

اندازه‌گیری ژن uPA در سرطان پستان: انتخاب ژن خانه دار

رضوان اسمعیلی: کارشناس ارشد آزمایشگاه، مرکز تحقیقات سرطان پستان جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران
 *کیوان مجیدزاده اردبیلی: استادیار بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سرطان پستان جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران
 نسربین عبدلی: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات سرطان پستان، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان در سراسر جهان است. مدت‌های طولانی محققان به دنبال یافتن راه‌هایی برای تشخیص و درمان سرطان در مراحل اولیه بوده‌اند. تحقیقاتی که برای توسعه استفاده از نشانگرهای زیستی صورت گرفته‌اند در تشخیص و درمان سرطان پستان بسیار مؤثر بوده و منجر به کاربردی شدن برخی از این نشانگرها در نزد بیماران شده است. روش‌های جاری در اندازه‌گیری نشانگرهای زیستی مانند ایمونوهیستوشیمی، ایمونوسیتوشیمی و الایزا روش‌های مورد تأیید و تکرارپذیر در آزمایشگاه‌های مختلف هستند اما نتایج غیرکمی و مراحل کار متعدد و طولانی از نقاط ضعف این تکنیک‌ها است که محققان را به جستجو در مورد روش‌های جایگزین مولکولی مانند Quantitative Real-Time PCR (Q-RT-PCR) تشویق می‌کند. تأیید نهایی اعتبار این روش برای استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیصی نیازمند اعتبارسنجی‌های متعدد از جمله در مورد ژن‌های خانه‌دار (Housekeeping genes) می‌باشد.

روش بررسی: شش ژن خانه‌دار که به طور معمول در سرطان پستان استفاده شده است (RPLP0, HPRT1, ACTB, GAPDH, TFRC, GUSB)، انتخاب و پایداری بیان آن‌ها برای نرمال کردن بیان ژن uPA مورد بررسی قرار گرفت. واکنش Q-RT-PCR با استفاده از Master Mix 2x از شرکت PrimerDesign در واکنش‌های ۲۰ میکرولیتری انجام شد. غلظت نهایی پرایمرها و پروب‌ها به ترتیب ۰/۵ میکرومولار و ۰/۳ میکرومولار بود. اندازه‌گیری میزان فلورسانس توسط دستگاه Applied Biosystems 7500 و آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار 7500 software system ver.2.0 انجام شد. برای یافتن پایدارترین ژن خانه‌دار، ابتدا داده‌ها توسط نرم افزار Excel به مقیاس خطی تبدیل شدند و سپس توسط نرم‌افزار geNorm[20] با روش Pair wise comparison و با استفاده از نرم‌افزار NormFinder[22] با روش combined estimate of The intra and inter group validation آنالیز شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه RPLP0 و GAPDH بیشترین مقدار M و TFRC کمترین مقدار را داشت. (شکل ۱) در این مطالعه TFRC بیشترین پایداری بیان را نشان داد. در این مطالعه میزان V برای استفاده از سه و چهار کنترل داخلی به ترتیب ۰/۵ و ۰/۴ بود. **نتیجه‌گیری:** براساس این مطالعه ژن TFRC پایدارترین ژن کنترل و ترکیب TFRC و ACTB بهترین ترکیب دو ژنی برای نرمال‌سازی uPA در سرطان پستان است. لازم به ذکر است که ژن‌های RPLP0 و GAPDH به‌عنوان رفرنس مناسب توصیه نمی‌شود. **واژه‌های کلیدی:** Real-Time PCR، نرمال‌سازی، سرطان پستان، uPA

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان در سراسر جهان است. هر سال بیش از یک میلیون زن در جهان به این سرطان مبتلا می‌شوند که از این تعداد سالیانه ۴۰۰/۰۰۰ نفر فوت می‌کنند [۱]. در ایران در میان بانوان بالای ۳۰ سال میزان شیوع و بروز این بیماری به ترتیب ۲۲ و ۱۲۰ در هر صد هزار نفر می‌باشد [۲]. مدت‌های طولانی محققان به دنبال یافتن راه‌هایی برای تشخیص و درمان سرطان در مراحل اولیه بوده‌اند. تحقیقاتی که برای توسعه استفاده از نشانگرهای زیستی صورت گرفته‌اند، در تشخیص و درمان سرطان پستان بسیار مؤثر بوده و منجر به کاربردی شدن برخی از این نشانگرها^۱ در نزد بیماران شده است.

آزمایش Oncotype که یک پانل چندژنی درمانی است، برای تعیین خطر عود در این بیماران و تصمیم در مورد شیمی‌درمانی به کار می‌رود [۳]. میزان گیرنده استروژن و پروژسترون به صورت معمول جهت تصمیم‌گیری در مورد شیمی‌درمانی و Her-2/neu برای روش درمانی هدفمند استفاده می‌شود. همچنین به تازگی اندازه‌گیری uPA برای تعیین میزان مهاجم بودن تومور در دستورالعمل‌های بالینی وارد شده است [۴].

روش‌های رایج در اندازه‌گیری نشانگرهای زیستی مانند ایمونوهیستوشیمی، ایمونوسیتوشیمی و الیزا روش‌های مورد تأیید و تکرارپذیر در آزمایشگاه‌های مختلف هستند [۵-۸] اما، نتایج غیرکمی و مراحل کار متعدد و طولانی از نقاط ضعف این تکنیک‌ها است که محققان را به جستجو در مورد روش‌های جایگزین مولکولی مانند Quantitative Real-time PCR (Q-RT-PCR) تشویق می‌کند [۹ و ۱۰].

تکنیک Q-RT-PCR یک روش مقرون به صرفه، سریع و با حساسیت و ویژگی بالا برای ارزیابی بیان ژن است [۱۱ و ۱۲]. تأیید نهایی اعتبار^۲ این روش برای استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیصی نیازمند اعتبارسنجی‌های متعدد از جمله در مورد ژن‌های خانه‌دار^۳ می‌باشد. چندین مطالعه بیان ژن در مقیاس بالا انجام شده است که در آن صدها ژن خانه‌دار مشخص شده است [۱۳-۱۵].

لازم است تغییراتی که در حین مراحل مختلف کمی‌سازی RNA رخ می‌دهد، توسط یک معیار داخلی کنترل شود. در سال‌های گذشته عقیده بر این بود که همه ژن‌های خانه‌دار در محدوده وسیعی از شرایط زیستی بیان ثابتی دارند لذا، این ژن‌ها بدون هرگونه اعتبارسنجی برای کنترل Q-RT-PCR استفاده می‌شد. در سال‌های اخیر، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برخلاف تصور قبلی بیان تمامی این ژن‌ها در همه شرایط بافتی و آزمایشگاهی ثابت نمی‌باشد [۱۶-۲۰]. انتخاب ژن خانه‌دار مناسب نقش مهمی در اعتبار نتایج هر مطالعه خواهد داشت. اعتبارسنجی ژن‌های خانه‌دار در ارزیابی بیان برخی از ژن‌ها در بعضی از بیماری‌ها انجام شده است اما، تاکنون اطلاعاتی در مورد انتخاب ژن مرجع مناسب در اندازه‌گیری بیان ژن uPA در سرطان پستان گزارش نشده است.

ژن uPA در مسیرهای زیستی مختلف نقش‌آفرین است. افزایش بیان این ژن همراه با چند پروتئین دیگر در سیستم فعال‌سازی پلاسمینوژن نقش مهمی در تهاجم سلول‌های توموری و متاستاز دارد. به این ترتیب بیان بالای این نشانگر زیستی یک عامل نامطلوب پیش‌بینی‌کننده متاستاز در سرطان پستان است [۲۱ و ۲۲]. هدف مطالعه حاضر انتخاب ژن خانه‌دار معتبر جهت اندازه‌گیری بیان ژن uPA در سرطان پستان است.

روش بررسی

نمونه‌گیری:

چهل بافت توموری پستان به همراه هشت نمونه نرمال مجاور و چهار نمونه بافت نرمال پستان از بانک بیولوژیک مرکز تحقیقات سرطان پستان (ICBC-BB) دریافت شد. روند نمونه‌گیری و ذخیره آن‌ها در این بانک براساس دستورالعمل‌های مربوطه انجام شده است و این مرکز به تمامی دستورالعمل‌های اخلاقی بانک‌های زیستی برای نگهداری و استفاده از نمونه‌های انسانی پایبند است. مشخصات بالینی و آسیب‌شناسی بافتی نمونه‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

¹ Biomarkers² Validity³ Housekeeping genes

جدول ۱: مشخصات بالینی و آسیب‌شناسی نمونه‌های بافتی

نوع بافت	سن	اندازه	مرحله تومور	grade	نوع بافت‌شناسی	وضعیت قاعدگی	ER	PR	Her2/neu	P53
بافت مجاور	۵۰				IDC					
بافت مجاور	۳۸				IDC					
بافت بدخیم	۳۸	۱۸	IIA	III	IDC	pre	-	-	-	+
بافت بدخیم	۳۸	۲۰		III	IDC	pre	+	+	-	
بافت بدخیم	۵۸	۳۵	IIIA	II	IDC	post	۳+	۳+	۲+	
بافت بدخیم	۸۰	۱۰		I		post	-	-	-	+
بافت بدخیم	۵۴	۳۰	IIB	II	IDC	post	+	+	-	
بافت مجاور					IDC+DCIS					
بافت بدخیم	۴۰	۲۵	IIB	II		pre	+	+	۳+	+
بافت بدخیم	۳۵	۲۰		III		post	+	+	-	+
بافت مجاور					IDC					
بافت بدخیم					DCIS+IDC					
بافت بدخیم	۵۲	۲۱	IIA	II	IDC	post	+	+	۱+	+
بافت بدخیم			III				+	+	-	+
بافت بدخیم	۸۲	۵۰	IIB	III	IDC	post	+	-	-	+
بافت مجاور	۴۳				IDC					
بافت بدخیم	۵۰	۵۰	IIA	II	IDC	pre	+	+	-	-
بافت بدخیم	۴۴	۲۰	IIIA	III		pre	۳+	۳+	۱+	
بافت بدخیم	۵۱	۲۰	IIA	II	IDC	post	+	+	-	
بافت بدخیم					IDC					
بافت بدخیم	۳۷	۶۰	IIIB	II	IDC	post	+	+	۱+	-
بافت بدخیم	۴۵				IDC	pre				
بافت بدخیم	۴۰	۱۵	IB	II	IDC	pre	+	+	-	
بافت بدخیم	۴۲	۲۰	IV	III	IDC	pre	-	-	-	+
بافت بدخیم	۵۲	۲۱	IIA	II	IDC+DCIS	post	+	+	۱+	+
بافت بدخیم	۵۰	۸	IIA	II	IDC	post	+	+	-	-
بافت بدخیم	۵۴	۳۰	IIA	II		post	+	+	-	
بافت بدخیم	۴۵		IV			pre	-	-	-	-
بافت مجاور	۴۵									
بافت مجاور	۴۰									
بافت مجاور	۵۲				IDC+DCIS					
بافت مجاور	۴۲				IHD					
بافت بدخیم	۵۳				IDC	pre	-	-	-	-
بافت بدخیم	۳۴	۱۰	IIB	II	IDC	pre	+	+	۳+	-
بافت بدخیم	۵۶	۳۸	IIB	II	IDC	post	-	-	-	+
بافت بدخیم	۷۱	۲۰	IV	II	IDC	post	+	+	-	
بافت بدخیم	۳۴	۳۰	IIA	II	IHC	pre	-	-	۱+	-

بافت بدخیم	۳۷		II		pre	+	+	+	
بافت بدخیم	۴۸	۳۰	IIB		ILC	pre	-	-	-
بافت بدخیم	۴۳	۱۸	I		IDC	pre	+	+	- +
بافت بدخیم	۴۵	۲۰	II	II	IDC	pre	-	+	-
بافت بدخیم	۳۹	۱۰۰	IIIA	II		pre	-	-	+ +
بافت بدخیم	۳۴	۶۰		III		pre			
بافت بدخیم									
طبیعی	۲۵								
طبیعی	۳۸								
طبیعی	۳۲				IDC				
طبیعی					IDC				
بافت بدخیم	۵۰	۱۵	IB	I	IDC	pre	+	+	- -
بافت بدخیم	۳۲	۱۰	IV	II	IDC	pre	-	-	+ +
بافت بدخیم	۶۰	۳۰	IV	II	IDC	post	+	-	۱+
بافت بدخیم	۴۱	۵۰	IV	I	IDC	pre	+	+	- -

مرحله‌بندی (Staging) براساس انجمن مشترک سرطان آمریکا (AJCC) American Joint Committee on Cancer انجام شده‌است. گیرنده استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PR)، Her-2/neu و P53 براساس نتایج ایمونوهیستوشیمی گزارش شده است.

استخراج RNA و سنتز cDNA

هشت تا ۲۰ میلی‌گرم از هریک از بافت‌ها بر روی یخ خشک بریده شد و در ۱ میلی‌لیتر Rnxplus (شرکت سیناژن، ایران) همگن شد و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، RNA از بافت‌ها استخراج گردید. سپس برای حذف DNA ژنومی مقدار ۳/۶ میکروگرم از RNA استخراج شده توسط ۱۸ واحد DNase فاقد RNase (از شرکت Fermentas) و ۲۰ واحد مهارکننده RNase و ۲/۴ میکرولیتر از MgCl₂ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شد. سپس برای غیرفعال کردن DNase، واکنش ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در مرحله بعد ۱ میکروگرم از این RNA با استفاده از کیت precisionTM reverse transcription (شرکت PrimerDesign) به cDNA تبدیل گردید.

کنترل داخلی و ژن موردنظر

شش ژن خانه‌دار که به‌طور معمول در سرطان پستان استفاده شده است (RPLP0, HPRT1, ACTB, GAPDH, GUSB, TFRC)، انتخاب گردید و پایداری

بیان آن‌ها برای نرمال کردن بیان ژن uPA مورد بررسی قرار گرفت. تمامی پرایمرها و پروب‌ها توسط نرم‌افزارهای Generunner v.3.05 طراحی و توسط نرم‌افزار PrimerExpress 3.0 تأیید شد (جدول ۲). بازده تکثیر هر پرایمر با استفاده از تهیه منحنی استاندارد از رقت‌های سریال یک‌دهم از cDNA و با استفاده از نرم‌افزار 7500 software system ver.2.0 انجام شد. cDNA مورد استفاده در تهیه سریال رقت از مخلوط ۱۵ نمونه cDNA توموری با نسبت برابر بود.

Real-Time-PCR کمی

واکنش Q-RT-PCR با استفاده از Master Mix 2x شرکت PrimerDesign در واکنش‌های ۲۰ میکرولیتری انجام شد. غلظت نهایی پرایمرها و پروب‌ها به ترتیب ۰/۵ میکرومولار و ۰/۳ میکرومولار بود. اندازه‌گیری میزان فلورسانس توسط دستگاه Applied Biosystems 7500 software system و آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار 7500 software system ver.2.0 انجام شد.

جدول ۲: توالی پرایمرها و پروبها

بازده	دمای ذوب	توالی	شماره دسترسی ژن
94	61.3	F GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	NM_001002 GAPDH
	63.2	R GGGTGAATCATATTGGAACA	
	74.9	P ATTTGGTCGTATTGGGCGCCTGGT	
94	64.5	F ACCGGCACCATCAAGCT	NM_003234 TFRC
	65.2	R TGATCACGCCAGACTTTGC	
	72.1	P TGAAAATTCATATGTCCCTCGTGAGGCT	
89	67.2	F CGGACGAGGATATGGGATTTG	NM_001002 RPLP0
	64.7	R AGAAGTAAGCCTTTATTTCTTGTTT	
	72	P TCACCAAAAAAGCAACCAACTTAGCCAGT	
74	68.6	F GCGTTCCTTTTGCAGGAGA	NM_000181 GUSB
	64.7	R GGTGGTATCAGTCTTGCTCAA	
	72	P ACCAGGTATCCCCACTCAGTAGCCAAG	
103	64.4	F TGGACTAATTATGGACAGGACTGAA	NM_000194 HPRT1
	62.8	R GTAATCCAGCAGGTCAGCAA	
	73.7	P CTTGCTCGAGATGTGATGAAGGAGATGG	
97.2	65.7	F AGGGCAGCACTGTGAAATAGATAAGT	NM_002658 UPA
	64.8	R CATGGTACGTTTGCTGAAGGA	
	75.3	P TTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACA	
95	65.9	F CAGCAGATGTGGATCAGCAAG	NM_001101 ACTB
	67.1	R GCATTTGCGGTGGACGAT	
	73.8	P AGGAGTATGACGAGTCCGGCCCC	

پروپها با استفاده از 5'FAM 3'TAMRA نشاندار شده‌اند.

آنالیز داده‌ها و پایداری ژن خانه‌دار

آنالیز داده‌های خام توسط نرم‌افزار 7500 software system ver.2.0 (از شرکت Applied Biosystem) انجام شد. برای یافتن پایدارترین ژن خانه‌دار، داده‌ها ابتدا توسط نرم‌افزار Excel به مقیاس خطی تبدیل شدند سپس داده‌ها توسط نرم‌افزار [20] geNorm با روش Pair wise comparison و با استفاده از نرم‌افزار NormFinder[22] با روش combined estimate of The intra and inter group validation آنالیز گردیدند.

نتایج

آمار توصیفی:

نتایج چرخه‌های آستانه در جدول ۳ نشان داده شده است. دامنه تغییرات چرخه‌های آستانه (CT Range) برای کنترل‌های داخلی برای ACTB بین ۸/۶۱ تا ۲۲/۶۸ با میانگین ($25/1 \pm 0/5$ s.e.m) و برای GUSB ($32/61 \pm 0/43$ s.e.m) بود. بیشترین و کمترین دامنه بیان بین ۲۲/۶۸ چرخه برای GUSB و ۸/۶۱ چرخه برای ACTB بود. (جدول ۳)

جدول ۳: مقدار چرخه‌های آستانه (CT)، ژن‌های خانه‌دار و ژن uPA

Gene	CT Range	CT Min	CT Max	Mean $\pm$ s.e.m
RPLP0	22.68	19.52	42.2	29.69 $\pm$ 0.81
GUSB	8.61	27.59	36.2	31.99 $\pm$ 0.33
TFRC	15.64	25.27	40.92	31.7 $\pm$ 0.5
HPRT1	14.25	26.42	40.67	32.61 $\pm$ 0.43
ACTB	14.05	16.93	30.98	25.1 $\pm$ 0.5
GAPDH	19.2	22.69	41.89	29.3 $\pm$ 0.5
UPA	10.65	28.13	38.78	31 $\pm$ 0.38

پایداری بیان ژن مرجع

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای GeNorm و NormFinder مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نرم‌افزار GeNorm با محاسبه Pairwise variation پایداری بیشترین کنترل داخلی بیان شده را تعیین می‌کند و براساس میزان پایداری بیان میانگین (M) نسبت به هر ژن یک منحنی می‌دهد.

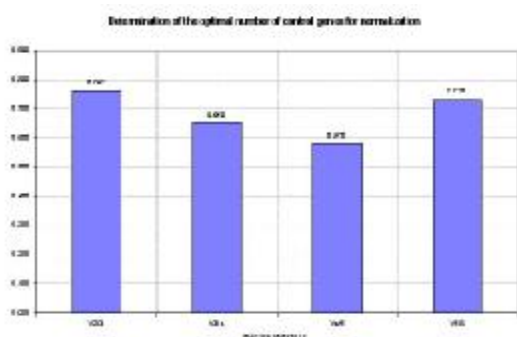
در این مطالعه RPLP0 و GAPDH بیشترین مقدار M و TFRC کمترین مقدار را داشتند (شکل ۱). در این مطالعه TFRC بیشترین پایداری بیان را نشان داد. عامل دیگری که توسط GeNorm اندازه‌گیری می‌شود، یعنی؛ عامل نرمال‌سازی (V) برای پیدا کردن تعداد بهینه کنترل داخلی‌های مورد نیاز است. این عامل نقطه‌ای است که در محدوده تعیین‌شده اضافه کردن کنترل داخلی دیگری برای آن ضروری نیست. براساس راهنمای نرم‌افزار، محدوده مقدار V برابر با ۰/۱۵ است اما، این مقدار نباید قطعی در نظر گرفته شود. در این مطالعه میزان V برای استفاده از سه و چهار کنترل داخلی به ترتیب ۰/۵ و ۰/۴ بود (شکل ۲).

نرم‌افزار NormFinder یک الگوریتم برای پیدا کردن بهترین ژن کنترل در میان تعدادی از ژن‌ها براساس پایداری بیان ژن‌ها در میان نمونه‌های مورد آزمایش است. در این مطالعه این نرم‌افزار به ترتیب ژن‌های ACTB، GUSB و TFRC را به‌عنوان پایداری‌ترین ژن‌ها تعیین کرد (جدول ۴).

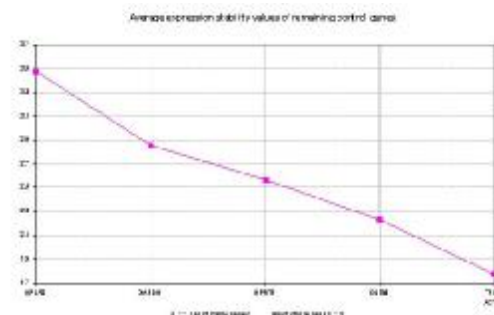
مقایسه آماری بین "نتایج بیان uPA نرمال شده با RPLP0" در یک گروه و "نتایج بیان uPA نرمال شده با ترکیب ACTB و TFRC" در گروه دیگر، تفاوت معنی‌داری را در میزان بیان uPA نشان داد. ($P.value < 0.05$).

بحث

در سال‌های اخیر در زمینه سرطان، پزشکی براساس ویژگی‌های فردی جایگزین نگرش سنتی به درمان‌های دارویی شده است. توصیه می‌شود در همه افراد برای انتخاب درمان مناسب به‌جای استفاده از داروی یکسان، نشانگرهای زیستی مورد تأیید در بیماران اندازه‌گیری شود و رژیم درمانی مناسب بر این اساس انتخاب گردد.



شکل ۲: تعیین تعداد بهینه ژن‌های خانه‌دار برای نرمال سازی (وارد کردن ژن کنترل بیشتر در صورتی که میزان V از ۰/۱۵ کمتر باشد، نیاز نیست).



شکل ۱: آنالیز ژن‌های انتخاب‌شده توسط GeNorm (ژن‌های دارای میزان M کمتر که به سمت راست منحنی قرار دارند، پایداری بیشتری دارند).

جدول ۴: میزان پایداری ژن‌های خانه‌دار براساس تجزیه و تحلیل توسط دو نرم‌افزار GeNorm و NormFinder

geNorm			NormFinder	
رتبه	نام ژن	پایداری (میزان M)	نام ژن	پایداری
1	TFRC	2.846	TFRC	0.796
2	GUSB	2.902	GUSB	1.007
3	ACTB	2.984	ACTB	1.130
4	HPRT1	3.298	HPRT1	1.799
5	GAPDH	3.538	GAPDH	1.984
6	RPLP0	4.737	RPLP0	2.966

ژن‌های دارای عدد کوچک‌تر پایدارتر هستند.

پیشنهاد شده است [۲۹]. در مطالعات دیگر سرطان پستان ژن‌هایی چون 18srRNA و همچنین HPRT1 برای اندازه‌گیری ژن HER-2/neu پیشنهاد شده است [۱۶ و ۲۸].

انتخاب ژن کنترل یکی از مراحل حیاتی در آنالیز Q-RT-PCR است. این ایده که ژن‌های خانه‌دار در سلول‌های مختلف بیان ثابتی دارند، ممکن است انتخاب آن‌ها را در مطالعات مختلف تحت تأثیر قرار دهد. به عنوان مثال در مطالعه MC Neill و همکاران داده‌های انتخاب ژن رفرانس در سرطان کولون و تخمدان برای انتخاب ژن رفرانس در سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفت. از آنجایی که در این مطالعه ژن ACTB در سرطان تخمدان و کولون ناپایدارترین ژن بوده است، از سری ژن‌های مورد مطالعه در سرطان پستان حذف شده است [۱۸]. قابل توجه است که ناپایداری یک ژن در یک سرطان خاص به معنی ناپایداری آن ژن در دیگر سرطان‌ها نیست زیرا الگوی بیان ژن‌های خانه‌دار با مکانیسم‌های سرطان تغییر می‌کند و در نتیجه انتخاب کنترل داخلی برای هر سرطان باید به صورت جداگانه انجام شود. تعمیم انتخاب ژن‌های رفرانس منجر به انتخاب نامناسب آن‌ها می‌شود در نتیجه ممکن است براساس شواهد سرطان‌های دیگر، بعضی از ژن‌ها به طور نادرست به مطالعه اضافه و یا از آن حذف شوند. ممکن است شرایط مختلف، آزمایش بیان ژن‌های خانه‌دار را تحت تأثیر قرار دهد و در نتیجه ژن‌های کنترل پایدار در شرایط مختلف آزمایشگاهی متفاوت باشند. از این رو برای آزمایش‌ها با شرایط مختلف، انتخاب ژن رفرانس باید جداگانه انجام شود.

تعیین پروفایل بیان ژن نقش مهمی در طراحی درمان‌های انفرادی دارد. علیرغم دقت روش‌های تأییدشده اندازه‌گیری نشانگرهای زیستی مانند ایمونوهیستوشیمی برای اندازه‌گیری Her-2/neu، ER و روش الایزا^۴ برای uPA، این روش‌ها معایبی نیز دارند. برای مثال روش الایزا به میزان قابل توجهی بافت نیاز دارد و در نتیجه بافت‌های کوچک که از سرطان‌های در مراحل اولیه به دست می‌آید، به سختی قابل بررسی است [۴]. مطالعات مختلفی برای تعیین امکان جایگزینی روش Q-RT-PCR با روش‌های ذکر شده انجام شده است [۲۳ و ۲۴].

این مطالعه اولین مطالعه در زمینه تعیین ژن‌های مرجع در کمی‌سازی uPA در سرطان پستان است. براساس نتایج این مطالعه ترکیب ACTB و TFRC بهترین ترکیب دو ژنی از نظر پایداری بیان ژن برای مطالعه uPA است. هر دو نرم‌افزار در پیدا کردن پایدارترین و ناپایدارترین ژن یکسان عمل کردند. در این مطالعه TFRC و RPLP0 پایدارترین و ناپایدارترین ژن بودند. همچنین GAPDH و ACTB نیز جزء ناپایدارترین و پایدارترین ژن‌ها بودند که با مطالعه Morse و همکاران و همچنین Gur-Dedeoglu و همکاران همخوانی داشت [۲۸-۲۵]. هر دو نرم‌افزار ترتیب یکسانی از پایداری ژن‌ها را نشان دادند. مطالعات مختلف ژن‌های دیگری را پیشنهاد داده‌اند به عنوان مثال MCNeill و همکاران در مطالعه کمی‌سازی ER، ژن‌های MRPL19 و PPIA به عنوان پایدارترین ژن‌ها و RPLP0 را به عنوان ناپایدارترین ژن معرفی کرده‌اند [۱۸]. در حالی که در مطالعه Lyng و همکاران در اندازه‌گیری ژن ER، ژن‌های TBP، RPLP0 و PUM1 برای مطالعات سرطان پستان

^۴ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

نتیجه‌گیری

تعیین یک ژن کنترل عمومی برای مطالعات بیان ژن دور از واقعیت است در نتیجه پایداری ژن‌های کنترل باید براساس نوع بافت و شرایط آزمایش انجام شود. براساس این مطالعه ژن TFRC پایدارترین ژن کنترل و ترکیب TFRC و ACTB بهترین ترکیب دوزنی برای نرمال‌سازی

uPA در سرطان پستان است. لازم به ذکر است که ژن‌های RPLP0 و GAPDH به‌عنوان رفرنس مناسب توصیه نمی‌شود.

توصیه می‌شود جهت پیدا کردن پایدارترین کنترل‌های داخلی برای هر آزمایش، مطالعه با تعداد نمونه و ژن‌های مرجع متعدد انجام شود.

References

1. Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol* 2009; 33: 315-8.
2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13: 1383-91.
3. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-26.
4. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5287-92.
5. Look M, van Putten W, Duffy M, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *Thromb Haemost* 2003; 90: 538-48.
6. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F, Klijn JGM. Prognostic Value of Urokinase-type Plasminogen Activator in 671 Primary Breast Cancer Patients. *Cancer Research* 1992; 52: 6101-5.
7. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brünner N, Jänicke F, Gelder MEM-V, Henzen-Logmans SC. The Urokinase System of Plasminogen Activation and Prognosis in 2780 Breast Cancer Patients. *Cancer Research* 2000; 60: 636-43.
8. Benraad TJ, Geurts-Moespot J, Grøndahl-Hansen J, Schmitt M, Heuvel JJ, de Witte JH, Foekens J, Leake R, Brünner N, Sweep C. Immunoassays (ELISA) of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA): Report of an EORTC/BIOMED-1 Workshop. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1371-81.
9. Schnitt SJ. Breast Cancer in the 21st Century: New Opportunities and New Challenges. *Mod Pathol* 2001; 14: 213-8.
10. Yaziji H, Gown AM. Testing for HER-2/neu in Breast Cancer: Is Fluorescence In Situ Hybridization Superior in Predicting Outcome? *Adv Anat Pathol* 2002; 9: 338-44.
11. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151-9.
12. Walker N, Slight T. A technique whose time has come. *Science* 2002; 296: 557-9.
13. de la Grange P, Dutertre M, Martin N, Auboeuf D. FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 4276-84.
14. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003; 19: 362-5.
15. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, Dillon W, Lee KF, Clark KE, Haverty P. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* 2001; 7: 97-104.
16. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; 85: 154-9.
17. Li YL, Ye F, Hu Y, Lu WG, Xie X. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serum

- ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2009; 394: 110-6.
18. McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol* 2007; 27: 107-19.
 19. Révillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat JP. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1038-42.
 20. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034.
 21. Killeen S, Hennessey A, El Hassan Y, Waldron B. The urokinase plasminogen activator system in cancer: a putative therapeutic target? *Drug News Perspect* 2008; 21: 107-16.
 22. Andersen C, Jensen J, Orntoft T. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245-50.
 23. Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J. Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Urokinase Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1, and Tissue Metalloproteinase Inhibitor Type 1 Gene Expressions in Primary Breast Cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1288-95.
 24. de Cremoux P, Tran-Perennou C, Brockdorff B, Boudou E, Brunner N, Magdelenat H, Lykkesfeldt A. Validation of real-time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 409-18.
 25. Drury S, Anderson H, Dowsett M. Selection of REFERENCE Genes for Normalization of QRT-PCR Data Derived From FFPE Breast Tumors. *Diagnostic Molecular Pathology* 2009; 18: 103-7. 110.1097/PDM.1090b1013e31817c31811ae31812.
 26. Gur-Dedeoglu B, Konu O, Bozkurt B, Ergul G, Seckin S, Yulug I. Identification of endogenous reference genes for QRT-PCR analysis in normal matched breast tumor tissues. *Oncol Res* 2009; 17: 353-65.
 27. Larionov A, Dixon J, Krause A, Evans D, Miller W. Validation of reference genes for relative real time PCR to study hormone-dependent gene expression in breast cancer biopsies. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94.
 28. Morse DL, Carroll D, Weberg L, Borgstrom MC, Ranger-Moore J, Gillies RJ. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 2005; 342: 69-77.
 29. Lyng M, Laenkholm A, Pallisgaard N, Ditzel H. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* 2008; 22: 20.