



بررسی بیان ژن‌های PIN1، β -catenin و cyclin D1 در بافت توموری افراد مبتلا به سرطان کولورکتال

فاطمه باباجانی^۱، حسین ستایش‌نیا^۱، محمدی^۱، هادی مظفری^۱، سهیلا اسدی^{۱*}

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۲- مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۰۶

چکیده

مقدمه: در مطالعه حاضر بیان ژن β -catenin، PIN1 و cyclin D1 در بافت تومور و بافت حاشیه تومور و همچنین رابطه بیان ژن β -catenin و PIN1 و cyclin D1 با یکدیگر و با ویژگی‌های بافت‌شناسی بافت‌های توموری در بیماران مبتلا به CRC مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: از ۳۱ بیمار مبتلا CRC، ۳۱ نمونه کولورکتال تازه منجمد به‌عنوان مورد و ۳۱ بافت غیرسرطانی حاشیه تومور به‌عنوان کنترل، بر اساس معیارهای ورود و خروج از بانک تومور ایران/دانشگاه علوم پزشکی تهران، انتخاب شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، از تکنیک Real Time PCR برای ارزیابی بیان ژن‌های PIN1، β -catenin و cyclin D1 استفاده شد. مطالعات هیستوپاتولوژیک نیز توسط پاتولوژیست انجام شد. همچنین ارتباط بیان ژن‌ها با یکدیگر و با ویژگی‌های پاتولوژیکی نیز بررسی شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که ۸۰/۶ درصد از بیماران بالای ۵۰ سال سن داشتند، همگی بیماران بدون سابقه مصرف الکل و ۷۱ درصد از بیماران غیرسیگاری و ۵۸/۱ درصد بدون سابقه خانوادگی CRC بودند. در ۸۳/۹ درصد موارد تومور بیش از ۳ سانتی‌متر و نوع آدنوکارسینوم با درجه تمایز ۲ بود. ۹۶/۸ درصد موارد دارای تهاجم عروقی و ۹۳/۵ درصد موارد دارای تهاجم لنفاوی بودند. همچنین نتایج نشان داد که بیان ژن‌های PIN1 و β -catenin در بافت تومور نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش معنی‌داری (به ترتیب $P=0/043$ و $P<0/001$) داشت. علاوه بر این بیان ژن cyclin D1 در بافت تومور نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش نشان داد، هرچند که این افزایش از نظر آماری معنادار نبود. از سوی دیگر نشان داده شد که بین بیان ژن PIN1 و cyclin D1 یک رابطه مستقیم و معنادار وجود داشت ($P<0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ممکن است PIN1 در بیان ژن‌های β -catenin و cyclin D1 در بافت توموری بیماران مبتلا به CRC نقش داشته باشد و در نتیجه پیشنهاد می‌شود که این ژن در پاتوژنز CRC نقش مهمی را داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال، PIN1، β -catenin، Cyclin D1.

*نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، تلفن: ۰۹۱۸۶۱۷۳۷۵۳، نمابر: ۰۲۳-۳۲۳۴۸۰۰، Email: sohila.asadi75@yahoo.com

ارجاع: باباجانی فاطمه، ستایش‌نیا حسین، محمدی حسین، مظفری هادی، اسدی سهیلا. بررسی بیان ژن‌های PIN1، β -catenin و cyclin D1 در بافت توموری افراد مبتلا به سرطان کولورکتال. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛ ۲۰(۳): ۳-۹.



مقدمه

سرطان کولورکتال (CRC) یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین انواع سرطان‌ها در سطح جهانی است که به‌عنوان سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان شناخته می‌شود و سالانه بیش از ۱/۸۵ میلیون مورد جدید و ۸۵۰،۰۰۰ مورد فوتی را به خود اختصاص می‌دهد (۱ و ۲). این نوع سرطان به‌طور عمده بر روده بزرگ و راست روده تأثیر می‌گذارد و با عوامل متعددی از جمله رژیم غذایی، ژنتیک و سبک زندگی مرتبط است (۳). با وجود پیشرفت‌ها در درمان CRC، چالش‌هایی نظیر مقاومت دارویی و عود بیماری همچنان وجود دارد. دسترسی به تشخیص زودهنگام و درمان مؤثر در کشورهای در حال توسعه محدود است، که این موضوع نیازمند توجه بیشتری است (۲). بنابراین ژن‌ها و پروتئین‌های مسیرهای انتقال پیام در این سرطان، می‌تواند نقش مهمی در تشخیص زودهنگام این بیماری داشته باشد، به‌طور خاص نقش ژن PIN1 (Peptidyl-prolyl isomerase NIMA-interacting 1) به‌عنوان یک موضوع

تحقیقاتی مهم در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است.

در زمینه CRC، تحقیقات نشان داده‌اند که Pin1 در تومورزایی، پیشرفت بیماری و پاسخ به درمان‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند (۴). ژن Pin1 به‌عنوان یک ایزومراز پروتئینی در تنظیم فرآیندهای سلولی و مسیرهای انتقال پیام نقش دارد (۵). این پروتئین با پروتئین‌های کلیدی مانند β -catenin تعامل دارد. این تعامل می‌تواند منجر به تغییر در فعالیت این پروتئین‌ها و در نتیجه تنظیم چرخه سلولی و آپوپتوز شود (۶)، همچنین تغییرات ساختاری در پروتئین‌های هدف خود ایجاد می‌کند که می‌تواند بر روی چرخه سلولی و فرآیندهای آپوپتوز تأثیر بگذارد. Pin1 می‌تواند با مهار تعامل بین APC (Adenomatous Polyposis Coli) و β -catenin موجب افزایش فعالیت β -catenin شود که به نوبه خود می‌تواند منجر به پیشرفت تومور گردد (۷ و ۸).

β -catenin پروتئینی است که در تنظیم رشد و تمایز سلول‌ها و همچنین در مسیر انتقال پیام Wnt نقش دارد. علاوه بر این جهش در ژن APC منجر به تجمع β -catenin و فعال‌سازی غیرطبیعی مسیر Wnt می‌شود. این تغییرات به‌طور مستقیم با شروع و پیشرفت CRC مرتبط هستند و افزایش سطح β -catenin می‌تواند منجر به تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی و جلوگیری از آپوپتوز شود (۹). یکی از پروتئین‌های کلیدی که در تنظیم چرخه سلولی نقش مهمی را در تومورزایی و پیشرفت CRC ایفا می‌کند و β -catenin نقش مهمی را در بیان این ژن دارد، cycD1 است.

cycD1 با کینازهای وابسته به سیکلین (CDK4 و CDK6) تعامل دارد و به تنظیم انتقال از فاز G1 به S کمک می‌کند. افزایش بیان این پروتئین می‌تواند منجر به تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌ها و تومورزایی شود (۱۰). cycD1 به‌عنوان یک پروتئین کلیدی در تنظیم چرخه سلولی، نقش

مهمی در CRC ایفا می‌کند. این پروتئین با β -catenin که یک پروتئین کلیدی در مسیر Wnt است، تعامل دارد. این تعامل می‌تواند منجر به فعال‌سازی غیرطبیعی این مسیر و تسریع در تومورزایی شود و همچنین می‌تواند بر فعالیت p53 تأثیر بگذارد، که یک پروتئین مهم در کنترل چرخه سلولی و آپوپتوز است (۱۱).

با توجه به شیوع CRC و اهمیت فاکتورهای ژنتیکی در این بیماری، بررسی دقیق عوامل ژنتیکی در بیماری سرطان کولورکتال می‌تواند به فهم عوامل مؤثر، شناخت مکانیسم‌های مولکولی بیماری، توسعه درمان‌های نوین و شناسایی نشانگرهای زیستی جهت تشخیص زودهنگام مؤثر باشد. در همین راستا، مطالعه حاضر به بررسی سطح بیان ژن‌های Pin1، β -catenin و cycD1 و ارتباط آن‌ها با یکدیگر و ویژگی‌های بافت‌شناسی تومور پرداخته است. این شناخت دقیق می‌تواند به بهبود قابل توجه مدیریت بالینی بیماران مبتلا به CRC کمک کند.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (IR.KUMS.REC.1400.212) تأیید شد. این مطالعه موردی-شاهدی، بر روی ۳۱ بیمار مبتلا به CRC انجام شد. ۳۱ نمونه بافت توموری CRC تازه منجمد به‌عنوان گروه بیمار و ۳۱ بافت مجاور تومور به‌عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این نمونه‌ها بر اساس معیارهای ورود و خروج از بانک تومور ایران/دانشگاه علوم پزشکی تهران، انتخاب شدند و با در نظر گرفتن استانداردهای اخلاقی و رضایت شخصی شرکت‌کنندگان، حجم نمونه بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$n = \frac{((z_{(1-\alpha/2)} + z_{(1-\beta)})^2 (\sigma_1^2 + \sigma_2^2))}{((\mu_1 - \mu_2))^2} = \frac{((1.96 + 1.84))^2 ((0.48)^2 + (3.64)^2)}{(0.69 - 3.64)^2} = 23$$

معیارهای ورود به مطالعه شامل بیماران مبتلا به CRC که از طریق بررسی هیستوپاتولوژیک توسط پزشک متخصص بیماری آنها تأیید شده بود. از طرفی معیارهای خروج از مطالعه شامل بیماران با سابقه دیابت نوع ۲، افراد مبتلا به بیماری قلبی عروقی و بیماری التهابی روده (IBD) بودند. علاوه بر این بیمارانی که شیمی درمانی و همچنین داروهای ضدالتهابی مصرف کرده بودند یا رادیوتراپی دریافت کرده بودند و بیماران مبتلا به CRC متاستاتیک به‌دلیل سایر سرطان‌ها از مطالعه حذف شدند (شیمی درمانی، رادیوتراپی یا بیماری‌های التهابی به‌عنوان متغیر مخدوشگر ممکن است بر بیان ژن‌های مورد مطالعه تأثیر داشته باشند که در این صورت نتیجه‌گیری دال بر اینکه تغییر در بیان این ژن‌ها می‌تواند در پاتوژنز CRC مؤثر باشد را تحت تأثیر قرار دهد). همچنین نوع تومور و نمرات بافت‌شناسی بر اساس سیستم طبقه‌بندی UICC-TNM طبقه‌بندی شدند (۱۲). علاوه بر این، بافت‌های حاشیه تومور نیز با بررسی هیستوپاتولوژیک ارزیابی و به‌عنوان بافت‌های غیرسرطانی گزارش شدند.

خانوادگی ابتلا به CRC وجود داشت در حالی که ۵۸/۱ درصد از بیماران بدون سابقه خانوادگی ابتلا به CRC بودند.

اطلاعات پاتولوژیک بیماران شامل اندازه تومور، بافت‌شناسی، درجه‌بندی تومور، تهاجم عروقی و لنفاوی، مرحله‌بندی تومور (تومور اولیه، درگیری غدد لنفاوی و متاستاز) و مرحله TNM در جدول ۳ ارائه شده است. یافته‌های طرح حاضر نشان داد که اندازه تومور در ۱۶/۱ درصد از بیماران کمتر از ۳ سانتی‌متر و اندازه تومور ۸۳/۹۵ درصد از بیماران بالاتر از ۳ سانتی‌متر بود (جدول ۳). همچنین مشاهده گردید که ۸۰/۶ درصد از تومورها از نوع آدنوکارسینوم بودند در حالی که ۱۶/۱ درصد از آنها از نوع آدنوکارسینوم موسینوز (کلوئید) بودند. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، درجه تومور در ۸۰/۷ درصد از تومورها I و II بود. در حالی که ۱۶/۲ درصد از آنها درجه III و IV بودند.

بیان ژن Pin1 در بافت تومور بیماران مبتلا به CRC در مقایسه با بافت‌های غیرسرطانی حاشیه تومور شرکت‌کنندگان به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ($P=0/043$) و بیان این ژن در بافت توموری نسبت به بافت حاشیه تومور یک افزایش ۴/۷ برابری را نشان داد (شکل B۱). علاوه بر این، یافته‌های تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که بیان ژن β -catenin در بافت‌های تومور شرکت‌کنندگان نسبت به بافت‌های حاشیه تومور همسان افزایش معنی‌داری داشت و بیان این ژن در بافت تومور یک افزایش ۸/۵ برابری را نسبت به بافت حاشیه تومور نشان داد ($P<0/0001$). (شکل C۱). همچنین بیان ژن cdcD1 در بافت تومور نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش نشان داد (یک افزایش ۳/۳۳ برابری) هرچند که این افزایش از نظر آماری معنادار نبود ($P=0/1$) (شکل A۱).

ارتباط بین بیان ژن PIN1 با بیان ژن cdcD1 و β -catenin توسط Correlation analysis مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که یک ارتباط مستقیم و معنادار بین میزان بیان ژن Pin1 و cdcD1 وجود دارد ($R=0/763$ و $P<0/001$). از طرف دیگر آنالیزها نشان داد که هیچگونه ارتباط معناداری بین میزان بیان ژن Pin1 و β -catenin وجود ندارد ($R=-0/006$ و $P=0/997$).

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، اندازه تومور ($P=0/320$)، درجه بافت‌شناسی ($P=0/143$)، مرحله‌بندی TNM ($P=0/999$)، تهاجم عروقی ($P=0/999$) و تهاجم لنفاوی ($P=0/999$)، ارتباط معنی‌داری با بیان ژن Pin1 نداشت. جدول ۵ ارتباط بیان ژن β -catenin را با ویژگی‌های پاتولوژیک بالینی بیماران نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، اندازه تومور ($P=0/596$)، درجه بافت‌شناسی ($P=0/565$)، مرحله‌بندی TNM ($P=0/201$)، تهاجم عروقی ($P=0/226$) و تهاجم لنفاوی ($P=0/233$) ارتباط معنی‌داری نداشتند. جدول ۶ ارتباط بیان ژن cdcD1 را با ویژگی‌های پاتولوژیک بالینی بیماران نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۶ نشان داده شده است، اندازه تومور ($P=0/634$)،

به‌منظور بررسی بیان ژن، در ابتدا با استفاده از محلول RNX-Plus (سیناکلون، ایران، شناسه محصول RNA(EX6101) توتال استخراج شد و سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز مربوطه و طبق دستورالعمل سازنده (کیت یکتا تجهیز، ایران، شناسه محصول YT4500) ساخته شد. بررسی ویژگی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene runner بر اساس توالی ژن مورد بررسی قرار گرفت و از شرکت آراین ژن (تهران، ایران) سفارش داده شد و سپس qRT-PCR با استفاده از کیت RealQ Plus 2 x Master Mix Green (Amplicon)، دانمارک، شناسه محصول A325402 انجام شد. qRT-PCR با استفاده از دستگاه Roche Light Cyclor 96 System (Roche، آلمان) تحت شرایط بهینه ایجاد شده در ۴۰ سیکل در دمای T_m و پرایمرهای مورد استفاده که در جدول ۱ به آن اشاره شده است و همچنین رنگ SYBR Green، انجام شد. در پروسه qRT-PCR در نهایت یک منحنی ذوب دیده شد و سپس با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز طول قطعات تکثیر شده در واکنش qRT-PCR تأیید شد. در نهایت جهت اطمینان از عدم الودگی با DNA از DNase نیز استفاده گردید. مقادیر آستانه چرخه (CT) ابتدا با استفاده از بسته نرم‌افزاری REST پردازش شدند. تجزیه و تحلیل‌های آماری بعدی با استفاده از GraphPad Prism نسخه ۸ برای تعیین تفاوت‌های معنی‌دار انجام شد. بیان ژن نسبی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ ، β -actin به‌عنوان ژن کنترل ارزیابی شد (جدول ۱).

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و نرم‌افزار GraphPad استفاده شد. برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد و برای مقایسه نتایج از آزمون t Student استفاده شد و $P>0/05$ سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. همبستگی بین متغیرها با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون تعیین شد و همچنین به‌منظور ارزیابی ارتباط بین ژن‌های Pin1 و β -catenin و cdcD1 با ویژگی‌های آسیب‌شناسی بالینی بیماران، از آزمون مربع کای استفاده شد.

نتایج

اطلاعات دموگرافیک بیماران مطالعه حاضر که بر روی ۳۱ بیمار مبتلا به CRC انجام شد شامل سن، سابقه مصرف الکل و سیگار و سابقه خانوادگی بیماری بود که در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است ۵۴/۸۳ درصد از بیماران مذکر بودند در حالی که ۴۵/۱۶ درصد بیماران مؤنث بودند. بر طبق یافته‌های حاصل، ۸۰/۶ درصد بیماران بالای ۵۰ سال سن داشتند. علاوه بر این، همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، هیچ‌کدام از بیماران در طرح حاضر سابقه مصرف الکل را نداشتند و ۷۱ درصد آنها غیرسیگاری بودند. در نهایت، نتایج نشان داد که در ۴۱/۹ درصد از شرکت‌کنندگان سابقه

درجه بافت‌شناسی ($P=0/300$)، مرحله‌بندی TNM ($P=0/99$)، تهاجم عروقی ($P=0/99$) و تهاجم لنفاوی ($P=0/99$)، ارتباط معنی‌داری نداشتند.

بحث

در مطالعه حاضر بیان ژن‌های Pin1 و β -catenin و cycD1 در بافت توموری و بافت حاشیه توموری غیرسرطانی بیماران مبتلا به CRC مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که اکثریت بیماران دارای سن بالای ۵۰ سال، بدون سابقه مصرف الکل، غیر سیگاری و بدون سابقه خانوادگی CRC بودند. از سوی دیگر در این مطالعه به بررسی ویژگی‌های کلینیکیوپاتولوژیکال (آسیب‌شناسی) بیماران نیز پرداخته شد که از این جهت بخش عمده‌ای از نمونه‌ها از نظر درجه بافت‌شناسی، گرید ۱ و ۲ بودند، اندازه تومور بیش از ۳ سانتی‌متر و همچنین نوع تومور آدنوکارسینوما بود و همچنین در اکثر نمونه‌ها تهاجم عروقی و همچنین تهاجم لنفاوی مشاهده شد. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان ژن Pin1 و β -catenin در بافت تومور بیماران مبتلا به CRC نسبت به بافت حاشیه تومور به‌صورت معناداری افزایش یافته است هرچند که بیان ژن cycD1 اگرچه در بافت توموری در مقایسه با بافت حاشیه تومور غیرسرطانی افزایش داشت اما از نظر آماری معنادار نبود. از طرف دیگر یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که یک ارتباط مثبت و معنادار میان سطوح بیان ژن Pin1 و cycD1 وجود داشت و در نهایت در مطالعه حاضر ارتباط بیان ژن‌های Pin1 و β -catenin و cycD1 با یکدیگر و با ویژگی‌های تومور مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشخص شد که میان بیان ژن‌های مذکور با ویژگی‌های تومور ارتباطی وجود نداشت.

ژن Pin1 با اثرگذاری بر مسیرهای مولکولی و ژن‌های دیگر، می‌تواند در ایجاد پیامدهای نامطلوب بیماری نقش داشته باشد. در همین راستا، پژوهشی توسط جونیچی و همکاران با هدف تعیین اینکه آیا PIN1 نقشی در تومورزایی کولورکتال از طریق تنظیم مثبت β -catenin و cycD1 ایفا می‌کند یا خیر، انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های ایمونوهیستوشیمی بر روی ۱۰۵ نمونه بافت CRC با استفاده از آنتی‌بادی‌های آنتی Pin1، آنتی- β -catenin و آنتی cycD1 انجام شد و همچنین روابط بین بیان PIN1 و عوامل بالینی آسیب‌شناسی، پیش‌آگهی، و بیان β -catenin / cycD1 بررسی شد. در نهایت همسو با نتایج حاصل از مطالعه ما، بیان Pin1 در ۴۰ نمونه افزایش داشت و علاوه بر آن بیان این ژن با نوع بافت‌شناسی، عمق تهاجم و مرحله‌بندی تومورهای کولورکتال همبستگی مثبت داشت و همچنین یافته دیگر در این مطالعه این بود که افزایش بیان Pin1 نیز با بیان بیش از حد هر دو β -catenin و cycD1 در ارتباط بود (۱۳). هم‌راستا با این مطالعه، یافته‌های مطالعه ما نشان داد که بیان ژن Pin1 در بافت توموری افراد مبتلا به CRC نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش معناداری را داشت اما هیچ‌گونه ارتباط معناداری بین بیان این ژن و ویژگی‌هایی چون سایز، درجه، تهاجم عروقی و لنفاوی و نوع تومور مشاهده نشد.

علاوه بر این به این جهت که PIN1 به‌عنوان یک ایزومراز پروتئینی عمل می‌کند و نقش مهمی در تنظیم فرایندهای سلولی مانند تقسیم سلولی، آپوپتوز و متاستاز ایفا می‌کند و همچنین افزایش بیان Pin1 و β -catenin می‌تواند باعث افزایش تکثیر سلولی، بقا و مهاجرت سلول‌های سرطانی شود و از طرفی در CRC با پیشرفت تومور، متاستاز و مقاومت به درمان مرتبط است در پژوهش دیگری که توسط چانگ و همکاران انجام شد، اهمیت بالینی بیان Pin1 و β -catenin در سرطان‌های روده بزرگ و همچنین وجود ارتباط میان Pin1 و β -catenin بررسی شد. این مطالعه روی ۱۲۴ بیمار مبتلا به CRC که تحت عمل جراحی قرار گرفتند انجام شد و نقش پروتئین Pin1 و β -catenin در تومورزایی کولورکتال و همچنین اهمیت بالینی پاتولوژیک آنها توسط ایمونوهیستوشیمی و ارتباط بین بیان پروتئین Pin1 و β -catenin نیز مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت هم راستا با مطالعه ما، پروتئین‌های Pin1 و β -catenin در بافت توموری بیماران مبتلا به CRC افزایش داشت. در صورتی‌که بیان بیش از حد هر دو پروتئین با متاستاز غدد لنفاوی، مرحله تومور و دوره بقا ارتباطی نداشت (۷). در مطالعه حاضر، نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیان Pin1 و β -catenin در بافت تومور بیماران به‌صورت بارزی نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش داشت و همین‌طور یک ارتباط مثبت و معنادار بین میزان بیان ژن Pin1 و β -catenin وجود داشت.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ توسط چانگ و همکاران انجام گرفت یک ارتباط معنی‌دار بین بیان پروتئین‌های Pin1 و β -catenin دیده شد. بنابراین بیان بیش از حد Pin1 و β -catenin ممکن است ارتباط نزدیکی با ایجاد و/یا پیشرفت کارسینوم کولورکتال داشته باشند و نشان‌دهنده این است که بیان بیش از حد Pin1 ممکن است به تنظیم مثبت β -catenin کمک کند. بنابراین می‌توان گفت افزایش بیان پروتئین Pin1 در سرطان کولورکتال می‌تواند به‌عنوان یک عامل کلیدی در بروز و پیشرفت این بیماری عمل کند (۱۴).

در نهایت نیز با توجه به نقش مهمی که Pin1 در تبدیل سلول‌های طبیعی به سلول‌های سرطانی و پیشرفت تومور در CRC ایفا می‌کند که شامل افزایش تکثیر، مهار آپوپتوز، افزایش مهاجرت و تهاجم، تحریک رگ‌زایی و افزایش مقاومت به درمان است، در مطالعه دیگری که توسط غلامزاده خوبی و همکاران انجام شد، نقش‌های Pin1 را در ویژگی‌های تومورزایی سلول‌های CRC ارزیابی نمودند. در این مطالعه، بیان Pin1 در سلول‌های SW-48 توسط RNA مداخله‌گر کوچک مصنوعی (siRNA) خاموش شد و پس از آن زنده‌ماندن سلول، تشکیل کلنی، آپوپتوز، اتوفازی، ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی سرطانی (CSC)، مسیرهای انتقال پیام مرتبط با CSC، مهاجرت سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که انتقال Pin1 siRNA به سلول‌های SW-48 از تکثیر سلول‌های سرطانی، مهاجرت و افزایش

رونوئسی TCF/LEF ترکیب شده و باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد و تمایز می‌شود، در نتیجه این فعال‌سازی می‌تواند منجر به افزایش توانایی سلول‌های سرطانی برای مهاجرت و متاستاز شود (۲۲). بر همین اساس طبق نتایج وانیتسووان و همکاران وی نیز در سال ۲۰۰۸، پایداری بیش از حد بتا-کاتنین به‌صورت تجمع هسته‌ای آن در پیشگویی نتایج سرطان‌های کولورکتال بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۲۳).

از سوی دیگر گزارش شده است که بیان β -catenin با بیان cycD1 در موارد سرطان روده بزرگ مرتبط است (۲۴). طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر بیان ژن cycD1 در بافت تومور نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش داشته است اما این افزایش از نظر آماری معنادار نیست همچنین در اکثر بافت‌هایی که تهاجم عروقی و لنفاوی وجود داشت، میزان بیان cycD1 افزایش یافته بود. در شرایط طبیعی، β -catenin تحت کنترل قرار دارد. اما در CRC، جهش‌هایی در ژن APC یا سایر اجزاء این مسیر باعث تجمع β -catenin در سیتوپلاسم و انتقال آن به هسته می‌شود. این پروتئین با فاکتورهای رونوئسی ترکیب شده و منجر به افزایش بیان cycD1 می‌شود که این امر باعث تسریع در ورود سلول به مرحله S چرخه سلولی و تقسیم سلولی می‌گردد (۲۵).

در نهایت تحقیقات بیشتر درباره این پروتئین‌ها نه تنها برای درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی CRC ضروری است بلکه می‌تواند راهگشای توسعه روش‌های درمانی جدید باشد. همچنین شناسایی داروهایی که بتوانند اثرات منفی این پروتئین‌ها را کاهش دهند یا مسیرهای انتقال پیام را هدف قرار دهند، ممکن است امیدهای جدیدی برای درمان بیماران مبتلا به CRC ایجاد کند.

در مطالعه حاضر با توجه به اینکه بیماران از شهرهای مختلفی به مرکز تحقیقات سرطان و بانک تومور ایران مراجعه نمودند، لذا امکان بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه با میزان بقا بیماران وجود نداشت. همچنین محدود بودن تعداد نمونه‌ها از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد که ممکن است بر تعمیم‌پذیری نتایج تأثیر بگذارد. علاوه بر این، یکی دیگر از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم بررسی ژن‌های مورد مطالعه در سطح پروتئین بود زیرا بررسی پروتئین‌ها می‌توانست اطلاعات بیشتری درباره عملکرد مسیرهای پیام‌رسانی ارائه دهد که همین امر نیز از محدودیت‌های مطالعه حاضر محسوب می‌شود. با توجه به اینکه درجه نومور در اکثریت نمونه‌ها از نوع ۲ بود و اکثریت نمونه‌ها از نظر متاستاز از نوع M0 بودند، در نتیجه مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه بین گروه‌های مختلف از نظر آماری امکان‌پذیر نبود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مطالعه حاضر مراتب قدردانی خود را از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه برای حمایت از پژوهش حاضر اعلام می‌کنند.

آپوتوز و اتوفاژی جلوگیری کرد و همچنین سلول‌های SW-48 که siRNA PIN1 به آنها منتقل شده بود از طریق مهار بیان ژن β -catenin و Notch1، ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی را کمتر نشان دادند (۱۵). همچنان که در مطالعه ما که بر روی بافت‌های سرطانی انجام گرفت، نیز مشاهده شد، اکثر نمونه‌هایی که تهاجم عروقی و لنفاوی را نشان دادند، دارای بیان ژن افزایش‌یافته Pin1 بودند. بنابراین در ارتباط با نقش PIN1 و اهمیتی که در CRC دارد می‌توان پیشنهاد داد که PIN1 ممکن است به فعال‌سازی مسیرهای انتقال پیامی کمک کند که منجر به افزایش مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌شود. این فعالیت‌ها به پیشرفت سرطان و بدتر شدن پیش‌آگهی بیماران مرتبط است (۱۶ و ۱۷). همچنین Pin1 می‌تواند با افزایش بیان پروتئین‌هایی مانند cycD1 و β -catenin، به ترویج رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی کمک می‌کند. این پروتئین‌ها در مسیرهای انتقال پیام Wnt و چرخه سلولی نقش دارند که برای تومورزایی ضروری هستند (۱۳). از طرفی علاوه بر افزایش آنکوژن‌ها، Pin1 می‌تواند پروتئین‌های سرکوبگر تومور را نیز ناپایدار کند، که این امر به رشد و تکثیر بیشتر سلول‌های سرطانی کمک می‌کند (۱۶ و ۱۷). علاوه بر CRC، این پروتئین در سرطان‌های دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفته همچنان که ایالا و همکاران گزارش دادند که افزایش بیان Pin1 در بیماران مبتلا به سرطان پروستات، میزان بقا در این بیماران کاهش پیدا می‌کند و در نتیجه می‌توان پیشنهاد کرد که افزایش بیان Pin1 یک نشانگر پیش‌آگهی نامطلوب برای سرطان پروستات است (۱۸).

در ادامه با توجه به نقش β -catenin در مسیرهای انتقال پیام Wnt و تأثیر آن بر متاستاز در سرطان‌ها، از جمله CRC، لیو و همکاران مکانیسم‌های مختلفی که β -catenin می‌تواند از طریق آن‌ها بر روی متاستاز تأثیر گذارد را مورد بررسی قرار دادند که شامل القای تغییرات اپیتلیالی-مزوتیدی (EMT) و تنظیم بیان پروتئین‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) می‌باشد (۱۹). در همین راستا فوجز و همکاران نشان دادند که افزایش بیان β -catenin می‌تواند به القای تغییرات اپیتلیالی-مزوتیدی (EMT) منجر شود، که برای متاستاز ضروری است (۲۰). یافته‌های حاصل از مطالعه ما نیز نشان داد که میزان بیان ژن β -catenin در بافت توموری افراد مبتلا به CRC نسبت به بافت حاشیه تومور به‌صورت معناداری افزایش پیدا کرده است. افزایش بیان β -catenin معمولاً به‌دلیل جهش‌های ژنتیکی در ژن APC یا دیگر اجزای مسیر Wnt رخ می‌دهد. این تغییرات می‌توانند منجر به فعال‌سازی غیرطبیعی مسیر Wnt و تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی شوند. همچنین β -catenin به‌عنوان یک فاکتور رونوئسی عمل می‌کند و می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با رشد و بقا سلول را افزایش دهد (۲۱). با فعال شدن مسیر انتقال پیام Wnt، از تجزیه β -catenin توسط کمپلکس‌های پروتئینی جلوگیری شده و β -catenin به هسته سلول منتقل می‌شود. در آنجا، با فاکتورهای

11. Mosaad H, Ahmed MM, Elaidy MM, Elfaragy OM, Abdelwahab MM, Abdelnour HM. Down-regulated MiRNA 29-b as a diagnostic marker in colorectal cancer and its correlation with ETV4 and Cyclin D1 immunohistochemical expression. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers* 2023;37:179-89. doi: 10.3233/CBM-220349
12. Rosen R, Sapra A. TNM Classification. StatPearls. Treasure Island (FL). Stat Pearls Publishing Copyright;2020.
13. Kuramochi J, Arai T, Ikeda S, Kumagai J, Uetake H, Sugihara K. High Pin1 expression is associated with tumor progression in colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2006;94:155-60. doi: 10.1002/jso.20510
14. Wu W, Xue X, Chen Y, Zheng N, Wang J. Targeting prolyl isomerase Pin1 as a promising strategy to overcome resistance to cancer therapies. *Pharmacological Research* 2022;184:106456. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106456
15. Gholamzadeh Khoei S, Saidijam M, Amini R, Jalali A, Najafi R. Impact of PIN1 inhibition on tumor progression and chemotherapy sensitivity in colorectal cancer. *J Gastrointest Cancer* 2022;53:299-310. doi: 10.1007/s12029-021-00600-6
16. Chen Y, Wu YR, Yang HY, Li XZ, Jie MM, Hu CJ, et al. Prolyl isomerase Pin1: a promoter of cancer and a target for therapy. *Cell Death & Disease* 2018;9:883. doi: 10.1038/s41419-018-0844-y
17. Yu JH, Im CY, Min SH. Function of PIN1 in cancer development and its inhibitors as cancer therapeutics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020;8:120. doi: 10.3389/fcell.2020.00120
18. Ayala G, Wang D, Wulf G, Frolov A, Li R, Sowadski J, et al. The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. *Cancer Research* 2003;63:6244-51.
19. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022;7:3. doi: 10.1038/s41392-021-00762-6
20. Fuchs SY, Ougolkov AV, Spiegelman VS, Minamoto T. Review oncogenic β -catenin signaling networks in colorectal cancer. *Cell Cycle* 2005;4:1522-39.
21. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 2002;38:867-71. doi: 10.1016/S0959-8049(02)00040-0
22. Zhao H, Ming T, Tang S, Ren S, Yang H, Liu M, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular Cancer* 2022;21:144. doi: 10.1186/s12943-022-01616-7
23. Wanitsuwon W, Kannun S, Boonpipattanapong T, Sangthong R, Sangkhathat S. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World Journal of Gastroenterology* 2008;14:6052-9. doi: 10.3748/wjg.14.6052
24. Utsunomiya T, Doki Y, Takemoto H, Shiozaki H, Yano M, Sekimoto M, et al. Correlation of beta-catenin and cyclin D1 expression in colon cancers. *Oncology* 2001;61:226-33. doi: 10.1159/000055379
25. Bian J, Dannappel M, Wan C, Firestein R. Transcriptional regulation of wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer. *Cells* 2020;9. doi: 10.3390/cells9092125

ملاحظات اخلاقی

تمام شرکت کنندگان مطالعه حاضر در مورد اهداف تحقیق آگاه شدند و قبل از شرکت در مطالعه، رضایت نامه کتبی آگاهانه از بیماران اخذ شد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تضاد منافع را اعلام نکردند.

حمایت مالی

این تحقیق با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، شماره ثبت ۴۰۰۰۲۹۱ (۱۴۰۰/۰۳/۲۵) انجام شده است.

کد اخلاق

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه IR.KUMS.REC.1400.212 تأیید گردید.

References

1. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *JAMA* 2021;325:669-85. doi:10.1001/jama.2021.0106
2. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi J, John A, et al. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers* 2022;14. doi:10.3390/cancers14071732
3. Murphy N, Moreno V, Hughes DJ, Vodicka L, Vodicka P, Aglago EK, et al. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine* 2019;69:2-9. doi: 10.1016/j.mam.2019.06.005
4. Gholamzadeh Khoei S, Saidijam M, Amini R, Jalali A, Najafi R. Impact of PIN1 inhibition on tumor progression and chemotherapy sensitivity in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Cancer* 2022;1-12. doi: 10.1007/s12029-021-00600-6
5. Kim G, Bhattarai PY, Choi HS. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 as a molecular target in breast cancer: a therapeutic perspective of gynecological cancer. *Archives of Pharmacol Research* 2019;42:128-39. doi: 10.1007/s12272-019-01122-3
6. Cheng C-W, Tse E. PIN1 in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Pharmacology* 2018;9:1367. doi: 10.3389/fphar.2018.01367
7. Kim CJ, Cho YG, Park YG, Nam SW, Kim SY, Lee SH, et al. Pin1 overexpression in colorectal cancer and its correlation with aberrant beta-catenin expression. *World Journal of Gastroenterology* 2005;11:5006-9. doi: 10.3748/wjg.v11.i32.5006
8. Stewart R, Sharma S, Wu T, Okuda S, Xie G, Zhou XZ, et al. The role of the master cancer regulator Pin1 in the development and treatment of cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2024;12:1343938. doi: 10.3389/fcell.2024.1343938
9. The investigation of the role of Fas and FasL molecules in the extrinsic pathway of apoptosis as a target for cancer therapy in colorectal cancer. *Clin Exc* 2020;10:1-17.[Persian].
10. Jun SY, Kim J, Yoon N, Maeng LS, Byun JH. Prognostic potential of cyclin d1 expression in colorectal cancer. *Journal of Clinical Medicine* 2023;12. doi: 10.3390/jcm12020572



Study of the Expression of Pin1, β -Catenin and cycD1 Genes in Tumor Tissue of Patints with Colorectal Cancer

Fatemeh Babajani (Ph.D. Student)¹, Hosein Setayeshnia (M.D.)¹, Hossien Mohammadi (M.Sc.)¹, Hadi Mozafari (Ph.D.)¹, Soheila Asadi (Ph.D.)^{1,2*}

1- Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

2- Fertility and Infertility Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran.

Received: 2 February 2025, Accepted: 28 October 2025

Abstract:

Introduction: This study investigated the expression of *PIN1*, β -catenin, and *CycD1* genes in tumor and tumor-adjacent tissues of patients with CRC, as well as their correlations with the histopathological features of tumor tissues.

Methods: Thirty-one colorectal tumor samples and matched non-cancerous adjacent tissues were acquired from the Iran Tumor Bank/Tehran University of Medical Sciences. Gene expression of *PIN1*, β -catenin, and *CycD1* was assessed using real-time PCR following RNA extraction and cDNA synthesis, and histopathological characteristics and their associations with gene expression were evaluated.

Results: Most patients were over 50 years old, with no history of alcohol use, non-smokers, and without a family history of CRC. In 83.9% of cases, tumors measured larger than 3 cm and were histologically classified as adenocarcinomas with a differentiation grade of 2. Vascular invasion was observed in 96.8% of cases, while lymphatic invasion was present in 93.5 %. The expression of *PIN1* and β -catenin genes in tumor tissue was significantly increased compared to matched margin tissue ($P=0.043$ and $P<0.0001$, respectively). Also, the *cycD1* gene expression increased in tumor tissue compared to the matched margin tissue, although this increase was not statistically significant. Furthermore, a direct and significant correlation was observed between the expression of *PIN1* and *CycD1* genes ($P<0.001$).

Conclusion: The results of this study suggest that *PIN1* may influence the expression of β -catenin and Cyclin D1 in tumor tissues of CRC patients, indicating a potential role for this gene in the pathogenesis of CRC.

Keywords: Colorectal cancer, *PIN1*, β -catenin, *CycD1*.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: S. Asadi, Email: sohila.asadi75@yahoo.com

Citation: Babajani F, Setayeshnia H, Mohammadi H, Mozafari H, Asadi S. Study of the expression of Pin1, β -catenin and cycD1 genes in tumor tissue of patints with colorectal cancer. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2025;20(3):3-9.

