

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن انسولین با سرطان روده بزرگ

مارال ارکانی^۱ (M.Sc)، اکرم صفائی^{۱*} (M.Sc)، خاتون کریمی^۱ (M.Sc)، الهام اربابی^۱ (M.Sc)، فاطمه رستمی^۱ (M.Sc)، میترا ایمان^۱ (B.Sc)، پروانه محمدی^۱ (B.Sc)، الهام حمزه‌ای^۱ (B.Sc)، محسن واحدی^۱ (M.Sc)، سید رضا محبی^۱ (Ph.D)، محمد وفایی^۲ (M.D)، سید رضا فاطمی^۱ (M.D)، محمدرضا زالی^۱ (M.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان طالقانی، مرکز تحقیقات کبد و گوارش

۲- انجمن استومی ایران، بخش جراحی

چکیده

سابقه و هدف: بعضی از مطالعات ثابت کرده‌اند که پلی مورفیسم ژن انسولین باعث افزایش سطح انسولین و مقاومت به این هورمون شده و متعاقباً باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ می‌شود. هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان شیوع پلی مورفیسم ژن انسولین (rs689) در جمعیت ایرانی و بررسی نقش این پلی مورفیسم در افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ است.

مواد و روش‌ها: مطالعه انجام شده از نوع مورد-شاهدی بود. با استفاده از روش PCR-RFLP، به صورت تصادفی ۱۱۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ و ۱۱۰ نفر گروه شاهد، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: P برای ژنوتیپ TT در مقابل ژنوتیپ AA ۰/۵۷، (نسبت شانس ۱/۳۳ = ۳/۶ - ۰/۴۸ = فاصله اطمینان ۰/۹۵) و برای ژنوتیپ AT در مقابل ژنوتیپ AA ۰/۵۲، (نسبت شانس ۱/۸۸ = ۳/۵ - ۰/۹۹ = فاصله اطمینان ۰/۹۵) محاسبه شد. ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم ژن انسولین rs689 و افزایش ریسک ابتلا به سرطان روده بزرگ یافت نشد (p = ۰/۱۴) شیوع آلل موتانت در دو جمعیت بیمار و شاهد تقریباً مشابه بود (نسبت شانس = ۱/۵۳، ۲/۳۹ - ۰/۹۸ = فاصله اطمینان ۰/۹۵، P = ۰/۰۵۷).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان می‌دهد که واریانت رسپتور ژن انسولین (rs689)، فاکتور مهمی برای ابتلا به سرطان روده بزرگ نیست.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی در ژنتیک، نورویس‌های کولون و راست روده، مقاومت به انسولین، rs689

مقدمه

سرطان روده بزرگ (Colorectal Cancer, CRC)،

سومین تومور شایع است و چهارمین سرطان مرگ‌زا در جهان شرق است [۱]. شیوع این سرطان در گروه‌های نژادی مختلف متفاوت است و هم‌چنین شیوع آن با سن، رژیم غذایی، سابقه خانوادگی افراد، سیگار کشیدن، کم‌حرکی و چاقی مرتبط می‌باشد [۲]. پلی مورفیسم‌های ژنتیکی هم‌چنین در گسترش بدخیمی‌های روده‌ی بزرگ نقش بسزایی دارند. یکی از مسیرهایی که پلی مورفیسم در ژن‌های دخیل در آن با سرطان

روده‌ی بزرگ مرتبط است، مسیر سیگنالینگ انسولین است [۳].

یکی از واریانت‌های ژنتیکی نامزد برای ارتباط با سرطان روده‌ی بزرگ، انسولین است چرا که واریانت‌های ژنتیکی در ژن مذکور سطح انسولین را افزایش داده و مطالعات گوناگون نشان دادند کسانی که سطح انسولین آن‌ها بیش‌تر از افراد سالم است، بیش‌تر در معرض ابتلا به سرطان‌های مختلف قرار دارند [۴-۹].

از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که مقاومت به

DNA با روش فنل- کلروفورم و رسوب‌گیری با اتانول انجام شد و روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتایپ، به کار گرفته شد. پرایمرهای به کار گرفته شده در این آزمایش، پرایمر پیش‌برنده 3' TCCAGGACAGGCTGCATCAG 5' و پرایمر معکوس 3' AGCAATGGGCGGTTGGCTCA 5' برای تکثیر قطعه 441bp بودند. برنامه‌ی PCR، شامل 35 سیکل با برنامه 10 دقیقه 93 درجه، 45 ثانیه 93 درجه، 30 ثانیه 68/9 درجه، 45 ثانیه 72 درجه و 10 دقیقه 72 درجه بود. بعد از انجام PCR، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، تمامی نمونه‌ها روی ژل آگارز 1٪ الکتروفورز گردیدند، سپس باقی‌مانده محصول جهت هضم آنزیمی به مدت 3 ساعت در مجاورت آنزیم HphI قرار گرفت. پس از اتمام مدت انکوباسیون، محصولات مجدداً روی آگارز 3/5٪ الکتروفورز شده و مورد بررسی قرار گرفتند. باندهای مشاهده شده شامل: سه باند 40bp، 161 و 240 که نشان‌دهنده نوع هتروزیگوت، دو باند 40bp و 161 نشان‌دهنده هموزیگوت طبیعی و تک باند 240bp نشان‌دهنده هموزیگوت موتانت بود. تست χ^2 ، به منظور به دست آوردن اختلاف فراوانی آلی بین گروه‌های بیمار و کنترل استفاده شد. با استفاده از آنالیز آماری، نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان 95٪ (CI) محاسبه و ارتباط بین پلی مورفیسم و بیماری مشخص گردید. آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS 16، انجام شد.

نتایج

در این مطالعه 110 بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ با میانگین سنی $55/09 \pm 12/31$ و 110 فرد گروه شاهد با میانگین سنی $46/35 \pm 17/90$ مورد بررسی قرار گرفتند. نسبت مرد به زن در گروه بیمار 86/0 و در گروه شاهد 100/0 بود. اکثر افراد بیمار و شاهد، غیر سیگاری بودند (جدول 1). در این مطالعه جنسیت ($P=0/58$) و استعمال مواد مخدر ($P=0/65$) ارتباط معنی‌داری با افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ نداشت.

انسولین (Insulin resistance) با بدخیمی‌های روده‌ی بزرگ مرتبط است. رژیم غذایی نامناسب و چاقی از دلایل مقاومت به انسولین (عدم توانایی برای کنترل کردن سطح گلوکز پلاسما) هستند. در مطالعه‌ای که روی موش انجام دادند، تزریق انسولین و رژیم غذایی پرچرب باعث نمایان شدن آثار بدخیمی روده‌ی بزرگ و بزرگ شدن تومور شدند [10-12]. طبق مطالعات، ثابت شده که انسولین در روند سرطان‌زایی، دخالت دارد. چرا که انسولین از طریق اتصال به رسپتور رشد سلولی را القا می‌کند [13] از طرفی، از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌ها جلوگیری می‌کند [14]. همچنین، 50٪ ساختار انسولین شبیه به فاکتور رشد است و 60٪ همولوژی بین رسپتور و فاکتور رشد وجود دارد که پیام رشد و تکثیر سلول‌ها را شدت می‌بخشد [15]. انسولین باعث افزایش سنتز هورمون‌های جنسی و استروئیدهای آزاد می‌شود که نمی‌توان نقش آن‌ها را در آغاز تومورزایی نادیده گرفت [16].

در پلی مورفیسم ژن انسولین rs689، اسید نوکلئیک تیمیدین در شماره‌ی 5201 در اینترون شماره‌ی 2، جای‌گزین آدنین می‌شود. ژنوتیپ مغلوب INST/T باعث افزایش سطح mRNA و در نتیجه بیان زیاد انسولین می‌شود [17، 18]. این مطالعه با هدف ارزیابی میزان شیوع پلی مورفیسم ژن انسولین rs689 در تهران و بررسی نقش این پلی مورفیسم در افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، جهت بررسی پلی مورفیسم در ژن انسولین (INS rs689) انجام شد. پس از اخذ رضایت از 115 بیمار مبتلا CRC و 115 فرد سالم به عنوان گروه شاهد که به مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی، مراجعه کرده بودند، نمونه‌ی خون از این افراد گرفته شد و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. در مورد افراد بیمار و شاهد اطلاعاتی شامل وضعیت استعمال دخانیات، سن و جنسیت تهیه گردید. نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه طی سال‌های 1387 تا 1389، جمع‌آوری شدند. استخراج

۱۲ نفر هموزیگوت موتانت TT (۱۰/۹٪)، ۳۷ نفر هتروزیگوت AT (۳۳/۶٪)، ۶۱ نفر هموزیگوت طبیعی AA (۵۵/۵٪) بودند. توزیع ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم ژن انسولین rs689 در دو گروه بیمار و شاهد در جدول ۲ نشان داده شده است.

میزان شیوع آلل T موتانت در گروه بیمار ۲۷/۷٪ و در افراد کنترل ۲۰/۰٪ محاسبه گردید که اختلاف معنی داری بین دو گروه از نظر فراوانی آلی مشاهده نشد (۲/۳۹ - ۰/۹۸ = فاصله اطمینان ۹۵٪، ۱/۵۳ = نسبت شانس).

نسبت شانس برای هموزیگوت موتانت در مقابل هموزیگوت طبیعی (AA/TT) ۱/۳۳ (۳/۶ - ۴۸/۰) = فاصله اطمینان ۹۵٪، ۱/۳۳ = نسبت شانس) و برای هتروزیگوت در مقابل هموزیگوت طبیعی (AA/AT) ۱/۸۸ (۳/۰۵ - ۹۹/۰) = فاصله اطمینان ۹۵٪، ۱/۸۸ = نسبت شانس) محاسبه گردید.

جدول ۱. مشخصات گروه‌های بیمار و شاهد مورد مطالعه

پارامترها		شاهدان (تعداد=۱۱۰)	بیماران (تعداد=۱۱۰)
سن (سال)		*۴۶/۳۵±۱۷/۹۰	*۵۵/۰۹±۱۲/۳۱
جنسیت	مرد	۵۵ (۵۰/۰)†	۵۱ (۴۹/۴)†
	زن	۵۵ (۵۰/۰)	۵۹ (۵۳/۶)
افراد غیر سیگاری		۹۰ (۸۱/۸)	۹۳ (۸۴/۵)
افراد با استعمال قبلی سیگار		۲ (۰/۹)	۲ (۱/۸)
افراد سیگاری		۱۹ (۱۷/۳)	۱۵ (۱۳/۶)

* میانگین ± انحراف معیار

† اعداد داخل پرانتز معرف در صد هستند

نمونه‌های DNAی افراد گروه بیمار و افراد گروه شاهد، برای ناحیه ژنی rs689 INS تکثیر شدند، در توزیع ژنوتیپی برای افراد سالم، ۹ نفر هموزیگوت موتانت TT (۸/۲٪)، ۲۶ نفر هتروزیگوت AT (۲۳/۶٪)، ۷۵ نفر هموزیگوت طبیعی AA (۶۸/۲٪) بودند. در توزیع ژنوتیپی برای افراد بیمار،

جدول ۲. نتایج نهایی حاصل از بررسی پلی مورفیسم rs689 در دو گروه بیمار و شاهد

SNP	شاهدان (تعداد=۱۰۵)	بیماران (تعداد=۱۰۵)	نسبت شانس	فاصله اطمینان (95%)	Pvalue
پلی مورفیسم ژن انسولین rs689					
AA	۷۵ (۶۸/۲٪)	۶۱ (۵۵/۵)	۱*	---	---
AT	۲۶ (۲۳/۶٪)	۳۷ (۳۳/۶٪)	۱/۸۸	۰/۹۹-۳/۵	۰/۰۵۲
TT	۹ (۸/۲٪)	۱۲ (۱۰/۹٪)	۱/۳۳	۰/۴۸-۳/۶	۰/۰۵۷
مقایسه فراوانی آلی (%)					
A	۱۷۰ (۸۱/۰٪)	۱۵۶ (۷۴/۳٪)	۱*	---	---
T	۴۴ (۲۰/۰٪)	۶۱ (۲۷/۷٪)	۱/۵۳	۰/۹۸-۲/۹۳	۰/۰۵۷

* رفرنس در نظر گرفته شده است

در این مطالعه جنسیت و استعمال مواد مخدر ارتباط معنی داری با افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ نداشت. این در حالی است که مطالعاتی دیگر ثابت کرده‌اند که افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ در افراد سیگاری [۱۹] و همین‌طور مردان [۲۰] بیش‌تر است.

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که واریانت ژن انسولین (rs689) فاکتور مهمی برای ابتلا به سرطان روده بزرگ نیست. شیوع آلل موتانت در دو جمعیت بیمار و شاهد تقریباً مشابه بود (نسبت شانس = ۱/۵۳؛ ۲/۳۹ - ۰/۹۸ = فاصله اطمینان ۹۵٪).

که در مسیر انتقال پیام انسولین، پروتئین‌های زیادی دخیلند، بهتر است واریانت‌های ژن‌های این پروتئین‌ها هم بررسی شود. در خلاصه، هیچ ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم ژن انسولین rs689 و سرطان روده‌ی بزرگ یافت نشد و فراوانی آلل موتانت، بین دو جامعه‌ی بیمار و کنترل، تفاوت معناداری نداشت.

تشکر و قدردانی

در انتها از بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ و افراد سالمی که، در این مطالعه با ما همکاری کردند و هم‌چنین از مسئولین مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که تمامی هزینه‌های این پروژه را بر عهده داشتند، کمال تشکر را داریم.

منابع

- [1] Li C, Li Y, Gao LB, Wang YY, Zhou B, Lv ML, et al. Receptor gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer in a chinese population. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 634-639.
- [2] Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980; 9: 227-231.
- [3] Slattery ML, Samowitz W, Curtin K, Ma KN, Hoffman M, Caan B, Neuhausen S. Associations among IRS1, IRS2, IGF1, and IGF1R3 genetic polymorphisms and colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1206-1214.
- [4] Ho GY, Melman A, Liu SM, Li M, Yu H, Negassa A, et al. Polymorphism of the insulin gene is associated with increased prostate cancer risk. *Br J Cancer* 2003; 88: 263-269.
- [5] Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Madarnas Y, et al. Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. *J Clin Oncol* 2002; 20: 42-51.
- [6] Yang G, Lu G, Jin F, Dai Q, Best R, Shu XO, et al. Populations-based, case-control study of blood c-peptide level and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1207-1211.
- [7] Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Lukanova A, Biessy C, Dechaud H, et al. Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1592-1600.
- [8] Schoen RE, Tangen CM, Kuller LH, Burke GL, Cushman M, Tracy RP, et al. Increased blood glucose and insulin, body size, and incident colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1147-1154.
- [9] Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergström R, Signorello LB, Lagiou P, et al. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 911-915.
- [10] Koohestani N, Chia MC, Pham NA, Tran TT, Minkin S, Wolever TM, Bruce WR. Aberrant crypt focus promotion and glucose intolerance: correlation in the rat across diets differing in fat, n-3 fatty acids and energy. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1679-1684.
- [11] Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1679-1687.

واریانت‌های آلی ژن‌هایی که در مسیر انسولین دخالت دارند شامل ژن انسولین (INS)، ژن رسپتور انسولین (INSR) و سوبستراهای رسپتور انسولین (IRSI, IRSII) با افزایش سطح انسولین و مقاومت به انسولین مرتبط است [۲۲،۲۱] که خود عاملی برای افزایش خطر بدخیمی‌های روده‌ی بزرگ است [۲۳].

در بزرگ‌ترین مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ در آمریکا روی ۸۶۷۴۰ زن سالم و ۴۶۱۴۶ مرد سالم و ۲۴۸۱ فرد مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ انجام شد، سطح بالای انسولین، عامل مستعدکننده برای افزایش ریسک ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ گزارش نشد [۲۴]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در نیویورک روی ۷۶۶ بیمار با آدنومای پیش‌رفته و ۷۷۱ کنترل انجام شد، ارتباط معناداری بین واریانت ژن انسولین rs689 و افزایش خطر ابتلا به آدنومای روده‌ی بزرگ یافت نشد [۲۵] در همین سال در اروپا گزارشی مبنی بر عدم ارتباط واریانت‌های ژن انسولین و ژن‌های مسیر انتقال پیام انسولین منتشر شد [۳]. در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌ای در آمریکا نشان داد که ارتباط معناداری بین واریانت‌های ژن‌های مسیر انتقال پیام انسولین و سرطان روده‌ی بزرگ، وجود دارد [۲۶]. نتایج ضد و نقیضی در زمینه‌ی ارتباط واریانت‌های ژن‌های مسیر انسولین و سرطان روده‌ی بزرگ وجود دارد که این‌که در مطالعه‌ی حاضر، نتیجه به صورت عدم ارتباط بین واریانت ژن انسولین و سرطان روده‌ی بزرگ به دست آمد. نتایج گوناگون و استدلال‌های پیچیده میان مطالعه‌های بررسی‌کننده‌ی ارتباط بین واریانت ژن انسولین و افزایش خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ، ممکن است به دلیل کمبود اطلاعات روی تاثیرات انسولین و یا سایر مقیاس‌های تغییردهنده‌ی سطح انسولین باشد؛ از طرف دیگر این اختلاف در یافته‌ها، می‌تواند ریشه در اختلاف نژادی داشته باشد. به منظور برطرف کردن این تضادها و تعیین دقیق احتمال نوع هم‌بستگی و یا عدم وجود آن در جمعیت ایران و سایر جمعیت‌ها، انجام تحقیقات با تعداد نمونه‌های بیش‌تر پیشنهاد می‌گردد. هم‌چنین از آن‌جا

[16] Pasquali R, Casimirri F, De Iasio R, Mesini P, Boschi S, Chierici R, et al. Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 654-658.

[17] Lucassen AM, Sreaton GR, Julier C, Elliott TJ, Lathrop M, Bell JI. Regulation of insulin gene expression by the IDDM associated, insulin locus haplotype. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 501-506.

[18] Bennett ST, Wilson AJ, Cucca F, Nerup J, Pociot F, McKinney PA, et al. IDDM2 VNTR encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene linked minisatellite locus. *J Autoimmun* 1996; 9: 415-421.

[12] Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR, Liu K. Colorectal cancer mortality and factors related to the insulin resistance syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 385-391.

[13] Van Obberghen E, Gammeltoft S. Insulin receptors: structure and function. *Experientia* 1986; 42: 727-734.

[14] Park D, Pandey SK, Maksimova E, Kole S, Bernier M. Akt-dependent antiapoptotic action of insulin is sensitive to farnesyl transferase inhibitor. *Biochemistry* 2000; 39: 12513-12521.

[15] Efstratiadis A. Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol* 1998; 42: 955-976.

Archive of SID

Association of the insulin gene polymorphism and colorectal cancer

Maral Arkani (M.Sc)¹, Akram Safaei (M.Sc)^{*1}, Khatoon Karimi (M.Sc)¹, Elham Arbabi (M.Sc)¹, Fatemeh Rostami (M.Sc)¹, Mitra Iman (B.Sc)¹, Parvane Mohamadi (B.Sc)¹, Elham Hamzei (B.Sc)¹, Mohsen Vahedi (M.Sc)¹, Reza Mohebi (Ph.D)¹, Mohamad Vafaei (M.D)², Reza Fatemi (M.D)¹, Mohamadreza Zali (M.D)¹

1 - Research Center for Gastroenterology and Liver Disease of Taleghani Hospital , Beheshti University , Tehran , Iran

2 - Iranian Ostomy Society, Tehran , Iran

(Received: 09 Jan 2011 Accepted: 27 Aug 2011)

Introduction: Some studies have determined that polymorphism in insulin gene are associated with increased insulin level and resistant to insulin and also cause to increase risk of colorectal cancer (CRC). The goal of this study was to evaluate incidence of the insulin gene polymorphism (rs689) in an Iranian population and to investigate the role of this polymorphism in increased risk of CRC.

Materials and Methods: Genotyping of the insulin gene were determined in a series of 110 colorectal cancer patients and 110 controls by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism genotyping assays (PCR-RFLP).

Results: P value for genotype AT compared with AA, was 0.052 (OR=1.88, CI=0.99-3.5) and TT versus AA was 0.57 (OR=1.33 CI=0.48- 3.6). The results showed that the insulin gene polymorphism (rs689) is not a predisposing factor to increased risk to CRC (P=0.14). Incidence of mutant allele between patients and controls had no significant differences (OR=1.53 95% CI=0.98- 2.39, Pe=0.057).

Conclusion: These findings suggest that the insulin gene polymorphism (rs689) is not associated with increased risk of CRC.

Keywords: Polymorphism, Colorectal neoplasms, Insulin resistance, rs 689

* Corresponding author: Fax: +98 21 22432527; Tel: +98 21 22432514
akramsafaei.134@gmail.com