بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی

عنوان

ساخت سازهٔ حاوی ژن tBid تحت کنترل پروموتر میدکاین و بررسی بیان آن در ردهٔ سلولی HepG2

نگارش

سمیرا احمدی

استاد راهنما

دکتر حسین عبدل تهرانی

استاد مشاور

دکتر فاطمه رهبری‌زاده

تابستان ۱۳۸۹

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم سمیرا احمدی رشته: بیوتکنولوژی پزشکی گرایش: --- تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر حسین عبدل تهرانی (استاد راهنما)

دکتر فاطمه رهبری زاده (استاد مشاور)

دکتر بهرام کاظمی (استاد ناظر)

دکتر محمدجواد رسایی (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱ : حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲ : انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به‌صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به‌صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه / رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳ : انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ٤ : ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه / رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵ : این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی – پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** است که در سال **۱۳۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر حسین عبدل تهرانی**، مشاوره **سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری‌زاده** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **سمیرا احمدی** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

تقدیم به :

خانوادهٔ مهربانم

تشکر و قدردانی

استاد ارجمند جناب آقای دکتر تهرانی که از کمک‌های ایشان در مراحل مختلف اجرای این پایان‌نامه بهره‌مند بوده‌ام.

استاد محترم سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده مشاور این تحقیق که بدون مساعدت‌ها و رهنمودهای ایشان کار برای من بسیار سخت‌تر می‌گشت.

دوست خوبم سرکار خانم سامیلا فرخی‌منش که مرا یاری دادند.

دوستان عزیزم در گروه بیوتکنولوژی پزشگی دانشگاه تربیت مدرس که مساعدت و همکاریشان قابل تقدیر است.

با تشکر از تمام اساتیدی که مرا یاری دادند.

با تشکر از کارکنان و کارمندان

چکیده

سرطان کبد (HCC) یکی از سرطان‌های شایع دنیاست که به علت کمبود راهکارهای درمانی مناسب آمار مرگ و میر ناشی از آن بسیار بالاست. امروزه ژن درمانی امیدهای تازه‌ای برای درمان این سرطان ایجاد کرده است. مزیت بزرگ ژن درمانی، هدفمند عمل کردن آن است یعنی می‌تواند راهکارهایی اتخاذ گردد که از طریق آن فقط سلول‌های سرطانی از بین برود. میدکاین یک فاکتور رشد و تمایز است که در بسیاری از سرطان‌ها دچار بیش‌بیان می‌گردد و HCC از جملهٔ این سرطان-هاست. در تحقیق حاضر از پروموتر آن جهت کنترل بیان ژن پیش‌آپوپتوزی tBid در سلول‌های سرطانی استفاده شده است. ژن tBid یکی از ژن‌های قدرتمند در القای آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی است که به تازگی به عنوان ترنسژن کشنده در ژن درمانی سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق ژن tBid با روش RT-PCR، از سلول‌های لنفوسیت انسان که این ژن را بیان می‌کنند، تکثیر و در وکتور pcDNA3.1/Hygro+ کلون شد تا سازهٔ pCMV-tBid حاصل شود. سپس پروموتر میدکاین با انجام Slowdown Hotstart PCR و در حضور ۱۰٪ گلیسرول تکثیر و در سازهٔ فوق جایگزین پروموتر CMV گردید تا سازهٔ pMK-tBid به دست آید. سازه‌های حاصل به رده‌های سلولی سرطان کبد(HepG2) و نرمال فیبروبلاستی (AG01522) منتقل و بیان ژن tBid در این سلول‌ها با روش RT-PCR و مرگ و میر سلول‌ها با شمارش سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن tBid تحت کنترل پروموتر میدکاین در سلول‌های HCC افزایش بیان قابل توجهی و حتی بالاتر از CMV نشان می‌دهد، در حالیکه در ردهٔ سلولی نرمال بیان کمی دارد. ضمن اینکه آمار مرگ و میر سلول‌های سرطانی که سازهٔ pMK-tBid. رادریافت کرده‌اند، بیش از سلول‌هایی است که pCMV-tBid را گرفته‌اند، و حال آنکه در ردهٔ نرمال سلول‌های بسیار کمتری در اثر سازهٔ pMK-tBid نسبت به سازهٔ pCMV-tBid از بین رفته‌اند.

واژه‌های کلیدی: HCC، ژن درمانی، کنترل رونویسی، پروموتر میدکاین، ژن tBid.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. سرطان ۲

۱-۱-۱. سرطان کبد ۳

۱-۲. ژن درمانی ٤

۱-۲-۱. انتقال ژن کشنده به سلول‌های سرطانی ٦

۱-۲-۲. هدفمند بودن مزیت ژن درمانی ۷

۱-۳. کنترل رونویسی ۸

۱-۳-۱. پروموترهای اختصاصی بافت ۹

۱-۳-۱-۱. بیان محدود به پروستات ۹

۱-۳-۱-۲بیان محدود به کبد ۱۰

۱-۳-۱-۳. بیان محدود به تیروئید ۱۰

۱-۳-۲. پروموترهای اختصاصی تومور ۱۱

۱-۳-۲-۱. پروموترهای ویژه سرطان (CSP)..... ۱۲

۱-۳-۲-۱-۱. تلومراز..... ۱۲

۱-۳-۲-۲. پروموترهای اختصاصی نوع تومور (TTSP)..... ۱۳

۱-۳-۲-۲-۱. AFP..... ۱۳

۱-۳-۲-۳. پروموترهای وابسته به ریز محیط توموری..... ۱٤

۱-۳-۲-٤. پروموترهای ویژه اندوتلیوم رگی..... ۱٦

۱-٤. میدکاین..... ۱۷

۱-٤-۱. ژن و پروتئین..... ۱۷

۱-٤-۲. مکانیسم‌های عمل میدکاین ۱۹

۱-٤-۳. میدکاین در سرطان‌ها..... ۲۰

۱-٤-٤. میدکاین در التهاب و ترمیم ۲۱
۱-٤-٥. استفاده از پروموتر میدکاین در سرطان‌ها ۲۲
۱-٥. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول ۲۳
۱-٥-۱. مسیر سیتوزولی یا مسیر کاسپازی آپوپتوز ۲٤
۱-٥-۲. مسیر میتوکندریایی آپوپتوز ۲٦
۱-٥-۲-۱. خانوادهٔ پروتئین‌های Bcl-2 ..... ۲٦
۱-٥-۲-۲. خروج عوامل مرگزا از میتوکندری ۲۷
۱-٥-۳. Bid ۲۸
۱-٥-٤. دسته‌بندی سلول‌ها در برگزیدن مسیرهای آپوپتوزی ۳۱
۱-٦. PCR مناطق غنی از GC ژنوم ۳۱
۱-٦-۱. مواد افزودنی ۳۲
۱-٦-۲. روش‌های مختلف PCR ۳۲
۱-٦-۲-۱. Touch down PCR ۳۲
۱-٦-۲-۲. Slow down PCR ۳۳
۱-٦-۲-۳. Hot Start PCR ۳۳

فصل دوم: مواد و روشها ۳٥
۲-۱. مواد محلول‌ها محیط کشت و تجهیزات ۳٦
۲-۱-۱. مواد ۳٦
۲-۱-۲. بافرها ۳٦
۲-۱-۲-۱. بافرهای الکتروفورز DNA ۳٦
۲-۱-۳. محیط‌های کشت ۳۷
۲-۱-۳-۱. محیط‌های کشت و ذخیره باکتری ۳۷
۲-۱-۳-۲. محیط‌های کشت سلولی ۳۸
۲-۱-٤. آنتی‌بیوتیک ۳۹

۲-۱-۵. پلاسمید ٤٠

۲-۱-٦. الیگونوکلئوتیدها ٤٠

۲-۱-٦-۱. الیگونوکلئوتیدهای ساخت پروموتر Midkine ٤٠

۲-۱-٦-۲. الیگونوکلئوتیدهای ساخت ژن tBid ٤٠

۲-۱-٦-۳. الیگونوکلئوتیدهای ژن β اکتین ٤٠

۲-۱-۷. کیت‌ها ٤١

۲-۱-۸. رده‌های سلولی ٤١

۲-۱-۹. سایر مواد ٤١

۲-۲. روش‌ها ٤٢

۲-۲-۱. تهیه وکتور ٤٢

۲-۲-۱-۱. تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش الکتریکی ٤٢

۲-۲-۱-۲. انتقال الکتریکی پلاسمید به باکتری ٤٣

۲-۲-۱-۳. تخلیص پلاسمیدها ٤٤

۲-۲-۱-٤. الکتروفورز پلاسمید تخلیص شده بر ژل آگارز ٤٤

۲-۲-۱-۵. ارزیابی کمی میزان پلاسمیدها ٤٤

۲-۲-۲. استخراج DNA و RNA ٤٤

۲-۲-۲-۱. جداسازی لنفوسیت از خون کامل ٤٥

۲-۲-۲-۲. کشت و آماده‌سازی سلولهای MCF-7 ..... ٤٦

۲-۲-۲-۳. استخراج DNA از سلول‌های MCF-7 ..... ٤٧

۲-۲-۲-٤. ارزیابی محصول استخراج DNA ٤٧

۲-۲-۲-۵. تخلیص RNA ٤٨

۲-۲-۳. تکثیر قطعات ژنی tBid و Midkine ٥٠

۲-۲-۳-۱. ساخت cDNA ٥٠

۲-۲-۳-۲. آماده‌سازی پرایمرها جهت استفاده در PCR ٥١

۲-۲-۳-۳. واکنش تکثیر قطعات tBid و پروموتر ژن Midkine به روش PCR ٥١

۲-۲-۳-۳-۱.تکثیر قطعهٔ ژنی tBid ۵۱
۲-۲-۳-۳-۲.تکثیر قطعهٔ پروموتری ژن Midkine ۵۲
۲-۲-۳-٤. تخلیص DNA از ژل آگارز ٥٤
۲-۲-٤. کلون کردن ژن tBid در پلاسمید pCDNA 3.1 / Hygro+ ۵۵
۲-۲-٤-۱. واکنش هضم آنزیمی جهت وارد کردن ژن tBid به پلاسمید pCDNA3.1 / Hygro^{+} ۵۵
۲-۲-٤-۲. واکنش اتصال آنزیمی قطعه tBid به وکتور pCDNA 3.1 / Hygro^{+} ۵۷
۲-۲-٤-۳. انتقال الکتریکی پلاسمید حاوی tBid به باکتری مستعد ۵۸
۲-۲-۵. تأیید کلونینگ ۵۸
۲-۲-۵-۱. تأیید کلونینگ به روش Colony PCR ۵۸
۲-۲-۵-۲. تأیید کلونینگ به وسیلهٔ هضم آنزیمی ۵۹
۲-۲-٦. کلون کردن قطعهٔ پروموتری میدکاین در پلاسمید pCMV-tBid ٦۰
۲-۲-٦-۱. واکنش هضم آنزیمی جهت وارد کردن پروموتر MK به پلاسمید pCMV-tBid ٦۰
۲-۲-٦-۲. واکنش اتصال آنزیمی قطعه پروموتر MK به پلاسمید pCMV-tBid ٦۲
۲-۲-٦-۳. انتقال به میزبان باکتریایی TG1 ..... ٦۳
۲-۲-٦-٤. تأیید کلونینگ به روش Colony PCR ٦۳
۲-۲-٦-۵. تأیید کلونینگ به وسیلهٔ هضم آنزیمی ٦٤
۲-۲-۷. تهیه جمعیت سلولی HepG2 و AG01522 ..... ٦۵
۲-۲-۷-۱. شرایط رشد سلول‌های HepG2 و AG01522 ..... ٦۵
۲-۲-۷-۲. کشت سلول‌های HepG2 و AGO در فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری ٦٦
۲-۲-۷-۳. ترانسفکشن سلول‌ها ٦٦
۲-۲-۸. بررسی سلول‌ها پس از دریافت سازه‌ها ٦۸
۲-۲-۸-۱بررسی میزان بیان ژن tBid با روش RT-PCR ٦۸
۲-۲-۸-۲. بررسی مرگ سلولی ۷۰

فصل سوم: نتایج ۷۱

۳-۱. ساخت سازه‌های pCMV-tBid و pMK-tBid ۷۲
۳-۱-۱. نتایج تخلیص پلاسمید $pCDNA\ 3.1/Hygro^+$ از باکتری *E. coli* نوع TG1 ..... ۷۳
۳-۱-۲. نتایج تخلیص DNA ژنومی سلول‌های MCF7 ..... ۷٤
۳-۱-۳. نتایج استخراج RNA و سنتز cDNA ۷٤
۳-۱-٤. نتایج PCR ژن tBid ۷۵
۳-۱-۵. نتایج PCR قطعهٔ پروموتری Midkine ۷٦
۳-۱-٦. نتایج کلون کردن قطعه tBid در پلاسمید $pCDNA\ 3.1/Hygro^+$ ۷۸
۳-۱-۷. نتایج کلونینگ پروموتر Midkine در پلاسمید pCMV-tBid ۸۰
۳-۱-۸. شمایی از وکتور مورد استفاده در این تحقیق ($pCDNA\ 3.1/Hygro^+$) و سازه‌های حاصل از آن ۸۲
۳-۲. نتایج ترانسفکشن سلولهای MCF-7 و AGO با سازه‌های حاصل ۸۳
۳-۲-۱. نرخ ترانسفکشن سلول‌ها ۸۳
۳-۲-۲. نتایج بررسی مرگ سلولی ۸٤
۳-۲-۳. نتایج بررسی میزان باین ژن در سلول‌ای دریافت کنندهٔ سازه‌های بخش ۳-۱-۸ ..... ۸۵

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۸۹
٤-۱. بحث و نتیجه‌گیری ۹۰
٤-۲. پیشنهادها ۹۸

فهرست منابع ۹۹
چکیده انگلیسی ۱۱۱

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه

جدول۱-۱. مثال‌هایی از پروموترهای اختصاصی بافت ۱۱

جدول ۱-۲. تعدادی از پروموترهای اختصاصی نوع تومور ۱۵

جدول ۱-۳. تعدادی از پروموترهای اختصاصی ریزمحیط توموری ۱۶

جدول ۱-٤. تأثیر میدکاین در سلول‌های مختلف..... ۱۸

جدول ۱-۵. میدکاین در سرطان‌ها ۲۲

جدول ۱-٦. میدکاین در بیماری‌های التهابی ۲۹

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... صفحه

شکل ۱-۱. کمپلکس گیرندهٔ میدکاین در سطح سلول ۲۰

شکل ۱-۲. مسیر آپوپتوزی Fas-FasL ۲۵

شکل ۱-۳. مسیر آپوپتوزی Trail-TrailR ۲۵

شکل ۱-٤. مسیر میتوکندریایی آپوپتوز ۲٦

شکل ۱-۵. دومن‌های مشترک در پروتئین‌های خانوادهٔ Bcl2 ..... ۲۷

شکل ۱-٦. الیگومریزه شدن Bax و Bak به کمک tBid ۲۹

شکل ۱-۷. نفوذ tBid در کاردیولیپین غشای میتوکندری ۲۹

شکل ۱-۸. نفوذپذیر شدن غشای لیزوزوم به کمک tBid ۳۰

شکل ۱-۹. سه متد PCR، استاندارد، Touchdown PCR ، Slowdown PCR ۳٤

شکل ۳-۱. تخلیص پلاسمید pcDNA3.1/Hygro+ ۷۳

شکل ۳-۲. تخلیص DNA ژنومی از سلول‌های MCF-7 ..... ۷٤

شکل ۳-۳. استخراج RNA ۷۵

شکل ۳-٤. نتیجهٔ PCR قطعهٔ tBid ۷٦

شکل ۳-۵. نتیجهٔ PCR قطعهٔ پروموتری Midkine ۷۷

شکل ۳-٦.الف. تأیید کلونینگ ژن tBid ۷۸

شکل ۳-٦.ب. تعیین توالی ژن tBid ۷۹

شکل ۳-۷.الف. تأیید کلونینگ پروموتر Midkine ۸۰

شکل ۳-۷.ب. تعیین توالی پروموتر Midkine ۸۱

شکل ۳-۸.الف. دریافت سازهٔ حاوی GFP ۸٤

شکل ۳-۹. نتایج RT-PCR سلول‌های بیان کنندهٔ tBid ۸٦

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱. سرطان

سرطان یکی از تهدیدهای مهم سلامتی در جهان و یکی از مهمترین علل بیماری و مرگ در کودکان و بالغین است. سرطان، ناشی از تکثیر بی‌رویه رده‌های سلولی تغییر یافته و گسترش آن‌ها است. رشد تومورهای بدخیم عمدتاً به قدرت تکثیر سلول توموری و توانایی تهاجم به بافت‌های میزبان و متاستاز به محل‌های دورتر بستگی دارد[۱]. سرطان فرآیند چند مرحله‌ای و پیچیده است که با مجموعه‌ای از تغییرات سلولی همراه می‌باشد. گر چه مکانیسم‌های کلی ایجاد سرطان تا حدودی شناخته شده است، اما هر نوع سرطان اساس ژنتیکی، خصوصیات و ویژگی‌های خاص خود را دارا است. [۲]

به طور کلی چهار مکانیزم ژنتیکی اصلی برای تغییر سلول‌های نرمال به سلول‌های سرطانی وجود دارند که عبارتند از:

۱. بیش‌بیان انکوژن‌ها[1]: باعث تحریک رشد سلول‌ها می‌شود مثل فعال شدن فاکتور رونویسی c-myc .

۲. از دست رفتن عملکرد ژن‌های سرکوبگر تومور[2] یا آنتی‌انکوژن‌ها: از دست رفتن مهار رشد سلول‌ها. مانند غیر فعال شدن p53

1. Oncogenes
2. Tumor suppressor genes

۳. بیان بالای ژن‌هایی که محصولات آنها از مرگ سلولی طبیعی جلوگیری می‌کنند مثل پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی خانوادهٔ Bcl2.

٤. بیان بالای ژن‌هایی که مانع عملکرد ژن‌های ترمیم DNA آسیب‌دیده تحت شرایط طبیعی می‌شوند[۳].

۱-۱-۱. سرطان کبد

هپاتوسلولار کارسینوما[1] (HCC) شایع‌ترین شکل از سرطان‌های اولیهٔ کبد است و یکی از متداول‌ترین بیماری‌های بدخیم در سراسر دنیا محسوب میشود. HCC معمولاً در بیماران مبتلا به سیروز کبدی ایجاد می‌شود که سیروز خود می‌تواند بر اثر هپاتیت‌های ویروسی، مصرف الکل، هومئوکروماتوز ارثی[2]، بیماری‌های خودایمنی کبد و در واقع هر بیماری که در کبد التهاب مزمن ایجاد کند، به وجود آید. تصور می‌شود که مبانی مولکولی هپاتوکارسینوژنز مانند بسیاری از سرطان‌های دیگر به بخش‌های زیر تقسیم شود:

۱. فعال شدن بعضی ژن‌ها از قبیل بعضی فاکتورهای رشد (IGF-II و TGF-α) ، آنزیم تلومراز که باعث نامیرا شدن سلول‌ها می‌شود، و بعضی انکوژن‌ها (مثل c-myc و β-catenin).

۲. غیر فعال شدن ژن‌های سرکوبگر توموری (مثل p53 و Rb) [٤].

HCC سومین رتبه را در بین مرگ و میرهای ناشی از سرطان در جهان داراست [۵]. علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر علم پزشکی در معالجهٔ سرطان‌ها، درمان مؤثر در مورد HCC به خصوص در موارد پیشرفتهٔ بیماری عملاً وجود ندارد [٦]، جراحی و برداشت تومور که تنها راه درمانی در این سرطان است اغلب به دلیل پیشرفته بودن بیماری، عود مجدد بیماری در کبد یا سایر نقاط بدن و یا از دست رفتن بخش زیادی از کبد پس از جراحی به دلیل وجود سیروز در کبد به همراه HCC خیلی موفقیت آمیز نیست [۵،۷،۸]. امروزه ژن درمانی امیدهای تازه‌ای برای درمان این سرطان ایجاد کرده است.

---

1. Hepatocellular Carcinoma
2. Hereditary Haemochromatosis

۱-۲. ژن درمانی

ژن درمانی انتقال یک ژن خارجی که ترنسژن[1] نامیده می‌شود به سلول‌های بدنی[2] فرد بیمار به منظور دست‌یابی به جنبه‌های درمانی است. در ابتدا ژن درمانی به عنوان روشی برای درمان بیماری-های ارثی به نظر می‌رسید اما توانایی بالقوهٔ آن برای درمان بیماری‌های اکتسابی مثل سرطان به خوبی مشخص شده است [۹].

در حال حاضرمهم‌ترین کاربرد ژن درمانی در رابطه با درمان سرطان‌ها می باشد. اهداف ژن درمانی سرطان‌ها شامل موارد ذیل می‌باشد؛ جایگزینی ژن‌های مهارکنندهٔ تومور، ارائهٔ ژن‌های مقاوم به داروها به سلول‌های پیش‌ساز خونی برای محافظتشان در برابر سمیت مواد شیمی‌درمانی، انتقال ژن‌های سایتوکاین‌ها، انتقال ترنسژن کشنده به سلول‌های سرطانی و خاموش‌سازی انکوژن‌ها[۱۰].

الف) جایگزینی ژن های مهارکننده تومور

جهش در ژن مهارکننده تومور p53 شایع‌ترین جهش ژن های مهارکنندهٔ تومور در سرطان‌ها می‌باشد. ارائهٔ این ژن به رده‌های سلولی سرطان کلون منجر به مهار تکثیرشان می‌شود. انتقال این ژن توسط وکتور آدنوویروسی به موش‌های مدل سرطان کلون منجر به کاهش رشد تومور و افزایش طول عمر موش‌ها گردید [۱۱] . جایگزینی نسخه سالم این ژن در چند سرطان دیگر از جمله سرطان کلون و سروگردن انجام گرفته و تنها اثرات جانبی آن تب و تغییرات گذرای آنزیم‌های کبدی است.

سایر مهارکننده‌های تومور برگزیده برای درمان سرطان ها که حداقل در فازهای پری‌کلینیکال مورد بررسی قرار گرفته‌اند شامل موارد ذیل می‌باشند؛ PTEN ,E.cadherin ,C.CAM pHyde،,BRCA1 [۱۲].

1. Transgene
2. somatic cells

ب) ژن درمانی به منظورارائهٔ ژن های مقاومت به داروها

روشی دیگر که بسیار گسترش یافته است، ارائهٔ ژن‌هایی به سلول‌های نرمال و بافت‌های غیر سرطانی بیمار است که سبب ایجاد مقاومت به عوامل شیمی‌درمانی در این سلول‌ها گشته و کیفیت و تأثیر شیمی درمانی را افزایش می‌دهد.

سیستم‌هایی که به‌طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است، سه سیستم گلیکوپروتئین P یا مقاومت دارویی چندگانه[1] MDR ، اشکال مقاوم به داروی دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) و D^6 آلکیل گوانین DNA آلکیل ترانسفراز (AGT) می‌باشند. به‌طور معمول استراتژی درمانی عبارت است از ارائه و بیان یک ژن مقاومت دارویی به جمعیت‌های سلول هموپویتیک، که سبب می‌شود عامل شیمی‌درمانی سمیت کمتری برای بیمار به همراه داشته و امکان درمان ضدتوموری مؤثرتری را فراهم آورد [۱۳].

ج) انتقال ژن‌های سایتوکاین‌ها

در این روش لنفوسیت‌هایی را که در محل تومور لانه‌گزینی می‌کنند را با ژن‌های کد کننده اینترلوکین‌ها از جمله IL-1β,2,4,12 و GM-CSF[2] و انترفرون گاما ترانسفکت کرده و در نتیجه منجر به تحریک پاسخ‌های ایمنی علیه سلول‌های سرطانی می‌شوند.

مثلاً در درمان مزوتلوما از وکتورهای واکسینا ویروس کد کننده IL-12 و رتروویروسی کدکننده INF-γ،GM-CSF در فاز کلینیکی استفاده شده است. با این وجود تنها در تعداد کمی از بیماران تحت درمان پاسخ ایمنی علیه سلول‌های سرطانیشان مشاهده گشت [۱٤].

د) خاموش‌سازی ژن‌ها

به کلیه مکانیسم‌هایی گفته می‌شود که منجر به مهار بیان ژن هدف می شوند. انواع روش‌های

1. Multiple drug resistance
2. Granolocyte Monocyte Colony Stimulating Factor