

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

حمیده کشوری روان^۱، فاطمه کوهکن^{۲*}، حسین سازگار^۱^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۲گروه 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 بافت‌های مختلف، ارتباط دارد. ماتریکس متالوپروتئازها 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 پروموتور 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 علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی خون‌گیری به عمل آمد. DNA ژنومی از 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 FSPBI 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 ($P=0/04$). در حالی که فراوانی همین آلل‌ها در افراد سالم به ترتیب ۸۰/۱۵ و ۲۰ درصد بود ($P=0/05$). همچنین فراوانی ژنوتیپ‌های CT، CC و TT در افراد مبتلا به سرطان ریه به ترتیب ۸۲، ۱۶ و ۲ درصد ($P=0/05$) و در افراد سالم به ترتیب ۶۹/۹۳، ۳۱/۱۶ و ۳/۱ درصد مشاهده گردید ($P=0/5$). 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، پلی مورفیسم طولی قطعات محدود

* نویسنده مسئول: فاطمه کوهکن، تهران، مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته، دانشکده زیست شناسی، گروه ژنتیک مولکولی

Email: biology1991@yahoo.com

مقدمه

در رتبه هفتم یا هشتم در مردان و فراتر از دهم در زنان است در حالی که در مقیاس جهانی به ترتیب در جایگاه ۴ و ۱ در مردان و زنان است (۴). با وجود فراوانی پایین سرطان ریه در ایران، بیماران مبتلا به این نوع سرطان بقای کوتاه مدت دارند. رتبه بندی ۲ در مردان و ۳ در زنان به عنوان علت مرگ مرتبط با سرطان را دارا می باشد (۵). ماتریکس متالوپروتئینازها (۳)، خانواده ای از اندوپپتیدازها هستند که به لحاظ ساختاری و عملکردی وابسته به روی می باشند و در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مشارکت دارند (۶). تا به امروز حدود ۲۴ نوع MMP مختلف در مهره داران شناسایی شده است که از آن میان، ۲۳ مورد از آن ها در انسان یافت می شود. ماتریکس ها در هیدر، توتیای دریایی و آرابیدوپسیس نیز یافت می شوند (۷). از نظر خانوادگی MMP ها به شش گروه کلاژنازها، ژلاتینازها، استروملیزین ها، ماتریلیزین ها، MMP های تیپ غشایی و MMP های دیگر تقسیم بندی می شوند. هر کدام از این گروه ها دارای زیر واحدهای مخصوص به خود بوده که وظایف منحصر به فردی ایفا می کنند (۸). تنظیم و کنترل فعالیت MMP ها در سه سطح تنظیم رونویسی، فعال سازی پروآنزیم و مهار فعالیت آنزیم صورت می گیرد (۹). فعال سازی MMP ها مستلزم مشارکت سایر پروتئینازها است تا پروپیتید را از میان بردارند. اغلب

سرطان ریه شایع ترین سرطان در دنیا است و در حال حاضر به عنوان یک اپیدمی در مقیاس جهانی در نظر گرفته می شود. انتظار می رود 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 سلول های کوچک (SCLC) (۱) و سرطان ریه با سلول های غیر کوچک (۲). سرطان ریه نوع SCLC، ۲۵-۲۰ درصد از کل موارد سرطان ریه را در بر می گیرد و شامل سلول های سرطان ریه از نوع کوچک می باشد که در آن روند رشد و تکثیر تومور بسیار سریع بوده و در مدت زمان اندکی به سایر نقاط بدن متاستاز می دهد. نوع NSCLC در برگیرنده حدود ۸۰-۷۵ درصد از کل موارد سرطان ریه می شود که از نظر بافت شناسی به زیر گروه های کوچکتر تقسیم بندی می شود 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 سال های اخیر، سرطان ریه به سومین علت عمده مرگ و میر، پس از بیماری های قلبی - 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

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

MMPها در فضای خارج سلولی به وسیله پروتئینازهای پلازما، بافت، پروتئینازهای باکتریایی یا MMPهای فعال شده دیگر، فعال سازی 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 فعال سازی 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 مویند 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 ۲-MMP و ۹-MMP غالباً به وسیله سلول‌های استرومایی ایجاد می‌شوند (۱۴). ۲-MMP دسته‌ای از اعضای خانواده MMPها 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). ۲-MMP 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 ۲-MMP با هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های عضله صاف مرتبط است که این وقایع در نمای پاتولوژیک بیماری‌های مهمی مانند فیبروز ریوی، پنومونی سازمان یافته و آسم وجود دارد. به علاوه پروتئین‌های خانواده MMP به ویژه ۲-MMP، هم در تکامل ریه (۱۷) و هم در بسیاری از اختلالات ریوی از جمله فیبروز ریوی ایدیوپاتیک^(۱)، آمفیژم، برونشکتازی، آسیب‌های حاد ریوی، افیوژن پلورال و سرطان ریه نقش مهمی دارند (۱۸). این مسئله باعث شده است که محققین در زمینه نقش پروتئین ۲-MMP 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 ۲-MMP متعددی گزارش شده‌اند که تصور می‌شود تعدادی از آن‌ها

1- Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)

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™, 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 ژنومی با 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 توالی‌های 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

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). SNP‌ها 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 متالوپروتئین‌ها و میزان بقا گزارش شده است. شماری از مطالعه‌های ارتباط بین واریانت‌های ژنتیکی در ژن ماتریکس متالوپروتئین‌های 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،

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) 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 و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل اسرشت 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 آنزیمی محصول با روش PCR RFLP، از آنزیم محدودالایتر *FspBI* که توالی 3' C|TAG 5' 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 تزیقی مخلوط شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت انکوبه شدند (طبق پروتکل اختصاصی آنزیم برش‌دهنده). سپس محصولات هضم آنزیمی روی 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 آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

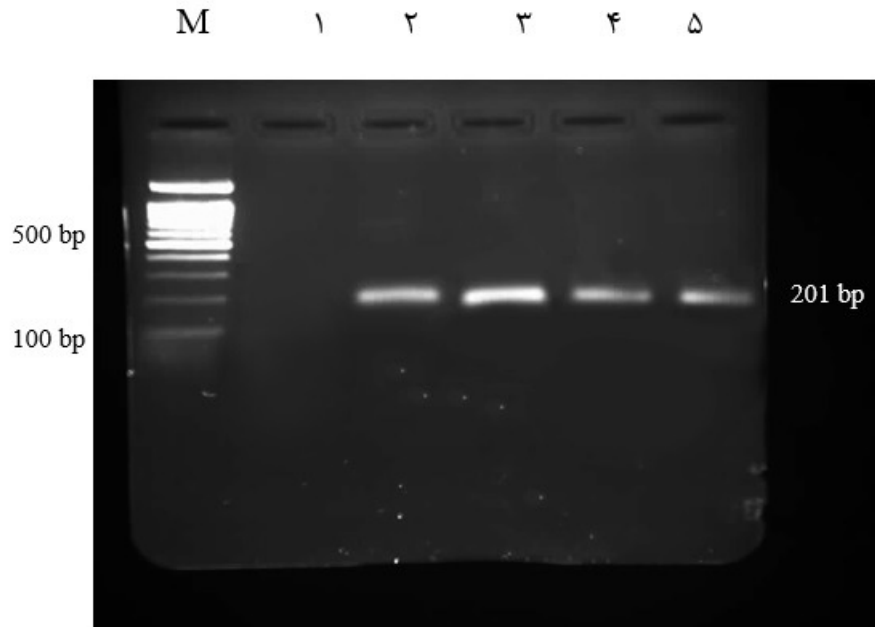
در مرحله اول برای تعیین ژنوتیپ در افراد مورد مطالعه به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن MMP-2 با استفاده از تکنیک PCR تکثیر و بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید (شکل ۱). در مرحله بعد محصولات PCR به وسیله آنزیم محدودگر *FSPBI* مورد برش قرار گرفتند و نتیجه هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۳ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). 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 افزایش یافته با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان پلی مورفیسم مورد نظر و ریسک رشد و تهاجم سرطان ریه محاسبه شد. پلی مورفیسم 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 ($p=0/04$). 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 $p=0/04$ و $p=0/05$). 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 و ژنوتیپ‌های CT+TT در گروه 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 و سرطان ریه است. با وجود این ارتباط ژنوتیپ هموزیگوت ($OR=2/46$) در مقایسه با ژنوتیپ‌های دارای حداقل یک آلل C پررنگ تر به نظر می‌رسد ($OR=98/1$).

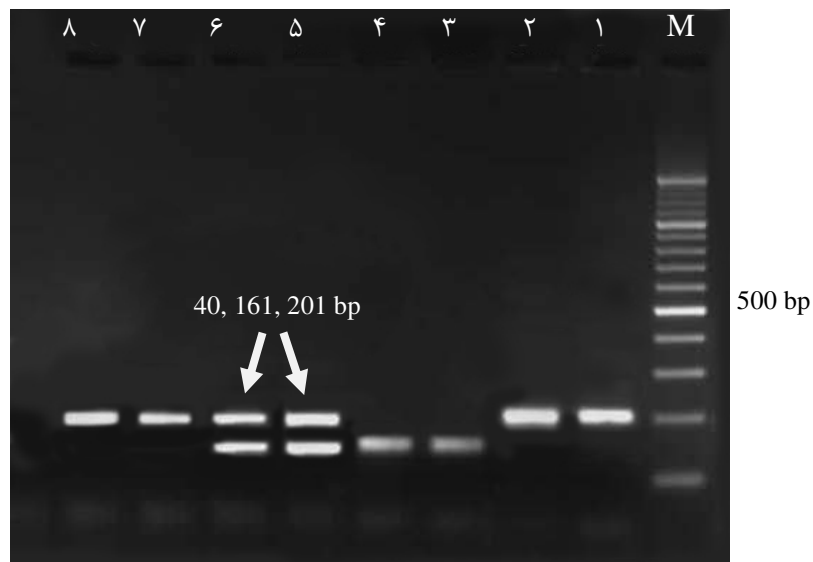
بیماران بر مبنای حضور یا عدم حضور متاستاز به دو گروه متاستازی (M+) و غیرمتاستازی (M-) تفکیک شدند. توزیع پلی مورفیسم پروموتور ژن MMP-2 در گروه متاستازی و غیرمتاستازی در جدول ۳ آورده شده است. به منظور بررسی تأثیر ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت T در مرحله شروع و متاستاز سرطان ریه، توزیع ژنوتیپی در گروه M+ 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 پلی مورفیسم 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

مبتلا با ژنوتیپ هموزیگوت C در معرض ریسک
برابری گسترش متاستاز قرار دارند.

غیرمتاستازی نشان داد. نتایج به دست آمده، ریسک
فزآینده‌ای را برای افراد هموزیگوت C گزارش
می‌دهند. در واقع می‌توان گفت افراد غیرمتاستازی



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



شکل ۲: نتیجه هضم آنزیمی و 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.

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 آلوتایپی و ژنوتایپی ژن MMP-2 در افراد کنترل و بیمار

ژنوتایپی	کنترل		بیمار		سطح معنی داری
	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	۰/۰۵
CT	۲۴	۳۱/۱۶	۸	۱۶	
TT	۳	۳/۱	۱	۲	

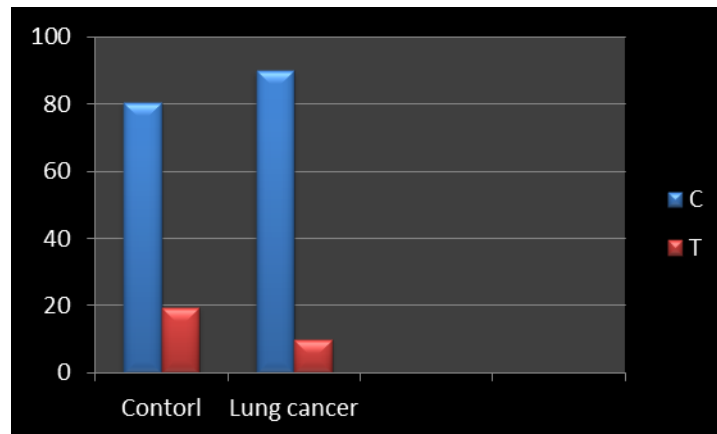
جدول ۳: توزیع پلی مورفیسیم پروموتور ژن MMP-2 در بیماران (بر مبنای حضور یا عدم حضور متاستاز)

حضور یا عدم حضور متاستاز	C	T	سطح معنی داری		
			CC	CT	TT
کنترل	۱۲۴	۳۰	۵۰	۲۴	۳
متاستاز مثبت	۳۴	۲	۱۶	۲	۰
متاستاز منفی	۵۶	۸	۲۵	۶	۱

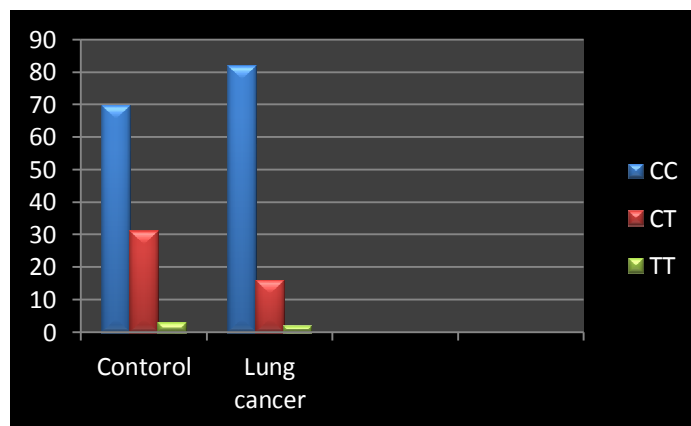
جدول ۴: آنالیز ارتباط پلی مورفیسیم پروموتور ژن MMP-2 و ریسک ابتلا به متاستاز

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

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



نمودار ۲: فراوانی ژنوتیپ‌های کنترل و سرطان ریه



بحث

با توجه به نقش MMP-2 در گسترش و متاستاز سرطان، ما در این تحقیق تأثیر ژنوتیپ‌های پرموتور 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 فزاینده تهاجم و متاستاز سرطان ریه نشان داد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، تاچوا و همکاران پلی مورفیسم ژن MMP-2 را به عنوان یک ریسک فاکتور در ابتلا به انواع

پلی مورفیسیم 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 پلی مورفیسیم 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؛ سرطان سینه، 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 پلی مورفیسیم ژنتیکی در گروه‌های بزرگی متشکل از افراد سالم و بیمار می‌باشد و نوعی ابزار دقیق برای شناسایی آلل‌های با پرتانس پایین ایجاد کرده است که پیش از این با مطالعه‌های پیوستگی ژن‌ها قابل شناسایی نبودند (۲۸). فارینا و همکاران نشان دادند MMP نقش مهمی در عملکردهای سرکوب تومور، تولید مهارکننده‌های 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

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 پلی مورفیسیم از جمله: MMP-1، MMP-2، MMP-9 و MMP-13 با خطر ابتلا به سرطان ریه پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که پلی مورفیسیم MMP-1 و MMP-9 خطر ابتلا به سرطان ریه را افزایش می‌دهند، در حالی که این استعداد ابتلا به سرطان با پلی مورفیسیم MMP-2 کاهش می‌یابد. همچنین ارتباط محسوسی بین پلی مورفیسیم MMP-13 و سرطان ریه در جمعیت نمونه‌ها مشاهده نگردید (۲۵). حاجی حسینی و همکاران، ارتباط بین پلی مورفیسیم‌های 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 پلی مورفیسیم ژن MMP-2 و خطر ابتلا به سرطان ریه پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد وجود

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 آلی 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 اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از اعضای محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به عمل می‌آورند.

REFERENCES

1. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V, et al. Cancer mortality trends in Spain 1980–2007. *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, Aghajani 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. Bourbouli 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, Ghezelsoufa 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 DNase 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.

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

Keshvary Ravan H¹, Kouhkan F^{2*}, Sazgar H¹

¹Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, ²Department 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 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 recognizing 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 *FSPBI* 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.