مقایسهٔ چگونگی بروز پروتئینهای P53، P21، P16، E-Cadherin و β-Catenin در آدنوکارسینوم کولورکتال و مخاط کولون غیرتوموری با استفاده از روش آرایه بافتی و ایمونوهیستوشیمی

دکتر نیلوفر سدیفی[۱]، دکتر مسعود ستوده[۲]، دکتر زهرا فروهش تهرانی[۳]، دکتر داریوش نصراله‌زاده[۴]

[۱] پژوهشگر، جهاد دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

[۲] استاد، بخش پاتولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۳] استادیار، بخش پاتولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۴] فلوی پژوهشی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف

آدنوکارسینوم کولورکتال یکی از شایعترین و قابل درمان‌ترین بدخیمیهای دستگاه گوارش است. نشان داده شده است که چگونگی بروز پروتئینهای P53، P21، P16، E-Catherine و β-Catenin در پیش‌آگهی این بدخیمی مؤثر است. هدف از این مطالعه مقایسه وضعیت پروتئینهای فوق در سلولهای توموری و غیرتوموری کولون افراد مبتلا به این بدخیمی با افراد غیرمبتلا و تعیین ارتباط آن با یافته‌های میکروسکوپی تعیین‌کننده پیش‌آگهی است.

روش بررسی

از نقاط مورد نظر بلوکهای پارافینی بافت توموری و غیرتوموری ۵۸ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم و ۵۰ کولون برداشته‌شده به دلیل ضایعات غیرتوموری نمونه‌های سیلندری شکل به قطر ۲/۵ میلی‌متر تهیه شد و در دسته‌های ۳۰تایی در بلوک آرایه بافتی قرار گرفت. برشهای حاصل به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی و بروز پروتئینهای فوق در آنها بررسی شد.

یافته‌ها

بروز P53 در سلولهای توموری بیش از سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا و غیرمبتلا بود ($p<0.001$) و با تهاجم عروقی تومور ارتباط مستقیم داشت ($p=0.017$). سایر یافته‌های مهم عبارت بودند از: ارتباط بروز E-Cadherin با کاهش تمایز سلولی ($p=0.023$) و ارتباط معکوس آن با تهاجم عروقی ($p=0.025$)، ارتباط معکوس بروز غشایی β-Catenin با تهاجم عروقی ($p=0.049$) و بروز بیشتر سیتوپلاسمی و هسته‌ای β-Catenin در تومور نسبت به بافتهای غیرتوموری ($p<0.001$). بروز این پروتئین در سیتوپلاسم ارتباط معکوس با افزایش مرحله ($p= 0.013$) و در هسته ارتباط مستقیم با کاهش تمایز سلولی نشان داد ($p=0.012$). چگونگی بروز پروتئینهای P21 و P16 با عوامل پیش‌آگهی ارتباط نداشت.

نتیجه‌گیری

به نظر می رسد که بررسی الگوی بروز پروتئیهای P53، E-Cadherin و β-Catenin در سلولهای توموری آدنوکارسینوم کولون که در بیوپسی از طریق کولونوسکوپی قابل انجام است، می تواند رفتار تهاجمی تومور را پیشگویی کند که ممکن است در انتخاب نوع درمان کمک‌کننده باشد.

کلید واژه: آدنوکارسینوم کولورکتال، ایمونوهیستوشیمی، P53، E-Cadherin، β-Catenin

گوارش/ دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، ۲۰-۲۶

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۲۸ **تاریخ اصلاح نهایی:** ۸۵/۱۰/۱۹ **تاریخ پذیرش:** ۸۵/۱۰/۲۱

زمینه و هدف

سرطان کولورکتال یک معضل عمدهٔ بهداشتی در بیشتر کشورهای جهان است.(۱)، ۹۸٪ از کلیه بدخیمی‌های رودهٔ بزرگ از نوع آدنوکارسینوم است.(۲)، این بدخیمی در آمریکا فراوانترین و درمان‌پذیرترین سرطان دستگاه گوارش به شمار می‌رود.(۲ و ۳)، طبق آمارهای منتشر شده مراکز ثبت سرطان در ایران، بدخیمی‌های ناحیهٔ رودهٔ بزرگ سومین سرطان شایع در ایران می‌باشند و بروز استانداردشدهٔ آن بر اساس سن، ۸/۶ مورد در ۱۰۰،۰۰۰ نفر است.(۴)

عوامل محیطی و ژنتیکی، هر دو در بیماریزایی این بدخیمی نقش دارند؛ از نظر ژنتیکی وقوع آن یک فرآیند چندمرحله‌ای و پیشرونده

نویسنده مسئول: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، بخش پاتولوژی، کدپستی ۱۴۱۱۴

تلفن و نمابر: ۸۸۰۱۲۹۹۲

E-mail: sotoudeh@ams.ac.ir

است که بخشی از آن از اختلال تنظیم تزاید در چرخهٔ تقسیم سلولی ناشی می‌شود. در این چرخه ژنهای مهارکننده تومور، یعنی P53، P21 و P16، در دو مرحلهٔ G_1 و G_2 مانع از ورود سلولهای واجد DNA آسیب‌دیده به مراحل بعدی تقسیم می‌شوند.(۲)، پروتئین حاصل از ژن P53 سبب مهار چرخهٔ سلولی از طریق القای سنتز P21 و نیز القای آپوپتوز وابسته به ژن BAX می‌شود.(۲)، نوع طبیعی P53 ژنی است که به طور طبیعی در سلول قرار دارد و دچار جهش نشده است. از آنجا که پروتئین حاصل از این ژن نیمه عمر کوتاهی (حدود ۲۰ دقیقه) دارد، به‌سرعت در سطح سلول متابولیزه می‌شود و از بین می‌رود. بنابراین با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بازیافت نمی‌شود و بروز آن در این رنگ‌آمیزی معمولاً به معنای وجود جهش در همان ژنی است که سبب افزایش نیمه عمر پروتئین محصول (حدود ۶ ساعت) می‌گردد. P21 و P16، دو عضو خانوادهٔ مهارکننده‌های کینازی وابسته به سیکلین (CDKs) هستند که در هسته قرار دارند و توقف چرخهٔ سلولی را در مرحلهٔ G_1، به ترتیب، با P53 که مهار مجموعهٔ cyclin D-CDK4 در فسفریله کردن ژن رتینوبلاستوم (RB) است، به عهده می‌گیرند.(۲و۵)

E-Cadherin گلیکوپروتئین غشایی است که اتصال بین‌سلولی را در بافتهای اپی‌تلیال میانجی‌گری می‌کند و جهش آن سبب افزایش خاصیت تهاجمی سلولهای سرطانی می‌شود.(۲و۵)

β-Catenin پروتئین مرتبط با ژنهای E-Cadherin و APC (adenosis polyposis coli) است که به طور طبیعی در زیر غشای پلاسمایی سلول قرار دارد و با ورود به سیتوپلاسم و سپس به هسته، رونویسی ژنهای محرک رشد C-myc و $cyclin-D_1$ را فعال می‌کند. APC با کاهش سطح سیتوپلاسمی β-Catenin با اثرات محرک رشد مقابله می‌کند. از طرفی عملکرد طبیعی E-Cadherin وابسته به اتصال آن به β-Catenin است.(۲و۵)

تکنیک آرایهٔ بافتی، روشی برای جمع‌آوری دهها تا صدها نمونهٔ بافتی استوانه‌ای‌شکل کوچک در یک بلوک پارافینی واحد برای آنالیز همزمان تعداد زیادی از نمونه‌های بافتی به همراه شاهدهای مربوط در شرایط یکسان است که سبب صرفه‌جویی در زمان و منابع و کنترل بهتر نتایج می‌شود. از این تکنیک برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، ایمونوهیستوشیمی★، فلوئورسنت هیبریدیزاسیون درجا★★، هیبریدیزاسیون درجا★★★ و واکنش پلیمراز زنجیره‌ای درجا★★★★ استفاده شده است.(۸-۶)، تهیه بلوکهای آرایه بافتی در اغلب مطالعات با استفاده از دستگاه مخصوص و به روش خودکار انجام شده است و مطالعات محدودی از روش دستی برای تهیه بلوکها استفاده کرده‌اند.(۱۲-۹)

چگونگی بروز پروتئینهای ژنهای P53، P21، P16، E-Cadherin و β-Catenin در مطالعات متعددی به طور جداگانه بررسی شده و نقش آن در پیش‌آگهی و پاسخ به درمان تعیین شده است.(۳۰-۱۳)

در مطالعهٔ حاضر که هدف آن بررسی چگونگی بیان پروتئینهای ژنهای فوق در سرطان کولورکتال بیماران ایرانی با استفاده از روش آرایهٔ بافتی و ایمونوهیستوشیمی است، فراوانی بروز پروتئینهای حاصل از این ژنها در سلولهای توموری و غیرتوموری کولون افراد مبتلا به آدنوکارسینوم با فراوانی بروز آنها در کولون افراد غیرمبتلا مقایسه می‌گردد و ارتباط فراوانی و الگوی بروز آنها با عوامل بافت‌شناسی تعیین‌کننده در پیش‌آگهی تعیین می‌شود تا روشهای ساده‌تری با امکان کاربرد بالینی، برای تشخیص و کمک به تعیین پیش‌آگهی و چگونگی پاسخ به درمان بیماران مورد آزمایش پیشنهاد شود.

روش بررسی

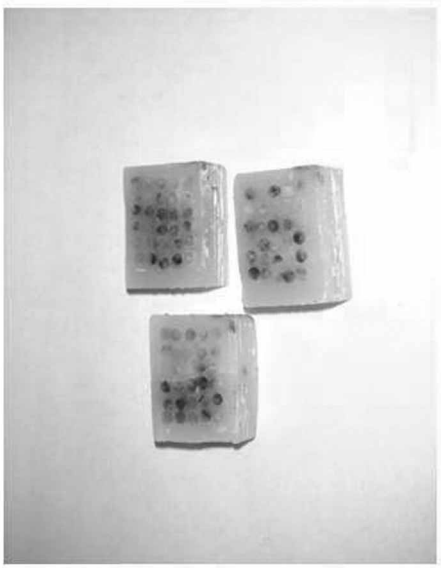
مطالعه به روش مورد-شاهدی بر روی بلوکهای پارافینی تهیه‌شده از بخش توموری کولون ۵۸ بیمار مبتلابه آدنوکارسینوم کولورکتال (به عنوان موارد) و بخش غیرتوموری کولون همان ۵۸ بیمار (به عنوان شاهدهای نوع اول) و ۵۰ مورد کولکتومی با دلایل غیرتوموری و جدای از بیماریهای التهابی ایدیوپاتیک روده نظیر تروما، ایسکمی و ... (به عنوان شاهدهای نوع دوم) در فاصلهٔ سالهای ۸۳-۱۳۸۰ در بیمارستان دکتر شریعتی تهران انجام گرفت.

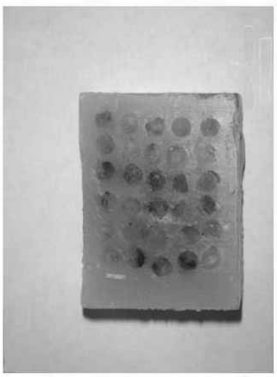
معیار انتخاب منطقه مناسب از نمونه‌ها برای تهیه آرایه بافتی تأیید وجود آدنوکارسینوم کولورکتال با بررسی هیستوپاتولوژی اسلایدهای رنگ‌آمیزی‌شده به روش هماتوکسیلین و ائوزین در موارد و فیکس بودن مناسب و نداشتن خونریزی و نکروز وسیع در موارد و شاهدها بود. برای این کار اسلایدهای موجود بازبینی شدند و پس از نشانه‌گذاری مناطق مورد نظر برای نمونه‌گیری روی اسلایدها و مطابقت آنها با بلوکهای پارافینی مربوط، نمونه‌ها با ابزار ۲/۵میلی‌متری یک‌بار مصرف پانچ بیوپسی به صورت قطعات استوانه‌ای‌شکل از بلوکهای اولیه خارج گشتند. نمونه‌های حاصل در ظرفهای جداگانه نگهداری و بر اساس شمارهٔ پاتولوژی نشانه‌گذاری شدند.

قالبهای مورد استفاده برای تهیه آرایه بافتی شامل دو قطعهٔ فلزی Lشکل بودند که برای جلوگیری از نشت پارافین، در کف پلیت میکروب‌شناسی قرار گرفتند و با پارافین مایع پر شدند؛ پارافین هنگام چیدن نمونه‌ها با حرارت ملایم چراغ الکلی، گرم نگه داشته شد تا در زمان چیدن بافتها که مستلزم صرف زمان و دقت زیاد است به صورت نرم و نیمه‌جامد باشد.

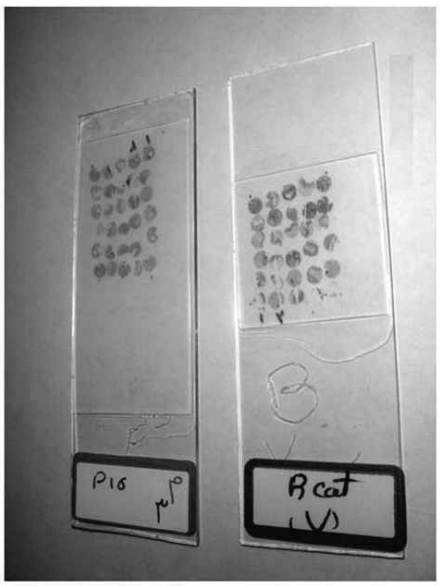
★ immunohistochemistry
★★ flourescent insitu hybridization
★★★ insitu hybridization
★★★★ insitu polymerase chain reaction

۲۷ نمونه از مورد یا شاهدها به همراه ۳ نمونه شاهد مثبت خارجی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در هر بلوک قرار داده شد (شکل ۱). شاهدهای مثبت خارجی که با مطالعه تحقیقات دیگران (۳۰-۱۳) و همچنین با استفاده از بروشور آنتی‌بادی‌های ایمونوهیستوشیمی، به طور اولیه انتخاب شده بودند، پس از تأیید توسط رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار گرفتند؛ این موارد شامل کارسینوم سلول سنگفرشی گردن رحم برای P21، کارسینوم مهاجم مجرایی پستان برای دو شاخص P53 و P16 و نیز اپی‌تلیوم نرمال معده یا بافت آدنوم پاراتیروئید برای دو شاخص E-Cadherin و β-Catenin بودند. پس از برش و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین، برای اطمینان از مناسب بودن بلوکها و بافتها، برشهای بیشتری جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی پنج شاخص مورد مطالعه تهیه شد (شکل ۲). نتایج پس از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی به روش استاندارد بر اساس مثبت یا منفی بودن، الگو، شدت و وسعت بروز پروتئینهای مورد مطالعه به صورت زیر طبقه‌بندی و در برگه ورود





شکل ۱



شکل ۲

اطلاعات ثبت گردید:

شدت رنگ‌پذیری: صفر = منفی، یک = مثبت خفیف، دو = مثبت متوسط و سه = مثبت شدید.

وسعت رنگ‌پذیری: صفر = کمتر از ۵ درصد، یک = ۲۵-۵ درصد، دو = ۵۰-۲۶ درصد، سه = ۷۵-۵۱ درصد و چهار = ۱۰۰-۷۶ درصد سلولها.

نمرهٔ نهایی، نتیجهٔ حاصل‌ضرب شدت در وسعت رنگ‌پذیری است که محدوده‌ای بین صفر تا ۱۲ دارد. نمرات صفر تا ۴ به‌عنوان رنگ‌پذیری منفی و نمرات ۵ تا ۱۲ به عنوان رنگ‌پذیری مثبت در نظر گرفته شدند.

الگوهای مورد قبول برای رنگ‌پذیری مثبت سلولها شامل هسته برای سه شاخص P53، P21 و P16، غشای سلول برای E-Cadherin و هسته، سیتوپلاسم یا غشای سلول برای β-Catenin بود.

در برگه ورود اطلاعات، علاوه بر نتایج رنگ‌آمیزی برای شاخصها، جنس، سن، محل و نوع تومور (NOS، موسینی و سلول نگین انگشتری)، grade بافت‌شناسی، Astler & Coller stage (به صورت دو حالت کمتر یا مساوی و بیشتر از ۳)، تهاجم عروقی و تهاجم دور عصبی برای موارد و جنس، سن و محل کولکتومی برای شاهدهای نوع اول و دوم درج شد.

نتایج رنگ‌آمیزی پنج شاخص در سه گروه مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه شدند و ارتباط رنگ‌پذیری سلولهای توموری با grade، stage، تهاجم عروقی، تهاجم دور عصبی و نوع تومور معین گشت.

آنالیز این اطلاعات توسط نسخه ۱۰ نرم‌افزار آماری SPSS و بر حسب لزوم با بهره‌گیری از دو آزمون Fisher یا Pearson chi-square انجام گرفت.

فراوانیهای بروز شاخصهای مربوط، در مورد سن، جنس و محل

تومور، محاسبه و به صورت داده‌های خام ارائه شدند.

یافته‌ها

فراوانی بروز P53 در سلولهای توموری (۳۹/۷٪) به طور معنی‌داری بیشتر از سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال (صفر) و کولون افراد غیرمبتلا (صفر) بود (p-value <۰/۰۰۱).

فراوانی بروز P21 و P16 در گروه بیماران (به ترتیب برابر با ۳۹/۷٪ و ۱۹٪) به طور معنی‌داری کمتر از بروز آنها در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا (به ترتیب برابر با ۸۹/۷٪ و ۶۹٪) و کولون افراد غیرمبتلا (به ترتیب برابر با ۷۸٪ و ۵۶٪) بود (p-value <۰/۰۰۱).

فراوانی بروز غشایی E-Cadherin و β-Catenin در سلولهای تومور نسبت به گروههای شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (p-value =۰/۸۹۱) و به ترتیب برابر با ۶۷/۲٪ و ۹۳/۱٪ در بیماران: ۶/۵۸ و ۱۰۰٪ در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا و ۶۶٪ و ۱۰۰٪ در کولون افراد غیرمبتلا بود.

فراوانی بروز سیتوپلاسمی و هسته‌ای در تومور (به ترتیب برابر با ۶۰/۳٪ و ۴۸/۳٪) به طور معنی‌داری بیشتر از بروز آن در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا (به ترتیب برابر با ۵/۲٪ و۱/۷٪) و کولون افراد غیرمبتلا (به ترتیب برابر با ۲٪ و صفر) بود (p-value <۰/۰۰۱).

بروز کلیه پروتئینهای مورد مطالعه در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال با بروز آنها در کولون افراد غیرمبتلا تفاوت معنی‌داری نداشت.

فراوانی بروز P53 در سلولهای آدنوکارسینوم کولورکتال با تهاجم عروقی تومور ارتباط مستقیم داشت (۶۶/۷٪ تومورهای P53 مثبت دارای تهاجم عروقی و ۳۰/۲٪ فاقد آن بودند؛ p-value =۰/۰۱۷).

فراوانی بروز P21 و P16 با هیچکدام از فاکتورهای تعیین‌کننده پیش‌آگهی ارتباط معنی‌دار نداشت.

بروز غشایی E-Cadherin، ارتباط مستقیم با کاهش تمایز سلولی (فراوانی بروز در gradeهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر با ۸۴٪، ۵۸/۶٪ و ۲۵٪ بود؛ p-value = ۰/۰۲۳) و ارتباط معکوس با احتمال تهاجم عروقی داشت (۴۰٪ از تومورهای E-Cadherin مثبت دارای تهاجم عروقی و ۷۶/۷٪ فاقد آن بودند؛ p-value = ۰/۰۲۵).

بروز غشایی β-Catenin با احتمال تهاجم عروقی نسبت معکوس داشت (۸۰٪ تومورهای β-Catenin مثبت دارای تهاجم عروقی و ۹۷/۷٪ فاقد آن بودند؛ p-value=۰/۰۴۹). بروز سیتوپلاسمی این پروتئین ارتباط معکوس با افزایش stage داشت (فراوانی بروز سیتوپلاسمی β-Catenin در stageهای کمتر یا مساوی ۳ برابر با ۷۳٪ و در stageهای بیشتر از ۳ برابر با ۳۸/۱٪ بود؛ p-value=۰/۰۱۳)، در صورتی که بروز هسته‌ای آن با کاهش تمایز سلولی ارتباط مستقیم نشان داد (فراوانی بروز هسته‌ای در gradeهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر با ۶۸٪، ۳۷/۹٪ و صفر بود؛ p-value=۰/۰۱۲).

خلاصه ارتباط بروز پروتئینها با عوامل تعیین‌کننده پیش‌آگهی در جدولهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول۱: درصد بروز پروتئینهای مختلف در ارتباط با عوامل تعیین‌کننده پیش‌آگهی

نوع پروتئین مورد مطالعه (موارد مثبت در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی)		عوامل تعیین‌کننده پیش‌آگهی											
		مرحله پیشرفت (stage)		درجه تمایز (grade)			تهاجم عروقی		تهاجم دور عصبی		نوع تومور		
		≤۳	>۳	خوب	متوسط	بد	وجود دارد	وجود ندارد	وجود دارد	وجود ندارد	*NOS	موسینوس	حلقه انگشتری
P53		٪۴۰/۵	٪۳۸/۱	٪۳۲	٪۴۸/۳	٪۲۵	٪۶۶/۷	٪۳۰/۲	٪۳۷/۵	٪۴۰	٪۴۱/۲	٪۴۰	۰
P21		٪۳۷/۸	٪۴۲/۹	٪۳۲	٪۴۱/۴	٪۲۵	٪۲۰	٪۴۶/۵	٪۵۰	٪۳۸	٪۳۹/۲	٪۴۰	٪۵۰
P16		٪۲۱/۶	٪۱۴/۳	٪۲۰	٪۱۳/۸	٪۵۰	٪۱۳/۳	٪۲۰/۹	٪۱۲/۵	٪۲۰	٪۱۷/۶	٪۴۰	۰
E-Cadherin		٪۶۷/۶	٪۶۶/۷	٪۸۴	٪۵۸/۶	٪۲۵	٪۴۰	٪۷۶/۷	٪۵۰	٪۷۰	٪۷۰/۶	٪۶۰	۰
β-Catenin	روی غشاء سلولی	٪۹۷/۳	٪۸۵/۷	٪۹۲	٪۹۳/۱	٪۱۰۰	٪۸۰	٪۹۷/۷	٪۱۰۰	٪۹۲	٪۹۴/۱	٪۱۰۰	٪۵۰
	سیتوپلاسمی	٪۷۳	٪۳۸/۱	٪۶۴	٪۶۵/۵	۰	٪۵۳/۳	٪۶۲/۸	٪۶۲/۵	٪۶۰	٪۶۲/۷	٪۶۰	۰
	درون هسته‌ای	٪۵۴/۱	٪۳۸/۱	٪۶۸	٪۳۷/۹	۰	٪۵۳/۳	٪۴۶/۵	٪۵۰	٪۴۸	٪۵۱	٪۲۰	٪۵۰

*NOS= Not otherwise specified

جدول۲: خلاصه ارتباط بروز پروتئینهای مختلف با عوامل تعیین‌کننده پیش‌آگهی*

پروتئین مورد مطالعه		مرحله پیشرفت	درجه تمایز	تهاجم عروقی	تهاجم دور عصبی	نوع تومور
P53		۱	۰/۳۹۲	۰/۰۱۷ ارتباط مستقیم	۱	۰/۵۰۶
P21		۰/۷۸۳	۰/۲۵۵	۰/۱۲۴	۰/۷۰۰	۰/۹۵۴
P16		۰/۷۲۹	۰/۲۲۰	۰/۷۱۰	۱	۰/۳۷۴
E-Cadherin		۱	۰/۰۲۵ ارتباط معکوس	۰/۰۲۳ ارتباط معکوس	۰/۴۱۸	۰/۱۰۶
β-Catenin	روی غشاء سلولی	۰/۱۳۰	۰/۸۴۲	۰/۰۴۹ ارتباط معکوس	۱	۰/۰۴۴
	سیتوپلاسمی	۰/۰۱۳ ارتباط معکوس	۰/۰۳۸	۰/۵۵۳	۱	۰/۲۰۵
	درون هسته‌ای	۰/۲۸۴	۰/۰۱۲ ارتباط معکوس	۰/۷۶۷	۱	۰/۴۱۶

* اعداد ذکر شده برابر با p-value محاسبه شده‌می‌باشند.

بحث

آدنوکارسینوم کولورکتال شایعترین و درمان‌پذیرترین سرطان دستگاه گوارش است.(۱ و ۲)، عوامل محیطی و ژنتیکی، هر دو در بیماریزایی آن نقش دارند.(۲)، از نظر ژنتیکی وقوع این بدخیمی چندمرحله‌ای و پیشرونده است که بخشی از آن از اختلال در تنظیم چرخهٔ تقسیم سلولی منشأ می‌گیرد. ورود سلول از مرحلهٔ G_0 به G_1 و سپس به S در کنترل ژنهای متعددی از جمله سرکوب‌کننده‌های توموری P53، P21 و P16 است.(۲)

چسبندگی بین‌سلولی در بافتهای اپی‌تلیال توسط پروتئین غشایی E-Cadherin تأمین می‌شود و β-Catenin علاوه بر ایفای نقش در افزایش تحریک تقسیم سلولی، واسطهٔ عملکرد Cadherin نیز است.(۲ و ۵)

مطالعات متعددی به طور جداگانه روی این پروتئینهای کلیدی مرتبط با چرخه سلولی انجام شده که نشانگر ارتباط چگونگی بروز آنها با پیش‌آگهی و چگونگی پاسخگویی به درمان در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال بوده‌اند.(۳۰-۱۳)

در مطالعهٔ حاضر تلاش شد با رفع مشکلات تکنیکی روش دستی آرایه بافتی (manual tissue array) و ایمونوهیستوشیمی، فراوانی بروز P53، P21، P16، E-Cadherin و β-Catenin در سلولهای توموری و غیرتوموری کولون بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال با بروز آنها در کولون افراد غیرمبتلا مقایسه شود و ارتباط فراوانی و چگونگی بروز این شاخصها با فاکتورهای بافت‌شناسی مؤثر بر پیش‌آگهی نیز تعیین گردد. مشکلات تکنیکی آرایه بافتی و روش به‌کارگرفته‌شده برای رفع آنها به شرح زیر است:

انتخاب محل پانچ در بلوک پارافینی برای استخراج نمونه‌ها باید با دقت صورت بگیرد و حتی‌المقدور از مکانهای دارای بافت چربی استفاده نشود، در غیر این صورت برش بلوکها دچار مشکل می‌شود و احتمال کنده شدن بافت هنگام کار از روی لام وجود دارد. نمونه‌های بافتی استوانه‌ای کوچک باید در قالب آرایه بافتی در یک سطح قرار بگیرند که مستلزم صرف زمان و دقت بسیار است. استفاده از بلوکهای پارافینی از پیش‌آماده‌شده که حفره‌های جایگاه نمونه‌ها توسط پانچ در آنها تعبیه شده بودند به دلیل ترک خوردن بلوک حین چیدن نمونه‌ها در روش دستی امکان‌پذیر نشد. آنتی‌بادی مورد استفاده در روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی باید تمام سطح لام را بپوشاند.

مزایای روش آرایه بافتی حفظ خصوصیات مورفولوژیک بافت و قابلیت استفاده از آن در روشهای رنگ‌آمیزی مانند هماتوکسیلین و ائوزین، ایمونوهیستوشیمی و همچنین امکان مطالعات مختلف مولکولی روی بافت است. این روش صرفه‌جویی در زمان، هزینه و مواد مصرفی را به دنبال دارد و امکان مقایسهٔ بهتر نتایج را با یکدیگر و بافتهای شاهد فراهم می‌آورد و به دلیل مقرون به صرفه بودن به انجام تحقیقات آینده کمک خواهد نمود.

در مطالعهٔ حاضر افزایش بروز P53، کاهش بروز P21 و P16 و

جابه‌جایی بروز پروتئین β-Catenin از غشای سلولی به سیتوپلاسم و هستهٔ سلول در سلولهای آدنوکارسینوم کولورکتال بیش از افراد غیرمبتلا مشاهده شد؛ اما بروز این پروتئینها در سلولهای پوششی غیربدخیم قرارگرفته در مجاورت بافت توموری افراد مبتلا به سرطان با سلولهای پوششی کولون افرادی که به آدنوکارسینوم کولون مبتلا نبودند، تفاوت معنی‌داری نداشت. بروز غشایی E-Cadherin و β-Catenin هر سه گروه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و بدین علت نمی‌توان هیچ‌یک از شاخصهای فوق را به عنوان شاخص تشخیص‌دهنده ابتدایی سرطان کولون در نظر گرفت.

در مقایسه با stageهای پایین‌تر، در stageهای بالاتر تومور کاهش بروز سیتوپلاسمی β-Catenin مشاهده شد؛ کاهش تمایز میکروسکوپی سلول با کاهش بروز غشایی E-Cadherin و کاهش بروز هسته‌ای β-Catenin همراه بود. تهاجم عروقی تومور با افزایش بروز P53 و کاهش بروز غشایی E-Cadherin و β-Catenin همراهی داشت. تهاجم دور عصبی تومور با هیچ‌کدام از شاخصهای فوق ارتباط معنی‌داری را نشان نداد.

در مطالعه والاسیادو* و همکارانش در سال ۱۹۹۷ (۱۸) و نیز مطالعه گوسیا** و همکارانش در ۲۰۰۰ (۱۹) در یونان تومورهای P53 مثبت با احتمال کمتر متاستاز لنفاوی و خصوصیات تهاجمی کمتری همراه بودند که با مطالعه ما مغایرت داشت. در تحقیق هیرویکوسکی*** و همکارانش در ۱۹۹۹ در فنلاند (۲۰) و نیز در مطالعه کولین**** و همکارانش در ۲۰۰۵ در انگلستان (۲۱) جهش یا افزایش بروز P53 ارتباطی با پیش‌آگهی نداشت. در مطالعه دیز***** و همکارانش در ۲۰۰۵ در اسپانیا (۲۲) همراهی افزایش بروز P53 با افزایش عود فقط در ۳ stage Duck مشاهده شد. میتومی****** و همکارانش در ۲۰۰۵ در ژاپن (۲۳) نشان دادند که کاهش بروز P21 با افزایش درگیری لنفاوی و کبد همراه است. در تحقیق یاسویی******* و همکارانش در ۱۹۹۷ در ژاپن (۲۴) نیز کاهش بروز P21 با تهاجم عمیقتر تومور به لایه عضلانی و بالاتر stage همراهی داشت. تادا******** و همکارانش در ۲۰۰۳ در ژاپن (۲۵) نشان دادند که متاستاز لنفاوی در تومورهای دارای کاهش بروز P16 دیده می‌شود. در مطالعه ما میزان بروز P21 و P16 در سلولهای توموری نسبت به سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا و کولون غیرمبتلایان کاهش نشان داد؛ اما ارتباطی با پیش‌آگهی نداشت. در مطالعات هرتر********* (۲۶) و همکارانش در ۱۹۹۹ در آلمان و اوتسونومیا********** و همکارانش در ۲۰۰۱ در ژاپن (۲۷) و دلکتورسکایا*********** و همکارانش در ۲۰۰۵ در مسکو (۲۸) انتقال بروز پروتئین β-Catenin از غشای سلولی به سیتوپلاسم و هستهٔ سلول در سلولهای آدنوکارسینوم کولورکتال بیش از سلولهای غیرتوموری مشاهده شد و با افزایش خاصیت تهاجمی تومور همراه بود که با نتایج مطالعه ما مشابهت داشت. در دو تحقیق اسلونکوا************ و همکارانش در ۲۰۰۱ در چک (۲۹) و جیسوس************ و همکارانش در ۲۰۰۵ در برزیل (۳۰) بروز E-Cadherin ارتباطی با پیش‌آگهی نشان نداد که این نتیجه مغایر با مطالعه ما بود.

نتیجه‌گیری

می‌توان چنین گفت که بررسی چگونگی بروز پروتئین حاصل از ژنهای P53، E-Cadherin و β-Catenin با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌های کوچک بیوپسی فیکس‌شده در فرمالین می‌تواند قبل از عمل جراحی ماهیت تهاجمی تومور، احتمال وجود متاستازهای عروقی-لنفاوی و چگونگی پاسخگویی به درمان را پیشگویی نماید و اطلاعات جامعتری را برای انتخاب بهترین روشهای درمانی در اختیار متخصصان جراحی، دستگاه گوارش و انکولوژی قرار دهد.

سپاسگزاری

این مقاله نتیجه پایان‌نامه تخصصی خانم دکتر نیلوفر صدیقی و طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمان تهران به شماره قرارداد ۱۳۲/۱۱۱۶۰ مورخ ۸۴/۱۲/۲۰ است.

بدین وسیله از سرکار خانم سیده پری سیما عظیمی کارشناس واحد ایمونوهیستوشیمی بخش پاتولوژی بیمارستان دکتر شریعتی که زحمت رنگ‌آمیزی بافتها را در این مطالعه متقبل شدند، قدردانی می‌نماییم.

* Valassiadu
** Goussia
*** Hirvikoski
**** Colin
***** Diez
****** Mitomi
******* Yasui
******** Tada
********* Herter
********** Utsunomiya
*********** Delektorskaya
************ Sloncova
************* Jesus

References

1. Haskell CM .Colorectal cancer Natural history, diagnosis and staging. In: Haskell CM. Cancer Treatment. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. page 703-5.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Neoplasia Chen L, James M. The gastrointestinal tract. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease, 7th ed. Philadelphia: *Elsvier Saunders;* 2005. p. 859-68.
3. Rosai J. Gastrotestinal tract. In: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's Surgical pathology. 9th ed. Edinburg: *Mosby*; 2004. p. 799-821.
4. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, *et al.* Cancer occurrence in Ardabil: Result of a population-based cancer registry from Iran. *Int J Cancer* 2003; 107: 113-8.
5. Sherbet GV, Lakshmi MS. The Genetics of Cancer, Genes Associated With Cancer Invasion, Metastasis and Cell Proliferation. 1st ed. San Diego: *Academic Press;* 1997. p. 29-31, 66-7, 77, 103-6, 174, 204-5.
6. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, *et al.* Tissue microarrays for high-throghput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7.
7. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified... tissue microarray technology. *Mol pathol* 2003; 56: 198-204.
8. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, *et al.* Validation of microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimen using the exampels of human fibroblastic tumor. *Am J Pathol* 2001; 158: 1245-51.
9. Wang L, Deavers MT, Deavers MT, Malpica A, Silva EG, Liu J. Tissue microarray: a simple and cost effective method for high- throughput studies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003: 174-6.
10. Pan CC, Chen PC, Chiang H. An easy method for manual construction of high-density tissue arrays. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12: 370-2.
11. Hidalgo A, Pina P, Guerrero G, Lazos M, Salcedo M. A simple method for construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol* 2003; 56: 144-6.
12. Wang SL, Yang CH, Chen HH, Chai CY. A Simple and economic method for the manual construction of well-aligned tissue arrays. *Pathol Res Pranct* 2006 22; [Epub ahead of print].
13. Mackay JA, Doglas JJ, Ross VG, Curran S, Murray GI, Cassidy J, *et al.* Protein expression and gene ploymorphism in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000; 88: 77-81.
14. Liang Z, Liu F, Luo Y. Detection of the expression of p_{21}, p_{53}, p_{185} proteins and the mutation of ras, p_{53} genes in colorectal adenoma and carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1995; 24: 352-5.
15. Diez M, Medrano M, Muguerza JM, Ramos P, Hernandez P, Villeta R, *et al.* Influence of tumor localization on the prognostic value of p_{53} protein in calorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2000; 20: 3907-12.
16. Shu M, Liu S, Yu P. Expression and significance of p_{53}, C-erb B2, CEA proteins in colorectal adenoma and carcinoma. *Hunan Yi ke Da Xue Bao* 1998; 23: 129-32.
17. Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, Mourra N, Flahault A, Olschwang S, *et al.* Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p_{53}, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Wirchow Arch* 2003; 443: 115-21.
18. Valassiadou KE, Stefanaki K, Tzardi M, Datseris G, Geosgoulias V, Melissas J, *et al.* Immunohistochemical expression of p_{53}, Bcl2, mdm2 and Waf1/p_{21} proteins in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 1997; 17: 2571-6.
19. Goussia AC, Ioachim E, Agnantis NJ, Mahera M, Tsanos EV. Bcl2 expression in colorectal tumours Correlation with p_{53}, mdm2, Rb, proteins and proliferation indices. *Histol Hisopathol* 2000; 15: 667-72.
20. Hirvikoski P, Auvinen A, Servomma K, Kiuru A, Rytomma T, Makkonen K, *et al.* K-ras and p_{53} mutations and overexpression as prognostic factors in female rectal carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 685-91.
21. Colin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, P_{53} and APC mutions in Colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54: 1283-6.
22. Diez M, Pollan M, Ramos P, Villeta R, Ratia T, Hernandez P, *et al.* Variation in the prognostic value of P_{53} protein in relation to tumoral stage in patients with colorectal adenocarcinuma. *Cir Esp* 2005; 77: 213-20.
23. Mitomi H, Mori A, Kanazawa H, Nishiyama Y, Ihara A, Otani Y, *et al.* Venous invasion and down-regulation of P_{21} (WAF1/CIP) are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1421-6.
24. Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, Semba S, Kudo Y, Shimamoto F, *et al.* Expression of p_{21} Waf_1/Cip_1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p_{53} proteion expression. *Pathol Int* 1997; 47: 470-7.
25. Tada T, Watanabe T, Kazana S, Kanazawa T, Hata K, Komuro Y, *et al.* Reduced p_{16} expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1756-60.
26. Herter P, Kuhnen C, Muller KM, Wittinghofer A, Muller O. Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and peutz-jeghers polyps. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 125: 297-304.
27. Utsunomiya T, Doki Y, Takemoto H, Shiozaki H, Yano M, Sekimoto M, *et al.* Correlation of beta-catenin and Cyclin D1 expression in colon cansers. *Oncology* 2001; 61: 226-33.
28. Declektorskava VV, Perevoshchikov AG, Golovkov DA, Kushlinskii NE. Expression of E-cadherin, beta-catenin, and CD-44V6 cell adhesion molecules in primary tumors and metastases of colorectal adenocarcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139: 706-10.
29. Sloncova E, Fric P, Kucerova D, Lojda Z, Tuhackova Z, Sovova V. Changes of E-Cadherin and beta-catenin in human and mouse intestinal tumours. *Histochem J* 2001; 33: 13-7.
30. Jesus EC, Matos D, Artigiani R, Watzberg AF, Goldenberg A, Saad SS. Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 422-7.

Comparison of the Expression of P53, P21, P16, E-Cadherin and β-Catenin Proteins in Colorectal Adenocarcinoma and the Non-tumoral Colonic Mucosa by Immunohistochemistry and Tissue Array Techniques

Sodeifi N
Jahad Daneshgahi, Iran University of Medical Sciences

Sotoudeh M
Department of Pathology, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Foroheshe Tehrani Z
Department of Pathology, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Nasrollahzadeh D
Digestive Diseases Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Corresponding Author:
Masoud Sotoudeh M.D., Department of Pathology, Shariati Hospital, Karger-e-Shomali Ave., Tehran, 14114, Iran.
Telefax: +98 21 88012992
E-mail: sotoudeh@ams.ac.ir

ABSTRACT

Background: Colorectal adenocarcinoma is one of the most prevalent and treatable malignancies of the gastrointestinal tract. Pattern of expression of the P53, P21, P16, E-cadherin and β-Catenin proteins are shown to be related to the prognosis of this malignancy. We aimed to compare the pattern of expression of these proteins in tumoral and non-tumoral mucosal cells of cancer and on-cancer patients in relation to the histological prognostic factors.

Materials and Methods: 2.5 millimeter cylindrical cores were punched out from selected tumoral and non-tumoral areas of the paraffin blocks of 58 colorectal cancer patients and colonic mucosa of 50 colons removed for other reasons. The samples were arrayed in paraffin blocks in groups of 30. Histological sections were evaluated for the expression of the target proteins by immunohistochemical techniques.

Results: P53 was expressed more in tumoral than non-tumoral mucosal cells of the cancer and non-cancer patients ($p<0.001$) and was related to vascular invasion ($p=0.017$). Expression of E-Cadherin was related to poor differentiation ($p=0.023$) and inversely to vascular invasion ($p=0.025$). Membranous expression of β-Catenin was inversely related to vascular invasion ($p=0.049$). Cytoplasmic and nuclear expression of this protein was more in tumor cells ($p<0.001$). Also, the cytoplasmic expression of β-Catenin was inversely related to the stage ($p=0.013$) whereas nuclear expression was related to poor differentiation. ($p=0.012$). The pattern of expression of P21 and P16 were not found to have any relation with the histological prognostic factors.

Conclusion: It seems that the determination of the pattern of expression of P53, E-Cadherin and β-Catenin in colorectal adenocarcinoma, which is applicable on colonoscopic biopsies, could predict the biological aggressiveness of the tumor which might have therapeutic implications. *Govaresh/* Vol. 12, No. 1, Spring 2007; 20-26

Keywords: Colorectal adenocarcinoma, Immunohistochemistry, P53, E- Cadherin, β-catenin