

بررسی پلی مورفیسم کدون شماره ۷۲ ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان‌های پوست غیر ملانومایی در شهر اصفهان

دکتر مهدی نیکبخت دستجردی^۱، مقدار حسن‌زاده^۲، دکتر اردشیر طالبی^۳، مجتبی اکبری^۴

خلاصه

مقدمه: ژن P53 به عنوان سرکوب کننده‌ی تومور، نقش مهمی در پایداری ژنومیک دارد. G-to-C در کدون ۷۲ از ژن P53 با افزایش خطر ابتلا به سرطان‌های ریه، نازوفارنکس، دهان، پروستات و کورکتال ارتباط دارد و شاید بتوان آن را به عنوان مارکر استعداد ابتلا به سرطان پوست در نظر گرفت. این پژوهش، تأثیر پلی مورفیسم ژن P53 بر کارسینومای پوست غیر ملانومایی را بررسی نمود.

روش‌ها: این مطالعه‌ی مورد-شاهدی با بررسی ۲۰ نمونه‌ی کارسینوم سلول بازال (Basal cell carcinoma یا BCC)، ۲۰ نمونه‌ی کارسینوم سلول سنگفرشی (Squamous cell carcinoma یا SCC) و ۲۰ نمونه‌ی شاهد برای هر مورد در شهر اصفهان انجام شد. ژنوتیپ‌های مختلف کدون ۷۲ از ژن P53، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Polymerase chain reaction یا PCR تعیین شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های Arg/Arg در نمونه‌های BCC ۶۰ درصد و در نمونه‌های سالم ۲۵ درصد بود. تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه شاهد و مورد در این گروه ژنوتیپی مشاهده شد ($P = ۰/۰۴۸$). فراوانی افراد هتروزیگوت Arg/Pro و همچنین فراوانی ژنوتیپ Pro/Pro در نمونه‌های سرطانی در مقایسه‌ی با نمونه‌های طبیعی گروه شاهد معنی‌دار نبود. $OR = ۴/۵$ در افراد BCC نشان می‌دهد که شانس ابتلای به این بیماری در افراد دارای ژنوتیپ Arg/Arg حدود چهار و نیم برابر افراد سالم است. نتایج آزمون χ^2 تفاوت معنی‌داری را بین فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف در نمونه‌های SCC و سالم نشان نداد.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پلی مورفیسم کدون ۷۲ از ژن P53 یک عامل ژنتیکی مستعد کننده برای ابتلای به سرطان پوست غیر ملانومایی از نوع BCC در اصفهان است، ولی برای تعیین نقش این پلی مورفیسم ژن P53 در رشد سرطان پوست لازم است مطالعات بیشتری صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، کدون ۷۲ ژن P53، سرطان پوست غیر ملانومایی، کارسینوم سلول بازال، کارسینوم سلول سنگفرشی.

مقدمه

یا (Non melanoma skin carcinoma) نیز ذکر می‌کنند. NMSC شایع‌ترین سرطان پوست در انسان است. در طبقه‌بندی این سرطان BCC مسؤل ۸۰ درصد موارد و SCC مسؤل ۲۰ درصد بقیه را تشکیل می‌دهد (۱). به دلیل فراوانی و هزینه‌ی بالای درمانی سرطان پوست غیر ملانومی، این نوع سرطان یک مشکل بهداشت

کارسینوم سلول بازال (Basal cell carcinoma) یا BCC) و کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) یا (Squamous cell carcinoma) شایع‌ترین اشکال بروز سرطان پوست هستند. این دو شکل از سرطان پوست را با هم به عنوان سرطان پوست غیر ملانومی (NMSC)

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای به شماره‌ی ۳۹۰۱۱۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

^۱ دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۴ اپیدمیولوژیست، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

ژن P53 دارای پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی شایعی است که در نتیجه ی آن دو آلل ایجاد می شود. یکی آرژنین (Arginin یا Arg) با توالی CGC و دیگری پرولین (Prolin یا Pro) با توالی CCC. در نتیجه ۳ ژنوتیپ ایجاد می شود که عبارت از Arg/Arg, Pro/Arg, Pro/Pro می باشد.

با توجه به این که این پلی مورفیسیم وابسته به موقعیت جغرافیایی و نژادی است و فراوانی برخی از سرطان های انسانی با آن مرتبط است و پاسخ دهی این ژنوتیپ به داروهای شیمی درمانی متفاوت گزارش شده است (۱۴)، از این رو در مطالعه ی پیش رو تأثیر این پلی مورفیسیم بر NMSC بررسی شد.

روش ها

این مطالعه یک مطالعه ی مورد-شاهدی بود که طی آن به بررسی ۲۰ نمونه ی DNA در مبتلایان به BCC و ۲۰ نمونه در مبتلایان به SCC و نیز ۲۰ نمونه ی شاهد برای هر یک از سرطان ها در شهر اصفهان پرداختیم. در هر گروه ۲۰ نمونه مورد مطالعه قرار گرفتند. ژنوتیپ های مختلف کدون ۷۲ از ژن P53، با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase chain reaction) تعیین شد.

برای استخراج DNA از خون محیطی افراد سالم حدود ۰/۵ میلی لیتر به عنوان گروه شاهد جمع آوری گردید. با اضافه نمودن بافر لیز سلولی و سانتی فوژ، گلوله های سفید و قرمز لیز شدند. سپس با استفاده از روش استاندارد، استخراج DNA انجام گرفت (۸).

برای استخراج DNA از بلوک های پارافینی نمونه های سرطانی سه یا پنج قطعه از برش های بافتی به ضخامت ۴ تا ۵ میکرومتر در میکروتیوپ ۱/۵

عمومی به شمار می آید (۲). آمارهای رسمی NMSC را در بین چهار سرطان شایع بالغین قرار می دهد (۳). تماس با آفتاب به عنوان مهم ترین عامل ایجاد NMSC شناخته می شود (۴). به هر حال اشعه ی خورشید تنها علت ایجاد NMSC محسوب نمی شود. عوامل فیزیکی و شیمیایی دیگر مانند اشعه ی یونیزه کننده، آرسنیک، محصولات زغال سنگ و به علاوه مهار سیستم ایمنی نیز باعث ایجاد NMSC می شوند (۵). از آن جایی که رابطه ی مستقیمی بین ژنتیک و سرطان وجود دارد و بیشترین کمک در فهم سرطان ناشی از مطالعات بیولوژیکی مولکولی است، نشان داده شده است که اگر ژن خاصی موتاسیون پیدا کند به تولید سرطان منجر می شود، بررسی و تحقیق در این مورد از اهمیت خاصی برخوردار است. یکی از ژن هایی که در سرطان نقش دارد ژن P53 است که در سال ۱۹۸۰ میلادی به عنوان پروتو انکوژن شناخته شد (۶). در سال ۱۹۹۰ به عنوان یک ژن مهار کننده ی تومور و ثبات ژنی (Genomic stability) نام گذاری شد (۷-۸). پروتئین مهار کننده ی تومور P53 به وسیله ی جلوگیری از تکثیر و القای آپوپتوز سلول های توموری از پیشرفت سرطان جلوگیری می کند (۹). این پروتئین اثر حفاظتی در سلول هایی که آسیب DNA دارند را بر عهده دارد. مطالعات زیادی در رابطه با یافتن ارتباط بین انواع پلی مورفیسیم های پروموتور این ژن و بیماری ها انجام شده است (۱۰). گزارش ها نشان می دهند که میزان بروز سرطان های مختلف مانند سرطان پروستات (۱۱)، سرطان سینه (۱۲)، سرطان کولورکتال (۱۰) و سرطان حنجره (۱۳) با پلی مورفیسیم کدون ۷۲ از ژن P53 رابطه ی مستقیم دارد. مشخص شده است که کدون ۷۲ اگزون شماره ی ۴

فراوانی سه ژنوتیپ مختلف کدون ۷۲ در نمونه‌های سرطانی با توزیع فراوانی این سه ژنوتیپ در نمونه‌های شاهد از آزمون χ^2 استفاده و $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نسبت شانس (Odds ratio) یا (OR) و سطح اطمینان ۹۵ درصد برای تعیین رابطه‌ی بین متغیر وابسته و مستقل محاسبه گردید.

یافته‌ها

در این پژوهش، تعداد ۲۰ نمونه SCC، ۲۰ نمونه BCC و ۲۰ نمونه از افراد سالم جمع‌آوری گردید و عملیات استخراج DNA روی ۶۰ نمونه انجام شد.

سن نمونه‌ها بین ۳۶ تا ۹۸ سال بود. برای مشخص کردن پلی مورفیسم کدون ۷۲ از ژن P53 با استفاده از PCR آلل پرولین با اندازه‌ی ۱۷۷ جفت باز و آلل آرژینین با اندازه‌ی ۱۴۱ جفت باز به طور اختصاصی انجام گرفت. توزیع ژنوتیپ‌های کدون ۷۲ در آگزون ۴ در گروه شاهد و بیمار در جدول ۱ برای BCC و جدول ۲ برای SCC نشان داده شده است.

همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فراوانی ژنوتیپ Arg/Arg در افراد مبتلا به BCC از افراد سالم به طور معنی‌داری بیشتر بود. OR به دست آمده برای این ژنوتیپ در افراد مبتلا به BCC برابر ۴/۵ بود (فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد: ۱۷/۳۷-۱/۱۶) که به این معنی است که افراد دارای ژنوتیپ Arg/Arg ۴/۵ برابر افراد سالم مبتلا به BCC بودند.

جدول ۲ نشان می‌دهد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دو گروه افراد سالم مبتلایان به SCC وجود نداشت.

میلی لیتری جمع‌آوری گردید و با اضافه نمودن گزینلن سانتریفوژ انجام و سپس گزینلن دور ریخته شد. در مرحله ی بعد با اضافه نمودن اتانول، سانتریفوژ انجام و در نهایت با استفاده از روش استاندارد، استخراج DNA انجام گرفت.

پس از استخراج DNA تکثیر توالی پلی مورفیک کدون ۷۲ ژن P53 توسط PCR انجام شد. PCR از طریق استفاده از ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانوگرم DNA، ۱ واحد تک پلی مراز، ۱/۵ میلی مول (MgCl₂) و ۲۰۰ میکرومول از هر یک از dGTP، dTTP، dCTP، dATP و ۲ میکروگرم از هر یک از زوج پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر پرولین و آرژینین انجام گرفت (۸).

توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر پرولین عبارتند از:

F: GCCAGAGGCTGCTCCCC
R: CGTGCAAGTCACAGACTT

و توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر آرژینین عبارتند از:

F: TCCCCCTTGCCGTCCCAA
R: CTGGTGCAGGGGCCACGC

سپس حدود ۲۰ میکرولیتر از محصول واکنش همراه با ۴ میکرولیتر Loading buffer در ژل آگاروز ۲ درصد در بافر (TBE) Tris-borate-EDTA $\times 0/5$ الکتروفورز شد و روی یک ترانس لومیناتور ماورای بنفش (Ultra violet transilluminator) مشاهده شد (۸) اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه‌ی توزیع

جدول ۱. مقایسه‌ی توزیع فراوانی ژنوتیپ در مبتلایان به BCC (Basal cell carcinoma) و افراد سالم

ژنوتیپ	مبتلایان به BCC	گروه شاهد	مقدار P*
Arg/Arg	۱۲ (۶۰)	۵ (۲۵)	۰/۰۴۸
Arg/Pro	۷ (۳۵)	۱۳ (۶۵)	۰/۱۱
Pro/Pro	۱ (۵)	۲ (۱۰)	> ۰/۰۵

* آزمون χ^2 : ۵/۰۱۶ (درجه‌ی آزادی ۲)

جدول ۲. مقایسه‌ی توزیع فراوانی ژنوتیپی در مبتلایان به SCC (Squamous cell carcinoma) و افراد سالم

ژنوتیپ	مبتلایان به SCC	گروه شاهد	مقدار P*
Arg/Arg	۸ (۴۰)	۶ (۳۰)	۰/۷۴
Arg/Pro	۱۰ (۵۰)	۱۱ (۵۵)	> ۰/۰۵
Pro/Pro	۲ (۱۰)	۳ (۱۵)	> ۰/۰۵

* آزمون χ^2 : ۰/۵۳۳ (درجه‌ی آزادی ۲)

بحث

Pro/Pro با افزایش خطر ابتلای به سرطان اندومتر ارتباط دارد (۱۶).

Wang و همکاران نشان دادند که در سرطان گردن رحم مرتبط با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) یا Human papilloma virus) بیان بیش از اندازه‌ی اسید آمینه‌ی آرژنین در پروتئین P53 وجود دارد و مشخص نمودند که افراد هموزیگوس آرژنین P53 برای ابتلای به سرطان گردن رحم مرتبط با HPV هفت برابر مستعدتر از افراد هتروزیگوت بودند (۱۷). در مطالعه‌ی در سال ۱۳۸۵ در دانشگاه شیراز رابطه‌ی ضعیفی بین ژنوتیپ Arg/Arg و ابتلای به BCC مشاهده شده بود (۱۸). رابطه‌ی واضح‌تری از پلی مورفیسم Arg/Arg ژن P53 و سرطان‌های پوستی در سال ۲۰۰۸ در برزیل توضیح داده شد (۱۹). قبل از آن پزشکان هلندی هر نوع ارتباطی بین پلی مورفیسم در ژن P53 و ابتلای به BCC یا SCC را رد کرده بودند (۲۰). در این مطالعه عوامل زمینه‌ساز بالقوه از قبیل کشیدن سیگار، عادات زندگی و ابتلای به ویروس HPV کنترل نشد. این‌ها موارد مهمی هستند

مطالعات انجام شده پیشنهاد می‌کنند که عواملی مانند پلی مورفیسم ژنتیکی ممکن است بیان‌کننده‌ی تفاوت‌های فردی در میزان بروز سرطان باشند. وقوع اشکال مختلف آلی در یک ژن پلی مورفیسم نامیده می‌شود. پلی مورفیسم اشکال متفاوتی دارد که یکی از انواع آن تغییر در کدون و به دنبال آن تغییر در پروتئین ایجاد شده است. این تغییر منجر به ایجاد تفاوت در عملکرد پروتئین اصلی می‌شود. عملکرد طبیعی پروتئین P53 محافظت از ژنوم در مقابل صدمات وارده است که منجر به ترمیم ژنوم و یا آپوپتوز می‌شود و از این طریق سلول‌های کارسینومژنیک را حذف می‌نماید (۱۵). پلی مورفیسم شایع G-to-C در ژن P53 موجب تبدیل آرژنین به پرولین در ساختمان پروتئین می‌شود. نقش پلی مورفیسم Arg/Pro در استعداد ابتلا به سرطان در چند تحقیق بررسی و نتایج ضد و نقیضی ارائه گردیده است. در ژاپن نتایج مطالعه‌ی انجام شده نشان داد که ژنوتیپ Arg/Arg در مقایسه‌ی با ژنوتیپ Arg/Pro و

با بررسی سایر عوامل زمینه‌ساز مانند کشیدن سیگار، ابتلای به ویروس HPV و محافظت از پوست در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش لازم است.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پلی مورفیسیم کدون ۷۲ از ژن P53 و ژنوتیپ Arg/Arg یک عامل ژنتیکی مستعد کننده برای ابتلای به سرطان پوست غیر ملانومایی و از نوع BCC در اصفهان می‌باشد، ولی برای تعیین نقش این پلی مورفیسیم ژن P53 در رشد سرطان پوست، لازم است مطالعات بیشتری صورت پذیرد.

References

1. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 2002; 146 Suppl 61: 1-6.
2. Housman TS, Feldman SR, Williford PM, Fleischer AB, Jr., Goldman ND, Acostamadiedo JM, et al. Skin cancer is among the most costly of all cancers to treat for the Medicare population. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(3): 425-9.
3. Wheless L, Black J, Alberg AJ. Nonmelanoma skin cancer and the risk of second primary cancers: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(7): 1686-95
4. Albert MR, Weinstock MA. Keratinocyte carcinoma. *CA Cancer J Clin* 2003; 53(5): 292-302.
5. Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2005; 152(6): 1108-24.
6. Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J. *The World of the Cell*. 6th ed. Sanfrancisco: Benjamin Cummings; 2005. p. 783-5.
7. Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990; 348(6303): 747-9.
8. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(4): 177-81.
9. Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, et al. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 2009; 11(6): 694-704.
10. Cao Z, Song JH, Park YK, Maeng EJ, Nam SW, Lee JY, et al. The p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to colorectal cancer in Korean patients. *Neoplasma* 2009; 56(2): 114-8.
11. Zhang J, Zhuo WL, Zheng Y, Zhang YS. Polymorphisms of TP53 codon 72 with prostate carcinoma risk: a meta-analysis. *Med Oncol* 2010; 27(2): 540-6.
12. Aoki MN, da Silva do Amaral Herrera AC, Amarante MK, do Val Carneiro JL, Fungaro MH, Watanabe MA. CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development. *Int J Mol Med* 2009; 23(3): 429-35.
13. Zemleduch T, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter K, Jagodzinski PP. Contribution of polymorphism in codon 72 of TP53 gene to laryngeal cancer in Polish patients. *Oral Oncol* 2009; 45(8): 683-6.
14. Mahasneh AA, Abdel-Hafiz SS. Polymorphism of p53 gene in Jordanian population and possible associations with breast cancer and lung adenocarcinoma. *Saudi Med J* 2004; 25(11): 1568-73.
15. Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordan J. p53: twenty five years understanding the

- mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem* 2004; 60(4): 287-307.
16. Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3(6): 389-92.
17. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5(1): 129-34.
18. Pezeshki A, Sari-Aslani F, Ghaderi A, Doroudchi M. p53 codon 72 polymorphism in basal cell carcinoma of the skin. *Pathol Oncol Res* 2006; 12(1): 29-33.
19. de Oliveira WR, Rady PL, Grady J, Hughes TK, Neto CF, Rivitti EA, et al. Association of p53 arginine polymorphism with skin cancer. *Int J Dermatol* 2004; 43(7): 489-93.
20. Bastiaens MT, Struyk L, Tjong AHS, Gruis N, ter Huurne J, Westendorp RG, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma and p53 codon 72 polymorphism: a need for screening? *Mol Carcinog* 2001; 30(1): 56-61.

Archive of SID

Investigation of P53 Codon 72 Polymorphism in Patients with Nonmelanoma Skin Cancers in Isfahan

Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD¹, Meghdad Hasanzadeh², Ardeshir Talebi PhD³,
Mojtaba Akbari MSc⁴

Abstract

Background: The P53 tumor suppressor gene plays important roles in genomic stability. G-to-C at codon 72 in the P53 gene has been associated with increased risk for lung, oral, prostate, breast, colorectal cancers and may be a marker for risk of skin cancer. This project studied the effect of P53 polymorphism on risk of nonmelanoma skin cancers (Squamous and basal cell carcinoma).

Methods: This case-control study undertook for study of twenty basal cell carcinoma (BCC), twenty squamous cell carcinoma (SCC) and twenty specimens as controls for each cancer specimen in the city of Isfahan, Iran. Different P53 codon 72 genotypes were identified using polymerase chain reaction.

Findings: In control samples, the frequency of Arg/Arg genotype showed 25% and in BCC specimens showed 60%. The differences in this genotype group between the cases and controls were statistically significant ($P = 0.048$). The differences in the frequency of heterozygote Arg/Pro and also in the frequency of Pro/Pro genotype between the cases and controls were not statistically significant. OR = 4.5 in BCC cases show that the risk for this disease in persons who have Arg/Arg genotype is about 4.5 times more than normal people. The results of χ^2 test showed that in this study there is not statistically significant differences between the SCC specimens and controls for frequency of different genotypes.

Conclusion: The present study indicate that P53 codon 72 polymorphism is a genetic predisposing factor for risk of nonmelanoma skin cancers (of BCC type) in Isfahan. However, further studies are needed in order to elucidate the role of P53 codon 72 polymorphism in skin cancer development.

Keywords: Polymorphism, P53 codon 72, Nonmelanoma skin cancer, Basal cell carcinoma, Squamous cell carcinoma.

* This paper is derived from a medical doctorate thesis No. 390111 in Isfahan University of Medical Sciences.

¹ Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

² Student of Medical, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³ Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁴ Epidemiologist, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Mehdi Nikbakht Dastjerdi PhD, Email: nikbakht@med.mui.ac.ir