

Original Article

## *MLH1 Gene Expression and Pathologic Factors in Iranian Patients with Colorectal Cancer*

Ahdieh Hosseini Anvari<sup>1</sup> , Shahla Mohammad Ganji<sup>2\*</sup> , Tahereh Komeili Movahhed<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Department of Genetics, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Iran.

<sup>2</sup> Molecular Medicine Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> Cellular and Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

\*Corresponding Author:  
**Shahla Mohammad Ganji**;  
Molecular Medicine  
Department, National  
Institute of Genetic  
Engineering and  
Biotechnology, Tehran, Iran.

Email:  
shahla@nigeb.ac.ir

Received: 04 Jul, 2020  
Accepted: 26 Oct, 2020

### **Abstract**

**Background and Objectives:** *MutL* homolog (*MLH1*) is a key component of heterodimeric complex MutL $\alpha$ , which recognizes and repairs base-base mismatches or insertion/deletion loops that arise from nucleotide misincorporation. In the absence of *MLH1* protein, the number of unrepaired mismatches will increase and cause tumors in organs. The present study aimed at quantitative analysis of *MLH1* gene expression and its association with depth of tumor invasion (T) and lymph node invasion (N) factors in blood samples of Iranian patients with colorectal cancer (CRC).

**Methods:** Blood samples from 33 patients with CRC were collected. RNA (Ribonucleic acid) was extracted and cDNA (Deoxyribonucleic acid) was fabricated according to the kit protocol extracted. The primer was designed by the Exon-Exon Junction method, and Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) test was performed three times for *MLH1* and  $\beta$ -*actin* (Beta-actin) genes. Data were analyzed in REST 2009 Software, and a T-test was used to evaluate the expression of *MLH1* gene and its association with T and N factors.




**Results:** The results of Real-Time PCR in 33 patients with the male to female ratio of 42.5% to 57.5% and a mean age of 55 years demonstrated a significant decrease in *MLH1* gene expression in the late stages of the disease ( $P < 0.05$  \*). Furthermore, the reduction of expression in this gene was associated with T ( $P < 0.05$  \*) and N factors ( $P < 0.05$  \*).

**Conclusion:** As evidenced by the obtained results, a direct relationship was observed between decreased expression of *MLH1* gene and late stages of colorectal cancer. Moreover, the association of this gene with T and N factors was investigated and confirmed in several Iranian patients with colorectal cancer.

**Keywords:** Colorectal cancer; DNA mismatch repair; Gene expression; *MLH1*; Real-time polymerase chain reaction.

DOI: 10.29252/qums.14.8.62

## بررسی ارتباط بیان ژن *MLH1* و فاکتورهای پاتولوژیکی در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال

عهده حسینی انواری<sup>۱</sup> ، شهلا محمدگنجی<sup>۲</sup> \*، ظاهره کمیلی موحد<sup>۳</sup> 

### چکیده

**زمینه و هدف:** ژن *MLH1* (MutL homolog 1) عنصر اصلی هتروداایمر MutLa بوده و در ترمیم عدم تطابق باز-باز و لوپ حذف و اضافه نقش دارد. هنگامی که پروتئین *MLH1* حضور ندارد، تعداد خطاهایی که تعمیر نشده باقی می‌مانند، افزایش می‌یابد و این مهم می‌تواند منجر به ایجاد تومور در بدن شود. در این راستا، پژوهش حاضر با هدف بررسی کمی بیان ژن *MLH1* در نمونه خون بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال (CRC: Colorectal Cancer) و ارتباط آن با فاکتورهای مراحل پیشرفت تومور به لایه‌های دیواره روده (T) و مراحل تهاجم به گره لنفاوی (N) انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه نمونه خون ۳۳ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال جمع‌آوری شد. استخراج RNA (Ribonucleic acid) و ساخت cDNA (Complementary DNA) مطابق با پروتکل کیت صورت گرفت. پرایمر به روش Exon-Exon Junction طراحی شد و آزمون Real Time PCR (Real-time Polymerase Chain Reaction) برای ژن‌های *MLH1* و  $\beta$ -*actin* (Beta-actin) به صورت سه بار تکرار انجام شد. آنالیز نهایی نتایج با استفاده از نرم‌افزار Rest 2009 صورت گرفت و از آزمون T برای بررسی بیان ژن *MLH1* و ارتباط آن با فاکتورهای T و N در نمونه‌های موجود استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از Real Time PCR ۳۳ بیمار با میانگین سنی ۵۵ سال و درصد فراوانی ۴۲/۵ زن و ۵۷/۵ مرد، کاهش معنادار بیان ژن *MLH1* را در مراحل بالای بیماری نشان داد ( $P < 0.05^*$ ). همچنین ارتباط کاهش بیان این ژن با فاکتورهای T ( $P < 0.05^*$ ) و N ( $P < 0.05^*$ ) معنادار بود.

**نتیجه‌گیری:** بر مبنای نتایج، ارتباط مستقیمی میان کاهش بیان ژن *MLH1* و مراحل بالای سرطان کولورکتال مشاهده شد و ارتباط آن با فاکتورهای T و N در تعدادی از بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال بررسی و تأیید گردید.

**کلیدواژه‌ها:** بیان ژن؛ تعمیر ناسازگاری DNA؛ سرطان کولورکتال؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی؛ *MLH1*.

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران.

<sup>۲</sup> گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

شهلا محمدگنجی؛ گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:  
shahla@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Hosseini Anvari A, Mohammad Ganji S, Komeili Movahhed T. *MLH1* Gene Expression and Pathologic Factors in Iranian Patients with Colorectal Cancer. Qom Univ Med Sci J 2020;14(8):62-70. [Full Text in Persian]

## مقدمه

سرطان کولورکتال (CRC) یکی از رایج‌ترین انواع سرطان است که ۱/۲۳ میلیون نفر (۹/۷ درصد از کل سرطان‌ها) را در سال درگیر می‌کند و چهارمین علت مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان می‌باشد. در مردان و زنان تقریباً ۴/۳ درصد خطر CRC وجود دارد (۱). میزان بروز CRC در بیشتر کشورهای خاورمیانه ۳۰-۵۰ مورد و در شمال آمریکا و اروپا ۷-۳ مورد (در صد هزار نفر) برآورد شده است. گزارش سالانه مرکز ثبت ملی سرطان ایران (INCR: National Cancer Registry in Iran) نشان می‌دهد که CRC چهارمین سرطان شایع در مردان پس از معده، مثانه و پروستات بوده و دومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان پستان محسوب می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژی، بالاترین میزان بروز CRC در ایران را در استان‌های مرکزی، شمالی و غربی گزارش نموده‌اند؛ در حالی که استان‌های جنوب شرقی ایران کمترین میزان بروز CRC را داشته‌اند (۲).

عوامل متعددی مانند سن، سابقه خانوادگی و رژیم غذایی در بروز CRC مؤثر هستند (۱). بنا بر طبقه‌بندی WHO (World Health Organization) در مورد تومورهای سیستم گوارش، عوامل زیر نقش اتیولوژیکی در پیشرفت CRC دارند: فاکتورهای تغییرناپذیر همچون سندروم فامیلی، سن بالای ۵۱ سال، داشتن پولیپ و سابقه ابتلا به بیماری‌های التهابی روده و سرطان‌های دیگر مانند سرطان رحم و پستان و نیز فاکتورهای تغییرپذیر مانند عادات تغذیه‌ای بد، عدم تحرک، چاقی، مصرف سیگار، مصرف الکل، درمان‌های جایگزین هورمونی، داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (۲).

ناپایداری کروموزومی (CIN: Chromosomal instability)، ناپایداری ریز ماهواره‌ای (MSI: Microsatellite instability) و فنوتیپ متیلاتور جزایر غنی از CpG (CIMP: CpG Island) نقش مهمی در تومورزایی CRC دارند (۳،۴). براساس مطالعات، نزدیک به ۲۵۰ جهش مختلف در بیماران مبتلا به CRC شناسایی شده است که تقریباً معادل ۵۵ درصد از این جهش‌های شناخته شده مربوط به ژن‌های MMR (Mismatch repair) می‌باشد (۵). نقص در پروتئین‌های تعمیر ناسازگاری (dMMR: Deficient mismatch repair) می‌تواند در پی جهش‌های ژرم لاین در ژن‌های *MLH1*، *MSH6*، *MutS*

(Homolog Post-meiotic segregation) *PMS2* و *MSH2*، حاصل شود که حدود ۹۰ درصد از این جهش‌ها در دو ژن *MLH1* و *MSH2* یافت می‌شود (۶). مهم‌ترین پروتئین سیستم MMR که معمولاً در سرطان روده بزرگ دخیل است، *MLH1* می‌باشد (۷،۸). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که هرگونه تغییر در بیان ژن *MLH1* ممکن است خطر CRC را افزایش دهد (۹). ژن *MLH1* همولوگ انسانی، ژن ترمیم جفت بازهای غیر مکمل *E. coli* (Escherichia coli) به نام *MutL* می‌باشد (۱۰). جهش‌های ژرم لاین در *MLH1* مسئول ۵۰ درصد از یک نوع ارثی از CRC به نام سندرم لینچ است. علاوه بر این، ۱۵-۱۳ درصد از CRC پراکنده ناشی از کمبود *MLH1* براساس هایپر متیلیشن پروموتور سوماتیک می‌باشد (۷).

ژن *MLH1* روی بازوی کوتاه کروموزوم ۳ در موقعیت ۲۲.۲ قرار داشته و حاوی ۲۱ اگزون است. پروتئین کدگذاری شده توسط ژن *MLH1* می‌تواند با اندونوکلاز دخیل در تعمیر میس‌مچ به نام *PMS2* به منظور ایجاد *MutLa* که بخشی از سیستم MMR است، همکاری کند (۱۱). *MutLa* به طور عمده در ترمیم عدم تطابقت باز-باز و لوپ‌های حذف و اضافه در نتیجه تکثیرهای ناقص DNA نقش دارد. علاوه بر این، پروتئین کدگذاری شده در سیگنالینگ آسیب DNA دخیل بوده و می‌تواند با پروتئین *MLH3* که در ترمیم عدم تطابق DNA دخالت دارد، به فرم  $\gamma$  *MutL* تبدیل شود که در میوز مشاهده می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهند که *MLH1* در سایر فعالیت‌های اصلی سلولی از جمله تنظیم نقاط بازرسی چرخه سلولی و آپوپتوز، نو ترکیبی متقاطع و ناسازگاری میتوز نقش دارد (۷،۱۲). با توجه به نقش مهم ژن *MLH1* و بررسی مطالعات انجام شده در دهه‌های اخیر که با تجزیه تحلیل مولکولی توسط پروفایلینگ بیان *mRNA* سرطان‌ها را با دقت بالاتری طبقه‌بندی کرده است (۱۳)، پژوهش حاضر با هدف بررسی کمی بیان ژن *MLH1* به روش غیر تهاجمی از نمونه خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با استفاده از روش Real time PCR و بررسی ارتباط آن با فاکتورهای پاتولوژیکی مراحل پیشرفت تومور به لایه‌های دیواره روده (T) و مراحل تهاجم به گره‌های لنفاوی (N) در تعدادی از بیماران ایرانی مبتلا به CRC انجام شد تا از این طریق بتوان

گردید. استخراج RNA از نمونه‌ها طبق پروتکل کیت (Intron Biotechnology Co, #Cat 17061) صورت گرفت. به منظور تعیین خلوص RNA استخراج شده در دستگاه Nano Drop One نسبت جذب نوری A260/A280 خوانده شد و نمونه‌هایی که بهترین جذب نوری را در بازه ۲-۱/۸ داشتند، انتخاب شدند. به منظور بررسی کیفیت مناسب از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. در انتها RNA استخراج شده در فریزری با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا مراحل بعدی پژوهش روی آن انجام شود.

ساخت cDNA توسط کیت cDNA synthesis (محصول شرکت یکتا تجهیز آزما) روی RNA استخراج شده مطابق با دستورالعمل موجود در کیت به صورت زیر انجام شد: ۱ میکرولیتر از پرایمرهای 18 (dT) Oligo و Random Hexamer به ۰/۵ میکرولیتر RNA استخراج شده اضافه گردید و با افزودن مقدار مناسب آب DEPC (Diethyl pyrocarbonate) به حجم نهایی دست یافته شد. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به هر کدام از نمونه‌ها مواد زیر افزوده شد: ۴ میکرولیتر 5X first-strand Buffer، ۰/۵ میکرولیتر RNasein و ۱ میکرولیتر (۱۰ میلی‌متر) dNTPs. میکروتیوپ به منظور ساخت cDNA، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به منظور توقف فعالیت آنزیم RT، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در انتها، cDNA ساخته شده جهت انجام مراحل تحقیقاتی بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

### طراحی پرایمر

با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 و سایت‌های آنلاین Ensemble و Primer3، UCSC، به صورت Exon-Exon Junction طراحی شد. در ادامه برای تأیید نهایی، پرایمرها در پایگاه‌های داده BLAST NCBI بررسی گشته و تأیید شدند (جدول ۱).

### Real time PCR

به منظور انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه Step One Applied Biosystems Plus و روش SYBER GREEN استفاده

تغییرات کمی بیانی ژن هدف را به عنوان بیومارکر جهت غربالگری، پیش‌آگهی و تشخیص CRC در نمونه خون محیطی مورد استفاده قرار داد.

## روش بررسی

### جمع‌آوری نمونه

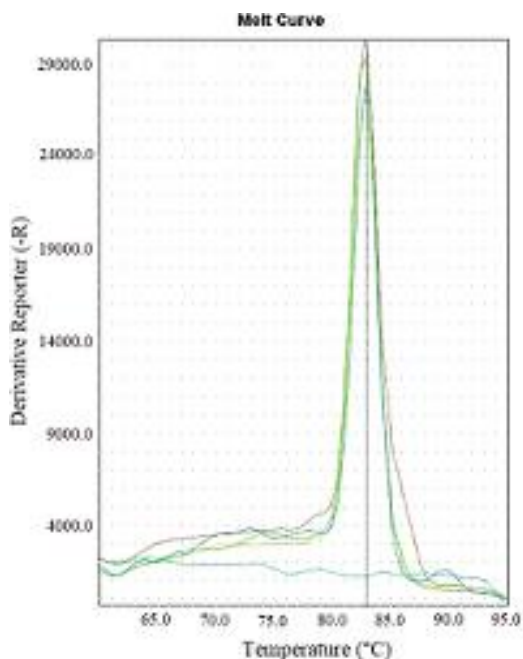
مطالعه حاضر یک تحقیق بنیادی از نوع مورد-شاهدی می‌باشد. به منظور انجام این تحقیق کد اخلاق (IR.IAU.QOM.REC.1397.017) از کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم اخذ گردید. سپس نمونه‌گیری با حجم نمونه ۳۳ نفر بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال و ۳۳ فرد سالم انجام شد. نمونه‌ها پس از تشخیص، اخذ پرسشنامه و کسب رضایت آگاهانه، قبل از استفاده از هر نوع دارو و یا درمان توسط پزشک جراح جمع‌آوری شدند. بیماران با تومور سکوم، کولون صعودی، عرضی و نزولی و رکتوسیگموئیدی به عنوان تومور کولورکتال در نظر گرفته شدند و مبتلایان به انواع دیگر سرطان از ادامه مطالعه کنار گذاشته شدند.

در این مطالعه ۱۴ زن (۴۲/۵ درصد) و ۱۹ مرد (۵۷/۵ درصد) با میانگین سنی ۵۵ سال (محدوده سنی ۲۸-۷۹ سال) که از مراجعه کنندگان به بیمارستان "گلپایگانی" قم و "کلینیک تخصصی صدرا" طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه فاکتورهای ریسک بالینی براساس سیستم مرحله‌بندی توده سرطان، سایز تومور و تهاجم به اعضای مجاور (TNM) دسته‌بندی شد. مراحل مختلف سرطان نیز براساس اطلاعات موجود در پرونده پاتولوژی بیماران به گروه‌های (مرحله 0-IV) تقسیم‌بندی گردید. همچنین میزان رشد و پیشروی تومور در لایه‌های دیواره روده (شاخص T) به چهار گروه مجزا (T0-TX، T1-4) و تهاجم به گره‌های لنفاوی (شاخص N) به چهار گروه (N1-3، NX-N0) تقسیم شد.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

۵ میلی‌لیتر خون محیطی تازه به ویال حاوی محلول EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) نیم مولار (۱۰ درصد) اضافه شد و با حفظ شرایط زنجیره سرما به آزمایشگاه منتقل

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده و طول محصول حاصل از واکنش PCR برای ژن هدف ( <i>MLH1</i> ) و ژن کنترل داخلی ( <i>B-actin</i> )		
پرایمر	Sequence 5'---3'	طول محصول PCR
<i>MLH1</i> Forward Primer <i>MLH1</i> Revers Primer	AAG GAA ATG ACT GCA GCT TGT AC GTT CTT CAC TAA GCT TGG TGG TG	۲۱۴ bp
<i>B actin</i> Forward Primer <i>B actin</i> Revers Primer	GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC AGA CGC AGG ATG GCA TGG G	۱۶۱ bp



شکل شماره ۱: منحنی ذوب مربوط به ژن *MLH1*

گردید. در این مطالعه بهینه‌سازی واکنش Real Time PCR طی ۴۵ سیکل و در سه مرحله به صورت زیر انجام شد: ابتدا مرحله واسرشته‌سازی (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. سپس مرحله اتصال (Annealing) در دمای ۵۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط رشته (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. از ژن  $\beta$ -actin به عنوان ژن کنترل داخلی برای تمام نمونه‌های سالم و بیمار استفاده شد. طی انجام واکنش Real Time PCR برای ژن‌های موجود در پژوهش، در هر دو گروه بیمار و سالم یک کنترل منفی (میکروتیوب حاوی master mix و پرایمرها؛ اما فاقد cDNA) منظور شد تا از صحت واکنش و عدم آلودگی با هرگونه DNA خارجی اطمینان حاصل گردد. در پژوهش حاضر روش Real Time PCR همراه با نرمالیزاسیون انجام شد. باید خاطر نشان ساخت که برای اطمینان از صحت داده‌های ارائه شده توسط دستگاه، تمام واکنش‌های Real Time PCR موجود در پروژه سه بار تکرار گردیدند.

### آنالیز داده‌ها

آنالیز نهایی به کمک نرم‌افزار Rest 2009 صورت گرفت. همچنین از نرم‌افزار SPSS 22 و آزمون آماری Kolmogorov-Smirnov برای بررسی نرمال بودن داده‌ها و از آزمون T برای بررسی بیان ژن *MLH1* و ارتباط آن با فاکتورهای T و N استفاده گردید. علاوه بر این، بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش نسبت به گروه کنترل با استفاده از روش Fold change یا  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  صورت گرفت. آنالیزها به صورت relative بین ژن مورد نظر و ژن مرجع انجام شدند و  $(P < 0.05)$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

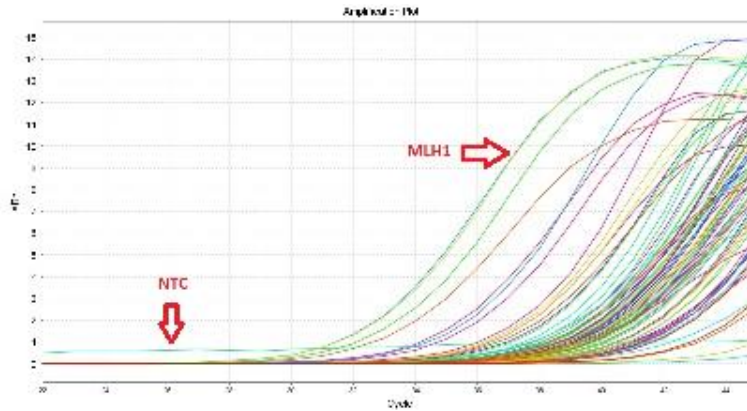
در این مطالعه ۳۳ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال شامل: ۱۴ زن

(۴۲/۵ درصد) و ۱۹ مرد (۵۷/۵ درصد) با میانگین سنی ۵۵ سال (محدوده سنی ۲۸-۷۹ سال) بررسی شدند.

به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها، کیفیت رنگ فلورسنت سایر گرین، اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیر اختصاصی و پرایمر دایمر، نمودار منحنی ذوب (شکل ۱) برای محصول به صورت جداگانه توسط دستگاه برای ژن‌های *MLH1* و *B-actin* رسم شد و تک قله‌ای بودن منحنی‌ها بررسی گردید.

بررسی منحنی‌های تکثیر (شکل ۲) و ذوب نشان‌دهنده تکثیرنمایی قطعه مورد نظر با منحنی ذوب واحد می‌باشند.

پس از انجام واکنش تکثیر، Ct نمونه‌ها با استفاده از دستگاه محاسبه شد و اندازه‌گیری میزان بیان ژن با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه گردید. مطابق با نتایج به دست آمده، بیان ژن هدف نسبت به ژن کنترل داخلی در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال کاهش پیدا کرده است. به عبارت دیگر، میزان بیان ژن *MLH1* در افراد مبتلا

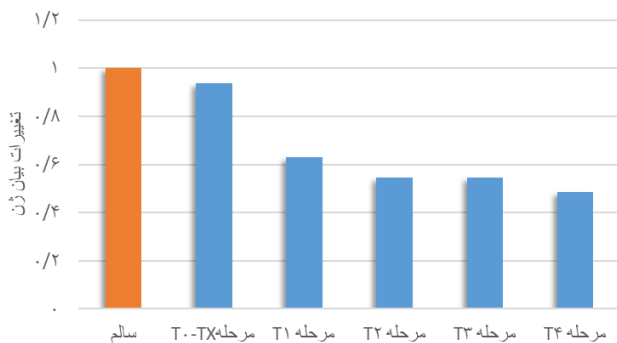


شکل شماره ۲: منحنی تکثیر مربوط به ژن *MLHI*

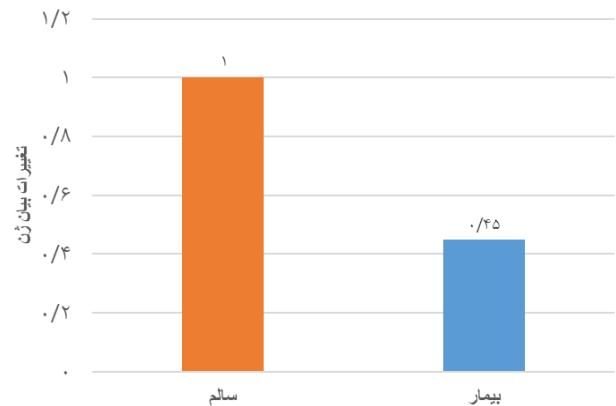
با توجه به نتایج به دست آمده، میزان بیان ژن *MLHI* در Stage II و Stage III و  $(P=0/04^*)$  معنادار در نظر گرفته شد؛ بنابراین بین Stage II و Stage III سرطان کولورکتال و نمونه‌های کنترل، کاهش بیان معنادار بود. در این مطالعه ارتباط بین مراحل مختلف سرطان کولورکتال و بیان ژن *MLHI* با استفاده از آزمون One Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت؛ اما نتایج معناداری به دست نیامد  $(P>0/05)$ .

آنالیز آماری میزان بیان ژن *MLHI* در مقایسه با شاخص T در افراد نرمال نسبت به افراد مبتلا به سرطان (نمودار ۲) در مراحل T2 سطح معناداری  $(P=0/04^*)$ ، T3 سطح معناداری  $(P=0/05^*)$  و T4 سطح معناداری  $(P=0/00^*)$  را نشان داد. ارتباط میان کاهش بیان ژن *MLHI* در مراحل پیشرفته رشد تومور به لایه‌های دیواره روده که شامل: T2، T3 و T4 می‌باشد، به کمک آنالیزهای آماری اثبات گردید.

همچنین آنالیز آماری میزان بیان ژن *MLHI* در مقایسه با شاخص



نمودار شماره ۲: میزان بیان ژن *MLHI* در مراحل رشد تومور به لایه‌های دیواره روده (T) در افراد مبتلا به سرطان نسبت به افراد نرمال



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان بیان ژن *MLHI* در نمونه خون دو گروه (بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و افراد سالم)

به سرطان نسبت به افراد نرمال، ۵۵ درصد کاهش بیان داشته است (نمودار ۱). این یافته با استفاده از آزمون T مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این کاهش معنادار است  $(P=0/01^*)$ .

میزان بیان ژن *MLHI* در هریک از مراحل مختلفی بیماری سرطان در مقایسه با نمونه‌های کنترل به صورت جداگانه با استفاده از آزمون T بررسی گردید و نتایج در قالب جدول ۲ ارائه گردید.

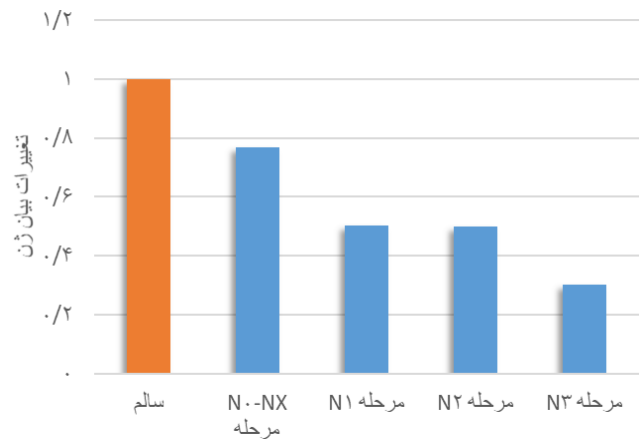
جدول شماره ۲: آنالیز نتایج آزمون T در مراحل مختلف سرطان کولورکتال در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های نرمال

سطح معناداری	Foldchange		تفکیک مراحل سرطان
	افزایش یافته	کاهش یافته	
۰/۲۲	-	۱/۹	Stage 0
۰/۱۹	-	۱/۸	Stage I
۰/۰۲*	-	۲/۵	Stage II
۰/۰۴*	-	۹/۱	Stage III
۰/۲۳	-	۱/۶	Stage IV

مری، معده و دهانه رحم ارتباط دارد (۴). با این وجود، مطالعات کمی در زمینه مکانیسم بیان و تنظیم ژن *MLHI* در سرطان کولورکتال صورت گرفته است؛ بنابراین، تفسیر این مکانیسم به تشخیص بیشتر اثرات *MLHI* بر وقوع و رشد سرطان کولورکتال کمک می‌کند که این مهم برای پیشگیری و درمان این سرطان مفید خواهد بود (۱۴).

مطابق با تحقیقات Yu و همکاران که در سال ۲۰۱۶ با هدف ارزیابی بیان *mRNA MLHI* در خون محیطی به عنوان بیومارکر تشخیص *HNPCC* (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) انجام شد، سطح *mRNA MLHI* در ۱۹ خانواده با فرد یا افراد مبتلا به *HNPCC* با استفاده از *qPCR* (quantitative Polymerase Chain Reaction) تعیین گردید. نتایج نشان دادند که سطح *mRNA MLHI* در *HNPCC* به طور قابل توجهی پایین‌تر از گروه شاهد است ( $P < 0.001$ ). در این مطالعه سطح *mRNA MLHI* دارای حساسیت ۸۱/۳ درصد و ویژگی ۸۶/۷ درصد برای تمایز *HNPCC* از گروه کنترل بود. یافته‌ها حاکی از آن بودند که سطح بیان *mRNA MLHI* در خون محیطی ممکن است به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص *HNPCC* مناسب باشد (۱۵).

Pinto و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷، مؤثر بودن متیلاسیون *MLHI* برای تشخیص سندروم لینچ در بیماران مبتلا به تومور با کاهش بیان *MLHI* را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش بیان کاهش یافته RNA در موارد متیلاسیون پروموتور *MLHI* در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شد. نتایج حاکی از آن بودند که متیلاسیون *MLHI* اکثراً در بیمارانی رخ می‌دهد که فقط بیان پروتئین *MLHI* را در تومورهایشان داشتند. علاوه بر این، این پژوهشگران شواهدی را ارائه دادند مبنی بر اینکه هایپرمتیلاسیون *MLHI*، مکانیسم مولکولی حدود ۳ درصد از خانواده‌های دارای سندروم لینچ بوده و به ویژه در بیماران مبتلا به تومورهای متعدد اولیه بدون سابقه خانوادگی، مهم گزارش شده است (۱۶). از سوی دیگر، گشایشی و همکاران در سال ۲۰۱۸ شیوع و ویژگی‌های بالینی نقص در پروتئین‌های MMR در سرطان روده بزرگ را در موارد شروع زودرس در مقایسه با موارد دیررس به عنوان یک مطالعه مقطعی گذشته‌نگر در شمال شرق ایران انجام



نمودار شماره ۳: میزان بیان ژن *MLHI* در مراحل تهاجم به گره‌های لنفاوی (N) در افراد مبتلا به سرطان نسبت به افراد نرمال

N در افراد نرمال نسبت به افراد مبتلا به سرطان (نمودار ۳) در مراحل N1 سطح معناداری ( $P=0.01^*$ )، N2 سطح معناداری ( $P=0.02^*$ ) و N3 سطح معناداری ( $P=0.04^*$ ) را نشان داد. ارتباط میان کاهش بیان ژن *MLHI* در مراحل تهاجم به گره‌های لنفاوی (N) که شامل: N1، N2 و N3 بود نیز با کمک آنالیزهای آماری اثبات گردید.

## بحث

سرطان کولورکتال به دلیل شیوع بالا و همچنین نسبت بقا، یک معضل عمده در مدیریت سرطان در جهان می‌باشد. با توجه به اینکه طول عمر برخی از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به پنج سال هم نمی‌رسد و نیز از آنجایی که نیازهای بیماران مبتلا به سرطان در سال‌های مختلف پس از تشخیص با یکدیگر متفاوت است، بررسی کامل‌تر سرطان کولورکتال یک نیاز حیاتی می‌باشد. در این میان، راه‌اندازی آزمون‌های تشخیصی مولکولی کاملاً اختصاصی در کنار علائم بالینی می‌تواند کمک مؤثری برای تشخیص افراد در معرض خطر ابتلا و حتی افراد فاقد علائم بالینی باشد. براساس مطالعات صورت گرفته، نقص در پروتئین‌های تعمیر عدم تطابق (dMMR) می‌تواند از جهش‌های ژرم لاین در ژن‌های *MLHI*، *MSH2*، *MSH6* و *PMS2* حاصل شود. مهم‌ترین پروتئین تعمیر عدم تطابق DNA که در سرطان روده بزرگ دخیل است، *MLHI* می‌باشد (۷).

مطالعات نشان داده‌اند که *MLHI* به شدت با سرطان کولورکتال،

T در افراد مبتلا به سرطان نسبت به افراد سالم در مراحل T2 سطح معناداری ( $P=0/04^*$ )، T3 سطح معناداری ( $P=0/05^*$ ) و T4 سطح معناداری ( $P=0/00^*$ ) را نشان داد؛ بنابراین ارتباط میان کاهش بیان ژن *MLHI* در مراحل پیشرفته رشد تومور به لایه‌های دیواره روده که شامل: مراحل T2، T3 و T4 می‌شود، با کمک آنالیزهای آماری اثبات گردید.

علاوه‌براین، میزان بیان ژن *MLHI* در مقایسه با شاخص N در افراد مبتلا به سرطان نسبت به افراد سالم در مراحل N1 سطح معناداری ( $P=0/01^*$ )، N2 سطح معناداری ( $P=0/02^*$ ) و N3 سطح معناداری ( $P=0/00^*$ ) را نشان داد. ارتباط میان کاهش بیان ژن *MLHI* در مراحل تهاجم به گره‌های لنفاوی (N) که شامل: مراحل N1، N2 و N3 می‌باشد، با کمک آنالیزهای آماری به خوبی به اثبات رسید.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که کاهش بیان ژن *MLHI* نقش مؤثری در ایجاد سرطان کلورکتال دارد؛ اما مهم‌ترین نکته در اهمیت این ژن، نقش آن در مراحل سرطان (Stage) و سیستم طبقه‌بندی TNM می‌باشد. فرضیه حاصل از این پژوهش بیان می‌کند که این ژن می‌تواند در مراحل بعدی مطالعات، بیشتر مورد توجه قرار بگیرد؛ زیرا این احتمال وجود دارد که در آینده نزدیک بتواند در بهبود وضعیت درمانی سرطان کلورکتال نقش مؤثری داشته باشد. همچنین به دلیل معنادار بودن نتایج لازم است پژوهشی مشابه با تعداد نمونه بیشتر انجام شود و پارامترهای کلینیکی و بالینی دیگر مورد بررسی قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری ارزشمند "انستیتو کنسرو بیمارستان امام خمینی(ره)" به دلیل تأمین بخشی از نمونه‌های بیماران و نیز از کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قم قدردانی نمایند.

دادند. این پژوهشگران ۳۲۱ مورد CRC و نمونه آسیب‌شناسی را طی سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۶ مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها تومورها را با رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی (IHC: Immunohistochemistry) از چهار پروتئین تعمیر (*MLHI*، *MSH2*، *MSH6* و *PMS2*) مورد آزمایش قرار دادند. نتیجه IHC بین CRC زودرس و دیررس در معرض خطر بالای سندروم لینچ معنادار نبود (۱۷).

در پژوهش حاضر که برای نخستین بار در ایران در مورد بیان ژن *MLHI* نمونه خون تازه ۳۳ بیمار (غیر خویشاوند مبتلا به سرطان کلورکتال که با استفاده از آزمایشات بالینی و نتایج پاتولوژی برای این سرطان مثبت تشخیص داده شده بودند) و ۳۳ فرد سالم (غیر خویشاوند با مبتلایان به سرطان کلورکتال) به صورت مورد-شاهدی و با روش Real Time PCR انجام شد، کاهش بیان ژن *MLHI* در نمونه‌های سرطانی نسبت به بیان این ژن در نمونه‌های سالم معنادار بود ( $P=0/01^*$ ). از آنجایی که ژن *MLHI* نقش کلیدی در سیستم ترمیم ناسازگاری (MMR) دارد و با توجه به مطالعات قبلی انجام شده در ارتباط با جهش‌های این ژن در ایران و جهان و نیز نتایج حاصل از پژوهش حاضر استنباط می‌شود که سرطان کلورکتال با کاهش بیان ژن *MLHI* ارتباط دارد؛ بنابراین با کاهش بیان ژن *MLHI*، امکان اصلاح عدم تطابق باز-باز و حلقه‌های حذف-اضافه ناشی از همانندسازی معیوب DNA کاهش پیدا کرده و بروز جهش‌ها افزایش می‌یابد. مطابق با نتایج حاصل از آنالیزهای آماری در این مطالعه، بیان ژن *MLHI* نسبت به ژن کنترل داخلی در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است.

## نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، میزان بیان ژن *MLHI* در Stage II ( $P=0/02^*$ ) و Stage III ( $P=0/04^*$ ) معنادار در نظر گرفته شد. همچنین آنالیز آماری میزان بیان ژن *MLHI* در مقایسه با شاخص

## References:

1. Ma H, Brosens LA, Offerhaus GJ, Giardiello FM, de Leng WWJ, Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. Pathology 2018;50(1):49-59. PMID: 29169633
2. Dolatkah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: molecular

- epidemiology and screening strategies. *J Cancer Epidemiol* 2015;2015:643020. [PMID: 25685149](#)
3. Fu T, Liu Y, Li K, Wan W, Pappou EP, Iacobuzio-Donahue CA, et al. Tumors with unmethylated MLH1 and the CpG island methylator phenotype are associated with a poor prognosis in stage II colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2016;7(52):86480-9. [PMID: 27880934](#)
  4. Jensen LH, Rasmussen AA, Byriel L, Kuramochi H, Crüger DG, Lindebjerg J, et al. Regulation of MLH1 mRNA and protein expression by promoter methylation in primary colorectal cancer: a descriptive and prognostic cancer marker study. *Cell Oncol* 2013;36(5):411-9. [PMID: 24027018](#)
  5. Rupnarain C, Dlamini Z, Bhoola K. Colon cancer : genomics and apoptotic events. *Biol Chem* 2004;385(6):449-64. [PMID: 15255176](#)
  6. Haghighi MM, Radpour R, Aghajani K, Zali N, Molaei M, Zali MR. Four novel germline mutations in the MLH1 and PMS2 mismatch repair genes in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009;24(8):885-93. [PMID: 19479271](#)
  7. Hinrichsen I, Ernst BP, Nuber F, Passmann S, Schäfer D, Steinke V, et al. Reduced migration of MLH1 deficient colon cancer cells depends on SPTAN1. *Mol Cancer* 2014;13(1):11. [PMID: 24456667](#)
  8. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P DP. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2015;34(3):1087-96. [PMID: 26151224](#)
  9. Zarandi A, Irani S, Savabkar S, Chaleshi V, Ghavideldarestani M, Mirfakhraie R, et al. Evaluation of promoter methylation status of MLH1 gene in Iranian patients with colorectal tumors and adenoma polyps. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017;10(Suppl 1):S117-21. [PMID: 29511481](#)
  10. Sharp A, Pichert G, Lucassen A, Eccles D. RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1. *Hum Mutat* 2004;24(3):272. [PMID: 15300854](#)
  11. Takeda T, Banno K, Yanokura M, Adachi M, Iijima M, Kunitomi H, et al. Methylation analysis of DNA mismatch repair genes using DNA derived from the peripheral blood of patients with endometrial cancer: epimutation in endometrial carcinogenesis. *Genes (Basel)* 2016;7(10):86. [PMID: 27754426](#)
  12. Wu Q, Vasquez KM. Human MLH1 protein participates in genomic damage checkpoint signaling in response to DNA interstrand crosslinks, while MSH2 functions in DNA repair. *PLoS Genet* 2008;4(9):e1000189. [PMID: 18787700](#)
  13. Kang MJ, Jung SA, Jung JM, Kim SE, Jung HK, Kim TH, et al. Associations between single nucleotide genes and the risk of developing colorectal cancer. *Anticancer Res* 2011;31(2):575-84. [PMID: 21378341](#)
  14. Chen T, Lv H, Xu Y, Du W, Zhang R. A study on the aberrant methylation of colorectal cancer MLH1 gene. *Am J Clin Exp Med* 2019;7(1):1-6. [Link](#)
  15. Yu H, Li H, Cui Y, Xiao W, Dai G, Huang J, et al. The mRNA level of MLH1 in peripheral blood is a biomarker for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Cancer Res* 2016;6(5):1135-40. [PMID: 27294005](#)
  16. Pinto D, Pinto C, Guerra J, Pinheiro M, Santos R, Vedeld HM, et al. Contribution of MLH 1 constitutional methylation for Lynch syndrome diagnosis in patients with tumor MLH 1 downregulation. *Cancer Med* 2018;7(2):433-44. [PMID: 29341452](#)
  17. Goshayeshi L, Ghaffarzagdegan K, Khooei A, Esmailzadeh A, Khorram MR, Mozaffari HM, et al. Prevalence and clinicopathological characteristics of mismatch repair-deficient colorectal carcinoma in early onset cases as compared with late-onset cases: a retrospective cross-sectional study in Northeastern Iran. *BMJ Open* 2018;8(8):e023102. [PMID: 30166308](#)