Archive of SID

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی جهش های ژن p53 در بیماران مبتلا به سرطان پستان با روش غیر رادیواکتیو PCR - SSCP

کتایون اعتمادی *، دکتر پروین مهدی پور **

چکیده:

تغییرات ژن p53 به عنوان فاکتور پیش آگاهی دهنده مفید در پیشگیری و درمان سرطان پستان محسوب می شود لذا این مطالعه مولکولی با هدف تعیین جهش های ژن p53 انجام گرفت.

در این مطالعه جهش های ژن p53 در دو اگزون ۶ و ۷ با روش غیر رادیواکتیو (PCR-SSCP) Polymerase Chain Reaction Single Strand Conformation Polymorphism مورد بررسی قرار گرفت و میزان جهش با عوامل هیستوپاتولوژیکی تومور و وجود پیشینه فامیلی و سن بیماران با آزمون آماری Fisher exact مقایسه شد. ۲٤ بیمار مبتلا به سرطان پستان اولیه انتخاب گردید. نمونه ها بعد از تشخیص پاتولوژی و بررسی وجود پیشینه فامیلی برای سرطان جهت استخراج DNA مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA با دو روش فنل کلروفرم و Boiling انجام گردید. در مرحله بعد با انتخاب پرایمرها و چرخه گرمایی مناسب دو اگزون ۶ و ۷ با واکنش PCR تکثیر گردید. سپس محصول PCR با روش SSCP مورد بررسی و در نهایت با نیترات نقره رنگ آمیزی و مطالعه شد.

نتایج بدست آمده حاکی است که۴۵/۸٪ بیماران زیر ۳۵ سال سن داشتند. تشخیص پاتولوژیکی در ۸۳/۳٪ موارد (Infiltrating Ductal Carcinoma) IDC و بقیه موارد از نوع (Infiltrating Lobular Carcinoma) ILC بود، وقوع سرطان در پیشینه فامیلی در ۶۶/۶٪ موارد منفی بود. میزان جهش در اگزون ۶ (۸٪) و در اگزون ۷ (۱۶/۶٪) و در کل ۲۵٪ مشاهده گردید. میزان جهش در ژن p53 با هریک از فاکتورهای فوق الذکر جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که ارتباط معنی داری در هیچیک از موارد مشاهده نگردید.

نکته قابل توجه میزان بالای جهش در ژن p53 است که تأکیدی بر نقش مهم این ژن در روند تومورزایی سرطان پستان است.

کلید واژه ها: ژن p53 / سرطان پستان / واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه:

سرطان پستان مهمترین نئوپلاسم درزنان است که سبب مرگهای مرتبط با سرطان بین زنان در اغلب کشورهای پیشرفته و بسیاری از کشورهای درحال توسعه می شود(۱).

سرطان پستان ۳۲٪ از کل موارد سرطان زنان را تشکیل می دهد و مسئول ۱۹٪ از مرگ و میرهای ناشی از سرطان در زنان است . در سال ۱۹۷۰ احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان یک در ۱۳ و در سال ۱۹۸۰ یک در۱۱ و

* عضو هیأت علمی گروه پاتولوژی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** دانشیار گروه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.SID.ir

Archive of SID

در سال ۱۹۹۲ این احتمال یک در ۹ بوده است (۲).

یکی از عوامل مهم در بروز سرطان پستان تغییرات ژنتیکی است . یک تغییر ژنتیکی مهم در سرطان پستان غیرفعال شدن ژنهای سرکوبگر تومور (Tumor Suppressor Genes) می باشد . در سرطان های پستان و رده های سلولی تومور جهش در ژن p53 که یک ژن سرکوبگر تومور است روی کروموزوم 17P مشاهده میشود (۳).

یافتن حذف آلل p53 و یا جهش در ژن p53 در تومورهای مهم انسان تأکیدی براین نکته است که جهش در ژن p53 عاملی مرکزی برای سرطان زایی است . اهمیت نقش جهش های ژن p53 در پیدایش سرطان پستان شناخته شده است و یافته های متعدد در نقاط مختلف دنیا نیز از نقش و اهمیت p53 حمایت می کند (۴). با توجه به افزایش روزافزون بروز سرطان پستان در جوامع مختلف و از جمله در کشور ما ، لزوم یک مطالعه مولکولی پیرامون سرطان پستان ضروری می نمود . شایان ذکر است که پیشگیری و درمان سرطان با درک بیشتر خصوصیات ملکولی آن امکان پذیر است . مطالعات به عمل آمده جهش در ژن p53 را در ۵۰-۱۵ درصد سرطان های پستان گزارش نموده اند . از آنجا که تومورهای پستان با جهش در ژن p53 اغلب بطور تهاجمی تر عمل می نمایند ارزش p53 به عنوان یک فاکتور آگاهی دهنده مورد توجه قرار گرفته است . در مجموع بیش از ۹۰٪ جهشهای ژن p53 در بین کدونهای ۳۷۰-۱۱۰ واقع می گردد که شامل اگزونهای ۸-۵ می باشد(۵).

در این مطالعه هدف تشخیص و بررسی جهش های احتمالی ژن p53 در دو اگزون ۶ و ۷ و رابطه آن با عوامل هیستوپاتولوژیکی تومور ، سن بیماران و وجود پیشینه فامیلی در بیماران مبتلا به سرطان پستان اولیه می باشد . این شناسایی ضمن پیش بینی احتمال متاستاز در بیمار در اتخاذ روشهای درمانی مناسب جهت شیمی درمانی و پاسخ بهتر به این روشها می تواند مناسب و شایسته باشد.

روش کار:

جهت بررسی جهش های ژن p53 از روش PCR- SSCP استفاده گردید . با استفاده از تکنیک PCR قطعه ای از ژن را به دلخواه تا میلیونها برابر تکثیر کرده و در روش SSCP یا روش چند شکلی فضایی تک رشته تغییرات زنجیره را در ساختمان سوم DNA تک رشته تشخیص می دهیم(۶).

نمونه گیری : نمونه های بررسی شده از بین بیماران مشکوک به ابتلا به سرطان پستان که در بیمارستانهای امام خمینی و دی تهران برای اولین بار جراحی شده اند انتخاب گردید. ۲۴ نمونه بعد از تشخیص پاتولوژی ، بررسی از نظر سن بیماران و وجود پیشینه فامیلی برای سرطان در بلوکهای فیکس شده در پارافین به بخش ژنتیک تحویل گردید . برای استخراج DNA از دو روش جوشانیدن (Boiling) و فنل -کلروفرم استفاده گردید . جهت اطمینان از خلوص DNA های استخراج شده ، کیفیت و کمیت DNA با دو روش اسپکتروفتومتری و روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی گردید چرا که لازمهٔ یک PCR موفقیت آمیز داشتن DNA خالص به مقدار کافی است .

روش انجام PCR : برای تکثیر دو اگزون ۶ و ۷ به پرایمرهای ویژه هر یک از اگزونها نیاز بود . اگزون ۶ از ۱۱۴ جفت باز و اگزون ۷ از ۱۱۱ جفت باز تشکیل شده اند . برای انتخاب و تأئید آغازگرهای مورد نیاز از طریق ورود به شبکهٔ کامپیوتری بانک ژن ، توالی کامل ژن p53 انسانی دریافت و توالی پرایمرهای انتخاب شده با توالی نقشه ژن مربوطه مطابقت داده شد. Primers ، توسط دستگاه Applied Biosystem model 391 DNA synthesisear و در انگلستان سنتز شده است . سپس برای حصول بهترین نتیجه PCR ، چرخه گرمایی مناسب برای ایجاد شرایط اپتیمم جهت PCR و تکثیر اگزون های مورد نظر انتخاب گردید . ابتدا در هر میکروتیوپ نیم میلی لیتری ، ۱۷µl مخلوط واکنش PCR ریخته و به آن ۱میکرولیتر ازپرایمرهای رقیق شده مربوط به اگزون های مورد نظر اضافه گردید . سپس ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq polymerase به هر یک از تیوپها افزوده ، ۴-۳ میکرولیتر از DNA تخلیص شده ژنومی هر بیمار به مخلوط واکنش افزوده ، کاملا مخلوط گردید . در انتها ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی برای جلوگیری از تبخیر نمونه ها در حرارت دستگاه به آن افزوده شد . دمای مناسب برای واسرشتی DNA ، حدود ۹۴° C ، دمای مناسب برای اتصال پرایمرها

www.SID.ir

Archive of SID

۶۲° C و دمای تکثیر DNA ، ۷۲° C می باشد . تعداد ۳۰ چرخه حرارتی برای انجام واکنش و تکثیر قطعات مورد نظر کافی بود .

الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز : محصول تکثیر شده برای تأئید اندازه قطعه مورد نظر و اختصاصی بودن آن روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید . برای این امراز شاخص مولکولی DNA (مارکر VIII) استفاده شد. نمونه ها را الکتروفورز و سپس با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی و با استفاده از نور UV نتیجه کار بررسی شد.

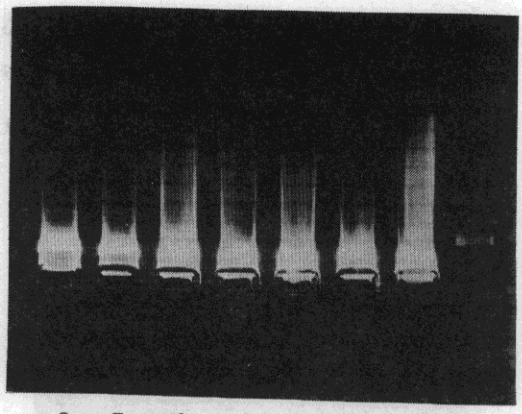
الکتروز فوزر SSCP : ابتدا محصول PCR را با SSCP Loading buffer مخلوط کرده ، ۲۰μl روغن معدنی روی تیوب ها افزوده و نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵° C واسرشته گردید . نمونه ها سریعاً در یخ قرار داده شد تا از اتصال مجدد DNA های تک رشته به یکدیگر جلوگیری گردد. سپس ۵ μl از هریک از نمونه ها را به داخل چاهک های ژل MDE (Mutation Detection Enhancment) که توسط کمپانی AT Biochem برای SSCP طراحی گردیده است ریخته در کنار آنها شاخص مولکولی DNA و یک نمونه DNA دو رشته ای (Undenature) را قرار داده و با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت ۲۰ ساعت الکتروفورز گردید . در زمان الکتروفورزبافر TBE قسمت بالا و پائین ژل را می پوشاند . پس از پایان الکتروفورز نمونه ها با نیترات نقره (Silver staining) رنگ آمیزی شد و نتایج بررسی گردید.

اطلاعات بدست آمده به کمک آزمون دقیق فیشر تست گردید و سپس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج :

براساس این بررسی ۴۵/۸۳٪ بیماران مورد مطالعه سن زیر ۳۵ سال داشتند. وقوع سرطان در پیشینهٔ فامیلی در ۶۶/۶۶٪ موارد مثبت و در ۳۳/۳۴٪ موارد منفی ، تشخیص پاتولوژیکی بیماری در ۸۳/۳٪ موارد IDC (Infiltrating Ductal Carcinoma) و در بقیه موارد از نوع ILC (Infiltrating Lobular Carcinoma) بودند.

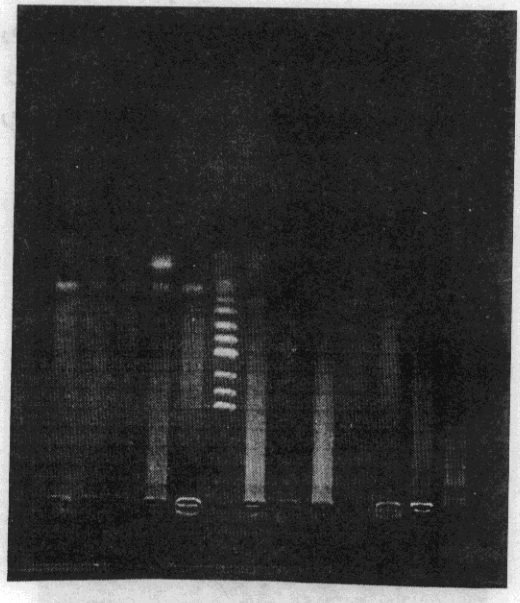
از بافتهای توموری ۲۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان DNA استخراج و کیفیت و کمیت آنها بررسی گردید که دارای کیفیت مناسب جهت واکنش PCR بودند(شکل ۱).



8 7 6 5 4 3 2 M

شکل ۱: الکتروفورز تعدادی از DNA های ژنومیک بیماران مبتلا به سرطان پستان برروی ژل آگارز ۰/۸درصد
ردیف ۱: مارکر1Kb(1Kb DNA Laddermarker)
ردیف ۸-۲: DNA استخراج شده از بافت توموری پستان

DNAهای استخراج شده ، جهت تکثیر قطعات مورد نظر (اگزون ۶ و ۷ ژن p53) وارد واکنش PCR گردید . محصول PCR روی ژل آگارز ۲٪ تست گردید که نتایج حاکی از تکثیر قطعات مورد نظر بود (شکل ۲).



131211109 M 7 6 5 4 3 2 1

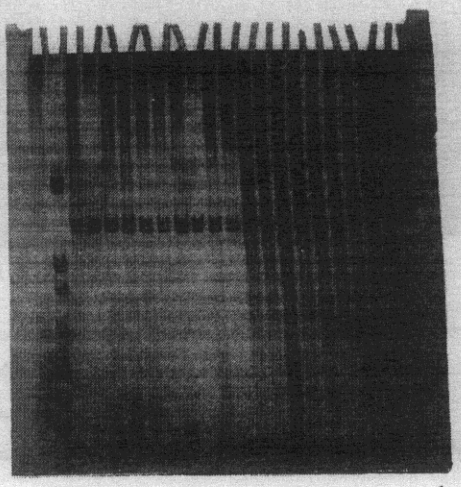
شکل ۲: طرح الکتروفورزی محصولات واکنش PCR اگزون۶و۷ ژن p53 بافتهای توموری پستان روی ژل آگارز۲٪
ردیف ۷-۱: محصولات واکنش PCR اگزون ۶ ژن p53
ردیف ۸: شاخص مولکولی DNA (مارکر VII)
ردیف ۱۳-۹ : محصولات واکنش PCR اگزون ۷ ژن p53

در مرحلهٔ سوم واکنش SSCP تغییرات حرکت DNA تک رشته ای روی ژل MDE پس از رنگ آمیزی بررسی

www.SID.ir

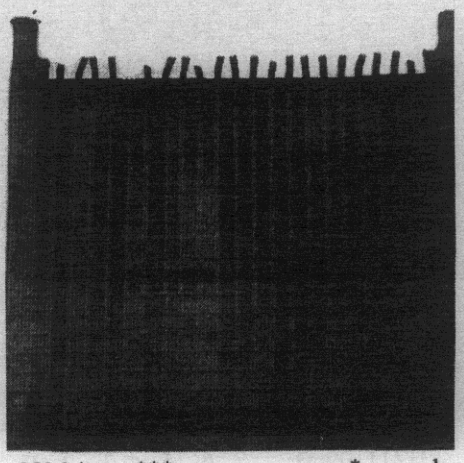
Archive of SID

گردید که نتایج حاکی از ۸ درصد جهش در اگزون ۶ ، ۱۶/۶ درصد در اگزون ۷ و جمعاً فراوانی جهش در دو اگزون ۶ و ۷ ، ۲۴/۶٪ ارزیابی گردید(شکل ۳و۴) .



22M 1

شکل ۳: بررسی SSCP محصولات واکنش PCR اگزون۶ ژن p53برروی ژل پلی اکریل آمید
ردیف ۱و۲: DNA های تک زنجیره ای با حرکتی متفاوت از DNA نرمال
ردیف ۱۲: محصول واکنش PCR ، DNA نرمال
ردیف ۲۱: شاخص مولکولی DNA (مارکر VIII)
ردیف ۲۲: محصول واکنش PCR اگزون ۶ ، دناتوره نشده



22M * . . *** . . . . . *. . . 1

شکل ۴: بررسی SSCP محصولات واکنش PCR اگزون ۷ ژن p53 بر روی ژل پلی اکریل آمید
ردیف: ۶، ۱۵، ۱۶، ۱۷ دارای DNAهای تک زنجیره ای با حرکتی متفاوت از DNA نرمال
ردیف ۱۲: محصول واکنش PCR ، DNA نرمال
ردیف ۲۱: شاخص مولکولی DNA (مارکر VIII)
ردیف ۲۲: محصول واکنش PCR ، اگزون۷ ، دناتوره نشده

در این بررسی در ۲۷/۲۷٪ بیماران زیر ۳۵ سال و در ۲۳٪ بیماران بالای ۳۵ سال در اگزون ۶ و ۷ ژن P53 جهش مشاهده گردید. ارتباط در اگزون ۶ و۷ ژن P53 و سن بیماران با استفاده از آزمون آماری بررسی و ارتباط معنی داری مشاهده نشد(P.value=۰/۵۹). در ۲۰ درصد بیماران با تشخیص پاتولوژی IDC و ۰/۰۲٪ بیماران با تشخیص پاتولوژی ILC جهش در اگزون های ۶ و ۷ مشاهده گردید ، نتایج با آزمون آماری بررسی و ارتباط معنی داری مشاهده نگردید(P=۰/۲۵). در ۱۷/۶٪ بیماران با داشتن پیشینه فامیلی برای وقوع سرطان و در ۴۲/۸٪ بیماران فاقد پیشینه جهش در اگزون های ۶و۷ مشاهده گردید. داده ها با آزمون آماری بررسی و ارتباط معنی داری مشاهده نگردید (P=۰/۲۱).

بحث:

بحث را پیرامون ۳ نکته متمرکز می کنیم :

۱- اهمیت ژن p53 ۲- اگزون های مورد مطالعه ۳- روش اتخاذ شده

امروزه میدانیم ژن p53 در بیش از ۵۰ درصد سرطانهای انسان دچار تغییر شده است که این نکته توسط Hollstein در سال ۱۹۹۳ و Levine در ۱۹۹۴ مطرح گردید (۷) . اهمیت نقش موتاسیونهای p53 در پیدایش سرطان پستان شناخته شد و در ۵۰-۱۵ درصد موارد سرطان سینه جهش در ژن p53 دیده شده است (۸،۹) . بررسی ها نشان میدهند که تغییرات ژن p53 در بسیاری از سرطانها به عنوان فاکتور پیش آگهی دهنده مستقل و مفیدی محسوب می شود و اغلب در ارتباط با پارامترهای کلینیکی ضعیف و پیش آگهی بد می باشد(۱۰). در درمان سرطان پستان مقاومت به شیمی درمانی یک مشکل جدی است. با توجه به اینکه p53 جهش یافته ، بیان ژن مقاومت به داروMDR (Multi Drug Resistance) را افزایش میدهد ممکن است باعث مقاومت به شیمی درمانی و رادیو درمانی گردد . لذا بررسی وضعیت ژن p53 در مبتلایان به سرطان پستان ضروری است ، چرا که این افراد ممکن است صرف نظر از اندازهٔ تومور به درمانهای شدیدتری نیاز داشته باشند (۵). از سوی دیگر Tamura و همکارانش گزارش دادند که برگشت یا عود بیماری در کوتاه مدت در بیمارانیکه تومورهایشان دچار جهش یا حذف در ژن p53 شده اند سریعتر می باشد . همچنین

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات متعدد از افزایش خطر مرگ دو تا سه برابر در بیماران مبتلا که دارای جهش در ژن p53 می باشد حکایت دارد (۱۱). با توجه به نتایج حاصل از این بررسی و وفور بالای جهش در بیماران مورد مطالعه ، بررسی وضعیت ژن p53 در مبتلایان به سرطان پستان می تواند مورد توجه قرار گیرد. همچنین این بررسی می تواند در ایجاد امنیت نسبی خاطر بیماران در بهبود روند بیماری موثر باشد.

در ژن p53 پنج منطقهٔ بسیار حفاظت شده از نظر توالی در طی تکامل در گونه های مختلف وجود دارد که چهارتای آنها در اگزون ۸-۵ قرار دارد . از ۵۶۰ نوع جهش متفاوت که در ژن p53 دیده شده است در مجموع بیش از ۹۰٪ در اگزون ۸-۵ مشاهده گردیده است . در ژن p53 شش نقطه داغ برای موتاسیون وجود دارد که سه تای آنها در اگزون۷ (کدونهای ۲۴۵ ، ۲۴۸ ، ۲۴۹) قرار دارد. لذا بنظر می رسد اگزون ۷ یکی از مستعدترین نقاط ژن p53 برای بروز موتاسیون باشد(۵). مطالعه حاضر نیز تأکید مجددی بر این نکته است ، چنانچه از ۲۴/۶٪ موتاسیون مشاهده شده در دو اگزون ۶ و۷ ، ۱۶/۶٪ آن در اگزون ۷ واقع گردیده است. نتایج حاصله با سایر مطالعات انجام شده در جدول زیر مقایسه گردیده است.

مقایسه نتایج بررسی های گوناگون جهت تعیین درصد جهش های ژن p53 (در اگزون های مختلف به تفکیک) در بیماران مبتلا به سرطان پستان با روش PCR-SSCP

منبع	اگزون ۸	اگزون ۷	اگزون ۶-۵	موتاسیون ٪	اگزونهای مطالعه	سال بررسی
۱۲	٪۴	٪۴	٪۹	٪۱۷	۵-۸	۱۹۹۳
۱۳	٪۱۱/۷	٪۵	٪۶/۶	٪۲۳/۳۳	۵-۸	۱۹۹۴
۵	٪۵/۲	٪۴/۵	٪۷/۳	٪۱۸	۴-۸	۱۹۹۸
۱۴	٪۱۱/۳	٪۱۶	٪۸/۷	٪۳۶	۵-۸	۱۹۹۴
مطالعه حاضر		٪۱۶/۶	٪۸	٪۲۴/۶	۶و۷	

در این مطالعه از تکنیک PCR-SSCP استفاده شد. حساسیت این روش در رابطه با قطعات کوچکتر از ۳۰۰ جفت باز تا ۹۹ درصد است (۱۴) . از آنجاکه که قطعات مورد مطالعه این پژوهش بسیار کوچکتر از ۳۰۰ جفت باز بود این روش در مقایسه با سایر روشها در جهت شناسایی جهش ژن P53 ارجح شناخته شد . در این مطالعه به جای استفاده از مواد رادیواکتیو از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید ، که ارزان بودن ، در دسترس بودن و خطرات کمتر از نقاط قوت این متد در مقایسه با استفاده از مواد رادیواکتیو بود (۱۵) .

در مطالعه حاضر ارتباط بین جهش در اگزونهای ۶و۷ ژن p53 با فاکتورهای هیستوپاتولوژیکی تومور ، وجود پیشینه فامیلی و سن بیماران به طور جداگانه مورد مقایسه قرار گرفت و هیچ ارتباط معنی داری بین جهش در ژن p53 و عوامل ذکر شده مشاهده نگردید. این نتایج با بررسی که در سال ۱۹۹۷ توسط Soong و همکاران صورت گرفته مطابقت دارد(۹).

پایان سخن اینکه ، نتایج گوناگون نشان دهندهٔ این است که کاربرد روش سریع و نسبتاً ساده PCR-SSCP برای شناسایی وضعیت ژن p53 در بیماران مبتلا به سرطان پستان دربردارندهٔ یک اطلاعات پیش آگاهی دهندهٔ کلینیکی مهم در این گروه از تومورها می باشد . این روش ساده ، قابل اجرا، دقیق و نسبتاً کم هزینه است . نتایج مطالعهٔ حاضر حاکی است که میزان جهش در اگزون ۶ ، ۸درصد ، در اگزون ۷ ، ۱۶/۶ درصد و در کل دو اگزون ۲۵٪ می باشد.

نتیجهٔ کلی اینکه میزان بالای جهش در ژن p53 تأکیدی بر نقش مهم این ژن در روند تومورزایی سرطان پستان است و تغییرات این ژن بعنوان یک فاکتور پیش آگهی دهنده مفید در پیشگیری و درمان سرطان پستان محسوب می شود.

منابع :

1. Parkin DM. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. Bull World Health Organ 1984 ; 62(2): 163-82.
2. Ozban MA , Butel JS. Tumor suppressorr p53 mutations and breast cancer: A critical analysis . Adv Cancer Res 1995 ; 66: 71-141 .
3. Van de Vijver MJ. Molecular genetic changes in human breast cancer . Adv Cancer Res 1993 ; 61:25 - 56.
4. Radford DM , Phillips NJ , Fair KL , et al. Allelic loss and the progression of breast cancer . Adv Cancer Res 1995Nov ; 55(22): 5180-3 .
5. Iacopetta B , Grieu F , Powell B , et al . Analysis of p53 gene mutation by PCR-SSCP provides independent

www.SID.ir

Archive of SID

prognostic information in node-negative breast cancer. Clin Cancer Res1998Jul; 4(7):1597-602.
6. Cha RS , Thily W. Specificity efficiency and fidelity of PCR . PCR methods and applications 1993 ; 3:18-37.
7. Levine AJ , Chang A , Dittmer D, et al . The p53 tumor suppressor gene. Lab Clin Med 1994 Jun ; 123 (6) : 817-23
8. Done SJ, Arneson NC, Ozcelik H, et al. p53 mutations in mammary ductal carcinoma in situ but not in epithelial hyperplasis . Cancer Res 1998 Feb; 58 (4): 785- 89.
9. Soong R. Detection of p53 gene mutation by rapid PCR-SSCP and its association with poorsurvival in breast cancer . Int J Cancer 1997 Dec; 74(6): 642-47.
10. Elledge RM , Allred Dc . The p53 tumor suppressor gene in breast cancer . Breast Cancer Res Treat 1994 ; 32(1) : 39- 47.
11. Tamura G , Maesawa C , Suzuki y , et al. Aberrations of tumor suppressor genes in esophageal squamous-cell cancinoma. Int J Cancer 1994 Apr ; 57(1): 21-5.
12. Marchetti A , Buttita F , pellegrini S , et al . p53 mutation in differenet histologic types of human breast Carcinoma. Cancer Res 1993; 53: 2846-51.
13. Chen YH , Dong JP , Zhang SJ. Detection of point mutation of p53 gene by non - isotopic PCR-SSCP in paraffin embeded breast cancer tissue. Chung Hua Ping Li Hsaeh Tsa Chin 1994 ; 23(6) : 327-29 .
14. Faille A , De Cremoux P , Extra JM , et al . p53 mutations and over expression in locally advanced breast cancer . Br J Cancer 1994 ; 69 (6): 1145- 50.
15. Teschauer W . Conditions for SSCP analysis with broad applicability . A study on the effects of acrylamide , buffer and glycrol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996 ; 34 : 125 - 31.

www.SID.ir