مقاله پژوهشی

بررسی ایمونوهیستوشیمی پروتئین های ترمیم کننده عدم تطابق ژنی در سرطان معده

مهسا مولایی[۱]، مهدی یداله زاده[۲]، بابک منصوری[۳]، فاطمه نعمتی[۳]، نرگس زالی[۳]، مهدی منتظر حقیقی[۳]، محمدرضا زالی[۴]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۲] دستیار تخصصی بیماری های داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماری های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۴] استاد، مرکز تحقیقات بیماری های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف

وجود موتاسیون ژرم لاین در ژن های ترمیم‌کننده عدم تطابق ژنی *(MMR) در بیش از ۷۰٪ بیماران مبتلا به سرطان ارثی غیرپولیپی کولورکتال وجود دارد. اما هنوز در مورد اهمیت این سیستم در سرطان معده در جمعیت عمومی اطلاعات کافی وجود ندارد. در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی پروفایل بیان ژن های MLH1, PMS2, MSH2 و MSH3 در نمونه های سرطان معده بررسی گردد.

روش بررسی

این مطالعه مقطعی (Cross-Sectional) بر روی ۱۳۴ بیمار مبتلا به سرطان معده که تحت گاسترکتومی کامل یا نسبی از دی ماه سال ۱۳۷۹ تا انتهای آذر ماه سال ۱۳۸۳ قرار گرفته بودند، صورت گرفته است. جهت آنالیز تحلیل بین متغیرها بر حسب مورد آزمون‌های Chi-Square, exact's Fisher و Student's t-test استفاده شده است.

یافته ها

تنها در ۵ تومور (۳/۷٪) بیان پروتئین های MMR غیرطبیعی وجود داشت که همگی MLH1 غیرطبیعی و در ۴ مورد نیز PMS2 غیرطبیعی داشتند. هیچ یک از تومورها MSH2 یا MSH6 غیرطبیعی نداشتند. در مقایسه تحلیلی انجام شده بین زیرگروه‌های متغیرهای بررسی شده اختلافی از نظر نتیجه رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC)** به دست نیامد.

نتیجه گیری

اگرچه ژنتیک علت زمینه ای گروه کوچکی از بیماران مبتلا به سرطان معده است، اما بروز موتاسیون های ژرم لاین می تواند سبب افزایش خطر بروز سرطان معده شود. در این مطالعه ۳/۷٪، اختلال در عملکرد پروتئین های ترمیم کننده عدم تطابق ژنی (MMR) داشتند و به نظر می رسد MLH1 و PMS2 نقش اصلی تری در عملکرد MMR در سرطان معده در بیماران ایرانی دارند، هر چند که انجام مطالعات بیشتر در این زمینه لازم می باشد.

کلیدواژه: سیستم ترمیم‌کننده عدم تطابق ژنی، سرطان معده، ایمونوهیستوشیمی، MLH1, MSH2, MSH3, PMS2

گوارش / دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، ۱۴۸-۱۵۲

نویسنده مسئول: تهران، اوین، بیمارستان طالقانی، طبقه هفتم، مرکز تحقیقات بیماری های دستگاه گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تلفن: ۲۲۴۳۲۵۱۵ - ۰۲۱ نمابر: ۲۲۴۳۲۵۱۷ - ۰۲۱

پست الکترونیک: m_molaei@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۸ تاریخ اصلاح نهایی: ۸۸/۱۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۰

زمینه و هدف

مجموعه ترمیم‌کننده عدم تطابق ژنی DNA (MisMatch Repair (MMR)) سیستمی است که خطاهای ناشی از اضافه شدن و یا حذف شدن بازها و نیز عدم فراخوانی بازها که در طی بازنویسی و ترکیب آنها رخ می دهد

* MisMatch Repair

** ImmunoHistoChemical Staining

را تشخیص داده و ترمیم می کند. به علاوه، سیستم MMR در ترمیم انواع خاصی از صدمات DNA نیز دخیل است. ژن هایی که در سیستم MMR نقش اصلی را دارند شامل mutS (MSH6, MHS3, MSH2) و (PMS2, PMS1, MLH3, MLH1) mutL می باشند (۱).

موتاسیون ژرم لاین در ژن های MMR سبب بروز ناپایداری در میکروستلایت (MSI (MicroSatellite Instability)) می شوند که نقش مهمی در انواع خاصی از سرطان های کولورکتال، تخمدان و پستان دارد (۴-۲). به طور کلی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ارثی غیرپولیپی (colorectal cancer Hereditary Non polyposis [HNPCC]) سرطان معده نیز به عنوان یک سرطان سین کرونوس و متاکرونوس مطرح می باشد (۵ و ۶).

وجود موتاسیون ژرم لاین در ژن های (PMS2, PMS1, MSH6, MSH2, MLH1) MMR در بیش از ۷۰٪ بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ارثی غیر پولیپی (HNPCC) وجود دارد. علاوه بر آن، میزان سرطان معده به همراه موتاسیون های یاد شده در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ارثی غیر پولیپی می بایست بیشتر از حد معمول جامعه باشند (۷ و ۸)، که در این زمینه بیشتر توجهات و تحقیقات بر روی نقش موتاسیون در MLH1 و MSH2 متمرکز شده است (۵ و ۶).

از سوی دیگر در زمینه اهمیت نقش نقایص عملکردی سیستم MMR در سرطان معده در جمعیت عمومی اطلاعات کافی وجود ندارد و هنوز کاملاً مشخص نشده است که کدام یک از سرطان های برخاسته از معده ناشی از نقص در سیستم MMR یا MSI می باشند (۹). بدین ترتیب در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC] Immunohistochemistery) پروفایل بیان ۴ ژن از ژن های MMR (PMS2, MSH3, MSH2, MLH1) در نمونه های سرطان معده در جمعیت عمومی بررسی گردد و شروعی برای مطالعات گسترده تر باشد.

روش بررسی

جمع آوری بیماران: این مطالعه مقطعی (Cross-Sectional) بر روی کلیه بیماران مبتلا به سرطان معده که تحت گاسترکتومی کامل یا نسبی از دی ماه سال ۱۳۷۹ تا انتهای آذر ماه سال ۱۳۸۳ قرار گرفته بودند و در واحد سرطان مرکز تحقیقات بیماری های دستگاه گوارش و کبد بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (RCGLD) ثبت شده بودند، صورت گرفته است. کلیه بیماران فوق موارد تازه تشخیص داده شده سرطان معده (بدون مشخص بودن ارثی و یا اسپورادیک بودن سرطان) بوده است و بیمارانی که نمونه پاتولوژی آنها در دسترس نبود، کسانی که لنفوم معده داشتند و نیز کسانی که تحت شیمی درمانی و یا رادیوتراپی قرار گرفته بودند از مطالعه خارج شدند. در ۶۰ مورد خاستگاه اصلی تومور آنتروم و پیلور، در ۲۰ مورد انحنای کوچک معده، در ۱۹ مورد کاردیا و در ۴ مورد انحنای بزرگ معده بود. اطلاعات مورد نیاز شامل سن زمان تشخیص، جنسیت، درجه دیسپلازی (Grade) تومور، مرحله بندی (Stage) و محل تومور با استفاده از بانک جمع آوری اطلاعات مرکز تحقیقات (RCGLD) جمع آوری شد و سپس در صورت لزوم با استفاده از مصاحبه تلفنی و یا حضوری با بیماران و یا اعضاء خانواده آنها اطلاعات تکمیل گردید. مرحله بعدی (Stage) تومورها با استفاده از سیستم TNM (۱۰) و درجه‌بندی دیسپلازی تومورها با استفاده از معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) (۱۱) تعیین شد.

بلوک‌های پارافینه و برش‌های هیستوپاتولوژی جهت بررسی بیشتر و کامل تر از بایگانی بخش پاتولوژی مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد (RCGLD) تهیه و جمع آوری شد. بیمارانی که نمونه‌های پاتولوژی آنها در دسترس نبود و یا آنهایی که سابقه لنفوم معده داشتند از مطالعه خارج شدند. برش‌های با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلن و ائوزین (H&E) جهت تایید تشخیص و گزارش پاتولوژی بازبینی و بررسی شدند و رنگ‌آمیزی IHC بر روی نمونه های بافتی ۱۳۴ بیمار صورت گرفت.

رنگ آمیزی ایمونوهیستو شیمی: یک نمونه بافتی تومور از هر بیمار برای IHC مورد استفاده قرار گرفت. برش ها به ضخامت ۴ میکرون از بلوک های بافتی ثابت شده در فرمالین و پارافینیزه شده تهیه شد.

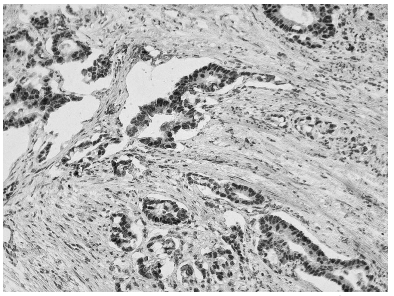
برش های بافتی سپس برای پارافین زدایی در گزیلن قرار گرفتند و برای آب دهی در محلول هایی از الکل که مرحله به مرحله غلظت شان کم می شد غوطه ور می‌شدند. فعالیت پراکسیداز اندوژن با استفاده از محلول های بلوکان مهار شد و برای آشکار شدن آنتی ژن ها، برش ها در محلول بافر (PH:۹) EDTA در میکروفر در دمای 40^{0} درجه انکوبه شد. در مرحله بعدی آنتی بادی های اولیه یعنی:

MLH1 (BD Biosciences Pharmingen, clone: G168-15, 1/100 dilution)
MSH2 (Calbiochen, Oncogene sciences, clone: FE11, 1/100 dilution)
MSH6 (BD Transduction laboratories, clone 44, 1/1000 dilution)
PMS2 (BD Pharmingen, clone A 16-4, 1/500 dilution)

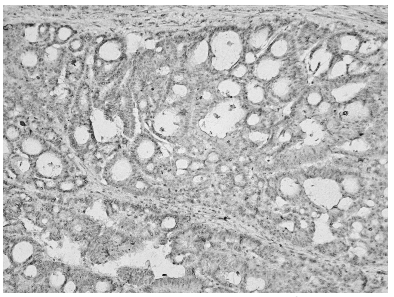
روی اسلایدها ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه در محیط مرطوب و دمای اتاق انکوبه شدند. در بین کلیه مراحل، شستشو با بافر TBS (Tris Buffered Saline) برای ۳ دقیقه انجام می گرفت و پس از پایان این مرحله نمونه ها با (REAL Envision ,DAKO) Envision آغشته شدند. در مرحله آخر جهت نمایان کردن واکنش ایمنی از ۲ و ۳ دی آمینوبنزیدین (DAB) و سپس برای Counterstaining از هماتوکسیلن استفاده شد.

اسلایدها در این مرحله کدبندی شدند تا بررسی لام ها به صورت کور (blind) صورت گیرد. تمامی نمونه ها توسط یک پاتولوژیست به صورت کور بررسی شده اند. سلول های اپتیلیال طبیعی، سلول های استرومایی و

یا لنفوسیت های اینتراموکوزال در هر نمونه به عنوان کنترل داخلی (Internal control) جهت ارزیابی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC) مورد استفاده قرار گرفتند. سپس نمونه ها از نظر رنگ‌آمیزی هسته سلول ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. عدم رنگ پذیری کامل هسته برای هر کدام از محصولات ژن های MMR عنوان شده به عنوان پروتئین MMR غیرطبیعی در نظر گرفته شد (شکل های ۱ و ۲).



شکل ۱: رنگ پذیری کامل هسته برای هر کدام از محصولات ژن های MMR عنوان شده به عنوان پروتئین MMR طبیعی می باشد.



شکل ۲: عدم رنگ پذیری کامل هسته برای هر کدام از محصولات ژن های MMR عنوان شده به عنوان پروتئین MMR غیرطبیعی در نظر گرفته شده است.

روش آنالیز آماری : اختلاف بین توزیع متغیرهای کیفی بر حسب مورد با آزمون های Chi-Square و یا exact's Fisher آزموده شد و در مورد متغیرهای کمی نیز از آزمون Student's t-test استفاده شده است. سطح معنی دار آماری P-value<۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه ۱۳۴ بیمار مبتلا به سرطان معده بعد از بررسی معیارهای ورود و خروج بررسی شده اند. نسبت مرد به زن در آنها برابر ۲/۱ بود. میانگین سن زمان تشخیص بیماری در آنها برابر ۵۸/۴۶ سال (SD=۱۳/۰۳ و طیف ۲۵ تا ۸۰ سال) بود. ۱۱۹ بیمار (۸۹/۵٪) سن ۴۰ سال یا بیشتر داشتند، مابقی بیماران (۱۴ مورد) سن کمتر از ۴۰ سال داشتند که ۱۳ نفر بین ۳۰ تا ۳۹ سال و تنها یک نفر کمتر از ۳۰ سال سن داشتند. تمایز بافتی در ۷۲ نمونه (۵۳/۷٪) به صورت تمایز کم (Poorly differentiated)، در ۳۰ نمونه (۲۲/۴٪) به صورت تمایز متوسط (Moderate differentiated) و در ۳۲ نمونه (۲۳/۹٪) به صورت تمایز زیاد (Well differentiated) بود. ۱۸ تومور در مرحله I، ۳۳ تومور در مرحله II، ۷۰ تومور در مرحله III و ۱۳ تومور نیز در مرحله IV بودند. تنها در ۵ تومور (۳/۷٪) بیان پروتئین های MMR غیرطبیعی وجود داشت که همگی MLH1 غیرطبیعی و در ۴ مورد نیز PMS2 غیرطبیعی داشتند. هیچ یک از تومورها MSH2 یا MSH6 غیرطبیعی نداشتند. سه بیمار از ۵ بیمار فوق (۶۰٪) سابقه سرطان دستگاه گوارش در خانواده درجه اول خود را نیز داشته اند (جدول ۱). در مقایسه تحلیلی انجام شده بین زیرگروه های متغیرهای بررسی شده اختلافی از نظر نتیجه رنگ آمیزی IHC به دست نیامد.

جدول ۱: مشخصات توصیفی بیماران مبتلا به سرطان معده با رنگ آمیزی ایمونوهیستو شیمی غیرطبیعی

	مورد۱	مورد۲	مورد۳	مورد۴	مورد۵
سن زمان تشخیص (سال)	۳۴	۵۹	۷۷	۶۷	۶۵
جنسیت	مرد	زن	مرد	مرد	زن
خاستگاه تومور	انحنای کوچک	آنتروم	کاردیا	تنه	کانال پیلور
درجه دیسپلازی	تمایز متوسط	تمایز کم	تمایز متوسط	تمایز زیاد	تمایز زیاد
مرحله بندی (Stage) سابقه بیماری	IIIA	IIB	IIIA	IIIA	IB
درخانواده درجه اول	منفی	سرطان کبد	سرطان کولورکتال	منفی	سرطان مری
نتیجه IHC					
MLH1	غیرطبیعی	غیرطبیعی	غیرطبیعی	غیرطبیعی	غیرطبیعی
PMS2	غیرطبیعی	غیرطبیعی	غیرطبیعی	طبیعی	غیرطبیعی

بحث

ژنتیک علت زمینه ای گروه کوچکی از بیماران مبتلا به سرطان معده است (۴). در مطالعه ما هم تنها ۵ مورد (۳/۷٪)، اختلال در عملکرد پروتئین های MMR داشتند. در صورتی که در یک مطالعه در چین (۲۰۰۶)، ۱۴ مورد از ۱۰۱ بیمار (۱۳/۸۶٪) مبتلا به سرطان معده، موتاسیون در ژرم لاین ژن های MMR داشتند(۷) که در نتیجه قطعاً اختلال در عملکرد پروتئین های MMR در آنها نیز از ۱۳/۸۶٪ بیشتر خواهد بود که به مراتب از یافته ما بیشتر است. از سوی دیگر موتاسیون ژرم لاین در ژن های MLH1 و MSH2 به کرات در بیماران مبتلا به سرطان معده فامیلی رخ می دهد(۷) حتی تا ۹۰٪ از بیماران HNPCC نیز گزارش شده است (۷ و ۱۲) که می تواند سبب افزایش ۴ برابری سرطان معده شود (۷).

در مطالعه ما نیز با توجه به این که ۳ مورد از بیماران با رنگ آمیزی هیستوشیمی غیرطبیعی دارای سابقه خانوادگی سرطان دستگاه گوارش در افراد درجه اول فامیل بوده اند و این که هر سه مورد نیز اختلال در عملکرد MLH1 و PMS2 داشته اند احتمال وجود موتاسیون در این افراد بسیار زیاد خواهد بود، که آن هم نشان از ارثی بودن بیماری دارد. بدین ترتیب به نظر می رسد MLH1 و PMS2 نقش اصلی تری در عملکرد MMR در سرطان معده در بیماران ایرانی دارند در صورتی که گزارشات کشورهای دیگر MLH1 و MSH2 نقش های اصلی را داشتند (۷ و ۱۲). اما از آنجایی که هنوز

اطلاعات کافی در این زمینه به دست نیامده است، انجام مطالعات بیشتر مورد نیاز است.

نتیجه گیری

در این مطالعه ۳/۷٪، اختلال در عملکرد پروتئین های MMR داشتند و به نظر می رسد MLH1 و PMS2 نقش اصلی تری در عملکرد MMR در سرطان معده در بیماران ایرانی دارند، هر چندکه انجام مطالعات بیشتر در این زمینه لازم می باشد.

REFERENCES

1. Iyer R, Pluciennik A, Burdett V, Modrich P. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 2006; 106: 302–23.
2. Lynch HT, Grady W, Suriano G, Huntsman D. Gastric Cancer: New Genetic Developments. *J Surg Oncol* 2005; 90:114–33.
3. Pharoah PDP, Guilford P, Caldas C. International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001; 121: 1348–53.
4. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet* 2004; 41: 508–17.
5. Flores-Rozas H, Clark D, Kolodner RD. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. *Nature Genetics* 2000; 26: 375–8.
6. Iyer RR, Pohlhaus TJ, Chen S, Hura GL, Dzantiev L, Beese LS, et al. The MutSalpha-proliferating cell nuclear antigen interaction in human DNA mismatch repair. *J Biol Chem* 2008; 283: 13310–9.
7. Zhang Y, Liu X, Fan Y, Ding J, Xu A, Zhou X, et al. Germline mutations and polymorphic variants in MMR, E-cadherin and MYH genes associated with familial gastric cancer in Jiangsu of China. *Int J Cancer* 2006 ; 119: 2592-6.
8. Yuan Y, Ye J, Zheng S. Clinical and genetic features of International Collaborative Group-hereditary nonpolyposis colorectal cancer families and suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Chin Med J* 2004; 117: 748-52.
9. Leung WK, Yu J, Enders KW, To KF, Ma PK, Lee TL, et al. Concurrent Hypermethylation of Multiple Tumor Related Genes in Gastric Carcinoma and Adjacent Normal Tissues. *Cancer* 2001;91:2294–301.
10. Sobin LH, Wittekind C. UICC TNM classification of malignant tumours. 5th ed. New York, Wiley, 1997; 65-9.
11. Jass JR, Sobin LH. World Health Organization international histological classification of tumours. Histological typing of intestinal tumours. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
12. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei Y, Carter K, Ruben S, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80.

Original Article

Immunohistochemistry Stain Assessment of DNA Mismatch Repair Proteins in Gastric Cancer

Molaei M[1], **Yadollahzadeh M**[2], **Mansoori B**[3], **Nemati F**[3], **Zali N**[3], **Montazer-Haghighi M**[3], **Zali MR**[4]

[1] Assistant Professor, Gastroenterology and Liver Disease Research Center, Talleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2] Resident of Internal Medicine, Gastroenterology and Liver Disease Research Center, Talleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[3] Researcher, Gastroenterology and Liver Disease Research Center, Talleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[4] Professor, Gastroenterology and Liver Disease Research Center, Talleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: Germline mutations in MMR genes are reported to be present in more than 70% of HNPCC cases. But, there is a paucity of data regarding the importance of defect of MMR system in the gastric cancer in general. So, in this study, we used IHC stain for MLH1, MSH2, PMS2 and MSH6 to reveal profile of MMR expression in patients with gastric cancer.

Materials and Methods: This study was performed on 134 patients with gastric cancer who had undergone surgical resection from January 2001 to December 2005. For comparative analyses chi-square test or Fisher's exact test and t-test were used.

Results: Through IHC assay, all of samples from patients had normal stain for MSH2 and MSH6. Except in 5 cases (3.7%) IHC stains for MLH1 and in 4 cases (3%) IHC stains for PMS2 were normal. In comparative analyses there were not any significant difference in variables between subgroups of IHC result.

Conclusion: Although, genetic factors are cause of gastric cancer in few patients, and germline mutation may increase the risk of gastric cancer. In this study 3.7% of cases with gastric cancer had abnormal MMR proteins function. It seems that MLH1 and PMS2 have a major role in MMR functions in Iranian patients with gastric cancer, to further clarify this issue, more resrarchers should be done.

Keywords: Mismatch repair system, Immunohistochemistry, Gastric cancer, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6.

Govaresh/ Vol. 14, No.3, Autumn 2009; 148-152

Corresponding author:

Gastroenterology and Liver Disease Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: + 98 21 22432515 Fax: + 98 21 22432517

E-mail: m_molaei@sbmu.ac.ir

Received: *19 Oct. 2009* ***Edited:*** *7 Feb. 2010*

Accepted: *9 Feb. 2010*