

کاهش میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ در اثر حضور و افزایش تک بازگوانین در توالی پرموتور ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ (در جمعیت تهران)

دکتر مجید متولی باشی^{۱*}، فاطمه کوه کن^۲، دکتر زهره جنتی^۳

چکیده

مقدمه: افزایش یا کاهش یک نوکلئوتید گوانین در ناحیه ۱۶۰۷- پرموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ باعث ایجاد به ترتیب دو نوع آلل ۲G و ۱G برای ژن مذکور در جمعیت می گردد. آلل ۲G واجد یک جایگاه اتصال اضافی نسبت به آلل ۱G جهت اتصال اعضای فاکتورهای رونویسی خانواده ETS می باشد که می تواند به افزایش بیان ژن مذکور منجر گردد. از این رو هدف از مطالعه حاضر ارزیابی نقش تنوع ژنتیکی افزایش نوکلئوتید مذکور با میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ و همچنین فعالیت مهاجرتی سلول های سرطانی می باشد.

روش بررسی: نمونه خون ۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ و ۱۰۰ نمونه کنترل جمع آوری گردید. بیماران به مدت میانگین ۲۵ ماه تحت پیگیری و مراقبت قرار گرفتند (۱۲ تا ۳۶ ماه). DNA استخراج شده از نمونه های خون با روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند.

نتایج: بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال به دو گروه متاستازی (M+) و گروه بدون متاستاز (M-) تقسیم شدند. آلل ۲G در گروه متاستازی (۵۵٪) در مقایسه با گروه کنترل (۲۳٪) فراوانی بیشتری نشان داد. آنالیزهای میزان بقا مشخص کرد که میزان بقای کلی ۳ ساله برای بیماران غیرمتاستازی (M-) واجد ژنوتیپ های هموزیگوت و هتروزیگوت ۱G برابر با ۸۱٪ و برای افراد هموزیگوت ۲G برابر با ۶۶٪ می باشد (P=۰/۰۴). میزان بقای وابسته به سرطان به ترتیب برابر با ۹۰٪ و ۷۱٪ (P=۰/۰۱) و میزان بقای بدون ظهور بیماری نیز به ترتیب برابر با ۷۳٪ و ۵۲٪ (P=۰/۰۰۱) به دست آمد.

نتیجه گیری: مطابق نتایج به دست آمده افراد واجد ژنوتیپ های دارای حداقل یک آلل ۱G، میزان بقای وابسته به سرطان بیشتری نسبت به افراد فاقد این آلل از خود نشان می دهند.

واژه های کلیدی: سرطان روده بزرگ، متاستاز، عود مجدد بیماری، آنالیزهای بقا

مقدمه

سرطان روده بزرگ، سومین عامل رایج مرگ های وابسته به سرطان در سراسر دنیا، در اثر رشد کنترل نشده لایه داخلی اندام های

کلون و رکتوم ایجاد می گردد و یکی از سرطان های شایع در زنان و مردان است (۱). در زمان تشخیص معمولاً این سرطان در ۵۴٪ موارد تنها به کلون و رکتوم محدود (Ducks A و B) و در ۴۶٪ موارد باقیمانده متاستاز به لنف، کبد و یا ارگانهای دیگر مشاهده می شود (Ducks C و D) (۲،۳). جراحی توده سرطانی ساکن به منظور درمان سرطان روده بزرگ می تواند تا حدودی مؤثر واقع شود. اما متأسفانه علی رغم حضور تکنیک های پیشرفته جراحی،

* نویسنده مسئول: استادیار بخش ژنتیک گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۷۴
نمبر: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۵۶

Email: mbashi@sci.ui.ac.ir

۳- کارشناسی ارشد ژنتیک - بخش ژنتیک گروه زیست شناسی

۲- استادیار بخش ژنتیک گروه زیست شناسی

۱-۳- دانشگاه اصفهان - دانشکده علوم

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۷/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱/۲۰

راديو تراپی و فاکتورهای شیمی درمانی در درمان سرطان روده بزرگ، هنوز جلوگیری و مبارزه با گسترش متاستاز این سرطان به عنوان مشکل اساسی باقیمانده است و اغلب بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ سرانجام در اثر گسترش متاستازی می‌میرند. با توجه به این امر، به نظر می‌رسد که شناسایی افراد باپتانسیل رشد و گسترش متاستازی جهت جلوگیری از گسترش سرطان امری حیاتی و ضروری در تشخیص زود هنگام و به موقع افراد مستعد جهت درمان و پیشگیری متاستاز محسوب گردد (۲،۴).

متاستاز فرآیند پیچیده‌ای است که طی آن سلول‌های توموری از تومور اولیه فرار نموده و با تخریب بافتهای احاطه کننده به رگها وارد می‌شوند و در نهایت در محل دیگری از خلال سلولهای اندوتلیالی عبور نموده و با رشد در ارگان جدید ایجاد تومورهای ثانویه می‌کنند (۵،۶،۷). در این فرآیند پیچیده آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ (Matrix Metalloproteinase-1) نقش مهمی می‌تواند ایفا کند (۸-۱۱). آنزیم مذکور قادر است ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه را هضم نماید و بنابراین باعث سهولت نفوذ سلول‌های توموری از غشای پایه و تجمع در ارگان‌های دیگر گردد (۶،۱۲،۱۳،۱۴). آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ توانایی تخریب ترکیبات عمده استرومای بینایی (به طور ویژه کلاژنهای نوع I، II و III) را دارا می‌باشد (۱۵). به طور معمول بیان این آنزیم در اغلب سلول‌ها پایین است اما به سرعت توسط فاکتورهای رشد، سیتوکین‌های التهابی و ... افزایش می‌یابد (۱۶،۱۳،۱۸،۱۷).

در برخی از شرایط پاتولوژیک، بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در نتیجه القاء مداوم تحریکات خارجی مانند شرایط ایجاد شده در آرتريت روماتوئید و آرترواسکلروزیس، یا در اثر بیان پایدار به علت یک موتاسیون فعال کننده در منطقه تنظیمی آن، افزایش می‌یابد. لذا، سطح بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ و بنابراین پتانسیل آن در هضم بافت پیوندی می‌تواند تحت تأثیر یک وارسته ژنتیکی در پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ قرار بگیرد (۱۹).

در سال ۱۹۹۸، شخصی به نام Rutter نشان داد که یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱، می‌تواند فعالیت رونویسی آن را متأثر سازد. در

واقع دخول یک باز گوانین در موقعیت ۱۶۰۷- جفت بازی پروموتور که پلی مورفیسم ۲G نامیده می‌شود، یک توالی همسان برای فاکتورهای رونویسی ETS (5'-GGAT-3') ایجاد می‌کند (۱۹). تصور می‌گردد که پلی مورفیسم 2G قادر به افزایش پتانسیل تولید آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ (در پاسخ به شرایط توموری) نسبت به پلی مورفیسم 1G می‌باشد که تنها واجد یک گوانین در این موقعیت بوده و لذا فاقد توالی همسان برای فاکتورهای رونویسی ETS است (5'-GAT-3'). بنابراین پلی مورفیسم ۲G می‌تواند به عنوان یک فاکتور مؤثر تسهیل کننده در رشد و پیشرفت توموری محسوب گردد (۱۹،۲۰). ارتباط بین حضور آلل ۲G در پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در چندین نوع سرطان از جمله سرطان تخمدان (۲۱)، اندومتريال (۲۲) و شش (۵) و همچنین با درجه بدخیمی و متاستاز سرطان‌های مختلفی نظیر سرطان ملانوما (۲۳) نشان داده شده است.

بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تاثیر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی مذکور در ژن MMP-1 بر متاستاز و میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال می‌باشد.

روش بررسی

مقدار ۴ میلی‌لیتر خون وریدی از افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ (۸۱ بیمار مبتلا به سرطان بدون گسترش متاستاز و ۶۹ بیمار مبتلا به سرطان با فعالیت متاستازی) و افراد سالم (۱۰۰ نفر) توسط سرنگ گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد خون، نمونه‌ها بلافاصله به داخل لوله‌های حاوی EDTA منتقل و تکان داده شدند.

نمونه‌های خون افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ بدون گسترش متاستازی از بخش ۱ و ۲ سرطان زنان و مردان بیمارستان امام خمینی تهران و نمونه‌های خون افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ با فعالیت متاستازی از بخش ۳ سرطان زنان و مردان بیمارستان مذکور انتخاب گردیدند. کلیه نمونه‌های خون بین شهریور ۱۳۸۳ تا شهریور ۱۳۸۵ جمع‌آوری گشته و نمونه‌های مورد نظر تا شهریور ۱۳۸۶ تحت نظارت و پیگیری نویسندگان قرار گرفتند. نمونه‌های خون افراد سالم از کلینیک تشخیص طبی مرکزی فردیس تهران تهیه گردید. افراد سالم به نحوی انتخاب گشتند که توزیع سن، جنس و استعمال دخانیات

گردید. آنزیم Alu I آلل 1G را در جایگاه پلی مورفیسم برش می‌دهد، اما در آلل 2G شکستی ایجاد نمی‌کند. پس از الکتروفورز انتظار می‌رود که هموزیگوتهای آلل 1G با دو باند ۲۴۱ و ۲۸ جفت بازی، هموزیگوتهای آلل 2G با تک باند ۲۶۹ جفت بازی و هتروزیگوتهای با ترکیبی از هر ۳ باند مشخص شوند. اما با توجه به اینکه باند ۲۸ جفت بازی کوچکتر از آن است که بر روی ژل آشکار گردد هموزیگوتهای آلل 1G با تک باند ۲۴۱ جفت بازی، هموزیگوتهای آلل 2G با تک باند ۲۶۹ جفت بازی و هتروزیگوتهای با دو باند ۲۴۱ و ۲۶۹ جفت بازی تشخیص داده شدند.

آنالیزهای آماری: آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. در تحقیق حاضر، از آزمون^۲، به منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه‌های مختلف بیماران و افراد کنترل استفاده گردید. نسبت افزایش یافته (OR) با فاصله اطمینان ۹۵٪ درصد برای تخمین ارتباط میان پلی مورفیسم پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ و ریسک رشد و تهاجم روده بزرگ و میزان مرگ و میر این افراد محاسبه گشت. در کلیه محاسبات، سطح احتمال $P < 0.05$ ، از نظر آماری معنی دار فرض گردید.

آنالیزهای بقا: بیماران هر سه ماه یک بار پس از عمل جراحی تحت آزمایشات کلینیکی مورد نیاز قرار گرفتند. اولتراسونوگرافی شکمی هر سه ماه یک بار در بیماران غیر متاستازی انجام گرفت. در طول مدت پیگیری با مراجعه به پرونده‌های پزشکی، آزمایشات انجام شده و مصاحبه با پزشک معالج هر گونه تغییر در وضعیت بیماری و یا بقای بیمار لحاظ گردید. میزان بقای کل: به عنوان مدت زمان بین جراحی تا مرگ به هر دلیل، میزان بقای ویژه سرطان: مدت زمان بین جراحی تا مرگ در اثر سرطان و میزان بقای بدون بیماری: به صورت مدت زمان بین جراحی تا عود مجدد و یا متاستاز تعریف گردید. برای بقای کل، تمام مرگها بدون توجه به دلیل آن منظور گردید و برای بقای ویژه سرطان، تنها مرگهای ناشی از سرطان محاسبه گردیدند.

منحنی‌های بقا با استفاده از روش کاپلان - میر رسم و باتست لاگ-رانک مقایسه گردیدند.

نتایج

فراوانی آللهای 1G و ۲G در جمعیت کنترل به ترتیب برابر با

در گروه مذکور با گروه سرطان روده بزرگ مطابقت داشته باشد. نمونه خون‌های تهیه شده درون ظرف یخ (4° - سانتیگراد) حمل و پس از انتقال به اصفهان تا زمان استفاده در دمای 20° - سانتیگراد نگهداری گردید.

DNA ژنومی نمونه‌های گرفته شده با استفاده از روش نمکی میلر (۲۴) با کمی تغییرات استخراج، با PCR تکثیر و با روش RFLP تعیین ژنوتیپ گشتند.

توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ به صورت زیر می‌باشد:

Forward: 5'-TGACTTTTAAAACATAGICTATGTTCA-3'

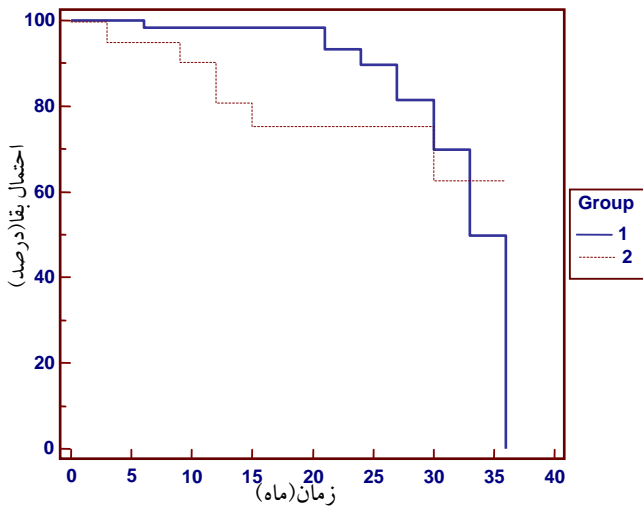
Reverse: 5'-TCTTGGATTGATTGAGATAAGTCATAGC-3'

یک موتاسیون جابجایی باز از T به G (g) در دومین نوکلئوتید مجاور انتهای ۳ پرایمر معکوس ایجاد گردید تا جایگاه شناسایی برای آنزیم محدود کننده Alu I در آلل 1G حاصل شود.

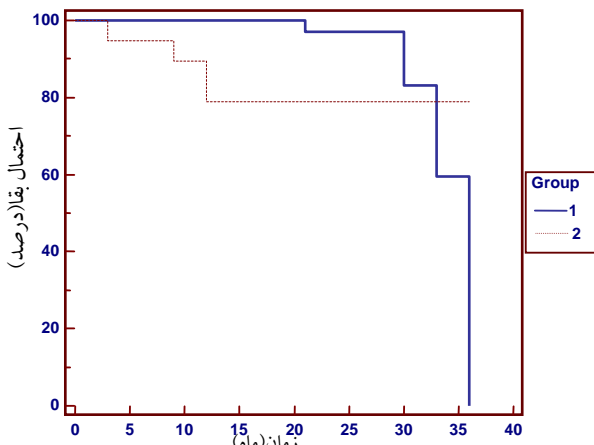
واکنش PCR در حجم ۲۵ μl شامل ۱۰۰ ng از DNA الگو، ۲/۵ μl از بافر PCR 10X، ۲ μl از Mgcl2 و ۲/۵ واحد از DNA پلیمرز Taq (سیناژن، ایران)، ۰/۲ μM از مخلوط dNTP، ۰/۲ μl از پرایمرهای R و F بر طبق زمان بندی زیر صورت گرفت: دمای دناتوره اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه که با ۳۰ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد برای پرایمرهای طراحی شده به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه تکرار گردید. در انتها ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد برای تکمیل فرآیند تکثیر انجام گرفت. پس از انجام تکنیک PCR، برای شناسایی آللهای 1G/2G با استفاده از آنزیم محدود الاثر Alu I محصولات PCR طبق دستور زیر هضم آنزیمی شدند:

در یک ویال حدود ۵-۴ میکروگرم DNA، ۲ میکرولیتر بافر 10X TangoTM و ۰/۵ میکرولیتر محلول شامل ۵ واحد آنزیم محدود الاثر (سیناژن، ایران) ریخته شد و حجم کلی با آب مقطر دوبار استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس ویال حاوی مخلوط واکنش به مدت ۶-۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن ماری قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل، انجام گیرد. محصول هضم آنزیمی توسط الکتروفورز ۳ درصد آگارز، بررسی

در آنالیز دیگر، به منظور بررسی دقیق نقش ژنوتیپ هموزیگوت ۲G در متاستاز و میزان بقای بیماران، مطالعات بقا پس از گروه بندی بیماران غیرمتاستازی در دو گروه واجد حداقل یک آلل ۱G و واجد ژنوتیپ هموزیگوت ۲G انجام گرفت. در زمان آخرین پیگیری، ۳۷ بیمار بدون هیچ نشانه‌ای از بیماری زنده بودند؛ ۲۶ بیمار با وجود برگشت بیماری زنده بودند؛ ۱۲ بیمار دچار مرگ ناشی از بیماری شده بودند و ۶ بیمار به دلایل دیگری غیر از بیماری فوت کرده بودند.



نمودار ۱: مقایسه گروه های ژنوتیپی ۱ و ۲ توسط نمودار کاپلان-میر گویای تفاوت آماری معنی داری در میزان بقای کلی ۳ ساله افراد بیمار واجد سرطان روده بزرگ می باشد (تست لاگ-رانک: $P=0/04$).
گروه ۱: ۱G/۱G + ۱G/۲G گروه ۲: ۲G/۲G



نمودار ۲: مقایسه گروه های ژنوتیپی ۱ و ۲ توسط نمودار کاپلان-میر گویای تفاوت آماری معنی داری در میزان بقای وابسته به سرطان روده بزرگ در بین افراد بیمار میباشد (تست لاگ-رانک: $P=0/01$).
گروه ۱: ۱G/۱G + ۱G/۲G گروه ۲: ۲G/۲G

۵۳٪ و ۴۷٪ و در جمعیت بیمار به ترتیب برابر با ۴۰٪ و ۶۰٪ می باشد. فراوانی آلل ۲G در جمعیت بیمار نسبت به جمعیت کنترل، افزایش قابل توجهی نشان می دهد ($\chi^2=7/76$ و $P=0/01$). فراوانی ژنوتیپ های ۱G/۱G، ۱G/۲G و ۲G/۲G در جمعیت بیمار به ترتیب برابر با ۲۰٪، ۴۱٪ و ۳۹٪ و در جمعیت کنترل برابر با ۲۹٪، ۴۸٪ و ۲۳٪ به دست آمد. مطابق نتایج، توزیع آللی و توزیع ژنوتیپی در دو جمعیت بیمار و کنترل تفاوت آماری معنی داری نشان می دهد (جدول ۱، $\chi^2=7/76$ ، $P=0/01$ و $\chi^2=7/67$ ، $P=0/02$). در مرحله بعد ارتباط و پیوستگی گروه های ژنوتیپی در دو جمعیت مقایسه گردید: ژنوتیپ ۱G/۲G نسبت به ۱G/۱G به عنوان مرجع، ارتباط آماری معنی داری با جمعیت های بیمار و کنترل نشان نداد، لذا گروه ژنوتیپی مذکور همراه با گروه ژنوتیپی ۱G/۱G به عنوان یک مرجع واحد در نظر گرفته شده و ارتباط ژنوتیپ ۲G/۲G با جمعیت های مورد مطالعه نسبت به این گروه ژنوتیپی مرجع سنجیده شد.

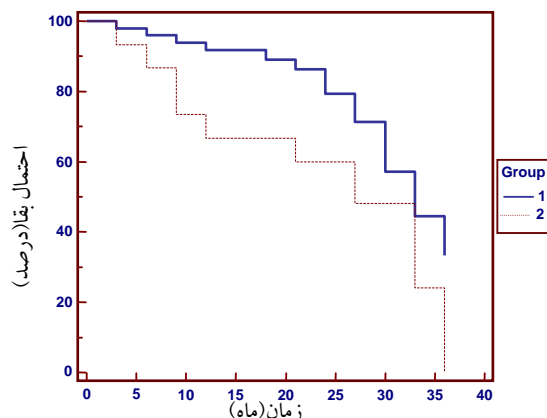
مطابق جدول ۲ ژنوتیپ هموزیگوت ۲G در مقایسه با ژنوتیپ های دارای حداقل یک آلل ۱G، ارتباط آماری معنی داری با جمعیت بیماران نشان دادند ($OR=2/17$ و $95\% CI = 1/23-3/83$).

جهت انجام مطالعات تکمیلی بیماران بر مبنای حضور یا عدم حضور متاستاز به دو گروه متاستازی (M+) و غیرمتاستازی (M-) تقسیم گشتند. مطالعات نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت ۲G در گروه متاستازی، به طور چشمگیری، در مقایسه با گروه غیرمتاستازی و همچنین گروه کنترل بیشتر است (به ترتیب: ۵۵٪ در مقابل ۲۶٪ و ۲۳٪). در مقابل، این فراوانی در گروه غیرمتاستازی، در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری فاحشی نشان نمی دهد (۲۶٪ در مقابل ۲۳٪، جدول ۱). در ادامه به منظور بررسی تاثیر ژنوتیپ هموزیگوت ۲G در مرحله شروع و متاستاز سرطان روده بزرگ، توزیع ژنوتیپی در گروه M+ و M- با گروه کنترل مقایسه گردید. قیاس گروه های ژنوتیپی، در گروه M- و کنترل تفاوت آماری فاحشی نشان نمی دهد ($95\% CI = 0/59-2/31$) و $OR=1/17$ ، اما مقایسه ژنوتیپ هموزیگوت ۲G در گروه M+ و کنترل، دخالت مستقیم ژنوتیپ مذکور را در مرحله متاستاز مشهود می سازد ($95\% CI = 2/11-7/97$ ، $OR=4/10$) (جدول ۲).

آلل ۱G برابر با ۱۸٪ و برای بیماران هموزیگوت ۲G ۲۸٪ محاسبه گردید. میزان متاستاز برای بیماران واجد ژنوتیپ دارای حداقل یک آلل ۱G و بیماران هموزیگوت ۲G به ترتیب برابر با ۸٪ و ۱۹٪ به دست آمد. در مجموع میزان بقای بدون بیماری برای افراد واجد ژنوتیپ هموزیگوت ۲G برابر با ۵۲٪ است که در افراد واجد ژنوتیپهای دارای حداقل یک آلل ۱G به ۷۳٪ می‌رسد.

میزان بقای ویژه سرطان نیز در بیماران واجد ژنوتیپ دارای حداقل یک آلل ۱G و بیماران هموزیگوت ۲G به ترتیب ۹۰٪ و ۷۱٪ محاسبه گردید.

با توجه به نتایج به دست آمده در جدول ۳ می‌توان گفت تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های واجد یک آلل ۱G و گروه هموزیگوت ۲G در هر سه فاکتور میزان بقای کل (شکل ۱)، تست لاگ-رانک: $P=0/04$ ، میزان بقای وابسته به سرطان (شکل ۲، تست لاگ-رانک: $P=0/01$) و همچنین برای بقای بدون حضور بیماری (شکل ۳، تست لاگ-رانک: $P=0/001$) وجود دارد.



نمودار ۳: مقایسه گروه‌های ژنوتیپی ۱ و ۲ توسط نمودار کاپلان-میر گویای تفاوت آماری معنی‌داری در میزان بقای بدون حضور بیماری سرطان روده بزرگ در بین افراد بیمار می‌باشد (تست لاگ-رانک: $P=0/001$) گروه ۱: ۱G/۱G+۱G/۲G گروه ۲: ۲G/۲G

میزان بقای کل سه ساله در بیماران واجد ژنوتیپ دارای حداقل یک آلل ۱G برابر با ۸۱٪ بود که این مقدار در افراد هموزیگوت ۲G به ۶۶٪ کاهش نشان داد.

عود منطقه‌ای برای بیماران واجد ژنوتیپ دارای حداقل یک

جدول ۱: توزیع آلی و ژنوتیپی پلی مورفیسم پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ در گروه کنترل و گروههای بیمار سرطان روده بزرگ

فرآوانی	فرآوانی آلی	P(a)	فرآوانی ژنوتیپی	P (b)
ریخته ژنتیکی	G1	۱/۱	۱/۲	۲/۲
کنترل	G2	(/۲۹)	(/۴۸)	(/۲۳)
بیماران (M+&M-)	(/۴۰)	(/۲۰)	(/۴۱)	(/۳۹)
M+	(/۷۰)	(/۱۵)	(/۳۰)	(/۵۵)
-	(/۵۱)	(/۲۵)	(/۴۹)	(/۲۶)

راهنمای ژنوتیپی جدول: $1/1 = 1G/1G$ ، $1/2 = 1G/2G$ ، $2/2 = 2G/2G$

a: ارزش P محاسبه شده از آزمون χ^2 آلی. آلل ۲G در گروه سرطان روده بزرگ و بیماران با فعالیت متاستازی (M+) نسبت به کنترل تفاوت آماری بسیار معنی‌داری را نشان می‌دهد (به ترتیب: $P=0/01$ ، $\chi^2=7/76$ ، $P=0/001$ و $\chi^2=18/02$)؛ فرآوانی آلی ۲G در گروه بیماران بدون فعالیت متاستازی (M-) نسبت به کنترل، تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($P=0/49$ و $\chi^2=0/468$).

b: ارزش P محاسبه شده از آزمون χ^2 ژنوتیپی. توزیع ژنوتیپی در گروه سرطان روده بزرگ و بیماران با فعالیت متاستازی نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری نشان می‌دهد ($P=0/02$ ، $\chi^2=7/67$ ، $P=0/001$ و $\chi^2=18/44$)؛ اما این تفاوت در گروه بیماران بدون فعالیت متاستازی دیده نشد ($P=0/78$ و $\chi^2=0/482$). M+ : گروه بیمار با فعالیت متاستازی -M: گروه بیمار بدون فعالیت متاستازی

جدول ۲: آنالیز ارتباط و پیوستگی پلی مورفیسم پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ در گروه کنترل و گروههای بیمار سرطان روده بزرگ

گروههای ژنوتیپی	کنترل	بیماران (M+&M-)	M+	M-
۱G/۱G+۱G/۲G	۷۷ (۷۷٪)	۸۷ (۵۸٪)	۳۱ (۴۵٪)	۶۰ (۷۴٪)
۲G/۲G	۲۳ (۲۳٪)	۶۳ (۴۲٪)	۳۸ (۵۵٪)	۲۱ (۲۶٪)
ORa	-	۲/۱۷	۴/۱۰	۱/۱۷

a: OR محاسبه شده برای ژنوتیپ ۲G/۲G در برابر ژنوتیپهای ۱G/۱G+۱G/۲G در گروه‌های مختلف بیماران نسبت به گروه کنترل.

جدول ۳: بررسی ارتباط پلی مورفیسم پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ و میزان بقای بیماران

آنالیزهای بقا	ژنوتیپ	n	موارد ابتلا	P (Log-rank test)
میزان بقای کلی	۱G/۱G + ۱G/۲G	۶۰	۱۱ (۱۸٪)	۰/۰۴
	۲G/۲G	۲۱	۷ (۳۳٪)	
a میزان بقای وابسته به سرطان	۱G/۱G + ۱G/۲G	۶۰	۶ (۱۰٪)	۰/۰۱
	۲G/۲G	۲۱	۶ (۲۹٪)	
b میزان بقای بدون بیماری	۱G/۱G + ۱G/۲G	۶۰	۱۶ (۲۷٪)	۰/۰۰۱
	۲G/۲G	۲۱	۱۰ (۴۸٪)	

n: تعداد کل افراد.

a: افراد واجد ژنوتیپ ۲G/۲G نسبت به سایر ژنوتیپها، در معرض خطر فزاینده عود و متاستاز سرطان روده بزرگ قرار دارند (OR = ۲/۵ و ۹۵٪ CI = ۰/۸۹ - ۷/۰).

b: میزان مرگ و میر افراد هموزیگوت ۲G در مقایسه با افراد دیگر بیشتر است (OR = ۳/۵ و ۹۵٪ CI = ۰/۹۷ - ۱۲/۵۶).

بحث

بیان می‌تواند به تولید مقادیر بیشتری از آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ منجر گردد (۲۶).

در مطالعه حاضر بر روی جمعیت تهران، سهم آلل ۲G در بیماران بیشتر از افراد کنترل یافت شد. این یافته، پیشنهاد می‌کند که آلل ۲G می‌تواند در فرآیند سرطان دخیل بوده و لذا افراد حامل آلل مذکور از لحاظ ژنتیکی برای سرطان مستعدتر هستند (مطالعات انجام شده در تحقیق حاضر دخالت آلل ۲G را صرفاً در مرحله متاستاز و نه در شروع سرطان نشان دادند). با توجه به مطالعات ذکر شده، می‌توان استدلال نمود که حضور آلل ۲G به فعالیت بیشتر پروموتور ماتریکس متالوپروتیناز-۱ و در نتیجه افزایش آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ می‌انجامد. افزایش این آنزیم منجر به تخریب فزاینده ماتریکس خارج سلولی و افزایش در رهایش فاکتورهای رشد می‌گردد و لذا می‌تواند سبب سهولت در فرآیند تهاجم و گسترش سرطان روده بزرگ گردد (۲،۳).

به منظور روشن ساختن این ابهام که آلل ۲G دقیقاً در کدام مرحله سرطان (شروع، متاستاز و یا هر دو) نقش مؤثری ایفا می‌کند، در مرحله بعدی مطالعات، بیماران در دو گروه متاستازی و غیرمتاستازی تفکیک گشتند. نتایج نشان دادند که فراوانی آلل ۲G در این دو گروه بسیار باهم متفاوت است. (۷۰٪ در مقابل ۵۱٪). در واقع برخلاف مقایسه گروه غیرمتاستازی و گروه کنترل

تنوعات تک نوکلئوتیدی در توالی ژنومی افراد یک جامعه را پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) می‌نامند. Rutter و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که در اثر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی واجد دو گوانین در موقعیت bp ۱۶۰۷-، یک جایگاه اتصال دیگر برای اعضای خانواده فاکتورهای رونویسی ETS (۳'-GGAT-۵')، در مجاورت جایگاه اتصال AP-1 در موقعیت bp ۱۶۰۲- ایجاد می‌شود. در نتیجه خانواده فاکتورهای رونویسی AP-1 و ETS در تعاون با هم، رونویسی را افزایش داده و لذا SNP ۲G فعالیت رونویسی بیشتری نسبت به SNP ۱G نشان می‌دهد (۱۹،۲۵،۲۶).

از طرفی Kanamori و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Nishioka و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که بافت سرطانی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و اندومتريال که دارای ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت ۲G هستند، دارای مقادیر بیشتری از رونوشت‌های آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ در مقایسه با بیماران فاقد این آلل می‌باشند. مطابق مطالعات Kanamori، میانگین سطح بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ در تومورهای حامل آلل ۲G (۲G/۲G و ۱G/۲G)، ۷ مرتبه بیش از میانگین سطح بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۱ در تومورهای فاقد این آلل (۱G/۱G) است (۲۲،۲۱). در سال ۲۰۰۲، Fujimoto و همکاران، نشان دادند که این افزایش

۵) آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ بارهایش فاکتورهای رشد اسیر شده در ماتریکس خارج سلولی، رشد و رگ‌زایی را جهت متاستاز سلولها مهیا می‌سازد.

لذا، نقش آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در لیز بافت کلاژنی و ایجاد شرایط مناسب برای مهاجرت سلول‌های توموری و دخالت آن در رهایش فاکتورهای رشد مختلف از جمله فاکتورهای رشد دخیل در رگ‌زایی می‌تواند عاملی در توجیه تأثیر افزایش بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در گسترش متاستازی باشد (۳۳،۳۴).

آنالیزهای میزان بقای بدون بروز بیماری نه تنها نقش ژنوتیپ ۲G را در فرآیند متاستاز تأیید نمودند بلکه نشان می‌دهند افراد واجد ژنوتیپ هموزیگوت ۲G با OR برابر با ۲/۵ (۰/۷۱) - ۰/۸۹ (۰/۹۵ CI) و ۲/۵ (OR) در معرض ریسک فرآیندهای برای متاستاز و یا عود بیماری قرار دارند. تصور می‌گردد، تعداد ناچیزی از سلول‌های توموری باقیمانده پس از درمان، می‌تواند به گذشت زمان، رشد و تکثیر یافته و دوباره ایجاد تومور نمایند و یا اینکه در بدن پخش شوند و متاستاز ایجاد کنند. ژنوتیپ هموزیگوت ۲G به علت داشتن فعالیت پروموتوری بیشتر و در نتیجه بیان بیشتر آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱، می‌تواند شرایط را برای رشد مجدد و سریع سلول‌های توموری و پخش و گسترش آنها فراهم سازد (۶). از این رو پیشنهاد می‌شود این افراد پس از درمان تحت نظارت مرتب و دقیق بوده و در فواصل زمانی معین، سطح آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در سرم، پلاسما و یا CSF آنها اندازه‌گیری شود و در صورت لزوم اقدامات مناسب اعمال گردد (۳۳).

از طرفی مطالعات میزان بقای وابسته به سرطان نشان دادند که افراد واجد ژنوتیپ هموزیگوت ۲G نسبت به افراد واجد گروه‌های ژنوتیپی دیگر میزان بقای کمتری دارند و به عبارتی این افراد ۳/۵ (۰/۹۷ - ۱۲/۵۶) (OR) برابر بیشتر از افراد هموزیگوت و هتروزیگوت ۱G در معرض خطر مرگ قرار می‌گیرند که این امر خود می‌تواند از قش ژنوتیپ هموزیگوت ۲G در فرآیند گسترش متاستاز و بدخیمی ناشی گردد.

که تفاوت معنی‌داری در توزیع آلی و ژنوتیپی نشان نمی‌دهند (به ترتیب: $\chi^2 = 0/49$ و $P = 0/78$ و $\chi^2 = 0/48$ و $P = 0/78$)، مقایسه گروه کنترل و گروه متاستازی، از ارتباط و پیوستگی قوی هموزیگوت‌های ۲G در گروه متاستازی خبر می‌دهد (OR=۴/۱۰، ۰/۹۵ CI=۲/۱۱-۷/۹۷). ارتباط فرآیندها مذکور، با مشاهده فراوانی بیشتر آلی ۲G در گروه متاستازی نسبت به گروه غیرمتاستازی و کنترل همخوانی دارد.

عدم وجود تفاوت آماری در فراوانی آلی و توزیع ژنوتیپی گروه کنترل و بیماران سرطانی غیر متاستازی (M-) نشان می‌دهد که آلی ۲G و لذا ژنوتیپ‌های واجد آلی مذکور در شروع فرآیند سرطان دخالت فاحشی ندارند. در مقابل تفاوت محسوس آماری مشاهده شده برای گروه M+ نشان می‌دهد که افزایش بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ بیش از هر چیز، نقش پررنگی در گسترش متاستازی توده سرطانی روده بزرگ برعهده دارد. در واقع می‌توان ادعا نمود نقش مشاهده شده برای آلی ۲G (OR = ۱/۶۷ و ۰/۹۵ CI = ۱/۱۶-۲/۳۹) و ژنوتیپ ۲G/۲G (OR = ۲/۱۷ و ۰/۹۵ CI = ۱/۲۳-۳/۸۳) در سرطان روده بزرگ ناشی از وجود بیماران متاستازی در گروه بیمار بوده و در حقیقت به مرحله متاستاز مربوط می‌باشد.

نقش آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در گسترش متاستاز چند مرحله‌ای و به قرار ذیل می‌باشد (۳۲-۲۷):
۱) آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در رشد اولیه تومور و رگ‌زایی دخیل است.

۲) ماتریکس خارج سلولی سرشار از کلاژن، سدی محکم در برابر عبور سلولها تشکیل می‌دهد. آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ توسط سلول‌های توموری و سلول‌های استرومایی در جواب به تحریکات سیتوکینی و... ترشح می‌گردد و با لیز این سد، سلول‌های توموری را به مهاجرت و حرکت در ماتریکس خارج سلولی و در نتیجه تهاجم قادر می‌سازد.

۳) آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ به ورود و خروج سلول‌های توموری از رگها کمک می‌کند.

۴) مهاجرت سلول‌های توموری به درون ماتریکس خارج سلولی مقصد نیز به فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ نیاز دارد.

نتیجه گیری

یکی از مسایل مهم در درمان سرطان روده بزرگ قدرت تعیین یک فاکتور ارزشمند در مراحل اولیه بیماری برای تشخیص افراد مبتلایی است که در معرض ریسک بالای عود مجدد و متاستاز قرار داشته تا بتوانند از فاکتورهای شیمی درمانی حداکثر استفاده را ببرند. با توجه به اثرات جانبی مضر استفاده از فاکتورهای شیمی درمانی، بیماران اغلب تمایل کمتری به این نوع درمان نشان می دهند و معمولاً افراد مبتلا به متاستاز گره لنفاوی (Ducks C) و همچنین تعداد اندکی از بیماران مرحله Ducks B تحت شیمی درمانی قرار می گیرند. لذا شناسایی افراد در معرض خطر فرآینده عود و متاستاز بیماری در کنترل سرطان روده بزرگ امری حیاتی محسوب

می گردد (۴،۳،۲). از این رو امید است این تکنیک ساده ژنتیکی به تکنیک کارای کلینیکی در شناسایی افراد در معرض ریسک فرآینده رشد، مهاجم و عود مجدد سرطان روده بزرگ تبدیل گردد و به اتخاذ راه درمانی اختصاصی تر به منظور رسیدن به جواب بهتر و اثرات جانبی کمتر به پزشک متخصص یاری رساند.

سپاسگزاری

کلیه مراحل این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک دانشگاه اصفهان انجام گرفته است. لذا از تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت های مالی و همچنین از بیمارستان امام خمینی تهران به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه خون بیماران و اطلاعات پزشکی سپاسگزاریم.

References

- 1- Kemp Z, Thirlwell C, Sieber O, Silver A, Tomlinson L. *An update on the genetics of colorectal cancer*. Hum Mol Genet 2004;13, R177-R185.
- 2- Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozava T, et al. *MMP-1 is a prognostic factor for hematogenous metastasis of colorectal cancer*. oncologist 2000;5:108-14.
- 3- Zucker S, Vacirca J. *Role of matrix metalloproteinase (MMPs) in colorectal cancer*. Cancer Metas Rev 2004;23:101-17.
- 4- Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. *Matrix metalloproteinases-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer*. Nat Med 1996; 2: 461-2.
- 5- Su L, Zhou W, Park S, Wain J, Lynch T, Liu G.

- Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk*. Cancer Epidemiol Prev 2005;14: 567-70.
- 6- John A, Tuszynsky G. *The role of matrix metalloproteinase in tumor angiogenesis and tumor metastasis*. Pathol Oncol Res 2001;1:14-23.
- 7- Demant P. *Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer*. Nat Rev Genet 2003;4:721-34.
- 8- Salo T, Liotta LA, Keski-Oja J, Turpeenniemi-Hujanen T, Tryggvason K. *Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells—role in metastasis*. Int J Cancer 1982; 30:669-73.
- 9- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. *Metastatic potential correlates*

- with enzymatic degradation of basement membrane collagen.* Nature 1980; 284:67-8.
- 10- Liotta LA, Kleinerman J, Catanzaro P, Rynbrandt D. *Degradation of basement membrane by murine tumor cells.* J Nat Cancer Inst 1977; 58:1427-31.
- 11- Chamberlain SH, Hemmer RM, Brinckerhoff CE. *Novel phorbol ester response region in the collagenase promoter binds Fos and Jun.* J Cell Biochem 1993;52:337-51.
- 12- Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. *Matrix metalloproteinases in tumor invasion.* Cell Mol Life Sci 2000; 57:5-15.
- 13- Gross J, Lapiere CM. *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay.* Proc Natl Acad Sci 1962;48: 1014-22.
- 14- Arribas J. *Matrix metalloproteinase and tumor invasion.* Clin. Implication of Basic Res 2005; 19:2020-2.
- 15- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.* Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:207-14.
- 16- Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF. *Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases.* Matrix Suppl 1992;1: 421-4.
- 17- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. *Interstitial collagenase as marker of tumor progression.* Clin. Cancer Res 2000; 6: 4823-30.
- 18- Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H, et al. *A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen.* J Biol Chem 1999;274: 25371-8.
- 19- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, et al. *A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription.* Cancer Res 1998;58:5321-5.
- 20- Wyatt C, Charles I, Coon J, Gibson J, Brinckerhoff, E. *Potential for 2G single nucleotide polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase to enhance gene expression in normal stromal cells.* Cancer Res 2002; 62:7200-2.
- 21- Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, et al. *Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region.* Cancer Res 1999; 59: 4225-7.
- 22- Nishioka Y, Kobayashi K, Sagae S, Ishioka S, Nishikawa A, Matsushima M, et al. *Single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter in endometrial carcinomas.* Jpn J Cancer Res 2000; 91:612-5.
- 23- Ye S, Dhillon S, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM, Pickering RM, et al. *Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism.* Cancer Res 2001; 61:1296-8.
- 24- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nucleic Acids Research 1988; 16: 1215.
- 25- Barchowsky A, Frleta D, Vincenti MP. *Integration of the NF kappa B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts.* Cytokine 2000; 12:1469-79.
- 26- Shan K, Ying W, Jian- Hui Z, Wei G, Wang Na, Yan L. *The function of the SNP in the MMP1 and MMP3 promoter in susceptibility to*

- endometriosis in china*. Mol Hum Reproduction 2005;6: 423-4327.
- 27- White LA, Brinckerhoff CE. *Two activator protein-1 elements in the matrix metalloproteinase-1 promoter have different effects on transcription and bind Jun D, c-Fos, and Fra-2*. Matrix Biol 1995; 14:715-25.
- 28- Visse F, Nagase H. *Structure and function of MMPs and TIMPs*. Circulation Res 2003;92:827-39.
- 29- Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. *Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer*. Oncogene 2002;21: 2245-52.
- 30- Fridman R. *Metalloproteinases and cancer*. Cancer and Metastasis Rev 2006; 25:7-8.
- 31- Riyad B, Abdelbaset B, Raija R, Kari S, Seppo P. *MMP-1 (collagenase-1) expression in primary colorectal cancer and its metastases*. Scandinavian J. of Gastroentero 2007;42:1473-8.
- 32- Rundhaug JE. *Matrix metalloproteinase and angiogenesis*. J Cell Mol Med 2005;9: 267-85.
- 33- Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López C. *Matrix metalloproteinases in cancer: from new function to improved inhibition strategies*. Int J Dev Biol 2004; 48:411-24.
- 34- Charles S. *Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation*. Curr Opin Cell Biol 2003;11:634-40.