مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره شانزدهم ، شماره چهارم ، زمستان ۱۳۸۷، صفحات ۵۰-۴۱

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

دکتر مجید متولی باشی*[1]، فاطمه کوه کن[2]، دکتر زهره حجتی[3]

چکیده

مقدمه: افزایش یا کاهش یک نوکلئوتید گوانین در ناحیه ۱۶۰۷- پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ باعث ایجاد به ترتیب دو نوع آلل 2G و 1G برای ژن مذکور در جمعیت می‌گردد. آلل 2G واجد یک جایگاه اتصال اضافی نسبت به آلل 1G جهت اتصال اعضای فاکتورهای رونویسی خانواده ETS می‌باشد که می‌تواند 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 سلول‌های سرطانی می‌باشد.

روش بررسی: نمونه خون ۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ و ۱۰۰ نمونه کنترل جمع‌آوری گردید. بیماران به مدت میانگین ۲۵ ماه تحت پیگیری و مراقبت قرار گرفتند (۱۲ تا ۳۶ ماه). DNA استخراج شده از نمونه‌های 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 2G 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 1G برابر با ۸۱٪ و برای افراد هموزیگوت 2G برابر با ۶۶٪ می‌باشد (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.

نتیجه‌گیری: مطابق نتایج به دست آمده افراد واجد ژنوتیپ‌های دارای حداقل یک آلل 1G، میزان بقای وابسته به سرطان بیشتری نسبت به افراد فاقد این آلل از خود نشان می‌دهند.

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

مقدمه

سرطان روده بزرگ، سومین عامل رایج مرگ‌های وابسته به سرطان در سراسر دنیا، در اثر رشد کنترل نشده لایه داخلی اندام‌های کلون و رکتوم ایجاد می‌گردد و یکی از سرطان‌های شایع در زنان و مردان است(۱). در زمان تشخیص معمولاً این سرطان در ۵۴٪ موارد تنها به کلون و رکتوم محدود (B و Ducks A) و در ۴۶٪ موارد باقیمانده متاستاز به لنف، کبد و یا ارگانهای دیگر مشاهده می‌شود (D و Ducks C) (۲،۳). جراحی توده سرطانی ساکن به منظور درمان سرطان روده بزرگ می‌تواند تا حدودی مؤثر واقع شود. اما متأسفانه علی‌رغم حضور تکنیک‌های پیشرفته جراحی،

* ۱- نویسنده مسئول: استادیار بخش ژنتیک گروه زیست شناسی
تلفن: ۷۹۳۲۴۷۴-۰۳۱۱ نمابر: ۷۹۳۲۴۵۶-۰۳۱۱
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 دریافت: ۱۳۸۷/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۷/۲۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

رادیو تراپی و فاکتورهای شیمی درمانی در درمان سرطان روده بزرگ، هنوز جلوگیری و مبارزه با گسترش متاستازی 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 پیشگری متاستاز محسوب گردد(۲،۴).

متاستاز فرآیند پیچیده‌ای است که طی آن سلول های 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 می کنند (۵،۶،۷). در این فرآیند پیچیده آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ (Matrix Metalloproteinase-1) نقش مهمی می‌تواند ایفا کند (۱۱-۸). آنزیم مذکور قادر است ترکیبات ماتریکس خارج سلولی وغشای 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 بینابینی (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 آرتریت روماتوئید و آرتروواسکلروزیس، یا در اثر بیان پایدار به علت یک موتاسیون فعال‌کننده 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(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 می کند(۱۹). تصور می گردد که پلی‌مورفیسم 2G قادر به افزایش پتانسیل تولید آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ (در پاسخ به شرایط توموری) نسبت به پلی‌مورفیسم 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 پلی‌مورفیسم 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)، اندومتریال(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 پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی مذکور در ژن MMP-1 بر متاستاز و میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

در گروه مذکور با گروه سرطان روده بزرگ مطابقت داشته باشد.

نمونه خون‌های تهیه شده درون ظرف یخ (°۴- سانتیگراد) حمل و پس از انتقال به اصفهان تا زمان استفاده در دمای °۲۰- 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 متالوپروتئیناز-۱ به صورت زیر می‌باشد:

Forward: 5'-TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA-3'

Reverse: 5' -TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAgC -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 ۱G حاصل شود.

واکنش PCR در حجم ۲۵µl شامل ۱۰۰ng از DNA الگو، ۲/۵µl از بافر PCR 10X، ۲µl از Mgcl2 و ۲/۵ واحد از DNA پلیمراز Taq (سیناژن، ایران)، ۰/۲µ M از مخلوط dNTP M، ۰/۲µl 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 محدودالاثر Alu I محصولات PCR طبق دستور زیر هضم آنزیمی شدند:

در یک ویال حدود ۵-۴ میکروگرم DNA، ۲ میکرولیتر بافر TangoTM 10X و ۰/۵ میکرولیتر محلول شامل ۵ واحد آنزیم محدودالاثر (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 گردید. آنزیم Alu I آلل 1G را در جایگاه پلی‌مورفیسم 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 هتروزیگوتها 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 هتروزیگوتها 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 χ^2، به منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه‌های مختلف بیماران و افراد کنترل استفاده گردید. نسبت افزآینده (OR) با فاصله اطمینان ۹۵٪ درصد برای تخمین ارتباط میان پلی‌مورفیسم پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ و ریسک رشد و تهاجم روده بزرگ و میزان مرگ و میر این افراد محاسبه گشت. در کلیه محاسبات، سطح احتمال P<۰/۰۵، از نظر آماری معنی‌دار فرض گردید.

آنالیزهای بقا: بیماران هر سه ماه یک بار پس از عمل جراحی تحت آزمایشات کلینیکی مورد نیاز قرار گرفتند. اولتراسنوگرافی 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 2G در جمعیت کنترل به ترتیب برابر با

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

۵۳٪ و ۴۷٪ و در جمعیت بیمار به ترتیب برابر با ۴۰٪ و ۶۰٪ می‌باشد. فراوانی آلل 2G در جمعیت بیمار نسبت به جمعیت کنترل، افزایش قابل توجهی نشان می‌دهد (P=۰/۰۱ و χ^2=۷/۷۶). فراوانی ژنوتیپ‌های 1G/1G، 1G/2G و 2G/2G 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 می‌دهد (جدول ۱، P = ۰/۰۱، χ^2= ۷/۷۶ و P = ۰/۰۲، χ^2= ۷/۶۷).

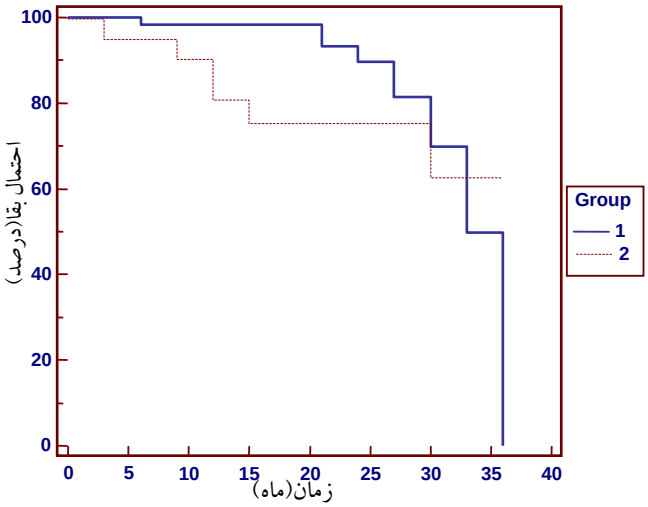
در مرحله بعد ارتباط و پیوستگی گروه‌های ژنوتیپی در دو جمعیت مقایسه گردید: ژنوتیپ1G/2G نسبت به1G/1 G به عنوان مرجع، ارتباط آماری معنی‌داری با جمعیت‌های بیمار و کنترل نشان نداد، لذا گروه ژنوتیپی مذکور همراه با گروه ژنوتیپی1G/1G به عنوان یک مرجع واحد در نظر گرفته شده و ارتباط ژنوتیپ 2G/2G با جمعیت‌های مورد مطالعه نسبت به این گروه ژنوتیپی مرجع سنجیده شد.

مطابق جدول۲ ژنوتیپ هموزیگوت 2G در مقایسه با ژنوتیپ‌های دارای حداقل یک آلل 1G، ارتباط آماری معنی‌داری با جمعیت بیماران نشان دادند(۳/۸۳-۱/۲۳ = ۹۵٪ CI و OR=۲/۱۷).

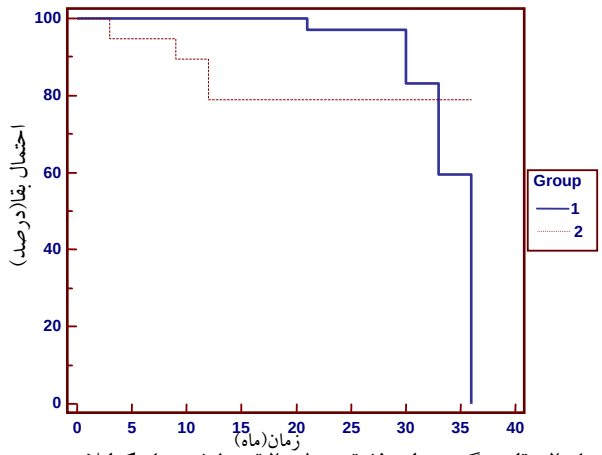
جهت انجام مطالعات تکمیلی بیماران بر مبنای حضور یا عدم حضور متاستاز به دو گروه متاستازی (M+) و غیرمتاستازی (M-) تقسیم گشتند. مطالعات نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت 2G در گروه متاستازی، به طور چشمگیری، در مقایسه با گروه غیرمتاستازی و همچنین گروه کنترل بیشتر است (به ترتیب: ۵۵٪ در مقابل ۲۶٪ و ۲۳٪). در مقابل، این فراوانی در گروه غیرمتاستازی، در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری فاحشی نشان نمی‌دهد (۲۶٪ در مقابل ۲۳٪، جدول ۱). در ادامه به منظور بررسی تاثیر ژنوتیپ هموزیگوت 2G در مرحله شروع و متاستاز سرطان روده بزرگ، توزیع ژنوتیپی در گروه +M و -M با گروه کنترل مقایسه گردید. قیاس گروه‌های ژنوتیپی، در گروه -M و کنترل تفاوت آماری فاحشی نشان نمی‌دهد (۲/۳۱-۰/۵۹ = ۹۵٪ CI و OR=۱/۱۷)، اما مقایسه ژنوتیپ هموزیگوت 2G در گروه +M و کنترل، دخالت مستقیم ژنوتیپ مذکور را در مرحله متاستاز مشهود می‌سازد (۷/۹۷-۲/۱۱=۹۵٪ CI، OR=۴/۱۰) (جدول ۲).

در آنالیز دیگر، به منظور بررسی دقیق نقش ژنوتیپ هموزیگوت 2G در متاستاز و میزان بقای بیماران، مطالعات بقا پس از گروه بندی بیماران غیرمتاستازی در دو گروه واجد حداقل یک آلل 1G و واجد ژنوتیپ هموزیگوت 2G 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.

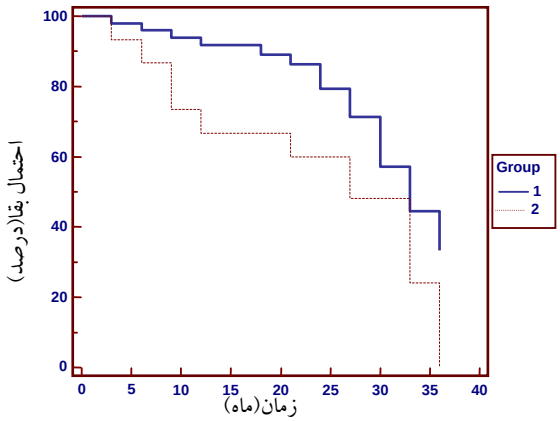


نمودار ۱: مقایسه گروه های ژنوتیپی ۱ و ۲ توسط نمودار کاپلان- میر گویای تفاوت آماری معنی‌داری در میزان بقای کلی ۳ ساله افراد بیمار واجدسرطان روده بزرگ می باشد(تست لاگ-رانک: P=۰/۰٤) . گروه۱: 1G/2G+1G/1G گروه ۲: 2G/2G



نمودار ۲: مقایسه گروه های ژنوتیپی ۱ و ۲ توسط نمودار کاپلان- میر گویای تفاوت آماری معنی‌داری در میزان بقای وابسته به سرطان روده بزرگ در بین افراد بیمار میباشد(تست لاگ-رانک: P=۰/۰۱) . گروه۱: 1G/2G+1G/1G گروه ۲: 2G/2G

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار ۳: مقایسه گروه های ژنوتیپی ۱ و ۲ توسط نمودار کاپلان- میر گویای تفاوت آماری معنی داری در میزان بقای بدون حضور بیماری سرطان روده بزرگ در بین افراد بیمار می باشد(تست لاگ-رانک: P=.۰/۰۰۱) گروه۱: 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 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 ۱Gبه 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 (شکل۱، تست لاگ-رانک: P=۰/۰۴)، میزان بقای وابسته به سرطان (شکل۲، تست لاگ-رانک: P=۰/۰۱) و همچنین برای بقای بدون حضور بیماری (شکل۳، تست لاگ-رانک: P=۰/۰۰۱) وجود دارد.

جدول۱: توزیع آللی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در گروه کنترل وگروههای بیمار سرطان روده بزرگ

فراوانی	فراوانی آللی		P(a)	فراوانی ژنوتیپی			P (b)
ریخته ژنتیکی	G۱	G۲		۱/۱	۱/۲	۲/۲	
کنترل	(٪۵۳)	(٪۴۷)		(٪۲۹)	(٪۴۸)	(٪۲۳)	
بیماران(M+&M-)	(٪۴۰)	(٪۶۰)	۰/۰۱	(٪۲۰)	(٪۴۱)	(٪۳۹)	۰/۰۲
M+	(٪۳۰)	(٪۷۰)	۰/۰۰۱	(٪۱۵)	(٪۳۰)	(٪۵۵)	۰/۰۰۱
-	(٪۴۹)	(٪۵۱)	۰/۴۹	(٪۲۵)	(٪۴۹)	(٪۲۶)	۰/۷۸

راهنمای ژنوتیپی جدول : ۱G/۱G = ۱/۱، ۱G/۲G = ۱/۲ ، ۲G/۲G = ۲/۲

a: ارزش P محاسبه شده از آزمون χ^2آللی. 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=۰/۰۱، χ^2= ۷/۷۶ و P=۰/۰۰۱ و χ^2=۱۸/۰۲)؛ فراوانی آلل۲G در گروه بیماران بدون فعالیت متاستازی(M-) نسبت به کنترل، تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نمی‌دهد(P=۰/۴۹ و χ^2= ۰/۴۶۸).

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=۰/۰۲، χ^2= ۷/۶۷ و P = ۰/۰۰۱ و χ^2= ۱۸/۴۴) ؛ اما این تفاوت در گروه بیماران بدون فعالیت متاستازی دیده نشد(P = ۰/۷۸ و χ^2 = ۰/۴۸۲). M+ : گروه بیمار با فعالیت متاستازی -M: گروه بیماربدون فعالیت متاستازی

جدول۲: آنالیز ارتباط و پیوستگی پلی مورفیسم پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در گروه کنترل وگروههای 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 گروه های مختلف بیماران نسبت به گروه کنترل.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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

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

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 (۷/۰- ۰/۸۹=۹۵CI٪ و ۲/۵= OR).

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

بحث

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 پلی‌مورفیسم 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 ۱۶۰۲bp- 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 اندومتریال که دارای ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت ۲G هستند، دارای مقادیر بیشتری از رونوشت‌های آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ درمقایسه با بیماران فاقد این آلل می‌باشند. مطابق مطالعات Kanamori، میانگین سطح بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در تومورهای حامل آلل ۲G (۲G/۲G و ۱G/۲G)، ۷ مرتبه بیش از میانگین سطح بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ در تومورهای فاقد این آلل (۱G/۱G) است(۲۱،۲۲).

در سال ۲۰۰۲، Fujimoto و همکاران، نشان دادند که این افزایش بیان می‌تواند به تولید مقادیر بیشتری از آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-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 متالوپروتئیناز-۱ و در نتیجه افزایش آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ می‌انجامد. افزایش این آنزیم منجر به تخریب فزآینده 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

که تفاوت معنی‌داری در توزیع آللی و ژنوتیپی نشان نمی‌دهند (به ترتیب: P=۰/۴۹ و χ^2 =۰/۴۶۸ و P = ۰/۷۸ و χ^2=۰/۴۸۲)، مقایسه گروه کنترل و گروه متاستازی، از ارتباط و پیوستگی قوی هموزیگوتهای 2G درگروه متاستازی خبر می‌دهد (OR=۴/۱۰ ،۹۵٪ CI=۲/۱۱-۷/۹۷). ارتباط فزآینده مذکور، با مشاهده فراوانی بیشتر آلل 2G در گروه متاستازی نسبت به گروه غیرمتاستازی و کنترل همخوانی دارد.

عدم وجود تفاوت آماری در فراوانی آللی و توزیع ژنوتیپی گروه کنترل و بیماران سرطانی غیر متاستازی (-M) نشان می‌دهد که آلل 2G و لذا ژنوتیپهای واجد آلل 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 آلل 2G (OR = ۱/۶۷ و ۹۵٪ CI= ۱/۱۶-۲/۳۹) و ژنوتیپ 2G/2G (OR=۲/۱۷ و 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 وبه 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.

۵) آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ بارهایش فاکتورهای رشد اسیرشده 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 2G را در فرآیند متاستاز تأیید نمودند بلکه نشان می‌دهند افراد واجد ژنوتیپ هموزیگوت 2G با OR برابر با ۲/۵ (۷/۰-۰/۸۹=۹۵CI٪ و ۲/۵ =OR) در معرض ریسک فزآینده‌ای 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 2G 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 2G نسبت به افراد واجد گروه‌های ژنوتیپی دیگر میزان بقای کمتری دارند و به عبارتی این افراد ۳/۵ (۱۲/۵۶ - ۰/۹۷=۹۵CI٪ و ۳/۵=OR) برابر بیشتر از افراد هموزیگوت و هتروزیگوت 1G در معرض خطر مرگ قرار می‌گیرند که این امر خود می‌تواند از قش ژنوتیپ هموزیگوت 2G در فرآیند گسترش متاستاز و بدخیمی ناشی گردد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

نتیجه‌گیری

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 نوعِ درمان نشان می‌دهند و معمولاً افراد مبتلا به متاستاز گره لنفاوی (Ducks C) و همچنین تعداد اندکی از بیماران مرحله Ducks B تحت شیمی درمانی قرار می‌گیرند. لذا شناسایی افراد در معرض خطر فزآینده عود و متاستاز بیماری در کنترل سرطان روده بزرگ امری حیاتی محسوب می‌گردد(۲،۳،۴). از این رو امید است این تکنیک ساده ژنتیکی به تکنیک کارای کلینیکی در شناسایی افراد در معرض ریسک فزآینده رشد، تهاجم و عود مجدد سرطان روده بزرگ تبدیل گردد و به اتخاذ راه درمانی اختصاصی‌تر 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 حمایت‌های 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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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 produce 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 TNFdependent 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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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, Sánches 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]