Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 19, No. 3, Jul-Aug 2011
Pages: 359-368

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۹ ، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۰
صفحه: ۳۶۸-۳۵۹

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

بررسی پلی مورفیسم پروموتر ژن MDM2(SNP309) در مبتلایان سرطان پستان در آذربایجان شرقی

محمد علی حسین پور فیضی*[۱]، صغری تقی زاده[۲]، ناصر پولادی[۳]، پروین آذرفام[۴]، وحید منتظری[۵]

۱-استاد رادیوبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه تبریز
۲- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه تبریز
۳-کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان
۴- کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی، دانشگاه تبریز
۵- استاد گروه جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۰

چکیده

مقدمه: آنکوژن MDM2 فسفوپروتئینی با خاصیت یوبیکوئیتین لیگازی کد می‌کند که باعث ممانعت از فعالیت P53 و پیش برندگی تخریب آن می‌شود. اخیرا یک جانشینی T به G در پروموتر ژن MDM2(SNP309)، شناسایی شده و ارتباط آن با بیان افزایش یافته MDM2 نشان داده شده است و مشخص گردیده که این بیان افزایش یافته با بروز در سنین پایین چندین تومور از جمله سرطان سینه همراه است. از این رو شاید بتوان آن را به عنوان یک مارکر استعداد ابتلا به سرطان پستان در نظر گرفت. ما در این پژوهش تاثیر این پلی مرفیسم(MDM2, SNP309) بر کارسینومای پستان را بررسی نموده‌ایم.

روش برررسی: این مطالعه با بررسی ۹۵ نمونه سرطانی و ۹۵ نمونه کنترل در استان آذربایجان شرقی انجام شد. ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه ۳۰۹ ژن MDM2، با استفاده از SSCP-PCR و Sequencing تعیین شد.

نتایج: در گروه کنترل توزیع ژنوتیپی این پلی‌مورفیسم ژن MDM2 برای ژنوتیپ‌های T/T، GT و GG، به ترتیب ۲۹/۵٪، ۴۰٪ و ۳۰/۵٪ بود. توزیع ژنوتیپی این پلی‌مورفیسم در گروه سرطانی۳۱/۶٪ برای ژنوتیپ T/T، ۳۷/۹٪ برای T/G و ۳۰/۵٪ برای G/G بود. تفاوت معنادار آماری بین توزیع این پلی‌مورفیسم ژن MDM2 در گروه کنترل و سرطانی دیده نشد(Pvalue>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم پروموتر ژن MDM2 در جایگاه ۳۰۹ به تنهایی همراهی قابل استنادی با ابتلا به سرطان پستان در جمعیت شمال غرب کشور ندارد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، پلی مورفیسم، ژن MDM2، SNP309

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن ۳۳۶۲۲۸۰-۰۴۱۱، پست الکترونیکی: pourfeizi@eastp.ir

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

مقدمه

سرطان پستان یکی از سرطان‌های شایع است به طوری که پس از سرطان پوست دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد(۱،۲) و بیش از ۱۰۰/۰۰۰ مورد جدید هر ساله تشخیص داده می‌شود(۳). سرطان سینه یک بیماری هتروژن می‌باشد(۴) فاکتورهای محیطی متعدد و تغییرات ژنتیکی از قبیل پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی از عوامل به وجود آورنده آن می‌باشند(۵). SNP (single nucleotide polymorphism)ها که به عنوان تنوع ژنتیکی، تعیین کننده تنوع فنوتیپی بین افراد می‌باشند به نظر می‌رسد که در حساسیت افراد به سرطان‌ها و پیشرفت بیماری در آنها دخیل باشند(۶).

ژن‌هایی مانند BRCA-1، BRCA-2 و P53 از مهمترین موارد شناخته شده در زمینه‌ی سرطان پستان هستند. زنان دارای جهش در این ژن‌ها با احتمال بالایی در طول عمر خود مبتلا به سرطان پستان می‌شوند و اغلب آنها در سنین جوانی و قبل از یائسگی تشخیص داده می‌شوند(۷،۸).

BRCA 2, BRCA1 ژن‌های انسانی متعلق به خانواده ژن‌های سرکوبگر توموری می‌باشند. این ژن‌ها در سلول‌های سالم به پایداری ژنتیکی سلول و جلوگیری از رشد بی رویه سلولی کمک می‌کند. جهش در این ژن‌ها با توسعه سرطان‌های وراثتی پستان و تخمدان ارتباط دارد.

جهش‌های BRCA1 همچنین ممکن است خطر توسعه سرطان کولن، پانکراس، رحم و گردنه رحم زنان را افزایش دهد. جهش‌های مضر BRCA2 نیز ممکن است خطر سرطان پانکراس، سرطان معده، سرطان کیسه صفرا، سرطان مجرای صفراوی و ملانوما را افزایش دهد.

مردان حامل جهش‌های BRCA1 نیز در خطر ابتلا به سرطان پستان و احتمالاً سرطان پانکراس، سرطان بیضه و شروع زودهنگام سرطان پروستات هستند. سرطان پستان مردان، سرطان پانکراس و سرطان پروستات ارتباط قوی با جهش‌های ژن BRCA2 نیز نشان می‌دهد(۷،۸).

P53 یک مهار کننده سرطان می باشد که فعالیت آن در بسیاری از سرطان‌های انسانی به علت جهش در خود ژن P53 یا انحرافاتی در بیان پروتئین‌های عمل کننده در مسیر P53 از قبیل MDM2 ممکن است از بین رفته یا به شدت تضعیف گردد(۹). MDM2 یک فسفو پروتئین و یک یوبی کوئیتین لیگاز برای P53 است که مسئول ممانعت از فعالیت P53 و پیش برندگی تخریب آن می باشد(۱۰). اخیراً یک جانشینی T به G در پروموتر ژن MDM2(SNP309)، شناسایی شده و ارتباط آن با بیان افزایش یافته MDM2 نشان داده شده است و مشخص گردیده که این بیان افزایش یافته با بروز در سنین پایین چندین تومور از جمله سرطان سینه همراه است، زیرا این افزایش بیان باعث تسریع در تشکیل تومور می‌گردد(۱۱). این مطالب بیان کننده این واقعیت است که این پلی‌مورفیسم می‌تواند به عنوان یک عامل مهم در سرطان مطرح باشد. که می‌تواند بر روی فرکانس سرطان در یک جمعیت، سن بروز سرطان در یک فرد، پاسخ به درمان سرطان‌ها تاثیرگذار باشد(۱۲). مشخص گردیده است که MDM2 در تعدادی از سرطان‌های مختلف از جمله سرطان سینه دچار بیان بیش از حد(Over expression) می‌شود (۱۶-۱۳). لذا SNP309 در دومین منطقه پرومتوری ژن MDM2 که با بیان افزایش یافته این ژن همراه است، می‌تواند به عنوان یک پتانسیل مولکولی برای حساسیت به سرطان و یک تومور مارکر مناسب در تومورهای سینه مورد ارزیابی قرار گیرد. در صورت وجود حالت پلی‌مورفیسمی در جایگاه 309 ژن MDM2، یعنی تبدیل T به G در این منطقه پروموتری، میل اتصالی فاکتور فعال کننده رونویسی Sp1 به این منطقه به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد و این امر باعث افزایش بیان ژن MDM2 می‌گردد. بدین معنی که هر گاه ژنوتیپ فرد در این جایگاه پلی مورفیسمی TT باشد، در سلول بیان پایه‌ای از ژن MDM2 وجود دارد ولی هر گاه ژنوتیپ فرد TG باشد، آلل G باعث افزایش بیان ژن MDM2 می‌گردد و این افزایش بیان در حالت GG شدیدتر می‌باشد. با توجه به اثر ممانعت گنندگی که MDM2 بر روی P53 دارد، افزایش بیان MDM2 باعث افت در مقدار افزایش پروتئین P53 در صدمات سلولی می‌گردد(در

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

حالت معمول مقدار پروتئین P53 در صورت بروز صدمات سلولی ۱۴-۵ مرتبه افزایش می‌یابد که این رقم در صورت وجود آلل G در جایگاه 309 ژن MDM2 و افزایش مقدار پروتئین MDM2، به ۳-۲ برابر کاهش می‌یابد)(۱۷). ما در مطالعه توصیفی حاضر سعی نموده‌ایم نقش حالت‌های مختلف این جایگاه پلی‌مورفیسم را در بیماران مبتلا به سرطان پستان در آذربایجان بررسی نماییم.

جدول ۱: مواد مورد استفاده در این مطالعه به همراه شرکت تولید کننده و کشور سازنده

نام ماده	تولید کننده	کشور سازنده
اکریل آمید	Merck	Germany
آمونیوم پرسولفات (APS)	Merck	Germany
اتیدیوم برماید (EtBr)	Merck	Germany
الکل اتیلیک مطلق	Merck	Germany
تریس- باز (Tris-base)	Merck	Germany
Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA)	Merck	Germany
آگارز	Gene fanavaran	Iran
NaCl (extra pure)	Merck	Germany
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck	Germany
NaOH	Merck	Germany
اسید استیک گلاسیال (CH3COOH)	Merck	Germany
Xylene	Merck	Germany
فرمالدهید	Merck	Germany
Tetra Methyl Ethilen Diamine (TEMED)	Merck	Germany
Bromophenolblue	Merck	Germany
نیترات نقره	Merck	Germany
آغازگرها (OD= 10)	Fazabiotech	Iran
Proteinase K	طوبی نگین	Iran
Taq DNA polymerase	Kimiashimi	Iran
dNTP mix	Kimiashimi	Iran
MgCl2	Kimiashimi	Iran
PCR buffer	Kimiashimi	Iran

روش بررسی

ابتدا خون ۹۵ نفر از بیماران استان آذربایجان شرقی که به بیمارستان‌های شهر تبریز(بیمارستان‌های امام رضا و نورنجات) مراجعه نموده بودند و ۹۵ نفر از افراد سالم بدون هر گونه پیشینه سرطان، جمع‌آوری شد. افراد سالم حین مراجعه برای خون گیری از لحاظ سابقه خانوادگی ابتلا به هر گونه سرطان و همچنین از لحاظ دارابودن فاکتورهای خطر ابتلا به سرطان پستان مورد پرسش قرار می‌گرفتند و در صورت دارا بودن هر گونه سابقه سرطان در خانواده یا دارا بودن عوامل پر خطر، از لیست افراد سالم حذف می شدند.

بیماران مورد بررسی در این مطالعه در محدوده سنی ۸۲-۱۷ سال قرار دارند و متوسط سنی آنها ۴۵ سال می‌باشد که در مقایسه با سن بیماران سرطان پستان در کشورهای توسعه یافته پایین است. در مجموع از خون ۹۵ فرد مونث سالم نیز به عنوان کنترل در این مطالعه استفاده شد این افراد فاقد هر گونه بیماری ژنتیکی بوده و در خویشاوندان درجه یک و دو خود هیچگونه سرطانی را نشان نداده بودند، این افراد در محدوده سنی ۷۶-۲۱

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

سال قرار داشته و متوسط سنی آنها ۴۰ سال بود.

سپس استخراج DNA صورت گرفت، بدین صورت که ۲ سی‌سی از خون افراد سالم و سرطانی را برداشته و با از استفاده از بافر لیز کننده و سانتریفیوژ، گلبول‌های قرمز آنها لیز شد. در ادامه به روش هضم با پروتئیناز K، DNA گلبول‌های سفید آنها استخراج و در میکروتیوب‌هایی نگهداری شد. سپس غلظت DNAهای استخراجی با استفاده از بارگذاری مقداری از DNA استخراج شده در ژل آگارز ۲٪ تعیین گردید. در مرحله بعدی واکنش PCR(Polymerase Chain Reaction) قطعه دارای جایگاه SNP309 از ژن MDM2 صورت گرفت(ترموسایکلر از شرکت Labcycler کشور Germany خریداری شده بود). این واکنش با استفاده از ۱-۲ میکرولیتر DNA، ۰/۲ میکرولیتر تک پلی مراز، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mixed، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و ۰/۸۵ میکرولیتر MgCl2 انجام گرفت.

توالی پرایمرهای رفت و برگشت عبارتند از(۱۴):

F: 5-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3

و R: 5-TCGGAACGTGTCTGAACTTG-3

طول قطعه حاصل از این واکنش ۱۹۵ جفت باز بود. شرایط بهینه برای این تکثیر به ترتیب زیر انجام گرفت:

مرحله اول: Denaturation ابتدایی با دمای ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه

مرحله دوم: ۳۵ سیکل از مراحل a، b و c

a- Denaturation با دمای ۹۴ درجه به مدت ۲۰ ثانیه

b- Annealing با دمای ۵۹ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

c- Extension با دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه

مرحله سوم: Extension نهایی با دمای ۷۲ درجه به مدت ۳ دقیقه

بعد از انجام PCR محصولات جهت الکتروفورز و سپس انجام SSCP در فریزر نگهداری شدند.

الکتروفورز روی ژل آگارز: حدود ۴ میکرولیتر از محصول واکنش همراه ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری در ژل آگارز ۲٪ در بافر 1x TBE الکتروفورز شد و کارایی واکنش تکثیر، با استفاده از دستگاه شناساگر نور ماورا بنفش مشاهده گردید.

بعد از واکنش PCR نوبت به انجام روش SSCP(single-strand conformational polymorphism) بر روی محصولات PCR می‌رسد که برای این عمل ۳-۲ میکرولیتر از محصول PCR برداشته شده و به همراه ۶-۴ میکرولیتر از محلول بارگذاری SSCP در یک میکروتیوپ ریخته شد و برای تک رشته‌سازی در دستگاه مربوطه قرار گرفت(برای تک رشته‌سازی مخلوط فوق به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه قرار گرفت). بعد از تک رشته‌سازی محصولات PCR، میکروتیوپ‌ها به سرعت در یخ قرار گرفته و بلافاصله در ژل آکریل آمید ۱۰٪ بارگذاری گردید و سپس به مدت ۱۷-۲۰ ساعت الکتروفورز روی آنها در دمای صفر درجه و با ولتاژ ۱۰۰V انجام گرفت. پس از طی این مدت، ژل به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی و الگوهای متفاوت(بر اساس کنفورماسیون‌های مختلف قطعات تک رشته‌ای) که نشان دهنده ژنوتیپ‌های متفاوت بودند، مشاهده شدند.

در نهایت برای تایید ژنوتیپ‌های به دست آمده از روش SSCP، نمونه‌های دارای الگوهای باندی مختلف برای توالی یابی توسط شرکت فزاپژوه تهران به شرکت میکروژن کره جنوبی فرستاده شدند. در این کشور توالی یابی به روش سانجر(Sanger) انجام گرفت.

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار(SPSS (Ver16.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه توزیع فراوانی سه ژنوتیپ مختلف در جایگاه ۳۰۹ منطقه پروموتری ژن MDM2 در نمونه‌های سرطانی با توزیع فراوانی این سه ژنوتیپ در نمونه‌های شاهد از آزمون مجذور کای استفاده شد و از آنجایی که P>۰/۰۵ بود، معنی‌دار در نظر گرفته نشد. نسبت شانس و سطح اطمینان ۹۵٪ برای تعیین رابطه بین متغییر وابسته و مستقل محاسبه شد.

نتایج

در این پژوهش توصیفی عملیات استخراج DNA روی خون ۹۵ بیمار سرطانی و ۹۵ فرد سالم صورت گرفت که نوع بیماری در ۶۸/۸٪ بیماران تحت بررسی کارسینومای تهاجمی مجرایی(Invasive ductal carcinoma)، در ۴/۵٪ بیماران

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

کارسینومای در جای مجرایی(Insitu ductal carcinoma)، در ۲/۵٪ بیماران فیبروآدنوما و در ۱/۸ ٪ از بیماران از نوع فیبروکیستیک می‌باشد. پستان درگیر در ۴۴٪ بیماران، پستان چپ و در ۵۴٪ آنها پستان راست می‌باشد. در حالی که تنها ۲٪ بیماران تحت بررسی درگیری هر دو پستان را نشان داده‌اند. اندازه تومور در ۱۸/۸٪ از بیماران T1(کوچکتر از ۲ سانتی‌متر)، در ۲۵٪ T2(بین ۵-۲ سانتی متر)، در ۱۹/۷٪ T3(بزرگتر از ۵ سانتی‌متر) و در ۵/۴٪ از آنها T4(بیماری گسترش یافته با درگیری پوست) می‌باشد. درجه بندی تومور و مرحله بیماری بر اساس اطلاعات موجود در پرونده پاتولوژی بیماران انجام گرفت. نتایج نشان داد که ۱۲/۵٪ بیماران در زمان جراحی در Stage I، ۲۲/۳٪ در مرحله Stage II و ۴۳/۸٪ در Stage III قرار داشتند.

تمامی DNAهای استخراجی دارای کیفیت مناسب برای PCR بودند و این واکنش برای تمامی نمونه‌های استخراج شده صورت گرفت. محصولات PCR برای انجام روش SSCP و بارگذاری در ژل آکریل آمید در یخچال نگهداری شدند.

توزیع ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف جایگاه ۳۰۹ ژن MDM2 در گروه کنترل و بیمار در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری در توزیع ژنوتیپی و آللی در دو گروه مورد بررسی دیده نمی‌شود(جدول ۲).

فراوانی ژنوتیپ TT در نمونه‌های سرطانی ۳۱/۶٪ و در نمونه‌های سالم ۲۹/۵٪ بود. تفاوت معنی‌دار بین گروه شاهد و سرطانی در این گروه ژنوتیپی دیده نشد. فراوانی افراد هتروزایگوت در گروه سرطانی ۳۷/۹٪ و در گروه شاهد ۴۰/۰٪ می‌باشد که در این نوع ژنوتیپ نیز تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نمی‌شود. اختلاف بین فراوانی ژنوتیپ GG در نمونه‌های سرطانی و سالم نیز معنی‌دار نبود(جدول ۳).

فراوانی‌های آللی در نمونه‌های سرطانی و سالم، هم پوشانی CIها (confidence intervals) یا ضریب اطمینان های آنها و مقدار بدست آمده برای OR(هرگاه مقدار بدست آمده برای OR برابر با یک باشد، فاکتور مورد مطالعه بر صفت مورد مطالعه بی‌تاثیر می‌باشد) و P value (که بسیار بزرگتر از ۰/۰۵ می‌باشد)، نشان دهنده بی معنی بودن تاثیر آلل G در ابتلا به سرطان در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد.

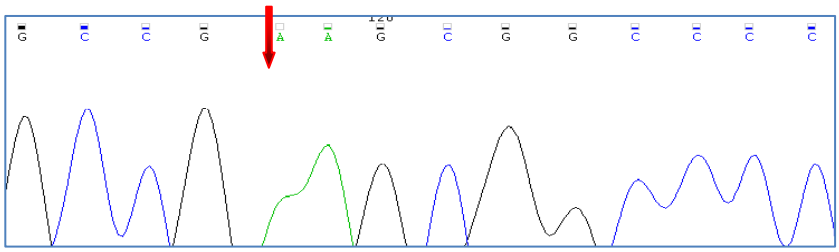
جدول ۲. توزیع فراوانی ژنوتیپی در گروه کنترل و سرطانی

	گروه سرطان پستان		گروه شاهد		
ژنوتیپ	تعداد(درصد)	CI-CANCER	تعداد(درصد)	CI-CONTROL	P value
TT	۳۰(۳۱/۶٪)	۲۳/۱۰-۴۱/۴۹	۲۸(۲۹/۵٪)	۲۱/۲۴-۳۹/۲۹	۰/۷۵
TG	۳۶(۳۷/۹٪)	۲۸/۷۹-۴۷/۹۴	۳۸(۴۰/۰٪)	۳۰/۷۲-۵۰/۰۵	۰/۷۶
GG	۲۹(۳۰/۵٪)	۲۲/۱۸-۴۰/۴۰	۲۹(۳۰/۵٪)	۲۲/۱۸-۴۰/۴۰	۱

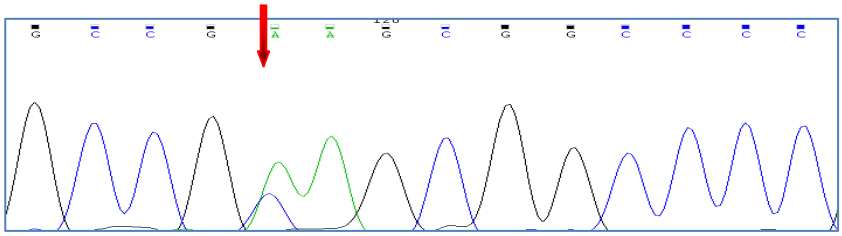
جدول ۳. توزیع فراوانی آللی در گروه کنترل و سرطانی

	گروه سرطان پستان		گروه شاهد	
آلل	تعداد(درصد)	CI-CANCER	تعداد(درصد)	CI-CONTROL
T	۹۶(۵۱٪)	۴۳/۴۸-۵۷/۵۶	۹۴(۴۹٪)	۴۲/۴۴-۵۶/۵۲
G	۹۴(۴۹٪)	۴۲/۴۴-۵۶/۵۲	۹۶(۵۱٪)	۴۳/۴۸-۵۷/۵۶
۰/۸۷P value=	OR(CI95%)=۰/۹۶(۰/۶۴۱۳-۱/۴۳۳۵)			

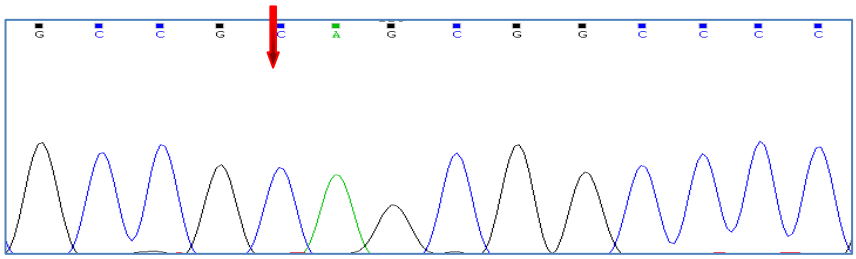
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018



الف) ژنوتیپ TT(AA)



ب) ژنوتیپ TG(AC)



ج) ژنوتیپ GG(CC)

نمودار ۱: توالی ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه ۳۰۹ ژن MDM2 را نشان می‌دهد. الف) توالی اصلی و بدون پلی مورفیسم ژن ب)توالی مربوط به ژنوتیپ هتروزایگوت ج) توالی مربوط به ژنوتیپ هموزایگوت آلل تغییر یافته(توالی‌ها مربوط به رشته منفی ژن می‌باشند، بنابراین توالی‌های TT، TG و GG را به صورت AA، AC و CC می‌بینیم.)

بحث

مطالعات انجام گرفته بر روی حالت‌های مختلف یک جایگاه ژنی پیشنهاد می‌کنند که عواملی مانند پلی مورفیسم‌های ژنتیکی ممکن است بیان کننده تفاوت‌های فردی در حساسیت افراد به سرطان، بروز زودرس و پیشرفت سرطان و حتی مقاومت‌های دارویی باشند. سرطان پستان عامل اصلی مرگ و میر زنان در کشورهای صنعتی است و در کشورهای در حال توسعه مانند ایران، در حال افزایش است(۱۸). افزایش سطوح پروتئین MDM2 در سلول به وسیله مکانیسم‌های مختلفی باعث پیشبرد تشکیل تومور در سلول‌ها می‌شود. بنابراین هر گونه تغییری اعم از جهش یا پلی مورفیسم که در ساختار ژن روی داده و باعث افزایش بیان پروتئین آن گردد، می‌تواند به عنوان عاملی مهم در سرطان زایی مطرح باشد. از آنجایی که اکثرا بیان بالای پروتئین MDM2 در سلول‌ها به دلیل ترجمه رونوشت‌های مربوط به منطقه پروموتری P2 می‌باشد، پلی مورفیسم‌های موجود در منطقه P2 بیشترین تاثیر را در بیان بالای پروتئین و افزایش خطر ابتلا به سرطان دارند.

چندین جایگاه پلی مورفیسمی در منطقه پروموتری P2 شناسایی شده‌اند که چند مورد از آنها عبارتند از: 344T>A،

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

285G>C و 443G>T(۱۹). در سال ۲۰۰۴، Bond و همکارانش(۲۰) جایگاه پلی مورفیسم دیگری در نوکلئوتید ۳۰۹ این منطقه پروموتری شناسایی کردند. در جایگاه ۳۰۹ جایگزینی نوکلئوتید G به جای نوکلئوتید T دیده می شود. این دانشمندان نشان دادند که جایگزینی T>G باعث افزایش تعداد رونوشت های مربوط به P2 و نهایتاً باعث بالا بردن سطح پروتئین MDM2 در سلول می‌شود، این افزایش سطح پروتئینی نیز باعث تسریع در تشکیل تومور و پایین آوردن سن ابتلا به سرطان می‌شود. چنین مشاهده‌ای در مورد چندین نوع از سرطان‌های وراثتی و تک گیر انسانی از جمله سرطان پستان صورت گرفته است.

با توجه به سابقه ژنتیکی متفاوت جمعیت‌ها(اثر بنیادی یا Fundamental effect)، مطالعه روی پلی مورفیسم‌های متفاوت در نقاط مختلف دنیا می‌تواند نتایج متفاوتی داشته باشد. به عنوان مثال طبق مطالعاتی که توسط Hirata و همکارانش بر روی سرطان سلول‌های کلیوی انجام گرفت، پیوستگی این جایگاه پلی مورفیسم با خطر ابتلا و پیشرفت کارسینومای کلیوی نشان داده شد و مشخص گردید که بیماران دارای ژنوتیپ MDM2 309GG علایم تشخیصی بدتر و عمر کوتاه‌تر داشتند(۱۴). در مطالعه دیگری که توسط Ezzikouri و همکارانش در کشور فرانسه بر روی کارسینومای سلول‌های کبدی انجام گرفت نیز مشخص گردید که این جایگاه پلی مورفیسم در منطقه پروموتری ژن MDM2 یک حد واسط مهم و تاثیر گذار در پیشرفت سرطان کبد در بیماران Moroccan می‌باشد(۱۳). در سال ۲۰۰۹ یک مطالعه- متا آنالیزیز در خصوص پیوستگی پلی مورفیسم MDM2 309T/G با خطر ابتلا به سرطان ریه در میان آسیایی‌ها صورت گرفت که نتایج آن نشان دهنده سهم اندک آلل G در ابتلا به سرطان ریه در میان آسیایی‌ها بود(۲۱). در مطالعه‌ای هم که نتیجه ۳۶ پژوهش مربوط به SNP309 را گرد آوری کرده است، مشخص گردیده که بالاترین فرکانس این همراهی در سرطان سینه گزارش شده است(در ۱۱ مطالعه)(۱۵). همچنین عدم همراهی جایگاه پلی مورفیسمی ۳۰۹ ژن MDM2 با خطر ابتلا به سرطان پستان در برخی جمعیت‌ها مانند بریتانیایی‌ها(۱۲)، مردم چین(۱۰) و ترکیه‌ای‌ها(۲۲) گزارش شده است.

در مطالعه‌ای که روی مردم بریتانیا انجام گرفت هم زمان همراهی ژنوتیپ GG برای سرطان‌های پستان و تخمدان بررسی گردید. در این مطالعه بدست آمدن OR=1.04 (95%CI=0.67-1.60) برای سرطان پستان و OR= 0.86 (95%CI=0.53-1.37) برای سرطان تخمدان، نشان دهنده عدم همراهی ژنوتیپ GG با بروز زودرس سرطان پستان فامیلی و سرطان تخمدان بود. در مورد مردم چین نیز مطالعات نشان دهنده عدم نقش مهم جایگاه پروموتری ۳۰۹ ژن MDM2 در بروز سرطان پستان بود((OR=1.03 (95%CI= 0.74-1.42). مطالعه نقش این جایگاه در خطر ابتلا به سرطان پستان و سن پایین بروز سرطان در مردم ترکیه نشان دهنده عدم همراهی پلی مورفیسم MDM2 SNP309 با خطر ابتلا به سرطان پستان بود((OR=1.20 (95%CI= 0.67-2.12). در مطالعه حاضر نیز وجود OR نزدیک به ۱، نشان دهنده عدم همراهی این پلی مورفیسم با شانس ابتلا به سرطان سینه در جمعیت شمال غرب ایران است.

بنابر نتایج بررسی حاضر، می‌توان گفت که احتمالاً پلی‌مورفیسم جایگاه ۳۰۹ پروموتر ژن MDM2 به تنهایی در بروز سرطان پستان در شمال غرب کشور نقشی ندارد. با این وجود برای ارزیابی نقش دقیق تر این پلی مورفیسم و پلی مورفیسم‌های دیگر در ژن‌های مرتبط از قبیل AKT (SNP3/4GG) و P53 (SNP cod72Arg/Pro) در کارسینوژنز پستان، مطالعات بیشتری لازم است. در مطالعات آینده عوامل زمینه ساز از قبیل کشیدن سیگار نیز باید در نظر گرفته شود.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

منابع:

1- Victor GV. ***Breast cancer prevention: a review of current evidence.*** CA Cancer J Cline 2000; 50(3): 156-70.

2- Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe LH, et al. ***Trends in breast cancer by race and ethnicity.*** CA Cancer J Clin 2006; 56(3):168-83.

3- Max P, Freddie B, Paola P. ***Global cancer statistics.*** CA Cancer J Clin 2005; 55(1): 74-108.

4- Hulka BS, Moorman PG. ***Breast cancer: hormones and other risk factors.*** Maturitas 2001; 38(1): 103-13.

5- Wolff MS, Weston A. ***Breast cancer risk and environmental exposures, Environ***. Health Perspect 1997; 105(4): 891-6.

6- Gareth LB, Wenwei H, Arnold L. ***A single nucleotide polymorphism in the mdm2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect.*** Cancer Res 2005; 65 (13):5481-85.

7- Levine AJ. ***P53, the cellular gatekeeper for growth and division.*** Cell 1997; 88(3): 323-31.

8- James D, Olufunmilayo I. ***Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations.*** Nature Reviews Cancer 2007; 7(1038): 937-48.

9- Michael D, Oren M. ***The p53 and Mdm2 families in cancer.*** Current Opinion in Genetics & Development 2002; 12(1): 53-9.

10- Ma H, Hu Z, Zhai X, Wang S, Wang X, Qin J, et al. ***Polymorphisms in the MDM2 promoter and risk of breast cancer: a case-control analysis in a Chinese population.*** Cancer let 2006; 240(2): 261-67.

11- Lundgren K, Montes R, Luna DO, McNeill YB, Emerick EP, Spencer B, et al. ***Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53.*** Genes Dev 1997; 11(6): 714–25.

12- Campbell IG, Eccles DM, David YH. ***No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer.*** Cancer Letters 2006; 240 (2): 195-7.

13- Ezzikouri S, Essaid A, Afifi R, Kihal LK, Benazzouz M, Hassar M. ***MDM2 SNP309T>G polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: a case–control analysis in a Moroccan population.*** Cancer Detect Prev 2009; 32(5): 380-85.

14- Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Kawamoto K, Suehiro Y, Tanaka Y. ***MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma.*** Clin Cancer Res 2007;13(14): 4123-29.

15- Cordon CC, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, et al. ***Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas.*** Cancer Res 1994; 54(3): 794-9.

16- Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, Kinoshita T, Nagai H, Uchida T, et al. ***The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin.*** Blood 1994; 84(9): 3158-65.

17- Quesnel B, Preudhomme C, Fournier J, Fenaux P, Peyrat P. ***MDM2 gene amplification in human breast***

cancer. Europ J Cancer 1994: 30(7): 982-84.

18- Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT, Kotsis A. ***The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece.*** Cancer Letters 2005; 222(1): 57–65

19- Paulin F, Neill M, McGregor G, Cassidy A, Ashfield A, Clinton A, et al. ***MDM2 SNP309 is associated with high grade node positive breast tumours and is in linkage disequilibrium with a novel MDM2 intron 1 polymorphism.*** BMC Cancer 2008; 281(8).

20- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, et al. ***A single nucleotide polymorphism in the mdm2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans.*** Cell 2004; 119(5): 591–602.

21- Guia XH, Qiub LX, Zhangd HF, Zhanga DP, Zhonge WZ, Lib J. ***MDM2 309 T/G polymorphism is associated with lung cancer risk among Asians***. Europ J Cancer 2009; 22(8): 156-63.

22- Petenkaya A, Bozkurt B, Akilli-Ozturk O, Kaya HS, Gur-Dedeoglu B, Yulug IG. ***Lack of association between the MDM2-SNP309 polymorphism and breast cancer risk.*** Anticancer Res 2006; 26(6): 4975-77.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:06 IRDT on Tuesday July 17th 2018

Study of MDM2 Promoter Polymorphism(SNP309) in Breast Cancer Patients in an Iranian Population

Hossein Pour Feizi M(PhD)*[1], Taghizadeh S(MSc)[2], Pouladi N(MSc)[3], Azarfam P(MSc)[4], Montazeri V(MD)[5]

[1]*Department of Radiobiology, Tabriz University, Tabriz, Iran*
[2]*Department of Genetic, Biology Group, Science Faculty, Tabriz University, Tabriz Iran*
[3]*Department of Cellular and Molecular Biology, Tarbiat Moalem University, of Azerbaijan, Tabriz, Iran*
[4]*Department of Medical Physics, Radiobiology Laboratory, Tabriz University, Tabriz Iran*
[5]*Department of Surgery, Tabriz University of Medical Sciences University, Tabriz, Iran*

Received: 16 Aug 2010 ***Accepted:*** 19 Apr 2011

Abstract

Introduction: Immunological processes play an important role in recurrent spontaneous abortion(RSA). According to studies, T lymphocytes and natural killer cells(NK cells) are two effective cell groups in RSA. The aim of this study was to study the percentage and absolute number of natural killer(NK) cells in women with RSA of unknown etiology.

Methods: A total of 24 women with history of recurrent abortions of unknown etiology were studied and their peripheral blood NK cell counts were compared with a group of fertile patients.

Lymphocytes from peripheral blood were isolated by ficoll paque density centrifugation. Lymphocytes were stained using anti CD56, (FITC)-anti CD16 and CYQ-CD3 monoclonal antibodies for identification of NK cells. Anti CD56 and(FITC)-anti CD69 were used for detection of activated NK cells. BD FACS caliber flow cytometry was used for data analysis.

Results: On the basis of the obtained results, absolute number of CD16+56+ cells were significantly higher in Recurrent spontaneous abortion(RSA)as compared to the control group(P= 0.43). The absolute number of CD16+56 bright cells was also high in RSA(P=0.00). There was no significant difference in CD16+56dim cell count between RSA and control group(P= 0.08). In RSA, the absolute number of CD69+ cells was significantly high(P=0.02). Results also showed a significant increase in the absolute number of CD56+/CD69+ cells in RSA (P=0.04).

Conclusion: The higher percentage of NK cells in peripheral blood of RSA patients as compared to the control group may indicate the same increase in number and cytotoxicity of uterine NK cells.

Keywords: Breast Neoplasms; Polymorphism, Genetic; Proto- Oncogene Proteins C-mdm2

This paper should be cited as:
Hossein Pour Feizi M, Taghizadeh S, Pouladi N, Azarfam P, Montazeri V. ***Study of MDM2 promoter polymorphism(snp309) in breast cancer patients in an iranian population***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(3):359-68.

****Corresponding author; Tel: 0411 3362280, Email: pourfeizi@eastp.ir***