Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

مطالعه بررسی بیان ژن های KRAS وNRAS افراد مبتلا به سرطان ریه نسبت به گروه سالم

سحرریخته گر[1]، اردشیر حسام پور[2]*

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۳ / پاییز ۹۷ / مسلسل ۷۷

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۶/۳ پذیرش مقاله: ۹۷/۷/۷

* **مقدمه:** سرطان ریه یکی از رایج ترین انواع سرطان‌ها در سرتاسر دنیا است و یکی از دلایل مهم مرگ و میر است. تغییرات بیانی در ژن‌های KRAS و NRAS باعث ایجاد اختلال در انتقال سیگنال‌های درون سلولی و تغییرات تنظیم سیکل سلولی می‌شود.

* **مواد و روش‌ها:** سطح بیان ژن‌های KRAS و NRAS در ۵۰ نفر از افراد بیمار در مقایسه با ۵۰ فرد سالم بررسی کمی شد. RNA تام استخراج ، cDNA سنتز و بیان بیومارکرهای KRAS و NRAS در حضور ژن کنترل GAPDH با استفاده از qRT-PCR بررسی شد.

* **یافته‌ها:** نتایج آزمون‌ها حاکی از افزایش بیان بیومارکرهای هدف در افراد سرطان ریه در مقایسه با سالم می باشد به طوریکه برای ژن‌های KRAS و NRAS به ترتیب ۲/۰۵ و ۳/۴۳ برابر بیان افزایشی مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که grade بیماری با میزان بیان بیومارکرها ارتباط معنی داری نشان داشته است، به طوریکه با افزایش مرحله و درجه شدت سرطان بیان بیومارکرها افزایش می‌یابد (P=۰/۰۰۳).

* **بحث و نتیجه‌گیری:** افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های KRAS و NRAS در نمونه‌های خون مبتلا به سرطان در مقایسه با نرمال، را می‌توان به عنوان بیومارکرهای احتمالی هدف جهت غربالگری غیر تهاجمی در تشخیص زود هنگام سرطان ریه استفاده نمود.

* **واژه‌های کلیدی:** KRAS، NRAS، Real Time PCR، مارکر، سرطان ریه.

آدرس مکاتبه: تهران، واحد تهران مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه.

پست الکترونیک: a.hesampour@gmail.com

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

مقدمه

بروز سرطان سالانه در سرتاسر دنیا در حال افزایش است و سرطان ریه یک بیماری با پیش آگهی ضعیف در زمان تشخیص است. این بیماری به اولین علت مرگ و میر مردان و دومین علت مرگ میر زنان در سرتاسر دنیا تبدیل شده است (۱). از لحاظ ظاهر بافت شناسی سرطان ریه به دو شکل سرطان ریه کوچک سلول (SCLC) و سرطان ریه غیر کوچک سلول (NSCLC) دسته بندی می شود. سرطان ریه غیر کوچک سلول به انواع آدنوکارسینوما، کارسینومای سلول‌های سنگفرشی و کارسینومای سلول‌های بزرگ تقسیم بندی می‌شود (۲). اکثر علائم شایع سرطان ریه شامل سرفه، تنگی نفس، همو‌پتزیس است و علائم سیستمیک آن کاهش وزن، بی‌اشتهایی، خستگی و درد قفسه‌ی سینه و دنده است (۳). آلودگی هوا احتمالاً یکی از عوامل دخیل در مبتلا شدن به سرطان ریه است همچنین قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی در شرایط طبیعی و تصادفی مانند آرسنیک، آزبست، نیکل کلراید و گاز طبیعی رادون رادیواکتیو خطر مبتلا شدن به سرطان ریه را افزایش می‌دهد (۴) سرطان ریه غیر کوچک سلول ۸۵٪ از موارد سرطان ریه را شامل می‌شود. از روش‌های درمانی که برای درمان این مدل از سرطان ریه استفاده می‌شود شامل استفاده از عمل جراحی، برداشت بافت و به دنبال آن شیمی درمانی برای بیمارانی که در مراحل ابتدایی سرطان ریه قرار دارند می‌باشد (۵). برای افرادی که به سرطان ریه کوچک سلول مبتلا شده‌اند معمولاً در مراحل ابتدایی آن جراحی در نظر گرفته می‌شود. برخی تغییرات ژنتیکی شناخته شده در سرطان ریه شامل موتاسیون در KRAS با نقش گیرنده‌ی فاکتور رشد اپی درمال (EGFR)-BRAF و همچنین ایجاد موتاسیون‌هایی در JAK2 ,ERBB2, RET و گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاست ۱ (FGFR1) است (۶). ژن‌های RAS، ژن‌هایی هستند که به طور متناوب دچار تغییر می شوند به طوریکه در ۱۷ تا ۲۵ ٪ درصد از انواع سرطان‌ها و همینطور در ۳۵٪ درصد از سرطان‌های ریه دچار موتاسیون می‌شوند و باعث ایجاد مشکل در انتقال سیگنال‌های درون سلولی و بیان آن می‌شود که شامل KRAS-NRAS و HRAS است (۷). ژن NRAS یکی از ژن‌های خانواده‌ی ژنی RAS است که توسط پژوهشگران انستیتو تحقیقاتی سرطان در لندن کشف شد (۸). NRAS یک GTPase مرتبط با KRAS است که ابتدا در رده‌ی سلولی نوروبلاستوما به عنوان یکی از اعضای سه‌گانه خانواده‌ی RAS یک سال بعد از KRAS وHRAS شناسایی شد (۹). مطابق گزارش آژانس بین المللی تحقیقات برای سرطان، سرطان ریه سالانه بیش از یک میلیون نفر را در سرتاسر دنیا تهدید می‌کند و به همین دلیل به یکی از انواع سرطان‌های کشنده در سرتاسر دنیا شناخته می‌شود (۱۰). در این میان سن یک عامل تعیین کننده در رابطه با خطر مبتلا شدن به سرطان ریه است. به طوری که در ایران متوسط سن مبتلا شدن به این بیماری ۶۰ سال است (۱۱). موفقیت در درمان‌های ضد سرطانی هدفمند تا حد زیادی وابسته به بیومارکرهایی است که در بیماران شناسایی می‌شود. بیومارکرها کاربرد بسیاری در ارزیابی خطر، غربالگری، تشخیص زودهنگام، پیش آگهی و پیش بینی از پاسخ‌ها نسبت به درمان و مشاهده پیشرفت بیماری برای بیماران مبتلا دارد (۱۲). هدف از این پژوهش بررسی مقایسه‌ای کمی بیان ژن‌های KRAS و NRAS به روشی غیر تهاجمی در نمونه خون افراد مبتلا به آدنوکارسینومای ریه و افراد سالم با استفاده از تکنیک Real-time PCR است، که بتوان تغییرات کمی بیانی دو ژن هدف را به عنوان بیومارکر جهت غربالگری و تشخیص سرطان ریه در نمونه‌های خونی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

این پژوهش شامل یک جامعه ۱۰۰ نفری شامل جمع‌آوری ۵۰ عدد نمونه خون مبتلا به سرطان ریه از نوع آدنوکارسینوما و ۵۰ عدد نمونه خون CBC افراد شاهد که جواب رادیولوژی و آزمایشگاهی آنها در سه دوره متوالی معاینه ۱ ساله منفی اعلام گردیده است به همراه پرسشنامه و رضایت نامه و با رعایت قوانین اخلاق در مطالعات تجربی پزشکی Helsinki و تبعیت از دستورالعمل‌های مربوطه از قسمت بیمارستان مسیح دانشوری به شماره کمیته اخلاق ۳۴۰/۲۲ جمع‌آوری شده است. پس از جمع‌آوری نمونه خون با رعایت اصول انتقال و نگهداری به تانک ازت و فریزر ۸۰- درجه منتقل شد. تمامی دستورالعمل‌های اخلاقی برای نگهداری و استفاده از نمونه‌های انسانی رعایت گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA تام از نمونه‌های خون استفاده از کیت GeneAll انجام شد. و نمونه‌های استخراج شده توسط اسپکتروتومترنانودراپ (Thermo scientific, Germany) سنجش کمی و توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی کیفی شد و از نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر میان ۲-۱/۸ داشتند جهت سنتز cDNA استفاده شد. یک میکرولیتر از RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA، Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, #K1622 - ,Thermo Fisher داخل دستگاه ترموسایکلر(ABI (Applied Biosystem با استفاده از آنزیم رونویس معکوس Multiscribe™ مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی پرایمر PCR

برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزار (Applied Biosystems,Primer Express Software version 3 Austin TX USA) و همچنین سایت NCBI استفاده شد. که پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده. توالی ژن GAPDH که به عنوان شاهد داخلی مورد استفاده قرار گرفته است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های KRAS وNRAS به همراه کنترل GAPDH

نام		توالی `۳-۵`
KRAS	F R	TGT GTC TCA TAT CAG GTT GAC GA CAA GAG TCG AGT GTG GTC TCA
NRAS	F R	ATG ACT GAG TAC AAA CTG GTG GT CAT GTA TTG GTC TCT CAT GGC AC
GAPDH	F R	CTC TCT GCT CCT CCT GTT CG ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC

آزمون Real time PCR

آزمون Real time PCR با استفاده از کیت، 480 Master mix (Roche Applied Science) SYBR Green I ساخت شرکت Roche با برنامه حرارتی به شرح واسرشت سازی اولیه DNA الگو با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه است، مرحله دوم به صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه (cycles) با دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه و۶۱ درجه به مدت۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت۳۰ ثانیه انجام شد. اندازه‌گیری میزان فلورسنت توسط دستگاه rotor-gene 6000 ساخت کمپانی Corbet استرالیا انجام شد و منحنی‌های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم افزار رسم و آنالیز شد. جهت تایید صحت انجام واکنش PCR و تکثیر قطعات، محصول واکنش RealTime PCR پس از بررسی توسط نانودراپ روی ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی و صحت اندازه قطعات حاصل از تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تایید تکثیر روی ژل آگارز در شکل ۱ نمایش داده شده است. به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها، کیفیت رنگ فلورسانت سایبرگرین، اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیر اختصاصی و عدم وجود دایمر پرایمر در محصول PCR نمودار منحنی ذوب برای ژن‌های NRAS،KRAS و GAPDH به صورت جداگانه توسط دستگاه Real time PCR Rotor gene Q رسم شد.

آنالیز داده‌ها

داده‌های خام حاصل از Real Time PCR با استفاده از نرم افزار تجزیه و تحلیل شد و محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام گردید. پس از تکثیر، (cycle threshold) CT نمونه‌ها شناسایی و تعیین

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

شد. بر اساس روش Relative Quantification (RQ) و فرمولاسیون $\Delta\Delta Ct^{-2}$ به صورن مضربی از میزان بیان ژن‌های KRAS و NRAS درج شده و در مقایسه با ژن داخلی GAPDH و در مجاور نرمال متوازن مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت.

آزمون‌های آماری تست کولموگروف اسمیرنوف (جهت بررسی پارامتر سن)، آزمون T_TEST برای بررسی میزان بیان ژن در افراد سالم و بیمار و به منظور بدست آوردن ارتباط بین دو پارامتر کمی (سن و ΔCT ژن) از آزمون پیرسون استفاده گردید. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و P<۰/۰۵ معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

نتایج بررسی نسبت مقدار RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد. نتایج بررسی نمودار منحنی ذوب به صورت تک قله ای مشاهده شد که بیانگر تنها یک محصول PCR است. محصول PCR نیز بر روی ژل قرار گرفت و مشاهده شد که هر کدام از واکنش‌های انجام شده توسط پرایمرهای اختصاصی تنها یک باند اختصاصی وجود دارد که این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه‌ها را تایید کرد. نتایج سیکل تزاید در نمودار ۱ ترسیم شده است.

بررسی جمعیت مورد مطالعه

در این پژوهش، جمعیت مورد مطالعه ما شامل دو گروه بیماران و افراد سالم بودند که با برآورد حجم نمونه آماری در هر گروه ۵۰ نفر قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران در این مطالعه ۵۳/۶۵ و افراد سالم ۴۹ سال بود که از نظر توزیع داده تست کولموگروف اسمیرنوف نشان می‌دهد که پارامتر سن از توزیع نرمال برخوردار بوده و گروه بیمار و افراد سالم از این نظر یکسان انتخاب شده‌اند (P=۰/۲) (جدول ۲).

بررسی تغییر بیان نسبی ژن‌های KRAS و NRAS

بررسی تغییر بیان نسبی در افراد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد سالم نشان داد که تغییر بیان نسبی ژن‌های KRAS وNRAS در افراد مبتلا به سرطان ریه به ترتیب ۱/۰۵±۴/۵۹ با (P-value =۰/۰۱۴) و ۱/۵۱±۱۱/۴۴ با (P-value=۰/۰۰۱) می‌باشد. همچنین نسبت بیان ژن‌های KRAS و NRAS در نمونه‌های کنترل سالم به ترتیب ۰/۴۳±۲/۲۳ با (P-value=۰/۰۱۴) و ۰/۳۱ ±۳/۳۳ با (P-value=۰/۰۰۱) می‌باشد که این تغییرات حاکی از بیان افزایشی ژن‌های KRAS و NRAS در مقایسه با افراد سالم می‌باشد که برای ژن KRAS تغییرات افزایشی ۲/۰۵ برابر بیان نسبت به افراد سالم و برای ژن NRAS افزایش بیان ۳/۴۳ برابر نسبت به افراد سالم است . نتایج نشان می‌دهد بررسی کمی بیان ژن های KRAS و NRAS در نمونه خون بیماران و افراد مستعد به سرطان ریه میتواند به عنوان بیومارکر برای تشخیص و غربالگری سرطان ریه استفاده گردد. در این راستا با شناسایی این دو ژن در نمونه های خون، نتایج نشان داد که میزان بیان ژن های KRAS و NRAS در نمونه خون افراد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی داری دارد (نمودار۲).

بررسی وضعیت مرحله بیماری

در این مطالعه از ۵۰ بیمار ۲۶ مورد (۵۲٪) دارای سلول‌های سرطانی در مرحله ۳ و ۲۴ مورد (۴۸٪) در مرحله ۴ سرطان ریه قرار دارند. در بررسی ارتباط بین مرحله و درجه شدت بیماری در بیماران مشخص شد که بین این دو پارامتر ارتباط معنی‌داری وجود دارد و پراکندگی فراوانی‌ها در مرحله و درجه بیماری یکسان است و با افزایش مرحله و درجه شدت سرطان و میزان بیان ژنی افزایش می‌یابد.

بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان بیومارکرها در افراد بیمار و سالم

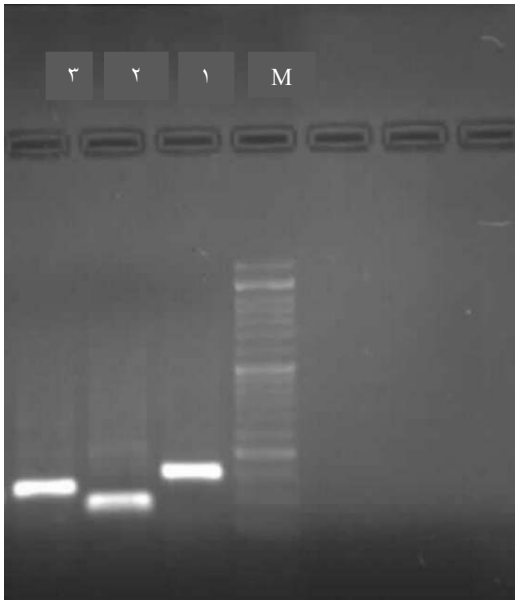
به منظور به دست آوردن ارتباط بین دو پارامتر کمی سن و میزان بیان KRAS و NRAS از آزمون Pearson استفاده شد و میانگین و انحراف معیار داده‌ها با هم مقایسه گردید. نتایج این بررسی نشان داد که بین پارامتر

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

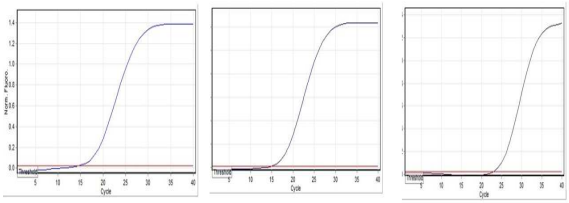
سن و ΔCt ژن‌های KRAS و NRAS ارتباط معنـی داری وجود دارد (P=۰/۰۱).

بررسی ارتباط بین مرحلـه و درجـه بیمـاری بـا میزان بیومارکرهای KRAS وNRAS

بدین منظور ابتدا داده‌ها به دو گروه کنترل و بیمار تفکیـک (split) شـد و در ادامـه از آزمـون Pearson جهـت بررسـی همبسـتگی بـین مرحلـه بیمـاری و ΔCt بیـان بیومارکرهـای KRAS و NRAS بهره گرفته شد. نتایج نشان داد بـین مرحلـه بیمـاری و میـزان ΔCt ارتبـاط معنـی داری وجـود دارد (P=۰/۰۰۱). همین آزمون در مورد درجه بیماری نیز انجام شـد و نتایج نشان داد که درجه تمایز سلول‌های سـرطانی یـا grade بیماری با میزان بیان نیز KRAS و NRAS ارتبـاط معنـی‌داری دارد (P=۰/۰۰۳). به منظور بررسی بهتر این نوع ارتباط، میـزان بیـان بیومارکرهـای KRAS و NRAS بـا اسـتفاده از فرمـول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - با توجه به میانگین Ct افراد سالم- مورد ارزیابی قـرار گرفت. نتایج بیانگر این بود که میزان بیانKRAS و NRAS بـا افزایش مرحله بیماری ارتباط مستقیمی دارد.

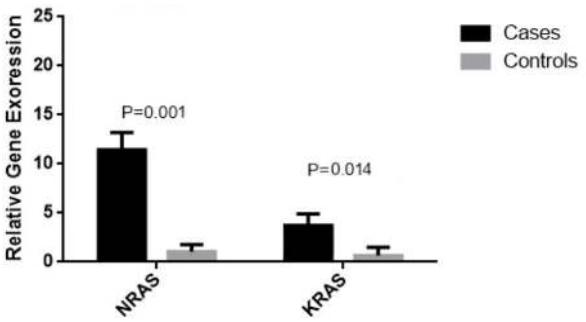


شکل ۱. چاهک ۱ محصول ژن NRAS می باشد که طول قطعه‌ی تکثیری ۲۱۶ جفت باز می‌باشد چاهک ۲. محصول PCR ژن KRAS می‌باشد که طول قطعه‌ی تکثیر ۱۷۰ جفت باز مـی باشـد. چاهـک ۳ محصول ژن GAPDH می باشد که طول قطعه تکثیری آن ۱۸۰ جفت باز می باشد. چاهک M مارکر DNA است.



الف ب ج

نمودار ۱. سیکل تزاید بیومارکرها- محور افقـی سـیکل تزایـد و محور عمودی میزان فلورسنت می باشد. مقـدار Ct بـرای(الـف) ژن KRAS معادل سیکل ۲۲/۹۵ (ب) ژن NRAS معادل سـیکل۱۵/۱۲ (ج) ژن GAPDH معادل سیکل۱۴/۵۳ می باشد.



نمودار۲. تغییر بیان نسبی ژن‌های E KRAS و NRAS در افراد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد سالم. میزان بیان ژن‌های KRAS و NRAS در نمونه خون افراد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی داری نشان داد.

جدول ۲. مشخصات افراد سالم و بیمار

مرحله بیماری	انحراف معیار	میانگین	محدوده سن	گروه های اصلی
-	۴۰/۱۴	۴۹	۳۵-۶۳	افراد نرمال ۵۰ نفر
III & IV	۱۱/۲۵	۵۳/۶۵	۷۰-۴۸	افراد بیمار ۵۰ نفر

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان ریه علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است و همچنین این بیماری، دومین سـرطان رایـج تشـخیص داده شـده بـا نـرخ بـیش از ۱۴٪ در زنـان و در مردان، بعد از سـرطان سـینه و سـرطان پروسـتات اسـت (۱۳). در کشورهای توسعه یافته نسبت به کشورهای کمتر توسعه یافته میزان بروز سرطان ریه بیشتر اسـت کـه ایـن میزان برای مـردان ۴۲/۲ ٪ و بـرای زنـان ۲۱/۸ ٪ اسـت (۱۴). اپیدمیولوژی سرطان ریه در ایران به دلیل تغییـرات جمعیت شناسی و اپیدمیولوژیک بـه تـدریج رو بـه تغییـر

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

است و یافته‌ها نشان می‌دهد که بروز سرطان ریه رو به افزایش است. کردستان و آذربایجان شرقی از جمله استان‌هایی هستند که فرکانس بالایی برای مبتلا شدن به سرطان ریه در آنها مشاهده شده است. افزایش میزان ریزگردها یکی دیگر از مشکلاتی است که در سال‌های اخیر در ایران تشدید شده و ممکن است نقش بسزایی در ایجاد سرطان ریه در کشور داشته باشد (۱۵). با وجود پیشرفت در تشخیص مراحل ابتدایی سرطان ریه، اکثر افراد مبتلا به این بیماری در مراحل پیشرفته تشخیص داد می شوند. از این رو شناسایی بیومارکرهای تشخیصی می‌تواند نقش مهمی برای کنترل بیماران مبتلا به سرطان ریه داشته باشد (۱۶). در پژوهش حاضر میزان بیان ژن های KRAS و NRAS به عنوان بیومارکرهای احتمالی دخیل در سرطان ریه در نمونه خون افراد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد نرمال به صورت کمی بررسی شد . بررسی ها نشان داد که نتایج حاصله با پژوهش‌های انجام شده در ارتباط با تغییرات بیانی بیومارکرها KRAS و NRAS در سایر سرطان‌های مورد مطالعه مطابقت دارد. به طوریکه نتایج بسیاری از مطالعات پیشین ، افزایش معنی دار بیومارکرهای KRAS و NRAS و نقش آنها در ایجاد و پیشبرد سرطان ریه را نشان داده است(۲۱، ۲۴ ، ۲۵). لیانگ و همکاران بررسی تغییرات و ارتباط بیانی بین ژن‌های KRAS, RBM5 و EGFR در بافت سرطانی غیر کوچک سلول ریه (NSCLC) در ۱۲۰ نمونه سرطانی NSCLC به ترتیب در سطح mRNA و پروتئین با استفاده از تکنیک Real-time PCR و بررسی وسترن بلاتینگ انجام دادند که نتایج نشان داد میزان بیان ژن KRAS هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین در بافت‌های سرطانی NSCLC در مقایسه با بافت نرمال افزایش داشته است(۱۷). پنگ و همکاران میزان بیان ژن RBM5 و KRAS را در سطح mRNA بر روی ۴۵ نمونه‌ی بافتی سرطان پانکراس بدست آمده از بیماران مورد سنجش قرار دادند. نتایج بدست آمده با استفاده از RT-PCR نشان از افزایش بیان ژن KRAS در سطح mRNA در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه سالم داشت و این افزایش بیان در رابطه با ویژگی‌های پاتولوژیکی مرتبط با اندازه تومور، متاستاز گره‌های لنفاوی و حمله‌ی عصبی بوده است(۱۸). ژو و همکاران در مطالعه دیگری مکانیسم مولکولی سرطان زایی آنتی بنزو پیرین ترانس ۸،۷-دیول ۱۰،۹- اپوکسی با استفاده از سلول‌های اپیتلیال انسانی بدخیم برونش ترنسفرم شده باanti-BPDE از طریق مقایسه‌ی میزان بیان ژن‌های KRAS-HRAS-NRAS در سطح پروتئین و mRNA با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ و RT-PCR را به ترتیب بررسی کردند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان دهنده افزایش میزان بیان ژن‌های KRAS-NRAS-HRAS هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین نسبت به نمونه‌ی ترانسفرم نشده سالم بوده است. بنابراین بیش از حد بیان شدن ژن‌های RAS احتمالاً نقش مهمی در سرطان القاء شده از طریق anti-BPDE داشته که نشان دهنده نقش مهم سرطان‌زایی ژن‌های RAS از طریق مواد شیمیایی است (۱۹). لی و همکاران میزان بیان ژن‌های Hub(PIK3CA, MDM2 CCND1, EGFR, JUN, MYC, VEGFA, ERK1 and ERK2) و RAS (KRAS-NRAS-HRAS) در بافت‌های سرطانی ریه، گلیوما و مثانه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن‌های Hub و RAS در هر سه رده-ی سلولی سرطانی با استفاده از RT-PCR نشان دهنده افزایش بیان آنها در سطح mRNA نسبت به نمونه نرمال بود (۲۰،۲۶). از آنجائیکه پروتئین‌های KRAS و NRAS نقش‌های مختلفی در فعالیت‌های بیولوژیکی متعدد به عنوان تنظیم کننده سیکل سلولی، تمایز سلولی، رشد و تکثیر سلولی دارند لذا افزایش بیان این بیومارکر می‌تواند نقش پروتوانکوژنی داشته و باعث تغییر سیگنالینگ پایین دستی در مسیرهای کنترل سلول شود که احتمالاً باعث

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

پیشرفت سرطان شوند (۲۳،۲۷). همچنین با توجه به افزایش بیان همزمان دو ژن در تمامی نمونه‌های سرطانی، احتمالاً ارتباط مستقیم و تقویتی در تقش دو ژن به طور همزمان و پیشرفت سرطان ریه است. با توجه به اینکه در مطالعات متعددی بر روی سرطان ریه و سایر سرطان‌ها نتایج، افزایش هم زمان و معنی دار بیان ژن‌های KRAS و NRAS را می‌دهد و علاوه بر افزایش همزمان معنی‌دار، ارتباط معنی‌دار بین میزان افزایش بیان و شدت و استیج بیماری مشاهده شد. لذا مطالعه کمی این بیومارکرها می تواند به عنوان شناساگر احتمالی در بررسی پیش آگهی، غربالگری و پایش درمان در سرطان ریه کاربری داشته باشد (۲۲،۲۸). در پژوهش حاضر نیز تغییرات کمی افزایشی بیان به صورت معنی‌دار در ژن‌های KRAS و NRAS در نمونه خون افراد مبتلا به سرطان ریه نسبت به افراد نرمال بررسی شد با توجه به نتایج کمی حاصله لذا بررسی تغییرات بیانی این دو ژن در نمونه خون افراد مبتلا به آدنوکارسینومای ریه احتمالاً می‌تواند به عنوان یک بیومارکر به منظور غربالگری و تشخیص غیرتهاجمی افراد مبتلا به سرطان ریه استفاده شود. مطالعات آتی در جهت بررسی ارتباط میزان بیان این ژن‌ها با خصوصیات هیستوپاتولوژی و بالینی بیماران در ادامه مطالعه انجام خواهد شد. امید است در آینده بتوان از آنها به عنوان بیومارکر پیش آگهی دهنده برای کمک به تشخیص و درمان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

References

1. Pinho L, Fernando M, Rodrigues M, Estrela J, Jorge R, Santos Cruz T. Molecular Targets in Lung Cancer Therapy: A Current Review. Journal of Integrative Oncology; 2015;4:2-4.
2. Latimer Kelly M, Timphoty F. Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles and Screening. Am Fam Physician. 2015.15;91(4):250-60.
3. Yousefi-koma A, Panah-Moghaddam M, Kalff V. The Utility of Metabolic Imaging by 18F-FDG PET/CT in Lung Cancer: Impact on Diagnosis and Staging; National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease, Iran; 2013; 12(1): 16-25.
4. Singh chinnapam R, Kandasamy K. Molecular understanding of lung cancers-A review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2014; 4: S35-S41.
5. Pallis Athanasios G. A Review of Treatment in Non-small-cell Lung Cancer. Medical Oncologist. 2012;8(4):208–212.
6. Cooper Wendy A, Lam David L, Sandra A. O'Toole J, Minna J. Molecular biology of lung cancer, .2013;5(S5):S479-S490.
7. Sylwia J, Radzioch D, Mari H. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010; 2.P1-13.
8. Elizabeth S. Waxman. Biomarkers Molecular Targets, Immunotherapy, Treatments for Non-Small Cell Lung Cancer. J Adv Pract Oncol. 2016; 7(5): 514-524.
9. Kadoaki O, Lecia V, Sequist M. Christine A, Chen X, Charles M. et al.Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations. Clin Cancer Res; 2013; 1; 19(9): 2584-2591.
10. Almasi Z , Hamid S, Amoori N, Enayatrad M. Epidemiology Characteristics and Trends of Lung Cancer Incidence in Iran. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention; 2016; 17 (2);557-562.
11. Khosravi A, Esfahani-Monfared Z, Seifi S, Karimi S, Emami H, Khodadad K. Clinicopathological Characteristics of Iranian Patients with Lung Cancer: a Single Institute Experience. Asian Pac J Cancer Prev.2016; 17 (8), 3817-3822.
12. Henrya L, Daniel F H. Cancer biomarkers; Molecular oncology 6 (2012) ; 140 -146.
13. Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Robles A, Molina M, Faus-Dáder M, Ángel Calleja-Hernández M. Liquid biopsy in early stage lung cancer; Translational lung cancer research; 2016;5(5):517-524.
14. Cheng Ting-Yuan D, Cramb S, Baade P, Danny R. Chukwumere Nwogu Y, Reid M. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends Disparities and Tumor Characteristics; Journal of Thoracic Oncology.2016;11;1653-1671.
15. Esmaeilzadeh N, Salahi-Moghaddam A, Khoshdel A. Geographic distribution of important cancers in Iran; Hormozgan Medical Journal;19.2, 2015.
16. Kentaro I, Ishikawa Y. MicroRNA In Lung Cancer: Novel Biomarkers and Potential Tools for Treatment .2016. 122-128.
17. Liang H, Zhang J, Shao C, Zhao L, Xu W, Sutherland L, et al. Differential Expression of RBM5, EGFR and KRAS mRNA and

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

protein in non-small cell lung cancer tissues; Journal of Experimental & Clinical Cancer Research; 2012, 31-36.

18. Alikord valeshabad P, Qingfu L, Wang Y. Differential expression of RBM5 and KRAS in pancreatic ductal adenocarcinoma and thei association with clinic pathological features; 2013.1000-1004.
19. Lanlan Z, Jiang Y, Tan A, Greenlee A, Shen Y, Liu L, et al.Silencing of N-Ras Gene Expressio Using shRNADecreases Transformation Efficiency and Tumor Growth in Transformed Cells Induced by Anti-BPDE; Toxological Science;2008. 105(2), 286-294.
20. Lei C, Wang P, Luo H, Wang X, Zhang J, Wang Y et al. Inhibition of activated Ras suppresses multiple oncogenic Hub genes in human epithelial tumors; INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY; 2014.1609-1617.
21. Román M, Baraibar I, López I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. Mol Cancer. 2018. 19;17(1):33.
22. Asgari Y, Khosravi P, Zabihinpour Z, Habibi M. Xploring candidate biomarkers for lung and prostate cancers using gene expression and flux variability analysis. Integr Biol (Camb). 2018 J19. 128-132. (In Persian).
23. Wei H, Liang F, Cheng W, Zhou R, Wu X, Feng Y, et al. The mechanisms for lung cancer risk of PM2.5: Induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human non-small cell lung cancer cells. Environ Toxicol. 2017;32(11):2341-2351.
24. Shi L, Middleton J, Jeon YJ, Magee P, Veneziano D, Laganà A, et al. KRAS induces lung tumorigenesis through microRNAs modulation. Cell Death Dis. 2018 Feb 13;9(2):219.
25. VanderLaan PA, Rangachari D, Majid A, Parikh MS, Gangadharan SP, Kent MS et al. Tumor biomarker testing in non-small-cell lung cancer: A decade of change. Lung Cancer. 2018 ;116:90-95.
26. Sutton BC, Birse RT, Maggert K, Ray T, Hobbs J, Ezenekwe A, et al. Assessment of common somatic mutations of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS in pulmonary non-smallcell carcinoma using iPLEX® HS, a new highly sensitive assay for the MassARRAY® System. PLoS One. 2017 19;12(9):e0183715.
27. Katoh M. Therapeutics Targeting FGF Signaling Network in Human Diseases. Trends Pharmacol Sci. 2016. 37;12:1081-1096.
28. Ricordel C, Friboulet L, Facchinetti F, Soria JC. Molecular mechanisms of acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs in EGFR T790M-mutant lung cancer. Ann Oncol. 2018 .1;29:28-37.

Investigation of KRAS and NRAS expression levels in lung cancer patients compared to normal patients.

Rikhtegar S[1], Hesampour A[*2]
1. MSC, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, a.hesampour@gmail.com.

Received: *25 Agu 2018* **Accepted:** *29 Sep 2018*

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 15:31 +0330 on Monday January 21st 2019

Abstract

Background: Lung cancer is one of the most common cancers around the world, and a major cause of death. The KRAS and NRAS genes could cause malfunction in signal transduction and cell cycle regulation.

Materials and Methods: In this study, the expression level of KRAS and NRAS biomarkers among 50 lung cancer patients in comparison with 50 normal individuals was investigated. Total RNA from blood samples was extracted and the cDNA synthesized. The specific primers for detection of markers were designed and the expression levels of KRAS and NRAS genes in the presence GAPDH using the qRT-PCR method were quantitatively studied.

Results: Quantitative comparison showed that KRAS and NRAS expression levels increased significantly in lung cancer patients compared to the control population. Results showed a quantitative increase of KRAS and NRAS genes with an increase of 2/05 and 3/43 fold respectively, for lung cancer compared to normal samples.

Conclusion: Based on current study results, we could quantitatively predict the expression level of KRAS and NRAS genes in patients which could be used as a biomarker indicator during screening of lung cancer samples. This could also be used as a noninvasive method for the screening of the population for early detection to inhibit cancer.

Keywords: KRAS, NRAS, Real time PCR, marker, Lung cancer.

Citation: Rikhtegar S, Hesampour A. Investigation of KRAS and NRAS expression level in lung cancer patient in compare with normal. Yafte. 2018; 20(3):18-27.