته است. (۱۰-۵) سلول های بنیادی سرطان نه تنها باعث شروع تومور، تکامل، متاستاز و عود تومورها می باشند بلکه در ناموفق بودن درمان های معمول سرطان هم موثرند. (۱۱) به نظر می رسد سلول های بنیادی سرطان (CO-CSC) در مقاومت انتخابی به درمان های رایج سرطان کولون (نظیر شیمی درمانی) و همچنین عود مجدد تومور دخیل باشند. (۱۲) مارکرهای CO-CSC به عنوان فاکتور پیش آگهی در بقا سرطان کولون عنوان شده است و بر لزوم توسعه درمانهایی که CSC را هدف قرار می دهند اشاراتی در مقالات علمی وجود دارد. (۱۶-۱۳) از جمله این مارکرها CD24 می باشد. (۲۰-۱۷)

CD24 یک مارکر سطح سلولی از جنس سیالوگلیکوپروتئین تک زنجیره ایبا وزن ۴۲ کیلو دالتون که در بسیاری از تومورهای توپر بیان آن گزارش شده است. (۱۸-۱۷) ولی اولین بار در سرطان پانکراس ویژگی های Cancer Stem Cell را نشان داد. (۱۷)

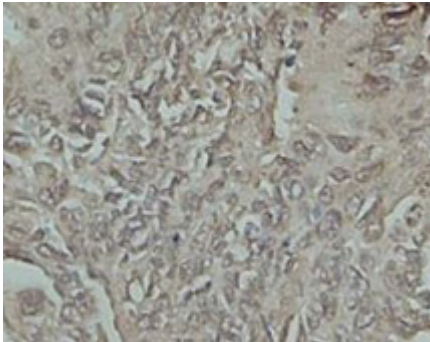
CD24 دارای یک هسته کوچک پروتئینی متشکل از ۲۷ آمینو اسید است که به طور ویژه ای گلیکوزیله شده و از طریق لنگر فسفاتیدیل اینوزیتول به غشای سلول متصل گردیده است و در انتقال پیام های خارج سلولی به درون سلول نقش دارد. (۲۲-۲۱)

CD24 در ۵۰/۵٪ از بیماران سرطان کولون بروز می یابد. ارتباط بین بیان این مارکر و فاکتورهای کلینیکو پاتولوژیک (درجه تمایز تومور) (۲۳) دیده شده است. بیان CD24 با متاستاز به لنف نود در سرطان کولون نیز نشان داده شده است. (۲۳) چنین به نظر می رسد که بروز سیتوپلاسمی CD24 در سرطان کولون به صورت غیرمستقل با بقای کوتاهتر بیماران همراه بوده است. (۲۴)

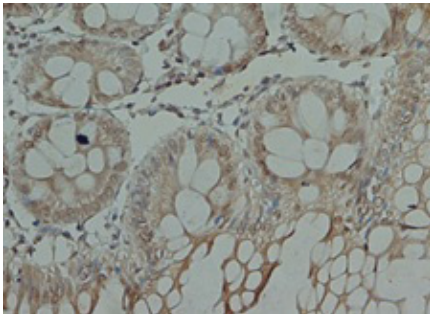
بقای ۵ ساله بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به صورت مستقل از نوع درمان ۵۰٪ ذکر شده است. (۱۸) که در صورت بروز متاستاز، به زیر ۱۰٪ می رسد. (۲۳-۲۱) و مرگ اکثر بیماران به علت گسترش متاستاتیک تومور به سایر ارگان ها است. (۲۱)

با توجه به شیوع بالای سرطان کولورکتال در منطقه ما و همچنین افزایش روز افزون این سرطان در جوامع انسانی از جمله ایران و از آنجایی که درصد بالایی از بیماران را افراد جوان جامعه تشکیل می دهند (۲۵ و ۲۶)

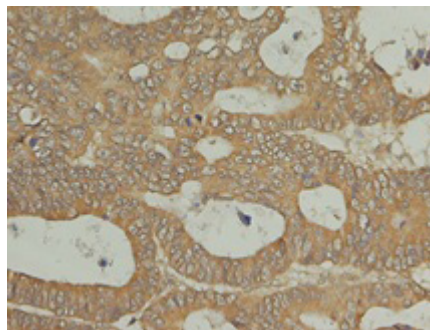
1. Self-renewal
2. Colorectal Cancer Stem Cell



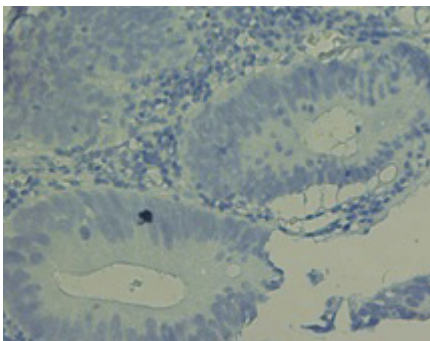
شکل ۱: بیان CD24 در بافت شاهد (بافت زیر اپیتلیوم لوزه) بزرگنمایی ۴۰۰*



شکل ۲: بیان سیتوپلاسمیک CD24 در بافت نرمال مجاور سرطان کولورکتال. بزرگنمایی ۴۰۰*



شکل ۳: بیان سیتوپلاسمیک و غشایی CD24 در سلولهای سرطان کولورکتال. بزرگنمایی ۴۰۰*



شکل ۴: عدم بیان CD24 در بافت تومورال سرطان کولورکتال (CD24 منفی). ۴۰۰*

به ماه)، و وضعیت فعلی بیمار (زنده/ مرگ به علت تومور یا عوارض آن) بودند. بیمارانی که قبل از جراحی تحت شیمی درمانی قرار گرفته بودند و یا سابقه پولیپوز خانوادگی و یا IBD داشتند حذف شدند. تمام نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و در پارافین بلوک گیری شده بودند. تمام برش‌هایی که از ناحیه تومور و سالم بودند مورد بررسی قرار گرفتند. وجود آدنوکارسینوم در بررسی پاتولوژیک اسلایدها جهت ورود به مطالعه مجدداً مورد تایید قرار گرفت و برشی که حاوی منطقه مناسب بافت تومورال برای IHC بود، انتخاب گردید.

رنگ آمیزی H&E و ایمونوهیستوشیمی:

بعد از تایید تشخیص پاتولوژی مراحل زیر برای رنگ آمیزی به ترتیب انجام شد:

(الف) آماده سازی بافت: پارافین زدایی از نمونه بلوک پارافینی، آبگیری نمونه‌ها توسط غلظت‌های صعودی اتانول (۷۷، ۹۵ و ۹۹٪)، شفاف سازی نمونه‌ها توسط گزین، قالبگیری مجدد نمونه‌ها

(ب) برش گیری و رنگ آمیزی H&E: تهیه برش‌های بافتی به ضخامت ۳ تا ۴ میکرومتر و رنگ آمیزی روتین H&E

(ج) رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی: پارافین زدایی نمونه توسط غوطه ورسازی در گزین، آبدهی توسط غلظت‌های اتانول نزولی (۹۹/۹۵ و ۷۷٪)، بافت‌ها را در بافر TRIS-EDTA (PH=9) قرار داده شد و سپس به مایکروویو با حداکثر قدرت منتقل شد تا بافر به نقطه جوش برسد. سپس قدرت مایکروویو به ۴۰٪ کاهش و بعد از طی ۱۵ دقیقه بافت‌ها خارج شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از شستشو با آب جاری و بافر TBS با استفاده از قلم DAKO حدود بافت را مشخص و در اتاقک مرطوب قرار داده شد و با استفاده از کیت‌های تشخیصی آنتی بادی منوکلونال موشی (Anti CD24 100 µg) که با رقت ۱/۱۰۰ توسط رقیق کننده آنتی بادی رقیق شده بودند به مدت یک شب در دمای اتاق آنکوبه گردید. سپس بافتها با پراکسیداز به مدت ۳۰ دقیقه مجاور شده و بعد از آن واکنش کروموزنیک توسط کیت مربوطه انجام گرفت. بافت شاهد برای CD24 بافت لنفوییدی لوزه و همچنین بافت نرمال (شکل ۱ و ۲) کنار نمونه‌های سرطان کولورکتال نیز به عنوان کنترل منفی با بافر پوشانده شدند. نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از شستشو با بافر TBS و اتمام مراحل رنگ آمیزی IHC و هماتوکسیلین به عنوان رنگ زمینه، اسلاید‌های تهیه شده مونته گردید.

بررسی رنگ آمیزی CD24:

بررسی لام‌های تهیه شده به شیوه نیمه کمی توسط دو پاتولوژیست مستقل به صورت یکسویه Blind (بدون اطلاع از داده‌های کلینیکیوپاتولوژیک بیماران) و با استفاده از میکروسکوپ نوری و در نماهای با قدرت پایین و بالا (X100-X400) برای تعیین میانگین میزان رنگ پذیری سلول‌های

توموری در کل سطح تومور انجام گرفت. رنگ پذیری سیتوپلاسمیک و غشایی در سلولها به عنوان مثبت در نظر گرفته شد. (شکل ۲ در بافت نرمال کنار تومور و شکل ۳ در بافت تومورال) موارد رنگ پذیری بسیار ضعیف و یا کمتر از ۵٪ سطح تومور به عنوان منفی (شکل ۴) و موارد بالای ۵٪ به عنوان حداقل میزان مثبت شدن مارکر گزارش گردید. (۲۴ و ۲۵)

آنالیز آماری:

داده های بیماران و نتایج ایمونوهیستوشیمی بیماران از طریق نرم افزار SPSS (IBM SPSS Statistics 20.0.1) و با استفاده از X^2 , Fisher's Exact Test, Student and Paired T-test مورد آنالیز قرار گرفت. مقدار p -value زیر ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته ها:

در ۵۰ بیمار مورد مطالعه، میانگین سن $64/57 \pm 13/9$ سال با دامنه ۲۸-۹۳ سال داشتند. ۷ نفر از این بیماران در سن زیر ۵۰ سال، ۱۲ نفر در سن ۵۰-۵۹ سال، ۹ نفر در سن ۶۰-۶۹ سال، ۱۴ نفر در سن ۷۰-۷۹ سال و ۸ نفر در سن ۸۰ سال و بالاتر قرار داشتند. قابل ذکر است میانگین سن تشخیص بیماری در کل افراد تحت مطالعه $60/51 \pm 14/74$ سال با دامنه ۲۵-۹۳ سال بود.

۲۵ نفر از بیماران مورد مطالعه مرد و ۲۵ نفر زن بودند. میانگین سن مردان و زنان به ترتیب $65/71 \pm 12/11$ و $63/48 \pm 15/62$ سال بود و طبق آزمون T-test، تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد. ($p=0/58$)

در ۷۴ نفر تشخیص تومور ادنوکارسینوما و در ۳ نفر موسینوس کارسینوما بود. شیوع ادنوکارسینوما در مردان و زنان به ترتیب ۸۸٪ و ۱۰۰٪ بود. ضمن اینکه هر سه مورد موسینوس کارسینوما در مردان بود ولی بر حسب آزمون دقیق فیشر، بین جنس و پاتولوژی تومور رابطه معنی داری وجود نداشت. (p -value > ۰/۰۵) قابل ذکر است میانگین سن بیماران مبتلا به ادنوکارسینوما $65/37 \pm 13/8$ و میانگین سن بیماران مبتلا به موسینوس کارسینوما $52/33 \pm 10/7$ سال بوده و طبق آزمون T-test، اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد ($p=0/12$)

بیان CD24 در ۲۹ مورد منفی و ۲۱ مورد مثبت بود. میانگین سن بیمارانی که از نظر مارکر CD24 منفی بوده اند $63/24 \pm 12$ سال و در بیمارانی که وضعیت این مارکر در آنان مثبت بوده $63/24 \pm 16/3$ سال و طبق آزمون T-test، تفاوت بین دو گروه معنی دار نبود ($p=0/57$). شکل ۳ و ۴ بیانگر موارد مثبت و منفی بیان CD24 در بافت تومورال سرطان کولور کتال می باشد. توزیع فراوانی جنس بر حسب بیان CD24 در گروه منفی ۴۰٪ و در گروه مثبت ۵۱٪ مرد بوده و تفاوت دو گروه معنی دار نبود ($p=0/99$). بروز مارکر در بافت نرمال کنار تومور در ۳۰٪ از نمونه های در دسترس از این نظر (۹ از ۳۰ مورد) یافت شد.

در خصوص پاتولوژی تومور نیز ارتباط معنی داری بین ماهیت تومور و بیان CD24 وجود نداشت ($p=0/99$). میانگین اندازه تومور در کل بیماران مورد مطالعه $4/57 \pm 1/94$ میلی متر با دامنه ۱-۱۰ میلی متر بود. میانگین اندازه تومور در بیمارانی که از نظر بیان CD24، منفی بوده اند $4/78 \pm 2/06$ و در افراد مثبت $4/29 \pm 1/78$ میلی متر بود و طبق آزمون T-test، تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود نداشت. ($p=0/38$)

در ۲۷ نفر (۵۴٪) محل تومور در کولون راست، در ۳ نفر (۶٪) در کولون چپ، در ۱۹ نفر (۳۸٪) در محل رکتوم و در ۱ مورد (۲٪) محل تومور نامشخص بود. بیان مارکر CD24 بر حسب محل تومور اختلاف معنی داری نداشت. (p -value > ۰/۰۵)

۳۱ مورد (۶۲٪) از نمونه ها well differentiated، ۱۴ مورد (۲۸٪) moderately differentiated، ۳ مورد (۶٪) poorly differentiated بودند. در گروه منفی ۱۷ مورد و در گروه مثبت ۱۶ مورد well differentiated بودند (۵۸٪) در مقابل ۷۶٪ ولی بر طبق آزمون دقیق فیشر، تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود نداشت. ($p=0/55$)

۴ نفر (۸٪) T2، ۱۶ نفر (۳۲٪) T3، ۱۹ نفر (۳۸٪) T4 و وضعیت ۱۱ نفر (۲۲٪) مشخص نبود. انجام آزمون دقیق فیشر بر روی داده های مذکور نشان داد بین عمق تومور و بیان مذکور ارتباط معنی داری وجود ندارد. (p -value > ۰/۰۵)

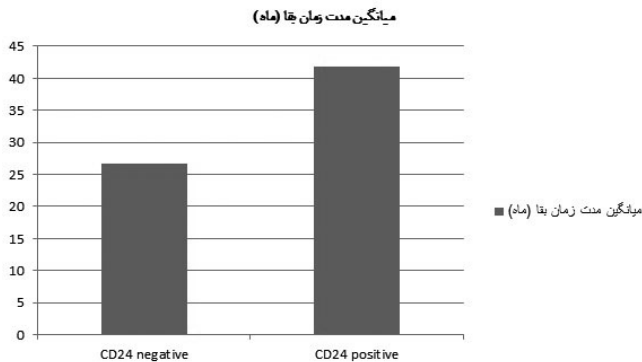
از ۵۰ بیمار مطالعه شده، ۲۰ نفر (۴۰٪) دارای متاستاز غدد لنفاوی بوده و ۳۰ نفر (۶۰٪) متاستاز لنف نود نداشتند. انجام آزمون های دقیق فیشر و کای اسکویر بر روی داده های مذکور نشان داد وجود متاستاز لنف نود بر حسب بیان مارکر مذکور تفاوت معنی داری ندارد. (p -value > ۰/۰۵)

برابر نتایج بدست آمده بیماران از نظر دسته بندی متاستاز دور دست ۳۱ نفر (۶۲٪) M0، ۱۲ نفر (۲۴٪) M1A، ۵ نفر (۱۰٪) M1B بوده و وضعیت ۲ نفر (۴٪) نامشخص بود. انجام آزمون دقیق فیشر بر روی داده های مذکور نشان داد توزیع فراوانی متاستاز دور دست بر حسب بیان مارکر اختلاف معنی داری ندارد. (p -value > ۰/۰۵)

از ۵۰ بیمار مطالعه شده، ۱۱ نفر (۲۲٪) دچار متاستاز کبدی بوده و در ۳۷ نفر (۷۴٪) متاستاز کبدی رخ نداد. وضعیت ۲ بیمار (۴٪) نیز از نظر متاستاز کبدی مشخص نبود. بر حسب آزمون دقیق فیشر، بروز متاستاز کبدی بر حسب بیان CD24 تفاوت معنی داری ندارد. (p -value > ۰/۰۵)

در بررسی نتایج از نظر مرحله بیماری، ۵ بیمار (۱۰٪) در مرحله I، ۱۶ نفر (۳۲٪) در مرحله IIA، ۴ نفر (۸٪) در مرحله IIB، ۳ نفر (۶٪) در مرحله IIIA، ۱۳ نفر (۲۶٪) در مرحله IIIB و مرحله بیماری در ۹ نفر (۱۸٪) مشخص نبود. مرحله بیماری بر حسب بیان مارکر اختلاف معنی داری ندارد. (p -value > ۰/۰۵)

در ۱۰ نفر (۲۰٪) از بیماران، تهاجم به عروق خونی مشاهده شده و در ۲۷ نفر (۵۴٪) چنین تهاجمی مشاهده نشد. وضعیت ۱۳ بیمار (۲۶٪) نیز از این نظر مشخص نبود. بروز تهاجم به عروق خونی بر حسب بیان CD24 تفاوت



نمودار ۱: میانگین مدت بقا بر اساس بیان مارکر CD24 در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

مارکر سطح سلولی از جمله CD24، در تعداد کمی از مقالات بررسی شده است. (۱۲-۸ و ۲۸-۲۴) این مارکر اولین بار در سرطان پانکراس ویژگی های Cancer Stem Cell را نشان داد. (۱۷ و ۱۸) CD24 به عنوان یک تنظیم کننده میزان پرولیفراسیون، آپوپتوز و تهاجم در سرطان شناخته شده است. (۲۹) ساجیو^۲ و همکاران با Gene Expression Array Analysis افزایش بیان CD24 را به عنوان یک واقعه اولیه در کارسینومازن سرطان کولورکتال نشان دادند. (۳۰)

دانگو^۳ و همکاران بروز CD24 را به روش IHC بر روی آدنوکارسینوم کولورکتال مورد بررسی قرار دادند که در این مطالعه ارتباط CD24 تنها با درجه تمایز تومور نشان داده شد ولی با سایر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک ارتباطی نداشت. (۲۳) وانگ^۴ نیز از طریق tumorigenicity assay و IHC بیان کرد CD24 بر میزان پرولیفراسیون سلول توموری و به صورت غیر مستقیم با میزان رشد تومور اثر دارد. (۳۱) در مطالعات حیوانی نیز در مطالعه Baumann با بررسی به شیوه فلوسیتومتری در نمونه های سلول سرطانی rat این مارکر مرتبط با میزان رشد تومور (اندازه تومور) و متاستاز گزارش شد. (۳۲)

در مطالعه لیم^۵ و ویچرت^۶ و همکاران ارتباط بیان CD24 با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک نظیر سن، جنس، نوع تومور و یا فاکتورهای مربوط به تمایز تومور معنادار نشد (۲۴ و ۲۸) همچنین در مطالعه احمد^۷ بعد از بررسی CD24 به روش IHC در سرطان کولورکتال هیچ ارتباطی با مارکرهای کلینیکوپاتولوژیک دیده نشد. (۳۳) که این امر مشابه نتایج مطالعه ما می باشد. از علل این موضوع می توان به تعداد محدود مطالعات در مورد این مارکر، تعداد کمتر نمونه های کولورکتال مورد بررسی و همچنین نو بودن مطالعات در این زمینه اشاره کرد.

- Sagiv
- Dangho
- Wang
- Lim
- Weichert
- Ahmed

معنی داری ندارد. ($p\text{-value} > 0.05$)

در ۷ نفر (۱۴٪) از بیماران مطالعه شده، تهاجم به عروق لنفاوی مشاهده شده و در ۳۰ نفر (۶۰٪) چنین تهاجمی مشاهده نشد. وضعیت ۱۳ بیمار (۲۶٪) نیز از این نظر مشخص نبود. بروز تهاجم به عروق لنفاوی بر حسب بیان مارکر مورد مطالعه تفاوت معنی داری ندارد. ($p\text{-value} > 0.05$)

روش درمان در ۹ نفر (۱۸٪) فقط جراحی، در ۳۰ نفر (۶۰٪) جراحی و شیمی درمانی، در ۳ نفر (۷٪) جراحی همراه سایر روش ها شامل رادیوتراپی و در ۸ نفر (۱۶٪) روش درمان غیر از جراحی مشخص نبود. ارتباط بیان مارکر با نوع درمان در مواردی که جراحی و شیمی درمانی تواما انجام شده بود، دیده شد. ($p=0.04$)

میانگین مدت زمان بقای بیماران از زمان تشخیص بیماری $33/83 \pm 24/66$ ماه با دامنه ۱-۱۲۰ ماه بود. میانگین زمان بقای بیماران بر حسب بیان CD24، برای افراد منفی $26/64 \pm 18/15$ و در افراد مثبت $41/75 \pm 28/67$ ماه بود (نمودار ۱).

برابر نتایج مطالعه، در ۱۰ نفر از بیماران مورد مطالعه، بیماری بعد از درمان اولیه مجدداً عود کرده و ۲۹ نفر (۵۸٪) عود نداشتند و وضعیت عود در ۱۱ نفر (۲۲٪) مشخص نبود. عود در ۲۸٪ بیماران CD24 منفی و در ۲۲٪ بیماران CD24 مثبت، رخ داد ولی طبق آزمون مذکور، تفاوت بین دو گروه معنی دار نبود ($p=0.73$)

برابر نتایج بدست آمده در طی مدت بررسی؛ ۲۰ نفر (۴۰٪) از بیماران مورد مطالعه به علت سرطان کولورکتال و عوارض ناشی از آن فوت شده و ۲۱ نفر (۴۲٪) در قید حیات بودند و وضعیت ۹ بیمار (۱۸٪) نیز مشخص نبود. بر حسب آزمون دقیق فیشر، بروز مرگ بر حسب بیان مارکر تفاوت معنی داری ندارد. ($p\text{-value} > 0.05$) در جدول ۲ خلاصه نتایج و ارتباط بیان CD24 با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک بیان شده است.

بحث:

Cancer Stem Cell به عنوان مفهومی جدید در سرطان ها از سال ۱۹۹۷ در مقالات علمی به کار برده شده است. این سلول ها به عنوان آغازگر بدخیمی محسوب می شوند و توانایی خودسازی دارند و اولین بررسی ها ارتباط آن ها با ایجاد تومور و مقاومت به درمان را (برای لوکمی ها) نشان داد. (۱۳-۵)

در بررسی های بعدی ارتباط این سلولها با تومورهای توپر نیز ارایه شد که از آن جمله سرطان پستان، سرطان پروستات، بدخیمی های مغزی، سرطان ریه، نوروبلاستوما، رابدو میوسارکوما و سرطان های سلول کلیویو همچنین سرطانهای دستگاه گوارش بود. (۷-۲۷ و ۵) اهمیت این مارکرها به علت ارتباط آنها با متاستاز و عود و همین طور مقاومت به درمانهای ضد سرطان نظیر شیمی درمانی می باشد. (۷) پس می توان از این جهت به آنها به چشم مارکرهای پروگنوستیک دید. (۷ و ۵)

شناسایی این سلول ها در سرطان کولون (CO-CSC)^۱ با بروز چندین

1. Colorectal Cancer Stem Cell

جدول ۲: ارتباط بیان CD24 با ویژگیهای کلینیکی و پاتولوژیک بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

p-Value	CD24		خصوصیات
	مثبت	منفی	
۰/۵۷	۶۳/۲۴±۱۶/۳	۶۵/۵۷±۱۲	سن
۰/۹۹	۲۳(۵۱/۱)	۲(۴۰)	مرد
	۲۲(۴۸/۹)	۳(۶۰)	زن
۰/۹۹	۴۲(۹۳/۳)	۵(۱۰۰)	آدنوکارسینوما
	۳(۶/۷)	۰(۰)	موسینوس کارسینوما
۰/۱۸	۸(۴۰)	۱۹(۶۵/۵)	کولون راست
	۲(۱۰)	۱(۳/۴)	کولون چپ
	۱۰(۵۰)	۹(۳۱)	رکتوم
۰/۵۵	۱۶(۷۶/۲)	۱۷(۵۸/۶)	Well diff.
	۵(۲۳/۸)	۹(۳۱)	Moderately diff.
	۰(۰)	۳(۱۰/۳)	Poorly diff.
۰/۳۳	۳(۲۰)	۱(۴/۲)	T2
	۶(۴۰)	۱۰(۴۱/۷)	T3
	۶(۴۰)	۱۳(۵۴/۲)	T4
۰/۱۶	۱۵(۷۱/۴)	۱۵(۵۱/۷)	no
	۶(۲۸/۶)	۱۴(۴۸/۳)	yes
۰/۹	۱۳(۶۱/۹)	۱۸(۶۶/۷)	No:M0
	۶(۲۸/۶)	۶(۲۲/۲)	Yes:M1A
	۲(۹/۵)	۳(۱۱/۱)	Yes:M1B
۰/۱۸	۴(۲۳/۵)	۱(۴/۲)	I
	۸(۴۷/۱)	۸(۳۳/۳)	IIA
	۱(۵/۹)	۳(۱۲/۵)	IIB
	۰(۰)	۳(۱۲/۵)	IIIA
	۴(۲۳/۵)	۹(۳۷/۵)	IIIB
۰/۲۹	۱۴(۸۲/۴)	۱۳(۶۵)	خیر
	۳(۱۷/۶)	۷(۳۵)	بلی
۰/۴۲	۱۵(۸۸/۲)	۱۵(۷۵)	خیر
	۲(۱۱/۸)	۵(۲۵)	بلی
۰/۷۳	۱۴(۷۷/۸)	۱۵(۷۱/۴)	ندارد
	۴(۲۲/۲)	۶(۲۸/۶)	دارد
۰/۹۹	۱۰(۵۰)	۱۱(۵۲/۴)	در قید حیات
	۱۰(۵۰)	۱۰(۴۷/۶)	مرگ به علت تومور یا عوارض ناشی از آن
۰/۱۵	۱۵(۷۱/۴)	۲۲(۸۱/۵)	ندارد
	۶(۲۸/۶)	۵(۱۸/۵)	دارد
۰/۰۴	۷(۱۸/۴)	۲(۱۶/۶)	فقط جراحی
	۲۳(۶۰/۵)	۷(۵۸/۳)	جراحی و شیمی درمانی
	۳(۷/۹)	۰(۰/۰)	جراحی و رادیوتراپی یا سایر درمانها
	۵(۱۳/۱)	۳(۲۵/۰)	جراحی با درمان جانبی نامشخص

کولورکتال با مقاومت به شیمی درمانی مرتبط بود. (۳۵) در سایر مطالعات این ارتباط اثبات نشد. (۲۹ و ۲۳) در مطالعه حاضر ما توانستیم ارتباط نوع درمان با بیان CD24 را در گروهی از بیماران که تواما جراحی و شیمی درمانی شده بودند را نشان دهیم ($p=0.04$). ولی این ارتباط با مقاومت به درمان ارتباطی نداشت. و این موضوع شاید به مکانیسم های متفاوت CD24 در بروز مقاومت به شیمی درمانی وابسته باشد که متاسفانه در حال حاضر این مکانیسم ها هنوز چندان شناخته نشده اند ولی می توان امیدوار بود با گسترش مطالعات سلولهای بنیادی سرطان طی سالهای آینده به شناخت این مکانیسم ها نزدیکتر شویم.

ساجیو همکاران با هدف قرار دادن CD24 با آنتی بادی مونوکلونال علیه آن در رده سلولهای سرطانی بیان کننده آن و آنالیز وسترن بلات اهداف تاثیر درمانی این مارکر را بررسی کرد و نشان داد که حداقل در رده های سلولی سرطانی در آزمایشگاه رشد سلولها توسط این آنتی بادی مونوکلونال مهار می شود. (۳۶) شاپیرا نیز با بررسی تاثیر Anti-CD24 کنژوگه با اگزوتوکسین اختصاصی پسووموناس بر رده سلولی سرطان کولورکتال اثر کشندگی آنرا نشان داد. (۳۷) مطالعاتی از این دست می توانند نقشی درمانی برای این مارکر را نشان دهند و تا آن زمان مسلما بررسی های توصیفی و مطابقت آن با ویژگی های خاص توزیع تومور سرطان کولورکتال در جامعه ما می تواند راهنمای خوبی برای تعیین ادامه راه باشد.

نتیجه گیری:

ما در این مطالعه دریافتیم که بیان مثبت سیتوپلاسمیک و غشایی CD24 با نوع درمان (جراحی و شیمی درمانی تواما) مرتبط است و نیز هرچند غیرمعنادار، با بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نیز در ارتباط می باشد. این امر نشانگر این است که با ارزیابی بروز این مارکر بر روی نمونه های بیشتری از سرطان کولورکتال می توان در بررسی پیش آگهی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال کمکی کرد و به اطلاعات ارزشمندی دست یافت. این موضوع همچنین در بهبود استراتژی های درمانی ضد Stem Cells کاربرد خواهد داشت.

سو^۱ و لیم^۲ و همکاران بیان CD24 را با متاستاز به لنف نود در سرطان کولون مرتبط دانستند. (۲۹ و ۲۸) ولی این ارتباط در مطالعه ما مشاهده نگردید. ($p\text{-value} > 0.05$) همچنین این موضوع در مطالعه دانگو و ویچرت و همکاران نیز اثبات نشد. (۲۳ و ۲۴) با توجه به بررسی های انجام شده و اثبات نقش CD24 در اتصالات بین سلولی (۲۱ و ۲۲) انتظار می رود بروز آن مستقیم یا غیر مستقیم در روند گسترش و متاستاز سلولهای سرطانی نیز نقش داشته باشد. این امر در مورد سرطان پستان و پروستات بیان شده و این احتمال دور از ذهن نیست که در سرطانهای دیگر نظیر سرطان کولورکتال نیز این ارتباط در آینده مشاهده گردد.

در مطالعه سو و همکاران بیان سیتوپلاسمیک CD24 با مرحله تومور و همین طور متاستاز دور دست مرتبط گزارش شد. (۲۹) چنین ارتباطی در مطالعه ما یافت نشد که این مسئله همانند مطالعه دانگو می باشد. (۲۳) بیان CD24 با بقای بیماران در مطالعه ویچرت و همکاران به صورت غیر مستقل مرتبط بود (۲۴) لی^۳ در مطالعه متآنالیز خود با بررسی مقالات مربوط به CD24 در سرطانهای مختلف نشان داد که CD24 مارکری مرتبط با بقای کمتر و سرانجام بدتر می باشد. (۳۴) ولی در مطالعه دانگو (۲۳) و احمد و همکاران (۳۳) این ارتباط مشاهده نشد و گفته شد که انتخاب این مارکر به عنوان مارکر پروگنوستیک مناسب نیست.

در مطالعه ما تفاوتی حدودا ۱۴ ماهه بین بقای دو گروه (میانگین زمان بقاء بیماران بر حسب بیان CD24، برای افراد منفی $11/15 \pm 26/64$ و در افراد مثبت $21/67 \pm 41/75$ ماه) دیده شد که اگرچه این ارتباط معنادار نبود ولی چنین تفاوتی در مورد تصمیم گیری های کلی در روند پیگیری و درمان این بیماران شاید تاثیر گذار باشد که با توجه به تعداد نمونه ها، و نیز اهمیت یافتن یک مارکر پروگنوستیک در بررسی بیماران مبتلا، این امر نشان گر نیاز به توسعه مطالعات با تعداد نمونه بیشتر در این زمینه می باشد. در مطالعه کی جی^۴ و همکاران بیان CD24 در یک رده سلولی در سرطان

1. Su
2. Lim
3. Lee
4. Ke J

REFERENCES

1. Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer microenvironment*. *Cancer Microenviron* 2010;3:149-66.
2. Oladipo O, Conlon S, O' Grady A, Purcell C, Wikson C, Maxwell P, et al. The expression and prognostic impact of cxc-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue. *Br J Cancer* 2011;104:480-7.
3. Pourhoseingholi M. Increased barden of colorectal cancer in Asia. *World journal of Gastro-intestinal Oncology* 2012;4:68-70.
4. Kolahdoozan S, Sajedi A, Radmard A, Khademi H. Five common cancers in Iran. *Arch Iran Med* 2010;13:143-6.
5. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66:9339-44.
6. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8:755-68.
7. Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, et al. Prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat* 2010 ;122:795-801.
8. Sanders MA, Majumdar AP. Colon cancer stem cells:

- implications in carcinogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:1651-62.
9. Wilson BJ, Schatton T, Frank MH, Frank NY. Colorectal Cancer Stem Cells: Biology and Therapeutic Implications. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2011;7:128-35.
 10. Yeung TM, Mortensen NJ. Colorectal cancer stem cells. *Dis Colon Rectum* 2009;52:1788-96.
 11. Botchkina G. Colon Cancer Stem Cells from basic to clinical application. *Cancer Lett* 2013;338:127-40.
 12. Anderson EC1, Hessman C, Levin TG, Monroe MM, Wong MH. The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease And Therapeutic Response. *Cancers (Basel)* 2011;3:319-39.
 13. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:97-106.
 14. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 2010;138:2151-62.
 15. Willis N, Przyborski S, Hutchison C, Wilson R. Colonic and colorectal cancer stem cells: progress in the search for putative biomarkers. *J Anat* 2008;213:59-65.
 16. Soltanian S, Matin M. cancer stem cell and cancer therapy. *Tumour Biol* 2011;32:425-40.
 17. Jackson D, Waibel R, Weber E, Bell J, Stahel RA. CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1992 1;52:5264-70.
 18. Akashi T, Shirasawa T, Hirokawa K. Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. *Virchows Arch* 1994;425:399-406.
 19. Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:4906-13.
 20. Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. Cellular and Molecular Immunology :CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol* 2010;7:100-3.
 21. Pirruccello SJ, LeBien TW. The human B cell-association antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein. *J Immunol* 1986;136:3779-84.
 22. Fischer GF, Majdic O, Gadd S, Knapp W. Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules. *J Immunol* 1990;144:638-41.
 23. Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2009;15:2258-64.
 24. Weichert W, Denkert C, Burkhardt M, Gansukh T, Bellach J, Altevogt P, et al. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res* 2005;11:6574-81.
 25. Sadjad A, Nouraei M, mohagheghi M. cancer occurrence in Iran 2002, an international perspective. *Asian pacific J cancer pre* 2002;1:334-63.
 26. Fakhri H, Janbabaie Q. Epidemiologic and clinicopathologic criteria of colorectal cancer in Sari. *Mazandaran Uni Med Science J* 2006;18:44-48
 27. Rocco A, Compare D, Nardone G. cancer stem cell hypothesis and gastric carcinogenesis: Experimental evidences and unsolved question. *World J Gastrointest Oncol* 2012;4:54-9.
 28. Lim SC, Oh SH. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract* 2005;201:479-86.
 29. Su N, Peng L, Xia B, Zhao Y, Xu A, Wang J, et al. Correction: Lyn is involved in CD24-induced ERK1/2 activation in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2012;11:43.
 30. Sagiv E, Memeo L, Karin A, Kazanov D, Jacob-Hirsch J, Mansukhani M, et al. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis. *Gastroenterology* 2006;131:630-9.
 31. N, Triaspolitica. "Mengenal Penyakit Kanker, Jenis, Gejala, Penyebab Berikut Pengobatan Kanker." Nanya Dong Dok. Blogger, 20 June 2017. Web. 20 June 2017. <<http://nanyadongdok.blogspot.com/2017/06/mengenal-penyakit-kanker-jenis-gejala.html>>.
 32. Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, et al. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2005;65:10783-93.
 33. Ahmed MA, Jackson D, Seth R, Robins A, Lobo DN, Tomlinson IP, et al. CD24 is upregulated in inflammatory bowel disease and stimulates cell motility and colony formation. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:795-803.
 34. Lee JH, Kim SH, Lee ES, Kim YS. CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis. *Oncol Rep* 2009;22:1149-56.
 35. Ke J, Wu X, Wu X, He X, Lian L, Zou Y, et al. A subpopulation of CD24(+) cells in colon cancer cell lines possess stem cell characteristics. *Neoplasia* 2012;59:282-8.
 36. Sagiv E, Starr A, Rozovski U, Khosravi R, Altevogt P, Wang T, et al. Targeting CD24 for treatment of colorectal and pancreatic cancer by monoclonal antibodies or small interfering RNA. *Cancer Res* 2008;68:2803-12.