مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۲، شماره۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶(شماره پی در پی ۱۲۰)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی پروموتور ژن MMP-2 بر ابتلا و متاستاز سرطان ریه

حمیده کشوری روان[۱]، فاطمه کوهکن[۲*]، حسین سازگار[۱]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، [۲]گروه ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۱

چکیده

زمینه و هدف: بالا بودن میزان بروز سرطان ریه و پیش آگهی ضعیف آن سبب شده است که این سرطان به عنوان یک معضل مهم بهداشتی در چند دهه اخیر مطرح باشد. پیشرفت تومور نیازمند تجزیه ترکیب‌های ماتریکس خارج سلولی است و افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئازها با حمله‌ی تومور و متاستاز آن در تومورهای بدخیم بافت های مختلف، ارتباط دارد. ماتریکس متالو پروتئازها قادر به تجزیه تمام ترکیب‌های ماتریکس خارج سلولی و غشاهای پایه هستند. افزایش بیان MMPs در بسیاری از بدخیمی‌ها ثابت شده است. هدف از این مطالعه حاضر بررسی اثر پلی مورفیسم در پروموتر ژن MMP-2 با ابتلا به سرطان ریه و متاستاز آن در گروه بیماران مبتلا به سرطان ریه و گروه شاهد با روش PCR-RFLP بود.

روش بررسی: در این مطالعه از نوع مورد- شاهدی، به منظور بررسی چند شکلی ژن MMP-2 از ۵۰ فرد مبتلا به سرطان ریه و ۷۷ فرد سالم(شاهد) تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و با توجه به علایم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی خون‌گیری به عمل آمد. DNA ژنومی‌از نمونه‌های خون با استفاده از کیت شرکت سیناژن استخراج گردید. به منظور تکثیر ژن MMP-2 از روش PCR بهره گرفته شد و چند شکلی ژنی این ناحیه به روش PCR RFLP با آنزیم برش دهنده *FSPB*I بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون مربع کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بررسی توزیع آللی و ژنوتیپی در بیماران سرطان ریه و کنترل نشان داد که فراوانی آلل C و T در افراد مبتلا به سرطان ریه به ترتیب ۹۰ و ۱۰ درصد بودند (p=۰/۰۴). در حالی که فراوانی همین آلل‌ها در افراد سالم به ترتیب ۸۰/۱۵ و ۳۰ درصد بود (p= ۰/۰۵). هم‌چنین فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT در افراد مبتلا به سرطان ریه به ترتیب ۸۲، ۱۶ و ۲ درصد (p=۰/۰۵) و در افراد سالم به ترتیب ۶۹/۹۳، ۳۱/۱۶ و ۳/۱ درصد مشاهده گردید (p=۰/۵). مقایسه گروه‌های ژنوتیپی در گروه غیرمتاستاز و کنترل تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. مقایسه ژنوتیپ هموزیگوت CC در گروه متاستاز و کنترل دخالت مستقیم آلل C در مرحله متاستاز نشان داد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد افراد واجد آلل C می‌توانند استعداد ابتلا به سرطان ریه را افزایش دهند. هم‌چنین یافته‌ها نشان داد که ژنوتیپ CC به عنوان یک فاکتور تسهیل کننده با ریسک گسترش متاستاز در سرطان ریه مرتبط می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان ریه، ماتریکس متالوپروتئیناز، ماتریکس متالوپروتئاز ۲، پلی‌مورفیسم طولی قطعات محدود

*نویسنده مسئول: فاطمه کوهکن، تهران، مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته، دانشکده زیست شناسی، گروه ژنتیک مولکولی
Email: biology1991@yahoo.com

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

مقدمه

سرطان ریه شایع‌ترین سرطان در دنیا است و درحال حاضر به عنوان یک اپیدمی‌در مقیاس جهانی در نظر گرفته می‌شود. انتظار می‌رود که در آینده نزدیک، موارد ابتلا به این سرطان روند رو به فزونی داشته باشد(۱). بر اساس تقسیم بندی انجمن سرطان آمریکا، دو نوع اصلی سرطان ریه عبارت است از؛ سرطان ریه با سلول‌های کوچک SCLC[۱] و سرطان ریه با سلول‌های غیر کوچک[۲]. سرطان ریه نوع SCLC، ۲۵ـ۲۰ درصد از کل موارد سرطان ریه را در بر می‌گیرد و شامل سلول‌های سرطان ریه از نوع کوچک می‌باشد که در آن روند رشد و تکثیر تومور بسیار سریع بوده و در مدت زمان اندکی به سایر نقاط بدن متاستاز می‌دهد. نوع NSCLC در برگیرنده حدود ۸۰-۷۵ درصد از کل موارد سرطان ریه می‌شود که از نظر بافت‌شناسی به زیر گروه‌های کوچکتر تقسیم‌بندی می‌شود که با وجود تفاوت در خصوصیات بالینی، روند مشترکی در تشخیص و معالجه دارند(۲). تا به امروز نرخ ابتلا به سرطان ریه در ایران نسبتاً کم بوده است. با این حال در سال‌های اخیر، سرطان ریه به سومین علت عمده مرگ و میر، پس از بیماری‌های قلبی ـ عروقی و تصادف‌ها در ایران تبدیل شده است. سرطان ریه یکی از پنج تومور پیشرو در ایران است و نرخ آن به طور پیوسته در مردان و زنان در حال افزایش است(۳). فراوانی سرطان ریه در ایران کمتر از اروپا و ایالات متحده آمریکا است. در مقیاس سراسر کشور، سرطان ریه در رتبه هفتم یا هشتم در مردان و فراتر از دهم در زنان است در حالی که در مقیاس جهانی به ترتیب در جایگاه ۱و۴ در مردان و زنان است(۴). با وجود فراوانی پایین سرطان ریه در ایران، بیماران مبتلا به این نوع سرطان بقای کوتاه مدت دارند. رتبه‌بندی ۲ در مردان و ۳ در زنان به عنوان علت مرگ مرتبط با سرطان را دارا می‌باشد(۵). ماتریکس متالوپروتئینازها[۳]، خانواده ای از اندوپپتیدازها هستند که به لحاظ ساختاری و عملکردی وابسته به روی می‌باشند و در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مشارکت دارند(۶). تا به امروز حدود ۲۴ نوع MMP مختلف در مهره‌داران شناسایی شده است که از آن میان، ۲۳ مورد از آن‌ها در انسان یافت می‌شود. ماتریکس‌ها در هیدر، توتیای دریایی و آرابیدوپسیس نیز یافت می‌شوند(۷). از نظر خانوادگیMMP ها به شش گروه کلاژنازها، ژلاتینازها، استروملیزین‌ها، ماتریلیزین‌ها، MMPهای تیپ غشایی و MMP های دیگر تقسیم‌بندی می‌شوند. هر کدام از این گروه‌ها دارای زیر واحدهای مخصوص به خود بوده که وظایف منحصر به فردی ایفا می‌کنند(۸). تنظیم و کنترل فعالیت MMPها در سه سطح تنظیم رونویسی، فعال‌سازی پروآنزیم و مهار فعالیت آنزیم صورت می‌گیرد(۹). فعال‌سازی MMPها مستلزم مشارکت سایر پروتئینازها است تا پروپپتید را از میان بردارند. اغلب

1-Small Cell Lung Cancer (SCLC
2- Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
3- Matrix metalloproteinases (MMPs)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

MMPها در فضای خارج سلولی به وسیله پروتئینازهای پلاسما، بافت، پروتئینازهای باکتریایی یا MMPهای فعال شده دیگر، فعال‌سازی می‌شوند، اما برخی دیگر مانند ۲۸، ۲۳ و ۱۱ -MMP و MT-MMPها به صورت درون سلولی پیش از ترشح، به وسیله سرین پروتئینازهای شبه فورین داخل سلولی فعال‌سازی می‌شوند(۱۰). فعالیت MMPها، به وسیله مهارکننده‌های اندوژنی به شدت کنترل می‌شود و می‌تواند به صورت اختصاصی و به صورت غیراختصاصی مهار شود(۱۱). در ابتدا تصور می‌شد که MMPها تقریباً منحصراً در تهاجم و متاستاز حائز اهمیت هستند، اما تحقیق‌های اخیر ثابت می‌کنند که MMPها در چند مرحله از شکل‌گیری سرطان دخیل هستند(۱۲). از جمله مهم‌ترین این مراحل می‌توان به تنظیم رشد، تنظیم آپوپتوز، تنظیم رگ‌زایی، نقش در تمایز و پاسخ‌های ایمنی به سرطان اشاره کرد(۱۳). بیان و فعالیت MMPها تقریباً در تمام انواع سرطان‌های انسانی افزایش می‌یابند. این امر با مرحله تومور پیشرفته، افزایش تهاجم و متاستاز و کاهش بقا مرتبط است. بنابراین اطلاعات بالینی بسیار قوی موید نقش MMPها در پیشروی سرطان انسانی است. در تومورهای انسانی، سلول‌های سرطانی تنها منشأ MMPها نیستند. در حالی که برخی MMPها به وسیله سلول‌های تومور سنتز می‌شوند، بسیاری دیگر از جمله MMP-2 و MMP-9 غالباً به وسیله سلول‌های استرومایی ایجاد می‌شوند(۱۴). MMP-2 دسته‌ایی از اعضای خانواده MMP ها بوده که به عنوان ژلاتیناز A یا ژلاتیناز ۷۲ کیلو دالتون شناخته شده است و به وسیله رنج وسیعی از سلول‌های فیبروبلاست، اپیتلیوم، ماکروفاژها و سلول‌های آندوتلیال در ریه تولید می‌شود (۱۵). MMP-2 دارای یک قلمرو شبیه به فیبرونکتین و واسطه گر اتصال به ژلاتین است که می‌تواند به طور پروتئولیتیکی ژلاتین، کلاژن نوع چهار و الاستین را تجزیه کند (۱۶). در مطالعه‌هایی که به وسیله هنری و همکاران، و کیلی و همکاران انجام شد، نشان دادند که فعالیت و بیان پروتئین MMP-2 با هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های عضله صاف مرتبط است که این وقایع در نمای پاتولوژیک بیماری‌های مهمی‌مانند فیبروز ریوی، پنومونی سازمان یافته و آسم وجود دارد. به علاوه پروتئین‌های خانواده MMP به ویژه MMP-2، هم در تکامل ریه(۱۷) و هم در بسیاری از اختلالات ریوی از جمله فیبروز ریوی ایدیوپاتیک[1]، آمفیزم، برونشکتازی، آسیب‌های حاد ریوی، افیوژن پلورال و سرطان ریه نقش مهمی‌دارند(۱۸). این مسئله باعث شده است که محققین در زمینه نقش پروتئین MMP-2 در ایجاد فیبروز ریه اتفاق نظر نداشته باشند، چرا که عده‌ای نقش آن را در روند ایجاد فیبروز و عده‌ای نقش آن را در روند بهبود فیبروز ضروری می‌دانند(۱۹).

تا کنون پلی‌مورفیسم‌های MMP-2 متعددی گزارش شده‌اند که تصور می‌شود تعدادی از آن‌ها

1- Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

عملکردی می‌باشند. SNPهایی که در منطقه رمزگذاری کننده قرار دارند، به ویژه SNPهای غیرهمسان ممکن است بر فعالیت پروتئین تأثیر بگذارند و در نتیجه ممکن است با ایجاد و متاستاز سرطان مرتبط باشند(۲۰). SNP ها شایع‌ترین مارکرهای ژنتیکی ارثی هستند که بخش قابل توجهی از ناهمگونی را در میان افراد توجیه می‌کنند. به لحاظ بیولوژیکی این مسئله قابل قبول است که میزان بیان MMP-2 و عملکرد پروتئین ممکن است به وسیله SNPهای عملکردی در داخل یا پیرامون منطقه ژن MMP تعدیل شود و در نتیجه رشد، تهاجم یا متاستاز و بقاء تومور را پیش برد(۲۱). در NSCLC ارتباط تنگاتنگی بین سطوح در حال گردش ماتریکس متالوپروتئازها و میزان بقا گزارش شده است. شماری از مطالعه‌های ارتباط بین واریانت‌های ژنتیکی در ژن ماتریکس متالوپروتئازهای ۱، ۲، ۳، ۷، ۹، ۱۳ و ۱۴ را با حساسیت به سرطان یا متاستاز از جمله سرطان‌های ریه، پستان، کلورکتال و معده بررسی نموده‌اند(۲۲). هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم در ژن MMP-2 بر میزان ابتلا به سرطان ریه و متاستاز آن در جمعیت مراجعه کننده به بیمارستان الزهرا اصفهان بود.

روش بررسی

در این مطالعه مورد- شاهد، تعداد ۵۰ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان ریه مورد تأیید پاتولوژیست و ۷۷ نمونه خون مربوط به افراد سالم و منطبق با شرایط سن، جنس، استعمال دخانیات، روابط فامیلی در ازدواج، سابقه فامیلی از نظر سرطان با گروه بیماران از آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان الزهرا استان اصفهان تهیه گردید. نمونه‌گیری افراد پس از کسب اجازه و اطلاع رسانی در حین تکمیل نمودن پرسشنامه در راستای یکسان‌سازی معیارهای مطالعه انجام پذیرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده به تیوب‌های آزمایش استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شدند. پس از مخلوط نمودن، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت مطالعه‌های کوتاه مدت و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای بررسی‌های طولانی مدت نگهداری گردید.

نمونه DNA نهایی با استفاده از کیت استخراج ژن شرکت سیناژن ایران (DNP^{TM},CinnaGen, Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص و تا زمان مورد نیاز برای استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. کیفیت و کمیت استخراج DNA ژنومی‌با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز الکتروفورز ۱ درصد مورد سنجش قرار گرفت.

پرایمرها با کمک نرم افزار Oligo7 و هم‌چنین بانک‌های اطلاعاتی طراحی گردید. بدین منظور نخست از طریق بانک‌های اطلاعاتی NCBI توالی های موجود در ژن MMP-2 با توجه به محل پلی‌مورفیسم به دست آمد. سپس توالی‌های هدف به نرم افزار ویژه طراحی پرایمر وارد شدند. از میان پرایمرهای ارایه شده به وسیله نرم افزار، یک جفت که قابلیت بهتری نسبت به سایرین داشت انتخاب

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

گردید. جهت اطمینان از عدم هیبریداسیون پرایمرهای انتخاب شده با نقطه دیگری از ژنوم انسان، عملیات BLAST از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام گردید. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

به منظور تکثیر قطعه هدف، تمام نمونه‌های DNA در دستگاه ترموسایکلر (Mastersycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان، متحمل فرایند PCR شدند. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرو لیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer و ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم DNA پلی‌مراز *Taq*، ۱ میکرولیتر Mgcl2، ۰/۵ میکرولیتر dNTP به ازای هر نمونه انجام گردید. سپس به منظور جلوگیری از آلودگی و تبخیر، ۱ تا ۲ قطره روغن معدنی استریل، به مخلوط واکنش اضافه گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر، با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن ابتدایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از اتمام تکثیر قطعه ژن مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد، ابتدا با ولتاژ ۱۱۰ ولت و سپس با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شدند، پس از مشاهده نتایج به وسیله دستگاه مستندسازی ژل، محصولات حاوی قطعه مورد نظر انتخاب و محصولات فاقد قطعه دلخواه، حذف شد و جهت انجام مجدد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دوباره تحت عمل PCR قرار گرفتند. در نهایت تکرار آزمایش‌ها، موفق به تکثیر و انجام صحیح این واکنش بر روی همه نمونه‌ها گردید و قطعاتی با طول ۲۰۱ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱).

برای هضم آنزیمی‌محصول با روش PCR RFLP، از آنزیم محدودالاثر *FSPB*I که توالی 5' C|TAG 3' رشته های DNA را شناسایی و قطع می‌کند، استفاده شد. به این صورت که ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم برش دهنده در ۱ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم(10XTango) با ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی مخلوط شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت انکوبه شدند(طبق پروتکل اختصاصی آنزیم برش‌دهنده). سپس محصولات هضم آنزیمی‌روی ژل آگارز ۳ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شده و باندهای ایجاد شده با نور ماورای بنفش مشاهده و با دستگاه ژل داک عکس برداری و ثبت گردیدند. آلل T برای آنزیم برش دهنده دارای دو جایگاه برش است و سه قطعه ۴۰، ۱۶۱ و ۲۰۱ جفت بازی تولید می‌کند و آلل C تنها دارای یک جایگاه برش است و منجر به دو قطعه ۱۶۱ و ۲۰۱ جفت بازی می‌شود(شکل ۲).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و و آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند .

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

یافته‌ها

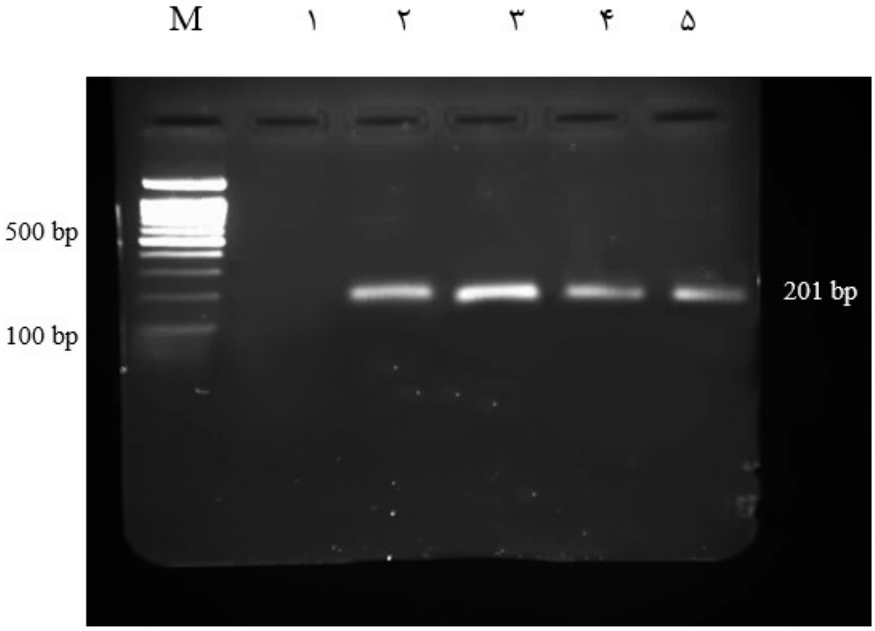
در مرحله اول برای تعیین ژنوتیپ در افراد مورد مطالعه به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن MMP-2 با استفاده از تکنیک PCR تکثیر و بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید(شکل ۱). در مرحله بعد محصولات PCR به وسیله آنزیم محدودگر *FSPBI* مورد برش قرار گرفتند و نتیجه هضم آنزیمی‌بر روی ژل آگارز ۳ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل۲).

در مطالعه حاضر به منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه‌های مختلف بیماران و افراد کنترل از آزمون مربع کای استفاده گردید. Odd Ratio (OR) نسبت افزاینده با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان پلی‌مورفیسم مورد نظر و ریسک رشد و تهاجم سرطان ریه محاسبه شد. پلی‌مورفیسم پروموتور ژن MMP-2 در تمام نمونه‌های مورد مطالعه، با موفقیت تعیین ژنوتیپ شدند که نتایج به دست آمده در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی آلل‌های C و T در جمعیت کنترل به ترتیب برابر با ۸۰/۵۱ و ۱۹/۴۹ درصد و در جمعیت بیماران به ترتیب برابر ۹۰ و ۱۰ درصد مشاهده گردید. هم‌چنین فراوانی آلل C در جمعیت بیمار نسبت به کنترل، افزایش قابل توجهی نشان داد(p=۰/۰۴). نتایج این مطالعه نشان داد توزیع آللی و ژنوتیپی در گروه مبتلا به سرطان ریه نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری نشان می‌دهد(به ترتیب p=۰/۰۴ و p=۰/۰۵). هم‌چنین ارتباط آلل T در گروه بیماران در مقایسه با گروه کنترل قوی‌تر است و ژنوتیپ CC در گروه بیماران(۸۲ درصد) نسبت به گروه کنترل(۶۴/۹۳ درصد) فراوانی بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد(نمودارهای ۱ و ۲). ژنوتیپ CC به عنوان یک گروه وژنوتیپ‌های CT+TT درگروه دیگر جای گرفتند که نتایج این طبقه‌بندی بین افراد کنترل و سرطان ریه نشان دهنده ارتباط مثبت میان ژنوتیپ‌های دارای حداقل یک آلل C (CT+CC) و هم‌چنین ژنوتیپ هموزیگوت(CC) C وسرطان ریه است. با وجود این ارتباط ژنوتیپ هموزیگوت(OR=۲/۴۶) در مقایسه با ژنوتیپ‌های دارای حداقل یک آلل C پررنگ تر به نظر می‌رسد(OR=۹۸/۱).

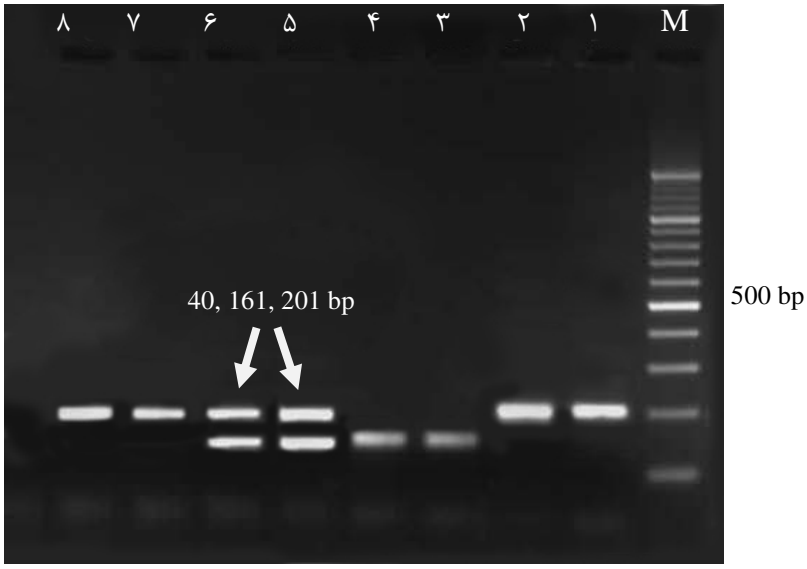
بیماران بر مبنای حضور یا عدم حضور متاستاز به دو گروه متاستازی(M+) و غیرمتاستازی (M-) تفکیک شدند. توزیع پلی‌مورفیسم پروموتور ژن MMP-2 در گروه متاستازی و غیرمتاستازی در جدول ۳ آورده شده است. به منظور بررسی تأثیر ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت T در مرحله شروع و متاستاز سرطان ریه، توزیع ژنوتیپی در گروه M+ و M- با گروه کنترل مقایسه گردید. نتایج آنالیزها در جدول ۴ نشان داده شده است. به منظور محاسبه ریسک گسترش متاستاز در افراد مبتلا به سرطان ریه که هنوز متاستاز در آن‌ها دیده نشده است (M-)، ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم پروموتور ژن MMP-2 در دو گروه متاستازی و غیرمتاستازی با یکدیگر مقایسه شدند. ژنوتیپ‌های هموزیگوت C رابطه و پیوستگی قوی‌تری را با گروه متاستازی در مقایسه با گروه

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

غیرمتاستازی نشان داد. نتایج به دست آمده، ریسک فزآینده‌ای را برای افراد هموزیگوت C گزارش می‌دهند. در واقع می‌توان گفت افراد غیرمتاستازی مبتلا با ژنوتیپ هموزیگوت C در معرض ریسک برابری گسترش متاستاز قرار دارند.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱درصد. چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک شماره ۱ کنترل منفی



شکل ۲: نتیجه هضم آنزیمیو مشاهده قطعات برش خورده به وسیله آنزیم *FSPBI* بر روی ژل آگارز ۳ درصد. چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک های ۱، ۲، ۷ و ۸ نمونه های دارای ژنوتیپ CC، چاهک ۳ و ۴ نمونه‌هایی با ژنوتیپ TT، چاهک ۵ و ۶ نمونه‌هایی با ژنوتیپ CT.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

جدول ۱: توالی پرایمرهای رفت و برگشت مربوط به ژن MMP-2

سایز محصول	توالی پرایمر	دمای اتصال	پرایمر
۲۰۱ bp	5′-CCTTCGTAGGCTGGTCCTTAC-3′ 5′-CTTCTGAGCTGAGACCTGAAGAG-3′	۶۲	MMP-2-F MMP-2-R

جدول ۲: فراوانی آللوتایپی و ژنوتایپی ژن MMP-2 در افراد کنترل و بیمار

فراوانی آللوتایپی و ژنوتایپی	کنترل		بیمار		سطح معنی‌داری
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
MMP-2					
C	۱۲۴	۸۰/۵۱	۹۰	۹۰	۰/۰۴
T	۳۰	۱۹/۴۹	۱۰	۱۰	
MMP-2					
CC	۵۰	۶۴/۹۳	۴۱	۸۲	
CT	۲۴	۳۱/۱۶	۸	۱۶	۰/۰۵
TT	۳	۳/۱	۱	۲	

جدول۳: توزیع پلی‌مورفیسم پروموتور ژن MMP-2 در بیماران (بر مبنای حضور یا عدم حضور متاستاز)

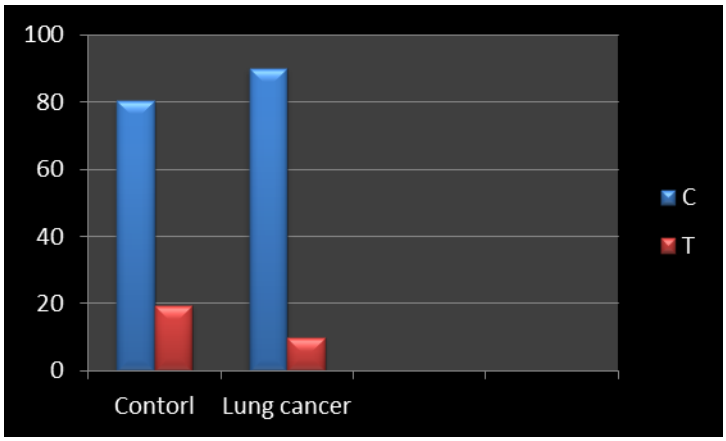
حضور یا عدم حضور متاستاز	C	T	سطح معنی‌داری	CC	CT	TT	سطح معنی‌داری
	تعداد	تعداد		تعداد	تعداد	تعداد	
کنترل	۱۲۴	۳۰		۵۰	۲۴	۳	
متاستاز مثبت	۳۴	۲	۰/۰۵	۱۶	۲	۰	۰/۰۵
متاستاز منفی	۵۶	۸	۰/۵	۲۵	۶	۱	۰/۱

جدول۴: آنالیز ارتباط پلی‌مورفیسم پروموتور ژن MMP-2 و ریسک ابتلا به متاستاز

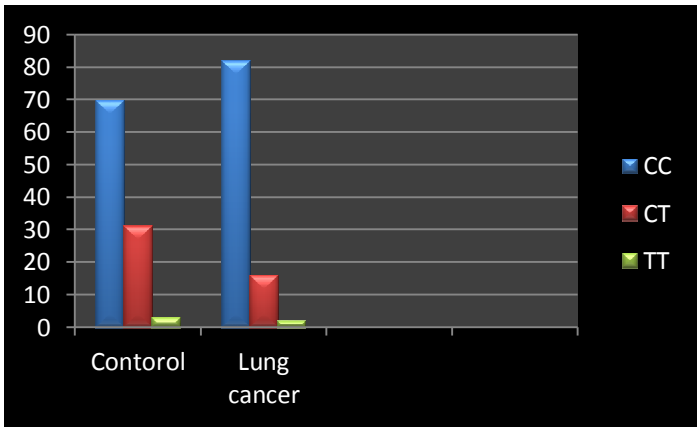
ریسک ابتلا به متاستاز	CC	CT+TT	CC+CT	TT	OR (%95 CI)	
	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	CT+CC[a]	CC[b]
کنترل	۵۰	۲۵	۷۴	۳		
متاستاز مثبت	۱۶	۲	۱۸	۰	۱/۶۴	۴
متاستاز منفی	۲۵	۷	۳۱	۱	۱/۲۹	۲

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

نمودار ۱: فراوانی آلل‌های C و T در گروه‌های کنترل و سرطان ریه



نمودار ۲: فراوانی ژنوتیپی در گروه‌های کنترل و سرطان ریه



بحث

با توجه به نقش MMP-2 در گسترش و متاستاز سرطان، ما در این تحقیق تأثیر ژنوتیپ‌های پروموتور ژن MMP-2 را بر میزان ابتلا به سرطان ریه در جمعیت افراد مراجعه کننده به بیمارستان الزهرا اصفهان را مورد بررسی قرار گرفت. از این رو DNA ژنومی از افراد سالم و مبتلا به سرطان ریه استخراج و با تکنیک PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج به دست آمده ارتباط مثبتی را میان آلل C و خطر فزآینده تهاجم و متاستاز سرطان ریه نشان داد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، تاچوا و همکاران پلی‌مورفیسم ژن MMP-2 را به عنوان یک ریسک فاکتور در ابتلا به انواع

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

بیماری‌ها از جمله سرطان معرفی کردند(۲۳). در طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۰ به وسیله بایکر و همکاران صورت گرفت، نشان داده شد که MMPها در اکثر رده‌های سلولی تومور انسان بیان می‌شوند و سطح بالای آن با متاستاز مرتبط است(۲۴). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، لی و همکاران به بررسی ارتباط چهار پلی‌مورفیسم از جمله: MMP-1، MMP-2، MMP-9 و MMP-13 با خطر ابتلا به سرطان ریه پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که پلی‌مورفیسم MMP-1 و MMP-9 خطر ابتلا به سرطان ریه را افزایش می‌دهند، در حالی که این استعداد ابتلا به سرطان با پلی مورفیسم MMP-2 کاهش می‌یابد. هم‌چنین ارتباط محسوسی بین پلی‌مورفیسم MMP-13 و سرطان ریه در جمعیت نمونه‌ها مشاهده نگردید(۲۵). حاجی حسینی و همکاران، ارتباط بین پلی مورفیسم‌های MMP-2 و MMP-9 را با بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن مورد بررسی و مقایسه قرار دادند. جمعیت مورد بررسی آنها شامل ۸۰ بیمار و ۸۰ کنترل بود که از روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ استفاده شده است. نتایج مطالعه آنها نشان داد که ژنوتیپ MMP-2 بین گروه بیمار و کنترل تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد. مقایسه ژنوتیپ CC بین بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن و گروه کنترل نشان داد که آلل C در ابتلا به این سرطان نقش دارد(۲۶). در مطالعه مشابهی با این طرح، یانگ و همکاران به بررسی ارتباط میان پلی‌مورفیسم ژن MMP-2 و خطر ابتلا به سرطان ریه پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد وجود پلی‌مورفیسم در ژن MMP-2، خطر ابتلا به سرطان ریه را به میزان ۲ برابر افزایش می‌دهد(۲۷). نتایج مطالعه یانگ و همکاران به نوعی موید نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه حاضر نتایج نشان دهنده افزایش خطر ابتلا به سرطان ریه با وجود پلی‌مورفیسم ژن MMP-2 برای افراد واجد آلل C بود که این ارتباط با ریسک گسترش متاستاز در مردان ارتباط قوی‌تری دارد.

شان و همکاران در پژوهشی بیان داشتند مطالعه‌ها ارتباطی کل ژنوم روی پنج نوع از شایع‌ترین سرطان‌ها شامل؛ سرطان‌سینه، پروستات، ریه، روده بزرگ و پوست متمرکز شده است. در این مطالعه‌ها تعداد زیادی از این جایگاه‌های ژنی با توان آزمون پایین شناسایی شده است که نیازمند تعداد بیشتر نمونه می‌باشد. این مطالعه‌ها شامل بررسی مستقیم پلی‌مورفیسم ژنتیکی در گروه‌های بزرگی متشکل از افراد سالم و بیمار می‌باشد و نوعی ابزار دقیق برای شناسایی آلل‌های با پنرتانس پایین ایجاد کرده است که پیش از این با مطالعه های پیوستگی ژن‌ها قابل شناسایی نبودند(۲۸). فارینا و همکاران نشان دادند MMP نقش مهمی در عملکردهای سرکوب تومور، تولید مهار کننده‌های رگزایی اندوژن، ترویج فعالیت‌های التهابی ضدتومور، و القای آپوپتوز ایفا می‌نماید. MMP-2 در بیولوژی سرطان، نیاز به مهارکننده‌های درمانی خاص برای عملکردهای سرکوب تومور، تولید مهارکننده‌های رگزایی اندوژن، ترویج فعالیت‌های

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

التهابی ضد تومور، و القای آپوپتوز، نقش‌های اساسی ایفا می‌نماید (۲۹).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده ارتباط مثبتی را میان آلل C و خطر فزآینده تهاجم و متاستاز سرطان ریه را نشان می‌دهد. هم‌چنین بررسی توزیع آللی و ژنوتیپی در بیماران سرطان ریه و کنترل نشان داده که آلل C در فرآیند سرطان دخیل است. به طور کلی یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم بالقوه عملکردی پروموتور ژن MMP-2 ممکن است بیومارکری در متاستاز سرطان ریه به شمار آید.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول بوده است که با حمایت معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد شهرکرد انجام شد. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از اعضای محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به عمل می‌آورند.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

REFERENCES

1.Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V, et al. Cancer mortality trends in Spain1980–2007. Annals of Oncology 2010; 21(3): 14–20.
2.Tubiana M. Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations. Cancer Radiother 2009; 13(4): 238–58.
3.Babaei M, Mousavi SH, Malek M, Tosi G, Masoumeh Z, Danaei N, et al. Cancer occurrence in Semnan Province, Iran: results of a population-based cancer registry. Asian Pac J Cancer Prev 2005; 6(2): 159–64.
4.Emami Razavi SH, Aaghajani H, Haghazali M, Nadali F, Ramazani R, Dabiri E, et al. The most common cancers in Iranian women. Iranian J Publ Health 2009; 38(1): 109–12.
5.Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Annals of Oncology 2009; 20(3): 556–63.
6.Hadler-Olsen E, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. Tumour Biol 2013; 34(4): 2041–51.
7.Brewa K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. Biochim Biophys Acta 2010; 1803(1): 55–71.
8.Yousef EM, Tahir MR, ST-Pierre Y, Gaboury LA. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. BMC Cancer 2014; 14: 609–21.
9.Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. Genes Dis 2015; 2(1): 26–34.
10.Leroux C, Girard N, Cottin V, Greenland T, Mornex JF, Archer F. Jaagsiekte sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. Vet Res 2007; 38(2): 211–28.
11.Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. Matrix Biol 2015; 44-46: 247–54.
12.Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinase and cancer-roles in threat and therapy. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(3): 1085–91.
13.Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. Semin Cancer Biol 2010; 20(3): 161–8.
14.Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. Carcinogenesis 2007; 28(3): 507–18.
15.Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. Exp Lung Res 2005; 31(6): 599–21.
16.Ruano-Ravina A, Figueiras A, Freire-Garabal M, Barros-Dios JM. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. Curr Pharm Des 2006; 12(5): 599–613.
17.Watson WH, Ritzenthaler JD, Roman J. Lung extracellular matrix and redox regulation. Redox Biol 2016; 8: 305–15.
18.Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera EV, van den Brandt PA, et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. Am J Clin Nutr 2005; 82(3): 657–67.
19.Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. Oncogene 2004; 23(38): 6392–403.
20.Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, et al. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. Clin Cancer Res 2005; 11(15): 5433–9.
21.Jin G, Miao R, Hu Z, Xu L, Huang X, Chen Y, et al. Putative functional polymorphisms of MMP-9 predict survival of NSCLC in a Chinese population. Int J Cancer 2009; 124(9): 2172–8.
22.Mitsudomi T. Molecular epidemiology of lung cancer and geographic variations with special reference to EGFR mutations. Transl Lung Cancer Res 2014; 3(4): 205–11.
23.Tacheva T, Chelenkova P, Dimov D, Petkova R, Chakarov S, Vlaykova T. Frequency of the common promoter polymorphism MMP2 -1306 C>T in a population from central Bulgaria. Biotechnol Biotechnol Equip 2015; 29(2): 351–6.
24.Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. Br J Surg 2000; 87(9): 1215–21.

25.Li H, Liang X, Qin X, Cai S, Yu S. Association of matrix metalloproteinase family gene polymorphisms with lung cancer risk: logistic regression and generalized odds of published data. Sci Rep 2015; 5: 1–11.

26.Hajihoseini S, Bahmani MK, Khosravi A, Ghezelsofla E, Ghaderi A. Prognostic significance of MMP2 and MMP9 functional promoter single nucleotide polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2011; 14(2): 137–44.

27.Yang L, Zeng W, Li D, Zhou R. Inhibition of cell proliferation, migration and invasion by DNAzyme targeting MMP-9 in A549 cells. Oncology Reports 2009; 22(1): 121–6.

28.Shan J, Mahfoudh W, Dsouza SP, Hassen E, Bouaouina N, Abdelhak S, et al. Genome-Wide Association Studies (GWAS) breast cancer susceptibility loci in Arabs: susceptibility and prognostic implications in Tunisians. Breast Cancer Res Treat 2012; 135(3): 715–24.

29.Farina AR, Mackay AR. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. Cancers (Basel) 2014; 6(1): 240–96.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 5:09 +0430 on Saturday June 23rd 2018

Single Nucleotide Polymorphisms of *MMP2 Gene* Promoter on the Risk of Development and Metastasis of lung Cancer

Keshvary Ravan H[1], Kouhkan F[2*], Sazgar H[1]

[1]Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran,[2]Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

Received: 29 Nov 2016 Accepted: 21 Apr 2016

ABSTRACT

Background & aim: The high incidence and poor prognosis of the lung cancer makes it aa a major health problem in the last few decades. Determination of frequency of different histopathology types of primary lung cancer has great importance in creating integrated treatment programs and recognized the effective factors causing the disease. Overexpression of MMPs has a direct relation with invasion and metastasis of malignant tumors in different tissues. The aim of this study was to assess the effect of MMP-2 gene promoter polymorphism with lung cancer and metastases in patients with lung cancer and compared with the control groups by the PCR-RFLP method.

Methods: In the present case-control study, The MMP-2 polymorphisms were analyzed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) in 50 patients with lung cancer and 77 cohort sample. All samples were taken under supervision of a physician. DNA isolation was performed using DNA extraction kit (Cinnagen, Iran). *MMP9 gene* was amplified by specific primers and PCR product was digested with *FSPB*I restriction enzyme. Data were analysis using Chi square by the SPSS software.

Results: The examination of allelic and genotypic distribution in patients with lung cancer and control showed that the allele frequency of C and T in patients with lung cancer were 90 and 10% (P=0.04) and in the control were 80.15 and 30% (P=0.05) respectively. Also genotype frequency of CC, CT and TT in patients with lung cancer were 82, 16 and 2 (P=0.05) and in the control were 69.93, 31.16, 3.1 percentage respectively (P=0.5). No significant difference was seen in comparison of genotype groups in non-metastatic and control. Comparison of homozygous CC genotype and control were confirmed the direct involvement of c allele in metastasis

Conclusion: It seems that individuals with C allele can increase susceptibility to lung cancer. Also these findings indicate that CC genotype as a risk factor facilitating the spread of metastasis of lung cancer.

Keywords: Lung cancer, Matrix metalloproteinase, MMP-2, PCR RFLP.

Corresponding author: **Kouhkan F,** Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
Email: cbiology1991@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Keshvary Ravan H, Kouhkan F, Sazgar H. Single Nucleotide Polymorphisms of MMP2 Gene Promoter on the Risk of Development and Metastasis of lung Cancer. Armaghane-danesh 2017; 22 (1): 104-117.