

# بررسی پلی مورفیسم ژن "نیتریک اکساید ۲" در افراد مبتلا به سرطان معده در استان مازندران

مهشاد هوشیار<sup>۱</sup>، سعید عابدیان کناری<sup>۲</sup>، عباس محمدپور<sup>۳</sup>، حبیبه میرمجیدی<sup>۴</sup>،  
مجید جعفری ثابت<sup>۵</sup>، رامین عطایی<sup>۶\*</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** سرطان معده، چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان بوده و در استان‌های شمالی ایران میزان شیوع بالایی دارد. نیتریک اکسید به‌طور عمده توسط نیتریک اکسید سنتاز ۲ در شرایط پاتولوژیک سنتز می‌شود و نقش مهمی در سمیت سلولی، التهاب و فیبروز ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی چند شکلی جایگاه T>C ژن NOS2 در افراد مبتلا به سرطان معده بوده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه مورد شاهدی (case-control)، ۹۳ فرد مبتلا به سرطان معده که در سال ۹۴ به کلینیک طوبی شهر ساری جهت آندوسکوپی مراجعه کردند به همراه ۹۳ فرد سالم به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA به روش نمکی انجام و پلی مورفیسم جایگاه T>C (rs1137933) ژن NOS2 با روش PCR-RFLP تعیین شد. ارتباط ژنوتیپ این جایگاه با بروز سرطان معده توسط نرم‌افزار medcalc و آزمون‌های آماری (X<sup>2</sup> Chi-square و آزمون (OR) odds Ratio) انجام گرفت.

**نتایج:** فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CT و CC در نمونه‌های بیمار به ترتیب ۱۲/۶۱، ۵۱/۳۵ و ۳۶ درصد و در افراد سالم ۳۸/۷، ۳۴/۴ و ۲۶/۸ درصد بود. در این بررسی ارتباط مستقیم و معنی دار بین پلی مورفیسم این جایگاه و نسبت شانس سرطان معده به دست آمد (OR=۰/۰۵، ۲/۰۴، ۹۵٪ CI (۱/۳۷ تا ۳/۰۳)).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد ژنوتیپ CC+CT ممکن است در افزایش خطر ابتلا به سرطان معده موثر باشد. در نتیجه بررسی چند شکلی جایگاه T>C ژن NOS2 می‌تواند یک مارکر مولکولی مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و هم‌چنین برای طراحی راه کارهای پیش‌گیری در افراد مستعد این سرطان باشد.  
**واژه‌های کلیدی:** نیتریک اکسید سنتاز ۲، سرطان معده، PCR-RFLP، پلی مورفیسم

**ارجاع:** هوشیار مهشاد، عابدیان کناری سعید، محمدپور عباس، میرمجیدی حبیبه، جعفری ثابت مجید، عطایی رامین. بررسی پلی مورفیسم ژن "نیتریک اکساید ۲" در افراد مبتلا به سرطان معده در استان مازندران. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۶): ۳۸۴۳-۵۳.

۱- گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۲- مرکز تحقیقات ایمنونوتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۳- مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۴- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین و تکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۵- گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۶- مرکز تحقیقات تالاسمی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۷- مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۱۳۳۲۸۰۴، پست الکترونیکی: aminataee1349@gmail.com، صندوق پستی: ۴۷۱۸۷۹۸۵۸۷

## مقدمه

سرطان معده، بعد از سرطان مری دومین سرطان کشنده و چهارمین سرطان شایع در جهان است (۱). سرطان معده بیشتر در مردان بالای ۴۰ سال شایع بوده و با افزایش سن، خطر ابتلا به این سرطان افزایش می‌یابد (۲). به دلیل پیش‌آگهی ضعیف و به خاطر بالا بودن نرخ مرگ‌ومیر در سراسر جهان، این سرطان کاپیتان مرگ نامیده شده است (۳). در ایران برخلاف کشورهای غربی و ژاپن، میزان بروز سرطان معده در طی دو دهه گذشته رو به افزایش بوده است که به خصوص در نواحی شمال غرب کشور بروز بسیار بالایی دارد؛ در شمال غرب فرم کاردیا و در جنوب، سرطان غیرکاردیایی آن بروز بیشتری دارد. گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند که سرطان معده در ایران در مردان در مرتبه دوم و در کل در رتبه چهارم قرار دارد (۴ و ۵) پلی‌مورفیسم‌ها در جمعیت‌های گوناگون با فراوانی‌های مختلف و ارتباط یا عدم ارتباط با بیماری‌های خاص بروز می‌کنند. امروزه اهمیت بررسی پلی‌مورفیسم‌ها و ارتباط آن‌ها با بیماری‌ها در تعیین ریسک ابتلا به بیماری بسیار با اهمیت است. بنابراین مطالعه ارتباط یا عدم ارتباط هر پلی‌مورفیسم در هر جمعیتی، خاص آن می‌باشد که در صورت داشتن ارتباط می‌توان بررسی آن را به عنوان مارکری برای تعیین ریسک ابتلا در نظر گرفت (۶). پلی‌مورفیسم ژن‌هایی که در پاسخ التهابی دخیل هستند مانند نیتریک‌اکسید سنتاز (NOS) در سرطان‌زایی معده نقش دارند. نیتریک‌اکسید (NO) در انسان، مولکولی کوچک با عمر کوتاه می‌باشد که در چندین عملکردهای فیزیولوژی و پروسه‌های بیولوژیکی نقش دارد از قبیل، اتساع عروق، استراحت عضله صاف، و عملکرد عمومی NO ولی در غلظت‌های زیاد محافظت در برابر اثرات رادیکال‌های آزاد می‌باشد و NO مشتقات آن ممکن است به آسیب DNA منجر شود (۷). آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتاز: (Nitric Oxide Synthase: NOS) اولین بار در سال 1989 شناسایی شدند. سه ایزوفرم اصلی این آنزیم نوروئی (nNOS: neural NOS)، القایی endothelial NOS (iNOS) inducible NOS، اندوتلیالی (eNOS) در فاصله سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۴ کلون و خالص

سازی شدند. ایزوفرم‌های آنزیم NOS محصولات ژن‌های مختلف هستند و محل بروز، تنظیم و خصوصیات متفاوتی دارند. ساختار ژن‌های NOS مشابه است و از یک ژن اجدادی مشترک مشتق شده‌اند. NOS-I (nNOS) اولین بار در بافت عصبی یافت شد و متصل به غشای سلولی است. (iNOS) NOS-II در سیتوپلاسم برخی از سلول‌ها و بافت‌ها یافت می‌شود و در پاسخ‌های ایمنی و التهابی نقش دارد (eNOS) NOS-III اولین بار در سلول‌های اندوتلیال عروق یافت شد؛ متصل به غشای سلولی است و باعث انبساط عروق می‌شود و در تنظیم فشار خون نقش دارد. نیتریک اکساید (Nitric Oxide NO): در پاسخ‌های التهابی که توسط محصولات میکروبی و برهم کنش‌های خودایمنی آغاز می‌شود، آزاد می‌شود و نقش آن در ایمنی غیراختصاصی ثابت شده است (۸-۱۰). با توجه به گسترش سرطان معده در شمال کشور و با توجه به اینکه آنزیم NOS-II در پروسه‌های التهابی نقش دارد و آدنوکارسینوما معده نیز یک پروسه التهابی است و از آنجا که مطالعه جامعی در خصوص پلی‌مورفیسم این ژن و ارتباط آن با این کانسر انجام نشده است این مطالعه به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم این ژن بین جمعیت مبتلا به آدنوکارسینوما معده و جمعیت سالم می‌پردازد.

## روش بررسی

در این مطالعه مورد شاهدهی، case-control، با هدف تعیین اثر پلی‌مورفیسم NOS2 در آدنوکارسینوم معده از ۹۳ فرد مبتلا به آدنوکارسینوم معده بر اساس نتایج اندوسکوپی و پاتولوژی و تایید فوق تخصص گوارش ۹۳ فرد سالم از همراهان بیماران (زن یا مرد) به صورت تصادفی انتخاب که در دامنه سنی ۳۰ تا ۷۰ سال بوده و پس از کسب رضایت آگاهانه ۵ CC خون محیطی گرفته شد و به منظور جلوگیری از لخته شدن در ونوجت‌های حاوی EDTA ذخیره شد. جمع‌آوری نمونه‌ها و بررسی آن‌ها طبق پروتکل اخلاقی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد ۹۶۸ انجام یافته است. جهت تعیین حجم نمونه برای مطالعه مورد شاهدهی از معادله زیر استفاده شده است که برای مقایسه میانگین دو گروه با پیش فرض سطح اطمینان

DNA در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شود و شکل کریستالی پیدا کند سپس ۸۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، به هر کدام از میکروتیوبها افزوده و درب محصول با پارافیلیم بسته شد. سپس در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

**تعیین غلظت DNA استخراج شده:** پس از کالیبره کردن دستگاه بیوفتومتر، ۲ میکرولیتر از نمونه DNA را در روی لنز ریخته و میزان جذب، در طول موج ۲۶۰nm و ۲۸۰nm خوانده شد. نسبت جذب ۲۶۰nm به ۲۸۰nm بین ۱/۵ تا ۲ به دست آمد که یعنی نمونهها دارای خلوص مناسبی بود.

**PCR-RFLP:** برای تکثیر و تخلیص DNA از کیت Bioneer AccuPrep® PCR Purification Kit شرکت آلمان استفاده شد که در طی ۳۷ چرخه که هر چرخه شامل مراحل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه در ۵ دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۶۴/۵ درجه ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی زنجیره با دمای ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون (مرحله اولیه در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه انجام شد) محصولات PCR با آنزیم محدود کننده HinII (BSaH) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد طی ۲۴ ساعت هضم شد در صورت حضور C در نوکلئوتید که مطابق NOS2 است محصول PCR با طول bp ۴۳۶ به دو قطعه با طول bp ۲۵۸ و bp ۱۷۸ شکسته شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد اجرا شدند و با اتیدیوم برماید قابل تشخیص شدند. در جدول ۱ مواد مصرفی برای واکنش PCR و در جدول ۲ مشخصات پرایمرها نشان داد که با مراجعه به سایت NBCI و نرم افزارهای مربوطه طراحی و توسط شرکت تکاپوزیست تهیه شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار MedCalc (V ۱۲.۱.۴۰) انجام شد. آزمون‌های آماری ( $X^2$ ) Chi-square و آزمون Odds Ratio (OR) انجام گرفت و هم‌چنین پارامترهایی مانند P-value, Confidence Interval (CI) تعیین شد.

۹۵٪ و توان ۸۰٪ این معادله پیشنهاد شده است که با حداقل تعداد انتخاب شده مطابقت دارد.

$$n = \left[ \frac{(z_{1-\alpha/2} \sqrt{2\bar{p}(1-\bar{p})} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)})}{p_1 - p_2} \right]^2$$

**استخراج DNA به روش رسوب دهی با نمک: Salting**

**(out):** برای استخراج DNA از کیت استخراج (DNA Extraction)(Japan) TAKARA استفاده شده که برای این منظور ۱ سی‌سی خون بیمار و فرد سالم حاوی EDTA درون میکروتیوب ۱/۵ سی‌سی منتقل و با بافر لیزکننده I پر شد و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال قرار داده شد این عمل باعث لیز گلبول‌های قرمز می‌شود سپس به مدت ۴ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ محلول رویی، که شامل گلبول‌های قرمز است دور ریخته شد. و عمل فوق روی رسوب باقی مانده، ۵ بار تکرار شد تا در نهایت رسوب صورتی رنگ متمایل به سفید مشاهده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده II به رسوب حاصله از مرحله قبل اضافه گشت و به آرامی به رسوب ضربه وارد شد تا کاملاً حل شود. سپس به مدت ۵۰ دقیقه در بن ماری، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این بافر وظیفه لیز کردن غشای گلبول سفید و غشای هسته را داراست. میکروتیوب‌ها از بن ماری به دمای اتاق منتقل شد و ۳۰۰ میکرولیتر از پرکلرات سدیم به هر میکروتیوب افزوده شد تا پروتئین‌ها دناتوره و جدا شوند و به صورت توده قهوه‌ای رنگی، تجمع پیدا کنند. سپس محلول با دور ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید که لایه رویی که حاوی DNA است برداشته و به میکروتیوب جدید منتقل شد ۷۰ میکرولیتر از اتانول ۹۶٪ سرد به آن اضافه و چند بار تکان داده شد. با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا DNA رسوب بدهد. بعد از اتمام سانتریفیوژ محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب باقی مانده، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده شد تا چنانچه نمک بر روی کلاف DNA وجود داشته باشد، در فاز آبی حل شود. سپس با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در انتها محلول رویی دور ریخته شد. میکروتیوب‌های حاوی رسوب

## ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران تایید شده است (کد اخلاق ۹۶۸-۱۳۹۳)

## نتایج

در این مطالعه مورد-شاهدی تعداد ۹۳ فرد بیمار مبتلا به سرطان معده و ۹۳ فرد سالم از نظر پلی مورفیسم در ژن NOS2 مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز آماری اختلاف معنی داری را در دو گروه بیمار و کنترل نشان داد (جدول ۳،۴) در مجموع از میان ۹۳ فرد کنترل ۳۶ نفر (۳۸/۷٪) دارای ژنوتیپ TT، ۳۲ نفر (۳۴/۴٪) دارای ژنوتیپ CT و ۲۵ نفر (۲۶/۸٪) دارای ژنوتیپ CC بودند. در میان ۱۱۱ فرد بیمار ۱۴ نفر (۱۲/۶۱٪) دارای ژنوتیپ TT، ۵۷ نفر (۵۱/۳۵٪) دارای ژنوتیپ CT و ۴۰ نفر (۳۶٪) دارای ژنوتیپ CC بودند. ( $\chi^2=18/722$ ,  $P=0/0001$ )، می توان گفت تفاوت معنی داری در توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم مورد

نظر ژن NOS2 بین دو گروه کنترل و بیمار وجود داشت بدین صورت که فراوانی ژنوتایپ TT در گروه بیمار نسبت به کنترل به طور معنی دار کاهش یافت و همچنین ژنوتایپ CT در گروه بیمار نسبت به کنترل افزایش معنی داری داشته و همچنین در مورد ژنوتایپ CC در گروه بیمار نسبت به کنترل افزایش وجود داشته است (جدول ۳،۴) بنابراین برای بررسی ارتباط تک تک ژنوتیپها با بیماری آدنوکارسینوما از آزمون Odds- (OR) Ratio با کمک برنامه نرم افزاری MedCalc (V ۱۲.۱.۴۰) استفاده گردید. در شکل ۱ تصویر ژل آگارز حاصل از RFLP آورده شده است. به ترتیب ردیف ۱ لدر و ۲،۳،۴ ژنوتیپ، CC، TT و CT می باشند. این بررسی نشان می دهد که در سطح معنی داری (۳/۰۳ تا ۱/۳۷)  $OR=2/04$ ,  $P=0/0004$ ,  $OR=2/04$ ،  $CI_{95\%}$  (۱/۳۷ تا ۳/۰۳) معنی داری C با نسبت شانس همبستگی مستقیمی دارد به عبارتی افزایش تعداد آلل C در ژنوتایب منجر به افزایش شانس سرطان می شود.

جدول ۱: مواد مصرفی برای واکنش PCR

مقدار	مواد مصرفی
۱۲μL	Master mix 1X
۵ μL	Template DNA
۰.۸μL	Forward primer
۰.۸μL	Reverse primer
۷μL	H <sub>2</sub> O
۲۵μL	Total

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

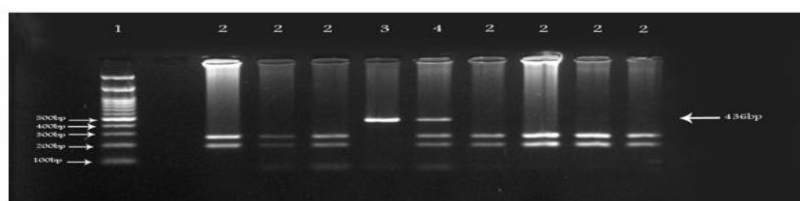
محل	توالی پرایمر	آنزیم محدودالایتر	محصول PCR
C>T (rs1137933)	Forward: GGCCCCAGTTAAATTGTGTCTACC	Hin11	bp ۱۷۸ + C: ۲۵۸
	Reverse : CTCACCAAAAAGTCTTCAGACTCACA	(BSaHI)	bp ۴۳۶ T:

جدول ۳: بررسی میزان تاثیر ژنوتیپها در شانس بیماری آدنوکارسینوما حالت اول: TT(Ref)

Genotypes	OR(%95 CI)	p-value
TT	1.00 (Ref)	--
CC	4.11(1.85 to 9.10)	0.0005
CC+CT	4.37(2.17 to 8.80)	p < 0.0001

جدول ۴: بررسی میزان تاثیر ژنوتیپها در بروز بیماری آدنوکارسینوما حالت دوم: TT+CT(Ref)

Genotypes	OR(%95 CI)	p-value
TT+CT	Ref (1.00)	--
CC	1.53(0.84 to 2.79)	0.16



شکل ۱: تصویر ژل آگارز حاصل از RFLP. به ترتیب ردیف ۱ لدر و ۲، ۳، ۴ ژنوتیپ CC، TT و CT می‌باشند.

(NO) یک رادیکال آزاد بسیارفعال بوده که نشان داده شده است دارای عملکردهای مختلف بیولوژیک می باشد. NO از ال-آرژینین به وسیله خانواده‌ای از ایزوآنزیمها موسوم به نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و در حضور اکسیژن تولید می‌شود که تولید ال-سیترولین و NO نموده که به تنظیم سطح طبیعی NO در بدن کمک می‌نماید (۱۴،۱۵). NOS از دسته اکسیدوردوکتازها بوده که با عمل بر روی یک جفت دهنده (که در این واکنش شامل اکسیژن مولکولی و NADPH می‌باشند) و از طریق اتصال و یا احیای اکسیژن ملکولی، واکنش خود را به انجام می‌رساند. این واکنش به کوفاکتورهای مختلفی از قبیل NADPH، FMN، FAD، تتراهیدروبیوپترین، کلسیم، کالمودولین، (Calmodulin) و اکسیژن مولکولی نیاز دارد (۱۶،۱۷). NOS دارای سه ایزوفرم بوده که توسط ژنهای متفاوتی بیان می‌شوند. ایزوفرم بافت عصبی (nNOS) و ایزوفرم اندوتلیال عروق (eNOS) که هر دو وابسته به یون کلسیم و کالمودولین بوده، ایزوفرم سوم که غیر وابسته به کلسیم و کالمودولین بوده، قابل القاء (iNOS) می‌باشد (۱۶). علی‌رغم اثرات مفید NO، تولید بیش از حد NO به علت تولید گونه‌های

## بحث

در حال حاضر سرطان معده، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها و دومین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان می‌باشد. به دلیل پیش‌آگاهی ضعیف، این سرطان در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود و هم‌چنین به دلیل ناکارآمدی درمان‌های متداول، اکثر بیماران حتی پس از جراحی، دارای بقاء پنج ساله پایینی بوده و فوت می‌کنند (۱۱). تولید iNOS توسط LPS، IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ )، TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )، PAF (Platelet-activating Factor)، GM-CSF (Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor)، IL-1 (Interleukin-1) و IL-6 فرا تنظیم می‌شود (۱۲). آنزیم iNOS و mRNA مربوط به آن بسیار پایدار می‌باشند و به همین دلیل قادر به تولید مقادیر زیاد NO در طی چندین روز می‌باشند که منجر به تولید میزان زیادی از گونه‌های فعال نیتروژن اکسید (Reactive Nitrogen Oxide Species) =RNOS می‌گردد، که واسطه طیف گسترده‌ای از تأثیرات فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک می‌باشد (۱۳). نیتریک اکسید

IVS15 در NOS3 و ژن IVS20+, IVS16+88T>G524 8-G>T63, IVS7 -A>G26, 7Ex-C>T43, 62G>T GT/TT, NOS288 نشان داد که در IVS16+ که با افزایش خطر سرطان پروستات و IVS20+524G>A با کاهش خطر سرطان پروستات همراه است. و در NOS3, IVS7-26GG, NOS3 با افزایش خطر سرطان در ارتباط است، و همه این SNPها ارتباط معنی‌داری با سرطان تهاجمی دارند (مرحله III-IV) ولی با سرطان غیر تهاجمی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. نتایج آن‌ها نشان داد که پلی‌مورفیسم ژن NOS از عوامل مهم ژنتیکی برای سرطان مهاجم پروستات می‌باشد (۲۵). در سال ۲۰۱۰ توسط جورج و همکاران بررسی پلی‌مورفیسم این ژن در نقاط آگزون ۱۶ (تبدیل سرین به لوسین در جایگاه ۶۰۸) و (۹۵۴G/C و ۱۱۷۳ C/T) - که هر دو در پروموتور قرار دارند با روش PCR-RLFP مورد بررسی قرار گرفته و در جمعیت مورد مطالعه، مشاهده شد که SNP در جایگاه‌های ۹۵۴ (آگزون ۱۶) و ۱۱۷۳ (پروموتور) مشاهده نشد. بنابراین هیچ ارتباطی با گاستریت و سرطان معده ندارند. ولی جهشی را در جایگاه ۹۵۴ G/C - مشاهده کردند که ارتباط معنی‌داری با سرطان معده همراه با مصرف الکل و دخانیات دارد و این اولین گزارش از افزایش خطر مبتلا به سرطان معده در این جایگاه می‌باشد (۲۶). در سال ۲۰۰۶ گوتو و همکاران در بررسی دیگر با روش PCR-RLFP نشان دادند که پلی‌مورفیسم ژن نیتریک اکسید القایی (iNOS) در موقعیت T150C در آتروفی معده و سرولوژی هلیکوباکتر هیچ وابستگی وجود ندارد، اما پلی‌مورفیسم در این جایگاه، در سرطان معده که مرتبط به هلیکوباکتر پیلوری است مشاهده شده است و ارتباط معنی‌داری با آن دارد (۲۷). در سال ۲۰۱۱ توسط ژانگ و همکاران مطالعه‌ای در رابطه با افراد مبتلا به سرطان ریه (NSCLC) که به وسیله شیمی‌درمانی و رادیو تراپی تحت درمان بودند، بین سال‌های ۲۰۱۱ - ۲۰۰۹ و آنالیزهای ژنوتیپ ۳۶ تا SNP (۲۱) مورد در NOS2A، ۱۴ مورد در NOS3) در هر فرد بیمار به وسیله استفاده از سیستم Sequenom Mass Array انجام شد و نتایج حاصل نشان داد

اکسیژن فعال (ROS)، نیتروژن فعال (RNS) و نیتروزیلاسیون پروتئین‌ها، دارای اثرات سمی می‌باشد (۱۸). NO قادر به عبور از غشای سلولی و طی مسافت‌های طولانی بوده، از این رو، باید تولید آن تحت کنترل باشد (۱۹). نیتریک‌اکسید سنتتاز القایی (iNOS) توسط ژن نیتریک‌اکسید سنتتاز ۲ (NOS2) در تعدادی از انواع سلول بعد از تحریک به واسطه سایتوکین‌های التهابی و ایمنی و هم‌چنین رادیکال‌های تولید شده در مراحل اولیه آپتوزیس و نکروز لیپولی ساکارید (LPS) بیان می‌شود. بنابراین پلی‌مورفیسم ژن‌هایی که در پاسخ التهابی دخیل هستند مانند نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) در سرطان‌زایی معده نقش دارند (۲۰، ۲۱). طبق مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ توسط یو و همکاران ارتباط پلی‌مورفیسم بین NOS2 و BPH مورد بررسی قرار گرفت و سه نوع SNP در ژن NOS2 که شامل ۲۷۸T/C - که در پروموتور قرار دارد و rs10459953 (5' UTR) و آگزون ۱۶ (تبدیل لوسین به سرین) با روش PCR-RLFP مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده کردند که تنها SNP در rs10459953s در ارتباط با BPH است (۲۲). در سال ۲۰۰۵ توسط فرانس و همکاران افزایش بیان آنزیم NOS2 در سرطان روده بزرگ مشاهده شده است در نتیجه بررسی پلی‌مورفیسم در پروموتور NOS2 ممکن است در توسعه و پیشرفت سرطان روده بزرگ نقش داشته باشد و با استفاده از روش PCR-RLFP نتیجه گرفتند که پلی‌مورفیسم در پروموتور NOS2 اثر محدود در شروع یا پیشرفت سرطان روده بزرگ دارد (۲۳). در سال ۲۰۱۱ توسط ریک و همکاران پلی‌مورفیسم Ser608Leu در نیتریک‌اکسید سنتتاز القایی و ژنوتیپ‌ها با ترکیبی از اطلاعات مربوط به مرحله تومور، درجه، مرحله پیشرفت، در بیماران مبتلا به سرطان مثانه بواسطه تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که برای پلی‌مورفیسم Ser608Leu، هموزیگوت TT خطر ابتلا به سرطان معده را سه برابر بیشتر می‌کند و تهاجم این بیماری را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۴). در سال ۲۰۰۹ توسط لی و همکاران بررسی ارتباط سرطان پروستات با ژن NOS2A در جایگاه Ex16 C>A, 2892T>G, +14C>T Ex16



پلی‌مورفیسم این ژن نداشتند و نتایج ناهمسو با مطالعه حاضر بودند.

### نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که پلی‌مورفیسم نیتریک اکسید سنتاز ۲ با افزایش شانس سرطان معده در گروه بیمار نسبت به کنترل در ارتباط می‌باشد و در توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم مورد نظر ژن NOS2 بین دو گروه کنترل و بیمار وجود دارد و پس از بررسی ارتباط تک تک ژنوتیپ‌ها با بیماری آدنوکارسینوما مشخص شد که تعداد آلل C با نسبت شانس سرطان همبستگی مستقیمی دارد به عبارتی افزایش تعداد آلل C در ژنوتایب منجر به افزایش نسبت شانس بیماری سرطان در گروه بیمار نسبت به کنترل می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌شود که پلی‌مورفیسم ژن نیتریک اکسید سنتاز ۲ ممکن است یک مارکر مفید در تعیین حساسیت ژنتیکی به سرطان معده باشد.

### محدودیت‌های مطالعه و پیشنهادات

از محدودیت‌های مطالعه تعداد بیماران و افراد کنترل بوده است که در بازه زمانی محدود تعداد قابل قبول که کاملاً براساس حجم نمونه محاسبه شده باشد ممکن نبوده است. برای تکمیل مطالعه پیشنهاد می‌شود در حجم بالاتر از نمونه ارتباط این پلی‌مورفیسم با داده‌های دموگرافیک از جمله سن و جنس و گرید تومور بررسی شود.

### سپاس‌گزاری

این مطالعه حاصل پایان‌نامه دانشجوی داروسازی خانم مهشاد هوشیار می‌باشد

**حامی مالی:** معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران

**تعارض در منافع:** وجود ندارد.

که تغییرات ژنتیکی در ژن NOS2A و NOS3 در بیماران NSCLC در پاسخ آنها به درمان رایو درمانی و شیمی درمانی تحت تاثیر قرار نمی‌دهد (۲۸). التهاب مزمن، یک عامل خطر برای سرطان روده بزرگ است و در سال ۲۰۰۵ دیکن و همکاران SNP در ژن‌های التهابی از جمله جایگاه  $C>T524+$  در NOS2A مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که هیچ ارتباط معنی‌داری بین SNP مورد بررسی و سرطان روده بزرگ وجود ندارد (۲۹). در سال ۲۰۰۷ توسط کایس و همکاران پلی‌مورفیسم در پروموتور iNOS (تکرار پلی‌مورفیسم CCTTT و SNP  $C\rightarrow G-2445$ ) و ارتباط آن با سطح بیان mRNA نیتریک اکسید سنتاز القایی در موکوس معده و خطر ابتلا به سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون چند متغیره نشان داد که تکرار طولانی CCTTT نسبت به تکرار کوتاه باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان معده می‌شود، اما ارتباطی بین SNP در  $C\rightarrow G-2445$  و سرطان معده نشان داده نشد (۳۰). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ بیان شد که در بسیاری از تومورها بیان iNOS زیاد است اما نقش iNOS در طی رشد و توسعه تومور متفاوت است که در برخی مواقع تشدید و در برخی مواقع مهار فعالیت آن گزارش شده است (۳۱). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ توسط Avtandilyan N به بررسی NOS و آرژینین در کانسر پستان پرداخته شد و نتایج نشان که سطح فعالیت آرژیناز و NO و فعالیت NOS و مقادیر پلی‌آمین‌ها به موازات گسترش کانسر افزایش می‌یابد و بعد از کموتراپی نئوادجوانت کاهش می‌یابد و پیشنهاد شده که مهار NOS اثرات آنتی تومور دارد و باعث کاهش پرولیفراسیون سلولی، متاستاز و آنژیوژنیز می‌گردد (۳۲). در سال ۲۰۰۸ توسط عبد نیک‌فرجام و همکاران مطالعه‌ای در رابطه با پلی‌مورفیسم ژن NOS2A و بیماری آرتریت روماتوئید انجام گرفت که ارتباط معنی‌داری با پلی‌مورفیسم این ژن نداشت (۱۲). شماره رفرنس در جلوی اسامی آورده شود و رفرنس در انتهای متن ذکر گردد صورت گرفت ارتباط معنی‌داری با

## References:

- 1- Holbrook JD, Parker JS, Gallagher KT, Halsey WS, Hughes AM, Weigman VJ, et al. *Deep Sequencing of Gastric Carcinoma Reveals Somatic Mutations Relevant to Personalized Medicine*. J Trans Med 2011; 9(1):119.
- 2- Bernini M, Barbi S, Roviello F, Scarpa A, Moore P, Pedrazzani C, et al. *Family History of Gastric Cancer: A Correlation between Epidemiologic Findings and Clinical Data*. Gastric Cancer 2006; 9(1): 9-13.
- 3- Siewert JR, Maruyama K. "What's New in Gastric Cancer?"—Introduction. World J Surg 1995; 19(4): 483.
- 4- Zeraati H, Mahmoudi M, Mohammad K, Kazemnejad A, Mohagheghi MA, Mir MR. *Postoperative Survival in Gastric Cancer Patients and its Related Factors*. J School of Public Health and Institute of Public Health Research 2005; 3(4): 1-2.
- 5- Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. *Gastric Cancer in Iran: Epidemiology and Risk Factors*. Arch Iran Med 2009; 12(6): 576-83.
- 6- Rejali L, Hasanzad M, Hassani M, Reza M, Fathi M, Sarzaeim MR, et al. *Analysis of Endothelial Nitric Oxide Synthase (Enos) Gene Polymorphism Glu 298 Asp as a Risk Factor of Coronary Artery Disease in a Sample of Iranian Population*. Medical Science 2012; 22(2): 116-21.
- 7- Ying L, Hofseth LJ. *An Emerging Role for Endothelial Nitric Oxide Synthase in Chronic Inflammation and Cancer*. Cancer Research 2007; 67: 1407-10.
- 8-Batra J, Chatterjee R, Ghosh B. *Inducible Nitric Oxide Synthase (Inos): Role in Asthma Pathogenesis*. Indian J Biochemistry & Biophysics 2007; 44: 303-5.
- 9-Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. *Nitric Oxide and Tissue Destruction*. Oral Diseases 2001; 7(1): 2-10.
- 10-Tripathi P. *Nitric Oxide and Immune Response*. Indian J Biochemistry & Biophysics 2007; 44(5): 310-19.
- 11-Zhang L, Hou YH, Wu K, Zhai JS, Lin N. *Proteomic Analysis Reveals Molecular Biological Details In Varioliform Gastritis Without Helicobacter Pylori Infection*. World J Gastroenterol 2010; 16(29): 3664-73.
- 12-Abd Nikfarjam B, Amirghofran Z, Kamali E. *NOS2A Gene Polymorphism and its Association with Nitric Oxide Production in Peripheral Blood Leukocytes of Normal Individuals*. Modares J Medical Sciences: Pathobiology 2008; 10(3-4): 41-50.
- 13-Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. *Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Diseases*. Molecular Medicine 2000; 6(5): 347-73.
- 14-Choi WS, Chang MS, Han JW, Hong SY, Lee HW. *Identification of Nitric Oxide Synthase Instaphylococcus Aureus*. Biochem Biophys Res Commun 1997; 237(3): 554-8.
- 15-Lokhande PD, Kuchekar BS, Chabukswar AR, Jagdale SC. *Nitric Oxide: Role in Biological System*. Asian J. Biochem 2006; 1:1-7.
- 16-Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. *Macrophage Nitric Oxide Synthase Subunits*.



- Purification, Characterization, and Role of Prosthetic Groups and Substrate in Regulating their Association into a Dimeric Enzyme.* J Biological Chemistry 1993; 268(28): 21120-9.
- 17-Herrero MB, Gagnon C. *Nitric Oxide: A Novel Mediator of Sperm Function.* J Andrology 2001; 22(3): 349-56.
- 18-Bredt DS. *Nitric Oxide Signaling Specificity—the Heart of the Problem.* J Cell Science 2003; 116(1): 9-15.
- 19-Papi S, Ahmadizar F, Hasanvand A. *The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress.* Immunopathol Persa 2019; 5(1): e08.
- 20-Roshanaei G, Kazemnejad A, Sadighi S. *Assessment of Risk Factors Affecting Recurrence of Patients with Gastric Cancer in the Presence of Informative Censoring in Iran.* Asian Pac J Cancer Prev 2012; 12: 2443-6.
- 21-Tepes B. *Can Gastric Cancer Be Prevented?* J Physiol Pharmacol 2009; 60(Suppl 7): 71-5.
- 22-Yoo KH, Kim SK, Chung JH, Chang SG. *Nitric Oxide Synthase 2 Gene Polymorphisms are Associated with Prostatic Volume in Korean Men with Benign Prostatic Hyperplasia.* Asian J Androl. 2010; 12(5): 690.
- 23-Fransén K, Elander N, Söderkvist P. *Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2) Promoter Polymorphisms in Colorectal Cancer.* Cancer Letters 2005; 225(1): 99-103.
- 19-Ryk C, Wiklund NP, Nyberg T, De Verdier PJ. *Ser608Leu Polymorphisms in the Nitric Oxide Synthase-2 Gene May Influence Urinary Bladder Cancer Pathogenesis.* Scandinavian J Urology and Nephrology 2011; 45(5): 319-25.
- 20-Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, et al. *Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Prostate Cancer Risk.* Carcinogenesis 2009; 30(4): 621-5.
- 21-Jorge YC, Duarte MC, Silva AE. *Gastric Cancer is Associated with NOS2-954G/C Polymorphism and Environmental Factors in a Brazilian Population.* BMC Gastroenterology 2010; 10: 1-5.
- 22- Goto Y, Ando T, Naito M, Goto H, Hamajima N. *Inducible Nitric Oxide Synthase Polymorphism is Associated with the Increased Risk of Differentiated Gastric Cancer in a Japanese Population.* World J Gastroenterology 2006; 12(39): 6361-65.
- 23-Zhang J, Li BS, Zhou CC, Yu HY, Ding XP, Sun MP, et al. *Single Nucleotide Polymorphisms in NOS2A and NOS3 Genes are Not Associated with Treatment Response of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Following the Definitive Radiochemotherapy.* Neoplasma 2011; 59(6): 631-40.
- 24-Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. *Gastric Adenocarcinoma: Review and Considerations for Future Directions.* Annals of Surgery 2005; 241(1): 27-39.
- 25-Kaise M, Miwa J, Suzuki N, Mishiro S, Ohta Y, Yamasaki T, Tajiri H. *Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Promoter Polymorphism is Associated with Increased Gastric Mrna Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Increased Risk of Gastric Carcinoma.* European J Gastroenterology & Hepatology 2007; 19(2): 139-45.

- 26-Vannini F, Kashfi K, Nath N. *The Dual Role of Inos in Cancer*. Redox Biol 2015; 6: 334-43.
- 27- Avtandilyan N, Javrushyan H, Petrosyan G, Trchounian A. *the Involvement of Arginase and Nitric Oxide Synthase in Breast Cancer Development: Arginase and NO Synthase as Therapeutic Targets in Cancer*. Biomed Res Int 2018; 30; 2018: 8696923.
- 28- Zhang J, Li BS, Zhou CC, Yu HY, Ding XP, Sun MP, et al. *Single Nucleotide Polymorphisms in NOS2A And NOS3 Genes Are Not Associated With Treatment Response Of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Following The Definitive Radiochemotherapy*. Neoplasma 2011; 59(6): 631-40.
- 29-Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. *Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions*. Annals of Surgery 2005; 241(1): 27-39.
- 30-Kaise M, Miwa J, Suzuki N, Mishiro S, Ohta Y, Yamasaki T, Tajiri H. *Inducible nitric oxide synthase gene promoter polymorphism is associated with increased gastric mRNA expression of inducible nitric oxide synthase and increased risk of gastric carcinoma*. European journal of Gastroenterology & Hepatology 2007; 19(2): 139-45.
- 31-Vannini F, Kashfi K, Nath N. *The dual role of iNOS in cancer*. Redox Biol 2015; 6: 334-343.
- 32-Avtandilyan N, Javrushyan H, Petrosyan G, Trchounian A *the Involvement of Arginase and Nitric Oxide Synthase in Breast Cancer Development: Arginase and NO Synthase as Therapeutic Targets in Cancer*. Biomed Res Int. 2018; 30; 2018: 8696923.

## Evaluation of NOS2 Polymorphism in Gastric Adenocarcinoma Patients in Mazandaran Province

Mahshad Hooshyar<sup>1</sup>, Saeed Abedian-Kenari<sup>2</sup>, Abbas Mohammadpour<sup>3</sup>,  
Habibeh Mirmajidi<sup>4</sup>, Majid Jafari-Sabet<sup>5</sup>, Ramin Atae<sup>6,7\*</sup>

### Original Article

**Introduction:** Gastric cancer is the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer death worldwide. North of Iran is a high-risk area for gastric cancer. Nitric oxide (NO), mainly synthesized by inducible nitric oxide synthase (NOS2) in pathological conditions, plays an important role in cytotoxicity, inflammation and fibrosis. In this research we studied the effect of (rs1137933) T>C genotype on gastric cancer.

**Methods:** This analysis was performed on 93 patients with gastric cancer who were referred to endoscopy Tuba Clinic in 2015 and 93 healthy individuals as controls. DNA extracted from peripheral blood samples was applied in PCR-RFLP (Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism) analysis to determine (rs1137933) T>C genotype. The association of the (rs1137933) T>C genotype and gastric cancer risk were analyzed by MedCalc software and (X<sup>2</sup>) Chi-square and (OR) Odds Ratio exams.

**Results:** Frequency of TT, CT, and CC genotypes in cases was 12.61, 51.35 and 36% and 38.7, 34.4, and 26.8% in the control group. Significant association was found between (rs1137933) T>C genotype with gastric cancer chance,  $P < 0.05$ , OR=2/04, 95% CI (1/37 to 3/03).

**Conclusion:** The results of the study show that the presence of CC+CT genotypes may increase the risk of gastric cancer.  $P < 0.0001$ , OR=4.37 (2.17 to 8.80). Therefore, investigating the (rs1137933) T>C single nucleotide polymorphism of NOS2 gene could be an appropriate molecular marker that could be used to determine individual sensitivity to gastric cancer and for designing cancer prevention programs.

**Keywords:** NOS2, Gastric cancer, PCR-RFLP, Polymorphism.

**Citation:** Hooshyar M, Abedian-Kenari S, Mohammadpour A, Mirmajidi H, Jafari-Sabet M, Atae R. Evaluation of NOS2 Polymorphism in Gastric Adenocarcinoma Patients in Mazandaran Province. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 29(6): 3843-53.

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

<sup>2</sup>Immunogenic Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

<sup>3</sup>Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

<sup>4</sup>Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Medical Sciences and Technology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>6</sup>Thalassemia Research Center (TRC), Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

<sup>7</sup>Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 0911 323 2804, email: raminataee1349@gmail.com