بررسی بیان ژن‌های IL-23 و IL-27 درسه رده سلول سرطان پستان و غدد لنفاوی درگیر و غیر درگیر در بیماران مبتلا به سرطان پستان

علیرضا اسکندری [۱](M.Sc)، منصوره جابری‌پور [۲](Ph.D)، علی خدادادی [۱*](Ph.D)، عباس قادری [۲](Ph.D)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی*

۲- *مرکز تحقیقات سرطان شیراز*

چکیده

سابقه و هدف: تعیین مارکرهای حیاتی در تشخیص سرطان‌ها یک نیاز اساسی است. یکی از کاربردهای آن کمک جهت تهیه واکسن و ایمنی درمانی سرطان‌ها است. هدف از این مطالعه تعیین بیان ژن سایتوکاین‌های IL-23 و IL-27 در غدد لنفاوی درگیر و غیر درگیر و سه رده سلولی سرطان پستان بود.

مواد و روش‌ها: بررسی بیان ژن سایتوکاین‌های IL-23 و IL-27 در ده غده لنفاوی (شامل: ۵ غده لنفاوی متاستاز شده و ۵ غده لنفاوی غیر متاستاز شده) و سه رده سلول سرطانی (شامل: SKBR3، MCF7 و MDAMB468) با استفاده از روش Quantitative real time PCR (QRT-PCR) میزان بیان ژن‌های مورد نظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Syber Green مورد ارزیابی گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاکی از کاهش بیان این ژن‌ها در سلول‌های سرطانی فوق است. همچنین، تفاوت معنی داری بین بیان آن‌ها در غدد لنفاوی درگیر و غیر درگیر مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: یافته ها نشان می دهند که محیط ظریف شیمیایی اطراف تومور در بیان این ژن‌ها و در نتیجه بروز التهاب و پیش‌رفت تومورکه ممکن است در اثر عمل‌کرد این سایتوکاین‌ها باشد دخالتی ندارد.

واژه‌های کلیدی: نورویش‌های پستان، بیان ژنی، اینترلوکین ۲۳، ۲۷ انسانی، گره های لنفاوی

مقدمه

سرطان پستان به عنوان یکی از سرطان‌های شایع در بین زنان به خصوص کشورهای غربی مطرح می‌باشد. شیوع سرطان پستان در ایران نیز بر اساس بررسی‌های به عمل آمده ۱۲۰ درصد هزار نفر گزارش شده که سن ابتلا نسبت به کشورهای غربی ده سال کم‌تر می‌باشد [۱]. بر اساس تئوری مک فارلند در سال ۱۹۵۰ سیستم ایمنی توانایی تشخیص و حذف سلول‌های سرطانی در بدو شکل‌گیری را دارد. بنابراین بررسی وضعیت سیستم ایمنی در محیط ظریف شیمیایی اطراف تومور می‌تواند تاثیر بسیار مهمی در تشخیص، پیش‌رفت و درمان تومور با روش‌های نوین ایمنی درمانی داشته باشد [۲]. این سیستم از طریق واسطه‌هایی به نام سایتوکاین‌ها اثر خود را اعمال می‌کند و از آن‌جا که سایتوکاین IL-12 دارای فعالیت‌های ضد توموری بوده و تحقیقات متعددی در مورد نقش این سایتوکاین در این زمینه انجام گرفته است لذا بررسی سایر سایتوکاین‌های این خانواده نیز ضروری به نظر می‌رسد، که از جمله آن‌ها می‌توان به IL-23 و IL-27 اشاره نمود.

IL-23 یک سایتوکاین پیش التهابی و از خانواده IL-12 می‌باشد. از دو زیر واحد به نام‌های P40 و P19 تشکیل شده است [۳،۲]. با توجه به تاثیرگذار بودن IL-23 بر عمل‌کرد و

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۱۱۸۳۳۵۷ نمابر: ۳۳۳۲۰۳۶ ۰۶۱۱

Email: akhodadadi2@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۱۷

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

تولید سایتوکاین‌های التهابی توسط سلول Th17 و نقش این سلول در بروز التهاب، بیماری‌های خود ایمنی و سرطان‌ها می‌توان به اهمیت تاثیر IL-23 در بروز التهاب، بیماری‌های خودایمنی و سرطان‌ها پی برد.IL-27 یک سایتوکاین با دو زیر واحد مختلف شامل EBI3 و P28 می‌باشد [۵،۴]. IL-27 در تکثیر سلول‌های +TCD4 و تحریک تولید IFNγ در این سلول‌ها و در نتیجه پاسخ ایمنی مربوط به Th1 موثر می‌باشد. این سایتوکاین هم‌چنین به همراه IL-12 باعث شروع تولید IFNγ از سلول‌های +TCD4 مبتدی و NK سل‌ها می‌شود [۶]. در کنار تاثیر IL-27 بر روی سلول‌های +TCD4 مبتدی و نقش مهار فعالیت‌های سلول‌های لنفوسیت توسط این سایتوکاین، توانائی IL-27 در تحریک سلول‌های +TCD8 و افزایش فعالیت کشندگی این سلول‌ها در بیماری‌های عفونی و سرطان‌ها نیز گزارش شده است [۸،۷].

MCF7 یک سلول سرطانی است که اولین بار در سال ۱۹۷۳ توسط Herbert soul و همکاران جدا گردید. این سلول از منشاء انسانی (بافت غدد پستانی) از ترشحات مایع جنب بیماران Invassive ductal carcinoma جدا شد و از نظر مرفولوژی یک سلول اپیتلیال می‌باشد [۹]. سلول MDA-MB468، اولین بار توسط Cailleau و همکاران در سال ۱۹۷۷ از یک زن سیاهپوست ۵۱ ساله و از ترشحات مایع جنب بیمار مبتلا به متاستاز آدنوکارسینوما جدا گردید و دارای منشاء اپیتلیالی می‌باشد [۱۰]. رده سلولی دیگر SKBR3 می‌باشد که در سال ۱۹۷۰ توسط Trempe و همکاران از ترشحات مایع جنب جدا گردید. این سلول دارای منشاء انسانی بوده و توانایی ایجاد تومور در موش‌های مدل آزمایشگاهی را دارد [۱۱].

علت بررسی بیان ژن‌های این سایتوکاین‌ها در رده سلول‌های سرطانی، بررسی تاثیر محیط ظریف شیمیایی اطراف تومور در بیان این ژن‌ها و دخالت این محیط در پیش‌رفت تومور می‌باشد و علت بررسی بیان این سایتوکان‌ها در غدد لنفاوی درگیر و غیر درگیر بررسی تاثیر این سایتوکاین‌ها در متاستاز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- کشت سلولی و جداسازی RNA

۱-۱- کشت سلولی. در این تحقیق سلول‌ها را در محیط کشت RPMI (Biosera) با FBS ده درصد و یک درصد از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Biosera) در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵ درصد کشت داده و بعد از پاساژ سوم یک سی‌سی تریپسین حاوی EDTA را به فلاسک اضافه نموده و بعد از ۳۰ ثانیه تریپسین را خارج و ۲ دقیقه بعد سلول‌ها از جدار فلاسک جدا گردیدند. یک میلیون سلول را در لوله‌های اپندورف ریخته، یک سی‌سی Trizol (Invitrogen) به آن اضافه نموده و RNA مورد نظر بر اساس پروتکل شرکت سازنده استخراج و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- نگهداری گردید.

۱-۲- غدد لنفاوی و جدا سازی RNA . این بررسی بر روی ده غده لنفاوی انجام گرفت که به دو گروه درگیر و غیر درگیر تقسیم شده که هر گروه شامل ۵ غده بود. بعد از این‌که غدد لنفاوی توسط جراح متخصص از بیمار جدا گردید در لوله‌های فالکون حاوی محیط RPMI قرار داده و در شرایط کاملاً استریل و زیر هود این غدد در پلیت ریخته شد و به وسیله تیغ جراحی غدد لنفاوی را بریده و طی این عمل لنفوسیت‌ها خارج می‌شوند. تکه‌های بافتی جدا شده و محلول باقی مانده که حاوی لنفوسیت‌ها و محیط کشت می‌باشد با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از رسوب حاصل تعداد یک میلیون سلول جدا کرده و به آن یک سی‌سی Trizol (Invitrogen) اضافه گردید و در لوله‌های اپندورف ریخته شد. RNA براساس پروتکل شرکت سازنده استخرج گردید و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- نگهداری گردید.

۲- قرائت غلظت RNA. بعد از این‌که RNA جدا گردید، غلظت آن‌را جهت تعیین حجم مورد نیاز برای سنتز cDNA با فتومتر اندازه‌گیری نمودیم. خلوص و میزان RNA استخراج شده به روش رنگ‌سنجی و به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

۱µl از محلول RNA در ۹۹ µl بافر TE حل شده و OD آن در ۲۶۰ nm و در ۲۸۰ nm و نیز ۳۲۰ nm توسط اسپکترفوتومتر UV visible (eppendorf) قرائت می‌شود و طبق فرمول زیر غلظت RNA محاسبه می‌گردد. نسبت OD ۲۶۰nm/۲۸۰nm نیز برای تعیین خلوص RNA به‌دست می‌آید. (خلوص RNA در حد ۱/۸< قابل قبول است).

RNA concentration = (OD 260 – OD 320) * 40 * 100

۳- سنتز cDNA. در این مرحله از RNA های جدا شده از نمونه‌های مورد مطالعه به میزان ۵ میکروگرم جهت سنتز cDNAاستفاده نمودیم. برای این منظور از کیت (Fermentas, Finland) First strand cDNA Synthesis RevertAidTM استفاده شد.

۴- پرایمر. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار (open primer۳sourceforge USA) طراحی و از طریق سایت اینترنتی (Ncbi.nlm.nih.gob Blast) گردید. ردیف بازی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ درج گردیده است.

۵- Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). تکنیک به کار رفته در این تحقیق Real- time PCR بوده که با این تکنیک میزان بیان mRNA ژن‌های مورد نظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Syber Green ارزیابی گردید. میزان تکثیر در چرخه‌ای که CT نامیده می‌شود، توسط دستگاه Bio-Rad system (Chromo4 Real-time PCR Detector, Bio-Rad, Foster City, CA, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. از ژن بتا اکتین به عنوان Housekeeping gene استفاده شد.

مراحل انجام Real-Time PCR به شرح زیر بود: ابتدا Master Mix، پرایمرها و DEPC treated water به دمای محیط رسیده و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin)آماده استفاده شدند، استریپ‌های دستگاه بر روی یخ در زیر هود قرارداده و به آن‌ها ۱۲/۵میکرولیتر Master Mix، از هر پرایمر ۰/۴ میکرولیتر پرایمر و ۱۰/۷ میکرولیتر DEPC treated water اضافه شد، در این مرحله cDNA به دمای محیط رسیده و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin)آماده شده و در زیر هود دیگر به هر استریپ ۱ میکرولیتر اضافه گردید، استریپ‌ها در دستگاه قرار داده و PCR طبق پروتوکل جدول ۲ انجام شد.

۵-۱- نمودار منحنی ذوب (Melting Curve): قبل از آنالیز داده‌ها منحنی ذوب (Melting Curve) جهت هر ژن مورد بررسی قرار گرفته و با بررسی این منحنی صحت پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید گردید.

جدول ۱. مشخصات پرایمرها

پرایمر	سکانس	محل اتصال	طول محصول	دمای ذوب	طول پرایمر
IL-23F	5□-GTTCCCCATATCCAGTGTGG-3□	۳۶۸-۳۸۷	۷۹	۶۰/۰۵	۲۰
IL-23R	5□-GGATCCTTTGCAAGCAGAAC-3□	۴۲۷-۴۴۶	۷۹	۵۹/۸۲	۲۰
IL-27F	5□-GAGCAGCTCCCTGATGTTTC-3□	۲۷۶-۲۹۵	۱۵۸	۵۹/۹۶	۲۰
IL-27R	5□-AGCTGCATCCTCTCCATGTT-3□	۴۳۳-۴۱۴	۱۵۸	۵۹/۸۳	۲۰
Beta ActinF	5□-AGCACTGTCTTGGCGTACAG-3□	۹۶۱-۹۸۰	۲۳۴	۵۴/۵۸	۲۰
Beta ActinR	5□-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3□	۷۶۶-۷۴۷	۲۳۴	۵۲/۳۶	۲۰

جدول ۲. پروتوکل مربوط به انجام Real- time PCR

Enzyme activation and denaturation	10 minutes: 95oC	
Denaturation	15 seconds: 95oC	40 cycle
Annealing	30 seconds: 57oC	
Extension	34 seconds: 60oC	
Melting Curve from 60 to 90oC, read every 1oC, hold 20 second		

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

۵-۲- نمودار استاندارد: جهت بررسی Efficiency و شرائط حاکم بر واکنش، نمودار استاندارد رسم گردید. برای این کار رقت‌های مختلف از محصول PCR حاصل را تهیه کرده و سپس برای آن‌ها تست Real-time PCR انجام و از CTهای حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم نمودار استاندارد استفاده شد، بعد از تهیه نمودار استاندارد به وسیله فرمول زیر بازدهی واکنش Real-time PCR ارزیابی گردید:

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

محاسبه بیان ژنها بر اساس فرمول (-ΔCT) 1+Efficiency و بر اساس فرمول Pfaffl method انجام پذیرفت که در این بررسی یک ژن رفرانس و یک یا چند ژن هدف وجود دارد. یک گروه به عنوان کالیبراتور شناخته شده و بیان ژن‌ها نسبت به این کالیبراتور سنجیده می‌شود. در این تحقیق سلول سرطانی غیر متاستاتیک SKBR3و غدد لنفاوی غیر درگیر به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شدند [۱۲].

۶- آنالیز آماری: ΔΔtc و Relative Quantitation (RQ) با استفاده از نرم‌افزار REST-RG © - version 3 محاسبه گردید.

نتایج

۱- نتایج سلول‌های سرطانی. انجام آزمایش بررسی بیان mRNA ژن‌های IL23 و IL27 در CDNA های سلول‌های سرطانی فوق با روش Real time PCR بیان قابل توجهی را نشان نداد، نتایج در جدول۳ قابل مشاهده می‌باشد.

۲- بررسی مقایسه بیان mRNA ژن‌های IL23 و IL27 بین غدد لنفاوی درگیر یا مثبت و غدد لنفاوی غیر درگیر یا منفی. در این بررسی مشاهده شد که بیان ژن‌های IL-23 و IL-27 در غدد لنفاوی درگیر نسبت به غدد لنفاوی غیر درگیر بیان کم‌تری داشته ضمن این‌که بین بیان ژن‌های مذکور در غدد لنفاوی درگیر و غیر درگیر اختلاف معناداری وجود نداشت.اطلاعات مربوط به CT و بیان ژن‌های مذکور و ژن β-actin در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳. میزان CT و کاهش بیان mRNA ژن‌های IL-23 ، IL-27 و β actin در سلول‌های سرطانی با استفاده از نرم افزار REST-RG © 3

رده سلولهای سرطانی	CT β-actin	CT IL23	CT IL27	کاهش بیان ژن در سلول MCF7 نسبت به سلول SKBR3	کاهش بیان ژن در سلول MDAMB468 نسبت به سلول SKBR3
SkBR3	23.96	33.5	36.15	IL-23=-7.549 IL-27=-7.895	IL-23=-7.388 IL-27=-7.554
MCF7	14.3	32.49	35.59		
MDAMB468	14	32	34.95		

جدول ۴. میزان CT و کاهش بیان mRNA ژن‌های IL-23 ، IL-27 و β actin در غدد لنفاوی درگیر و غیردرگیر با استفاده از نرم افزار REST-RG © 3

غدد لنفاوی	βactin CT	IL23 CT	IL27 CT	کاهش بیان غدد لنفاوی درگیر نسبت به غیر درگیر
1+	16.1	24.44	39.52	IL-23 =- 0.879 IL-27=- 1.653
2+	14.25	23.63	30.84	
3+	13.84	26.8	31.24	
4+	13.77	27.27	31.47	
5+	21.04	25.43	31.36	
1-	13.88	25.44	29.12	
2-	19.27	24	29	
3-	15.84	24.06	38.04	
4-	18.26	25.12	32.23	
5-	16.86	28.92	31.89	

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که ژن‌های IL-23 و IL-27 در سلول‌های سرطانی MDAMB468 MCF7 و SKBR3 بیان قابل توجهی نداشته و ارتباط معناداری نیز بین بیان این ژن‌ها در غدد لنفاوی درگیر و غیر درگیر دیده نشد. Langowski و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که بین IL-23 و التهاب

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

مزمن و بدخیمی ارتباط معنادار وجود دارد، این دانش‌مندان مشاهده کردند که IL-23 پاسخ التهابی در محیط ظریف شیمیایی اطراف تومور را تنظیم می‌کند و باعث جذب سلول‌های لنفوسیت بین اپیتلیالی به ناحیه تومور می‌گردد در صورتی‌که IL-12 باعث جذب سلول‌های TCD8+ می‌گردد، این دانشمندان نشان دادند که IL-23 باعث پیش‌رفت پاسخ التهابی با افزایش متالوپروتئیناز ماتریکس شده و باعث افزایش رگ‌زایی تومور می‌گردد، حذف ژنتیکی و یا حذف سایتوکاین IL-23 به وسیله استفاده از آنتی‌بادی‌ها منجر به جذب سلول‌های لنفوسیت T کشنده به محیط ظریف شیمیایی اطراف تومور گردیده و باعث بروز فعالیت ضد توموری می‌گردد و سرانجام این‌که این محققین نشان دادند که تومور در موش و در میزبانانی که IL-23 آن‌ها کاهش داشته و یا رسپتور IL-23 آن‌ها حذف گردیده‌اند رشد کمی داشته است [۱۳]. حال با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق ما و مقایسه آن با نتایج این دانشمندان و با توجه به این‌که سلول‌های توموری در تولید این سایتوکاین دخالتی ندارند و بنابراین بیان این ژن در محیط ظریف شیمیایی اطراف تومور یک پاسخ ایمنی بدن میزبان نمی‌باشد؟ که ممکن است در مراحل مختلف بیماری بیان متفاوتی داشته و با توجه به نقش دوگانه این سایتوکاین آیا حذف این ژن و یا بلاک کردن آن باعث مهار پاسخ دفاعی بر علیه پیش‌رفت التهاب نمی‌باشد؟

Kortylewski و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان سایتوکاین‌های IL-23 و IL-12 را در سلول‌های سرطانی ملانوما تحت عنوان B16 و C4 ارزیابی نموده که این ارزیابی با تکنیک ELISA انجام گردید و میزان این سایتوکاین‌ها بسیار کم ارزیابی گردید که این نتایج نیز با نتیجه پژوهش ما در بررسی IL-23 و IL-27 در سلول‌های سرطانی هم‌خوانی دارد [۱۴]. Fukuda و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که بیان IL-23 در خون محیطی بیماران HOSCC افزایش داشته و هم‌چنین رسپتور این سایتوکاین نیز در سل لاین‌های این بیماری افزایش بیان نشان می‌دهد ضمن این‌که این محققین نشان دادند که تاثیر این سایتوکاین بر این سلول‌های سرطانی باعث افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌گردد، این محققین این افزایش بیان را با تکنیک Real time PCR انجام دادند [۱۵].

با توجه به نقش IL-27 بیش‌تر مطالعات بر نقش ضد توموری این سایتوکاین استوار است، cocco و همکاران فعالیت ضد توموری این سایتوکاین را در سرطان مولتیپل میلوما نشان دادند و دریافتند که این سایتوکاین مانع رگ‌زایی و پیش‌رفت تومور می‌گردد [۱۶]. Dibra و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان بالای رسپتور WSX1 را در سلول‌های اپیتلیال تومورهای مختلف نشان داده و عنوان کردند که بیان بالای این گیرنده می‌تواند باعث مهار رشد و پیش‌رفت تومور گردد و هم‌چنین بیان بالای این رسپتور در سلول‌های NKG2D در ناحیه تومور نیز موید تاثیرگذاری سایتوکاین IL-27 در فعالیت ضد توموری می‌باشد [۱۷]. Salcedo و همکاران در سال ۲۰۰۹ خاصیت ضد توموری IL-27 را در موش‌های دارای تومور نروبلاستوما ارزیابی نموده و نشان دادند که فعالیت هم‌زمان دو سایتوکاین و IL-2 و IL-27 خاصیت ضد توموری قوی‌تری را القاء نموده و می‌تواند از متاستاز نیز جلوگیری نمایید و این عمل را با تقویت سلول‌های CTL و مهار سلول‌های T تنظیمی انجام می‌دهند [۱۸]. در تحقیقی که توسط Motomu و همکارانشان انجام شد خواص مختلفی از IL-27 از جمله خاصیت ضد رگ‌زایی این سایتوکاین ارزیابی شد. این سایتوکاین با تاثیر مستقیم بر سلول‌های اندوتلیال و تولید اینترفرون گاما باعث تولید IP10 و MIG شده و خاصیت ضد رگ‌زایی را تقویت می‌کند. با بررسی‌های بیش‌تر توسط این محققین ثابت شد که این سایتوکاین دارای خاصیت جلوگیری از رگ‌زایی در متاستاز ریه می‌باشند. در ادامه بررسی‌ها، این محققین خاصیت ضد سرطان این سایتوکاین را بررسی کرده و با وارد کردن آن در سلول‌های تومور ملانومای موشی B16F10 و ایجاد سلول‌هایی تحت عنوان B16F10+IL-27 و وارد کردن این سلول‌ها به تومور و مقایسه با سلول‌های تومورال فاقد این سایتوکاین، خواص ضد سرطان آن‌را مشاهده کرده و آن‌را از بسیاری از سایتوکاین‌های دیگر از قبیل IL-12 در ایجاد خاصیت ضد

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

سرطان توان‌مندتر یافتند زیرا این سایتوکاین قادر بود در غیاب اینترفرون گاما و حتی در نقص توام سیستم ایمنی (SCID) نیز خاصیت ضد سرطان خود را ایفا کند [۱۹].

Liu و همکاران در سال ۲۰۰۸ ارتباط بین IL-27 و تومور مری را بررسی نموده و با استفاده از ایمونوتراپی توسط این سایتوکاین دریافتند که IL-27 با افزایش تولید IFNγ در سلول‌های T و هم‌چنین تقویت فعالیت سلول‌های NK خاصیت ضد توموری خود را اعمال می‌کند [۱۹].

Yoshimato و همکاران در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضد توموری این سایتوکاین را در ملانومای موش مورد بررسی قرار دادند این بررسی بر روی موش‌های دارای نقص در گیرنده WSX-1 و موش‌های نرمال انجام گرفت و دیده شد در موش‌های دارای گیرنده فوق که با سلول‌های سرطانی B16F10 آلوده شده بودند IL-27 قادر بود با فعال کردن مسیرهای انتقال پیام Stat1,3 و افزایش بیان MHC کلاس یک و هم‌چنین افزایش بیان فاکتورهای تنظیمی اینترفرون IRF(1) و IRF(8) زمینه مهار پیش‌رفت تومور را فراهم نماید [۲۰].

یکی از بحث انگیزترین موضوعات روز ارتباط سرطان و التهاب مزمن می‌باشد. بسیاری از تومورهای مهاجم التهابی می‌باشند که از جمله می‌توان به سرطان پستان در افراد Her2+ اشاره نمود. بنابراین می‌توان فرض نمود که ممکن است التهاب باعث تهاجمی شدن تومور گردد. این موضوع را اولین بار Virchow ارائه داد و پیش‌زمینه بروز سرطان را التهاب مزمن عنوان نمود و صدمات پیامد التهاب را باعث تکثیر بیش از حد سلول‌ها وسرطانی شدن آن‌ها دانست، بررسی‌های جدید نیز نشان می‌دهد که وجود سلول‌های التهابی، فاکتورهای رشد، استرومای فعال شده و ایجاد آسیب در DNA مشخصاً زمینه پیش‌رفت تومور را فراهم می‌کنند با توجه به این‌که IL-23 نقش موثری در پیش‌رفت التهاب و بیماری‌های اتوایمیون دارد و این عمل‌کرد در مدل‌های حیوانی از قبیل آرتریت و کولیت نشان داده شده و هم‌چنین با توجه به نقش التهاب در پیش‌رفت سرطان و ارتباط بین IL-23 و بروز و پیش‌رفت التهاب از یک طرف و تاثیر این سایتوکاین بر سلول Th17 و نقش این سلول در پیش‌رفت التهاب و سرطان شاید بتوان به این نکته اشاره نمود که تمایز القاء شده از طرف این سایتوکاین بر سلول Th17 ممکن است به عنوان عاملی در پیش‌رفت تومور تاثیرگذار باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی میزان بیان سایتوکاین‌های IL-23 و IL-27 در سلول‌های سرطان پستان شامل MCF7، MDA_MB468 و SKBR3 و کاهش ناچیز بیان این سایتوکاین‌ها در این سلول‌ها می‌توان گفت در صورت مشاهده هر گونه تغییر در بیان این سایتوکاین‌ها در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان، احتمالاً می‌تواند مربوط به پاسخ سیستم دفاع ایمنی بدن بیماران بوده و ارتباطی با محیط ظریف شیمیایی اطراف تومور ندارد. از طرفی مقایسه میزان بیان این سایتوکاین‌ها در غدد لنفاوی درگیر با غدد لنفاوی غیردرگیر تفاوت معناداری نشان نداده که بتوان بروز و عدم بروز متاستاز و ارتباط آن با بیان این سایتوکاین‌ها را توجیه نمود. که در این مورد نیاز به مقایسه تعداد بیش‌تری غدد لنفاوی درگیر و غیردرگیر از نظر بیان این سایتوکاین‌ها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مشترک بین معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ومرکز تحقیقات سرطان شیراز می‌باشد که ازحمایت‌های مالی این دو مرکز تشکر و قدر دانی می‌شود

منابع

[1] Mousavi S, Montazeri A, Mohagheghi M, Jarrahi A, Harirchi I, Najafi M. Breast cancer in Iran: An epidemiological review. Breast J 2007; 13: 383-391.

[2] Abbas AK, Andrew HL, shiv P. cellular and mulecular immunology.Sixth edition, Saunders Elsevier, Philadelphia 2007; 588-618.

[3] Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity 2000; 13: 715-725.

[4] Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, Birkenbach M. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. J Virol 1996; 70: 1143-1153.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

[5] Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. J Immunol 2004; 172: 2225-2231.

[6] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J. and et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naïve CD4+ T cells. Immunity 2002; 16: 779-790.

[7] Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Hixon JA, Hahn C, et al. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8+ T cells. J Immunol 2004; 173: 7170-7182.

[8] Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, Asakawa M, Fujita K, Kudo M. and et al. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. J Immunol 2006; 176: 7317-7324.

[9] Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinom. J Natl Cancer Inst 1973; 51: 1409-1416.

[10] Cailleau R, Olivé M. and Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In Vitro 1978; 14: 911-915.

[11] Trempe GL. Human breast cancer in culture. Recent Results Cancer Res 1976; 57: 33-41.

[12] Pfaffl WM. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: e45.

[13] Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K. et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. Nature 2006; 442: 461-465.

[14] Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. Cancer Cell 2009; 15: 114-123.

[15] Fukuda M, Ehara M, Suzuki S, Ohmori Y, Sakashita H. IL-23 promotes growth and proliferation in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. Int J Oncol 2010; 36: 1355-1365.

[16] Cocco C, Nicola G, Emma D, Emanuela O. IL-27 Acts as Multifunctional Anti-Tumor Agent in Multiple Myeloma. Cancer Res 2010; 14: 299-303.

[17] Ra D, Cutrera JJ, Xia X, Birkenbach MP, Li S. Expression of WSX1 in tumors sensitizes IL27-signaling independent NK cell surveillance. Cancer Res 2009; 69: 5505-5513.

[18] Salcedo R, Hixon JA, Stauffer JK, Jalah R, Brooks AD, Khan T, et al. Immunologic and therapeutic synergy of IL-27 and IL-2: enhancement of T cell sensitization, tumor-specific CTL reactivity and complete regression of disseminated neuroblastoma metastases in the liver and bone marrow. J Immunol 2009; 182: 4328-4338.

[19] Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Sirén J, Matikainen S, Julkunen I. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokine in human monocyte-derived dendritic cells. J Leuko Biol 2004; 75: 764-771,

[20] Yoshimoto T, Morishima N, Mizoguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S, et al. Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma. J Immunol 2008; 180: 6527-6535.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

IL-23 and IL-27 gene expression in three breast cancer cell lines and metastatic and non-metastatic lymph nodes in breast cancer patients

Alireza Eskandari (M.Sc)[1], Mansooreh Jaberipour (Ph.D)[2], Ali khodadadi (Ph.D)[*1], Abbas Ghaderi (Ph.D)[2]

1 – Dept. of Immunology and Cellular and molecular research center, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2 - Shiraz Institute for Cancer Research, Shiraz, Iran

(Received: 6 Nov 2010 Accepted: 6 Feb 2011)

Introduction: There is a great need to identify prognostic and diagnostic cancer bio-markers which can be applied for vaccine and immunotherapy development. The aim of this study was to determine gene expression of IL-23 and IL-27 in two groups: lymph nodes of breast cancer patients and three cell lines.

Materials and Methods: IL-23 and IL-27 mRNA transcript were investigated in 10 lymph node samples (consisting of 5 metastasis and 5 non metastasis ones) and three cell lines (including of SKBR3, MDA-MB-468 and MCF7) by quantitative real time PCR (Q-PCR) procedure using designed primers, Master Mix reaction containing SYBER green and β actin housekeeping gene.

Results: Data showed no significant differences in IL-23 and IL-27 mRNA gene expressions among metastatic lymph node and non-metastatatic ones. Also, we did not find any significant differences in IL-23 and IL-27 mRNA expressions in cancer cell lines.

Conclusions: Our findings indicate that breast cancer microenvironment has no effect on inflammation via either IL-23 gene expression or Il-27.

Keywords: Breast neoplasms, Gene expression, Interleukin-23& 27 human, Lymph nodes

* Corresponding author: Fax: +98 611 3332036 ; Tel: +98 9161183357
akhodadadi2@gmail.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]