

## بررسی پلی مورفیسم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ و استعداد ابتلا به سرطان مثانه

دلارام نیک فرجام<sup>۱</sup>، فرزانه تفویضی<sup>۲\*</sup>، مسعود صالحی پور<sup>۳</sup>

### 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 پلی مورفیسم 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 پلی مورفیسم (MMP-1(-1607) از روش RFLP استفاده شد. نتایج: اختلاف معنی‌داری بین فرکانس آللی 1G/1G و 2G/2G دیده نشد ( $P > 0.05$ ). همچنین ارتباطی بین پلی مورفیسم ژنتیکی و استعداد ابتلا به سرطان مثانه مشاهده نشد ( $P = 0.49$ , OR: 1.23, 95% CI (0.67 – 2.28)). نتیجه‌گیری: با توجه به عدم ارتباط پلی مورفیسم (MMP-1(-1607) و خطر سرطان مثانه، پیشنهاد می شود پلی مورفیسم‌های دیگر ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ با خطر سرطان مثانه مورد بررسی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سرطان مثانه، ماتریکس متالوپروتئیناز، پلی مورفیسم

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 پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲

## 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 فراوان‌ترین 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) و 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 پروموتور ژن MMP-1 می‌تواند روی فعالیت رونویسی آن تأثیر گذارد (۱۵). این پلی‌مورفیسم شامل حذف یا اضافه شدن یک باز گوانین در موقعیت ۱۶۰۷- جفت بازی پروموتور ژن MMP-1 است. اضافه شدن باز گوانین، سبب ایجاد یک توالی همسان برای فاکتورهای رونویسی (5'-GGAT-3') ETS می‌شود. این جایگاه در مجاورت جایگاه اتصال AP-1 در موقعیت ۱۶۰۲- قرار دارد. خانواده ETS برای القاء رونویسی احتیاج به فاکتورهای رونویسی دیگری مانند خانواده AP-1 دارند، دو جایگاه مجاور مذکور به صورت سینرژیک عمل می‌کنند و با همکاری یکدیگر سبب افزایش رونویسی از آلل 2G می‌شوند (۱۶،۱۷). در نتیجه ژنوتیپ 2G/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 فریور ۲۰- درجه

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 آلل 1G 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:

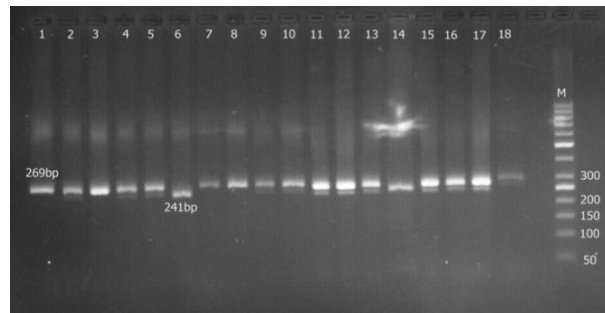
ارتباط بین پلی مورفیسم (1607-) MMP-1 و خطر ابتلا به سرطان مثانه با استفاده از روش رگرسیون لجستیک و نرم‌افزار POPGENE Ver 1.32, SPSS Ver 21 انجام شد. سن، جنس، درجه و مرحله بیماری و اندازه تومور با استفاده از Chi-square Test بررسی شد. در کلیه محاسبات سطح احتمال  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار فرض گردید و سطح اطمینان OR (odds Ratio), CI (confidence Interval), مورد محاسبه قرار گرفت.

#### نتایج

نمونه‌های ۱۵۷ بیمار در بازه سنی  $13/62 \pm 60/89$  و ۱۴۳ فرد سالم در بازه سنی  $16/41 \pm 60/40$  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

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 در  $12000 \text{ rpm}$  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 سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر cell lysis solution 3 به مخلوط اضافه شد و نمونه‌ها در  $12000 \text{ rpm}$  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، 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 پلی مورفیسم

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، ۱۳، ۱۵، 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٪)	-

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

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 [OR:3.25,95%CI (2.01-5.26) و P=0.0001]. با توجه به

مثانه بررسی شد. نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به عدد P-value های 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.

داشت ولی اختلاف معنی‌داری در فرکانس آللی مشاهده نشد ( $P=0/37$ ). دو جمعیت سالم و بیمار مورد مطالعه در حال تعادل می‌باشند ( $P=0/66$ ). ارتباط بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و خطر ابتلا به سرطان

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

( $P>0/05$ ). با توجه به P-Value های محاسبه شده برای دو گروه استیج (Ta,T1)، (T2,T3) در بین سه گروه ژنوتیپ رابطه معنی‌داری بین استیج و نوع ژنوتیپ دیده نشد ( $P>0/05$ ).

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 ( $P>0/05$ ). ارتباط معنی‌داری بین درجه بیماری و ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد

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

معیارها	ژنوتیپ‌ها			
	1G1G	1G2G	2G2G	
مصرف دخانیات	افراد بیمار	۱۸	۳۳	۳۸
	بله	۶	۱۷	۱۸
	افراد سالم	۱	۰/۶۴ (۰/۲۱-۱/۹)	۰/۷ (۰/۲۳-۲/۱)
	OR (% 95 CI)			
اندازه تومور	عدد P		۰/۴۳	۰/۵۲
	خیر	۱۲	۲۱	۳۵
	افراد بیمار	۲۴	۳۷	۴۱
	افراد سالم	۱	۱/۱۳ (۰/۴۷-۲/۷)	۱/۷۰ (۰/۷۴-۳/۹)
گرید بیماری	عدد P		۰/۷۷	۰/۲
	$\geq 3$	۱۸	۲۷	۳۲
	$< 3$	۱۲	۲۷	۴۱
	OR (% 95 CI)	۱	۰/۶۶ (۰/۲۷-۱/۶)	۰/۵۲ (۰/۲۲-۱/۲)
مرحله بیماری	عدد P		۰/۳۷	۰/۱۳
	High	۱۵	۳۰	۴۰
	Low	۱۵	۲۴	۳۳
	OR (% 95 CI)	۱	۱/۲۵ (۰/۵۱-۲/۸)	۱/۲۰ (۰/۵۱-۲/۸)
مرحله بیماری	عدد P		۰/۶۲	۰/۶۵
	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	

## بحث

بیش از ۹۰٪ تومورهای مثانه سرطان ترانزیشنال هستند و در تمامی آن‌ها پلی‌مورفیسم ژنتیکی مشهود است (۱۸،۱۹). تحقیقات نشان داده است که پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژنتیکی در ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی مانند آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز ممکن است در سرطان مثانه نقش داشته باشند (۲۰). آنزیم کلاژناز فیروبلاستی عضوی از خانواده بزرگ آنزیم‌های پروتئاز 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 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 وارپته ژنتیکی در پروموتور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ قرار بگیرد. در واقع دخول یک بازگوانین در موقعیت 1607 - جفت بازی پروموتور که پلی‌مورفیسم 2G 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 توموری نسبت به پلی‌مورفیسم 1G است که تنها واجد یک گوانین در این موقعیت بوده و لذا فاقد توالی همسان برای ETS است (-GAT-5' 3')؛ بنابراین پلی‌مورفیسم 2G می‌تواند به عنوان یک فاکتور مؤثر تسهیل‌کننده فاکتورهای رونویسی در رشد و پیشرفت تومور محسوب گردد (۲۳). پلی‌مورفیسم‌ها، ارائه‌دهنده تنوع کدهای ژنتیکی در جمعیت می‌باشند که متداول‌ترین پلی‌مورفیسم‌ها، پلی

مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) ها می‌باشند. نشان داده شده است که پلی‌مورفیسم در ناحیه پروموتوری ژن‌ها، مثل آلل 2G در ژن (1607)-MMP-1، با انواع بدخیمی‌ها و سرطان‌ها مرتبط است (۲۵). در ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۱، آلل 2G با ایجاد یک جایگاه فعال رونویسی، فعالیت قابل توجه و بیشتری نسبت به آلل 1G داشته و باعث افزایش ریسک بعضی از سرطان‌ها از جمله دهان، کلورکتال، کلیه و سر و گردن می‌باشد (۲۶،۲۷). حتی در سرطان‌های تخمدان و کلورکتال، حضور آلل 2G به طور قابل توجهی با کاهش طول عمر بیمار ارتباط داشت (۲۸،۲۹) (۳۲،۳۳). Hirata و همکاران در سال ۲۰۰۳، گزارش کردند که فرکانس ژنوتیپ 2G/2G 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 پلی‌مورفیسم‌های (1607)-MMP-1 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 اشاره شده است و در بعضی مطالعات به عدم ارتباط پلی‌مورفیسم و افزایش ریسک سرطان مثانه اشاره دارند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن (1607)-MMP1 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٪) ۳۳ نفر 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 آلی و ریسک سرطان مثانه دیده نشد [OR:1.16, 95%CI(0.83-1.6), P=0.37]. ارتباطی نیز بین پلی مورفیسم ژنتیکی و خطر بروز سرطان مثانه در این تحقیق مشاهده نشد. در انتها با توجه به اعداد و نتایج به دست آمده ارتباطی بین پلی مورفیسم ژن MMP-1(-1607) و خطر ابتلا به سرطان مثانه در افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان هاشمی‌نژاد دیده نشد.

از جمله 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 پلی مورفیسم متالوپروتئینازهای ۱،۲،۳،۸،۹،۱۲ و سرطان مثانه را بررسی کردند. آن‌ها این مطالعه را در جمعیت اروپایی‌ها 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 پلی مورفیسم 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 پلی مورفیسم‌های ۱،۲،۳،۷،۹ MMP-1 را در خطر ابتلا به سرطان مثانه بررسی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که بیان هتروزیگوت پلی مورفیسم 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 آلی 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 پلی مورفیسم MMP-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 پلی مورفیسم MMP-1(-1607) تنها در شرایط و مدل مغلوب یعنی ۲G2G 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 پلی مورفیسم 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 ژنوتیپ ۲G/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=۰.۰۰۰۱] به طور کلی این تحقیق حاکی از ارتباط پلی مورفیسم MMP-۱(-۱۶۰۷) حساسیت‌پذیری در برابر سرطان

مثانه بود (۳۶). 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. پیشنهاد می‌شود که این پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های آماری بزرگ‌تر مورد بررسی قرار گیرد. همچنین سایر پلی‌مورفیسم‌های مربوط به ژن MMP-۱ و احتمال خطر سرطان مثانه مطالعه شود. نتیجه‌گیری در این مطالعه ارتباطی بین ژنوتیپ‌ها و افزایش خطر ابتلا به

## 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, Kiemeny 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 patients*. 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. *Interstitial 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.

- 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 metalloproteinase-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, Brinckerhoff 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 metalloproteinase-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*. Cardiovasc 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 chine 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 patients 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 aggressiveness 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-12 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, Grzegorzcyk 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 Metalloproteinase-1 and 7 in North Indian Population*. Hindawi 2010; 29: 37-46.
- 33- Tasci AL, Tugcu V, Ozbek E, Ozbay B, Simsek A, Koksall V. *A single-nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances bladder cancer susceptibility*. BJU International 2008;101(4): 503-7.

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

Delaram Nikfarjam <sup>1</sup>, Farzaneh Tafvizi <sup>\*2</sup>, Masoud Salehipoure <sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> 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 alleles ( $P>0.05$ ). 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

#### 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