مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۳، شماره ۶/ بهمن و اسفند ۱۳۹۰/ ۸۲-۷۱

مقاله پژوهشی

مقایسه اندازه گیری تزاید ژن HER-2/neu توسط PCR تمایزی و ایمونوهیستوشیمی در بیماران مبتلا به سرطان سینه

الهام اورنگی[۱]، دکتر زهره حجتی[۱]*، دکتر کامران قاعدی[۱]، دکتر مریم طباطبائیان[۲]

[۱]گروه زیست شناسی – دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، [۲]گروه پژوهشی سرطان- بیمارستان امید اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱٤ اصلاح نهایی: ۹۰/۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱٦

چکیده:

زمینه و هدف: **تزاید آنکوژن HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor/ neuroglioblastoma) بر روی پیشرفت، درمان و پیش‌آگاهی سرطان سینه موثر است. بررسی دقیق وضعیت HER-2/neu بافت تومور، برای اداره بیماری و انتخاب صحیح بیماران پاسخگو به داروی جدید Trastuzumab مهم می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی وضعیت ژن HER-2/neu در نمونه‌های سرطان سینه توسط روش PCR تمایزی و تطابق موجود بین این روش با تست ایمونوهیستوشیمی (IHC) در برخی از نمونه‌ها انجام شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه مورد-شاهدی، نخست، دقت کمی تکنیک PCR تمایزی بررسی شد و سپس ٦٧ بافت سرطان سینه تازه و ١٦ بافت پارافینی توسط این روش بررسی گردید. نتایج ایمونوهیستوشیمی فقط در ۲۷ مورد از ۸۳ نمونه بررسی شده توسط PCR تمایزی موجود بود. داده ها به کمک آزمون های آماری مک نمار و آزمون توافقی کاپا تجزیه و تحلیل شد.**

یافته‌ها: **PCR تمایزی، تزاید ژن HER-2/neu را در ۲۹ مورد از ۸۳ نمونه (۳۵٪) نشان داد. ۱۲ مورد از ۲۷ نمونه تست شده توسط ایمونوهیستوشیمی افزایش بیان HER-2/neu را دارا بود. تطابق بین دو روش در ۱۹ مورد از ۲۷ نمونه مشاهده گردید (۷۰٪ مشترک). در میان ۸ نمونه نامطابق، ٦ نمونه توسط ایمونوهیستوشیمی منفی، اما توسط PCR تمایزی مثبت بود و ۲ نمونه با تزاید HER-2/neu، در بررسی توسط ایمونوهیستوشیمی بیان طبیعی HER-2/neu را دارا بود.**

نتیجه گیری: **PCR تمایزی به منظور تعیین تعداد ژن HER-2/neu در یک حجم کوچکی از بافت تومور، تکنیکی ساده، سریع و ارزان است اما به دلیل این‌که روش PCR در نقطه نهایی می‌باشد، دقت پایینی دارد و مشاهده ٦ نمونه دارای تزاید HER-2/neu بدون تغییر در میزان پروتئین آن ممکن است از این حقیقت ناشی شود.**

واژه های کلیدی: سرطان سینه، ژن HER-2/neu، PCR تمایزی، اینترفرون گاما، ایمونوهیستوشیمی.

مقدمه:

سرطان سینه شایع‌ترین سرطان و علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در میان زنان است (۱). سرطان سینه در زنان ایرانی در مقایسه با زنان کشورهای غربی، حداقل یک دهه زودتر و در مراحل پیشرفته‌تر بروز می‌کند. رخداد آن در بین زنان ایرانی ۱۲۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار زن می‌باشد (۲). معمولاً جهش‌های سرطانزا در ژن‌های کنترل‌کننده چرخه سلولی و آپوپتوز XE آپوپتوز سلولی رخ می‌دهند. غالباً سه گروه ژنی در سرطان‌ها دچار جهش می‌شونـــد که یکی از آن ها انکوژن ها هستند. محصول این نوع ژن ها در ترنسفورماسیون سلول‌ها و یا القای سرطان دخالت دارد. انکوژن‌ها از ژن‌های طبیعی موجود در سلول به نام پروتوانکوژن‌ها بوجود می‌آیند. محصولات پروتوانکوژن‌ها تکثیر سلولی را القا می‌کنند ولی انکوژن‌ها فعال‌تر از حالت طبیعی می‌باشند. پروتوانکوژن‌های دخیل در ایجاد سرطان را می‌توان به گروه های مختلفی چون فاکتورهای رشد، گیرنده‌های سطح سلولی مثل ERBB

*نویسنده مسئول: اصفهان-خیابان هزار جریب-دانشگاه اصفهان-دانشکده علوم-گروه زیست شناسی-تلفن: ۷۹۳۲٤۷۸-۰۳۱۱، E-mail:z.hojati@sci.ui.a.c.ir

(erythroblastosis oncogene B) یا HER-2/neu و FMS (Fibromyalgia Syndrome)، ترکیبات سیستم انتقال پیام XE سیستم انتقال پیام درون سلول (مثل خانوادهRAS و ABL)، پروتئین‌های هسته‌ای متصل شونده به DNA (شامل فاکتورهای رونویسی از قبیل MYC) و ترکیبات شبکه سیکلین‌ها، CDKها (Cyclin delend kinase) و مهار کننده‌های کیناز تقسیم‌بندی نمود. یکی از مهمترین ناهنجاری‌های کروموزومی که منجر به سرطان از جمله سرطان سینه می‌گردد، تزاید آنکوژن‌ها می‌باشد (۳). تزاید ژنی یعنی افزایش تعداد کپی یک ناحیه محدودی از کروموزوم که منجر به ایجاد بیش از ۲ کپی از ژن‌های موجود در آن ناحیه می‌گردد. این منجر به افزایش بیان (بیان بیش از حد طبیعی) ژن‌های حیاتی درگیر در شروع و پیشرفت سرطان، می‌گردد (۴).

HER-2/neu مهمترین آنکوژن تزاید یافته در سرطان سینه است. تزاید ژن HER-2/neu و یا افزایش بیان آن در ۳۴-۱۰ درصد از بیماران دارای سرطان سینه مشاهده گردیده است. پروتوآنکوژن HER-2/neu که بر روی کروموزوم ۲۱-۱۲q۱۷ واقع شده، یک گلیکو پروتیئن ترانس ممبرین ۱۲۵۵ آمینواسیدی و ۱۸۵ کیلو دالتونی با فعالیت تیروزین کینازی ذاتی را کد می‌نماید که یکی از ۴ عضو خانواده رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی می‌باشد. پروتئین HER-2/neu در حالت طبیعی در بسیاری از سلول‌ها و بافت‌ها بیان می‌شود، مسیرهای انتقال پیام درون سلولی مهمی را هدف قرار می‌دهد و نقش مهمی در رشد، تمایز، بقا و چسبندگی سلول ایفا می‌کند (۵).

تزاید و یا افزایش بیان HER-2/neu، یک شاخص مهم در سرطان سینه است. این شاخص با پیش آگهی بد بیماری، افزایش خطر بازگشت بیماری، بقا کوتاه تر عمر بیمار، مقاومت و عدم پاسخ به درمان‌های معمول و پارامترهای مرتبط به پیشرفت تومور شامل اندازه بزرگتر تومور، درگیری غدد لنفاوی، مرحله پیشرفته‌تر و درجه بالاتری از بیماری، افزایش تکثیر سلولی و کاهش سطح بیان رسپتور هورمون‌های استروئیدی، در ارتباط می‌باشد (۶). تعداد گیرنده های هورمون استروژن در سلول های سرطان سینه که دارای تزاید و یا افزایش بیان HER-2/neu هستند نسبتاً پایین تر از تعداد آن در سلول های سرطان سینه فاقد تزاید HER-2/neu می‌باشند. لذا بیماران با سرطان سینه HER-2/neu مثبت، نسبت به داروی ضد استروژن تاموکسیفن و سایر رژیم‌های شیمی درمانی معمول مقاوم می‌باشند (۶). امروزه حداقل ۲ دارو هرسپتین (Trastuzumab) و Lapatinib جهت درمان تومورهای سینه HER-2/neu مثبت وجود دارد (۷). Trastuzumab یک آنتی بادی مونوکلونال انسانی است که دومین خارج سلولی پروتئین HER-2/neu را هدف قرار داده و سبب حذف سریع رسپتور HER-2/neu از سطح سلول‌های توموری گشته و در نهایت منجر به کاهش سیگنال رشد مرتبط به HER-2/neu در سلول‌های توموری می‌گردد (۸). استفاده از هرسپتین همراه با شیمی درمانی سبب کند شدن پیشرفت بیماری، افزایش پاسخ به درمان و افزایش بقاء بیماران با تومور سینه HER-2/neu مثبت می‌گردد (۹). پس انتخاب نوع درمان در بیماران دارای سرطان سینه، به وضعیت رسپتور HER-2/neu در سطح سلول‌های توموری بستگی دارد. لذا بررسی دقیق وضعیت ژن و یا پروتئین HER-2/neu به منظور انتخاب افراد واجد شرایط جهت درمان با هرسپتین لازم و ضروری است (۱۰).

روش مناسب جهت بررسی وضعیت HER-2/neu باید آسان، سریع، دقیق، حساس، تکرارپذیر و مقرون به صرفه باشد (۱۰). تکنیک Immunohistochemistry (IHC)، نخستین تکنیکی است که در بیشتر آزمایشگاه‌های پاتولوژی به منظور شناسایی بیماران سرطان سینه HER-2/neu مثبت استفاده می‌گردد (۱۱).

تکنیک IHC میزان پروتئین HER-2/neu موجود در سطح سلول‌های توموری را اندازه گیری می کند. سیستم شماره‌گذاری مرسوم در این تکنیک بر اساس شدت و تمامیت رنگ آمیزی غشاء سلول‌های توموری می‌باشد. این تکنیک سریع، آسان و کم هزینه است اما درصد نسبتاً بالایی از نتایج مثبت کاذب در بیماران با افزایش ضعیف در بیان پروتئین HER-2/neu (IHC+2) مشاهده می‌گردد (۱۲). به دلیل دقت پایین تکنیک IHC در تعیین وضعیت HER-2/neu، نمونه‌های تست شده با IHC مخصوصاً نمونه‌های با IHC+2 باید توسط تست دیگری مورد بررسی قرار گیرند (۱۳).

تکنیک FISH (fluorescent in situ hybridization)، تکنیکی دقیق و معتبر جهت اندازه گیری تعداد کپی ژن HER-2/neu در سلول های تومور سینه می‌باشد. اما این تکنیک سخت، وقت گیر و بسیار گران بوده، سیگنال فلورسنت پروب‌های آن ناپایدار بوده و اسلایدهای آن در دراز مدت قابل نگه‌داری نمی‌باشند (۱۳). لذا انجام این تست در بسیاری از آزمایشگاه‌ها عملی نمی‌باشد (۱۲،۷). تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR در مقایسه با تکنیک‌های میکروسکوپیک سریع‌تر، دقیق‌تر، ارزان‌تر و آسان‌تر است (۱۰). از جمله روش های دیگری که علاوه بر سهولت از دقت نسبتا بالایی نیز برخوردار است، روش real time PCR است. انجام این روش نیاز به دستگاه مخصوص real time PCR دارد که هنوز بسیاری از آزمایشگاه های تشخیص طبی به آن مجهز نیستند. انجام real time PCR علاوه بر اینکه به افراد متخصص نیاز دارد، هزینه بالایی را نیز به خود اختصاص می دهد. یکی از تکنیک‌های کارآمدی که به منظور تشخیص تزاید ژن HER-2/neu مورد استفاده قرار گرفت، تکنیک PCR تمایزی است. PCR تمایزی یک روش نیمه کمی جهت تخمین تزاید ژن HER-2/neu است. مشخص است که از هر ژن در حالت طبیعی دو کپی در هر سلول وجود دارد. لذا میزان اکثر ژن ها در سلول کاملاً مشخص است و از بسیاری از این ژن ها چون TATA باکس بایندینگ پروتئین وINFγ (interferon gamma)) به عنوان کنترل می توان استفاده نمود. در این روش، ژن هدف با تعداد کپی نامشخص و ژن کنترل با تعداد کپی ثابت (۲ کپی در هر سلول) به طور هم زمان در یک تیوپ تکثیر شده و محصولات PCR بعد از تعداد معینی از چرخه‌ها بر روی ژل آگارز بارگذاری گردیده. سطح تزاید ژن هدف، از روی نسبت بین شدت باند مربوط به ژن هدف و شدت باند ژن کنترل در نمونه‌های توموری و مقایسه آن با نسبت مذکور در نمونه طبیعی تعیین و تعداد کپی نسبی ژن هدف مشخص می‌گردد (۱۴). هدف از این مطالعه، تخمین نیمه کمی تزاید ژن HER-2/neu در بیماران سرطان سینه توسط روش PCR تمایزی پس از انتخاب ژن INFγ (به عنوان ژن کنترل با میزان ثابت دو کپی در سلول) و مقایسه نتایج این تکنیک با نتایج تست IHC در تعدادی از نمونه‌های توموری می‌باشد .

روش بررسی:

این مطالعه از نوع مورد- شاهدی است. در این مطالعه ۸۳ نمونه بافت تومور سینه شامل ۶۷ نمونه تازه و ۱۶ نمونه پارافینی از بیمارستان های سیدالشهدا و امیرالمومنین و آزمایشگاه های پاتولوژی دکتر برادران و دکتر مهاجر شهر اصفهان در سال ۱۳۸۹ تهیه و مورد بررسی قرارگرفت. میانگین سن بیماران ۵۰ سال بوده و رنج سنی آن ها ۲۸ تا ۷۰ سال بود. بیماری پانزده درصد این افراد به صورت دو طرفه و بقیه یک طرفه بود. سی و شش بیمار با سرطان تهاجمی و بدخیم (invasive) در گریدهای مختلف (I، II و III) بوده و بقیه نمونه های بنایین (benign) بودند. بافت‌های توموری تازه پس از انجام عمل ماستکتومی و یا پس از انجام عمل بیوپسی تهیه و در $-20^{o}c$ ذخیره گردید (فریزر پارس ایران). از هر بلوک پارافینی برش‌های ۱۰ میکرونی تهیه و در تیوپ استریل ذخیره گردید. هم چنین

۵ نمونه بافت طبیعی سینه از بخش غیر توموری بافت سینه طی عمل ماستکتومی تهیه و به عنوان نمونه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. همه نمونه‌ها با رضایت کامل بیماران تهیه گردید.

پس از تهیه برش‌های ۱۰ میکرونی، به منظور استخراج DNA، نخست روش پارافین زدایی صورت گرفت. جهت پارافین زدایی، ابتدا ml ۱ گزیلل (مرک آلمان) به هر ویال حاوی برش‌های ۱۰ میکرونی اضافه گردید و در دستگاه ترمومیکسر (Ependorf, Germany) به مدت ۱۰دقیقه در دمای $59^{o}c$ درجه سانتی گراد و در دور rpm ۵۰۰ قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ (Ependorf, Germany) گردید. این مرحله بر روی رسوب باقی مانده در کف ویال تکرار شد. از این رسوب فاقد پارافین جهت استخراج DNA استفاده شد.

روش استفاده شده جهت استخراج DNA از نمونه‌های بافت توموری تازه بر اساس روش پایه‌گذاری شده توسط Shi و همکاران بود (۱۵). به منظور استخراج DNA از نمونه‌های بافت توموری تازه، قطعاتی به اندازه mg ۱۰۰–۵۰ (توزین توسط ترازوی دیجیتال KERN آلمان) از هر بافت توموری بریده و در هاون چینی با اضافه نمودن بافر لیز کننده هموژن گشت. پس از هموژنیزاسیون کامل، عصاره سلولی به درون ویال منتقل شد. به رسوب بافتی حاصل از پارافین زدایی نیز به مقدار µl ۷۰۰ بافر لیز کننده اضافه گردید. عصاره سلولی هر دو نمونه بافت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $100^{o}c$ جوشانده شد. مخلوطی از فنول- کلروفرم- ایزوپروپانول به نسبت مشخصی به این عصاره جوشیده اضافه و پس از سانتریفوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm، فاز رویی جدا گردید. به فاز رویی کلروفرم اضافه و پس از سانتریفوژ و جداسازی محلول رویی و انتقال آن به ویال دیگر با آن ایزوپروپانول اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در $20^{o}c$- نگهداری و سپس به منظور رسوب DNA، در دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ گردیدند. در ادامه ابتدا رسوب DNA با الکل 70^{o} شستشو داده شد و پس از خشک شدن رسوب، با اضافه نمودن µl ۵۰ TE (Tris-EDIA) و قرار دادن آن در دمای $65^{o}c$ به مدت ۳۰ دقیقه، رسوب DNA در TE بافر حل گردید و برای انجام آنالیزهای بعدی در $20^{o}c$- ذخیره شد. تمامی این مطالعات در آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک دانشگاه اصفهان انجام گرفت.

توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق بدینصورت بودند.

پرایمر پیشرو ژن HER2

5′CCTCTGACGTCCATCATCTC3′،

پرایمر پیرو ژن HER2

5′ATCTTCTCGTGCCGTCGCTT3′،

پرایمر پیشرو ژن INFγ

5′TCTTTTCTTTCCCGATAGGT3′،

پرایمر پیرو ژن INFγ

5′CAGGGATGCTCTTCGACCTC3′.

شرایط مختلف هر دو جفت پرایمر شامل پرایمرهای ژن HER-2/neu (ژن هدف) و پرایمرهای ژن INFγ (ژن کنترل)، از نظر نزدیک بودن دمای اتصال هر دو جفت پرایمر، عدم اتصال انتهای ′۳ هر چهار پرایمر و مشاهده عدم تشکیل پرایمر دایمر توسط برنامه Oligo® 5، بررسی شد. جفت پرایمر ژن HER-2/neu محصولی به طول ۱۰۰ جفت باز و جفت پرایمر ژن INFγ محصولی به طول ۱۵۰ جفت باز تشکیل می‌دهد.

واکنش PCR در مخلوطی به حجم نهایی µl ۵۰ انجام گرفت. مخلوط PCR از µl ۷ بافر 10x PCR، µl ۳/۵ (۵۰ mm) Mgcl2، µl ۲ از هر چهار پرایمر به غلظت pmol ۱۰، µl ۰/۵ از آنزیم Smar Taq ۵u /µl DNA Pol و DNA ژنومی و آب به مقدار مناسب تشکیل شده بود. شرایط حرارتی دستگاه ترموسایکلر (Ependorf, Genrmany) جهت انجام PCR تمایزی بدین شرح بود. دناتوراسیون اولیه در دمای $95^{o}c$ به مدت ۱۰

دقیقـــه، در ادامـــه ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل مرحلـــه دناتوراسیون در دمای ^{o}c ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ^{o}c ۶۰ به مدت ۱ دقیقه و مرحله گسترش در دمای ^{o}c ۷۰ به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و در آخر مرحله مرحله گسترش نهایی در دمای ^{o}c ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

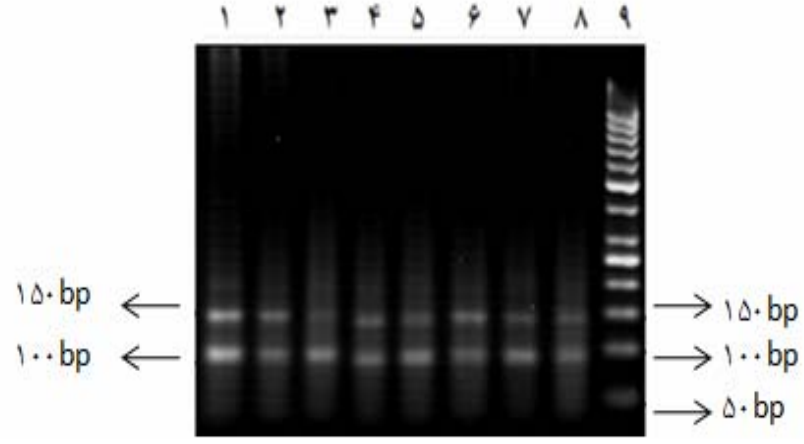
پس از انجام PCR تمایزی، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ به مدت ۲ ساعت و با ولتاژ ۵۰v بارگذاری گردیدند (توسط دستگاه ژل الکتروفورز Bioeer Technology کشور چین). به دلیل تفاوت ۵۲ جفت بازی بین طول محصول PCR ژن HER-2/neu و ژن INFγ از نشانگر DNA ۵۰ جفت بازی (تهیه شده از سیناژن ایران) استفاده شد. نسبت شدت یا دانسیته باند HER-2/neu به شدت باند INFγ برای هر نمونه توموری و طبیعی توسط نرم افزار Image J تعیین شد. این نرم افزار از سایت http://rsbweb.nih.gov/ij دانلود گردید. چگونگی کار و انجام آنالیز توسط این نرم افزار در این سایت به طور کامل آورده شده است. برای تعیین تعداد نسبی کپی ژن HER-2/neu در هر نمونه توموری، نسبت مذکور در نمونه توموری با همین نسبت در نمونه طبیعی مقایسه گردید. معیار تزاید ژنی، افزایش ۲ برابری یا بیشتر شدت باند HER-2/neu نسبت به شدت باند INFγ در نمونه توموری در مقایسه با همین نسبت در نمونه طبیعی بود.

تمامی نمونه‌های دارای جواب تست ایمونوهیستوشیمی (IHC) و اطلاعات مربوط به آنها از آزمایشگاه های دکتر برادران و دکتر مهاجر تهیه گردید.

در این مطالعه به منظور بررسی وجود اختلاف بین نتایج دو تست IHC و PCR تمایزی، از آزمون مک نمار و برای تعیین توافق بین نتایج این دو تست از آزمون توافق کاپا و فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. مقدار آماره کاپا به صورت زیر تفسیر گردید. توافق ضعیف= ۰/۲-۰، توافق متوسط= ۰/۴- ۰/۲۱، توافق مناسب= ۰/۶- ۰/۴۱، توافـــق خوب= ۰/۸- ۰/۶۱، توافـق تقریباً کامـل= ۱- ۰/۸۱

یافته ها:

در بررسی ۸۳ بافت تومور بدخیم سینه شامل ۶۷ بافت تازه توموری و ۱۶ بافت پارافینی توسط PCR تمایزی، ۲۹ نمونه تزاید ژن HER-2/neu را نشان دادند (تصاویر شماره ۱ و ۲). فراوانی نسبی تزاید ژن HER-2/neu در نمونه‌های توموری بدخیم سینه توسط PCR تمایزی، ۳۵ درصد بود. در نمونه‌های دارای تـــزاید HER-2/neu، شدت ژن HER-2/neu نسبت به ژن INFγ



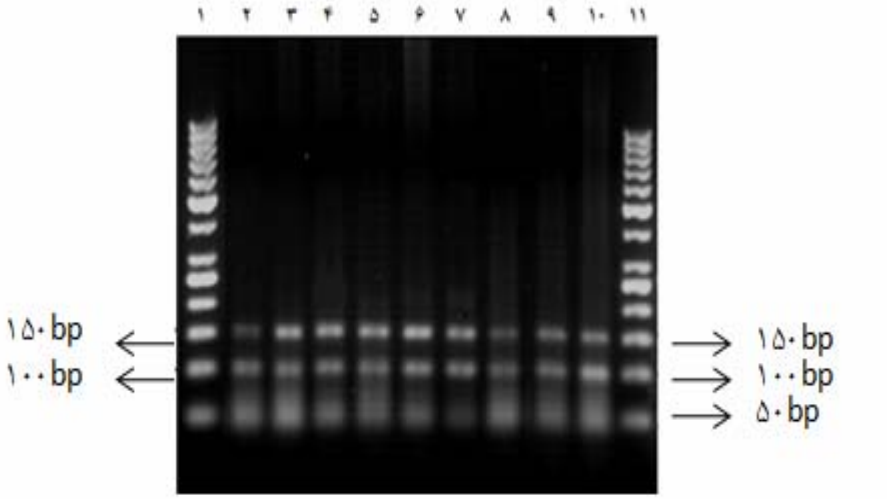
تصویر شماره ۱: مشاهده تزاید ژن HER2 توسط PCR تمایزی در نمونه‌های بافت توموری تازه.

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای دو ژن HER2/neu و INFγ انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ از یکدیگر تفکیک شدند. ستون ۱، ۳، ۵ و ۷ نمونه‌های توموری دارای تزاید HER2 و ستون ۲، ٤، ٦ و ۸ نمونه‌های توموری فاقد تزاید HER2 می‌باشند. ستون ۹ نشانگر DNA ۵۰ جفت بازی می باشد.

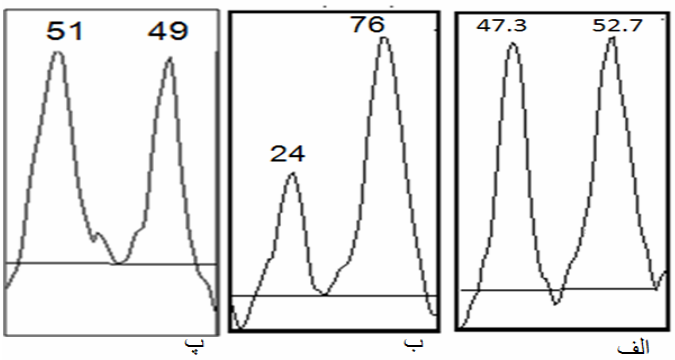
در مقایسه با همین نسبت در نمونه طبیعی، بین ۲ تا ۱۲ برابر بدست آمد (تصویر شماره ۳).

از بین ۸۳ بافت توموری بدخیم سینه، فقط برای ۲۷ (۱۷ نمونه تازه و ۱۰ نمونه پارافینی) گزارش IHC موجود بود. از مجموع این ۲۷ نمونه، در ۱۹ نمونه تطابق کامل بین نتایج دو تست IHC و PCR تمایزی مشاهده گردید. ده نمونه در هر دو تست مثبت و ۹ نمونه در هر دو تست منفی بودند. این نتایج نشان دهنده تطابق ۷۰ درصد بین نتایج دو تست IHC و PCR تمایزی می‌باشد. شش نمونه از ۸ نمونه نامطابق در بررسی توسط PCR تمایزی، تزاید ژن HER-2/neu را نشان دادند، در حالی‌که فاقد بیان افزاینده HER-2/neu در بررسی با IHC بودند. دو نمـونه دیگر در بررسی توسط IHC، افـزایش ضعیفی در بیان ژن HER-2/neu نشان دادند و در ۲+ IHC قرار داشتند، در حالی‌که فاقد تزاید این ژن در بررسی توسط PCR تمایزی بود (جدول شماره ۱).

در بررسی وضعیت تزاید ژن HER-2/neu توسط PCR تمایزی در ۱۲ نمونه IHC مثبت (۶ نمونه با ۳+ IHC و ۶ نمونه با ۲+ IHC)، ۱۰ نمونه (۸۳٪) دارای افزایش تعداد کپی HER-2/neu و ۲ نمونه (هر دو با ۲+ IHC)، فاقد تزاید HER-2/neu بودند. نسبت شدت ژن HER-2/neu به ژن INFγ در این دو نمونه نامطابق در مقایسه با همین نسبت در نمونه طبیعی، ۱/۳۳ و ۱/۴۷ بدست آمد. همچنین در بررسی روند تزاید ژن HER-2/neu در ۱۵ نمونه IHC منفی توسط تست PCR تمایزی، ۶ نمونه (۴۰٪) دارای تزاید HER-2/neu و ۹ نمونه فاقد تزاید HER-2/neu بودند. نسبت شدت ژن HER-2/neu به INFγ در این ۶ نمونه توموری نامطابق در مقایسه با همین نسبت در نمونه طبیعی، بین ۲/۲۷ تا ۴/۴۷ برابر بدست آمد (جدول شماره ۱).



تصویر شماره ۲: مشاهده تزاید ژن HER2 توسط PCR تمایزی در نمونه‌های بافت توموری پارافینی.
واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای دو ژن HER2/neu و INFγ انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ از یکدیگر تفکیک شدند. ستون ۲ و ۱۰ نمونه‌های همراه با تزاید HER2 و ستون ۳ تا ۹ نمونه‌های فاقد تزاید HER2 هستند. ستون ۱ و ۱۱ مارکر ۵۰ جفت بازی می‌باشد.



تصویر شماره ۳: مقایسه آنالیز منحنی‌های رسم شده با نرم افزار Image J در نمونه طبیعی و نمونه‌های تومـوری.
پس از انجام PCR با استفاده از پرایمرهـای دو ژن HER2/neu و INFγ و تفکیک محـصولات PCR بـر روی ژل ۲/۵٪، با استفاده از نرم افزار Image J شدت باندهای مربوط به HER2/neu و INFγ هر لاین بـه طـور مجـزا صـورت گرفـت. در ایـن نمودارها پیک سمت راست مربوط به ژن HER2 و پیک سمت چپ مربوط به ژن UBC است. الف: نمونه طبیعی. شـدت بانـد هر دو ژن تقریباً یکسان است. ب: نمونه‌های توموری دارای تزاید HER2 پ: نمونه توموری فاقد تزاید HER2.

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از بررسی بیان ژن توسط ایمونوهیستوشیمی و تزاید ژن توسط PCR تمـایزی در ۲۷ نمونه آنالیز شده توسط هر دو تست

شماره نمونه	جواب تست ایمونوهیستوشیمی	وضعیت بیان ژن HER-2/neu	نسبت HER2/INFγ توسط تست PCR تمایزی	وضعیت تزاید ژن HER-2/neu
۱	+۳	+	٤/٦٧	+
۲	+۳	+	٥/٧٠	+
۳	+۲	+	۲/۳٥	+
٤	+۲	+	۲/۸	+
٥	+۳	+	۳/۲۸	+
٦	+۲	+	۲	+
۷	+۳	+	۳/٤۷	+
۸	+۲	+	۱/۳۳	–
۹	+۲	+	۲	+
۱۰	+۳	+	۲/٥۳	+
۱۱	+۳	+	۹/۷۳	+
۱۲	+۲	+	۱/٤۷	–
۱۳	۰	–	۱/۲	–
۱٤	+۱	–	٤/٤۷	+
۱٥	+۱	–	۲/۸	+
۱٦	۰ یا +۱	–	۲/۲۷	+
۱۷	۰	–	۱/٤۷	–
۱۸	+۱	–	۱/٤۷	–
۱۹	+۱	–	۱/۲	–
۲۰	۰ یا +۱	–	۱/۳۳	–
۲۱	+۱	–	۱/٦	–
۲۲	۰ یا +۱	–	۲/٤	+
۲۳	۰ یا +۱	–	۱/٤۷	–
۲٤	۰ یا +۱	–	۲/۹۳	+
۲٥	۰	–	۱/٤۷	–
۲٦	+۱	–	۱/٦	–
۲۷	+۱	–	۳/۰۷	+

نمونه هایی که جواب تست ایمونوهیستوشیمی آنها ۳+ یا ۲+ می باشد دارای بیان افزاینده HER-2/neu هستند. در تست PCR تمایزی، نمونه هایی که نسبت تعداد کپی HER2 به INFγ در آنها ۲ یا بیشتر از ۲ می باشد دارای تزاید ژن HER-2/neu هستند.

نتایج حاصل از بررسی ۲۷ نمونه بافت تومور بدخیم سینه توسط دو تست IHC و PCR تمایزی با آزمون مک نمار، آنالیز گردید. با به دست آمدن میزان P=۰/۲۹، فرض یکسان بودن نتایج دو تست از دید آماری و بر اساس داده های موجود پذیرفته می شود. هم چنین بر اساس توضیحات ذکر شده در بخش روش بررسی و با بدست آمدن میزان κ = ۰/۴۲، توافق مناسب بین نتایج دو تست مذکور نشان داده شد.

بحث:

تزاید برخی از نواحی ژنوم که شامل آنکوژن‌های از قبیل HER-2/neu می‌باشد، نقش مهمی در شروع و پیشرفت تعدادی از تومورها از جمله تومور سینه، بازی می‌کند (۱۶،۹). در سرطان سینه، ۹۵-۹۲ درصد از موارد افزایش بیان HER-2/neu در نتیجه تزاید ژن آن می‌باشد (۱۸،۱۷). Trastuzumab یک داروی مفید در درمان تومورهای سینه HER-2/neu مثبت می‌باشد. این دارو قدرت درمان سایر تومورهای سینه را ندارد. در نتیجه به منظور شناسایی بیماران محتاج و قابل درمان با داروی Trastuzumab، باید وضعیت ژن HER-2/neu در هر نمونه تومور سینه جدید، مورد بررسی قرار گیرد. لذا استفاده از روشی ساده، دقیق، آسان و تکرار پذیر برای تعیین تومورهای دارای تزاید و یا افزایش بیان HER-2/neu، لازم و ضروری است (۱۹). معمولی‌ترین روش‌هایی که امروزه به منظور بررسی بیان ژن و یا تزاید ژن استفاده می‌گردد، تکنیک‌های IHC و FISH می‌باشند. تکنیک IHC علارغم سادگی و سهولت، دقت پایینی دارد و نتایج مثبت کاذب بسیاری در بیماران با IHC+۲ ارائه می‌دهد. مطالعات نشان داده که ۷۵ درصد از موارد نامطابق بین نتایج IHC و FISH در بیماران با IHC+۲ می‌باشد (۲۰). همچنین در مطالعه Kakar و همکاران، تطابق ۳۵ درصد بین نتایج تست IHC و FISH در نمونه های با IHC+۲ نشان داده شد (۲۱). علاوه بر این، در بررسی یک نمونه در آزمایشگاه های مختلف توسط تست IHC، به دلیل استفاده از آنتی بادی‌ها، پروتوکل‌ها و سیستم‌های شماره گذاری متفاوت، نتایج متفاوتی ارائه می‌گردد. این نشان دهنده دقت پایین تست IHC در بررسی وضعیت HER-2/neu می‌باشد. تست FISH نیز علی رغم دقت بسیار بالا، به دلیل نیاز به صرف هزینه‌های بسیار، در بسیاری از آزمایشگاه‌های پاتولوژی انجام پذیر نیست (۱۲). در مطالعه حاضر، وضعیت تزاید ژن HER-2/neu در نمونه‌های تومور سینه توسط روش PCR تمایزی بررسی گردید. در این بررسی ۲۹ نمونه از ۸۳ بافت تومور بدخیم (۳۵٪ از موارد)، تزاید HER-2/neu را نشان دادند. فراوانی نسبی تزاید ژن HER-2/neu در مطالعه حاضر مشابه نتایج مطالعه Kim و همکاران در بررسی تزاید HER-2/neu در ۲۷ نمونه تومور سینه توسط Real Time PCR، تزاید ۳۷ درصد ژن HER-2/neu را مشاهده نمودند (۹). همچنین این نتایج مشابه نتایج مطالعه Slamon و همکاران که در ۳۰ درصد از ۱۸۹ نمونه سرطان سینه بررسی شده توسط تکنیک ساترن بلات، تزاید ژن HER-2/neu را مشاهده نمودند (۲۲). همچنین Venter و همکاران تزاید ژن HER-2/neu را در ۳۳ درصد از نمونه‌های سرطان سینه نشان دادند (۲۳). تطابق ۷۰ درصد مشاهده شده بین نتایج تست PCR تمایزی با تست IHC (۱۹ نمونه از ۲۷ نمونه) در مطالعه حاضر با تطابق ۹۶/۳ درصد مشاهده شده در مطالعه Kim و همکاران و تطابق ۹۵ مشاهده شده در مطالعه Hanna متفاوت بود (۲۴،۹). در بین ۸ نمونه نامطابق ۲ نمونه در بررسی توسط IHC افزایش ضعیفی در بیان HER-2/neu نشان می‌داد (IHC +۲). در حالی‌که در بررسی توسط PCR تمایزی، فاقد تزاید ژن HER-2/neu بود. برای توجیه این ۲ مورد نامطابق می‌توان گفت که افزایش بیان پروتئین HER-2/neu فقط در نتیجه تزاید ژن آن نمی‌باشد بلکه می‌تواند علت‌های متعدد دیگری داشته باشد. بیان بیش از حد HER-2/neu ممکن است در نتیجه رونویسی بالای ژن HER-2/neu باشد. افزایش رونویسی این ژن ناشی از

جهش‌های فعال کننده در ژن‌های کنترل کننده بیان ژن HER-2/neu و یا بیان افزاینده فاکتورهای دخیل در رونویسی این ژن باشد (۲۶،۲۵). در ایران نیز مطالعات مشابهی بر روی آدنوسارکومای کولون صورت گرفته و مشخص شده است که این نوع سرطان با بیان بالای ژن HER-2/neu همراه است (۲۷). البته چندین مطالعه نیز نشان داده که نمونه‌های با ۲+ IHC اما فاقد تزاید ژنی، دارای پلی زومی کروموزوم ۱۷ می‌باشد (۲۸). در بین ۸ نمونه نامطابق، ۶ نمونه در بررسی توسط IHC، دارای بیان طبیعی ژن HER-2/neu بود. در حالی که در بررسی توسط PCR تمایزی، تزاید ژن HER-2/neu را نشان می‌داد. در مطالعات پیشین در بررسی تطابق بین نمونه‌های با IHC منفی با نتایج تست FISH فقط ۷٪ درصد از نمونه ها نامطابق بودند (۲۹). رخداد تزاید ژنی بدون تغییر در میزان پروتئین تزاید یافته، از دید مولکولی پدیده‌ای غیر ممکن و توجیه ناپذیر است و مشاهده ۶ نمونه دارای تزاید ژن HER-2/neu اما با سطح طبیعی پروتئین آن در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل نقایص و اشتباهاتی باشد که در حین انجام هر دو تکنیک رخ داده است. همانطور که در بالا اشاره شد حتی در بررسی یک نمونه توسط تست IHC در آزمایشگاه‌های مختلف نتایج متفاوتی ارائه می‌شود. پس در نتیجه دقت و حساسیت تست IHC پایین می‌باشد. روش PCR تمایزی نیز یک روش نیمه کمی محسوب می شود چون بر اساس مقایسه محصولات PCR میزان تزاید ژنی محاسبه می شود. بنابر این در مجموع به علت دقت و حساسیت پایین هر دو تست و تفاوت در بهینه بودن مواد و شرایط در حین انجام هر دو تست، می توان چنین نتایج متناقضی را مشاهده نمود.

نتیجه گیری:

تکنیک PCR تمایزی یک روش اسان، ساده، سریع و کم هزینه بوده که قدرت تشخیص تزاید ژنی در حد ۲ برابر را حتی در مقادیر کوچکی از بافت تومور دارا است. اندازه گیری تزاید ژنی با استفاده از دستگاه real time PCR و مقایسه آن با نتایج بدست آمده در این بررسی می تواند تا حدودی مشخص کننده دقت هر یک از روش های قابل استفاده باشد. اگر چه بدلیل حساسیت اینگونه آزمایش ها واهمیت نتایج مشاهده شده در انتخاب نوع رژیم درمانی بیماران، انجام حداقل دو تکنیک متفاوت و مقایسه آنها بسیار مفید به نظر میرسد.

تشکر و قدردانی:

از کمک های مالـــی دانشگاه اصفهان بالاخص تحصیلات تکمیلی تشکر فراوان می گردد. از آزمایشگاه های تشخیص طبی دکتر برادران و دکتر مهاجر جهت در اختیار قرار دادن اطلاعات مربوط به IHC نیز نهایت تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

1.Gunnarsson C, Ahnstrom M, Kirschner K, Olsson B, Nordenskjold B, Rutqvist LE, et al. Amplification of HSD17B1 and ERBB2 in primary breast cancer. Oncogene. 2003 Jan; 22(1): 34-40.

2.Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Mousavi Jarrahi A, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. The Breast J. 2007; 13(4): 383-91.

3.O'Hagan RC, Chang SS, Maser R, Mohan R, Artandi S, Chin L, et al. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. Cancer Cell. 2002 Aug; 2(2): 149-55.

4. Wu GJ, Sinclair C, Paape J, Ingle NJ, Roche CP, James CD, et al. 17q23 amplification in breast cancer involves the PAT1, RAD51C, PS6K, and SIGMA1B gene. Cancer Res. 2000 Oct; 60(19): 5371-5.

5. Tapia C, Savic S, Wagner U, Schonegg R, Novotny H, Grilli B, et al. HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. Breast Cancer Res. 2007; 9(3): R31.

6. Harold J, Burstein MD. The distinctive nature of HER2-positive breast cancer. New Engl J MED. 2005; 353(16): 1652-54.

7. Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, Morgan M, Jasani B. Evaluation of automated silver-enhanced in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens. Histopathology. 2009 Jan; 54(2): 248-53.

8. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. Ann Oncol. 2001; 12(Suppl 1): S3-8.

9. Kim YR, Choi JR, Song KS, Chong WH, Lee HD. Evaluation of HER2/neu status by Real-Time quantitative PCR in breast cancer. Yonsei Med J. 2002 Jun; 43(3): 335-40.

10. Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, Arizzi C, Coggi G, Bosari S. Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer. A technical and cost-effectiveness analysis. Am J Clin Pathol. 2008 Apr; 129(4): 563-70.

11. Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, et al. Evaluation of the quantitative analytical methods Real-Time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparision with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. Clin Chemist. 2005; 51(7): 1093-101.

12. Merkelbach-Bruse S, Wardelman E, Behrens P, Losen I, Buettner R, Friedrichs N. Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to Real-Time PCR. Am J of Surg Pathol. 2003; 27(12): 1565-70.

13. Matsenko NU, Rijikova VS, Kovalenko SP. Comparision of SYBR Green I and TaqMan Real-Time PCR formats for the analysis of her2 gene dose in human breast tumors. Bull Exp Biol Med. 2008 Feb; 145(2): 240-4.

14. Zadrozny M, Smolarz B, Romanowics-Makowska H, Kozlowska E, Kulig A. Genetic analysis of HER-2/neu gene amplification in paraffin embedded tumour tissue in women with breast cancer. Pol J Pathol. 2002; 53(4): 189-93.

15. Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. Histochem Cell Biol. 2004 Sep; 122(3): 211-8.

16. Kuwahara Y, Tanabe C, Ikeuchi T, Aoyagi K, Nishigaki M, Sakamoto H, et al. Alternative Mechanisms of Gene Amplification in Human Cancers. Genes Chromosomes Cancer. 2004 Oct; 41(2): 125-32.

17. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. Oncogene. 1996 Jul; 13(1): 63-72.

18. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 1989 May; 244(4905): 707-12.

19. Nistor A, Watson P, Pettigrew N, Tabiti K, Dawson A, Myal Y. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. BMC Clinic Pathol. 2006; 6(2): 1-8.

20. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States food and drug administrationapproved scoring system. J Clin Oncol. 1999 Jul; 17(7): 1983-7.

21. Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, et al. HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. Mol Diagn. 2000 Sep; 5(3): 199-207.

22. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ulrich A, McGuire WL. Human breast cancer correlation of relaps and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987 Jan; 235(4785): 177-82.

23. Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gulick DJ. Overexpression of the c-erbB2 oncoprotein in human breast cancer: immunohistological assessment correlates with gene amplification. Lancet. 1987 Jul; 2(8550): 69-72.

24. Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A. Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. Mod Pathol. 2001 Jul; 14(7): 677-85.

25. Hurst HC. Update on HER-2 as a target for cancer therapy. The ERBB2 promoter and its exploitation for cancer treatment. Breast Cancer Res. 2001; 3(6): 395-8.

26. Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ, et al. Ets regulation of the erbB2 promoter. Oncogene. 2000 Dec; 19(55): 6490-502.

27. Ghaffarzadegan K, Sharifi N, Vosooghynia H, Shakeri T, Ghiasi Moghadam T, Ghanad Kafi S, Lari S, Nassiri G. HER2/neu expression in colon adenocarcinoma and its correlation with clinicopathologic variables. Inter J Basic Med Sci. 2006: 9(1): 64-9.

28. Watters AD, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JMS. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat. 2003 Jan; 77(2): 109-14.

29. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in Clinical Laboratory Testing of Eligibility for Trastuzumab Therapy: Apparent Immunohistochemical False-Positives Do Not Get the Message. J Clini Oncol. 2001; 19(10): 2714-21.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2012 Feb, March; 13(5): 71-82. ***Original article***

Comparison of the HER2/neu gene amplification assesment by differential PCR and immunohistochemistry in breast cancer patients in Isfahan

Orangy E (MSc)[1], Hojati Z (PhD)[1*], Ghaedi K (PhD)[1], Tabatabaeean M (MD)[2]
[1]Biology Dept., Sciences faculty, Isfahan University, Isfahan, Iran, [2]Cancer Research Group, Omid Hospital, Isfahan, Iran.
Received: 4/March/2011 Revised: 4/Aug/2011 Accepted: 8/Oct/2011

Background and aim: Amplification of the oncogene HER-2/neu influences the breast cancer progression, prognosis and therapy. Accurate assessment of HER-2/neu status of the tumor is important for management of the disease and correct selection of patients who are able to respond to trastuzumab neu treatment. This study designed to evaluate the HER-2/neu gene status in breast cancer specimens by differential PCR and to show the concordance between these evaluations and IHC test in some specimens.
Methods: In this case-control study the quantitative accuracy of differential PCR was evaluated and then 67 fresh and 16 formalin fixed paraffin embedded breast cancer tissues were analysed using this method. IHC reports were available only for 27 of these samples. Data were analysed using McNemar and kappa test.
Results: HER-2/neu gene amplification was estimated (35%) in 29 cases out of 83 specimens (35%), as shown by differential PCR. IHC reports showed that 12 out of the 27 specimens contain overexpressed HER-2/neu. So, there was 70% agreement between these two methods (19 out off 27). Among the 8 discordant samples, 6 cases were negative by IHC but positive by differential PCR and 2 cases with HER-2/neu amplification had normal HER-2/neu expression by IHC.
Conclusion: Differential PCR is a simple, rapid and cheap method to determine the gene dosage in samples with small amount of tumor tissue but it does not seem to be so accurate, as it compares the end point products of the PCR. Thus, this method has low accuracy and the observation of 6 cases with HER-2/neu amplification in the absence of HER-2/neu over expression may have come from this reality.

Keywords: **Breast cancer, Differential PCR, HER-2/neu gene, INFγ, Immunohistochemistry.**

Cite this article as: Orangy E, Hojati Z, Ghaedi K, Tabatabaeean M. [Comparison of the HER2/neu gene amplification assesment by differential PCR and immunohistochemistry in breast cancer patients in Isfahan. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 Feb, March; 13(6): 71-82.]Persian

[*]**Corresponding author:**
Biology Dept., Sciences Faculty, Isfahan University, Hezarjarib St. Isfahan, Iran. Tel: 00983117932478, E-mail:z.hojati@sci.ui.a.c.ir