Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 18(105): 24-32

Comparing the Expression Levels of Toll Like Receptors 2, 4 and, in Normal and Cancerous Tissues of Patients with Laryngeal Carcinoma

Bijan Khademi[1], Mahboubeh Razmkhah[2], Ebrahim Eftekhar[3], Ahmad Hosseini[4], Hossein Hamedi [5*]

1- Professor, Department of otorhinolaryngology, Cancer Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
2-Assistant Professor, Department of Immunology, Cancer Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Biochemistry, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.
4- MSc in Immunology, Cancer Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
5- Resident, Department of Otolaryngology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 1 Sep 2015, Accepted: 28 Oct 2015

Abstract

Background: Laryngeal carcinoma induce immune system suppression in tumour micro environments with unknown mechanism. Toll like receptors (TLRs) are important molecules which play a critical role in the management and induction of immune responses. In this regard, the importance and the role of TLR 2, 4 and 9 have not been studied together in laryngeal cancer. The present study aims to evaluate the expression level of TLR2, TLR4 and TLR9 in patients with laryngeal carcinoma.

Materials and Methods: 89 tumour samples and 35 tumour-free tissues were obtained from laryngeal carcinoma male patients and the expression level of TLR2, TLR4 and TLR9 was analysed using Real-time PCR method.

Results: The expression level of TLR2 was increased as the result of increasing lymph node involvement, pretumoral involvement and regional metastasis. Also, the TLR4 gene expression levels were increased 1.5 fold in patients with lymph node involvement. The expression Level of TLR9 was increased by increasing stage and primary tumour involvement. The expression pattern of TLR2 and TLR4 in tumour and tumour-free tissues was the same, while TLR9 gene expressions show higher level in tumour tissues than its normal tissue. None of our findings were statistical significant.

Conclusion: we have shown that the expression status of TLR2, TLR4 and TLR9 in patients with laryngeal cancer was correlated with their clinicopathologic features. Additionally, the expression level of TLRs in cancerous and non-cancerous tissues shows no significant changes**.**

Keywords: Laryngeal cancer, Toll like receptor 2, TLR4, TLR9

*Corresponding Author:
Address: Department of Otorhinolaryngology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: hoseinhamedi44@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۱۲ (شماره پیاپی ۱۰۵)، اسفند ۱۳۹۴، ۳۲-۲۴

مقایسه بیان ژن گیرنده‌های شبه زنگوله‌ای نوع ۲، ٤ و ۹ در بافت توموری و بافت نرمال بیماران مبتلا به سرطان حنجره

بیژن خادمی[۱]، محبوبه رزمخواه[۲]، ابراهیم افتخار[۳]، احمد حسینی[٤]، حسین حامدی[۵*]

۱- استاد، گروه جراحی گوش، حلق و بینی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ، شیراز، ایران.

۲- استادیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ، شیراز، ایران.

۳-استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۴-کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ، شیراز، ایران.

۵- دستیار، گروه جراحی گوش، حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۶

چکیده

زمینه و هدف: سرطان حنجره به دلایل نامشخصی موجب القای سرکوب سیستم ایمنی در ناحیه تومور می‌شود. مولکول‌های گیرنده شبه زنگوله‌ای (TLR) نقش مهمی را در القاء و کنترل پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند. در این راستا اهمیت و نقش TLR های نوع ۲، ۴ و ۹ در کنار هم در سرطان حنجره مورد مطالعه قرار نگرفته است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی بیان ژن‌های TLR2، TLR4 و TLR9 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۸۹ نمونه تومور و ۳۵ نمونه از بافت سالم مجاور تومور از بیماران مرد مبتلا به سرطان حنجره تهیه شده و میزان بیان ژن‌های TLR2، TLR4 و TLR9 به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی (Real time PCR) تعیین شد.

یافته‌ها: بیان ژن TLR2 به واسطه درگیری غدد لنفاوی و هم‌چنین درگیری بافت اطراف تومور و در نهایت وجود متاستاز ناحیه‌ای افزایش یافت. بیان ژن TLR4 نیز در بیمارانی که درگیری غدد لنفاوی داشتند، حدود ۱/۵ برابر افزایش داشت. میزان بیان ژن TLR9 با افزایش stage و گسترش تومور افزایش پیدا کرد. بیان TLR2 و TLR4در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور آن تغییر چندانی نداشت، اما بیان TLR9 افزایش نشان داد. هیچ‌یک از یافته‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد میزان بیان ژن‌های TLR2، TLR4 و TLR9 در تومورهای جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان حنجره با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک بیماران مرتبط است. علاوه بر این، اگرچه مقایسه بیان این ژن‌ها در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور آن تغییراتی را نشان داد، اما چشم‌گیر نبود.

واژگان کلیدی: سرطان حنجره، مولکول‌های گیرنده شبه زنگوله‌ای TLR2 ، TLR4، TLR9

***نویسنده مسئول:** ایران، شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه جراحی گوش، حلق و بینی

Email: hoseinhamedi44@yahoo.com

مقدمه

سرطان حنجره تقریباً ۱ تا ۲ درصد کل سرطان‌های شایع را تشکیل می‌دهد. حنجره دومین محل شایع سرطان در مجاری فوقانی تنفسی و گوارشی بعد از حفره دهان است وکارسینوم سلول‌های سنگ‌فرشی ۸۵ تا ۹۰ درصد آن را تشکیل می‌دهد(۱). به غیر از مصرف الکل و دخانیات عواملی دیگر نظیر آلودگی به ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) و یا رفلاکس معده از عوامل تشدید کننده ایجاد این سرطان به شمار می‌روند(۲).

مولکول‌های گیرنده شبه زنگوله‌ای (TLR) به عنوان یکی از اجزاء ایمنی ذاتی محسوب شده که اجزاء مختلف میکروارگانیسم‌ها را شناسایی کرده و در ایجاد پاسخ برعلیه آن‌ها نقش محوری ایفاء می‌کنند(۳). مولکول‌های TLR بر سطح اکثر سلول‌های سیستم ایمنی نظیر لنفوسیت‌های B و T، ماکروفاژها، سلول‌های دندرتیک و حتی در سطح سلول‌های غیر ایمنی نظیر فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپی تلیال بیان می‌شوند(۴). یازده نوع مولکول TLR در انسان بیان می‌شود که به عنوان پلی بین ایمنی ذاتی و پاسخ ایمنی اختصاصی عمل می‌کنند(۵). تغییر بیان مولکول‌های TLR در سرطان‌های مختلفی گزارش شده است که نشان از نقش مهم این مولکول‌ها در ایجاد و پیشرفت سرطان می‌باشد(۶).

مولکول TLR2 از طریق سلول‌های توموری و لنفوسیت‌های مهاجرت کننده به ناحیه تومور بیان می‌شوند. بیان مولکول TLR2 در ناحیه تومور باعث فعال شدن سلول‌های کشنده طبیعی و ماست سل‌ها و در نتیجه از بین رفتن تومور می‌گردد(۷). تحقیقات نشان داده موش‌های فاقد TLR2 به سرعت دچار سرطان می‌شوند(۸). با این حال برخی مطالعات نشان داده TLR2 موجود بر سطح سلول‌های T تنظیمی از طریق فعال کردن این سلول‌ها، باعث مهار پاسخ ایمنی و در نتیجه رشد و گسترش تومور می‌شود(۸). وجود TLR4 بر روی سطح سلول‌های سرطانی با مقاومت این سلول‌ها در مقابل داروهای شیمی درمانی همراه بوده و از طریق مهار آپوپتوز، رشد وتکثیر این سلول‌ها را افزایش می‌دهد که این مکانیزم‌ها نشان دهنده اهمیت بیان این مولکول بر سطح سلول‌های سرطانی می‌باشند(۸،۹).

مولکول TLR9 نیز از دیگر مولکول‌های مهم خانواده TLR است که نقش‌های متفاوتی را در سرطان نشان داده است. برخی مطالعات نقش TLR9 را در تکثیر سلول‌های سرطانی و تهاجم به بافت اطراف نشان داده‌اند(۱۰). در حالی که برخی دیگر فعال شدن TLR9 در ناحیه تومور را باعث القاء پاسخ ایمنی علیه تومور دانسته و آن را یکی از راه‌کارهای کنترل رشد سرطان تلقی می‌کنند(۱۱).

به طور کلی، مولکول‌های گیرنده شبه زنگوله‌ای نقش مهمی را در القاء و کنترل پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند. در سرطان حنجره القاء سرکوب سیستم ایمنی در ناحیه تومور وجود دارد. مکانیسم اصلی که باعث ایجاد چنین حالتی در ناحیه تومور می‌شود، کاملا مشخص نمی‌باشد(۱۲). طبق شواهد موجود، اهمیت TLR2، TLR4 و TLR9 در پاتوژنز سرطان‌ها بیشتر است، به گونه‌ای که امروز تلاش‌های زیادی در جهت ساختن آنتاگونیست‌هایی که این گیرندها را بلوکه کنند یا بیان آن‌ها را مهار کنند، انجام گرفته است(۱۱-۶). از این رو، در مطالعه حاضر میزان بیان سه مولکول مهم TLR2، TLR4 و TLR9 در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان حنجره و ارتباط آن با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک بیماران مورد بررسی قرار گرفته است. هم‌چنین میزان بیان این مولکول‌ها در بافت تومور با بافت سالم اطراف آن نیز مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۸۹ بیمار مرد که طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ جهت عمل لارنژکتومی توتال یا همی لارنژکتومی به بیمارستان خلیلی دانشگاه علوم پزشکی شیراز مراجعه کرده بودند، وارد مطالعه شدند. تمام بیماران مبتلا به سرطان حنجره از نوع کارسینومای سلول سنگفرشی بوده که جهت تأیید آن گزارش پاتولوژی درخواست می‌شد. بیمارانی که قبل از عمل، شیمی درمانی و

رادیو تراپی دریافت کرده بودند یا بیمارانی که گزارش پاتولوژی آن‌ها نشان از انواع دیگر سرطان به غیر از کارسینومای سلول سنگ‌فرشی بود از مطالعه خارج شدند. جهت تهیه نمونه، قسمتی از بافت سرطانی حنجره و هم‌چنین قسمتی از بافت سالم اطراف آن خارج شد و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شده و تا زمان سنجش‌های آزمایشگاهی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. این مطالعه با کد ۹۳۷۹ به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز رسید و از بیماران رضایت نامه کتبی دریافت شد.

برای استخراج RNA از کیت invisorb RNA Tissue kit (اینوتیک، آلمان) استفاده شد و غلظت آن با استفاده از اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. به منظور حذف آلودگی احتمالی با DNA، RNAهای استخراج شده در مجاورت آنزیم DNase I قرار گرفتند. جهت سنتز cDNA از کیت Revert Aid First cDNAsynthesis (فرمنتاس، فنلاند) و دو نوع پرایمر الیگو دی تی و راندوم هگزامراستفاده شد. میزان بیان ژن‌های TLR2، TLR4 و TLR9 در بافت توموری و بافت نرمال مجاور آن به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز زمان واقعی (Real-time PCR) اندازه گیری شد. برای تکثیر این ژن‌ها از پرایمرهای اختصاصی که توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است و نیز از SYBR green I (ABI ، ایالات متحده امریکا) به عنوان رنگ گزارش‌گر استفاده گردید. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه تحت دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن اولیه DNA تنظیم شد. پس از آن ۴۰ مرتبه سیکل به ترتیب ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه و ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه انجام شد. در پایان واکنش آنالیز منحنی ذوب جهت تایید نتایج انجام شد. بیان ژن‌ها با استفاده از بتا اکتین یکسان سازی گردید و نتایج با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورداستفاده جهت انجام Real-time PCR

نام ژن	Forward primer	Reverse primer
Beta actin	CACCATCACGCCCTGGTGCC	ACAGAGCCTCGCCTTTGCCG
TLR2	ATTGTGCCCATTGCTCTTTC	ACCCACACCATCCACAAAGT
TLR4	ACCTCAACTGGGATCTCGTCA	GAGAGGTGGCTTAGGCTCTG
TLR9	AGTCAATGGCTCCCAGTTCCT	CGTGAATGAGTGCTCGTGGTA

تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ استفاده شد. آزمون کولموگروف-اسمیرنف نشان داد که داده‌ها از توزیع نرمال تبعیت نمی‌کنند، از این رو آزمون من ویتنی برای مقایسه میزان بیان ژن‌ها استفاده شد. برای تعیین ارتباط بیان ژن‌ها با همدیگر از آزمون اسپیرمن استفاده شد. مقدار p کمتراز ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد نمودارها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۵ ترسیم شدند.

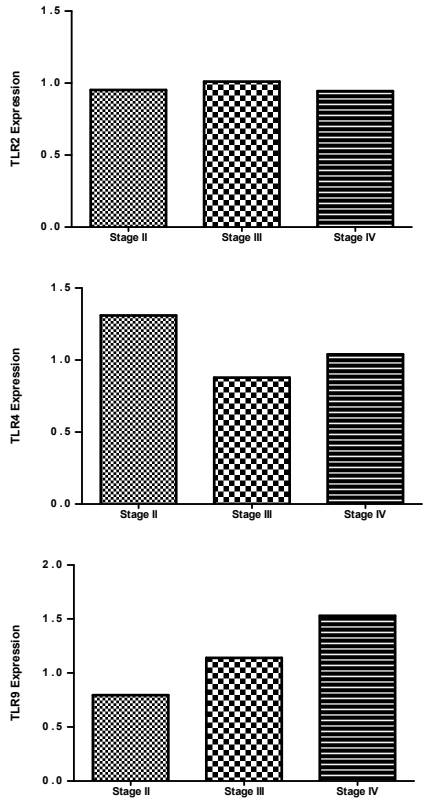
یافته‌ها

در این مطالعه، ۸۹ نمونه توموری از بیماران مبتلا به سرطان حنجره خارج شد. از ۳۵ بیمار بافت سالم اطراف تومور نیز جدا گردید. میانگین سنی بیماران ۶۰ سال بود. همه بیماران شرکت کننده در این مطالعه مرد بودند و دارای سرطان حنجره از نوع کارسینومای سلول سنگ‌فرشی بودند. اکثر بیماران در مرحله III و IV بیماری بودند (به ترتیب ۳۸ و ۴۰ درصد). ۸ درصد بیماران درگیری تیروئید، ۱۲ درصد درگیری غضروف، ۵۸ درصد درگیری بافت اطراف حنجره و ۲۴ درصد درگیری غدد لنفاوی ناحیه ایی نشان دادند. مشخصات کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران در جدول ۲ آمده است.

جدول۲. مشخصات کلینیکوپاتولوژیک بیماران مبتلا به سرطان حنجره

Percentage	Frequency (total=89)		
0	0	T0	Primary
0	0	T1	Tumor
9	8	T2	
45	40	T3	
18	16	T4	
28	25	Tx	
75	67	N0	Regional
4	4	N1	Lymph nodes
6	5	N2	Involvement
2	2	N3	
12	11	Nx	
0	0	I	Tumor Stage
9	8	II	(TNM)
38	34	III	
40	36	IV	
12	11	Unreported	
18	16	Well	Tumor
43	38	Moderate	Differentiation
25	22	Poor	
15	13	Unreported	
36	32	No Dysplastic Change	Mucosal Involvement
2	2	Microinvasive	
2	2	In situ	
21	19	Mild	
16	14	Moderate	
1	1	Sever	
1	1	Metaplasia	
3	3	Dysplastic Change	
17	15	Unreported	
28	25	Non Involve	Prelaryngeal
58	52	Involvement	Involvement
13	12	Unreported	
79	70	Non Involve	Thyroid
8	7	Involvement	Involvement
13	12	Unreported	
73	65	Non Involve	Cartilage
12	11	Involvement	Involvement
15	13	Unreported	

بیان ژن‌های TLR2، TLR4 و TLR9 در این بیماران به روش Real-time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که بیان ژن TLR2 در مراحل مختلف سرطان حنجره از تفاوت معنی‌داری برخوردار نیست (p>۰/۰۵). میانه بیان این ژن در مرحله II و III و IV به ترتیب برابر ۰/۹۵، ۱/۰۲ و ۰/۹۴ بود (شکل ۱). هنگامی که بیماران از نظر محل قرارگیری تومور (تومور اولیه) طبقه‌بندی شدند، بیمارانی که تومورهای T4 داشتند، ژن TLR2 را بیشتر از سایرین بیان می‌کردند. بیماران با تومور T4 در حدود ۶ برابر بیماران T3 و T2 ژن TLR2 را بیان می‌کردند، ولی این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵). گروه‌بندی بیماران از نظر درگیری غدد لنفاوی اطراف تومور نشان داد بیمارانی که غدد لنفاوی اطراف تومور آن‌ها درگیری داشت، در حدود ۳ برابر سایر بیماران ژن TLR2 را در بافت سرطانی خود بیان می‌کردند. اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵).تمایز بافت سرطانی نیز تأثیری در بیان TLR2 نداشت، هرچند در بیمارانی که تمایز متوسط در بافت آن‌ها گزارش شده بود، حدود ۲ برابر سایرین ژن TLR2 را بیان می‌کردند(p>۰/۰۵). بیمارانی که بافت موکوسی حنجره آنان تغییرات سرطانی دیس پلاستیک را نشان می داد، حدود ۲۰ برابر گروه کنترل (بافت سالم اطراف تومور) ژن TLR2 را بیان می‌کردند، در حالی که این میزان برای بیماران با تغییرات موکوسی micro invasive حدود ۱۲ برابر، metaplasia حدود ۷ برابر ، In situ حدود ۴ برابر و سایر گروه‌ها به طور یکسان با بافت سالم اطراف تومور ژن TLR2 را بیان می‌کردند. این تغییرات نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵).

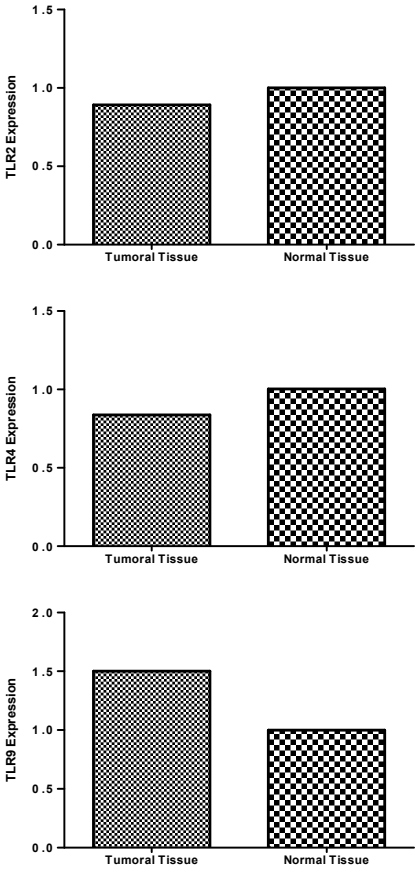


شکل ۱. بیان ژن‌هایTLR2،TLR4و TLR9 در بافت تومور بیماران مبتلا به سرطان حنجره با مراحل مختلف تعیین شده به روش Real Time PCR. نتایج از تفاوت معنی‌داری برخوردار نبوده است.

هیچ یک از بیماران شرکت کننده در این مطالعه متاستاز به بافت‌های دور دست را نشان ندادند. ولی بیماران

بر اساس درگیری بافت غده تیروئید، پاراتیروئید، بافت اطراف تومور و غدد لنفاوی به دو گروه دارای متاستاز به بافت اطراف و عدم آن تقسیم‌بندی شدند. بر این اساس بیمارانی که متاستاز ناحیه‌ای را نشان دادند، حدود ۵ برابر سایر بیماران ژن TLR2 را بیان می‌کردند(p=۰/۰۸).

مطالعه ۳۵ بیماری که علاوه بر بافت توموری، بافت سالم اطراف تومور نیز از آن‌ها در دسترس بود، نشان داد که بیان ژن TLR2 در هر دو بافت تقریبا یکسان است. در واقع بیان TLR2 در بافت توموری حدود ۰/۸۹ برابر بافت سالم اطراف تومور بود (p>۰/۰۵) (شکل ۲).



شکل۲. بیان ژن‌های TLR2،TLR4وTLR9 در بافت توموری و بافت سالم مجاور تومور در بیماران مبتلابه سرطان حنجره تعیین شده به روش Real Time PCR. نتایج از تفاوت معنی‌داری برخوردار نبوده است.

ارزیابی بیان ژن TLR4 نشان داد که بیماران مبتلا به سرطان حنجره در مراحل مختلف بیماری به یک اندازه ژن TLR4 را بیان می‌کنند. بیان این ژن در مراحل II و III و IV به ترتیب برابر ۱/۳۱، ۰/۸۸ و ۱/۰۴ بود(p>۰/۰۵) (شکل ۱). هم‌چنین بیان ژن TLR4 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره با تومور اولیه مختلف نیز یکسان بود و در بیماران T3،T2 و T4 به ترتیب ۱/۳۱، ۰/۸۸ و ۱/۴۲ بود(p>۰/۰۵). بیمارانی که درگیری غدد لنفاوی داشتند، در حدود ۱/۴ برابر بقیه بیماران ژن TLR4 را در بافت سرطانی خود بیان می‌کردند(p>۰/۰۵). متاستاز ناحیه‌ای به بافت اطراف تومور و وضعیت تمایز بافت سرطانی برروی بیان ژن TLR4 تأثیری نداشت. بافت سالم اطراف تومور کمی بیشتر از بافت سرطانی شده ژن TLR4 را بیان می‌کردند، ولی این تغییر نیز از لحاظ آماری چشم‌گیر نبود(شکل ۲).

ژن TLR9 ژن دیگری بود که بیان آن در بافت سرطانی و سالم بیماران مبتلا به سرطان حنجره مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش مرحله بیماری، بیان ژن TLR9 در بافت سرطانی نیز افزایش یافت. بیماران مرحله II حدود ۰/۸ و بیماران مرحله III حدود ۱/۴ ژن TLR9 را بیان می‌کردند، در حالی که در بافت سرطانی بیماران با مرحله IV بیان ژن TLR9 حدود ۱/۵ برابر سایر ژن‌ها افزایش بیان نشان می‌داد. این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵). نتایج در بیماران با درگیری غدد لنفاوی برخلاف نتایج TLR2 بود. در بیمارانی که درگیری غدد لنفاوی را نشان ندادند درحدود ۱/۳ برابر، ژن TLR9 بیشتر بیان می‌شد(p>۰/۰۵). با افزایش میزان تمایز بافت سرطانی در گروه بیمار میزان بیان ژن TLR9 کاهش نشان داد. در واقع بیماران با تمایز ضعیف در حدود ۱/۷ و با تمایز متوسط در حدود ۱/۲ و با تمایز قوی در حدود ۰/۹۳ برابر ژن TLR9 را بیان می‌کردند(p>۰/۰۵). وجود متاستاز ناحیه‌ای باعث کاهش بیان ژن TLR9 شد. در بیمارانی که این نوع متاستاز را نشان نمی‌دادند، حدود ۱/۳ برابر سایرین ژن TLR9 بیان شد(p>۰/۰۵). بیان TLR9 در بافت تومور حدود ۱/۵ برابر بافت سالم مجاور تومور بود که این نتیجه نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵) (شکل ۲). ارزیابی ارتباط بیان ژن‌های TLR2، TLR4 و TLR9 با

استفاده از آزمون اسپیرمن نشان داد که بین هیچ یک از ژن‌های مورد مطالعه ارتباط آماری معنی‌داری وجود ندارد.

بحث

در سرطان حنجره به دلایل نامشخصی، القای سرکوب سیستم ایمنی در ناحیه تومور وجود دارد. مولکول‌های گیرنده شبه زنگوله‌ای نقش مهمی را در القاء و کنترل پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند.در مطالعه حاضر بیان سه ژن مهم TLR2، TLR4 و TLR9 در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان حنجره به روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. بیان این سه ژن در جمعیت نسبتاً زیادی از بیماران (۸۹ نفر) به صورت کمی و ارتباط آن با ویژگی‌های کامل کلینیکوپاتولوژیک بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت که خود از نکات متمایز کننده مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات پیشین می‌باشد. علاوه براین، تفاوت بیان این مولکول‌ها در بافت توموری با بافت سالم اطراف تومور نیز مقایسه شده که از نقاط قوت دیگر این مطالعه است.

نتایج ما نشان داد که بیان ژن TLR2 به واسطه گسترش تومور، درگیری غدد لنفاوی و هم‌چنین درگیری بافت اطراف تومور و در نهایت وجود متاستاز ناحیه‌ای افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد که بیان TLR2 در سلول‌های ایمنی مهاجرت کرده به ناحیه تومور در سرطان دهان افزایش می‌یابد که این امر باعث تغییر پاسخ ایمنی در ناحیه تومور و مقاومت سلول‌ها به آپوپتوز در ناحیه تومور می‌شود(۱۳). نتایج تحقیقات دیگر که بیان مولکول‌های TLR2، TLR3 و TLR4 را به روش ایمنوهیستوشیمی در بافت توموری استخراج شده از ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان حنجره مورد بررسی قرار داده بودند، نشان داد که بیان TLR2 برروی بافت تومور در مقایسه با TLR3 و TLR4 بیشترین میزان را دارد(۱۴). با این وجود، این مطالعات ارتباط بین میزان بیان TLRها با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک بیماران بررسی نشده بود که بتوان نتایج آن‌ها را با نتایج مطالعه حاضر مقایسه نمود. یافته‌های ما گویای آن است که بیان TLR2 در بافت تومور نسبت به بافت سالم مجاور آن کمترین میزان (۰/۸۹ برابر) را دارد.

TLR4 ژن دیگر این مطالعه بود که بیان آن در تومورهای با درجات تمایز بافتی متفاوت و نیز در مراحل مختلف بیماری یکسان بود و شاخص‌های کلینیکوپاتولوژیک برمیزان بیان آن تأثیر چندانی نداشت. با این حال در بیمارانی که درگیری غدد لنفاوی داشتند بیان آن حدود ۱/۴ برابر افزایش یافت. در تأیید مطالعه ما، برگمن و همکاران نیز نشان دادند که بیان TLR4 ارتباطی با یافته‌های کلینیکوپاتولوژیک بیماران ندارد(۱۵). هم‌چنین آن‌ها رابطه‌ای بین بیان TLR4 و میزان زندگی بدون عوارض بیماران پیدا نکردند، ولی بیان نمودند که برخی پلی مورفیسم‌های ژن TLR4 می‌تواند نشان دهنده پیش اگهی بد این بیماری و مقاومت به درمان باشد(۱۵).

در مطالعه زسپانسکی و همکاران بر روی بیماران مبتلا به سرطان حنجره نشان داده شد که بیان توموری TLR4 در مقایسه با سایر TLR های ارزیابی شده کمترین میزان را دارد. با این وجود سلول‌های التهابی در ناحیه تومور، TLR4 را در مقایسه با سایر TLR ها بیشتر بیان کرده بودند. آن‌ها اظهار کردند که TLR4 ممکن است در فرار تومور از سیستم ایمنی و گسترش آن نقش داشته باشد(۱۴). مشخص گردید که افزایش بیان TLR4 باعث افزایش رشد سلول‌های سرطانی و نیز افزایش فعالیت مسیر آنژیوژنز در ناحیه تومور می‌گردد. هم‌چنین TLR4 از طریق افزایش فعالیت MyD88، Cox-2 و TGFβ1 باعث مهار آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد(۹،۸).

ارزیابی بیان ژن TLR9 در مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش مرحله بیماری و گسترش تومور بیان آن نیز افزایش می‌یابد. در حالی که با افزایش درگیری غدد لنفاوی، میزان تمایز بافت تومور و هم‌چنین درگیری بافت اطراف تومور، بیان این ژن کاهش می‌یابد. علاوه براین، بیان TLR9 در بافت توموری نسبت به بافت سالم همان بیماران افزایش پیدا کرد. مین و همکاران نشان دادند که میزان بیان پروتئین TLR9(ارزیابی شده بروش وسترن بلات) در

بیماران مبتلا به کارسینومای سلول سنگ‌فرشی دهان و نیز رده سلولی Tca-8113 نسبت به بافت سالم از افزایش معنی‌داری برخوردار است(۱۶). با این حال در مطالعه آن‌ها فقط ۳ نمونه بافت سالم مجاور تومور در دسترس بود. مقایسه بیان TLR9 در بافت تومور (۶۰ نمونه) و بافت سالم با تعداد کم از نقاط ضعف مطالعه آن‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر اگرچه افزایش بیان TLR9 در بافت توموری نسبت به بافت سالم از نظر آماری معنی‌دار نبود، اما از آن‌جایی که ۳۵ نمونه بافت سالم مجاور تومور در دسترس بود این نتایج از درجه اطمینان و صحت بیشتری برخوردار است. ارزیابی بیان پروفایل TLR ها در رده سلولی Detroit-562 (رده سلولی کارسینومای سلول سنگ‌فرشی) نشان داد که این سلول‌ها TLR2 ، TLR3 و TLR5 را به مقدار بسیار زیاد بیان می‌کنند، در حالی‌که هیچ‌گونه بیان TLR9 در آن‌ها وجود نداشت(۱۷). برخی مطالعات نشان داده‌اند فعال شدن TLR9 که برروی سلول‌های توموری بیان می‌شود از طریق افزایش اینترلوکین ۶ و ۸، ماتریکس متالوپروتئینازها و سیکلواکسیژناز ۲ باعث افزایش تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌گردد(۱۰). با این حال برخی محققان معتقدند افزایش بیان و فعال شدن TLR9 باعث از بین رفتن تومور می‌گردد(۱۱).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن‌های TLR2، TLR4 و TLR9 در تومورهای جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان حنجره با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک مانند درگیری غدد لنفاوی، درگیری بافت اطراف تومور، وجود متاستاز ناحیه‌ای و مرحله بیماری ارتباط دارد، ولی از نظر آماری این ارتباط معنی‌دار نبود. علاوه بر این، اگرچه مقایسه بیان این ژن‌ها در بافت توموری نسبت به بافت سالم مجاور آن تغییراتی را نشان داد، اما چشم‌گیر نبود. این الگوی بیان ژن‌های TLRs در سرطان حنجره ممکن است ناشی از مهاجرت سلول‌های التهابی به ناحیه تومور بوده باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد بیان این ژن‌ها با روش‌های دیگر نظیر ایمنوهیستوشیمی نیز مورد مطالعه قرار گیرد تا علاوه بر تأیید این نتایج، سلول‌های بیان کننده مولکول‌های TLR نیز دقیقاً مشخص گردند.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان از همکاری آن معاونت در اجرای این طرح صمیمانه سپاس گزاری می‌نمایند.

منابع

1. Saedi B, Razmpa E, Sadeghi M, Mojtahed M, Mojtahed A. The epidemiology of laryngeal cancer in a country on the esophageal cancer belt. Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery. 2009; 61(3):213-7.
2. Maasland DH, van den Brandt PA, Kremer B, Goldbohm RAS, Schouten LJ. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. BMC cancer. 2014; 14(1): 187-8.
3. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annual review of immunology. 2003; 21(1): 335-76.
4. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human ATP-binding Cassette and Solute Carrier Transporter Superfamiies. Drug metabolism and pharmacokinetics. 2005; 20(6):452-77.
5. Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. Trends in immunology. 2005; 26(10):509-11.
6. Mai CW, Kang YB, Pichika MR. Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. OncoTargets and therapy. 2013; 6:1573-87.
7. Lu H, Yang Y, Gad E, Inatsuka C, Wenner CA, Disis ML, et al. TLR2 agonist PSK activates human NK cells and enhances the antitumor effect of HER2-targeted monoclonal antibody therapy. Clinical Cancer Research. 2011; 17(21):6742-53.

8. Oldford SA, Haidl ID, Howatt MA, Leiva CA, Johnston B, Marshall JS. A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth. The Journal of Immunology. 2010; 185(11):7067-76.
9. Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Harasymczuk M, Boyiadzis M, Kruk-Zagajewska A, et al. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. Cancer research. 2009; 69(7):3105-13.
10. Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, et al. Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. International journal of oncology. 2010; 37(4):805-14.
11. Brignole C, Marimpietri D, Di Paolo D, Perri P, Morandi F, Pastorino F, et al. Therapeutic targeting of TLR9 inhibits cell growth and induces apoptosis in neuroblastoma. Cancer research. 2010;70(23):9816-26.
12. Whiteside TL, editor. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. Seminars in cancer biology.2006; 16:3-15.
13. Ng L, Rich A, Hussaini H, Thomson W, Fisher A, Horne L, et al. Toll-like receptor 2 is present in the microenvironment of oral squamous cell carcinoma. British journal of cancer. 2011; 104(3):460-3.
14. Szczepański M, Stelmachowska M, Stryczyński Ł, Golusiński W, Samara H, Mozer-Lisewska I, et al. Assessment of expression of toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. European archives of oto-rhino-laryngology. 2007;264(5):525-30.
15. Bergmann C, Bachmann HS, Bankfalvi A, Lotfi R, Pütter C, Wild CA, et al. Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas. J Transl Med. 2011; 9:139-40.
16. Ruan M, Zhang Z, Li S, Yang W, Wang L, Zhang C. Increased expression of Toll-like receptor-9 has close relation with tumour cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. Archives of oral biology. 2011; 56(9):877-84.
17. Rydberg C, Månsson A, Uddman R, Riesbeck K, Cardell LO. Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas. Immunology. 2009; 128(1pt2): e600-e11.