Archive of SID

مقاله پژوهشی

ارتباط پلی مورفیسم C>T p757l در ژن Exo1 و ریسک ابتلا به سرطان کلورکتال غیر ارثی در یک جمعیت از ایران

دکتر مهدی منتظر حقیقی* ، محمدیعقوب طالقانی** ، آتنا ایرانی شمیرانی*** ، زهرا اکبری***
محسن واحدی**** ، دکتر سیدرضا محبی***** ، دکتر سیدرضا فاطمی****** ، دکتر آرش جنابیان*******
دکتر محمدرضا زالی********

دریافت : ۸۹/۹/۲۰ ، پذیرش : ۹۰/۳/۴

چکیده:

مقدمه و هدف: یکی از ژنهای مستعد نمودن افراد به سرطان روده بزرگ ژن اگزونوکلئاز یک (EXO1) می باشد.این ژن یکی از ژنهای خانواده RAD2 می باشد. EXO1 نقش مهمی در مکانیسم ترمیم اتصال اشتباه بازی می کند.EXO1 همچنین در همانند سازی DNA نوترکیب هم فعالیت دارد مشخص شده است که چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (SNP) در شیوع این سرطان دخیل هستند.هدف از مطالعه حاضر بررسی همبستگی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی P757L در اگزون ۱۳ ژن EXO1 و احتمال خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ در یک جمعیت از ایران می باشد.

روش کار: در این مطالعه مورد- شاهدی ۸۱ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال و ۸۶ فرد سالم که به بیمارستان طالقانی شهر تهران بین سالهای ۱۳۸۷-۱۳۸۸ برای بررسی کلون و رکتوم مراجعه کرده بودند انتخاب شدند.این افراد با توجه به نتایج تشخیص کلونوسکوپی و همچنین تایید پاتولوژی در دو گروه بیمار و سالم قرار گرفتند. به منظور تعیین ژنوتیپهای پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی p757l ژنExo1 از روشPCR-RFLP استفاده شد و آنزیم محدود الاثر MnlI مورد استفاده قرار گرفت ، بنابراین در مجموع ژنوتیپهای ۱۶۷ فرد با استفاده از روش یاد شده تعیین گردید.

نتایج: بر اساس یافته ها در حالتی که ژنوتیپpro/pro به عنوان مرجع انتخاب شد. (OR=0.168, CI 95%0.034-0.816) برای ژنوتیپlue/lue(TT) محاسبه گردید که در این صورت ژنوتیپ lue/lue همبستگی معکوس با سرطان روده بزرگ نشان داد. در صورتی که ژنوتیپpro/lue (CT) در همین وضعیت ارتباط معنی داری با این سرطان نشان نداد (OR=0.663, 95% CI 0.340-1.294).

نتیجه نهایی: نتایج این مطالعه با یافته های پژوهش های دیگر که همبستگی معکوس و معنی داری بین ژنوتیپ p757l TT و سرطان کلون و رکتوم را نشان می دهند ، مطابقت دارد. بر این اساس مشخص شد که ژنوتیپ TT اثر محافظتی دربرابر ایجاد سرطان روده بزرگ دارد.

کلید واژه ها: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی / ژن اگزونوکلئاز ۱/ سرطان های کلون و راست روده

* دکتری ژنتیک مولکولی ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (mah_haghighi@hotmail.com)
** کارشناس زیست شناسی سلولی ـ مولکولی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
*** کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
**** دانشجوی دکتری آمار ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
***** استادیار ویروس شناسی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
***** دانشیار گروه گوارش مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
****** استادیار گروه خون و سرطان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی
******* استاد گروه گوارش مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه :

اصلاح تک نوکلئوتیدهایی که به اشتباه در حین فرایند همانندسازی حذف ویا اضافه شده اند یکی از وظایف اصلی و مهم بازآرایی DNA می باشد (۱) مکانیسم تعمیر DNA در انسان و جانداران، ژنوم را از تغییرات نامطلوب در اثر شرایط درونی و محیطی حفظ می کند. اگزونوکلئاز۱ جزیی از خانواده نوکلئاز RAD2 است که در همانند سازی و باز آرایی DNA نقش ایفا میکند. Exo1بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱ (1q42-q43) قرار دارد. یافته های محققان نشان می دهد اگزونوکلئاز۱ در پیشگیری از ایجاد جهش در فرایند تقسیم میوز سلول های جنسی نیز نقش مهمی دارد(۲). این ژن دارای یک اگزون ترجمه نشدنی است که به دنبال آن ۱۳ اگزون قابل ترجمه می آید(۳). محصول فرایند ترجمه ی این ژن پروتئینی با ۸۴۶ اسید آمینه می باشد. همانطور که اشاره شد این پروتئین عضوی از خانواده ی نوکلئاز RAD2 میباشد و در همانند سازی نوترکیبی و اصلاح توالی DNA نقش ایفا میکند و به تازگی مشخص شده در شرایط آزمایشگاهی دارای عملکرد نوکلئازی ´۵←´۳ و اگزونوکلئازی ´۳←´۵ می باشد(۴). از طرفی در انسان Exo1 تنها آنزیم شناخته شده در سیستمMMR (Mismatch Repair) میباشد که دارای هر دو عمل اندونوکلئازی و اگزونوکلئازی است و بر این اساس این پروتیئن نقش مهمی را در پویایی مجموعه MMR دارد. این ژن متقابلا" می تواند به صورت طبیعی با پروتئینهای مربوط به ترمیم DNA نظیر MSH2,MSH3,MLH1 در انسان مرتبط باشد(۵،۶). به دلیل نقشی که اگزونوکلئاز۱ در همانند سازی و بازآرایی ژنها بازی میکند میتواند ژن مناسبی برای بررسی میزان تاثیر در تومورزایی و ابتلا به سرطان کلورکتال باشد(۷). Exo1 میتواند به صورت طبیعی همراه با پروتئین های MMR نظیر MLH1 و MSH2 در سلولهای انسانی و مخمر با MSH3 وارد عمل شود(۲،۸). درپژوهشی بیان سطح بالایی از رونوشت در حدودا" Exo1 ۳ kb در بیضه ، تیموس ، کلون و جفت گزارش شده است(۲) بنابراین علاقه به تحقیق بر روی انواع متنوعی از تغییرات ژنتیکی درژن های کد کننده ی پروتئینهای تعمیرکننده DNA از جمله Exo1 منطقی به نظرمی رسد.

نقش Exo1 در ترمیم DNA در مرحله ی میوز اثبات شده علاوه بر این با توجه به اهمیت پلی مورفیسمهای تک نوکلئوتیدی(single nucleotide polymorphism) (SNP) در تعیین ساختار این ژن و از طرفی تاثیر در عملکرد و فعالیت پروتئین ها ، به نظر می رسد پلی مورفیسمهای تک نوکلئوتیدی می توانند نقشی در رابطه با مستعد شدن به سرطانها داشته باشند(۹). یکی از پلی مورفیسم های مهم در این ژن که بر اساس سایت (National Center for Biotechnology Information) هتروزیگویتی معادل 0.416 را نشان می دهد می تواند یکی از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی واجد شرایط برای مطالعه باشد. این پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی p757l به شماره SNP rs:۹۳۵۰ در اگزون ۱۳ Exo1 می باشد. بنابراین بر آن شدیم تا جهت تعیین همبستگی این پلی مورفیسم در ژن Exo1 با سرطان کلون و رکتوم که دارای جایگاه برش آنزیم MnlI میباشد این مطالعه را انجام دهیم

روش کار:

مطالعه حاضر از نوع مورد- شاهدی بود که بر روی ۸۱ نمونه بیمار و ۸۶ نمونه کنترل انجام گردید. بیماران از افرادی تشکیل شده بودند که از نظر پاتولوژی و علایم بالینی نشان دهنده سرطان روده بزرگ بودند و کسانی که دارای نتایج پاتولوژی منفی برای سرطان روده بزرگ بودند به عنوان کنترل انتخاب شدند.این نمونه ها از افرادی جمع آوری شد که بین سالهای ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۸ به دلیل مشکلات و دردهای ناشی از روده بزرگ به بیمارستان طالقانی تهران مراجعه کرده بودند. به کلیه بیماران و کنترل ها در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت ویا عدم شرکت در این مطالعه توضیح داده شد و از داوطلبین شرکت در مطالعه رضایت نامه کتبی دریافت شد. فرم رضایت نامه اخلاقی شرکت افراد در مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب و مورد استفاده قرار گرفت. تمامی بیماران توسط پزشک آموزش دیده مورد مشاوره قرار گرفته و اطلاعات کلینیکی و شرح حال از ایشان کسب گردید و در فرمهای اطلاعاتی مربوطه وارد شد. از تمامی بیماران و کنترل ها نمونه خون محیطی به میزان ده سی سی جهت انجام آزمایشات ژنتیکی گرفته شد.DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد فنل کلرو فرم از خون محیطی استخراج شد(۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

توالی پلی مورفیسم (rs:۹۳۵۰) MnlI با استفاده از روش PCR (Polymerase chain reaction) و پرایمرهای اختصاصی
Forward: 5'-cagaatggtcttaaaatgggtgt3'
Reveres: 5'-ttcagaataagaaacaaggcaac3'
انجام شد.

پرایمرها با استفاده از توالی ژن که با استفاده از سایت NCBI بدست آمد و نرم افزارهای Primer3 و Gene Runner طراحی شدند. شرایط و برنامه PCR به این ترتیب بود : نخست۵ دقیقه واسرشت اولیه در دمای۹۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت وسپس ۳۰ سیکل با این برنامه پیش رفت ۴۵ ثانیه واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه دمای ۶۳ درجه سانتی گراد به منظور اتصال پرایمرها ۳۰ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به منظور تکثیر و در پایان ۵دقیقه ۷۲ درجه به منظور تکثیر پایانی انجام شد.

محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودالاثر MnlI (fermentas) به میزان 5U/reaction به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مورد هضم قرار گرفتند. با توجه به این که برای این آنزیم در صورت وجود آلل نرمال(pro) یک جایگاه برش در قسمت تکثیر شده وجود دارد. آنالیز تمامی محصولات RFLP بر روی ژل ۲٪ آگارز انجام شد و رنگ آمیزی ژلها با استفاده از اتدیوم بروماید صورت گرفت.

رابطه ژنوتیپهایGT-TT و سرطان روده بزرگ با تحلیل رگرسیون لجستیک انجام گرفت و شدت رابطه با استفاده از نسبت بخت (OR) و فواصل اطمینان (CI) ۹۵٪ بیان شدند. توزیع آللی با استفاده از تعادل هاردی واینبرگ انجام گرفت به طوری که در هر دو گروه فراوانی آلل ها در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشتند.اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۳) آنالیز شدند و احتمالP کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج:

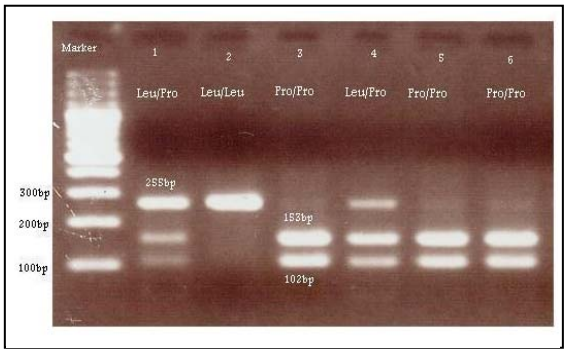
ژنوتیپ و جنسیت افراد کنترل و بیمار در جدول ۱ مشاهده می گردد.

جدول ۱: مشخصات ژنوتیپ افراد مورد مطالعه برحسب جنسیت

	ژنوتیپ بیمار			ژنوتیپ کنترل		
	CC	TC	TT	CC	TC	TT
جنسیت						
مرد	۲۷	۱۶	۰	۲۱	۱۸	۶
زن	۲۷	۹	۲	۲۴	۱۴	۳
مجموع	۵۴	۲۵	۲	۴۵	۳۲	۹

CC=Pro/Pro، CT=Pro/Leu و TT=Leu/Leu

ژنوتیپ ها به این ترتیب مشخص شدند که در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت (Pro/Pro) دو قطعه محصول RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) به طول های ۱۵۳bpو ۱۰۲bpایجاد شد و در افراد هموزیگوت (Leu/Leu) که فاقد جایگاه برش بودند. یک قطعه ۲۵۵ bp مشاهده شد و در افراد هتروزیگوت (Pro/Leu) سه قطعه bp (۱۰۲ ، ۱۵۳ ، ۲۵۵) به دست آمد (تصویر ۱).



تصویر ۱: ستون اول سمت چپ مربوط به DNA سایز مارکر می باشد. ستون دوم مربوط است به ژنوتیپ هتروزیگوت Leu/Pro که باند های۱۰۲bp ، ۱۵۳ ، ۲۵۵ دیده می شود. ستون سوم نشان دهنده ژنوتیپ هموزیگوت Leu/Leu با باند ۲۵۵bp می باشد. ستون چهارم نشان دهنده ژنوتیپ هموزیگوت Pro/Pro با دو باند ۱۵۳bpو ۱۰۲bp.

فراوانی ژنوتیپهای CC, CT, TT به ترتیب در بیماران ۶۶/۷٪ ، ۳۰/۹٪ ، ۲/۵٪ و افراد کنترل ۵۲/۳٪ ، ۳۷/۲٪ ، ۱۰/۵٪ تعیین گردید. فراوانی آلل T به ترتیب در نمونه های بیمار و کنترل ۱۸٪ و ۲۹٪ مشخص شد که بیانگر ارتباط معکوس و معنی دار ژنوتیپ CT با سرطان کلورکتال می باشد.همچنین فراوانی آلل C به ترتیب ۷۱٪ در گروه کنترل و ۸۲٪ در گروه بیماران تعیین گردید.

در حالتی که ژنوتیپ pro/pro به عنوان مرجع انتخاب شدOR=۰/۱۶۸ و(CI=95% 0.034-0.816) وP=۰/۰۵ برای ژنوتیپ lue/lue محاسبه گردید که در این صورت ژنوتیپ lue/lue همبستگی معکوس با سرطان روده بزرگ نشان داد. در صورتی که ژنوتیپ pro/lue در همین وضعیت ارتباط معنی داری با این سرطان نشان نداد۰/۶۶۳=OR (CI=95% 0.340-1.294) و نیز زمانیکه ژنوتیپهای pro/lue و pro/pro به عنوان مرجع در نظر گرفته شد ۰/۱۹۲=OR (CI=95% 0.040-0.921) و P=۰/۰۳۷ برای ژنوتیپ lue/lue محاسبه گردید. پس بنابراین وجود ژنوتیپ lue/lue

www.SID.ir

Archive of SID

می تواند سبب یک اثر کاهنده یا محافظتی در ایجاد این سرطان داشته باشد(جدول ۲).

جدول ۲)ارتباط بین ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs ۹۳۵۰ C>T ژن EXO1 وسرطان روده بزرگ غیر ارثی

	کنترل OR (CI 95%)	ارزش P	بیماران * OR (CI 95%)	ارزش P
CC	۱	--	۱	--
TC	۰/۶۵۱(۰/۳۳۸-۱/۲۵۴)	۰/۲۰۰	۰/۶۶۳(۰/۳۴۰-۱/۲۹۴)	۰/۱۹۵
TT	۰/۱۵۸(۰/۰۳۸-۰/۹۰۱)	۰/۰۳۷	۰/۱۶۸(۰/۰۳۴-۰/۸۱۶)	۰/۰۳۸

* تطبیق یافته برای سن و جنس

بحث:

سرطان روده بزرگ یکی از خطرات مهم برای سلامتی انسان بشمار می آید. سالانه نزدیک به یک میلیون مبتلای جدید به این سرطان در دنیا تشخیص داده می شوند و هر سال نیم میلیون مرگ به علت سرطان کلورکتال در جهان رخ می دهد . بروز این سرطان در سه دهه گذشته در ایران افزایش قابل توجهی داشته است (۱۱).

در سالهای اخیر مطالعات زیادی در ارتباط با پیوستگی این سرطان و پلی مورفیسم های ژن Exo1 انجام شده است.

نتایج تحقیقی که در ژاپن توسط یاماموتو و همکارانش انجام شد نشان داد که ارتباط معکوس و معنی داری بین این پلی مورفیزم و سرطان کلورکتال وجود دارد(۲) یافته های این مطالعه نشان داد که از تعداد کل ۱۰۲ نمونه بیمار تعداد ۳۵ نفر دارای ژنوتیپ CC و تعداد ۵۳ نفر دارای ژنوتیپ CT بودند و در گروه کنترل از تعداد ۱۱۰ نفر تعداد ۳۶ نفر دارای ژنوتیپ CC وتعداد ۴۷ نفر دارای ژنوتیپ CT بودند همچنین تعداد ۱۴ نفر در گروه بیماران و ۲۷ نفر در گروه کنترل ها دارای ژنوتیپ TT بودند(P=۰/۱۹۷) بنابراین فراوانی آلل Minor T و Major C به ترتیب در جایگاه MnlI بیماران۰/۴و ۰/۶۰ و در افراد کنترل به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۵۴ گزارش شده است. علاوه براین مشخص شد که ژنوتیپ CT در این ژن با سرطان کلورکتال ارتباط معکوس و معنی داری دارد، به بیان دیگر افراد واجد این ژنوتیپ دارای اثر محافظتی در برابر سرطان کلورکتال هستند. در مطالعه حاضر نیز آلل مینور (Minor) آلل T به ترتیب در افراد بیمار و کنترل با فراوانی و ۱۸٪ و ۲۹٪ آلل ماژور (Major) آلل C به ترتیب در افراد بیمار و کنترل با فراوانی ۸۲٪ و ۷۱٪ به دست آمد که بیان گر ارتباط معکوس و معنی داری بین این پلی مورفیسم و سرطان روده بزرگ می باشد و یا به عبارت دیگر در افرادی که آلل C آنها بهT تبدیل می شود احتمال ابتلا به سرطان روده بزرگ در آنها کمتر است که این یافته با نتایج مطالعه قبلی که به وسیله ی یاماموتو و همکارانش صورت گرفت همخوانی دارد.

نتیجه نهایی:

بر اساس یافته های ما در این مطالعه همبستگی معکوس و معنی داری بین ژنوتیپ TT این پلی مورفیسم و سرطان کلورکتال مشاهده شد.در واقع نتایج این مطالعه با یافته های مطالعات دیگر که همبستگی معکوس و معنی داری بین پلی مورفیسم p757l TT و سرطان کلون و رکتوم نشان می دادند ، مطابقت دارد.

منابع :

1. Peltomaki P. Role of DNA Mismatch Repair Defects in the Pathogenesis of Human Cancer. J Clin Oncol 2003; 21: 1174-1179.
2. Yamamoto H, Hanafusa H, Ouchida M. Single nucleotide polymorphisms in the EXO1 gene and risk of colorectal cancer in a Japanese population. Carcinogenesis 2005; 26:411-416.
3. Jina G, Wang H, Hua Z. Potentially functional polymorphisms of EXO1 and risk of lung cancer in a Chinese population: A case-control analysis. Lung Cancer 2008; 60: 340-346
4. Yoshiya G, Takahata T, Hanada N, Suzuki K, Ishiguro A, Saito M, et al. Influence of cancer-related gene polymorphisms on clinicopathological features in colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol 2008 ;23(6):823-4.
5. Tsai MH, Tseng HC, Liu CS. Interaction of Exo1 genotypes and smoking habit in oral cancer in Taiwan. Oral Oncol 2009; 45: 90–94.
6. Alam NA, Gorman P, Jaeger EEM. Germline deletions of EXO1 do not cause colorectal tumors and lesions which are null for EXO1 do not have microsatellite instability. Cancer Genet Cytogenet 2003;147: 121-127.
7. Jagmohan-Changur S, Poikonen T, Vilkki S, Launonen V, Wikman F, Orntoft TF, et al. EXO1 variants occur commonly in normal population: evidence against a role in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Cancer Res 2003; 63(1):154-8.
8. Lee B, Nguyen LH, Barsky D, Fernandes M, Wilson DM. Molecular interactions of human Exo1 with DNA. Nucleic Acids Res 2002;30(4): 942-949.
9. Kim JC, Roh SA, Yoon YS. MLH3 and EXO1 alterations in familial colorectal cancer patients

www.SID.ir

Archive of SID

not fulfilling Amsterdam criteria. Cancer Genet Cytogenet 2007 ;176 : 172-174.
10. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 2001: 1-38.
11. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Zali MR. Prognostic factors in 1,138 Iranian colorectal cancer patients. Int J Colorectal Dis 2008;23(7): 683-8.

www.SID.ir