

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ناحیه ۱۱۳۷۷- ژن ادیونکتین و خطر ابتلاء به سرطان سینه پس از یائسگی

لیلا کهن^{۱*}، فاطمه محمدی^۱، محمد محمدیان پناه^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان

۲. گروه رادیوتراپی آنکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

چکیده/ سرطان سینه یکی شایع ترین بیماری های زنان با شیوع ۰/۱۵ درصد در ایران است. پژوهش ها حاکی از آن است که ادیونکتین های مترشح از بافت چربی در ارتباط با خطر ابتلاء به سرطان سینه می باشند. ادیونکتین هورمونی ترشح شده از ادیوسیت هاست که اخیراً مشخص شده سطح سرمی آن ارتباط معکوسی با خطر ابتلاء به سرطان سینه پس از یائسگی دارد. پلی مورفیسم های ژنتیکی در ناحیه پروموتور ژن ادیونکتین با تغییر سطح سرمی ادیونکتین همراه هستند. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم G/C ۱۱۳۷۷- در ژن ادیونکتین و خطر ابتلاء به سرطان سینه پس از یائسگی در زنان ایرانی می باشد. نمونه های خون از ۱۰۰ فرد مبتلا به سرطان سینه پس از یائسگی (میانگین سنی ۵۴/۸±۱۰/۱) و ۱۰۰ فرد سالم (میانگین سنی ۵۵/۳±۶/۷) جمع آوری گردید که از لحاظ سن و جنس با گروه بیمار همسان سازی شدند. تعیین ژنوتیپ به کمک روش PCR-RFLP انجام شد. در حالت غالب برای آلل G، مقایسه بین ژنوتیپ های GG + GC در مقابل ژنوتیپ CC، مشخص شد که ژنوتیپ های GG + GC با خطر ابتلا به سرطان سینه پس از یائسگی همراه می باشد (P= 0.03 و 17.6%-95CI= 1.2 و OR= 4.6). در نتیجه آلل G می تواند به عنوان آلل غالب عمل کرده و خطر ابتلا به سرطان سینه پس از یائسگی را افزایش دهد.

واژگان کلیدی: سرطان سینه؛ یائسگی؛ پلی مورفیسم ژنتیکی؛ ادیونکتین؛ پیوستگی.

مقدمه

با سه عامل خطر سن شروع قاعدگی، سن یائسگی و سن در اولین بارداری در ارتباط است که حاصل تغییرات ترشح استروژن می باشد (۲). میزان مواجهه با استروژن در طول زندگی، نقش مهمی در تعیین خطر ابتلاء به سرطان سینه ایفا می کند به همین دلیل، قاعدگی زودرس و یائسگی دیررس از عوامل خطر ابتلا به سرطان سینه هستند چرا که فرد در طول زندگی خود، مدت بیشتری در معرض استروژن بوده است. چاقی نیز عامل خطر دیگری برای سرطان سینه بشمار می رود، به خصوص اگر

بافت سینه انسان مراحل متعددی از تکثیر، تمایز و پسرفت را طی می کند که توسط تغییر در سطح هورمون در گردش خون و طی دوره های قاعدگی و کهولت ایجاد می شود. هورمون های تخمدانی و به خصوص استروژن، نقش کلیدی در سبب شناسی سرطان سینه ایفا می کند (۱). استروژن نقش بسیار مهمی در ایجاد و پیشرفت سرطان سینه به عهده دارد، این تاثیر

* لیلا کهن، PhD

استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران

پست الکترونیک: kohan@iaua.ac.ir

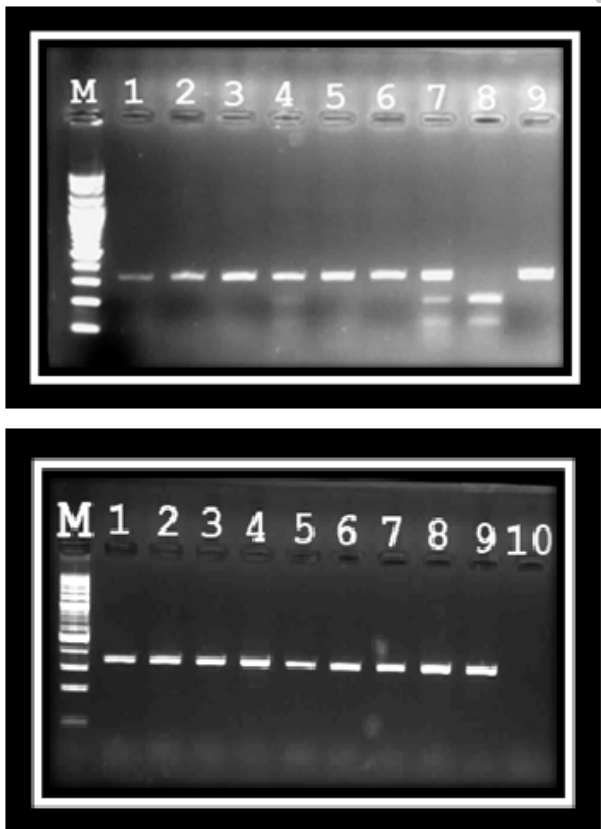
تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۵ • تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۸

و گروه شاهد نیز از افراد سالم جامعه انتخاب شدند. در ابتدا افراد رضایت خود را با پر کردن فرم رضایتنامه جهت انجام مراحل مختلف طبق دستورالعمل های اخلاقی اعلام کردند. به منظور تعیین ژنوتیپ، ۵ سی سی خون از افراد گرفته شد و درون تیوپ های حاوی EDTA منتقل گردید. نمونه های جمع آوری شده به همراه پرسشنامه ای که در آن قومیت، میزان فعالیت، قد و وزن، سابقه ابتلا به دیابت افراد ذکر شده بود، به آزمایشگاه منتقل و در دمای 20°C نگهداری شد. پس از استخراج DNA از خون محیطی به روش جوشان جهت تعیین ژنوتیپ از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. توالی پرایمرها، دمای اتصال پرایمر و اندازه محصول PCR در جدول ۱ آمده است.

اندازه محصول	دمای اتصال	پرایمر	پلی مورفیسم
۳۳۴bp	55°C	F: 5'-GGTGGACTTGACTTACTGG-3' R: 5'-TAGAAGCAGCCTGGAGAA-3'	-11377 C/G

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

شکل ۱



چاقی پس از سنین یائسگی باشد چرا که در این سنین بافت چربی منبع اصلی تولید استروژن در بدن است و بدن افراد چاق در معرض استروژن بیشتری قرار می گیرد (۳). ادیپونکتین از جمله پروتئین هایی است که از بافت چربی ترشح شده و به عنوان یک ادیپوکین حساس به انسولین عمل می کند. سطح سرمی ادیپونکتین در افراد چاق و در افراد مبتلا به دیابت کاهش چشمگیری را نشان می دهد (۴). بعلاوه، ادیپونکتین در تنظیم ترشح استروژن، فاکتور نکروز تومور (TNF) نیز شرکت می کند (۵). ژن ادیپونکتین که *ADIPOQ* نامیده شده، با اندازه ۱۷kb، روی کروموزوم 3q27 قرار گرفته است. این ژن دارای سه اگزون و دو اینترون می باشد (۶).

بیش از ۱۰ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن ادیپونکتین گزارش شده است؛ این در حالی است که مطالعات مرتبط با نقش این پلی مورفیسم ها در تغییر سطح بیان ژن و ابتلا به بیماریها، بیشتر بر روی ۵ پلی مورفیسم rs266729 (در ناحیه پروموتور)، rs822396 و rs822395 (در اینترون ۱)، rs1501299 (در اگزون ۲) و rs2241766 (در اینترون ۲) متمرکز شده اند (۷). ادیپونکتین از طریق چندین مکانیسم از جمله مهار رشد سلولی، اثر پروآپتوزی با تنظیم Bak، Bcl2، P53، اثرات ضد آنژیوژنزی، تنظیم سایتوکین های التهابی و بهبود مقاومت به انسولین مانع رشد سلولهای توموری سینه می گردد (۸،۱۲). سطح ادیپونکتین پلاسما در زنان مبتلا به سرطان سینه بخصوص پس از یائسگی، به طور قابل توجهی کاهش می یابد (۱۳،۱۴). با این وجود تعداد معدودی از مطالعات ارتباط بین واریانت های ژنتیکی در ژن ادیپونکتین و خطر ابتلا به سرطان سینه را بررسی کردند، لذا در این تحقیق ارتباط بین پلی مورفیسم ژنتیکی G/C-11377 در ژن ادیپونکتین و خطر ابتلا به سرطان سینه پس از یائسگی بررسی شد.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۰۰ زن (۱۰۰ فرد مبتلا به سرطان سینه پس از یائسگی و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد) بودند که از لحاظ سن (± 6 ماه)، جنس و قومیت همسان سازی شدند. مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده که نمونه های بیماران از بخش شیمی درمانی بیمارستان خمazy شیراز جمع آوری گردید

جدول ۲: ارتباط بین ژنوتیپ ها و خطر ابتلا به سرطان سینه

ژنوتیپ	سالم (%)	بیمار (%)	OR(95% CI)	P
CC	۹۳	۷۴	۰/۲۱(۰/۰۶-۰/۸۳)	۰/۰۳
CG	۷	۲۴	۴/۲(۱/۱-۱۶)	۰/۰۴
GG	۰	۲		
CG + GG	۷	۲۶	۴/۶(۱/۲-۱۷/۶)	۰/۰۳

بحث و نتیجه گیری

ادیپونکتین از بافت چربی ترشح شده و یکی از ادیپوسیتوکین هایایی است که اثرات متابولیکی مهمی را در بدن داراست. این ادیپوسیتوکین دارای خواص ضد التهابی، ضد تکثیر، آنتی آتروژن و حساس کننده به انسولین می باشد (۴). سطح سرمی ادیپونکتین در چاقی و بیماری های همراه شده با بدخیمی های خاصی، کاهش می یابد (۱۵).

مطالعات متعددی نشان دادند که سطح پایین ادیپونکتین در سرم، با افزایش خطر ابتلا به سرطان سینه همراه است (۱۳،۱۴،۱۶،۱۷). مشخص شده است که ارتباط بین سطح ادیپونکتین و احتمال بروز سرطان سینه به وضعیت یائسگی بستگی دارد. در زنانی که در دوره پس از یائسگی قرار دارند شواهدی مبنی بر ارتباط قابل توجه بین کاهش ادیپونکتین و وقوع سرطان سینه مشاهده می شود (۱۸،۱۹).

از آنجایی که سطح هورمون های جنسی به عنوان ریسک فاکتور شناخته شده ای برای سرطان سینه مطرح می باشد، ارتباط بین سطح ادیپونکتین سرمی و خطر ابتلا به سرطان سینه در دوران قبل و بعد از یائسگی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۳،۱۸). در مطالعه Mantzoros و همکاران گزارش شده که علی رغم ارتباط نسبتاً قوی که بین ادیپونکتین و سرطان سینه پس از یائسگی وجود دارد (OR:0.82, 95%CI: 0.67-1)، ارتباط معنی داری بین ادیپونکتین و سرطان سینه قبل از یائسگی مشاهده نمی شود (۱۳)؛ همچنین مطالعه Miyoshi و همکاران در سال ۲۰۰۴ گویای آن است که غلظت پایین ادیپونکتین سرم در زنان پس از یائسگی خطر ابتلا به سرطان سینه را افزایش می دهد (OR: 3.63, 95%CI: 1.61-819, P<0.005) (۱۷).

اثر هورمون های جنسی روی سطح ادیپونکتین می تواند دلیل این ارتباط را توضیح دهد زیرا که غلظت ادیپونکتین سرمی

پس از واکنش PCR، جهت انجام تکنیک RFLP، محصولات PCR توسط آنزیم *HhaI* هضم آنزیمی شدند. با الکتروفورز نمونه ها روی ژل آگارز ۲٪، ژنوتیپ CC باند ۳۳۴، ژنوتیپ CG باندهای ۳۳۴ و ۲۱۲ و ۱۲۲ و ژنوتیپ GG باندهای ۲۱۲ و ۱۲۲ را خواهند داشت (شکل ۱). ارتباط بین ژنوتیپ ها و خطر ابتلا به بیماری، توسط آنالیز آماری رگرسیون لجستیک، محاسبه OR با فاصله اطمینان ۹۵٪ به کمک نرم افزار SPSS و پیرایش ۱۸ بررسی شد.

یافته ها

در این مطالعه مورد-شاهدی تعداد ۲۰۰ زن انتخاب شدند که ۱۰۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان سینه پس از یائسگی و ۱۰۰ نفر سالم بودند. میانگین سنی افراد بیمار $54/8 \pm 10/1$ و میانگین سنی افراد سالم $55/3 \pm 6/7$ بود. توزیع دقیق ژنوتیپ ها در دو گروه سالم و بیمار در جدول ۲ آمده است.

فراوانی ژنوتیپ GG در جمعیت مورد مطالعه بسیار کم بوده به طوری که فراوانی این ژنوتیپ در افراد بیمار ۲٪ بوده و در افراد سالم این ژنوتیپ مشاهده نمی شود، بنابراین نسبت شانس (OR) برای این ژنوتیپ قابل محاسبه نمی باشد. اختلاف قابل توجهی در توزیع ژنوتیپ CG بین افراد سالم و بیمار وجود دارد (سالم ۷٪ و بیمار ۲۴٪). نتایج حاصل از آنالیز داده ها نشان می دهد که ژنوتیپ CG خطر ابتلا به بیماری را افزایش می دهد (OR:4.2, 95%CI:1.1-16, p=0.04). فراوانی آلل G و C در گروه بیمار به ترتیب ۰/۱۴ و ۰/۸۶ و در گروه سالم به ترتیب ۰/۰۳۵ و ۰/۹۶۵ می باشد.

نتایج نشان می دهد که ناقلین آلل G (ژنوتیپ های CG+GG) نسبت به افراد واجد ژنوتیپ CC در ریسک بیشتری برای ابتلاء به بیماری می باشند (P= 0.03 و OR= 1.2-17.6 و 95%CI= 0.67-1). همچنین چنانچه آلل C به عنوان مغلوب در نظر گرفته شود، ژنوتیپ CC در مقایسه با سایر ژنوتیپ ها اثر حفاظتی بر بیماری دارد (OR:0.21, 95%CI: 0.06-0.83, p=0.03).

ارتباط منفی قابل توجهی با غلظت استرادیول سرمی در زنان پس از یائسگی دارد (۲۰).

وجود پلی مورفیسم هاپی در ژن ادیونکتین می تواند سطح سرمی آن را در پلاسما تغییر دهد (۷). Qi و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که پلی مورفیسم G/C۱۱۳۷- در ژن ادیونکتین با سطح سرمی این ادیوسیتوکین در ارتباط بوده و ژنوتیپ GG با کاهش سطح ادیونکتین همراه است (۲۱). در این تحقیق ارتباط بین این پلی مورفیسم و استعداد ابتلا به سرطان سینه پس از یائسگی بررسی شد.

نتایج نشان داد که افراد واجد آلل G (ژنوتیپ CG+GG) نسبت به افراد واجد ژنوتیپ CC در خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان سینه پس از یائسگی هستند ($P=0.03$ و $OR=1.2$ ، $95\%CI=1.2$ و $OR=4.6$). همچنین با در نظر گرفتن آلل C در حالت مغلوب، ژنوتیپ CC اثر حفاظتی بر ابتلا به بیماری دارد ($OR:0.21$ ، $95\%CI: 0.06-0.83$ ، $p=0.03$). ارتباط بین پلی مورفیسم G/C ۱۱۳۷- و خطر ابتلاء به سرطان سینه در نیویورک توسط Kaklamani و همکاران نیز بررسی شده که نتایج ارتباط معنی داری را نشان نمی دهد؛ در این مطالعه وضعیت یائسگی افراد مورد توجه قرار نگرفته است (۷).

در مطالعه دیگری که توسط Teras و همکاران بر روی نژادهای سفید و سیاه آمریکایی صورت گرفته، گزارش شده است که ارتباط آماری معنی داری بین این پلی مورفیسم و خطر ابتلا

به سرطان سینه پس از یائسگی وجود ندارد (۲۲). با توجه به تفاوت ژنتیک جمعیت ها و شیوه زندگی افراد در جمعیت های مختلف، پیشنهاد می شود که با در نظر گرفتن ارتباط هورمون های جنسی با خطر ابتلا به سرطان سینه و همچنین ارتباط تنگاتنگی که بین ادیونکتین و هورمون های جنسی دوران یائسگی وجود دارد، این مطالعه در جمعیت های دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مطالعه حاکی از این است که افراد حامل آلل G در جایگاه ۱۱۳۷- ژن ادیونکتین نسبت به افراد واجد ژنوتیپ CC در این جایگاه در ریسک بالاتری برای ابتلا به سرطان سینه پس از یائسگی می باشند. بنابراین این پلی مورفیسم می تواند به عنوان یک مارکر مولکولی جهت تشخیص افراد در خطر ابتلا به سرطان سینه پس از یائسگی به کار رود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد که بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، جهت تامین هزینه های مالی و تجهیزات مورد نیاز، کلیه پرسنل محترم بخش شیمی درمانی بیمارستان نمازی شیراز جهت همکاری در جمع آوری نمونه های مورد نیاز و کارشناس محترم آزمایشگاه ژنتیک سرکار خانم نجمه نوروزی بابت همکاری صمیمانه در پیشبرد این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

References / منابع

1. Eigeliene N, Harkonen P, Erkkola R. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. *BioMed Central Cancer* 2006; 6: 246.
2. Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Research* 2004; 6(1): 39-52.
3. Huang J, Li X, Hilf R, Bambara RA, Muyan M. Molecular basis of therapeutic strategies for breast cancer. *Current Drug Targets Immune Endocrine and Metabolic Disorders* 2005; 5(4): 379-396.
4. Guzel S, Yalcin A. Adiponectin and its protective effects. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 2012; 6(17): 135-39.
5. Rose DP, Komninou D, Stephenson GD. Obesity, adipocytokines and insulin resistance in breast cancer. *Obesity Reviews* 2004; 5(3): 153-165
6. Biswas D, Vettriselvi V, Choudhury J, Jothimalar R. Adiponectin gene polymorphism and its association with type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2011; 26(2):172-177.
7. Kaklamani VG, Sadim M, Hsi A, et al. Variants of the adiponectin and adiponectin receptor 1 genes and breast cancer risk. *Cancer Research* 2008; 68(9): 3178-3184.
8. Chen X, Wang Y. Adiponectin and breast cancer. *Medical Oncology* 2011; 28(4): 1288-1295.
9. Kang JH, Lee YY, Yu BY, et al. Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Archive of Pharmacal Research* 2005; 28(11): 1263-1269.
10. Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 345(1): 271-279.
11. Wang Y, Lam JB, Lam KS, et al. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MMDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Research* 2006; 66: 11462-11470
12. Arditi JD, Venihaki M, Karalis KP, Chrousos GP. Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Hormone and Metabolic Research* 2007; 39(1): 9-13.
13. Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89(3):1102-1107.
14. Chen DC, Chung YF, Yeh YT, et al. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Letters* 2006; 237(1): 109-114.
15. Stephenson GD, Rose DP. Breast cancer and obesity: an update. *Nutrition Cancer* 2003; 45(1): 1-16.
16. Korner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A. Total and high-molecular weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92(3): 1041-1048.
17. Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clinical Cancer Research* 2003; 9(15): 5699-5704.
18. Hou WK, Xu YX, Yu T, et al. Adipocytokines and breast cancer risk. *Chinese Medical Journal (Engl)* 2007; 120(18): 1592-6.
19. Tworoger SS, Eliassen AH, Kelesidis T, et al. Plasma adiponectin concentrations and risk of incident breast cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 1510-1516.
20. Miyatani Y, Yasui T, Uemura H, et al. Association of circulating adiponectin with estradiol and monocyte chemoattractant protein-1 in postmenopausal women. *Menopause* 2008; 15(3): 536-541.
21. Qi L, Doria A, Manson JE, et al. Adiponectin genetic variability, plasma adiponectin, and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55(5): 1512-1516.
22. Teras LR, Goodman M, Patel AV, et al. No association between polymorphism in LEP, LEPR, ADIPOQ, ADIPOR1, or ADIPOR2 and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2009; 18(9): 2553-2557.

ABSTRACT

Association of the -11377 Adiponectin Gene Polymorphism with the Risk of Postmenopausal Breast Cancer

Leila Kohan*, Fatemeh Mohammadi, Mohammad Mohammadian Panah

Breast cancer is the most common malignancy in women with a prevalence of 0.15% in Iran. Adipokines produced by the adipose tissue have been studied in relation to the risk of breast cancer. Adiponectin is an adipocyte-secreted hormone. The inverse correlation between serum adiponectin levels and the risk of postmenopausal breast cancer has been recently documented. Genetic polymorphisms in the promoter region of the adiponectin gene are associated with the differences in adiponectin serum levels. The purpose of this study was to explore the relationship between -11377 G/C adiponectin gene polymorphism and the risk of postmenopausal breast cancer in Iranian patients.

Blood samples of 100 females with postmenopausal breast cancer (age rang: 54.8 ± 10.1) and 100 age- and sex-matched healthy individuals (age rang: 55.3 ± 6.7) were collected. The genotypes were determined using a polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. In the dominant effect of the G allele (comparison between GG + GC vs. CC), the GG+GC genotypes were associated with the risk of postmenopausal breast cancer (OR= 4.6, %95CI= 1.2-17.6, P= 0.03). It is concluded that the G allele may act as a dominant allele to increase the risk of postmenopausal breast cancer.

Key words: Breast Neoplasms; Menopause; Polymorphism, Genetic; Adiponectin; Association

*** Leila Kohan, PhD**

Assistant professor, Department of biology, Arsanjan branch, Islamic azad university, Arsanjan, Iran

Email: kohan@iaua.ac.ir

Submission Date: 16. July. 2013 • Acceptance Date: 9. Sep. 2013