خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۸ شماره ۳ پاییز ۹۰ (۱۸۵-۱۷۴)

مقاله پژوهشی

بیان ژن‌های خودبازسازی Oct4 ، Nanog ، Sox2 ، Nucleostemin ، Bmi و Zfx در رده‌های سلولی سرطانی کولون($CaCo_2$ و HT-29) ، کبد(HepG2)، پروستات (LNCaP)، مثانه(HT-1376) و در نمونه‌های تومور انسانی کولون، مثانه و پروستات

صبریه امینی[۱]، فردین فتحی[۲]، کاظم‌پریور[۳]، بهرام نیکخو[۴]، حشمت‌اله صوفی مجیدپور[۵]، جعفر مبلغی[۶]، بهروز داوری[۷]

چکیده

سابقه و هدف

ژن‌هایی که درکنترل خودبازسازی سلول‌های بنیادی نقش دارند به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده اند. در این تحقیق، بیان ژن‌های Oct4 ، Sox2 ، Nanog ، Nucleostemin ، Zfx و Bmi-1 در رده‌های سلولی سرطان کولون، پروستات، کبد و مثانه هم چنین در نمونه‌های انسانی این سرطان‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، بیان ژن‌های خودبازسازی Oct4 ، Nanog ، Sox2 ، Nucleostemin ، Bmi ، Zfx با استفاده از روش RT-PCR در نمونه‌های تومور انسانی شامل ۱۰ نمونه تومور مثانه، ۵ نمونه تومور پروستات، ۵ نمونه تومور کولون و ۵ نمونه نرمال کولون و در رده‌های سلولی سرطانی ارزیابی شد. هم چنین بیان ژن‌های Oct4 و Nucleostemin در سطح پروتئین با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که در نمونه‌های مورد مطالعه، ژن‌های خود بازسازی Oct4، Nanog، Sox2، Nucleostemin، Bmi و Zfx بیان می‌شوند و اندازه باندهای مربوط به ژن‌های مورد مطالعه مطابق با الگوی آغازگر طراحی شده بود. هم چنین بیان سیتوپلاسمی و هسته‌ای Oct4 و بیان هستکی و سیتوپلاسمی Nucleostemin با ارزیابی ایمونوسیتوشیمی تایید شد.

نتیجه گیری

در جمعیت سلول‌های سرطانی مورد مطالعه مذکور، تعدادی از سلول‌ها ویژگی سلول‌های بنیادی سرطانی را دارند و به احتمال زیاد در تکثیر سلول‌های سرطانی نقش اصلی را بر عهده دارند که به تایید نظریه cancer stem cell کمک می‌کند و پیشنهاد می‌کند که این ژن‌ها به صورت بالقوه می‌توانند به عنوان مارکر توموری جهت تشخیص و یا پیش‌آگهی سرطان استفاده شوند.

کلمات کلیدی: پروتئین انسانی Sox2 ، پروتئین انسانی Nanog ، پروتئین انسانی Zfx ، سرطان کولون، سرطان پروستات، سرطان مثانه

تاریخ دریافت : ۸۹/۸/۲۴
تاریخ پذیرش : ۹۰/۱/۲۷

۱- دکترای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD آناتومی ـ دانشیار مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۳۴۴۶-۶۶۱۷۷
۳- دکترای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ استاد دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی تهران ـ واحد علوم و تحقیقات ـ تهران ـ ایران
۴- متخصص آسیب‌شناسی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج ـ ایران
۵- متخصص اورولوژی ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج ـ ایران
۶- متخصص جراحی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج ـ ایران
۷- دکترای حشره‌شناسی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

مقدمه

خود تجدیدی کنترل نشده سلول‌ها، اخیراً به عنوان مکانیسم مهمی در فرآیند تومورزایی شناخته شده است. در هر توده توموری، تعداد اندکی از سلول‌ها به سلول‌های بنیادی شباهت دارند که این جمعیت اندک سلولی مسؤول حفظ و گسترش تومور هستند و توانایی مقاومت در برابر عوامل القا کننده آپوپتوزیس و شیمی درمانی را دارا می‌باشند(۳-۱). در سرطان کولورکتال سلول‌های آغاز کننده تومور، آنتی‌ژن‌های سطحی CD166 ، CD133 ، CD44 و ESA را بیان می‌کنند که در موش NOD/SCID (Non obese diabetic / sever immuno deficiency) حتی در غلظت‌های بسیار پایین، تولید تومور می‌نمایند و این تومورها با نئوپلاسم اولیه شباهت زیادی دارند. در سرطان کبد سلول‌های بنیادی سرطان(cancer stem cell)، بیان مارکرهای سطحی +CD90، -CD45 ، +CD117 و +CD133 را نشان دادند و زمانی که به موش‌هایSCID تزریق شدند، تومورهایی را به طور مکرر ایجاد کردند. در این سلول‌ها بیان ژن‌های سلول‌های پیش‌ساز/ بنیادی نظیر B-Catenin ، BMI ، NOTCH و OCT3/4 مشاهده شد که از مارکرهای سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشند(۵، ۴). مطالعه‌های انجام شده در سرطان‌های سیستم خونی نشان دادند که مارکرهای سطحی بن یاخته‌های لوکمیا، مشابهت فراوانی با مارکرهای سطحی بن یاخته‌های هماتوپوئتیک دارند(۶). ژن‌های Oct4، Nanog، Sox2، Nucleostemin، Bmi و Zfx ژن‌های مهمی برای ایجاد توانایی خود بازسازی بوده به طوری که سلول‌های بنیادی را فعال و ژن‌های شروع کننده تمایز را مهار می‌کنند و بدین ترتیب قابلیت خود تجدیدی سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کنند. Oct4 ، Nanog و Sox2 به صورت یک شبکه مرکزی در تکثیر و خودتجدیدی سلول‌های بنیادی جنینی، نقش اساسی ایفا می‌کنند(۸-۶). بیان این سه ژن در تعدادی از تومورها و دودمان‌های سلولی سرطانی نیز نشان داده شده است(۱۲-۹). ژن نوکلئوستمین مارکر دیگری است که جدیداً به عنوان مارکر بن یاخته‌های جنینی شناسایی شده است و بیان آن نیز در تعدادی از سرطان‌ها گزارش شده است(۱۳).

گروهی از محققین بیان این ژن را در سرطان‌های اپی‌تلیالی نظیر سلول‌های سرطان معده و سلول‌های Hela نشان دادند(۱۵، ۱۴). بررسی‌های انجام شده نشان داده است که بیان Zfx و Bmi نیز برای خود بازسازی سلول‌های بنیادی جنینی، عصبی و خون‌ساز لازم می‌باشند(۱۶). در سال ۲۰۰۹ کین و همکاران بیان ژن Bmi را در سرطان مثانه نشان دادند(۱۷). ژن‌هایی که در کنترل خودبازسازی سلول‌های بنیادی نقش دارند، به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده‌اند که بیان کنترل نشده آن‌ها نقش مهمی در فرآیند سرطان‌زایی دارا می‌باشند. هدف از این تحقیق، بیان ژن‌های Oct4 ، Sox2 ، Nanog ، Nucleostemin ، Zfx و Bmi-1 در رده‌های سلولی سرطان کولون HT-29 و $CaCo_2$ ، رده سلولی سرطانی پروستات LNCaP، رده سلولی سرطان کبد HepG2 و در رده سلولی سرطان مثانه HT-1376 هم چنین در نمونه‌های توموری بود. بیان این ژن‌ها علاوه بر آن که می‌توانند به عنوان مارکر سرطانی استفاده شوند، با توجه به نقش مهم آن‌ها در سلول‌های بنیادی می‌توانند تایید دیگری برای فرضیه Cancer stem cell بوده و خصوصیات بن یاخته‌های سرطانی یک تومور را بازگو کنند.

مواد و روش‌ها

روش کشت سلول‌های سرطانی مورد مطالعه:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. رده‌های سلولی $CaCo_2$ و HT-29 مشتق از آدنو کارسینومای کولورکتال انسان و رده‌های سلولی U87-MG (رده سلولی گلایوبلاستوما)، HT1376 (کارسینومای مثانه)، HepG2 (کارسینومای کبد) و LNCaP (کارسینومای پروستات) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رده U87-MG به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Nucleostemin و Sox2 و رده سلولی NT2 به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Oct4 و Nanog استفاده شد. برای کشت این سلول‌ها از محیط کشت‌های DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) و RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) سرم جنین گاوی FBS (Fetal bovin serum) ، به میزان ۱۵ ٪، اسید آمینه‌های غیر ضروری(Non essential amino acids:NEAA) به میزان یک درصد، پنی سیلین

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

جدول ۱: اسامی ژن‌ها و توالی مربوط به آغازگرهای بالادست(F) و پایین‌دست(R)

ژن	آغازگر	ترادف	دمای آنیلینگ	طول قطعه حاصل (bp)
h Oct4 (NM-203289)	F	GAGAATTTGTTCCTGCAGTGC	۶۰	۴۷۰
	R	GTTCCCAATTCCTTCCTTAGTG	۶۰	
h Nanog (NM-024865)	F	ACCTATGCCTGTGATTTGTGG	۵۹	۴۷۰
	R	AAGAGTAGAGGCTGGGGTAGG	۵۹	
h Sox2 (NM-003106)	F	ATGGGTTCGGTGGTCAAGTC	۶۰	۴۲۴
	R	GTGGATGGGATTGGTGTTCTC	۶۰	
h Nucleostemin (NM-206826)	F	CAGAGATCCTCTTGGTTGCAG	۶۰	۷۴۷
	R	AATGAGGCACCTGTCTCCTC	۶۰	
h GAPDH (NM-0020463)	F	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	۵۹	۲۲۴
	R	AGGGTCTCTCTCTTCCTCTTGTGCTC	۵۹	
Zfx (NM-003410)	F	TGATTCCAGGCAGTACCAAAC	۶۰/۳	۴۶۵
	R	TGACGAAAACCCTTACCACAC	۶۰/۲	
Bmi-1(NM-005180)	F	TACTCCAGTGCAGTCTCCTC	۶۰	۴۱۳

۱۰۰ ml/u و استرپتومایسین ۵۰ µg/ml استفاده شد. سلول‌ها در فلاسک‌های T25 ودر انکوباتور با دمای ۳۷ ºC و میزان ۵٪ CO_2 کشت داده شدند.

نمونه‌گیری از انسان:

نمونه‌های مورد نیاز این تحقیق از بیمارستان‌های امام خمینی تهران، توحید و بعثت سنندج با رضایت بیماران جمع‌آوری شدند. تعداد نمونه‌ها شامل ۱۰ نمونه تومور مثانه، ۵ نمونه تومور پروستات، ۵ نمونه تومور کولون و ۵ نمونه نرمال کولون بودند. نمونه‌های مورد نظر، تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و با توجه به علایم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی به دست آمدند. نمونه‌های بیوپسی در میکروتیوب استریل و عاری ازRNase و در تانک ازت قرار داده شده و تا مرحله استخراج RNA نگهداری شدند.

ارزیابی RT-PCR:

از RT-PCR جهت تایید بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد(جدول ۱). برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول استخراج(سیناژن، RNX Plus)، RNA کل (Total RNA) از سلول‌های سرطانی استخراج شد و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری، مراحل تهیه cDNA از آن به انجام رسید. بر روی RNA استخراج شده با استفاده از آغازگر(هگزامر راندوم) و کیت(بیونیر)، نسخه‌برداری معکوس انجام گرفت به طوری که واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر صورت گرفت. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد، جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو(محصول واکنش RT) از کیت (بیونیر) PCR ، آب مقطر استریل و آغازگرهای بالادست(Forward) و پایین دست (Reverse)، با مشخصات مورد اشاره در جدول یک استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، PCR با شرایط دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، آنیلینگ ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸ تا ۶۴ درجه سانتی‌گراد(بر اساس نوع آغازگر) و اکستنشن ۱دقیقه در دمای ۷۲ درجه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

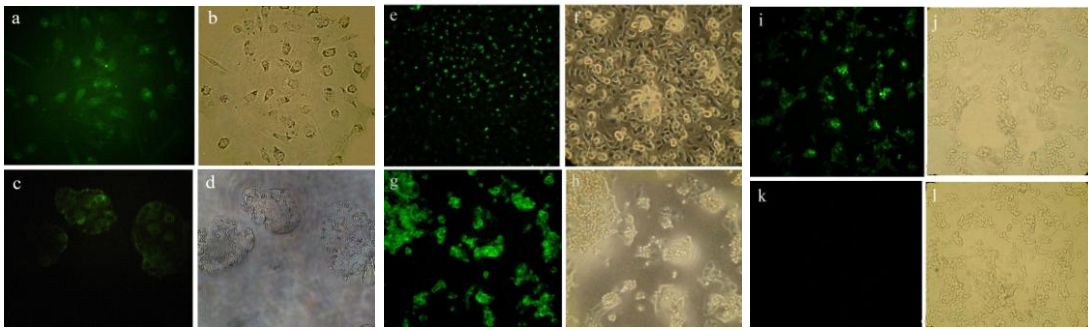
سانتی‌گراد انجام گرفت. تعداد ۳۵ سیکل و یک سیکل اکستنشن نهایی به مدت ۱۰دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT وPCR از دستگاه ترمال سایکلر(اپندورف) استفاده شد. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم‌افزارهای Gene runner وPrimer3 طراحی شدند. در هر مورد آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی:

برای بررسی بیان ژن‌های خود بازسازی Oct4 و Nucleostemin در سطح پروتئین از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. به این منظور سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد ثابت شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه مورد استفاده(Goat anti human ، سانتاکروز) NS وOct4 با غلظت ۱ به ۱۰۰ و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به سلول‌ها اعمال شدند. آنتی‌بادی ثانویه متصل به Texaz red (Donkey-anti Goat ، سانتاکرو)، آنتی‌بادی ثانویه متصل به FITC (Donkey-anti Goat ، سانتاکرو) جهت اتصال به آنتی‌بادی بر علیه Oct4 و Nucleostemin با غلظت ۱ به ۲۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به سلول‌ها اعمال شدند. برای اطمینان از صحت عملکرد آنتی‌بادی‌های به کار رفته، به ترتیب سلول‌های NT2 وU87MG به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. برای نمونه‌های کنترل منفی کلیه شرایط مثل نمونه‌های آزمون بود، با این تفاوت که آنتی‌بادی اولیه اضافه نگردید و نهایتاً سلول‌ها به کمک میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon TE-300) مطالعه و عکسبرداری شدند.

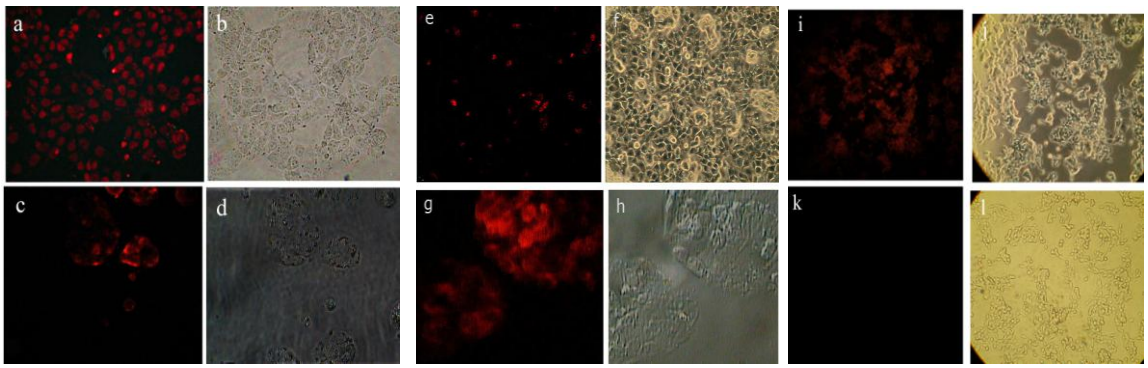
یافته‌ها

نتیجه واکنش ایمونوسیتوشیمی بر علیه نشانگر Oct4 و Nucleostemin به عنوان نشانگرهای شناخته شده سلول‌های بنیادی، مثبت بود. در این ارزیابی‌ها از آنجایی‌که نشانگر ثانویه مورد استفاده کونژوگه به FITC وTexaz Red بود بعد از اعمال نشانگرهای اولیه و ثانویه به نمونه‌ها، در نمونه‌های آزمایش با استفاده از فیلترهای FITC و Texaz Red به ترتیب سلول‌هایی با رنگ‌های سبز و قرمز که بیانگر واکنش مثبت آن‌ها به ارزیابی ایمونوسیتوشیمی بود، مشاهده شدند. در حالی که در نمونه کنترل منفی که از هر نظر شرایط انجام واکنش ایمونوسیتوشیمی بر روی آن‌ها مشابه کنترل مثبت بود و فقط از نشانگر اولیه در آن‌ها استفاده نشده بود، هیچ گونه رنگی که دال بر مثبت بودن نتیجه واکنش باشد مشاهده نشد(شکل‌های ۱ و ۲).

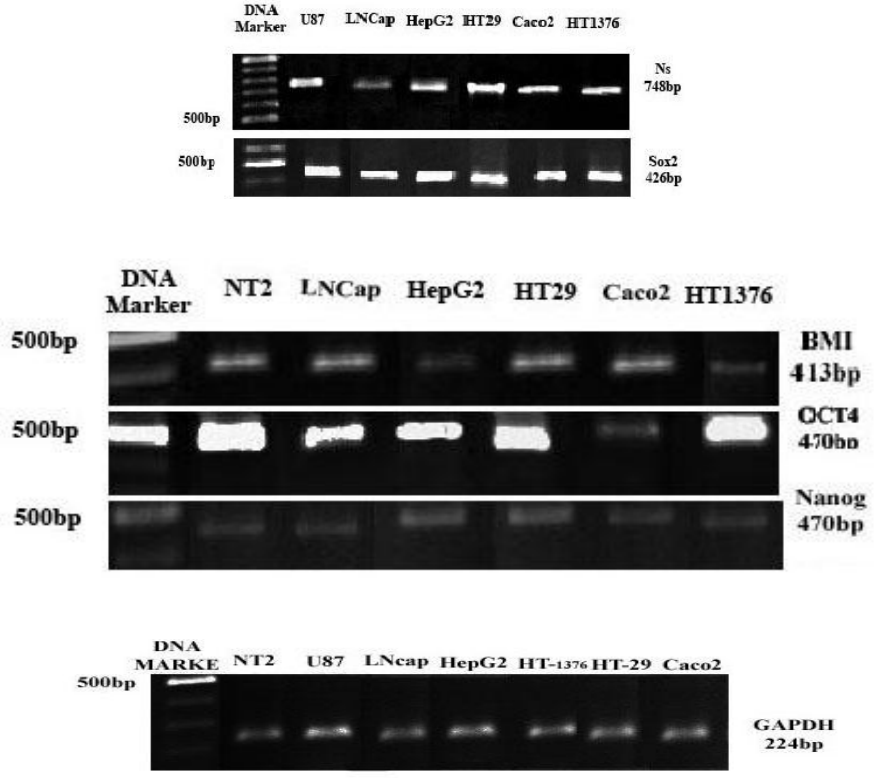


شکل ۱ : بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن Nucleostemin به ترتیب در سلول‌های a: U87 ، c : HT-29 ، e: HT1376 ، i: LNCaP ، g: HepG2 و K: Negative control شکل‌های b,d,f,h,j,l به ترتیب مربوط به تصاویر فاز کنتراست نمونه‌های k ، I ، g ، e ، c ، a می‌باشند. U87-MG به عنوان نمونه کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. در سلول U87 سیگنال هستکی بیشتر دیده می‌شود. اما در سایر نمونه‌ها بیان ژن نوکلئوستمین در سطح پروتئین هم به صورت هستکی و هم سیتوپلاسمی می‌باشد. در نمونه کنترل منفی که هیچ گونه سیگنالی مشاهده نشد، آنتی‌بادی اولیه مورد استفاده قرار نگرفت. بزرگ‌نمایی $X_{۴۰۰}$.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

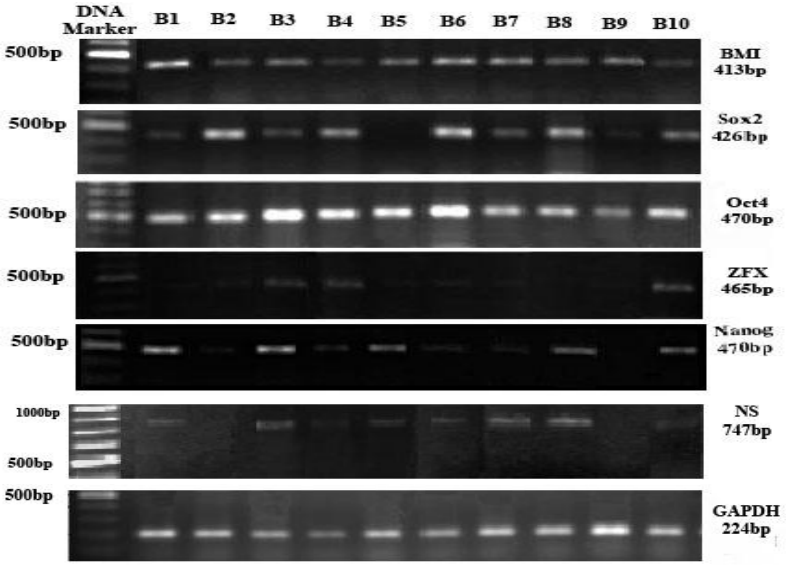


شکل ۲ : بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن Oct4 به ترتیب در سلول‌های a: NT2 ، c: HT-29 ، e: HT1376 ، i: LNCaP ، g: HepG2 و k: Negative control شکل‌های l ، j ، h ، f ، d و b به ترتیب مربوط به تصاویر فاز کنتراست نمونه‌های k ، I ، g ، e ، c و a می‌باشند. NT2 به عنوان نمونه کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. در سلول NT2 ، سیگنال هسته‌ای بیشتر دیده می‌شود. اما در سایر نمونه‌ها بیان ژن نOct4 در سطح پروتئین هم به صورت هسته‌ای وهم سیتوپلاسمی می‌باشد. در نمونه کنترل منفی که هیچ گونه سیگنالی مشاهده نشد، آنتی‌بادی اولیه مورد استفاده قرار نگرفت. بزرگ‌نمایی X۴۰۰ .

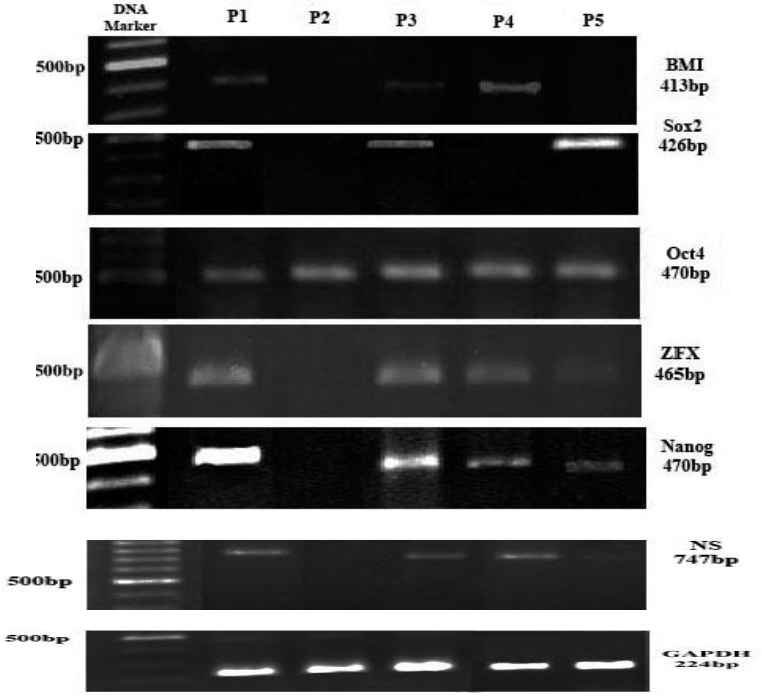


شکل ۳ : بیان ژن‌های خودبازسازی Oct4، Nanog، Nucleostemin، Zfx ، Bmi و Sox2 با استفاده از روش RT-PCR در رده‌های سلولی HT-29 و$CaCo_2$ آدنوکارسینومای کولورکتال، LNCaP کارسینومای پروستات، HepG2 کارسینومای کبد، HT-1376 کارسینومای مثانه. دودمان سلولی U87 به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Sox2، Nucleostemin وZfx و دودمان سلولی NT2 به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Oct4،Nanog و Bmi استفاده شدند، هم چنین ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بیان ژن‌های Oct4،Nanog، Nucleostemin، Zfx و Bmi در همه رده‌های سلولی مورد مطالعه مشاهده شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

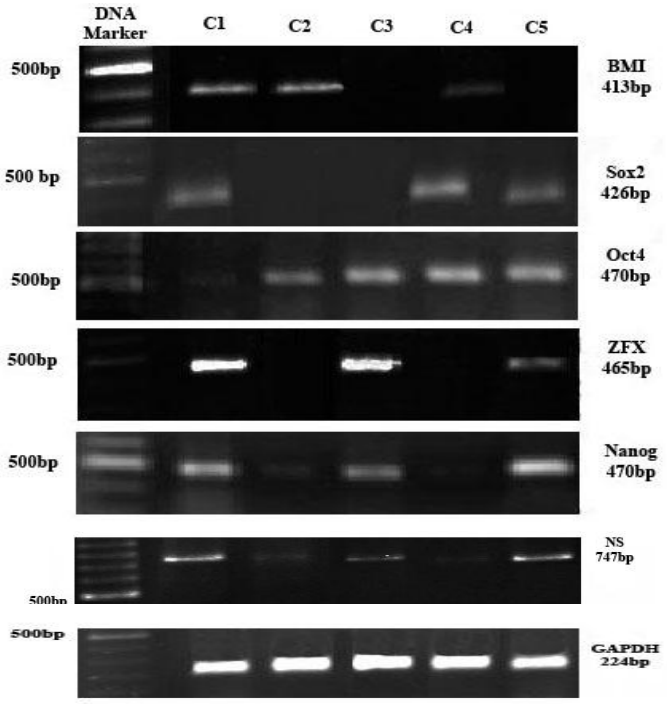


شکل ۴: بررسی بیان ژن‌های خودبازسازی Oct4، Nanog، Nucleostemin، Zfx ، Bmi و Sox2 با استفاده از روش RT-PCR در نمونه‌های توموری مثانه. GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در نمونه B5 بیان ژن Sox2 مشاهده نشد. هم چنین ژن Zfx در نمونه‌های B1، B2 ، B5 ، B6، B7، B8 و B9 به میزان جزئی بیان شد. نمونه B2 و B9 نیز بیان ژن Nanog و NS را نشان ندادند.

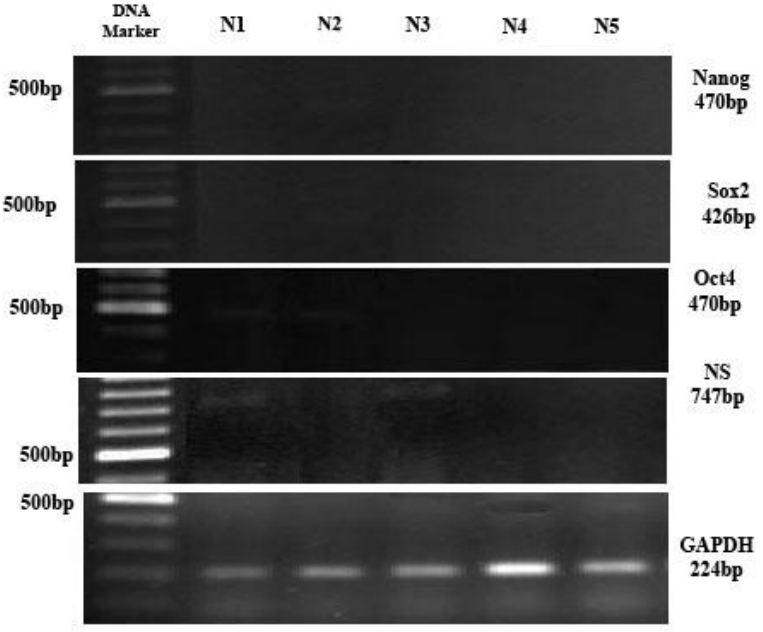


شکل ۵: بیان ژن‌های خود بازسازی Oct4، Nanog، Nucleostemin ، Zfx ، Bmi و Sox2 با استفاده از روش RT-PCR در نمونه‌های توموری پروستات. GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در نمونه توموری P2 فقط بیان ژن Oct4 و GAPDH مشاهده شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]



شکل ۶ : بیان ژن‌های خودبازسازی Oct4، Nanog ، Nucleostemin ، Zfx ، Bmi و Sox2 با استفاده از روش RT-PCR در نمونه‌های توموری کولون. GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در نمونه‌های C2 و C4 بیان ژن‌های Oct4، Bmi و GAPDH مشاهده شد اما ژن‌های Nanog و NS به میزان جزیی بیان شدند. در نمونه توموری C3 بیان ژن‌های Bmi و Sox2 مشاهده نشد.



شکل ۷ : بررسی بیان ژن Oct4 و Nucleostemin در نمونه‌های نرمال کولون، با استفاده از روش RT-PCR. در هیچ کدام از نمونه‌های نرمال کولون بیان ژن Nanog وSox2 مشاهده نشد. در نمونه‌های N1 و N3 بیان ژن Nucleostemin و در N1 وN2 بیان ژن Oct4 به میزان جزیی مشاهده شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

علاوه بر ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی در سلول‌های مورد مطالعه، به روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن‌های Nucleostemin، OCT4 ، Nanog ، Zfx ، Bmi و Sox2 در سلول‌های سرطانی HT-29 ، HT1376، LNCaP، HepG2 ، $CaCo_2$ و در نمونه‌های توموری مشاهده شد(شکل‌های ۷-۳) و اندازه باندهای مربوط به ژن‌های مورد مطالعه مطابق با الگوی آغازگر طراحی شده بود(جدول ۱).

بحث

نتایج این پژوهش به این دلیل که برای اولین بار بیان ژن‌های Nanog ، Nucleostemin ، Sox2 ، Zfx ، Bmi-1 و Oct4 را در رده‌های سلولی سرطان کولون $CaCo_2$ و HT-29 ، سرطان مثانه HT-1376 ، سرطان کبد HepG2 ، سرطان پروستات LNCaP و در نمونه‌های انسانی تومور کولون، مثانه و پروستات نشان داد، حایز اهمیت است. ژن‌هایی که در کنترل خودبازسازی سلول‌های بنیادی نقش دارند، به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده‌اند که بیان کنترل نشده آن‌ها، از اهمیت زیادی در فرآیند سرطانی شدن برخوردار است(۱۱، ۱۰، ۸). بیان ژن Oct4 در سرطان‌های سوماتیک در چند سال اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. دودمان‌های سلولی توموری پانکراس، کبد و پستان، همین طور دودمان‌های سلولی کلاسیک، نظیر Hela و Mcf7 ، همه بیان Oct4 را آشکار کردند(۱۲). در سال ۲۰۰۷ اطلسی و همکاران بیان ژن Oct4 را در نمونه‌های توموری و نرمال مثانه مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که میزان بیان Oct4 بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری دارد به طوری که بیشترین بیان در گروه توموری و کمترین میزان آن در گروه نرمال بود(۱۸). جین و همکاران در سال ۲۰۰۴ و ایزه و همکاران در سال ۲۰۰۵ قبلاً با مطالعه چند نمونه توموری و نرمال پستان توسط روش RT-PCR ، اختلاف بیان Oct4 را بین نمونه‌ها گزارش کرده بودند(۱۹، ۱۱). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، بیان ژن Oct4 را در رده‌های سلولی سرطانی $CaCo_2$ ، HT-29، LN-LNCaP ، HepG2 ، HT-1376 هم چنین در نمونه‌های توموری انسانی، نشان داد که با مطالعه‌های شوئن هالز در زمینه بیان این ژن در سلول‌های سرطانی مطابقت دارد و تمامی موارد بالا را تایید می‌کند(۱۲). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که Oct4 می‌تواند به عنوان مارکر اختصاصی توموری در بسیاری از سرطان‌ها مورد توجه قرار گیرد. Nanog مهار کننده نسخه‌برداری از ژن‌های فرودست GATA4 و GATA6 است که در تمایز سلولی نقش دارند. هم چنین ژن‌های لازم برای فعالیت خود تجدیدی مانند REX1 را فعال می‌کند(۹). بیان Nanog در تومورهای لایه زاینده انسان و کارسینوماهای جنینی نیز دیده می‌شود(۹، ۸). بیان سیتوپلاسمی Nanog در سرطان پستان نیز گزارش شده است(۹). اما تاکنون گزارش درخور توجهی از بیان آن در سلول‌های توموری نشان داده نشده است. با توجه به اثر ویژه این ژن درحفظ پرتوانی سلول‌ها و تنظیم ژن‌های درگیر در مسیر خود تجدیدی و مهار تمایز سلولی، از این ژن نیز به عنوان یک مارکر مولکولی جدید در تشخیص و پیش آگهی رفتار توموری استفاده می‌شود. در این تحقیق، بیان ژن Nanog در رده‌های سلولی سرطانی و نمونه‌های تومور مورد مطالعه، بررسی شد. نتایج این مرحله بیان ژن Nanog را برای اولین بار در آن‌ها نشان دادکه با نتایج حاصل از تحقیق ایزه و همکاران و کریستل و همکاران در مورد بیان این ژن در تومورهای انسانی مطابقت دارد (۱۰، ۹). یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که ژن‌های Oct4 به میزان بسیار کمی در نمونه‌های نرمال کولون نیز، بیان می‌شوند. در سال ۲۰۰۷ اطلسی و همکاران بیان ژن Oct4 را به میزان جزیی در بافت نرمال مثانه نشان دادند(۱۸). از طرف دیگر تای و همکاران نیز نشان دادند که بیان Oct4 منحصراً در بن یاخته‌های یک بافت دیده می‌شود و سایر سلول‌های بافتی این بیان را نشان نمی‌دهند(۲۰). در بسیاری از بافت‌ها از جمله بافت اپی‌تلیال کولون، ریه، پوست و مثانه، سلول‌های سطحی دچار تمایز و در نهایت مرگ سلولی شده و ریزش می‌کنند. در این بافت‌ها بن یاخته‌های بافتی (Tissue stem cells) با تقسیم شدن، علاوه بر حفظ خود [خودبازسازی(Self renewal)] مرتباً سلول‌های جدیدی را به وجود می‌آورند که وارد مسیرهای تمایزی شده، جایگزین سلول‌های سطحی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

می شوند، در این بافت‌ها میزان سلول‌های بنیادی بالغ بافتی، بیشتر از اندام‌هایی مانند کلیه و کبد است که تقسیمات سلولی اندکی دارند(۱۹). بنابراین به نظر می‌رسد که بیان ژن‌های Oct4 ، در بافت‌های نرمال کولون مربوط به بن یاخته‌های بافت کولون باشد. Sox2 در تنظیم نوروژنز در سیستم عصبی جنین در حال تکوین نقش کلیدی دارد و در تکثیر و حفظ سلول‌های بنیادی عصبی و مهار تمایز در این سلول‌ها مؤثر است(۲۱). افزایش بیان Sox2 در بیماران با کارسینومای تخمدان و سرطان ملانوما مشاهده شده است(۱۲). Sox2 در چندین نوع از بافت‌های توموری بیان می‌شود(۲۲). در سال ۲۰۰۹ شوئن هالز و همکاران بیان ژن Sox2 را در تعدادی از سرطان‌ها نشان دادند و ارتباط معنی‌داری بین درجه بدخیمی تومور و بیان Sox2 در سرطان‌های مثانه، مغز و کبد پیدا کردند(۱۲). نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیان ژن Sox2 رادر رده‌های سلول سرطانی و در نمونه‌های توموری مورد مطالعه در این پژوهش نشان داد که تحقیقات انجام شده توسط شوئن‌هالز وهمکاران و پورات و همکاران را، تایید می‌کند(۲۲، ۱۲). نوکلئوستمین یک پروتئین اتصالی به p_{53} است که یکی از جدیدترین اعضای خانواده پروتئین‌های اتصالی به GTP می‌باشد و به میزان بالا در سلول‌های بنیادی و بافت‌های غنی از سلول‌های بنیادی یافت می‌شود. نوکلئوستمین در تعدادی از دودمان‌های سلول سرطانی انسان بیان می‌شود. حذف NS ، تکثیر سلولی را در سلول‌های بنیادی و سرطانی متوقف می‌کند که نشان‌دهنده اهمیت عملکرد آن در حفظ پیشرفت چرخه سلولی در این سلول‌ها است. بنابراین از نوکلئوستمین به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی نام برده می‌شود(۲۴، ۲۳). جین لیو و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان ژن نوکلئوستمین را در دودمان‌های سلولی سرطان معده نشان دادند(۲۵). در سال ۲۰۰۸ لیوران لو و همکاران بیان ژن نوکلئوستمین را در دودمان‌های سلولی سرطان پروستات و در بافت‌های توموری پروستات، نشان دادند(۱۴). نتایج حاصل از تحقیق حاضر، بیان ژن نوکلئوستمین را در دودمان‌های سلولی و نمونه‌های توموری مورد مطالعه، نشان داد که با مطالعه‌های انجام گرفته توسط سایر محققین در مورد بیان این ژن در نمونه‌های توموری مختلف مطابقت دارد. نتایج حاصل از این تحقیق، بیان ژن نوکلئوستمین را در نمونه‌های بافتی نرمال کولون به میزان بسیار جزیی نشان داد. چن و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از روش RT-PCR ، بیان ژن نوکلئوستمین را به میزان جزیی در بافت‌های ماهیچه‌ای نرمال نشان دادند که این امر، به دلیل حضور تعدادی از سلول‌های میوبلاست با ویژگی سلول‌های بنیادی در بافت‌های ماهیچه‌ای است(۲۶). فان و همکاران نیز بیان ژن نوکلئوستمین را هم در بافت‌های نرمال و هم درتومورهای کلیوی نشان دادند(۲۳). به نظر می‌رسد که بیان جزیی ژن نوکلئوستمین در بافت‌های نرمال کولون به دلیل حضور سلول‌های بنیادی بافت کولون باشد که تحقیقات قبلی این مورد را تایید می‌کند. ژن Bmi از گروه پروتئین‌های Polycomb می‌باشد که در تکوین و تمایز سلولی، در کنترل رشد نرمال سلول و در تکثیر و خود بازسازی سلول‌های بنیادی جنینی نقش اساسی ایفا می‌کنند(۲۷). بئا و همکاران در سال ۲۰۰۱ Bmi-1 را به عنوان یک انکوژن سرطانی در چندین سرطان انسانی مانند لمفوما، سرطان کولورکتال، سرطان کبد و سرطان ریه نشان دادند(۲۸). نتایج حاصل از تحقیق ما نیز بیان ژن Bmi-1 را در رده‌ها و نمونه‌های توموری کولون، پروستات، مثانه و کبد نشان داد که با نتایج حاصل از تحقیقات بئا و همکاران مطابقت دارد. بیان Zfx برای خود بازسازی سلول‌های بنیادین جنینی و خون‌ساز لازم می‌باشد(۲۹). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر بیان این ژن را در رده‌های سلولی سرطانی و در نمونه‌های توموری مورد مطالعه نشان داد. در این پژوهش، توزیع پروتئین‌های نوکلئوستمین و Oct4 نیز، در رده‌های سلولی سرطانی کولون HT-29 ، سرطان کبد HepG2 ، سرطان مثانه HT1376 و سرطان پروستات LNCaP مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی بیان Oct4 در این سلول‌ها بررسی شد. در این سلول‌ها، توزیع پروتئین از نوع هسته‌ای و سیتوپلاسمی بود که با توزیع گزارش شده برای این نوع سلول مطابقت داشت اما بیان هسته‌ای بیشتر بود. بررسی الگوی بیان پروتئین Oct4 با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های سرطانی، توزیع سیتوپلاسمی و هسته‌ای، هر دو را نشان داد. اطلسی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

و همکاران در سال ۲۰۰۷ در سلول‌های سرطانی مثانه بیان سیتوپلاسمی پروتئین Oct4 را در نمونه‌های توموری مثانه نشان دادند(۱۸). بیان سیتوپلاسمی Nanog در سرطان پستان، قبلاً گزارش شده بود که این پروتئین نقشی بسیار شبیه به Oct4 داشته و از الگوی بیان مشابهی در سلول‌های مختلف برخوردار است(۹). بیان سیتوپلاسمی و هسته‌ای پروتئین Oct4 در رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه، برای اولین بار در این تحقیق نشان داده شد. در مرحله بعد توزیع پروتئین نوکلئوستمین در دودمان‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. توزیع پروتئین نوکلئوستمین از نوع هسته‌ای و هستکی می‌باشد که با توزیع گزارش شده برای این نوع سلول مطابقت داشت، چون این پروتئین به وسیله حالت اتصال یافته نوکلئوستمین به GTP بین هسته و هستک جابه‌جا می‌شود و لوکالیزاسیون هستکی بیشتر است(۳۰). بررسی بیان الگوی نوکلئوستمین در دودمان‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه، به وسیله روش ایمونوسیتوشیمی نشان داد که این پروتئین لوکالیزاسیون هستکی و سیتوپلاسمی دارد. این الگوی توزیع، اخیراً در سرطان‌های معده و کارسینومای سلول‌های کلیه هم مشاهده شده است(۲۵). لیوران لو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ بیان سیتوپلاسمی این پروتئین را در سلول‌های سرطانی پروستات نشان دادند. سلول‌های PC-3 از دودمان‌های سلولی سرطان پروستات، بیان سیتوپلاسمی و هستکی NS، هر دو را نشان دادند(۱۴). تسای و همکاران در سال ۲۰۰۲ قبلاً گزارش کرده بودند که سلول‌های بنیادی نرمال، بیان پروتئین نوکلئوستمین را منحصراً در هستک نشان می‌دهند(۳۰). اما یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که در سرطان معده و تومورهای کلیه، الگوی توزیع پروتئین نوکلئوستمین، هم سیتوپلاسمی و هم هستکی است(۳۱). بنابراین با توجه به گزارش‌های قبلی و نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سلول‌های بنیادی نرمال، بیان هستکی پروتئین نوکلئوستمین را نشان می‌دهند اما سلول‌های توموری علاوه بر بیان هستکی، بیان سیتوپلاسمی هم نشان می‌دهند. اخیراً یک پروتئین اتصالی نوکلئوستمین، به عنوان ایزوفرم α از پروتئین انسانی PPP2R5A شناسایی شده است. این پروتئین، زیر واحد β تنظیمی از خانواده فسفاتاز 2A است. فسفاتاز 2A نقش مهمی در کنترل رشد سلول، تقسیم سلول و آپوپتوزیس دارد و در سیتوپلاسم قرار گرفته است که ممکن است توزیع احتمالی برای لوکالیزاسیون سیتوپلاسمی NS باشد اما این که چرا چنین لوکالیزاسیونی رخ می‌دهد، نیاز به مطالعه‌های بیشتر دارد(۱۴).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیان ژن‌های خود تجدیدی Oct4، Nanog، Bmi، Zfx، Sox2 و Nucleostemin را برای اولین بار در رده‌های سلولی سرطان HT-29، HT1376، LNCaP و HepG2 و در نمونه‌های توموری کولون، مثانه و پروستات نشان داد که این امر تاییدی بر نظریه cancer stem cell می‌باشد. با مطالعه‌های بیشتر روی عملکرد این ژن‌ها با استفاده از روش‌های پیشرفته مولکولی مانند مهار این ژن‌ها در سلول‌های سرطانی به کمک siRNA و بررسی اثر آن در کنترل تکثیر سلولی، در آینده نتایج مهم‌تر و قابل اعتمادتری به دست خواهد آمد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با مساعدت‌های مالی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شده که بدین‌وسیله از این دانشگاه و نیز از بیمارانی که در جمع‌آوری نمونه همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

References :

1- Clarke MF, Fuller M. Stem cell and cancer: two faces of eve. Cell 2006; 124(6): 1111-5.
2- Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Sasaki A. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. Hum cell 2006; 19(1): 24-9.
3- Al-Hajj M, Clarke MF. Self –renewal and solid tumor stem cells. Oncogene 2004; 23(43): 7274-82.
4- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, *et al*. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature 2007; 445(7123): 111-5.
5- Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, *et al*. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. Cancer cell 2008; 13(2): 153-66.
6- Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer Stem Cells: an old idea—a paradigm shift. Cancer Res 2006; 66(4): 1883-90.
7- Avery S, Inniss K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 2006; 15(5): 729-40.
8- Rodda DJ, Chew JI, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, *et al*. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J Biol Chem 2005; 280(26): 24731-7.
9- Frebreg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic Reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. Mol Biol Cell 2007 ; 18(5): 1543-53.
10- Ezeh UI , Turek PJ , Reijo RA , Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. Cancer 2005 ; 104(10): 2255-65.
11- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, *et al*. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet 2008; 40(5): 499-507.
12- Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. Biochem Biophys Res Commun 2009; 383(2): 157-6.
13- Meng L, zhu Q, Tsai RY. Nucleolar trafficking of Nucleostemin family proteins:Common versus protein-specific mechanisms. Mol Cell Biol 2007; 27(24): 8670-82.
14- Liu RL, Zhang ZH, Zhao WM, Wang M, Qi SY, Li J, *et al*. Expression of nucleostemin in prostat cancer and its effect on the proliferation of PC-3 cells. Chin Med J 2008. 121(4): 299-304.
15- Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, *et al*. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer,liver cancer and other malignancies. World J Gastroentrol 2004; 10(9): 1246-9.
16- Galan-Caridad JM, Harel S, Arenzana TL, Hou ZE, Doetsch FK, Mirny LA, *et al*. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. Cell 2007; 129(2): 345–57.
17- Qin ZK, Yang JA, Ye YL, Zhang X, Xu LH, Zhou FJ, *et al*. Expression of Bmi-1 is a prognostic marker in bladder cancer. BMC Cancer 2009; 9: 61.
18- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT4, an embryonic stem cell marker,is highly expressed in bladder cancer. Int J Cancer 2007; 120(7): 1598-602.
19- Terskikh AV, Easterday MC, Li L, Hood L, Kornblum HI, Geschwind DH, *et al*. From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(14): 7934–9.
20- Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis 2005; 26(2): 495–502.
21- Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, *et al*. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. Development 2004; 131(15): 3805-19.
22- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, *et al.* An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet 2008; 40(5): 499-507
23- Fan Y, Liu Z, Zhao S, Lou F, Nilsson S, Ekmam P, *et al*. Nucleostemin mRNA expressed in both normal and malignant renal tissues. Br J Cancer 2006; 94(11): 1658-62.
24- Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. Stem cells 2006; 24(4): 1113-20.
25- Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, *et al*. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer,liver cancer and other malignancies. World J Gastroenterol 2004; 10(9): 1246-9.
26- Chen JC, Goldhamer DJ. Skeletal muscle stem cells. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1: 101.
27- Molofsky AV, Pardal R., Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. Curr Opin Cell Biol 2004; 16(6): 700–7.
28- Bea´ S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernandez S, *et al*. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. Cancer Res 2001; 61(6): 2409–12.
29- Galan-Caridad JM, Harel S, Arenzana TL, Hou ZE, Doetsch FK, Mirny LA, *et al*. Zfx Controls the Self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. Cell 2007; 129(2): 345–57.
30- Tsai RY, Mckay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. Genes Dev 2002; 16(23): 2991-3003.
31- Yang HX, Jin GL, Meng L, Zhang JZ, Liu WB, Shou CC. Screening and identification of proteins interacting with nucleostemin. World J Gastroentrol 2005; 11(31): 4812-4.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]

Original Article

Evaluation of the expression of self renewal genes (Oct-4, Nanog, Sox2, Nucleostemin, Bmi and Zfx) in bladder, colon and prostate cancers and in cancer cell lines (LNCaP, HepG2, HT-29, $CaCo_2$, HT-1376)

Amini S.[1], Fathi F.[2,3], Parivar K.[4], Nikkho B.[3], Sofimajidpour H.[3], Mobaleghi J.[3], Davari B.[3]

[1] *Sanandaj Islamic Azad university, Sanandaj , Iran*

[2]*Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences ,Sanandaj, Iran*

[3]*Kurdistan University of Medical Sciences ,Sanandaj, Iran*

[4]*Tehran Islamic Azad university, Tehran , Iran*

Abstract

Background and Objectives

Uncontrolled self renewal plays a direct function in different types of carcinoma progression. Here we examined the expression of self renewal regulatory factors such as Oct4, Nanog, Sox2, Nucleostemin, Zfx, Bmi-1 in colon, prostate, bladder and liver cancers in human samples and cancer cell lines.

Materials and Methods

We used RT-PCR to examine the expression of these genes in 10 tumors of bladder, 5 tumors of prostate, 5 tumors of colon , 5 normal tissues of colon, and cancer cell lines. The expression of Oct-4 and Nucleostemin at protein level was further determined by immunocytochemical (ICC) analysis in cancer cell lines.

Results

We designed specific primers to amplify a segment of Oct4, Nanog, Sox2, Nucleostemin, Bmi and Zfx. As expected DNA fragment of these genes based on designated primer was amplified in the PCR reaction. We detected the expression of these genes in almost all of the examined tumor samples and cancer cell lines that we used. Oct4 and Nucleostemin proteins were expressed in both nuclear and cytoplasmic in cancer cell lines. No immunoreactivity was observed in negative controls, which were incubated in the absence of primary antibody.

Conclusions

Collectively, our results indicated that in a tumor population a rare subpopulation of cells within the tumor cell mass has the potential of self renewal, and suggested that their expression can be used as potential tumor markers in diagnosis and/or prognosis of tumors. These results confirm the potential value of the cancer stem-cell theory in cancer therapy.

Key words: Sox2 protein، human, , NANOG protein، human, Zfx protein، human, Colonic Neoplasms, Prostatic Neoplasms, Urinary Bladder Neoplasms

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2011; 8(3): 174-185

Received: 15 Nov 2010
Accepted:16 Apr 2011

Correspondence: Fathi F., PhD of Anatomy. Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences.
P.O.Box: 66177-13446, Sanandaj, Iran. Tel: (+98871) 6661830; Fax : (+98871) 6660051
E-mail: *farfath@gmail.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-11]