Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 21(130): 21-30

Overexpression of TRAF4 Gene in Ovarian Cancer Samples and Association with Metastasis and Poor Prognosis in Patients

Parvin Javdan[1], Somayeh Reiisi[2*], Parisa Mohammadi Nejad[3]

1. M.Sc in Genetics, Department of Genetics, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Assistant Professor, Department of Genetics, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 28 Nov 2017, Accepted: 28 Feb 2018

Abstract

Background: Ovarian cancer is one of the common malignancies within gynecological cancers. Its lethality may be due to problems in distinguishing it at an early stage and lack of effective managements for patients with a progressive or recurrent status. Therefore, there is an essential need for prognostic biomarkers to diagnose or identifying mechanism of disease for effective treatment. It has been found out that, TRAF4 gene was significantly transformed in different cancers. Therefore, the aim of the present study was to investigate the TRAF4 gene expression in ovarian cancer.

Materials and Methods: In this study, 40 formalin fixed paraffin embedded tumoral tissues of ovarian cancer and 40 non-tumoral tissues were enrolled. Afterwards total RNA extraction and cDNA was synthesized, the relative gene expression was determined using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and evaluated by 2-ΔΔct method. Finally, the expression pattern was analyzed by statistical analysis.

Results: The results of recent study showed that TRAF4 expression was significantly increased in tumoral samples (p=0.0001). According to the study of demographic and clinopathology information with gene expression, there was seen a significant relationship between metastasis and up-regulation of gene. Also, there was a higher expression in TRAF4 gene in patient's ≤ 48 years old.

Conclusion: According to different studies, it seems that TRAF4 over expression is likely due to amplification of gene copies in chromosomal zone in cancers. Considering the results of present study and the over expression of TRAF4 in ovarian cancer specimen, especially over expression in patients≤48 years old, TRAF4 gene can be considered as a diagnostic biomarker.

Keywords: Gene expression, Ovarian cancer, Real time PCR, TRAF4

*Corresponding Author:
Address: Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
Email: s.reiisi@sci.sku.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۱، شماره ۱ (شماره پیاپی ۱۳۰)، فروردین ۱۳۹۷، ۳۰-۲۱

افزایش بیان TRAF4 در نمونه‌های سرطانی تخمدان و همراهی آن با متاستاز و پیش آگهی پایین در بیماران

پروین جاودان[۱]، سمیه رئیسی[۲*]، پریسا محمدی نژاد[۳]

۱.کارشناسی ارشد ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲.استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳.استادیار، گروه ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۷، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۹

چکیده

زمینه و هدف: سرطان تخمدان یکی از بدخیمی‌های شایع درمیان سرطان‌های زنان به شمار می رود. یکی از دلایل کشنده بودن این عارضه می‌تواند به دلیل عدم تشخیص در مراحل اولیه بیماری و فقدان درمان موثر برای بیماران با حالت پیشرفته سرطان یا عود مجدد آن باشد. بنابراین یک نیاز فوق العاده برای شناسایی بیومارکرهای تشخیصی یا شناسایی مکانیسم بیماری برای درمان موثر وجود دارد. یکی از ژن‌هایی که در سرطان‌های مختلف دارای تغییرات قابل توجهی بوده است، ژن TRAF4 می باشد. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی ژن TRAF4 در سرطان تخمدان بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۴۰ بافت پارافینه توموری تخمدان و ۴۰ بافت غیرتوموری وارد شدند. پس از استخراج RNA تام و سنتز cDNA، بیان نسبی ژن با استفاده از روش کمی Real-time PCR (qRT-PCR) سنجیده و سپس از طریق روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ آنالیز شد. در نهایت، تغییرات بیانی توسط روش‌های آماری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از بررسی اخیر نشان داد که بیان TRAF4 در نمونه‌های توموری به صورت معناداری دارای افزایش می یابد ($p=۰/۰۰۰۱$). در بررسی ارتباط بیان ژن با اطلاعات دموگرافیک و کلینوپاتولوژی، ارتباط معناداری میان نمونه های متاستاز مثبت و افزایش بیان ژن مشاهده شد. هم‌چنین مشخص شد که میزان بیان TRAF4 در افراد ۴۸ ساله یا پایین تر از آن، افزایش یافته است.

نتیجه گیری: با توجه به مطالعات مختلف، به نظر می رسد افزایش بیان TRAF4 احتمالا به علت تکثیر تعداد کپی‌های ژنی در ناحیه کروموزومی در سرطان‌ها است. با توجه به نتایج این مطالعه و افزایش بیان TRAF4 در نمونه‌های واجد سرطان تخمدان، به ویژه افزایش بیان در افراد ۴۸ ساله یا پایین تر از آن، TRAF4 احتمالاً می‌تواند به عنوان یک مارکر تشخیصی مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سرطان تخمدان، TRAF4، بیان ژن، Real time PCR

***نویسنده مسئول:** ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

Email: s.reiisi@sci.sku.ac.ir

مقدمه

سرطان تخمدان یکی از انواع سرطان های بدخیم در زنان است؛ در این نوع از سرطان، سلول های معینی درون تخمدان غیرطبیعی شده و به صورت غیرقابل کنترلی تکثیر می یابند تا این‌که تبدیل به یک تومور شوند (۱). از آن‌جا که اکثر بیماران در مراحل اولیه، در ظاهر فاقد هر گونه علائمی هستند، تا زمانی که بیمار دچار عارضه نشود، بیماری تشخیص داده نمی‌شود. بنابراین به دلیل تشخیص دیررس بیماری، میزان مرگ و میر در سرطان تخمدان فراوانی بالایی را نشان داده است (۲). باتوجه به تشخیص دیرهنگام بیماری، درمان این سرطان مشکل است و سالیانه منجر به مرگ حدود ۲۲۰۰۰ زن در امریکا می شود، به طوری که ریسک خطر ابتلای هر زن برای سرطان تخمدان ۱ در هر ۷۵ نفر است (۳، ۴). علیرغم مشخص نبودن علت قطعی برای ایجاد سرطان تخمدان، می توانیم از علت‌های ایجاد بیماری فوق به عوامل ژنتیکی و وراثتی اشاره کنیم. سرطان های ارثی تخمدان نسبت به موارد غیر ارثی (اسپورادیک) در سنین پائین تر بروز می‌کنند (۵). با این وجود، بیشتر موارد سرطان تخمدان اسپورادیک هستند. در این حالات تغییرات ژنتیکی مرتبط در طول عمر فرد رخ می دهند و تنها در سلول های خاصی از تخمدان ظاهر می شوند (۷-۵). علیرغم این‌که سرطان تخمدان بیشترین میزان مرگ و میر در میان سرطان های زنان را دارد، مسیرها و روش‌های تشخیصی موثری یافت نشده است. روش‌های غربال‌گری معمول برای تشخیص سرطان تخمدان شامل معاینه بالینی، فاکتور CA-125 و سونوگرافی بوده که تنها به شناسایی حدود ۴۰ درصد زنان مبتلا کمک می کند (۸). بنابراین امروزه شناسایی فاکتورهای مولکولی که بتواند به عنوان بیومارکر در تشخیص سریع‌تر بیماری در مراحل اولیه یا شناسایی مسیر درمانی مناسب با نوع تومور مفید باشد، هدف اصلی بسیاری از مطالعات است. در سال‌های اخیر، پژوهش های بسیاری برای ارزیابی تغییرات ژنی مؤثر در سرطان تخمدان شامل جهش های ژنی و تغییرات بیانی در آن‌ها صورت گرفته است و بیشترین کمک در درک سرطان، حاصل پیشرفت مطالعات بیولوژی مولکولی است. از طرف دیگر، با پیشرفت تکنولوژی نقش بیومارکرهای تشخیصی در این زمینه پررنگ‌تر شده است. مطابق با این مطالعات، از جمله ژن‌های مؤثر در بروز این سرطان، ژن TRAF4 است. این ژن، کد کننده یک فاکتور همراه شونده با رسپتور TNF بوده و عضو یک خانواده پروتئینی با شش عضو می‌باشد. پروتئین های خانواده TRAF در انتقال سیگنال از طریق فاکتور نکروز توموری دخالت دارند، به صورتی که پروتئین های ذکر شده متعلق به یک خانواده از واسطه های سیتوپلاسمی درگیر در مسیر پیام رسانی فعال شده توسط فاکتور همراهی نکروز توموری و اینترلوکین-۱/پذیرنده شبه Toll (IL-1R/TLR) هستند (۹). شش پروتئین این خانواده دارای ویژگی های ساختاری مشترکی هستند، از جمله یک بخش انتهای کربوکسی TRAF که توسط ژنوم پستانداران کد می شود. پروتئین های TRAF، خانواده ای از پروتئین های داربستی هستند (۱۰) که عملکرد اصلی این پروتئین ها، استفاده در عملکردهای مختلفی در سیستم ایمنی است. (۱۳-۱۱). یکی از اعضای این خانواده TRAF4 می باشد که برخلاف سایر اعضای خانواده، عملکرد بیولوژیکی آن هنوز کاملا مشخص نشده است. TRAF4 اولین عضو از خانواده پروتئینی TRAF است که بیان بالای آن در کارسینومای انسانی یافت شد و موقعیت ژنی آن بر روی کروموزوم 17q11.2 است(۱۳، ۱۴). در واقع رونوشت های مکمل این ژن ابتدا از سرطان سینه متاستازی جدا شد (۱۵). ژن TRAF4 عضو منحصر به فرد در میان خانواده ژن TRAF است که دارای عملکردهای حیاتی در سیستم ایمنی است، به صورتی که فاکتورهای رونویسی کلیدی و مهمی را در مسیرهای ایمونولوژیک فعال می کند. TRAF4 به عنوان ژن تنظیم کننده مثبت در سرطان‌های انسانی شناخته شده است (۹). در برخی مطالعات ارتباط میان مسیر پیام رسانی Wnt و ژن TRAF4 با سرطان تخمدان نیز کشف شده است؛ اما با این

وجود، نحوه اثر این ژن از طریق مسیر Wnt در سرطان تخمدان به درستی مشخص نشده است (۱۶، ۱۷). تاکنون تحقیقات اندکی بر روی تأثیر این ژن در سرطان تخمدان صورت گرفته است و اطلاعات بسیار محدودی در این رابطه وجود دارد. از آن‌جایی که تغییرات بیان ژن TRAF4 در سرطان‌های مختلف نقش مهمی ایفا می‌کند و با توجه به دخالت خانواده ژنی TRAFها در بسیاری از بیماری‌های انسانی، از جمله سرطان و بیماری‌های خود ایمنی و التهابی(۱۸، ۱۹)، به نظر می‌رسد مشخص شدن تاثیرات این ژن در سرطان تخمدان و ارتباط آن با موارد کلینوپاتولوژی می-تواند مقدمه ای برای تشخیص مکانسیم بیماری و نیز نزدیک شدن به این باور باشد که ژن مورد بررسی به عنوان بیومارکر در تشخیص زودهنگام به کار گرفته می‌شود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر برای بررسی بیان ژنی از بافت های پارافینه سرطان تخمدان استفاده شد. مطالعه به صورت مورد-شاهدی انجام پذیرفت. به طوری که برای بررسی، ۴۰ بافت توموری سرطان تخمدان و ۴۰ بافت غیرتوموری انتخاب شدند (نمونه ها به صورت تصادفی و از آزمایشگاه پاتولوژی الزهرا اصفهان تهیه گردیدند). نمونه‌ها از بلوک های پارافینه به دست آمدند و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در دمای ۲۰- درجه ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. از تمام بیماران در دسترس فرم رضایت نامه دریافت گردید و علاوه بر سن، اطلاعات پاتولوژی و بالینی بیماران مانند اندازه تومور، متاستاز و درجه توموری نیز برای هر نمونه مشخص شد. برای بررسی بیان ژنی، آزمایشات طی سه مرحله و مطابق با روش های استاندارد صورت گرفت.

RNA تام سلولی توسط کیت استخراج MN Macherey-Nagel Nucleo Spintotal RNA) FFPE-Germany) استخراج و بر اساس دستورالعمل کیت خالص سازی شد. بدین منظور ابتدا پارافین زدایی از برش های بافتی انجام شده و سپس سایر مراحل استخراج بر روی بافت بدون پارافین صورت گرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت RNA های استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. RNA های به دست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد، سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت مخصوص سنتز (Takara, Clontech) انجام شد. دستورالعمل کیت شامل دو مرحله است: مرحله اول، اضافه کردن پرایمرهای هگزامر تصادفی و oligo-dt همراه با آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Prime Script RT) و مرحله دوم، انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد. سپس cDNA های ساخته شده برای انجام تست های مولکولی استفاده شدند. به منظور بررسی بیان کمی ژن ابتدا طراحی پرایمر برای ژن‌های GAPDH به عنوان کنترل داخلی واکنش و TRAF4 طبق توالی به دست آمده از پایگاه Ensemble توسط نرم افزار Oligo V.7.0 انجام شد (جدول۱) (۲۰). بررسی بیان ژن با روش سایبرگرین به وسیله دستگاه Rotor-gene 6000 (Qiagen, Hildn, Germany) انجام شد. واکنش برای ژن TRAF4 و ژن رفرنس GAPDH در حجم ۱۵ میکرولیتر به صورت SYBR premix Ex taqII (YTA) به مقدار ۷/۵ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و معکوس (۱۰پیکومولار) هر کدام به مقدار ۰/۲ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر از cDNA رقیق شده که در نهایت با آب عاری از نوکلئاز به حجم مورد نظر رسید، صورت گرفت. دمای انجام واکنش در دستگاه به صورت زیر تنظیم شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل واکنش تکثیر شامل ۵ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه دمای اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای طویل سازی قطعات ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. مرحله ذوب برای محصولات در دمای ۷۲

تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از واکنش، از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد.

جهت بررسی آماری داده ها، از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS v.22 Inc., Chicago,IL) استفاده شد. آزمون آماری تی تست برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن ها در نمونه های توموری و غیرتوموری و بررسی گروه های سنی، اندازه تومور و متاستاز استفاده شد. برای بررسی ارتباط میزان بیان ژن و درجه توموری و هم‌چنین نوع سرطان تخمدان از روش آنووا استفاده شد (۲۱). سطح معنی‌داری برای محاسبات آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Graph Pad Prism 7 استفاده شد.

جدول ۱. توالی های پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

نام ژن	توالی '3-5'	دمای ذوب (Tm)	اندازه محصول
GAPDH	F: TGTGGGCATCAATGGATTTGG R: ACACCATGTATTCCGGGTCAAT	۵۸/۲ ۵۹/۵	۱۱۶ جفت باز
TRAF4	F: AGGAGTTCGTCTTTGACACCATC R: CTTTGAATGGGCAGAGCACC	۶۰/۲ ۶۱/۵	۱۶۲ جفت باز

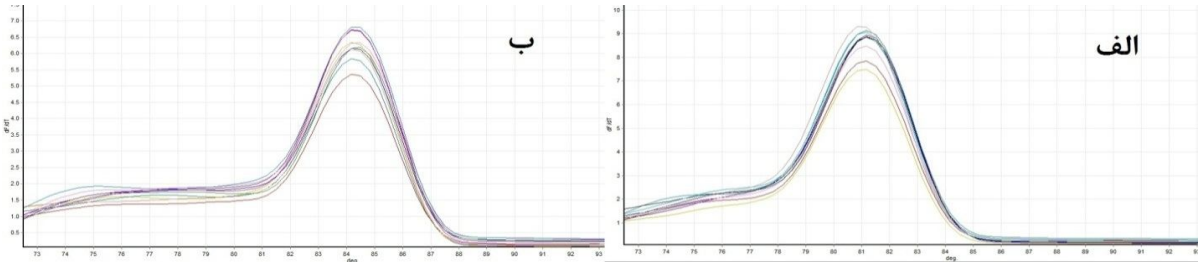
یافته‌ها

در این مطالعه ۴۰ بافت توموری سرطان تخمدان به همراه ۴۰ بافت غیرتوموری وارد شدند.

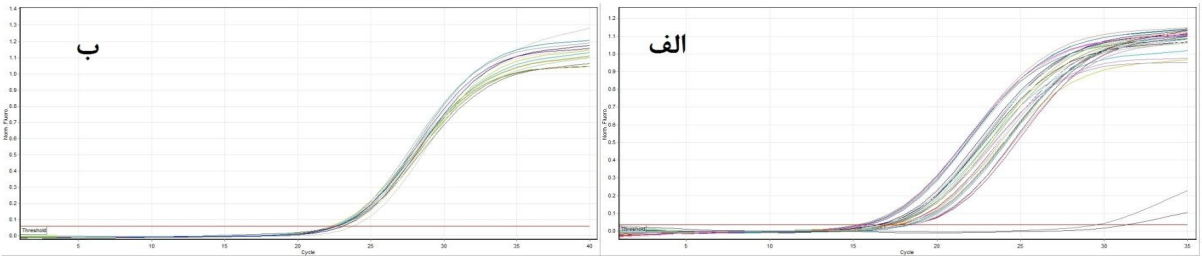
جدول ۲ خلاصه ای از اطلاعات کلینوپاتولوژی مربوط به نمونه های مورد بررسی را ارائه می دهد. برای بررسی بیان ژن از روش qRT-PCR استفاده شد که منحنی ذوب ژن رفرنس داخلی (GAPDH) و ژن اختصاصی (TRAF4) به صورت تک قله به دست آمد (شکل ۲). سپس بررسی بیان ژن برای تمامی نمونه ها انجام گرفت و بیان نسبی برای هر نمونه تعیین شد (شکل ۳).

جدول ۲. اطلاعات دموگرافی و کلینوپاتولوژی مربوط به نمونه های بررسی شده

اطلاعات بالینی بیماران		تعداد
میانگین سنی در افراد دارای تومور		۴۸/۵۵±۰/۲۵
میانگین سنی در افراد فاقد تومور		۴۵/۹۸±۰/۵۶
میانگین اندازه تومور		۵/۵±۰/۱۵
متاستاز	مثبت	۲۳ (٪ ۵۷/۵)
	منفی	۱۷ (٪ ۴۲/۵)
درجه توموری	۱	۹ (٪ ۲۲/۵)
	۲	۱۲ (٪ ۳۰)
	۳	۱۹ (٪ ۴۷/۵)
انواع سرطان تخمدان	سیروز	۲۹ (٪ ۷۲/۵)
	اندومتروییید	۶ (٪۱۵)
	موسینوس	۵ (٪ ۱۲/۵)

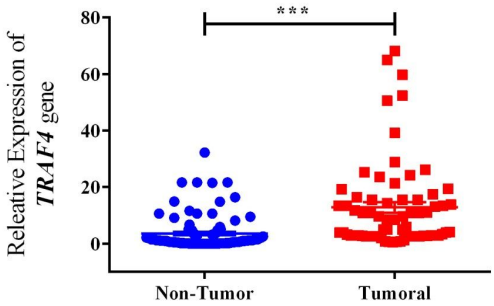


شکل ۲. الف)نمودار ذوب ژن GAPDH، ب) نمودار ذوب ژن TRAF4. وجود یک قله در نمودار به معنی اختصاصی بودن پرایمرها می باشد.



شکل ۳. الف)نمودارتکثیر ژن GAPDH، ب) نمودار تکثیر ژن TRAF4.

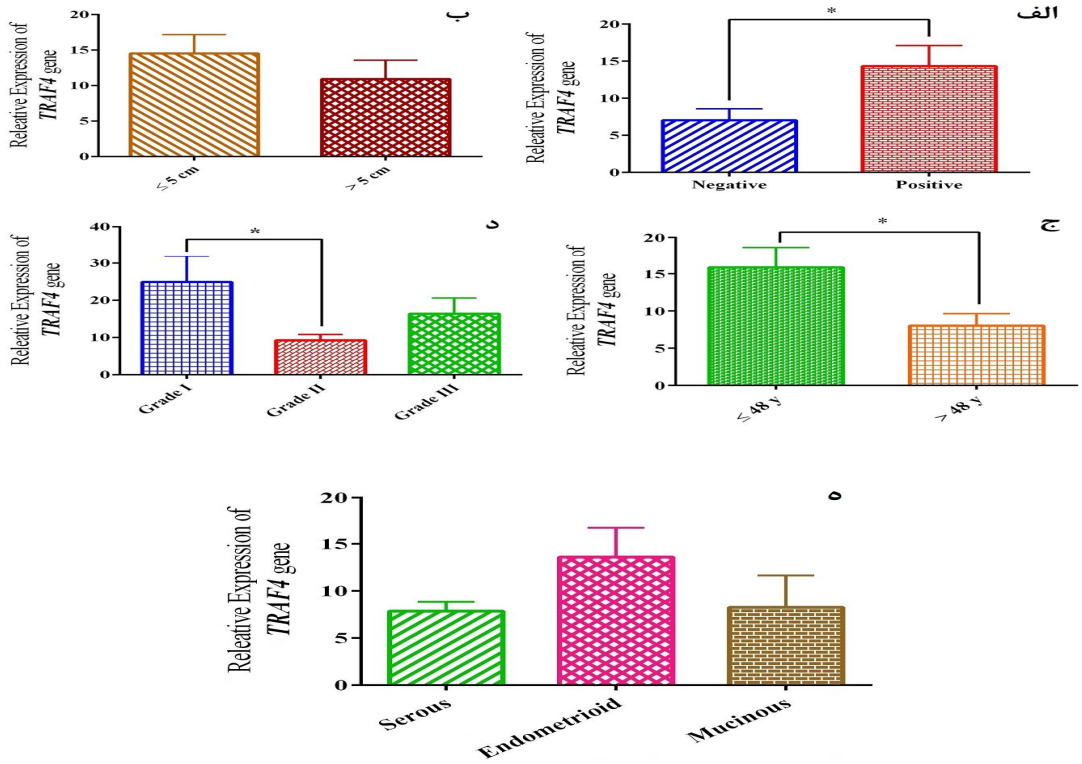
در مقایسه میانگین بیان نسبی ژن TRAF4 در بافت های توموری نسبت به بافت غیرتوموری، مشخص شد که میانگین بیان نسبی ژن TRAF4 در بافت توموری نسبت به بافت سالم دارای افزایش مشخصی می باشد و تفاوت بیان در دو گروه مورد بررسی اختلاف بسیار معناداری را نشان داد (p=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه میانگین بیان نسبی ژن TRAF4 در بافت های توموری و غیرتوموری در سرطان تخمدان. علامت ***در بالای نمودار نشان دهنده سطح معناداری در آزمون آماری انجام شده می باشد. (p=۰/۰۰۰۱)

علاوه بر بررسی میزان بیان ژن TRAF4 در بافت-های سرطانی تخمدان و بافت‌های سالم، میزان بیان ژن در گروه های دموگرافی و کلینوپاتولوژی نیز مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا ارتباط میزان بیان ژن با متاستاز تومورهای تخمدان به سایر نواحی (رحم، ناحیه شکمی و حفره صفاقی و روده ها) سنجیده شد (نمودار۲-الف) و مشخص شد که بیان ژن در حالت متاستازی نسبت به غیر متاستازی دارای افزایش مشخص می‌باشد (p=۰/۰۴). در بررسی ارتباط بیان ژن با اندازه توموری، با توجه به این‌که میانگین اندازه تومورها در حدود ۵ سانتی‌متر محاسبه شد، نمونه ها به دو دسته اندازه تومور کوچک‌تر و مساوی ۵ سانتی‌متر و بزرگتر از ۵ سانتی-متر تقسیم شدند. بیان ژن در هر دو گروه ارزیابی شد (نمودار۲-ب) و تفاوت معناداری در میزان بیان TRAF4 در این دو گروه مشاهده نشد (p=۰/۳۳).

در بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان ژن TRAF4 در افرادکوچک‌تر و برابر با ۴۸ سال، افزایش بیان ژن مشاهده شد (نمودار۲-ج) و تغییر بیان در این دو گروه از نظر آماری به صورت معنادار بود (p=۰/۰۳). در بررسی‌های کلینوپاتولوژی ارتباط میان درجه توموری (۱، ۲ و ۳) و میزان بیان ژن نیز سنجیده شد. مطابق با آنالیزهای انجام شده، افزایش بیان ژن به صورت معنادار در درجه۱ توموری مشاهده شد و سایر درجات تغییر قابل ملاحظه ای را نشان ندادند (نمودار۲-د) (p=۰/۰۱). برای مشخص شدن ارتباط بیان ژن با نوع سرطان تخمدان و تاثیر جایگاه تومور بر روی میزان بیان ژن، همراهی بین بیان ژن TRAF4 و محل درگیری تومور (بافت اندومتروئیدی، موسینی و مخاطی) نیز سنجیده شد (نمودار ۲-ه). مطابق با بررسی انجام شده، افزایش بیان ژن در بافت توموری اندومتروئیدی وجود داشته، اما با این وجود این تغییر به صورت معنادار نبود. بنابراین می توان بیان کرد که جایگاه توموری تاثیری در میزان بیان ژن نداشته است.



نمودار۲. مقایسه میزان بیان نسبی ژن TRAF4 در الف) بافت های با متاستاز منفی و مثبت، ب) اندازه توموری، ج) گروه های سنی زیر یا برابر با ٤٨ سال و بالای آن، د) درجه توموری، ه) محل درگیری تومور.

بحث

در مطالعه حاضر بیان ژن TRAF4 در سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن TRAF4 در نمونه‌های توموری و سالم دارای اختلاف معناداری بوده و میزان بیان ژن مورد بررسی در نمونه‌های توموری افزایش یافته است. بررسی مطالعات گذشته بر روی تغییرات بیان ژن TRAF4 در سرطان‌های مختلف حاکی از توافق میان پژوهش اخیر و نتایج به دست آمده از سایر پژوهش‌ها است؛ به صورتی که در مطالعات مختلف مشخص شده است که افزایش بیانTRAF4 یک ویژگی مشترک در اغلب کارسینوماهای انسانی از جمله سینه، پروستات، ریه و پانکراس می باشد (۱۸، ۲۲). نکته قابل توجه در مطالعات این است که یکی از مکانیسم های افزایش بیان پروتئین TRAF4 در سرطان های انسانی مضاعف شدن ژنی می باشد. TRAF4 در ناحیه ای از تزاید ژنی قرار گرفته است که فاقد هرگونه انکوژن شناخته شده است. در مطالعه حاضر نیز این مورد به وضوح قابل مشاهده است، به صورتی که میزان افزایش حدود ۴ برابری در نمونه های توموری تخمدان مشاهده شد. در بررسی های انجام شده بر روی سلول های سرطانی سینه در مقایسه با سلول نرمال سینه توسط ژنگ و همکاران مشخص شد که در محیط آزمایشگاهی، TRAF4 بیان بالاتری در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال سینه نشان می‌دهد. هم‌چنین بیان TRAF4 در لاین‌های سلولی سرطان سینه با بیان مثبت گیرنده استروژن، بالاتر از رده‌های سلولی سرطان سینه بدون بیان گیرنده استروژن بود (۲۳). در مطالعه حاضر مشخص شد که بیان ژن TRAF4 می تواند بر روی متاستاز نمونه های توموری موثر باشد. به صورتی که در نمونه های متاستاز مثبت

افزایش حدود ۲ برابری بیان ژن مشاهده شد. بنابراین با توجه به مطالعات مختلف، احتمالاً یکی از مسیرهای درگیر در تکثیر و مهاجرت سلولی با واسطه این ژن در اینجا نقش ایفا می کند. در مطالعه ای بر روی سلول های سرطانی سینه مشخص شد که خاموش کردن TRAF4 باعث کاهش رشد سلولی، مهاجرت و تهاجم می‌شود (۲۴). به همین منظور برای مشخص شدن این عملکرد که با استفاده از RNA تداخل‌گر (si-RNA)، بیان ژن TRAF4 را مهار کردند، مشخص شد که میزان بیان بتا–کاتنین و سیکلین D1 و هم‌چنین پروتئین C-MYC به طور قابل توجهی در سلول‌های سرطانی کولون مهار شدند. نتایج حاصل از این مطالعه ثابت می‌کند که TRAF4 باعث افزایش رشد سلول و تهاجم توسط افزایش فعالیت مسیر پیام رسانی Wnt/β-catenin می‌شود (۱۷). در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۱۳ نیز مشخص شد که TRAF4می تواند مانع از تخریب بتا-کاتنین توسط P53 شود و در نتیجه مسیر پیام رسانی Wnt را تقویت کند. هم-چنین در مطالعات دیگر، نقش ژن TRAF4 در مسیر پیام رسانی TGF-β آشکار شد. یکی از مولکول های کلیدی در مسیر پیام رسانی TGF-β، مولکول Akt می باشد. ژوانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۴، تعامل مستقیمی میان Akt و TRAF4 نشان دادند. علاوه بر این، بیان بیش‌ازحد Akt فعال شده، مهار رشد سلولی را در سلول‌هایی که ژن TRAF4 درآن‌ها خاموش شده، تغییر می‌دهد. در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که TRAF4 نقش مهمی در ایجاد تومور سرطان از طریق تعامل مستقیم و فعال کردن AKT بازی می‌کند و TRAF4 می‌تواند به عنوان یک هدف مولکولی بالقوه برای پیش‌گیری و درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد (۲۵).

از طرف دیگر با بررسی ارتباط میان اندازه تومور و نوع بافت توموری درگیر در سرطان تخمدان، مشخص شد که هیچ‌گونه ارتباط معناداری میان این دوفاکتور و میزان بیان ژن TRAF4 وجود ندارد. با این وجود در نوع بافت های توموری تخمدان، بیان ژن TRAF4 در نوع اندومتروئیدی به طور قابل توجهی بیشتر می باشد. این یافته با مطالعات مدل‌های حیوانی سرطان تخمدان اندومترئیدی سازگاری داشته، به صورتی که در این مدل های حیوانی نشان داده شد مسیر پیام رسانی Wnt درگیر می شود و با توجه به ارتباط بین مسیر Wnt و TRAF4 می‌توان گفت در تومورهای اندومتروئیدی، فعال بودن بیشتر این مسیر می‌تواند سبب افزایش بیان ژن در بافت اندومتروئید شود(۲۶، ۲۷). البته با توجه به این‌که در تقسیم بندی های انجام شده برای درجه توموری و نوع بافت درگیر، در توزیعات درون گروهی گاهاً تعداد کمی از نمونه ها قرار می‌گیرد، با توجه به این موضوع عدم معنی داری انتظار می رود. بنابراین نمونه گیری از بیماران یکی از محدودیت ها در مطالعات بالینی می باشد که در این مطالعه نیز ناگزیر بوده است.

علاوه بر این افزایش بیان ژن مورد مطالعه در گروه سنی زیر ۴۸ سال به صورت معناداری مشاهده شد. این افزایش بیان حدوداً دو برابری در این گروه سنی می تواند به عنوان یک مارکر آگهی دهنده در بررسی بیماری باشد. یکی از دلایل افزایش بیان در سنین پایین می تواند ارتباط آن با هورمون های استروئیدی باشد که در این محدوده سنی بیان بیشتری نسبت به دوره یائسگی دارند. در مطالعه ای توسط ژی و همکاران نشان داده شد که TRAF4 در پایین دست ژن فعال‌کننده کمکی گیرنده استروئید قرار دارد، به طوری که یک فعال‌کننده کمکی برای گیرنده هسته‌ای سرطانی می‌باشد (۱۶). اما در سایر مطالعات عدم بررسی چنین فاکتوری در سرطان های مختلف بحث در مورد آن را مشکل می سازد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات مختلف در انواع سرطان‌های انسانی نشان می‌دهد که TRAF4 می‌تواند نقش مهمی در ایجاد تومور و پیشرفت آن در انواع سرطان داشته باشد. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز سازگاری داشته و تومورزایی

ژن مورد مطالعه را در سرطان تخمدان اثبات می کند. علاوه بر این، از آن‌جایی که افزایش بیان ژن در سنین زیر ۴۸ سال و هم‌چنین بافت اندومتروئیدی مشاهده شده است، می‌توان این احتمال را داد که TRAF4 به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص و یا تعیین مسیردرمانی مناسب برای سرطان تخمدان به کار رود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از نتایج حاصل از پایان نامه نویسنده نفر اول می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در به انجام رساندن این مطالعه همکاری نمودند، ابراز می‌دارند.

منابع

1.Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial. Jama. 2011; 305(22):2295-303.

2.Jiang S-W, Chen H, Dowdy S, Fu A, Attewell J, Kalogera E, et al. HE4 transcription-and splice variants-specific expression in endometrial cancer and correlation with patient survival. International journal of molecular sciences. 2013;14(11):22655-77.

3.Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. The Lancet. 2014; 384(9951):1376-88.

4.Reade CJ, McVey RM, Tone AA, Finlayson SJ, McAlpine JN, Fung-Kee-Fung M, et al. The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. 2014; 36(2):133-40.

5.Kim Y-M, Lee S-W, Chun S-M, Kim D-Y, Kim J-H, Kim K-R, et al. Analysis and comparison of somatic mutations in paired primary and recurrent epithelial ovarian cancer samples. PloS one. 2014;9(6):e99451.

6.Dietl J. Revisiting the pathogenesis of ovarian cancer: the central role of the fallopian tube. Archives of gynecology and obstetrics. 2014; 289(2):241-6.

7.Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, Contu G, Grandi G, Cagnacci A, et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. BioMed research international. 2015;2015.

8.Bast Jr RC, Klug TL, John ES, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. New England journal of medicine. 1983;309(15):883-7.

9.Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. Journal of cell science. 2002; 115(4): 679-688

10.Gil J, García MA, Gomez-Puertas P, Guerra S, Rullas J, Nakano H, et al. TRAF family proteins link PKR with NF-κB activation. Molecular and cellular biology. 2004;24(10):4502-12.

11.Rousseau A, Tomasetto C, Alpy F. TRAF4, a multifaceted protein involved in carcinoma progression. Biologie aujourd'hui. 2014;208(4):299-310.

12.Yang F, Li Z, Deng H, Yang H, Yan F, Qian Z, et al. Efficient inhibition of ovarian cancer growth and prolonged survival by transfection with a novel pro-apoptotic gene, hPNAS-4, in a mouse model. Oncology. 2008;75(3-4):137-44.

13.Yang K, Wang F, Han J-J. TRAF4 promotes the growth and invasion of colon cancer through the Wnt/B-catenin pathway. International journal of clinical and experimental pathology. 2015; 8(2): 1419-1426.

14.Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2010;66(2):213-21.

15.Régnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, Chenard M-P, Wendling C, Basset P, et al. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor

receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. Journal of Biological Chemistry. 1995; 270(43):25715-21.
16.Xie P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. Journal of molecular signaling. 2013;8(1):7.
17.Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. Nature. 2002; 418(6896):443-8.
18.Camilleri-Broet S, Cremer I, Marmey B, Comperat E, Viguie F, Audouin J, et al. TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. Oncogene. 2007; 26(1).
19.Marinis JM, Homer CR, McDonald C, Abbott DW. A novel motif in the Crohn's disease susceptibility protein, NOD2, allows TRAF4 to down-regulate innate immune responses. Journal of Biological Chemistry. 2011;286(3):1938-50.
20.Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software :Springer; 2007.
21.Cuevas A, Febrero M, Fraiman R. An anova test for functional data. Computational statistics & data analysis. 2004;47(1):111-22.
22.Li R, Wang H, Bekele B, Yin Z, Caraway N, Katz R, et al. Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach. Oncogene. 2006;25(18):2628-35.
23.Zheng H, Kavanagh JJ, Hu W, Liao Q, Fu S. Hormonal therapy in ovarian cancer. International Journal of Gynecological Cancer. 2007;17(2):325-38.
24.Ben Q, An W, Fei J, Xu M, Li G, Li Z, et al. Downregulation of L1CAM inhibits proliferation, invasion and arrests cell cycle progression in pancreatic cancer cells in vitro. Experimental and therapeutic medicine. 2014;7(4):785-90.
25.Zhuang H, Tan M, Liu J, Hu Z ,Liu D, Gao J, et al. Human epididymis protein 4 in association with Annexin II promotes invasion and metastasis of ovarian cancer cells. Molecular cancer. 2014;13(1):243.
26.Schwartz DR, Wu R, Kardia SL, Levin AM, Huang C-C, Shedden KA, et al. Novel candidate targets of β-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. Cancer research. 2003;63(11):2913-22.
27.Wu R, Hendrix-Lucas N, Kuick R, Zhai Y, Schwartz DR, Akyol A, et al. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/β-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. Cancer cell. 2007;11(4):321-33.