CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۸، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۵/ ۶۱-۵۴

مقاله پژوهشی

مقایسه الگوی بیانی ژن های اصلی مسیر خود بازآفرینی در رده های سلول سرطانی، بافت سرطانی و بافت سالم تومور مثانه

محمدرضا میرزایی[1*]، مهدی محمودی[1]، غلامحسین حسن شاهی[1]، امیر رهنما[2]، محمود شیخ فتح الهی[3]، فهمیده بگرضایی[4]

[1]مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران؛ [2]گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران؛ [3]گروه پزشکی اجتماعی و مرکز تحقیقات محیط کار، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران؛ [4]گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۹

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017

چکیده:

زمینه و هدف: **یکی از دلایل ایجاد سرطان، بیان نا به جای ژن های کنترل کننده مسیر خود بازآفرینی در سلول سرطانی است، لذا در این مطالعه بیان ژن های اصلی کنترل کننده مسیر خود بازآفرینی شامل OCT4، NANOG، KLF4، SOX2 و Nucleostemin در دو رده سلولی 5637 و HT1376، بافت سرطانی و بافت سالم نمونه های بیوپسی بافت سرطانی مثانه، مورد بررسی قرار گرفت.**

روش بررسی: **در این مطالعه آزمایشگاهی، رده های سلولی در فلاسک های کشت و محیط کشت کامل RPMI1640 کشت و نگه داری شدند و نمونه های بیوپسی بافت سرطان از میان نمونه های سرطانی ارسالی به آزمایشگاه پاتولوژی و به صورت بافت تازه، با توجه به علائم بالینی و یافته های آزمایشگاهی، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. حاشیه های نمونه های بیوپسی به عنوان بافت سالم انتخاب گردید. بیان ژن های مورد نظر در سطح بیان mRNA در دستگاه Real-Time PCR تعیین و با فرمول ΔΔct مورد آنالیز قرار گرفته بصورت میزان تغییر بیان ژن (Fold change) ارائه گردید.**

یافته ها: **ارزیابی نتایج Real-Time PCR نشان داد ژن های مورد مطالعه در رده های سلول سرطانی و نیز بافت سرطانی توده های بیوپسی سرطانی مورد مطالعه بیان می شوند در حالیکه در بافت سالم توده های بیوپسی مورد اشاره، بیان این ژنها مشاهده نمی شود.**

نتیجه گیری: **بیان ژن های OCT4، NANOG، KLF4، SOX2 و Nucleostemin لازمه القاء توان خود بازآفرینی است. نتایج این تحقیق نشان می دهد این ژن ها در بافت سرطانی و رده های سلول سرطانی در مقایسه با بافت سالم بیان بالاتری از خود نشان می دهند. لذا به نظر میرسد مطالعه علت فعال شدن مجدد این ژنها میتواند در شناسایی ماهیت سرطان کمک کننده باشد.**

واژه های کلیدی: **رده سلول سرطانی، مسیر خود بازآفرینی، سرطان مثانه.**

مقدمه:

سرطان یکی از بیماری های مهم انسانی است که به علت ماهیت پیچیده ای که دارد، هنوز در بسیاری از موارد علت پیدایش و روش درمان آن شناسایی نشده است. سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه ادراری تناسلی و نهمین سرطان شایع در جهان و چهارمین سرطان شایع در مردان ایران است که به همراه سرطان های کبد و کلون، اصلی ترین علت مرگ به علت سرطان در اکثر کشورها است (۳-۱). سرطان

نویسنده مسئول: *رفسنجان- دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی- تلفن: ۰۳۴-۳۴۲۸۰۰۸۶، E-mail: mirzaeemr@gmail.com*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017

مثانه بر اساس سلول هایی از بافت مثانه که درگیر می شوند، به انواعی تقسیم می شود. یکی از فراوان ترین انواع سرطان مثانه، یوروتلیال کارسینوما (Urothelial Carcinoma) است که به آن سرطان سلول های ترانزیشنال (Transitional Cell Carcinoma; TCC) نیز می گویند. سایر انواع سرطان مثانه شامل سرطان سلول های سنگ فرشی (Squamous Cell Carcinoma) و آدنوکارسینوما (Adenocarcinoma) می باشد (۴). سرطان سلول های سنگ فرشی (SCC) در مردان و افراد مسن بیشتر دیده می شود (میانگین سنی افراد هنگام تشخیص ۶۹ سال است) (۵). قرار داشتن در معرض گروهی از مواد شیمیایی یا ترکیبات صنعتی در محل کار یا محیط زندگی و نیز استعمال دخانیات، خطر سرطان مثانه را به طور چشم گیری افزایش می دهند (۶،۵).

در خصوص اتیولوژی سرطان، عوامل متعددی را ذکر کرده اند که اصلی ترین این عوامل را تغییرات ژنتیک می دانند. این تغییرات به صورت جهش در ژن های ایجاد کننده سرطان و یا تغییراتی که باعث حذف و غیر فعال کردن ژن های مؤثر در سرطان می شوند رخ می دهند (۷).

اینکه این تغییرات ژنتیکی در کدام نوع سلول می تواند باعث سرطانی شدن سلول شود، دو نظریه وجود دارد. طبق نظریه اول، سلول های بافت از نظر توانایی سرطانی شدن هوموژن (مشابه) هستند، یعنی تمامی سلول های یک بافت این توانایی را دارند که در پی رخداد تغییرات ژنتیک و یا کاهش و افزایش بیان ژن (ژن های خاص)، به سلول سرطانی تبدیل شده و یک توده بدخیم را در بافت ایجاد کنند (۸). بر اساس نظریه دوم که در پی شناخت سلول های بنیادی بالغین (Adult Stem Cell) و شباهتی که با سلول های سرطانی دارند ارائه شده است، سلول های تشکیل دهنده یک بافت از نظر توانایی سرطانی شدن هتروژن (غیر مشابه) هستند، به عبارت دیگر تمامی سلول های بافت، توانایی سرطانی شدن را ندارند بلکه سلول های خاصی که به عنوان سلول های بنیادی بالغین (ASC) شناخته شده و در تمامی بافت ها با فراوانی بسیار کم (به نسبت یک به یک صد هزار سلول) وجود دارند، و یا سلول های سوماتیک خاصی که با فرایند تغییر در بیان ژن ها (Reprogramming) توانایی تقسیم نامحدود را کسب کرده اند، منشاء سرطان هستند.

بر این اساس، سلول های بنیادی موجود در بافت، به دنبال تغییراتی که هنوز به خوبی شناخته شده نیستند و یا اخلال در مسیرهای تمایزی، تبدیل به سلول سرطانی شده و به دنبال تقسیمات متعدد، وارد مرحله غیر قابل برگشتی می شوند که حاصل آن همه گیر شدن سرطان در بدن و مرگ انسان خواهد شد (۹).

با شناخت و ارائه تئوری سلول بنیادی سرطان (Cancer Stem Cell)، یافتن مکانیسم های سلولی که سلول اولیه (Progenitor) را به سمت ایجاد سلول بنیادی سرطان (CSC) هدایت می کند، در اولویت محققان سرطان قرار گرفت و می تواند در شناخت راه های تشخیص، درمان و پیش گیری از سرطان بسیار راه گشا باشد.

بر اساس تئوری جدید پیدایش سرطان، تمامی سلول های بافت تومور قدرت تقسیم نامحدود (self-renewal) نداشته بلکه سلول های خاصی که به نام سلول بنیادی سرطان (CSC) نامیده می شوند، این قدرت را دارند، لازمه تقسیم نامحدود و کنترل نشده سلولی، فعال شدن و بیان بالای گروهی از ژن ها است که به نام ژن های مسیر خود بازآفرینی خوانده می شوند. این ژن ها متعدد بوده، اما مهم ترین آن ها شامل OCT4، NANOG، KLF4، Nucleostemin و SOX2 می باشند (۱۰).

با عنایت به نقشی که سرطان در زندگی انسان و برنامه های کلان بهداشتی دارد، به نظر می رسد، پیش زمینه روش های تشخیص و درمان سرطان، شناسایی علت ایجاد سرطان است. همان گونه که ذکر شد فرضیه ها و نظریه های مختلفی در خصوص منشاء سرطان و چگونگی تبدیل یک سلول نرمال به سلول سرطانی وجود دارد که یکی از مهم ترین و پرطرفدارترین این نظریه ها، تئوری سلول بنیادی سرطان است. بر این اساس قاعدتاً باید پروفایل بیانی تقریباً یکسانی از نظر ژن های مسیر خود بازآفرینی بین رده های سلول سرطانی و سلول های بافت

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017

سرطانی و الگویی متفاوت از بیان ژن های ذکر شده در بافت نرمال وجود داشته باشد. با این فرضیه، هدف این تحقیق مقایسه الگوی بیانی ژن های OCT4، NANOG، KLF4، Nucleostemin و SOX2 در رده های سلول سرطانی (دو رده سلول سرطانی مشتق از تومور مثانه یعنی 5637 و HT1376 به عنوان نماینده رده های سلول سرطانی انتخاب شدند)، بافت سرطانی و بافت سالم مثانه می باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه آزمایشگاهی، رده های سلولی 5637 و HT1376 (تومور بدخیم مثانه)، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، خریداری و پس از بررسی مورفولوژیکی و اطمینان از سلامت سلول ها، در فلاسک کشت سلول به میزان ۱۰۵ سلول به ازاء هر فلاسک، کشت و پس از چندین پاساژ، جهت تعیین الگوی بیانی ژن های مورد نظر مورد آنالیز قرار گرفتند.

نمونه های انسانی مورد مطالعه در این تحقیق، ۵ نمونه بیوپسی بافت سرطانی مثانه بود که از بیمارستان علی ابن ابی طالب (ع) رفسنجان جمع آوری شدند. نمونه ها تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و به صورت بافت بیوپسی در میکروتیوب استریل و عاری از RNase قرار داده شده و به وسیله تانک ازت (MGM آمریکا)، به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. مشخصات نمونه های بیوپسی، در چک لیستی جداگانه تنظیم و ارسال گردید.

رده های سلولی پس از کشت و رسیدن به تراکم ۷۰٪، از محیط کشت جدا شده (با تریپسینه کردن) و پس از دو بار شستشو با بافر PBS، Total RNA سلولی جدا گردید. هر نمونه بیوپسی، با نظارت متخصص پاتولوژی به دو قسمت بافت سرطانی (نواحی مرکزی بافت که شکل گل کلم دارند) و بافت سالم (نواحی حاشیه ای)، تقسیم و به صورت جداگانه تخلیص RNA انجام شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA استخراجی با روش الکتروفورز و جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر، با کمک پرایمرهای Oligo dT، تمامی مولکول های mRNA به cDNA تبدیل و به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

توالی پرایمرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) ژن های OCT4، NANOG، KLF4، Nucleostemin و SOX2 و بتا اکتین (کنترل داخلی) با استفاده از نرم افزار Primer design نسخه ۳، طراحی و سپس با Blast نمودن آن ها در NBCI، از صحیح بودن آن ها اطمینان حاصل شد. (توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول شماره ۱ آمده است).

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمر ژن های مورد مطالعه

ژن های هدف	طراحی شده Oligo	توالی پرایمرها	طول قالب
OCT4	F	CGCAAGCCCTCATTTCAC	۱۱۱
	R	CATCACCTCCACCACCTG	
NANOG	F	GCAACGAGTGCAAGGCAC	۱۷۷
	R	CGAACGAGAGAGACAGCA	
KLF4	F	GCCAGACAGACTCCGTTAGG	۱۲۸
	R	GCAGGCTAAGTTCTGGCGG	
SOX2	F	CCGATTAGCTTGACGTGG	۱۶۵
	R	CGAGGCTTATGCCATTG	
Nucleostemin	F	CCGAGTTACAAGGVTACGTTA	۱۷۴
	R	TTAGGCGGATCAATTGCAGTT	
ß-actin	F	CACACCTTCTACAATGAGC	۱۶۰
	R	ATAGCACAGCCTGGATAG	

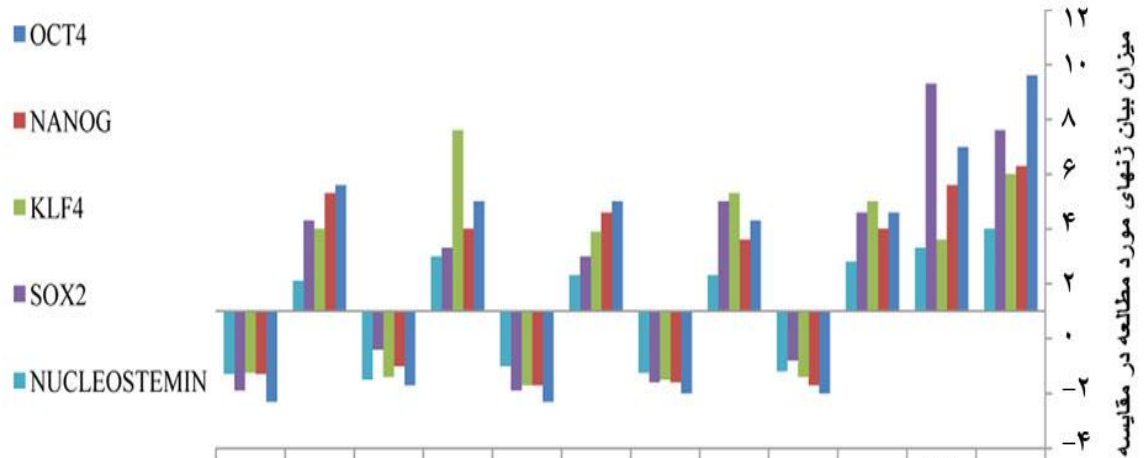
به منظور تکثیر ژن های مورد نظر، ابتدا آماده سازی پرایمرها انجام و سپس به منظور تکثیر mRNA (cDNA) ژن های هدف از دستگاه Real-Time PCR استفاده شد. ۴ میکرولیتر

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017

(۱۰۰ پیکو مول) پرایمرهای اختصاصی پیش رو و پس رو (۲ پیکوگرم بر میکرولیتر)، ۳ میکرولیتر cDNA (۲۰۰ نانوگرم)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین و ۳ میکرولیتر آب DNase free (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) به هر چاهک پلیت مخصوص PCR اضافه شد و روی پلیت را با چسب مخصوص پوشانده تا از تبخیر جلوگیری شود. پلیت را داخل دستگاه (Real-Time PCR (Bio-RAD گذاشته و با برنامه پیشنهادی شرکت سنتز کننده پرایمرها (یک سیکل ۹۵°c به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۵ سیکل با شرایط ۹۵°c به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۲°c–۵۸ به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲°c به مدت ۲۰ ثانیه) تکثیر انجام شد. (تمامی تست های مورد اشاره حداقل ۳ بار تکرار شد) داده های دستگاه Real-Time PCR (اعداد ct) با استفاده از فرمول ΔΔct مورد آنالیز قرار گرفت (از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد).

یافته ها:

نمونه های انسانی مورد مطالعه شامل پنج نمونه بیوپسی بافت تومور مثانه بود با مشخصات، میانگین سنی بیماران ۶۲ سال، Stage سه بیمار در فاز Ta و ۲ بیمار در فاز T1 و Grade بیماری دو بیمار در مرحله G2 و ۳ بیمار در مرحله G3 گزارش شده بودند. بیان ژن های OCT4، NANOG، KLF4، Nucleostemin و SOX2 در بافت سرطانی نمونه های بیوپسی مورد اشاره و هم چنین بافت سالم نمونه های بیوپسی تومور مثانه (به عنوان بافت سالم مثانه)، همچنین رده های سلولی سرطان مثانه (5637 و HT1376)، با روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۱ دیده می شود، ژن های مورد مطالعه از لحاظ آماری، در رده های سلولی و نیز نمونه های بافت سرطانی بیان بالاتری (تا ۹ برابر) نسبت به بافت سالم نشان می دهند.



	C5	T5	C4	T4	C3	T3	C2	T2	C1	T1	HT1376	5637
OCT4	-۲/۳	۵/۶	-۱/۷	۵	-۲/۳	۵	-۲	۴/۳	-۲	۴/۶	۷	۹/۶
NANOG	-۱/۳	۵/۳	-۱	۴	-۱/۷	۴/۶	-۱/۶	۳/۶	-۱/۷	۴	۵/۶	۶/۳
KLF4	-۱/۲۵	۴	-۱/۴	۷/۶	-۱/۷	۳/۹	-۱/۵	۵/۳	-۱/۴	۵	۳/۶	۶
SOX2	-۱/۹	۴/۳	-۰/۴	۳/۳	-۱/۹	۳	-۱/۶	۵	-۰/۸	۴/۶	۹/۳	۷/۶
NUCLEOSTEMIN	-۱/۳	۲/۱	-۱/۵	۳	-۱	۲/۳	-۱/۲۵	۲/۳	-۱/۲	۲/۸	۳/۳	۴

دو رده سلولي HT1376 و 5637 و نمونه هاي بافت سرطاني (T1-T5) و بافت سالم (C1-C5) بيوپسي تومور مثانه

نمودار شماره ۱: الگوی بیانی ژن های OCT4، NANOG، KLF4، Nucleostemin و SOX2 در دو رده سلولی 5637 و HT1376، بافت سرطانی (T1-T5) و بافت سالم (C1-C5) بیوپسی ۵ مورد تومور مثانه انسان

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017

بحث:

ژن های OCT4، NANOG، KLF4، SOX2 و Nucleostemin، به عنوان ژن های اصلی کنترل کننده مسیر خود بازآفرینی شناخته شده و امروزه به عنوان مارکری جهت شناسایی سلول های بنیادی معرفی می شوند (۱۲،۱۱). با شناخت و ارائه تئوری سلول بنیادی سرطان (CSC)، و شباهتی که بین رفتار این سلول ها (CSC) و سلول های بنیادی جنینی (ESC) وجود دارد، محققان متوجه شدند ژن OCT4 که از ژن های کلیدی ESC بوده و عامل اصلی پرتوانی (Pluripotency) و خود بازآفرینی در این سلول ها است، در سلول های سرطانی نیز نقش دارد (۱۳). SOX2 به همراه OCT4 و NANOG در حفظ حالت پرتوانی و خود باز آفرینی سلول های بنیادی نقش اساسی دارد و مطالعات اخیر نشان می دهد این ژن در رخدادهای پایانی تومورزایی یعنی تهاجم و متاستاز نقش دارد (۱۴). پروتئین Nanog نیز جزء پروتئین های دارای هومودومین است که برای حفظ حالت چند توانی (Multypotency) و خودبازسازی سلول های بنیادی جنینی مورد نیاز است. بیان این ژن در سلول های بنیادی جنینی بالاست ولی به دنبال القای تمایز کاهش می یابد (۱۵). تصور بر این است که ژن های OCT4، SOX2 و NANOG به صورت یک شبکه مرکزی در تنظیم خودبازسازی سلول های بنیادی نقش دارند، به طوری که هر کدام از این سه ژن در تنظیم دو ژن دیگر دخیل بوده و مجموع این سه ژن نیز به طور هم زمان، هم به عنوان فعال کننده رونویسی سایر ژن های دخیل در خود بازآفرینی و هم به عنوان مهارکننده ژن های دخیل در تمایز عمل می کنند (۱۶). در مطالعه اطلسی و همکاران مشخص شد در سلول های سرطانی جدا شده از بافت سرطان مثانه، بیان بالای ژن های OCT4، SOX2 و NANOG مشاهده می شود (۱۷). سلول های سرطانی جدا شده از کارسینومای سنگ فرشی دهانی، بیان بالایی از NANOG را نشان می دهند. بیش بیان این ژن در تومورهای مختلف سلول های جنسی و تومورهای استخوانی سارکوما نیز گزارش شده است (۱۸). نقش KLF4 در سرطان نقشی دو گانه است؛ شواهد نشان می دهد، این پروتئین هم به صورت انکوژن و هم به شکل پروتئین مهارکننده تومور ایفای نقش می کند. میزان بیان این ژن در سرطان هایی مثل مثانه و پستان افزایش می یابد و این افزایش بیان رابطه مستقیمی دارد با میزان پیشرفت سرطان (۲۰،۱۹). نوکلئوستمین یکی از ژن های دخیل در خود بازسازی سلول است. این ژن اولین بار در سال ۲۰۰۲ در سلول های بنیادی سرطان شناسایی شد (۲۱). نوکلئوستمین از اعضاء خانواده پروتئین های متصل شونده به GTP (Guanosine triphosphate) است که به صورت عمده داخل هستک و به میزان کمتری درون شیره هسته حضور دارد (۲۲). ژن کد کننده نوکلئوستمین در جایگاه کروموزومی 3p21.1 قرار داشته دارای ۱۵ اگزون است و پروتئینی با ۶۱ کیلودالتون کد می کند. بیان این ژن در سلول های سرطانی مثانه گزارش شده است و شواهد حاکی از نقش این ژن در حفظ قدرت خود بازآفرینی سلول دارد (۲۴،۲۳). در این مطالعه هم زمان بیان ژن های OCT4، NANOG، KLF4، Nucleostemin و SOX2 در دو رده سلولی مشتق از تومور مثانه (5637 و HT1376)، سلول های سرطانی بافت بیوپسی سرطان مثانه و نیز سلول های حاشیه ای بافت بیوپسی سرطان مثانه (به عنوان بافت سالم مثانه) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج مؤید آن است که بیان این ژن ها در رده های سلول سرطانی و سلول های سرطانی بافت مثانه بیان شده اما در سلول های نرمال مجاور بافت سرطانی بیان نمی شوند. این نتایج تأیید کننده آن است که سلول های موجود در توده مرکزی بافت سرطان (در سرطان مثانه توده مرکزی به شکل گل کلم دیده می شود)، توان خود بازآفرینی پیدا کرده و با تقسیمات کنترل نشده عامل توسعه بافت سرطانی خواهند بود. مطالعات آتی گسترده تر بر تعداد

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017

نمونه های بیشتر بیوپسی بافت سرطانی (سرطان های متعدد)، و ژن های دیگر کنترل کننده مسیر خود بازآفرینی می تواند از اهداف آینده باشد.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان می دهد که سلول های سرطانی بافت سرطان مثانه بیان کننده ژن های اصلی کنترل کننده خود بازآفرینی هستند و از آن جا که نشان داده شده است بیان این ژن ها (OCT4، NANOG، KLF4، Nucleostemin و SOX2) نشانه ای است بر بنیادی بودن (Stemness) سلول، لذا می توان عنوان کرد که سلول های مذکور در واقع سلول های بنیادی سرطان (CSC) یا هسته مرکزی سرطان در تومور مثانه هستند. بدیهی است مطالعات گسترده بعدی لازم خواهد بود تا این ادعا را تأیید نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامه دانشجویی و برآمده از طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان با شماره ۳۱/۹/۴۹۲۱ مورخ ۹۱/۱۱/۲۸ می باشد و لازم می دانیم از همکاران حوزه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و مخصوصاً کارشناسان محترم مراکز تحقیقاتی سلولی ملکولی و فیزیولوژی- فارماکولوژی این دانشگاه که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند تقدیر و تشکر نماییم.

منابع:

1. Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Parkin DM. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. Asian Pac J Cancer Prev. 2005; 6(3): 359-63.
2. Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K. Bladder cancer in cancer patients: Population-based estimates from a large Swedish study. Br J Cancer. 2009; 101(7): 1091-9.
3. Vakili M, Pirdehghan A, Adimi M, Sadeghian M, Akhondi M. Epidemiology and trend of cancer in Yazd, a central province of Iran, 2005-2009. J Res Health Sci. 2014; 14(3): 210-3.
4. Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmstrom PU, Stockle M, Sternberg C, et al. Guidelines on bladder cancer. Eur Urol. 2002; 41(2): 105-12.
5. Lane GI, Kwaan M, Lewis J. Squamous cell carcinoma at bladder exstrophy site after early cystectomy. Pediatr Surg Int. 2015; 31(11): 1107-10.
6. Hashibe M, Galeone C, Buys SS, Gren L, Boffetta P, Zhang ZF, et al. Coffee, tea, caffeine intake, and the risk of cancer in the PLCO cohort. Br J Cancer. 2015; 113(5): 809-16.
7. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. Eur Urol. 2016; 69(2): 300-10.
8. Aktipis CA, Boddy AM, Gatenby RA, Brown JS, Maley CC. Life history trade-offs in cancer evolution. Nat Rev Cancer. 2013; 13(12): 883-92.
9. Lopez-Lazaro M. Stem cell division theory of cancer. Cell Cycle. 2015; 14(16): 2547-8.
10. Gagliardi A, Mullin NP, Ying Tan Z, Colby D, Kousa AI, Halbritter F, et al. A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. EMBO J. 2013; 32(16): 2231-47.
11. Mirzaei MR, Najafi A, Arababadi MK, Asadi MH, Mowla SJ. Altered expression of apoptotic genes in response to OCT4B1 suppression in human tumor cell lines. Tumour Biol. 2014; 35(10): 9999-10009.
12. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. Curr Opin Genet Dev. 2008; 18(1): 48-53.
13. Radzisheuskaya A, Silva JC. Do all roads lead to Oct4? The emerging concepts of induced pluripotency. Trends Cell Biol. 2014; 24(5): 275-84.
14. Rizzino A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. Stem Cells. 2013; 31(6): 1033-9.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017

15. Navarro P, Festuccia N, Colby D, Gagliardi A, Mullin NP, Zhang W, et al. OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. EMBO J. 2012; 31(24): 4547-62.
16. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. Stem Cells Dev. 2009; 18(7): 1093-108.
17. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. Int J Cancer. 2007; 120(7): 1598-602.
18. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2008; 14(13): 4085-95.
19. Wei D, Kanai M, Huang S, Xie K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. Carcinogenesis. 2006; 27(1): 23-31.
20. Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, Aoki K, Suzuki K, Kanai Y, et al. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kruppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 308(2): 251-6.
21. Nikpour P, Mowla SJ, Jafarnejad SM, Fischer U, Schulz WA. Differential effects of Nucleostemin suppression on cell cycle arrest and apoptosis in the bladder cancer cell lines 5637 and SW1710. Cell Prolif. 2009; 42(6): 762-9.
22. Runesson E, Ackermann P, Karlsson J, Eriksson BI. Nucleostemin- and Oct 3/4-positive stem/progenitor cells exhibit disparate anatomical and temporal expression during rat Achilles tendon healing. BMC Musculoskelet Disord. 2015; 16: 212.
23. Tsai RY. Turning a new page on nucleostemin and self-renewal. J Cell Sci. 2014; 127(Pt 18): 3885-91.
24. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. Anat Cell Biol. 2014; 47(1): 1-11.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2016; 18(2): 54-61.

Original article

The comparison of self-renewal gene expression pattern in cancer cell lines, tumor tissue and normal tissue of the bladder tumor

Mirzaei MR[1*], Mahmoudi M[1], Hassan Shahi Gh[1], Rahnama R[2], Sheikh Fathollahi M[3], Bagrezai F[4]

[1]Cellular and Molecular Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R. Iran; [2]Patologic Dept., Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R. Iran; [3]Social Medicine Dept., and Working Environment Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R. Iran; [4]Biochemistry Dept., Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R. Iran.

Received: 4/Oct/2015 Accepted: 10/Nov/2015

Background and aims: Re-expression of self-renewal genes is one of the causes of cancer. So, expressional profile of self-renewal genes including, OCT4, NANOG, KLF4, SOX2 and Nucleostemin in two cell lines (5637 and HT1376), cancer and normal tissues of five bladder cancer biopsy tissues were analyzed**.**

Methods: In this experimental study, the cell lines were cultured in RPMI1640 medium. Cancer tissue samples were selected from samples referred to the pathology laboratory, according to clinical symptoms and laboratory findings. Tissue edges were selected as healthy tissue. Expressional profile of interested genes (mRNA expression) was carried down by Real-Time PCR, data were analyzed by ΔΔct formula and expressional rate reported as fold changes.

Results: The Real-Time PCR results showed that the expression of studied genes in cancer cell lines and tumor tissues were down by similar pattern but did not expressed in healthy tissue.

Conclusion: The expression of OCT4, NANOG, KLF4, SOX2 and Nucleostemin genes were necessary for induction of self-renewal potency. The results showed that these genes were expressed in cancer tissue and cancer cell lines in compared to normal tissues. The investigation of re-expression of mentioned genes is recommended.

Key words: **Tumor cell line, Self-renewal, Bladder cancer.**

Cite this article as: Mirzaei M, Mahmoudi M, Hassan-Shahi GH, Rahnama A, Sheikh Fathollahi M, Bagrezai F. The comparison of self-renewal gene expression pattern in cancer cell lines, tumor tissue and normal tissue of the bladder tumor. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(2): 54-61.

[*]**Corresponding author:**
Cellular and Molecular Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R. Iran. Tel: 00983434280086, E-mail: mirzaeemr@gmail.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:34 +0430 on Wednesday July 19th 2017