Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.9, Dec 2017
Pages: 708-718

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۹، آذر ۱۳۹۶
صفحه: ۷۱۸-۷۰۸

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

بررسی پلی‌مورفیسم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ و استعداد ابتلا به سرطان مثانه

دلارام نیک‌فرجام[۱]، فرزانه تفویضی*[۲]، مسعود صالحی‌پور[۳]

چکیده

مقدمه: ماتریکس متالوپروتئیناز-۱، با تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی نه تنها گسترش سلول‌های سرطانی را تسهیل می‌کند، بلکه با رهایش فاکتورهای رشد و رگ زائی در بقاء و تغذیه سلول‌های سرطانی نیز نقش کلیدی ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه، بررسی پلی‌مورفیسم ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ (MMP-1(-1607 و خطر سرطان مثانه است.

روش بررسی: این تحقیق موردی-شاهدی، شامل ۱۵۷ بیمار مبتلا به سرطان مثانه و ۱۴۳ فرد سالم همسان سازی شده از نظر سنی، می باشد. ابتدا استخراج DNA از خون محیطی و سپس PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه MMP-1 انجام گرفت. جهت بررسی پلی‌مورفیسم (MMP-1(-1607 از روش RFLP استفاده شد.

نتایج: اختلاف معنی‌داری بین فرکانس آللی 1G/1G و 2G/2G دیده نشد (P>۰/۰۵). همچنین ارتباطی بین پلی‌مورفیسم ژنتیکی و استعداد ابتلا به سرطان مثانه مشاهده نشد (OR: 1.23, 95% CI (0.67 – 2.28), P= 0.49).

نتیجه‌گیری: با توجه به عدم ارتباط پلی‌مورفیسم (MMP-1(-1607 و خطر سرطان مثانه، پیشنهاد می شود پلی‌مورفیسم‌های دیگر ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ با خطر سرطان مثانه مورد بررسی قرارگیرند.

واژه‌های کلیدی: سرطان مثانه، ماتریکس متالوپروتئیناز، پلی‌مورفیسم

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد تکوین، گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
*(نویسنده مسئول)؛تلفن: ۰۹۱۲۵۷۰۹۵۳۲ ، پست الکترونیکی: farzanehtafvizi54@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۵

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

مقدمه

سرطان مثانه یازدهمین سرطان شایع از نظر بروز سرطان و چهاردهمین سرطان منجر به مرگ در جهان است (۱). سالانه بیش از ۱۲ میلیون مورد جدید سرطان مثانه در سراسر جهان رخ می‌دهد و سالانه در حدود ۱۴۵۰۰۰ فرد مبتلا به سرطان مثانه در سراسر جهان می‌میرند (۲). سرطان مثانه در کشورهای پیشرفته شایع‌تر از کشورهای در حال پیشرفت است و از رایج‌ترین تومورهای بدخیم در سیستم ادراری است (۳). همچنین دومین تومور دستگاه مجاری ادراری- تناسلی بعد از سرطان پروستات است (۴). شیوع آن در مردان سه برابر زنان است و در سفیدپوستان رایج‌تر است (۵). از مهم‌ترین ریسک فاکتورهایی که در مطالعات مختلف اثر آن‌ها بر سرطان مثانه به اثبات رسیده است می‌توان به مصرف سیگار و مواجهه شغلی با کارسینوژن‌های اوروتلیال اشاره کرد. مصرف سیگار ۲ تا ۴ برابر ریسک سرطان مثانه را افزایش می‌دهد (۳).

کلاژناز فیبروبلاستی یا ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ قادر است کلاژن‌های فیبری و به طور ویژه کلاژن‌های ۱ و ۲ و ۳ که فراوان-ترین پروتئین تشکیل‌دهنده بدن می‌باشند را هضم نماید (۶). ناحیه پروموتوری کلاژناز فیبروبلاستی واجد عناصر تنظیمی حفاظت شده‌ای است که توسط فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و فاکتورهای محیطی کنترل می‌گردد (۷). در شرایط نرمال بیان ژن کلاژناز فیبروبلاستی در بافت‌ها پائین است و تنها زمانی که Extra Cellular Matrix (ECM) نیاز باشد افزایش می‌یابد (۸،۹). در مقابل در بسیاری از انواع تومورها سطح بالایی از کلاژناز فیبروبلاستی بیان می‌گردد. مطالعات اخیر افزایش بیان کلاژناز فیبروبلاستی را در بافت‌های توموری مختلفی نشان داده‌اند. MMP-1 یا آنزیم کلاژناز فیبروبلاستی توسط سلول‌های بنیادی توموری و فیبروبلاستی بیان می‌گردد و با تجزیه و تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی نه تنها سدهای فیزیکی پیش روی گسترش و تهاجم سلول‌های سرطانی را بر می‌دارد (۱۰،۱۱)، بلکه با آزادسازی فاکتورهایی نظیر Insulin-like growth factor (IGF), Basic fibroblast growth factor (BFGF) و فاکتورهای رگ‌زایی مانند Vascular endothelial growth factor (VEGF) شرایط مناسبی را برای رشد و تغذیه توموری فراهم می‌سازد (۱۲،۱۳).

متاستاز فرآیند پیچیده‌ای است که طی آن سلول‌های توموری از تومور اولیه فرار نموده و با تخریب بافت‌های احاطه‌کننده به رگ‌ها وارد می‌شوند و در نهایت در محل دیگری از خلال سلول‌های اندوتلیالی عبور نموده و با رشد در ارگان‌های جدید ایجاد تومور ثانویه می‌کنند. در این فرآیند پیچیده، آنزیم MMP-1 نقش مهمی می‌تواند ایفا کند (۱۴). بیان MMP-1 و بنابراین پتانسیل آن در هضم بافت پیوندی می‌تواند تحت تأثیر یک پلی‌مورفیسم ژنتیکی در پروموتور آنزیم MMP-1 قرار بگیرد. Rutter در سال ۱۹۹۸، نشان داد که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر ژنMMP-1 می‌تواند روی فعالیت رونویسی آن تأثیر گذارد (۱۵). این پلی‌مورفیسم شامل حذف یا اضافه شدن یک باز گوانین در موقعیت ۱۶۰۷- جفت بازی پروموتر ژن MMP-۱ است. اضافه شدن باز گوانین، سبب ایجاد یک توالی همسان برای فاکتورهای رونویسی ETS (5`-GGAT-3`) می‌شود. این جایگاه در مجاورت جایگاه اتصال AP-۱ در موقعیت ۱۶۰۲- قرار دارد. خانواده ETS برای القاء رونویسی احتیاج به فاکتورهای رونویسی دیگری مانند خانواده AP-1 دارند، دو جایگاه مجاور مذکور به‌صورت سینرژیک عمل می‌کنند و با همکاری یکدیگر سبب افزایش رونویسی از آلل ۲G می‌شوند (۱۶،۱۷). درنتیجه ژنوتیپ2G/2G می‌تواند پتانسیل بیان ژن MMP-1 را افزایش دهد و گسترش متاستاز، عود و برگشت بیماری را در افراد مبتلا به سرطان تسهیل نماید. بر اساس نقش پیشنهادی MMP-1 در سرطان، هدف از این مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم ژن MMP-1 و خطر احتمال ابتلا به سرطان مثانه است.

روش بررسی

در این مطالعه مورد- شاهدی، مقدار ۵ میلی‌لیتر از خون وریدی ۱۵۷ فرد مبتلا به سرطان مثانه مراجعه‌کننده به بیمارستان هاشمی‌نژاد و ۱۴۳ فرد سالم که برای چکاب سالیانه به همان بیمارستان مراجعه می‌کردند، پس از هماهنگی‌های لازم و گرفتن رضایت‌نامه کتبی از افراد در فاصله زمانی تیر ماه ۹۳ تا مرداد ماه ۹۵ جمع‌آوری و تا زمان کامل شدن نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

ذخیره‌سازی شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت زیست دانش یاران انجام شد. به طور خلاصه، ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه خون مورد بررسی به میکروتیوب ۱/۵ سی سی انتقال داده شد و با بافر لیزکننده گلبول‌های قرمز خون (RBC lysis solution 1) و ۵۰ ماکرولیتر از بافر (RBC lysis solution 2) مخلوط شدند. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون در۱۲۰۰۰r pm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی دور ریخته شد. این مرحله سه بار تکرار شد تا یک رسوب سفیدرنگ در انتهای میکروتیوب باقی بماند. به رسوب حاصل ۳۰۰ میکرولیتر از بافر cell lysis solution 1 و ۴۰ میکرولیتر از بافر cell lysis solution 2 اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر cell lysis solution 3 به مخلوط اضافه شد و نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به یک میکروتیوب جدید منتقل شد. DNA با استفاده از ایزوپروپانل رسوب داده شد و سپس رسوب DNA با الکل ۸۰٪ شستشو داده شد. رسوب DNA در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شد و در بافر حل شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- نگهداری شد. واکنش PCR، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر آمپلیکون، ۵۰ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۴ میکرومولار) از پرایمرهای اختصاصی ژن MMP-1 (F: 5 '-TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA-3', R: 5'-CTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAgC-3´) بهینه سازی شد. چرخه دمایی PCR شامل، مرحله دناتوراسیون ابتدایی در ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه اتصال پرایمر شامل اعمال دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. در پایان مرحله گسترش نهایی پرایمر با اعمال دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR ژن MMP-1(-1607) به طول ۲۶۹ جفت باز به وسیله آنزیم برشی ALU1 در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت مورد برش آنزیمی قرار گرفت. آنزیم Alu I، آلل 1G را در جایگاه پلی‌مورفیسم برش می‌دهد؛ اما در آلل 2G شکستی ایجاد نمی‌کند. پس از الکتروفورز هموزیگوت‌ها یا آلل 1G با دو باند ۲۴۱ و ۲۸ جفت بازی، هموزیگوت‌ها یا آلل ۲G با تک باند ۲۶۹ جفت بازی و هتروزیگوت‌ها با ترکیبی از هر ۳ باند مشخص شدند؛ اما با توجه به اینکه باند ۲۸ جفت بازی کوچک‌تر از آن است که بر روی ژل آشکار گردد، هموزیگوت‌ها یا آلل۱G با تک باند ۲۴۱ جفت بازی، هموزیگوت‌ها یا آلل ۲G با تک باند ۲۶۹ جفت بازی و هتروزیگوت‌ها با دو باند ۲۴۱ و ۲۶۹ جفت بازی تشخیص داده شدند.

آنالیزهای آماری:

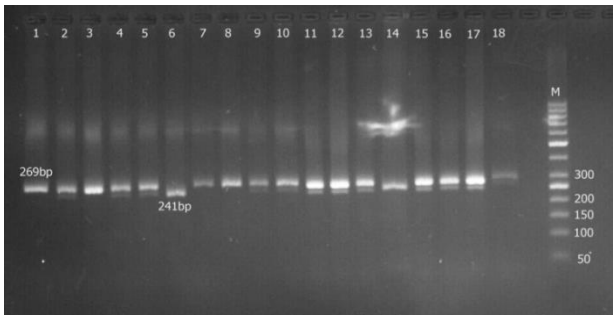
ارتباط بین پلی‌مورفیسم MMP-1 (-1607) و خطر ابتلا به سرطان مثانه با استفاده از روش رگرسیون لوجستیک و نرم‌افزار POPGENE Ver 1.32, SPSS Ver 21 انجام شد. سن، جنس، درجه و مرحله بیماری و اندازه تومور با استفاده از Chi-square Test بررسی شد. در کلیه محاسبات سطح احتمال P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار فرض گردید و سطح اطمینان OR (odds Ratio),CI (confidence Interval)، مورد محاسبه قرار گرفت.

نتایج

نمونه‌های ۱۵۷ بیمار در بازه سنی ۱۳/۶۲ ±۶۰/۸۹ و ۱۴۳ فرد سالم در بازه سنی ۱۶/۴۱±۶۰/۴۰ مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌های بیمار، ۲۴ نفر (۱۵/۲۹٪) زیر ۵۰ سال و ۱۳۳ نفر (۸۴/۷۱٪) بالای ۵۰ سال بودند. ۸۹ نفر (۵۶/۶۹٪) از بیماران و ۴۱ نفر (۲۸/۶۷٪) از افراد سالم دخانیات مصرف می‌کردند. ۲۸ نفر (۱۷/۸۳٪) از بیماران و ۲۲ نفر (۱۵/۳۸٪) از افراد سالم زن و ۱۲۹ نفر (۸۲/۱۷٪) از بیماران و ۱۲۱ نفر (۸۴/۶۲٪) از افراد کنترل مرد بودند. ۹۲ نفر (۵۸/۶٪) از بیماران در مرحله Ta و ۴۸ نفر (۳۰/۵۷٪) از آن‌ها دارای استیج T۱ و ۱۶ نفر (۱۰/۱۹٪) دارای استیج T۲ و تنها ۱ نفر (۰/۶۴٪) با استیج T۳ بود. ۷۲ نفر (۴۵/۸۶٪) از بیماران Low grade، ۸۵ نفر (۵۴/۱۴٪) از آن‌ها High grade بودند (جدول ۱). نتایج حاصل از آنالیز داده‌های به دست آمده از روش RFLP برای نمونه‌های بیمار و نمونه‌های سالم به صورت زیر است (شکل ۱). درصدهای به دست آمده از ژنوتیپ‌های مختلف در افراد سالم و بیمار بیانگر این موضوع است

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

که میزان ژنوتیپ 2G/2G در افراد سالم با (۴۱/۲۶٪) ۵۹ و در افراد بیمار با (۴۶/۵۱٪) ۷۳ نفر از درصد بالاتری برخوردار است (جدول ۱).



شکل ۱: نمونه RFLP در این مطالعه (نمونه‌های ۱،۳،۷،۸ با قرار گرفتن در جایگاه ۲۶۹ جفت بازی نمایانگر ژنوتیپ 2G/2G و نمونه‌های ۲،۴،۵،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳۱۵،۱۶،۱۷،۱۸ با دو باند ۲۴۱ و ۲۶۹ جفت بازی نمایانگر ژنوتیپ 1G/2G و نمونه‌های ۶ و ۱۴ با ۲۴۱ جفت باز نشان‌دهنده ژنوتیپ 1G/1G می‌باشند).

جدول ۱: مشخصات بالینی و کلینیکوپاتولوژیک و فراوانی ژنوتیپ‌ها

متغیرها	گروه بیمار ۱۵۷ نفر	گروه سالم ۱۴۳ نفر
سن		
زیر ۵۰ سال	۲۴(۱۵/۲۹٪)	۵۰ (۳۴/۹۶٪)
بالای ۵۰ سال	۱۳۳(۸۴/۷۱٪)	۹۳ (۶۵/۰۴٪)
جنسیت		
مرد	۱۲۹(۸۲/۱۷٪)	۱۲۱(۸۴/۶۲٪)
زن	۲۸(۱۷/۸۳٪)	۲۲(۱۵/۳۸٪)
سیگاری		
بله	۸۹(۵۶/۶۹٪)	۴۱(۲۸/۶۷٪)
خیر	۵۸(۴۳/۳۱٪)	۱۰۲(۷۱/۳۳٪)
مرحله تومور		
Ta	۹۲(۵۸/۶٪)	
T1	۴۸(۳۰/۵۷٪)	-
T2	۱۶(۱۰/۱۹٪)	
T3	۱(۰/۶۴٪)	
درجه تومور		
Low	۷۲(۴۵/۸۶٪)	
High	۸۵(۵۴/۱۴٪)	

مصرف دخانیات را به عنوان عامل خطری در بروز سرطان مثانه در دو گروه بیمار و کنترل با استفاده از Chi-square test مورد بررسی قرار گرفت. ۸۹ نفر از افراد مبتلا به سرطان و ۴۱ نفر از افراد کنترل دخانیات مصرف می‌کردند. ارتباط معنی‌داری بین مصرف دخانیات و احتمال بروز سرطان مثانه مشاهده شد [P=0.0001 و (OR:3.25,95%CI (2.01-5.26]. با توجه به میزان عددی OR، مصرف دخانیات به میزان ۳ برابر خطر ابتلا به سرطان مثانه را افزایش می‌دهد. فرکانس ژنی و ژنوتیپی برای هر دو جمعیت بیمار و سالم محاسبه گردید. با توجه به نتایج نمایش داده شده در جدول ۲، آلل 2G در هر دو جمعیت بیمار (۶۳/۷٪) و جمعیت سالم (۶۰/۱۴٪) بیشترین میزان را به خود اختصاص داد. با اینکه آلل 2G فراوانی بیشتری در جمعیت مورد بررسی

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

داشت ولی اختلاف معنی‌داری در فرکانس آللی مشاهده نشد (P=۰/۳۷). دو جمعیت سالم و بیمار مورد مطالعه در حال تعادل می‌باشند (P=۰/۶۶).

ارتباط بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و خطر ابتلا به سرطان مثانه بررسی شد. نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به عدد p-valueهای به دست آمده در هر یک از ژنوتیپ‌های مورد بررسی در دو گروه کنترل و بیمار، ارتباطی بین ژنوتیپ‌ها و خطر ابتلا به سرطان مثانه دیده نشد.

جدول ۲: ارتباط ژنوتیپ‌ها با خطر ابتلا به سرطان مثانه

ژنوتیپ‌ها	گروه بیمار	گروه کنترل	OR (95% CI)	عدد P
1G1G	۳۰	۳۰	۱	-
1G2G	۵۴	۵۴	۱/۰۰ (۰/۵۳-۱/۹)	۱/۰۰
2G2G	۷۳	۵۹	۱/۲۳ (۰/۶۷-۲/۲۸)	۰/۴۹
Allele				
1G allele	۱۱۴	۱۱۴	۱	عدد P
2G allele	۲۰۰	۱۷۲	۱/۱۶ (۰/۸۳-۱/۶)	۰/۳۷

تومورها در سه گروه ژنتیکی و بر اساس اندازه بر حسب سانتی‌متر به دو دسته تقسیم شدند (جدول ۳). ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و اندازه تومور دیده نشد (P>۰/۰۵). ارتباط معنی‌داری بین درجه بیماری و ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). با توجه به P-Valueهای محاسبه شده برای دو گروه استیج (Ta,T1)، (T2,T3) در بین سه گروه ژنوتیپ رابطه معنی‌داری بین استیج و نوع ژنوتیپ دیده نشد (P>۰/۰۵) .

جدول ۳: ارتباط بین ژنوتیپ‌ها با مصرف دخانیات، اندازه تومور، گرید و مرحله بیماری

معیارها			ژنوتیپ‌ها 1G1G	1G2G	2G2G
مصرف دخانیات	بله	افراد بیمار	۱۸	۳۳	۳۸
		افراد سالم	۶	۱۷	۱۸
		OR (% 95 CI)	۱	۰/۶۴ (۰/۲۱-۱/۹)	۰/۷ (۰/۲۳-۲/۱)
		عدد P		۰/۴۳	۰/۵۲
	خیر	افراد بیمار	۱۲	۲۱	۳۵
		افراد سالم	۲۴	۳۷	۴۱
		OR (% 95 CI)	۱	۱/۱۳ (۰/۴۷-۲/۷)	۱/۷۰ (۰/۷۴-۳/۹)
		عدد P		۰/۷۷	۰/۲
اندازه تومور		≥۳	۱۸	۲۷	۳۲
		<۳	۱۲	۲۷	۴۱
		OR (%95 CI)	۱	۰/۶۶ (۰/۲۷-۱/۶)	۰/۵۲ (۰/۲۲-۱/۲)
		عدد P		۰/۳۷	۰/۱۳
گرید بیماری		High	۱۵	۳۰	۴۰
		Low	۱۵	۲۴	۳۳
		OR (% 95 CI)	۱	۱/۲۵ (۰/۵۱-۲/۸)	۱/۲۰ (۰/۵۱-۲/۸)
		عدد P		۰/۶۲	۰/۶۵
مرحله بیماری		T2 and T3	۵	۸	۴
		Ta and T1	۲۵	۴۶	۶۹
		OR (% 95 CI)	۱	۰/۸۷ (۰/۲۵-۲/۹)	۰/۲۹ (۰/۰۷-۱/۱)
		عدد P		۰/۸۲	۰/۰۶

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

بحث

بیش از ٪۹۰ تومورهای مثانه سرطان ترانزیشنال هستند و در تمامی آن‌ها پلی‌مورفیسم ژنتیکی مشهود است (۱۸،۱۹). تحقیقات نشان داده است که پلی مورفیسم‌های مختلف ژنتیکی در ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی مانند آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز ممکن است در سرطان مثانه نقش داشته باشند (۲۰). آنزیم کلاژناز فیبروبلاستی عضوی از خانواده بزرگ آنزیم‌های پروتئازی است که با تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی نه تنها گسترش سلول‌های سرطانی را تسهیل می‌نماید بلکه با رهایش فاکتورهای رشد و فاکتورهای رگ‌زایی در بقاء و تغذیه سلول‌های سرطانی نیز نقش کلیدی ایفا می‌کند (۲۱). بیان آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز به طور طبیعی در بافت‌ها پائین است و در صورت لزوم با تغییرات در ماتریکس خارج سلولی توسط فاکتورهای رشد، سیتوکین‌های التهابی افزایش می‌یابند (۲۲،۲۳). در برخی از شرایط پاتولوژیک، بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در نتیجه القاء مداوم تحریکات خارجی مانند شرایط ایجادشده در آرتریت 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 واریته ژنتیکی در پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۱- قرار بگیرد. در واقع دخول یک بازگوانین در موقعیت1607 - جفت بازی پروموتر که پلی‌مورفیسمG2 نامیده می‌شود، یک توالی همسان -5'-GGAT 3' برای فاکتورهای رونویسی ETS ایجاد می‌کند (۲۴). تصور می‌گردد که پلی‌مورفیسم 2G قادر به افزایش پتانسیل تولید آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در پاسخ به شرایط توموري نسبت به پلی‌مورفیسم 1G است که تنها واجد یک گوانین در این موقعیت بوده و لذا فاقد توالي همسان براي ETS است (-5'-GAT 3')؛ بنابراین پلی‌مورفیسم 2G می‌تواند به عنوان یك فاکتور مؤثر تسهیل‌کننده فاکتورهاي رونویسي در رشد و پیشرفت تومور محسوب گردد (۲۳). پلی‌مورفیسم‌ها، ارائه‌دهنده تنوع کدهای ژنتیکی در جمعیت می‌باشند که متداول‌ترین پلی‌مورفیسم ها، پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی(SNP) ها می‌باشند. نشان داده شده است که پلی‌مورفیسم در ناحیه پروموتری ژن‌ها، مثل آلل 2G در ژن MMP-1(-1607)، با انواع بدخیمی‌ها و سرطان‌ها مرتبط است (۲۵). در ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۱، آلل ۲G با ایجاد یک جایگاه فعال رونویسی، فعالیت قابل‌توجه و بیشتری نسبت به آلل 1G داشته و باعث افزایش ریسک بعضی از سرطان‌ها ازجمله دهان، کلورکتال، کلیه و سر و گردن می‌باشد (۲۶،۲۷). حتی در سرطان‌های تخمدان و کلورکتال، حضور آلل 2G، به طور قابل‌توجهی با کاهش طول عمر بیمار ارتباط داشت (۲۸،۲۹) (۳۲،۳۳). Hirata و همکاران در سال ۲۰۰۳، گزارش کردند که فرکانس ژنوتیپ۲G۲G به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل در افراد مبتلا به Renal cell carcinoma (RCC) بود (۲۷). Zhu و همکاران در سال ۲۰۰۱، نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ 2G/2G و خطر سرطان ریه وجود دارد. آن‌ها نشان دادند که پلی‌مورفیسم MMP-1 با خطر ابتلا به سرطان ریه در افرادی که هرگز سیگار نکشیده‌اند، ارتباطی ندارد (۳۰). O-charoenrat و همکاران در سال ۲۰۰۶، همبستگی معنی‌داری بین ژنوتیپ 2G/2G و اندازه تومور، متاستاز، مرحله بیماری در سرطان سر و گردن مشاهده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که ژنوتیپ 2G/2G خطر ابتلا به سرطان سر و گردن را در افراد سیگاری شدید، بالا می‌برد (۳۱). لازم به ذکر است گزارش‌های مختلفی در مورد ارتباط پلی مورفیسم‌های MMP-1(-1607) و ریسک سرطان مثانه وجود دارد که در نهایت این بحث به صورت مبهم باقی مانده است. در بعضی از مطالعات به افزایش ریسک سرطان مثانه اشاره‌شده است و در بعضی مطالعات به عدم ارتباط پلی‌مورفیسم و افزایش ریسک سرطان مثانه اشاره دارند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن MMP1(-1607) با احتمال خطر ابتلا به سرطان مثانه و بررسی فرکانس آللی آن می‌باشد. در مطالعه حاضر با توجه به نتایج به دست آمده، در بررسی رابطه سن و سرطان، (٪۱۵/۲۹) ۲۴ نفر از افراد بیمار و (٪۳۴/۹۶) ۵۰ نفر از افراد کنترل زیر ۵۰ سال و (٪۸۴/۷) ۱۳۳نفر از افراد بیمار و (٪۶۵/۰۴) ۹۳ نفر از افراد کنترل، بالای ۵۰ سال بودند. به طوری

که با افزایش سن، ریسک ۳ برابری برای سرطان مثانه تخمین زده شد. در بررسی رابطه مصرف دخانیات و سرطان، (٪۵۶/۶۹) ۸۹ نفر از افراد بیمار و (٪۲۸/۶۷) ۴۱ نفر از افراد کنترل، دخانیات مصرف می‌کردند و (٪۴۳/۳۱) ۵۸ نفر از افراد بیمار و (٪۷۱/۳۳) ۱۰۲ نفر از افراد کنترل سیگار مصرف نمی‌کردند. ریسک سه برابری سرطان مثانه با مصرف دخانیات در بین سیگاری‌ها برآورد شد.

[OR: 2.98, 95% CI (1.71-5.18), P=0.0001]. ارتباطی بین فرکانس آللی و ریسک سرطان مثانه دیده نشد [OR:1.16, 95%CI(0.83-1.6), P=0.37]. ارتباطی نیز بین پلی‌مورفیسم ژنتیکی و خطر بروز سرطان مثانه در این تحقیق مشاهده نشد. در انتها با توجه به اعداد و نتایج به دست آمده ارتباطی بین پلی‌مورفیسم ژن MMP-1(-1607) و خطر ابتلا به سرطان مثانه در افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان هاشمی‌نژاد دیده نشد.

ازجمله مقالاتی که تایید کننده نتایج تحقیق حاضر می‌باشد می‌توان به مطالعه kader و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲۰) و Tao و همکاران در سال ۲۰۱۵ اشاره کرد (۳۲).

kader و همکاران، ارتباط بین ۹ پلی‌مورفیسم متالوپروتئینازهای ۱،۲،۳،۸،۹،۱۲ و سرطان مثانه را بررسی کردند. آن‌ها این مطالعه را در جمعیت اروپائی‌ها بین ۲۴۳ بیمار با سرطان تهاجمی مثانه و ۳۱۵ بیمار مبتلا به سرطان سطحی مثانه با استفاده از روش PCR-RFLP انجام دادند. ٪۷۶ را مردان و ٪۲۴ را زنان تشکیل می‌دادند. آن‌ها فاکتورهای سن، جنس و انواع ژنوتیپ پلی‌مورفیسم MMP-1(-1607) را در دو گروه سرطان سطحی و پیشرفته بررسی کردند و به رابطه معنی‌داری بین آن‌ها نرسیدند. تنها ارتباط معنی‌دار بین این دو گروه در مصرف دخانیات وجود داشت (P=۰/۰۲)، آن‌ها نتیجه گرفتند که افراد سیگاری بیشتر در معرض ابتلا به سرطان تهاجمی مثانه هستند (۲۰).

Tao و همکاران در سال ۲۰۱۵ در متاآنالیزی، بیان پلی‌مورفیسم‌های MMP-1,2,3,7,9 را در خطر ابتلا به سرطان مثانه بررسی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که بیان هتروزیگوت پلی‌مورفیسم MMP-1(-1607) باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان مثانه می‌شود (P=۰/۰۱) و یا به عبارتی دیگر ژنوتیپ 1G/2G نقش ژنوتیپ محافظتی برای خطر ابتلا به سرطان مثانه است. در بررسی فرکانس آللی و خطر ابتلا به سرطان مثانه، ارتباط منفی بین آلل ۲G و خطر سرطان مثانه گزارش شد [OR:0.57,95%CI(0.36-0.93),P=0.001] (۳۲).

ولی مقالاتی هستند که به ارتباط پلی‌مورفیسمMMP-1 و ابتلا به سرطان مثانه اشاره دارند. در مطالعه wieczorek و همکاران در سال ۲۰۱۳، کاهش معنی‌داری در ریسک سرطان مثانه برای ژنوتیپ‌های 1G/1G,1G/2G مشاهده شد [OR:0.62,95%CI(0.39-0.98),P=0.042]. کاهش ریسک سرطان مثانه در همین ترکیب ژنوتیپی در سیگاری‌ها مشاهده شد (P=۰/۰۱۹). ارتباطی بین گرید و استیج بیماری و ژنوتیپ‌ها دیده نشد (۳۳).

Yan و همکاران نتیجه گرفتند که پلی‌مورفیسم MMP-1(-1607) تنها در شرایط و مدل مغلوب یعنی ۲G/2G vs. (1G/2G,1G/1G;OR:1.44,95%CI(1.05-1.97),P=0.022) باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان مثانه می‌شود و در حالت‌های دیگر ارتباطی بین خطر سرطان مثانه و پلی‌مورفیسم MMP-1 دیده نشد (۳۴).

Srivastava و همکاران، آلل 2G را به عنوان یک آلل پرخطر معرفی کردند. ارتباطی بین استیج بیماری و ژنوتیپ دیده نشد. ژنوتیپ 2G/2G با افزایش خطر ابتلا به سرطان مثانه در بین سیگاری‌ها ارتباط داشت، به طوری که ریسک سه برابری برای سرطان در بین سیگاری‌ها تخمین زده شد [OR:3.2,95%CI(1.4-7.31),P=0.006] (۳۵).

Tasci و همکاران، رابطه معنی‌داری بین افزایش خطر بروز سرطان با ژنوتیپ۲G/2G دیدند. [OR:2.79,95%CI(1.53-5.6),P=0.001]. در واقع افزایش تقریباً ۲/۷ برابری برای ژنوتیپ ۲G۲G و سرطان مثانه مشاهده شد. ولی هیچ ارتباطی بین ژنوتیپ ۲G۲G و گرید و استیج تومور دیده نشد. ریسک سه برابری این ژنوتیپ در افراد سیگاری مشاهده شد [OR:۳.۲۱, ۹۵%CI(۱.۳۳-۵.۶۰), P=۰.۰۰۱] به طور کلی این تحقیق حاکی از ارتباط پلی‌مورفیسم MMP-۱(-۱۶۰۷) حساسیت‌پذیری در برابر سرطان

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

مثانه بود (۳۶).

پیشنهاد می‌شود که این پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های آماری بزرگ‌تر مورد بررسی قرار گیرد. همچنین سایر پلی مورفیسم‌های مربوط به ژن MMP-۱ و احتمال خطر سرطان مثانه مطالعه شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ارتباطی بین ژنوتیپ‌ها و افزایش خطر ابتلا به سرطان مثانه مشاهده نشد. گزارش‌های ضدونقیضی در جمعیت‌ها و تحقیقات مختلف در مورد بررسی پلی‌مورفیسم ژنتیکی MMP-۱ منتشر شده است که می‌تواند ناشی از متفاوت بودن اندازه جمعیت مورد مطالعه، ژنتیک افراد، نوع روش به کار رفته و حتی انتخاب جمعیت مورد بررسی باشد. در این تحقیق ارتباطی بین پلی‌مورفیسم ژنتیکی و استعداد ابتلا به سرطان مثانه دیده نشد.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

References:

1- Chavan S, Bray F, Lortet-Tieulent J, Goodman M, Jemal A. ***International Variations in Bladder Cancer Incidence and Mortality.*** Eur Urol 2014; 66(1): 59-73.

2- Ploeg M, Aben KK, Kiemeney LA. ***The present and future burden of urinary bladder cancer in the world.*** World J Urol 2009; 27(3): 289-93.

3- Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. ***Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer.*** Eur Urol 2013; 63(2): 234-41.

4- Van Schaik RHN, Van der Heiden IP, Van den Anker JN, Lindemans J. ***CYP3A5 Variant allele frequencies in Dutch Caucasians***. Clin Chem 2002; 48(10): 1668-71.

5- Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK, Schoenberg M. ***The molecular characteristics of bladder cancer in young pationts.*** J Urol 1998; 159(5): 1493-96.

6- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. ***Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince***. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 207-14.

7- Sun Y, Sun Y, Wenger L, Rutter J L, Brinckerhoff CE, Cheung HS. ***p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene expression***. J Biol Chem 1999; 274(17): 11535-40.

8- Nagase H, Woessner JF. ***Matrix metalloproteinases***. J Biological Chemistry 1999; 274(31): 21491-21494.

9- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. ***Interstial collagenase as marker of tumor progression.*** Clin Cancer Res 2000; 6: 4823-30.

10- Folgueras AR, Pendas AM, Sanches LM, Lopez C. ***Matrix metalloproteinases in cancer:from new function to improved inhibition strategies***. Int J Dev Biol 2004; 48(5-6): 411-424.

11- Hijova E. ***Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications***. Bratisl Lek Listy 2005; 106(6): 127-132.

12- Rundhaug JE. ***Matrix metalloproteinase and angiogenesis***. J Cell Mol Med 2005; 9(2): 267-285.

13- Visse F, Nagase H, Murphy G. ***Structure and function of MMPS and TIMPS***. Circulation Res 2006; 69(3): 562-573.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

14- Chamberlain SH, Hemmer RM, Brinckerhoff CE. ***Novel phorbol ester response region in collagenase promoter binds Fos and Jun.*** J Cell Biochem 1993; 52: 337-51.

15- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella J F,Ozelius L J, et al. ***A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloprpteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription.*** Cancer Res 1998; 58: 5321-5.

16- Tower G B, Conn CI, Belguise K, Dany C, Brinkerhoff CE***. Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism(ETS site)in the MMP-1 promoter.*** Eur Biochem 2003; 270(20): 4216-4225.

17- Ye S, Dhillon S, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM, Pickering RM, et al. ***Investigation of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloprpteinase-1 gene polymorphism***. Cancer Res 2001; 61(4): 1296-98.

18- Simforoosh N, Nouralizadeh A. ***2006.Iranian textbook of urology.2.Teimoorzadeh***.Bladder Cancer.873-893.

19- Kader AK, Liu J, Shao L, Dinney C, Lin J, Wang Y, et al. ***Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with Bladder Cancer Invasiveness.*** clin cancer Res 2007; 2614-262.

20- Motavali Bashi M, Kouhkan F, Hijati Z. ***The role of snp in Fibroblast collagenase gene with increasing of metastasis risk and viability reduction in Breast cancer patients***. J molecular and cellular researches (Iranian Journal of Biology) 2013; 26(3): 365-377. [Persian]

21- 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(24): 7200-2.

22- Ye S***. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome.*** Cardiovase Res 2006; 69(3): 636-45.

23- Cao Z, Li C, Jin L, Corbet EF. ***Association of Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism with generalized aggressive periodontitis in a chines population***. J Periodonal Res 2005; 40: 427-431.

24- Hirata H, Naito K, Yoshihiro S, Matsuyama H, Suehiro Y, Hinoda YA. ***Single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with conventional renal cell carcinoma***. Int J Cancer 2003; 106(3): 372-374.

25- Six L, Crimm C, Leodolter S, Tempfer C, Zeilinger R, Sliutz G, et al. ***A polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with the prognosis of pationts with ovarian cancer.*** Gynecol Oncol 2006; 100(3): 506-510.

26- Zinzindohoue F, Lecomte T, Ferraz JM, Laurent-Puig P. ***Prognostic significant of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer.*** Clin Cancer Res 2005; 11(2-1): 594-599.

27- Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. ***A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility***. Cancer Res 2001; 61(21): 7825-9.

28- O-charoenrat P, Leksrisakul P, Sangruchi S. ***A Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with susceptibility and aggressivenss of head and neck cancer.*** Int J Cancer 2006; 118(10): 2548-53.

29- Tao L, Li Z, Lin L, Lei Y, Hongyuan Y, Hongwei J, et al. ***MMP-1.2.3.7.and 9 Gene polymorphisms and Urinary Cancer Risk: A Meta-Analysis.*** Genet Test Mol Biomarkers 2015; 19(10): 548-555.

30- wieczore KE, Reszka E, Jablonowski Z, Jablonska E, Krol MB, Grzegorczyk A, et al. ***Genetic Polymorphisms in matrix metalloproteinases(MMPS)and tissue inhibitors of MMPS (TIMPS) and bladder cancer susceptibility***. BJU Int 2013; 112(8): 1207-14.

31- Yan Y, Liang H, Li T, Li M, Li R, Qin X, et al. ***The MMP1, MMP2 and MMP9 gene polymorphisms and susceptibility to bladder Cancer: a meta-analysis*** . Tumor Biol 2014; 35: 3047-3052.

32- Srivastava P, Gangwar R, Kapoor R, Mittal R. ***Bladder Cancer Risk Associated with Genotypic polymorphism of the matrix Metalloproteinas-1 and 7 in North Indian Population***. Hindawi 2010; 29: 37-46.

33- Tasci AL, Tugcu V, Ozbek E, Ozbay B, Simsek A, Koksal V. ***A single-nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances bladder cancer susceptibility***. BJU International 2008:101(4); 503-7.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

Study of Matrix Metalloproteinase -1 Polymorphism and Susceptibility to Bladder Cancer

Delaram Nikfarjam [1], Farzaneh Tafvizi [*2], Masoud Salehipoure [3]

[1,2,3] Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Received: 22 Apr 2017 **Accepted:** 27 Jul 2017

Abstract

Introduction: Matrix metalloproteinase-1 with the destruction of the basement membrane and extracellular matrix not only facilitates the spread of cancer cells, but also with the release of growth factors and angiogenesis plays a key role in cancer cell survival and nutrition. The purpose of this study was to recognize the relation between the polymorphism of Matrix metalloproteinase-1 gene and risk of bladder cancer.

Methods: This case-control study included 157 patients with bladder cancer and 143 healthy controls who were age-matched. First, DNA extraction from peripheral blood and then PCR was performed using specific primers. Then, RFLP method was used to evaluate the MMP-1 (-1607) polymorphism.

Results: There was no significant difference between the frequency of 1G/1G, 2G/2G allels (P>0.05). There was no association between polymorphism and susceptibility to bladder cancer [OR:1.23, 95%CI (0.67-2.28),P=0.49].

Conclusion: Due to the lack of association between MMP-1 polymorphism (-1607) and the risk of bladder-cancer, it is suggested that other polymorphisms of the matrix metalloproteinase-1 gene will be investigated.

Keywords: Bladder cancer, Matrix Metalloproteinases, Polymorphism

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 19:14 IRDT on Thursday June 21st 2018

This paper should be cited as:
Nikfarjam D, Tafvizi F, Salehipoure M. **Study of Matrix Metalloproteinase -1 Polymorphism and Susceptibility to Bladder Cancer.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(9): 708-18.

***Corresponding author: Tel: 09125709532, email: farzanehtafvizi54@gmail.com**