

بررسی بیان ژن p53 به روش ایمنوهیستوشیمی در بدخیمی‌های معده مراجعین به کلینیک بیمارستان پنجم آذر گرگان

رامین آذرهوش^۱، شهریار سمناوی^۲، سیما بشارت^۳، ندا مفتاح^۴، محمدرضا ربیعی^۵، غلامرضا روشندل^۶، علی جباری^۶
نقیسه عبدالهی^۷

^۱ استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی گرگان، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان

^۲ استادیار گروه داخلی دانشکده پزشکی گرگان، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان

^۳ پزشک، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان

^۴ دستیار داخلی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

^۵ مربی رشته آمار کاربردی دانشگاه صنعتی شاهرود

^۶ پزشک مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان

^۷ دستیار داخلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

نشانی نویسنده مسؤول: گرگان، ورودی غربی، سازمان مرکزی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دکتر سیما بشارت.

E-mail: s_besharat_gp@yahoo.com

وصول: ۸۵/۱/۱۹، اصلاح: ۸۵/۳/۲۱، پذیرش: ۸۵/۶/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: ژن p53 یک ژن سرکوب کننده تومور است. پروتئین P53 محصول این ژن می‌باشد که از طریق آپوپتوز از تشکیل تومور و انتشار سلول‌هایی که از نظر ژنتیکی آسیب دیده‌اند، جلوگیری می‌کند. اختلال یا غیرفعال شدن پروتئین P53 به دلیل جهش این ژن، می‌تواند منجر به رشد کنترل نشده سلول‌ها و در نتیجه ایجاد سرطان شود. موتاسیون‌های ژن p53 منجر به تجمع پروتئین P53 در هسته‌های سلول‌های سرطانی می‌شود که با روش‌های ایمنوهیستوشیمیایی قابل ردیابی می‌باشد. به دلیل نیمه عمر کوتاه محصولات ژن p53 و طولانی بودن نیمه عمر انواع جهش یافته آن، پروتئینی که به وسیله رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی ردیابی می‌شود، عمدتاً از نوع محصولات جهش یافته ژن p53 هستند. این مطالعه برای بررسی تجمع این پروتئین در بیماران مبتلا به سرطان معده در شهرستان گرگان انجام شده است.

مواد و روش‌ها: با مراجعه به بخش پاتولوژی بیمارستان پنجم آذر گرگان، اسامی بیماران مبتلا به سرطان معده طی سال‌های ۸۲-۷۶ استخراج شده (۱۱۱ نفر) و بلوک‌های پارافینی این بیماران پس از برش میکروتومی با متد ایمنوهیستوشیمیایی از نظر وجود پروتئین P53 رنگ-آمیزی شد. پس از ورود داده‌ها به رایانه با نرم افزار SPSS، برای بررسی ارتباط بین متغیرها از آزمون آماری مجذور کای استفاده شد.

یافته‌ها: براساس یافته‌های این مطالعه بیشترین فراوانی به آدنوکارسینوم تعلق داشت (۶۶/۷ درصد). در ۵/۵ درصد این افراد پروتئین P53 به روش ایمنوهیستوشیمی در سلول مشاهده گردید. ارتباط آماری معنی‌داری بین سن، جنس و نوع هیستولوژیک تومور معده با پروتئین P53 پیدا نشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه میزان پروتئین P53 بالا بود اما ارتباط معنی‌داری با سایر متغیرها یافت نشد. پیشنهاد می‌گردد جهت بررسی ارتباط بین تجمع این پروتئین در سلول‌های سرطانی با متغیرهای دیگر در بیماران مبتلا، مطالعات بیشتری صورت پذیرد. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۳/ شماره ۲/ صص ۷۹-۷۴).

واژه‌های کلیدی: سرطان معده؛ پروتئین P53؛ ایمنوهیستوشیمی.

مقدمه

آسیب غیرکشنده ژنتیکی نقش مهمی در سرطان-زائی دارد. آسیب های ژنتیکی (جهش ها) ممکن است در اثر عوامل گوناگونی نظیر مواد شیمیایی و پرتوتابی یا ویروس ها کسب شوند، یا ممکن است در یک رده سلول-های ژرمینال به ارث برسند. سه دسته از ژن های تنظیم کننده طبیعی هدف عمده آسیب ژنتیکی قرار می گیرند: پروتئین های پیش برنده رشد، ژن های سرکوب کننده سرطان مهارکننده رشد و ژن هایی که مرگ برنامه ریزی شده سلول ها را تنظیم می کنند (۱).

ژن p53 یک ژن شناخته شده سرکوب کننده تومور است که روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ قرار داشته و نقش مهمی در تنظیم چرخه سلولی دارد. این ژن یکی از اهداف اصلی تغییرات ژنتیکی در تومورهای انسان می-باشد. مطالعات نشان داده است که بیش از ۵۰ درصد تومورهای انسانی حاوی جهش های این ژن هستند. پروتئین P53 محصول این ژن می باشد که از طریق آپوپتوز در محافظت در برابر تشکیل تومور ایفای نقش کرده و از انتشار سلول هایی که از نظر ژنتیکی آسیب دیده اند، جلوگیری می کند. ایجاد اختلال یا غیرفعال شدن پروتئین P53 به دلیل جهش این ژن، می تواند منجر به رشد کنترل نشده سلول ها و در نتیجه ایجاد سرطان شود (۲،۳،۴).

جهش در ژن p53 یک عامل پیش آگهی دهنده مهم است. سرطان های دارای جهش در ژن p53 پیش رونده بوده و بیمار دارای ژن، عمر کمتری نسبت به بیمارانی دارند که ژن P53 در آنان دچار جهش نشده باشد (۵). موتاسیون های ژن p53 منجر به تجمع پروتئین P53 در هسته های سلول های سرطانی می شود که با روش های ایمنوهیستوشیمیایی قابل ردیابی می باشد (۳،۴). به دلیل نیمه عمر کوتاه محصولات ژن p53 و طولانی بودن نیمه عمر انواع جهش یافته آن، پروتئینی که به وسیله رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی ردیابی می شود، عمدتاً از نوع محصولات جهش یافته ژن p53 هستند (۶،۷).

افزایش بیان پروتئین P53 یا ژن p53 جهش یافته در بسیاری از تومورهای بدخیم انسان شامل تومورهای گوارشی، پروستات و پستان نشان داده شده است (۸-۱۰). آنالیز بقاء بیماران در مطالعات مختلف نشان داده است که بیان بیش از اندازه p53 با نوع هیستولوژیک تومورهای معده و نیز با پیش آگهی بیماران ارتباط داشته و نقش آن به عنوان یک عامل کارسینوژن در سرطان معده قویاً مطرح شده است (۱۱،۱۲).

توانایی p53 در کنترل آپوپتوز در پاسخ به آسیب DNA دارای استفاده های درمانی عملی است. پرتوتابی و شیمی درمانی اثرات خود را با القاء آسیب DNA و متعاقب آن، آپوپتوز اعمال می کنند. در نتیجه، تومورهایی که ژن های طبیعی P53 را حفظ می کنند، در مقایسه با آن-هایی که دارای p53 جهش یافته هستند، بهتر به چنین درمان هایی پاسخ می دهند (۱). این مطالعه برای بررسی ارتباط بین تجمع پروتئین P53 با نماهای پاتولوژیکی و برخی متغیرهای فردی در بیماران مبتلا به سرطان معده مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی پنجم آذر گرگان صورت گرفته است.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت توصیفی انجام گرفت. جهت آماری بیماران مبتلا به سرطان معده مراجعه کننده به بیمارستان پنجم آذر در سال های ۱۳۸۲-۱۳۷۶ بود. در این مطالعه کلیه نمونه های بیوپسی (۱۱۱ بیمار) مورد مطالعه قرار گرفتند. روش کار به این صورت بود که بلوک های پارافینی بیوپسی های موجود پس از برش میکروتومی با متد ایمنوهیستوشیمیایی (با استفاده از کیت DAKO) از نظر پروتئین P53 رنگ آمیزی شد. سپس تمامی بلوک ها از جهت وجود یا فقدان این پروتئین توسط یک پاتولوژیست در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شده و تفسیر شد. در رنگ آمیزی پروتئین P53 درجه بندی به-صورت زیر انجام شد: $>10\%$ ، (0) ، $25-10\%$ ، $(+1)$ ، $50-$

۰/۲۵، (+۲)/۷۵، -۷۵، (+۳)/۵۰ و $(+۴)/۷۵$.

از کل بیماران مبتلا به سرطان معده طی این فاصله زمانی، ۱۱۱ مورد دارای بلوک پارافینی بودند که وارد مطالعه شدند. پس از ورود داده‌ها به رایانه از طریق نرم افزار SPSS، از آزمون مجذور کای برای تعیین ارتباط بین متغیرهای مختلف استفاده شده و سطح معنی‌داری آزمون، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۱۱۱ بیمار مورد بررسی، اکثریت (۹۰ نفر، ۸۱/۱ درصد) مرد بودند. میانگین سنی بیماران $12/53 \pm$ ۶۳/۲ سال بود. دو جنس از نظر میانگین سنی تفاوت آماری معناداری نداشتند. ($\chi^2(109)=0.653; P->0.421$). اکثر بیماران (۹۵ نفر، ۸۵/۶ درصد) در گروه سنی بالای ۵۰ سال بودند. فراوانی انواع تومورهای مورد بررسی عبارت بودند از: آدنوکارسینوم ۶۶/۷ درصد (۷۴ نفر)، کارسینوم تمایز نیافته ۲۷ درصد (۳۰ نفر)، لنفوم ۳/۶ درصد (۴ نفر) و SCC ۲/۷ درصد (۳ نفر). در ۵۹/۵ درصد از بیماران (۶۶ نفر) بیان مثبت ژن p53 وجود داشت. درجه رنگ‌پذیری تومورها از نظر P53 در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.

میزان بیان ژن p53 ارتباط معنی‌داری با سن نشان نداد ($\chi^2(109)=-0.405; P\text{-value}=0.686$) و دو جنس نیز از نظر میزان بیان این ژن با یکدیگر تفاوت آماری

معناداری نداشتند ($\chi^2(1)=1.506; P\text{-value}=0.220$). میزان بیان ژن p53 در آدنوکارسینوم ۵۹/۵ درصد و در موارد تمایز نیافته ۷۰ درصد بود که این ارتباط نیز از نظر آماری معنادار نبود (نمودار ۲). ۵۹/۸ درصد از تومورهای درجه پایین، ۷۵ درصد از تومورهای با درجه متوسط و ۴۰ درصد از تومورهای درجه بالا، بیان p53 را نشان دادند (جدول ۱) همبستگی مثبتی بین بیان ژن p53 و درجه تومور مشاهده شد.

بحث

در مطالعه حاضر فراوانی بیان ژن p53 در بیماران مبتلا به سرطان معده، ۵۹/۵ درصد بوده است و بین بیان این ژن با هیچ کدام از متغیرهای فردی مورد بررسی و نیز مشخصات بافت شناسی و نوع تومور معده ارتباطی مشاهده نشد. در مطالعات مختلف، میزان بیان p53 به روش ایمنوهیستوشیمیایی در ۴۳ درصد تا بیش از ۶۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان معده دیده شده است (۴، ۶، ۷).

در نتایج مطالعه حاضر، هیچ‌گونه ارتباط معناداری بین بیان p53 و سایر متغیرهای فردی و مشخصات تومور معده، در افراد مورد بررسی مشاهده نشد.

در مطالعه شان و همکاران گزارش شد که بیان ایمنوهیستوشیمیایی p53 به طور معنی‌داری با بعضی فنوتیپ‌های هیستوپاتولوژیک ارتباط دارد و آدنوکارسینوم

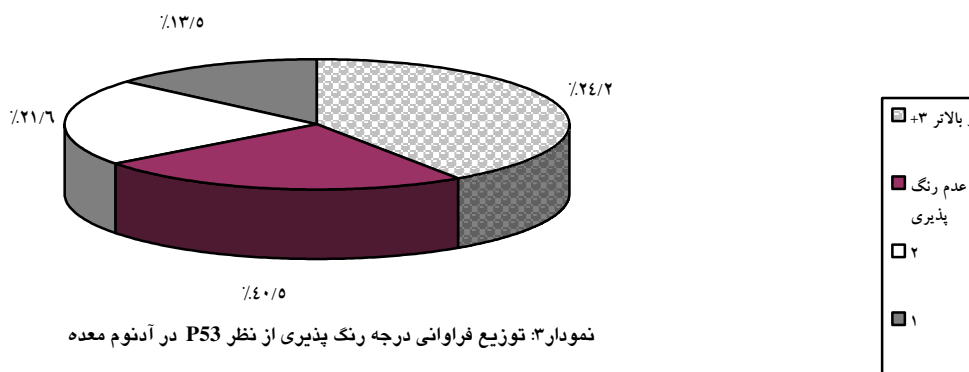
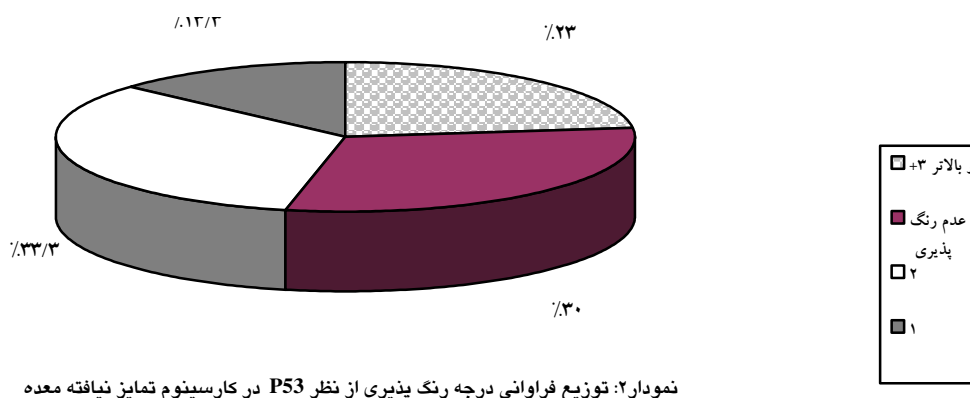
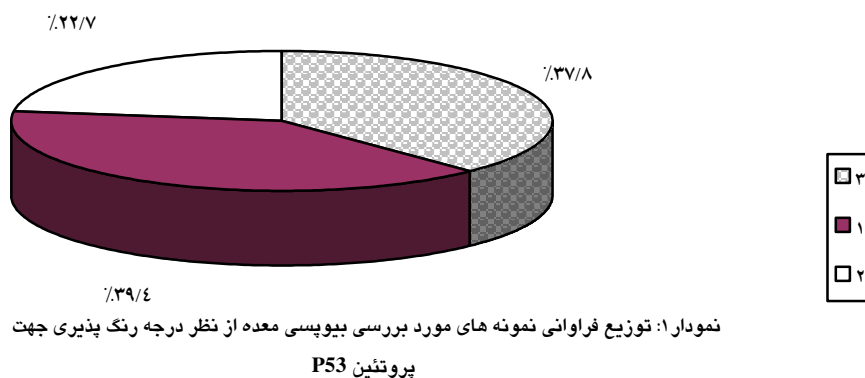
جدول ۱: توزیع فراوانی درجه رنگ‌پذیری نمونه‌های بیوپسی معده از نظر P53 برحسب درجه تومور معده در بیماران مبتلا به سرطان معده مراجعه‌کننده به بیمارستان پنجم آذر گرگان

درجه رنگ‌پذیری P53 (بدون بیان ژن)	صفر		+۱		+۲		+۳ و بالاتر		کل
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۱	۴۱	*۴۰/۲	۲۴	۲۳/۵	۱۴	۱۳/۷	۲۳	۲۲/۵	۱۰۰
۲	۱	۲۵	۱	۲۵	۰	۰	۲	۵۰	۱۰۰
۳	۳	۶۰	۱	۲۰	۰	۲۰	۰	۵	۱۰۰
کل	۴۵	۴۰/۵	۲۶	۲۳/۴	۱۵	۱۳/۵	۲۵	۲۲/۵	۱۱۱

مشاهده شد که بیان p53 با مورفولوژی تومور (اکثراً با آدنوکارسینوم های تمایز یافته از نوع دپرس) ارتباط دارد (۱۳).

محققان ژاپنی با بررسی ۱۷۸ بیمار مبتلا به سرطان اولیه معده، گزارش کردند که از نظر زمان بیان p53

کاردیا و نوع روده ای به ترتیب بالاترین میزان (۷۶/۵ درصد و ۶۹/۸ درصد) و نوع غیر کارد یا کمترین میزان (۵۰/۵ درصد) بیان ژن p53 را داشتند اما هیچ ارتباطی بین متغیرهای فردی (سن و جنس) و پروگنوز بیمار مشاهده نشد (۱۱). در مطالعه کیوکان و همکاران در ژاپن نیز



نرسانده‌اند (۱۶-۱۴).

در مطالعه غفارزادگان و همکاران، ارتباط معنی‌دار آماری بین بیان ژن p53 و درجه تومور معده گزارش شد؛ همچنین ارتباط مثبتی بین بیان p53 و نوع بافت‌شناسی تومور وجود داشت (۱۹). پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات تکمیلی میزان بروز این ژن در سایر تومورهای منطقه نیز مورد بررسی قرار گرفته و پیگیری دقیق بیماران در دستور کار مسئولین قرار بگیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب سپاسگزاری ویژه خود را از جناب آقای دکتر عباسعلی کشتکار، معاون محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر راهنمایی‌های ارزشمند ایشان، اعلام می‌دارند.

اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین تومورهای معده از نوع روده‌ای و نوع منتشر وجود دارد، بدین ترتیب که در نوع روده‌ای بیشتر موارد بیان افزایش‌یافته p53 در مراحل اولیه و در نوع منتشر اکثراً در مراحل پیشرفته رخ می‌دهد که مورد آخر با پروگنوز بدی برای بیمار همراه است (۷). در سایر مطالعات نیز بیان شده است که نوپلاسم‌های معده که از نظر بیان ژن p53 مثبت هستند دارای مرحله بالاتری می‌باشند و بالعکس، تومورهایی که به غدد لنفاوی ناحیه-ای تهاجم می‌کنند نسبت به کارسینوم‌های موضعی بیان p53 بیشتری دارند (۴).

نظریات متناقضی در مورد ارتباط بین میزان بیان p53 و پیش‌آگهی بیماران وجود دارد، در برخی مطالعات ارتباط مثبتی بین بیان p53 و میزان تهاجم تومور به بافت‌های اطراف و در نتیجه مرحله تومور و پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان معده دیده شده (۷، ۱۴) اما در مقابل مطالعات دیگری هم وجود دارند که این نظریه را به اثبات

References

1. Cotran, Kumar, Collins. Robbins pathologic basis of disease. Seventh edition, 2005
2. Lanfrancone L, Pelicci G, Pelicci PG. Cancer genetics. Curr Opin Genet Dev. 1994; 4(1): 109-19.
3. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. Curr Opin Cell Biol. 2001; 13(3): 332-7.
4. Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, Stern PL. Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. Br J Cancer. 1992; 66(3): 558-62.
5. Manke-Pluymers MB, Hop WC, Mulder AH, Tilanus HW. DNA ploidy as prognostic factor for patients with an Adenocarcinoma in Barrett's esophagus. Hepatogastroenterology. 1995; 42 (6): 786-8.
6. Okusa Y, Ichikura T, Tamakuma S. Immunohistochemical staining for the p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in familial clustering of gastric cancer. J Surg Oncol. 1996; 62 (4): 253-7.
7. Maehara Y, Emi Y, Tomisaki S, Oshiro T, Kakeji Y, Ichiyoshi Y, et al. Age-related characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients. Cancer. 1996; 77(9): 1774-80.
8. Manne U, Myers RB, Moron C, Poczatek RB, Dillard S, Weiss H, et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. Int J Cancer. 1997; 74: 346-58.
9. Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89(15): 7262-6.
10. Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, Varley JM. Expression of p53 protein in infiltrating and in situ breast carcinomas. J Pathol. 1991; 165(3): 203-11
11. Shun CT, Wu MS, Lin JT, Chen SY, Wang HP, Lee WJ, et al. Relationship of p53 and c-erbB-2 expression to histopathological features, Helicobacter pylori infection and prognosis in gastric cancer. Hepatogastroenterology. 1997; 44(14): 604-9.

12. Liu XP, Tsushimi K, Tsushimi M, Oga A, Kawauchi S, et al. Expression of p53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. *Pathol Int.* 2001; 51(6): 440-4.
13. Kyokane K, Ito M, Sato Y, Ina K, Ando T, Kusugami K. Expression of Bcl-2 and p53 correlates with the morphology of gastric neoplasia. *J Pathol.* 1998; 184(4): 382-9.
14. Fonseca L, Yonemura Y, De Arexabala X, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. p53 detection as a prognostic factor in early gastric cancer. *Oncology.* 1994; 51(6): 485-90.
15. Flejou JF, Muzeau F, Potet F, Lepelletier F, Fekete F, Henin D. Overexpression of the p53 tumor suppressor gene product in esophageal and gastric carcinomas. *Pathol Res Pract.* 1994; 190(12): 1141-8.
16. Gabbert HE, Muller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer.* 1995 1; 76(5): 720-6.
17. Kamran Ghaffarzagdegan, Mohammad-Reza Zali, Khadijeh Jami-Ahmadi, Hamid Asadzadeh, Mohammad-Reza Abbaszadegan. Correlation of nuclear P53 Immunoreaction with the histopathologic features in gastric carcinoma. *Arch Iranian Med.* 2004; 7(4): 279 –83.