مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی 1562 C/T– در ناحیه پروموتور ژن MMP9 بر میزان ابتلا به سرطان ریه و متاستاز آن

نویسندگان:

مژده رستگاری[۱]، حسین سازگار[۱*]، فاطمه کوهکن[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- مرکز تحقیقات بن یاخته، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.2, Summer 2017

چکیده:

مقدمه: ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP-9) نقش اساسی در شروع و پیشروی سرطان دارد. در مطالعه حاضر، ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ۱۵۶۲C/T– پروموتر ژن MMP-9 با سرطان ریه بررسی شد.

روش کار: در مطالعه نوع مورد– شاهدی حاضر، پلی مورفیسم ژن MMP-9 در ۱۰۰ بیمار مبتلابه سرطان ریه و ۱۰۰ نمونه کنترل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و RFLP تعیین ژنوتیپ شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد فراوانی ژنوتیپ CT در این پلی‌مورفیسم در گروه بیمار (۶۰٪) نسبت به گروه کنترل (۲۸٪) بالاتر است (۰/۰۰۰۱ =P و ۲/۰۴–۶/۶۹ =۹۵CI٪، ۳/۶۹ =OR). به‌منظور محاسبه ریسک متاستاز ژنوتیپ‌های این پلی‌مورفیسم در دو گروه متاستازی و غیرمتاستازی مقایسه شدند (۰/۴۶=P،۰/۳۱–۱/۶۸ =۹۵CI٪، ۱ =OR). همچنین برای اولین بار در ایران بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های این پلی‌مورفیسم در افراد سرطانی در جنسیت‌های مختلف و در گروه‌های مختلف ازنظر استعمال دخانیات نشان داد که توزیع ژنوتیپی در گروه‌های مردان و زنان، همچنین افراد سیگاری و غیر سیگاری مبتلابه سرطان ریه در مقایسه با افراد کنترل تفاوت آماری معناداری دارد (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم ۱۵۶۲C/T– ژن MMP-9 برافزایش خطر بروز سرطان ریه اثر دارد، اما تأثیری در متاستاز ندارد.

واژگان کلیدی: سرطان ریه، ماتریکس متالوپروتئیناز، پلی‌مورفیسم، PCR، RFLP

Pars J Med Sci 2017;15(2):9-16

مقدمه:

در سطح مولکولی، سرطان در اثر جهش در DNA رخ می‌دهد که از به هم خوردن تنظیمات چرخه سلولی و تکثیر نابجا به وجود می‌آید. بسیاری از این جهش‌ها در سلول‌های سوماتیک رخ می‌دهد [۱].

تقریباً همه سرطان‌ها می‌توانند وارد مرحله متاستاز و گسترش شوند [۲]. متاستاز شیوه گام‌به‌گام توسعه سرطان در نظر گرفته می‌شود و منجر به کسب قابلیت‌های جدید سلول‌های توموری و رشد تومور می‌شود. به این صورت که سلول‌های سرطانی ابتدا خود را از تومور اولیه جدا کرده و با شروع مهاجرت و حمله به بافت‌های اطراف وارد عروق شده، در سراسر بدن گسترش می‌یابند. درنهایت این سلول‌ها به بافت‌های ثانویه رسیده، به داخل بافت واردشده و در آنجا تکثیر پیدا می‌کنند. تصور می‌شود تخریب ماتریکس خارج سلولی یک گام بسیار مهم در شکل‌گیری متاستاز باشد [۳].

سرطان ریه شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی بدخیمی‌های اولیه ریه به دو گروه اصلی شامل سرطان ریه سلول کوچک و سرطان ریه سلول غیر کوچک تقسیم می‌شوند [۴].

نویسنده مسئول، نشانی: شهرکرد– رحمتیه– دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد– دانشکده علوم پایه– گروه زیست‌شناسی

تلفن تماس: ۰۹۱۷۷۱۲۱۹۹۳ پست الکترونیک:hoseinsazgar@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲۵ اصلاح: ۱۳۹۶/۳/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲

ماتریکس متالوپروتئینازها آنزیم‌هایی هستند که در تخریب ماتریکس خارج سلولی نقش داشته و در همه مراحل سرطان ازجمله پیدایش تومور، تهاجم و متاستاز درگیر هستند [۵].

MMP-9 که ژلاتیناز B یا کلاژناز نوع IV نیز خوانده می‌شود، یک عضو از خانواده MMP ها است که از اجزای ساختاری عمده غشاء محسوب می‌شود. ژن MMP-9 انسان در کروموزوم 20q11.2-q13.1 قرارگرفته و متشکل از ۷۶۵۴ باز است. این ژن در طیف گسترده‌ای از سرطان‌های انسانی ازجمله سرطان ریه بیان بالایی دارد [۶].

MMP-9 در پیشرفت تومور دخیل بوده و نقش تقریباً منحصر به‌فردی در تخریب ماتریکس سلولی دارد که در تمامی مراحل تهاجم توموری، اعم از شروع و پیشرفت در اوایل سرطان، آنژیوژنز، انتشار، تهاجم و تحرک، شکل‌گیری سلول‌های بنیادی سرطان، آماده‌سازی سایت‌های متاستاتیک و ارتقا رشد متاستاتیک مؤثر است [۷].

ازنظر عملکردی تعداد معدودی از پلی‌مورفیسم‌ها بسته به جایگاه قرارگیری آن‌ها در ژنوم فعال هستند. برای مثال، وجود یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی از نوع جابه‌جایی باز C→T در ناحیه ۱۵۶۲- می‌تواند یک عامل تنظیمی مهم باشد. مطالعات نشان می‌دهند که جابه‌جایی C→T مانع اتصال عوامل سرکوب‌کننده رونویسی مانند عناصر تنظیمی AP-1 و SP-1 به این منطقه و افزایش فعالیت رونویسی می‌شود. به‌طوری‌که در این جابه‌جایی در جایگاه پلی‌مورفیسم، مانع برهم‌کنش این پروتئین‌ها با DNA واجد آلل Tمی‌شود. درنتیجه سبب افزایش بیان ژن‌های واجد آلل T شده که خود می‌تواند منجر به متاستاز سلول‌های سرطانی و بدخیمی آن‌ها شود.

مطالعه‌های ژنتیک مولکولی روی عملکرد پلی‌مورفیسم ۱۵۶۲C/T- ژن MMP-9 در بیماری قلب و عروق و سرطان نشان داد که در حاملین آلل T، افزایش شدت تصلب شرایین عروق کرونری، افزایش مرگ‌ومیر قلبی، افزایش خطر یا پیشرفت شدید بعضی از انواع سرطان وجود دارد [۸].

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی ارتباط پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ۱۵۶۲C/T-پروموتر ژن MMP-9 با شروع سرطان ریه و متاستاز آن است.

روش کار:

مطالعه حاضر یک مطالعه مورد- شاهدی بود که در آن از ۱۰۰ بیمار مبتلابه سرطان ریه (۴۸ بیمار سیگاری و ۵۲ بیمار غیر سیگاری) و ۱۰۰ فرد سالم به‌عنوان گروه شاهد با کسب اجازه و اطلاع‌رسانی نمونه خون‌گرفته شد. افراد ازلحاظ معیارهای مطالعه یعنی سن، جنسیت و استعمال دخانیات مورد پرسش قرارگرفته و یکسان‌سازی شدند. محدوده سنی افراد در گروه بیماران و گروه شاهد ۷۵-۳۵ سال بود. بیماری افراد مبتلابه سرطان ریه توسط پزشک متخصص انکولوژی و متخصص ریه تشخیص داده و تأیید شد. نمونه‌های خون افراد سرطانی از بیمارستان‌های شهرکرد و اصفهان تهیه شد. گروه شاهد نیز از افرادی انتخاب شدند که داوطلبانه و برای آزمایش‌های روزمره به آزمایشگاه مراجعه و سابقه بیماری سرطان در خانواده آن‌ها وجود نداشت. پرسش‌نامه شامل اطلاعاتی از قبیل جنسیت، سن و سابقه مصرف سیگار و همچنین فرم رضایت‌نامه با آگاهی کامل از اهداف مطالعه توسط افراد بیمار و گروه شاهد تکمیل شد. به‌منظور استخراج DNA، از هردو گروه نزدیک به ۵ میلی‌لیتر خون‌گرفته شد و به لوله‌های فالکون K3 EDTA یا K2 EDTA حاوی EDTA به‌عنوان ماده ضد انعقاد منتقل شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به آزمایشگاه ارسال و در دمای ۲۰- نگهداری شدند. پس‌ازآن، DNA هریک از افراد مورد آزمایش با استفاده از کیتCinnaGen/ Iran و بر اساس روش کار کیت استخراج شد.

طراحی و آماده‌سازی پرایمرها:

پرایمرها به‌وسیله نرم‌افزار oligo نسخه ۷ و هم‌چنین بانک‌های اطلاعاتی طراحی شدند. برای این کار ابتدا از طریق بانک‌های اطلاعاتی توالی پروموتور ژن MMP-9 با توجه به محل پلی‌مورفیسم به دست آمد. سپس توالی‌های هدف به نرم‌افزار طراحی پرایمر وارد و از بین پرایمرهای طراحی‌شده یک جفت پرایمر که قابلیت بهتری نسبت به سایرین داشت انتخاب شد.

جدول ۱:توالی پرایمرهای رفت‌وبرگشت

اختصاصات	توالی پرایمر	طول	درصد GC
پرایمر رفت	5'-GCTTGAACACTAGTTCTGTGGA-3'	۲۲	۴۵
پرایمر برگشت	5'-GCAGGGTCTATATTCACCTTCT-3'	۲۲	۴۵

تکثیر نمونه‌ها به‌وسیله PCR:

تکثیر DNA به روش PCR باکیفیت و خلوص DNA ارتباط زیادی دارد. میزان جذب نوری آن در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر و نیز غلظت محلول DNA برحسب نانوگرم در میکرو لیتر توسط اسپکتروفتومتری انجام شد.

تکثیر ناحیه موردنظر با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده و آنزیم Taq DNA Polymerase ساخت شرکت CinnaGen/ Iran انجام شد. مواد و میزان بهینه‌شده برای انجام PCR در ۲۵ میکرو لیتر مخلوط واکنش در هر میکروتیوب شامل ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR، ۰/۷۵ میکرو لیتر dNTP mix، ۰/۵ میکرو لیترMgCl2 ، ۱ میکرو لیتر پرایمر رفت، ۱ میکرو لیتر پرایمر برگشت، ۱۸ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر، ۱ میکرو لیتر DNA الگو و ۰/۲۵ میکرو لیتر Taq DNA Polymerase بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر حرارتی با شرایط دمایی زیر انجام گرفت.

پس از دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکثیر نمونه‌ها هر سیکل شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد دناتوراسیون، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مرحله اتصال پرایمرها و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد مرحله طویل شدن انجام گرفت و به دنبال این ۳۵ سیکل، مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی این ژن انجام گرفت. برای بررسی نتایج PCR پس از پایان الکتروفورز، تصویر ژل در دستگاه Gel documentation مشاهده شد. سپس نمونه‌های حاصل از تکثیر با استفاده از آنزیم محدودکننده SphI مورد برش قرار گرفتند. در پژوهش حاضر، مواد لازم با مقادیر بهینه طبق پروتکل پیشنهادی آنزیم جهت هضم آنزیمی در یک میکروتیوب به یکدیگر اضافه شد. آنزیم SphI قادر است آلل T در پلی‌مورفیسم ناحیه پروموتور را برش داده و دو قطعه به طول‌های ۵۸۵ و ۲۲۵ جفت بازی تولید کند که توسط ژل ۳ درصد از همدیگر قابل‌تفکیک هستند. درحالی‌که آلل C توسط آنزیم SphI برش نمی‌خورد و بعد از الکتروفورز یک قطعه کامل ۸۱۰ جفت بازی دیده می‌شود، در حالت هتروزیگوت هر سه حالت مشاهده می‌شود. هضم آنزیمی توسط µ ۰/۲۵ از آنزیم Sph1 وµ ۲ بافر (10X آنزیم و انکوباسیون به مدت ۱۶ ساعت در دمای بهینه فعالیت آنزیم یعنی ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و سپس الکتروفورز روی ژل آگارز ۳ درصد در ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت.

به‌منظور بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم پروموتر ژن MMP9 و استعداد ابتلا به سرطان ریه از آزمون آماری مربع کای و محاسبه OR با فاصله اطمینان ۹۵ درصد به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه چهارده استفاده شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

در این پژوهش کلیه موارد اخلاق در پژوهش رعایت شده است. پرسشنامه ها با رضایت بیماران تکمیل گردیده و الزامات اخلاقی رعایت شده، همچنین محرمانگی اطلاعات حفظ شده است.

یافته‌ها:

افراد موردمطالعه ازلحاظ معیارهای پژوهش یعنی سن، جنسیت و استعمال دخانیات مورد پرسش قرارگرفته و یکسان‌سازی شدند. همچنین تلاش شد افراد گروه شاهد به نحوی انتخاب شوند که با گروه بیمار تا حد ممکن مطابقت داشته باشند. محدوده سنی افراد موردمطالعه ۷۵-۳۵ سال در نظر گرفته شد، اما در بررسی‌ها اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد.

جدول ۲ پراکنش ژنوتیپ‌ها و میزان شیوع آلل‌ها در گروه کنترل و افراد مبتلا به سرطان ریه را نشان می‌دهد. شمار ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده با شمار مورد انتظار برای جمعیت در تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای مقایسه شد. همچنین اختلاف‌های ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین گروه‌های موردمطالعه با تحلیل نسبت شانس سنجیده شد. فراوانی ژنوتیپی CC، CT و TT به ترتیب ۶۹٪، ۲۸٪ و ۳٪ در گروه کنترل و ۴۰٪، ۶۰٪ و ۰٪ در نمونه‌های سرطانی بود. بررسی یافته‌ها و مقایسه فراوانی سه ژنوتیپ یادشده در بین بیماران نشان داد که ژنوتیپ CT ارتباط بیشتری با گروه بیماران نسبت به گروه کنترل دارد.

(OR= ۳/۶۹ ،۹۵٪CI= ۲/۰۴-۶/۶۹، جدول ۲)

در تحلیل دیگر، به‌منظور محاسبه احتمال خطر گسترش متاستاز در افراد مبتلابه سرطان ریه که هنوز متاستاز در آن‌ها دیده نشده است (M-)، ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم پروموتور MMP-9 در دو گروه متاستازی و غیرمتاستازی با یکدیگر مقایسه شد (جدول ۳). ریسک محاسبه‌شده برای افراد واجد ژنوتیپ CT نسبت به افراد CC (OR=۱ ،۹۵٪CI= ۰/۳۱-۱/۶۸) نشان‌دهنده این است که آلل T در متاستاز نقشی ندارد.

همچنین بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- پروموتور MMP-9 در افراد سرطانی در گروه‌های زن و مرد و استعمال دخانیات نشان داد که توزیع ژنوتیپی در گروه‌های مردان، زنان، افراد سیگاری و غیر سیگاری مورد مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد کنترل تفاوت آماری معناداری دارد. (P=۰/۰۰۸،CI۱/۶۱-۱۲/۲۶ = ۹۵٪ و OR=۴/۴۴ برای زنان، P=۰/۰۰۲،CI۱/۵۹-۶/۹۲ = ۹۵٪ و OR=۳/۳۱ برای مردان، P=۰/۰۰۲،CI۱/۸۳-۱۰/۸۲ = ۹۵٪ و OR=۴/۴۵ برای افراد سیگاری، P=۰/۰۰۶، CI۱/۴۲-۷/۱۷ = ۹۵٪ و OR=۳/۲ برای افراد غیر سیگاری) (جدول ۴).

جدول ۲: فراوانی آللوتایپی و ژنوتایپی پلی مورفیسم C/T ۱۵۶۲- در ناحیه پروموتور ژن MMP-9 در افراد گروه کنترل و گروه مبتلابه سرطان ریه

	کنترل		سرطان ریه		P^a_{value}	OR (95%CI)
	n	٪	n	٪		
آللوتایپ MMP-9						
C	۱۶۶	(٪ ۸۳)	۱۴۰	(٪ ۷۰)		
T	۳۴	(٪ ۱۷)	۶۰	(٪ ۳۰)	۰/۰۰۲	۲/۰۹ (۱/۲۹-۳/۳۷)
ژنوتیپ MMP- ۹						
CC	۶۹	(٪ ۶۹)	۴۰	(٪ ۴۰)	رفرنس	
CT	۲۸	(٪ ۲۸)	۶۰	(٪ ۶۰)	<۰/۰۰۰۱	۳/۶۹ (۲/۰۴-۶/۶۹)
TT	۳	(٪ ۳)	۰	۰		

جدول ۳: بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- پروموتور MMP-9 در احتمال خطر متاستازی افراد M-

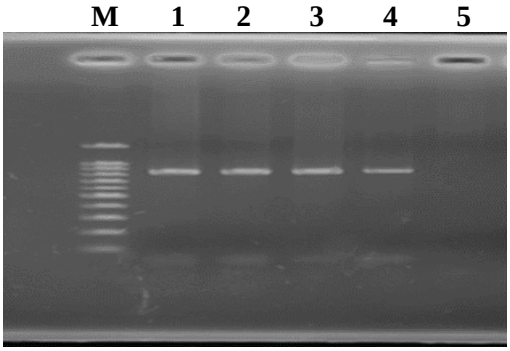
	CC	CT	TT	OR (95%CI) CT [a]	P
متاستازی (M^+)	۱۶	۱۸	۰	۱ (۰/۳۱-۱/۶۸)	۰/۴۶۲۵
غیرمتاستازی (M^-)	۲۶	۴۰	۰	رفرنس	-

a) OR محاسبه‌شده برای ژنوتیپ‌های CT در برابر ژنوتیپ CC

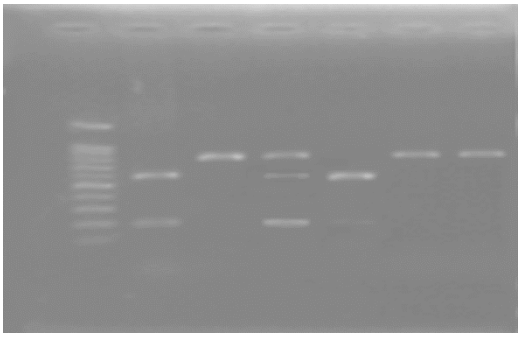
جدول ۴: فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- پروموتور MMP-9 در گروه‌های مختلف

	کنترل (n=۱۰۰)				سرطان (n=۱۰۰)					OR (95%CI)	P^a_{value}
	N	CC	CT	TT	n	CC	CT	TT	CT[a]		
جنسیت											
زن	۳۸	(٪ ۷۴)۲۸	(٪ ۲۴)۹	(٪ ۲)۱	۳۴	(٪ ۴۱)۱۴	(٪ ۵۹)۲۰	۰	۴/۴۴ (۱/۶۱-۱۲/۲۶)		۰/۰۰۸
مرد	۶۲	(٪ ۶۶)۴۱	(٪ ۳۱)۱۹	(٪ ۳)۲	۶۶	(٪ ۳۹)۲۶	(٪ ۶۱)۴۰	۰	۳/۳۱ (۱/۵۹-۶/۹۲)		۰/۰۰۲
استعمال دخانیات											
سیگاری	۴۷	(٪ ۷۴/۵)۳۵	(٪ ۲۳/۵)۱۱	(٪ ۲)۱	۴۸	(٪ ۴۲)۲۰	(٪ ۵۸)۲۸	۰	۴/۴۵ (۱/۸۳-۱۰/۸۲)		۰/۰۰۲
غیر سیگاری	۵۳	(٪ ۶۴)۳۴	(٪ ۳۲)۱۷	(٪ ۴)۲	۵۲	(٪ ۳۸)۲۰	(٪ ۶۲)۳۲	۰	۳/۲ (۱/۴۲-۷/۱۷)		۰/۰۰۶

a) OR محاسبه‌شده برای ژنوتیپ‌های CT در برابر ژنوتیپ CC



شکل ۱: تصویر قطعات ۸۱۰ جفت بازی پس از انجام PCR توسط پرایمر MMP9 _1562C/T بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک Mمارکر bp۱۰۰ ، چاهک‌های شماره ۱ تا ۴، قطعات ۸۱۰ جفت بازی و چاهک شماره ۵ کنترل منفی است.



شکل ۲: نتایج هضم آنزیمی و مشاهده قطعات برشی توسط آنزیم SphI روی ژل آگارز ۳٪. چاهک M مارکر bp۱۰۰ ، چاهک ۱ و ۴ دارای پلی‌مورفیسم TT، چاهک ۲، ۵ و ۶ دارای پلی‌مورفیسم CC و چاهک ۳ دارای پلی‌مورفیسم CT

بحث:

سرطان ریه شایع‌ترین سرطان با فراوانی سالانه ۱،۳۵۰،۰۰۰ مورد ابتلا در سرتاسر جهان است. این نوع سرطان یک بیماری کشنده با ۱۰٪ نرخ بقاء ۵ ساله است. اگرچه سیگار کشیدن می‌تواند عامل مؤثر در ابتلا به آن باشد، ولی فقط ۱۰ ٪ سیگاری‌های شدید به سرطان ریه مبتلا می‌شوند. ازاین‌رو تغییرپذیری در حساسیت ژنتیکی به مواد سرطان‌زا ممکن است نقش اصلی در اتیولوژی سرطان ریه داشته باشد [۹]. گزارش‌های بی‌شماری وجود دارد که نشان می‌دهد عامل‌های ژنتیکی در حساسیت به سرطان ریه نقش دارند [۱۰]. ماتریکس متالوپروتئازها می‌توانند تهاجم و متاستاز را از طریق تجزیه ماتریکس خارج سلولی غشاهای پایه و تنظیم چسبندگی سلول تنظیم کنند. بیان بیش‌ازحد ماتریکس متالوپروتئازها در تومورهای اولیه و متاستاتیک یافت شده و به میزان قابل‌توجهی با پیشرفت تومور یعنی تهاجم و متاستاز به اندام‌های ثانویه و کاهش بقا مرتبط است. مطالعه‌های زیادی ارتباط بین واریانت های ژنتیکی در ژن ماتریکس متالوپروتئازهای ۱، ۲، ۳، ۷، ۹، ۱۳ و ۱۴ را با حساسیت به سرطان یا متاستاز ازجمله سرطان‌های ریه، پستان، کلورکتال و معده بررسی کرده‌اند [۱۱]. همچنین افزایش بیان آنـزیم MMP-9 در بسیاری از بیماری‌های ریـوی چـون آسـم، آمفیـزم و فیبروز سیستیک گزارش‌شده است [۱۲]. در سرطان ریه نوع سلول غیرکوچک ارتباط نزدیکی بین مقادیر در حال گـردش آنزیم MMP-9 و میزان بقا گزارش‌شده اسـت [۱۳].

مطالعات انجام‌گرفته در طی سال‌های گذشته حاکی از آن است که پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- در ناحیه پروموتر MMP-9 با شروع سرطان ریه و متاستاز مرتبط است. در مطالعه حاضر با بررسی پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- در ناحیه پروموتر ژن MMP-9، نقش این پلی‌مورفیسم در شروع، متاستاز و همچنین تأثیر جنسیت و عوامل محیطی ازجمله استعمال دخانیات در سرطان ریه موردبررسی قرارگرفته است.

در مطالعه حاضر توزیع آللی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم‌های C/T ۱۵۶۲- در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل معنادار بوده و این نشان‌دهنده ارتباط آلل T در ز C/T ۱۵۶۲- با سرطان ریه است. به‌منظور بررسی نقش آلل T در پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲، در مرحله شروع و متاستاز، بیماران به دو گروه متاستازی و غیرمتاستازی تفکیک شدند.

در پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- توزیع آللی و ژنوتیپی آلل T در گروه غیرمتاستازی معنادار بود، اما تفاوت معناداری در توزیع آللی و ژنوتیپی آلل T در گروه متاستازی مشاهده نشد که نشان‌دهنده دخالت آلل T در بروز سرطان ریه و نقش نداشتن آلل در متاستاز است.

ژانگ و همکاران در مطالعه خود، پلی‌مورفیسم فعال C/T ۱۵۶۲- را در ناحیه پروموتر MMP-9 گزارش کردند. مطالعه آن‌ها بر این موضوع دلالت دارد که پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- دارای تأثیر خاص آللی روی رونویسی MMP-9 است. همچنین آنان در بررسی برهمکنش DNA- پروتئین نشان دادند که آلل T دارای فعالیت بیشتری است [۱۴].

علاوه بر این در مطالعه هانگسیا و همکاران مشخص شد که پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- در ناحیه پروموتر ژن MMP-9 می‌تواند عامل خطر سرطان ریه در بین جمعیت آسیایی باشد [۱۵].

جعفری و همکاران در سال ۲۰۱۴ دریافتند که آلل T در پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- با شروع سرطان ریه ارتباط دارد و این پلی‌مورفیسم می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر استعداد ابتلا به متاستاز و بدخیمی در نظر گرفته شود [۱۶].

مطالعه حاضر اولین بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم C/T ۱۵۶۲- پروموتور ژن MMP-9 در افراد سرطانی در گروه‌های مختلف جنسیتی و استعمال دخانیات در جمعیت ایران است. توزیع آللی و ژنوتیپی افراد مبتلابه سرطان نسبت به افراد کنترل در این گروه‌ها دارای ارتباط معنادار بود. بررسی‌ها نشان داد که مردان دارای آلل T نسبت به مردان فاقد این آلل، احتمال بالاتری برای ابتلا به سرطان ریه دارند.

با توجه به معناداری ارتباط هردو جنس دارای ژنوتیپ CT با بیماری، خطر ابتلا به سرطان ریه در زنان دارای ژنوتیپ CT به دلیل تأثیر هورمون‌های جنسی بیشتر از مردان دارای ژنوتیپ CT است. همچنین با توجه به معناداری ارتباط افراد سیگاری و غیر سیگاری دارای ژنوتیپ CT با بیماری، خطر ابتلا به سرطان ریه در افراد سیگاری به دلیل مواد سرطان‌زای درون سیگار بالاتر از افراد غیر سیگاری است.

با توجه به متفاوت بودن جمعیت‌های موردمطالعه ممکن است حالت قومیتی نیز درنتیجه پژوهش مؤثر بوده باشد و نتیجه‌گیری قطعی نیاز به مطالعه گسترده‌تر در آینده و تکرار آزمایش‌ها در سایر جمعیت‌ها دارد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که آلل T در همکاری با سایر عوامل دخیل در شروع سرطان ریه، شرایط را برای شکل‌گیری سلول‌های سرطانی در جمعیت موردمطالعه فراهم می‌سازد، اما نقشی در متاستاز سرطان ریه ایفا نمی‌کند.

تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از اساتید محترم و مسئولین آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاه در راستای اجرای این پژوهش صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع:

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان‌نشده است.

References:

1. Keyvani V, Kerachian MA. The Effect of Fasting on the Important Molecular Mechanisms Related to Cancer Treatment. J Fasting Health 2014; 2(3): 113-118.
2. Talmadge JE, Fidler IJ. the biology of cancer metastasis: historical perspective. Cancer Res 2010; 70(14): 5649–5669.
3. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. Cell 2006; 127(4): 679-695.
4. Zahir ST, Mirtalebi M. Survival of patients with lung cancer,Yazd, Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(9): 4387-4391.
5. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17: 463_516.
6. Tutton MG, George ML, Eccles SA, et al. Use of plasma MMP-2 andMMP-9 levels as a surrogate for tumor expression in colorectal cancer patients. Int J Cancer 2003; 107(4): 541-50.
7. Farina AR, Mackay AR. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. Cancers 2014; 6(1): 240–296. 8. Hughes S, Agbaje O, Bowen RL, et al. Matrix metalloproteinase single-nucleotide polymorphisms and haplotypes predict breast cancer progression. Clin Cancer Res 2007; 13(22): 6673–6680.
9. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 2006; 160(1): 1-40.
10. Joos L, He JQ, Shepherdson MB, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of

decline in lung function. Hum Mol Genet 2002; 11(5): 569-76.
11. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, et al. The molecular epidemiology of lung cancer. Carcinogenesis 2007; 28(3): 507-18.
12. Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, et al. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. Exp Biol Med (Maywood) 2006; 231(1): 20-7.
13. Yokota J. Tumor progression and metastasis. Carcinogenesis 2000; 21(3): 497-503.
14. Zhang C, Li C, Zhu M, et al. Meta-analysis of MMP2, MMP3, and MMP9 promoter polymorphisms and head and neck cancer risk. PLoS One 2013; 8(4): e62023.
15. Hongxia Li, Xiaoyan Liang, Xuebing Qin, et al. Association of matrix metalloproteinase family gene polymorphisms with lung cancer risk: logistic regression and generalized odds of published data. Sci Rep 2015; 5: 10056.
16. Jafari M, Pirouzi A, Mohsenzadeh M, et al. Association of MMP 9-1562 C/T Single Nucleotide Polymorphism with the Susceptibility to Lung Cancer Disease in South Iranian Population. British J Med Med Res 2014; 4(13): 2494-2502.

Original Article

Evaluation of correlation between -1562 C/T in promoter single nucleotide polymorphisms of MMP-9 gene and lung cancer initiation and metastasis risk

Mozhde Rastegar[1], Hossein Sazegar[1], Fatemeh Kohkan[3]

Received: 2016/15/11 Revised: 2017/15/06 Accepted: 2017/24/07

1. Dept of biology, Faculty of Basic Sciences , Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran
2. Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.2, Summer 2017

Pars J Med Sci 2017;15(2):9-16

Abstract:

Introduction:
Matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) plays an essential role in the initiation and progression of cancer. In this study, the relationship between single nucleotide polymorphisms C/T1562- MMP-9 gene promoter and lung cancer was studied.

Material and Method:
In this case-control study, MMP-9 gene polymorphism was determined in 100 patients with lung cancer and 100 controls using PCR and RFLP.

Results:
The results showed that the frequency of CT genotype in this polymorphism was higher in patients (60%) compared to controls (28%). (OR= 3.69, 95% CI= 2.04-6.69 and p= 0.0001). In order to calculate the risk of metastasis, metastatic and non-metastatic genotypes of this polymorphism were compared in the two groups. (OR= 1, 95% CI= 0.31-1.68 and p= 0.46). Also for the first time in Iran, we assessed polymorphism in cancer patients in different sexes, smokers and non-smokers, and observed no significant difference between men and women, or between smokers and non-smokers regarding distribution of this genotype as compared with control group ($p<0.05$).

Conclusion:
It appears that the polymorphism 1562 C/T MMP-9 gene increases the risk of lung cancer, but has no effect on metastasis.

Keywords: Lung Cancer, Matrix Metalloproteinases, Polymorphism, PCR, RFLP

* Corresponding author Email: hoseinsazgar@yahoo.com