

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن اینترلوکین-۱۷ (IL-17F) با افزایش استعداد ابتلاء به سرطان معده

ابوذر قربانی^۱
وحید حسینی^۲
ابوالقاسم عجمی^۱
علیرضا رفیعی^۱
زهرا حسینی خواه^۳
قاسم جان بابایی^۴

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده یکی از شایع ترین سرطان های دستگاه گوارشی در دنیا می باشد که در ایران نیز از شیوع بسیار بالایی برخوردار است. اینترلوکین-۱۷ (IL-17) یک سایتوکاین پیش التهابی می باشد است که توسط سلول های Th-17 ترشح می شود و از طریق القای فاکتورهای مختلف باعث ایجاد و تقویت التهاب می شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم IL-17 در بیماران مبتلا به سرطان معده و مقایسه آن با گروه شاهد می باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۳۳۲ نفر انجام گردید که شامل ۱۶۱ بیمار مبتلا به سرطان معده با میانگین سنی $62/14 \pm 12/6$ سال (۸۹ مرد و ۷۲ زن) و ۱۷۱ فرد سالم با میانگین سنی $58/93 \pm 14/2$ سال (۷۴ مرد و ۸۷ زن) بودند. DNA ژنومی با استفاده از روش تغییر یافته رسوب پروتئین با کمک غلظت بالای نمک استخراج شد و ژنوتیپ های حاصل از پلی مورفیسم IL-17F (rs 7488T/C) در ژن IL-17F با روش RFLP-PCR مورد بررسی گرفت و نتایج بین گروه بیمار و شاهد مقایسه گردید.

یافته ها: فراوانی آلل G در بیماران مبتلا به سرطان معده بیشتر (۱۲/۱ درصد) از فراوانی آن در گروه سالم (۹/۱۵ درصد) بود ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نشد ($p=0/22$). همچنین فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG در بیماران مبتلا به سرطان معده به مراتب از افراد سالم بیشتر بود (۴/۳ درصد در مقابل ۱/۸ درصد) با این وجود این تفاوت هم از نظر آماری قابل توجه نبود ($p=0/182$). ارتباط معنی داری بین حضور آلل 7488G با مراحل بالینی تومور ($p=0/28$)، درجه بدخیمی تومور ($p=0/36$) و عفونت هلیکوباکتر پیلوری ($p=0/89$) دیده نشد.

استنتاج: عدم وجود ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم A7488G در پروموتور ژن IL-17F و سرطان معده بیان می نماید که آلل G نمی تواند به تنهایی به عنوان یک فاکتور خطر ژنتیکی در تعیین استعداد ابتلاء به سرطان معده نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، پلی مورفیسم ژن، اینترلوکین 17-F، Th17

مقدمه

سرطان های دستگاه گوارش، بیش از یک سوم سرطان های شایع و تقریباً نیمی از سرطان هایی که منجر به مرگ می شوند را تشکیل می دهند. از میان سرطان های لوله گوارش می توان به سرطان کولورکتال و سرطان

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۵۱۲-۸۹ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مؤلف مسئول: علیرضا رفیعی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی E-mail: rafiei1710@gmail.com

۱. گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱۱/۲۱ تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۱۲

معدده اشاره کرد که شایع ترین آن‌ها هستند و به ترتیب سومین و چهارمین بدخیمی‌های رایج در دنیا با شیوع سالیانه تقریباً یک میلیون ونهصد و سی و چهار هزار نفر مورد جدید را شامل می‌شوند (Jemal A 2005). سرطان معدده به جهت شیوع بالا و مرگ و میر زیاد از اهمیت به‌سزایی در استان مازندران برخوردار است. هرچند تلاش‌های زیادی در جهت تشخیص و درمان مؤثر سرطان صورت گرفته است ولی از آن‌جا که سرطان معدده معمولاً در مراحل تقریباً پیشرفته تشخیص داده می‌شود که عملاً به جهت عدم پاسخ مناسب به درمان‌های موجود از پیش آگاهی خوبی برخوردار نیست لذا تلاش‌های وافری می‌بایست در پیشگیری از این سرطان‌ها و به‌ویژه سرطان معدده انجام شود (Lichtenstein P 2000).

از آن‌جا که ابتلاء به عفونت‌ها از جمله عفونت با هلیکوباکتر پیلوری نقش مهمی در بروز التهاب مزمن در مخاط معدده دارد (Suerbaum S 2002) و التهاب مزمن شرایط را برای بروز زخم پپتیک و ادنوکارسینوم معدده فراهم می‌نماید. با این حال، وجود تفاوت قابل ملاحظه در میزان التهاب در معدده افراد مختلف آلوده به *H. pylori* (Prinz C 2001)، نشان می‌دهد که غیر از عوامل مربوط به پاتوژن، فاکتورهای دیگری از جمله فاکتورهای ژنتیکی و ایمونولوژیکی مربوط به میزبان نیز در این راستا نقش دارند. بنابراین سازوکارهایی که در ایجاد التهاب در مخاط معدده نقش دارند، می‌توانند به‌عنوان محور اصلی مطالعاتی پاتوژن سرطان معدده قرار گیرند. در این میان Th-17 که دودمان جدیدی از لنفوسیت‌های T CD4+ می‌باشد که مرز بین پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی محسوب می‌شود با تولید سیتوکاین‌های پیش التهابی از قبیل IL-22, IL-17A, IL-17F و IL-26 نقش کلیدی در ایجاد التهاب داشته و در پاتوژن بسیاری از بیماری‌های خود ایمن (Chabaud M 1998) و بیماری‌های التهابی روده‌ای و بدخیمی‌ها (Ye ZJ 2010) (Chen D 2012) مؤثرند. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های Th-17 باعث تقویت پاسخ‌های

ایمنی ضد تومور می‌شوند (Benchetrit F 2002) در حالی که سایر گزارشات بیانگر ارتباط Th-17 و به‌ویژه IL-17 با فرایند رگ‌زایی در تومورها و تعداد عروق خونی در بافت‌های سرطانی می‌باشند (Kato T 2001). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که التهاب مزمن می‌تواند سنگ بنای پیدایش سرطان باشد. سلول‌های Th17 به‌واسطه نقشی که در پیدایش التهاب به‌ویژه التهاب مزمن دارند، می‌توانند با پیدایش و پیشرفت سرطان ارتباط داشته باشند (Horlock C 2009). ارتباط IL-17 با پیشرفت سرطان پروستات (Steiner GE 2003)، کارسینوم پوست (Wang L 2010) و سرطان معدده (Zhang B 2008) مشخص شده است. IL-17F موجب تولید بسیاری از سیتوکاین‌های التهابی نظیر IL-6 و GM-CSF و کموکاین‌های CxCL1 و CxCL2 و CxCL5 شده و تشکیل گرانولوم را تشدید نموده و در فراخوان نوتریفیل‌ها نقش به‌سزایی دارد (Weaver CT 2007).

مطالعات متعددی ارتباط بین پلی مرفیسم در ژن سیتوکاین‌ها و سرطان معدده را بررسی کرده‌اند ولی اندک مطالعاتی در جهان به بررسی نقش پلی مرفیسم در ژن IL-17F در ارتباط با سرطان معدده پرداخته‌اند. ژن IL-17F بر روی کروموزوم ۶ قرار گرفته و دارای ۳ اگزون می‌باشد. بروز پلی مرفیسم در ژن کد کننده IL-17F با بروز و شدت بیماری‌های خود ایمنی نظیر آرتريت روماتوئید (Nordang GB 2009)، بیماری التهابی روده (Chen B 2009)، سرطان معدده ارتباط دارد (Tahara T 2009; Tahara T 2010). جایگزینی گوانین به آدنین در موقعیت A7488G پروموتور ژن IL-17F که باعث ایجاد پلی مرفیسم عملکردی rs 763780 می‌شود قابلیت تغییر فعالیت ژن را دارد به‌طوری که در افراد دارای آلل 197A میزان تولید IL-17 بسیار بیشتر از ناقلین 197G است (Espinoza JL 2011). هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش اشکال پلی مرفیک ژن IL-17F در استعداد ابتلاء به سرطان معدده می‌باشد. به همین منظور وضعیت پلی مرفیسم A7488G در ژن

نظیر ارتريت روماتويد؛ لوپوس اريتماتوس سيستميك، ديابت مليتوس و بيماری التهابی روده و يا بيماری های عفونی مزمن بودند. همچنين چنانچه در بستگان درجه يك اين افراد سابقه سرطان معده وجود داشت نيز از ورود به مطالعه حذف می شدند. ویژگی های دموگرافيك و خصوصيات باليني و پاتولوژی بيماران در چك لیست ثبت گردید. پروتكل انجام اين مطالعه به تصويب كميته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران رسید. از افراد تحت مطالعه بعد از اخذ رضایت آگاهانه حدود ۱۰-۵ ميلي لیتر خون وریدی توسط سرنگ خلا دار استريل اخذ گردید و با لوله های حاوی ۵۰ ميلي مولار EDTA جهت استخراج DNA ژنومی و لوله های حاوی خون لخته جهت جداسازی سرم منتقل شد و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA به روش تغییر یافته *Salting out*

بدین منظور حدود ۴ ميلي لیتر خون حاوی EDTA را به لوله های فالكون ۱۵ ميلي لیتری منتقل گردید و با بافر لیزکننده I به حجم ۱۵ ميلي لیتر رسید. سپس به منظور مخلوط کردن، محتویات لوله را چند بار سر و ته کرده و ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد. به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و مجدداً لوله را تا ۱۵ ميلي لیتر با بافر I پر شد و مراحل فوق الذکر سه بار تکرار گردید در مرحله بعد بر روی رسوب حاصله ۲ ميلي لیتر بافر II ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۴۵ درجه سانتی گراد گذاشته شد و در طی این مدت چند بار لوله ها شیک شده تا رسوب کاملاً حل شود. نیم ميلي لیتر محلول سدیم پر کلرات ۵ مولار به لوله ها افزوده و دو تا سه دقیقه مخلوط گردید، به هر لوله دو ميلي لیتر كلرو فرم سرد، در زیر هود افزوده شد. لوله ها به مدت ۵ تا ۷ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی DNA می باشد به لوله های حاوی ۳ ميلي لیتر اتانل سرد

IL-17F در بيماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم بررسی شد. شناسایی فنوتیپ و ژنوتیپ بيماران مبتلا به سرطان علاوه بر كمك شایان در مشخص شدن فیزیوپاتولوژی بيماری، می تواند در شناسایی و غربالگری افراد دارای استعداد ابتلا ژنتیکی و احیاناً استفاده از راه کارهای پیش گیرانه و درمانی مناسب كمك نماید.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه مورد-شاهدی با توجه به سطح اطمینان ۹۵ درصد ($\alpha=0.05$) و توان آزمون ۹۰ درصد ($\beta=0.10$) و با توجه به ۷۲/۹ درصد $P=0.25$ ، $P=0.161$ نفر در هر گروه برآورد گردید. به طوری که از مجموع ۳۳۲ نفر مورد مطالعه، ۱۶۱ بیمار مبتلا به سرطان معده بودند که از تیر ماه ۱۳۸۸ لغایت بهمن ماه ۱۳۹۰ به پلی کلینیک طبوبی و بخش ها گوارش و انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری جهت آندوسکوپي و شیمی درمانی مراجعه کرده بودند. تشخیص سرطان معده بر اساس یافته های بالینی، آندوسکوپي و تأیید پاتولوژی بر طبق پروتکل بین المللی International Classification of Diseases for Oncology IX, code 151 و معیارهای Leuren انجام گردید. بيماران مورد بررسی بر اساس شواهد بالینی و یافته های آزمایشگاهی فاقد بيماری های التهابی به ویژه کولیت اولسرو و بيماری التهابی روده بودند. ۱۷۱ نفر داوطلب سالم غير خويشاوند با افراد مبتلا به سرطان معده که از نظر مشخصات سنی، جنس و منطقه جغرافیایی و نژاد با گروه بیمار مورد تحقیق مطابقت داشتند نیز به عنوان شاهد انتخاب شدند. این افراد از میان از اهداء کنندگان خون و يا از افرادی انتخاب شدند که جهت پایش سلامت خود مورد آندوسکوپي قرار می گرفتند و نتیجه آندوسکوپي آن ها نرمال بود. افراد شاهد بر اساس شواهد بالینی فاقد سابقه بيماری های خود ایمن یا التهابی

۹۹ درجه اضافه شد اکلاف DNA مشخص و رسوب کند. در پایان DNA را با پی پت پاستور خارج کرده تا در هوای آزاد اتانل آن تبخیر شود و سپس DNA در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل حل شد.

تکثیر ناحیه ژنی IL-17F

تکثیر بخشی از ژن IL-17F که حاوی پلی مرفیسم A7488G می باشد با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی به کمک واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) تکثیر یافت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر و با استفاده از مخلوطی از ۱۰۰ ng DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرو مول از هر یک از بازهای آلی (dNTP)، ۱ میکرومول از هر یک از پرایمرها، ۲ mM از محلول MgCl₂، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و بفر PCR انجام گردید. پروفایل دمایی PCR شامل، دناتوراسیون اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۵ °C و سپس در ۳۵ سیکل با شرایط دمایی زیر ادامه می یابد: دمای دناتوراسیون ۹۵ °C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰ °C به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۴ دقیقه.

تعیین ژنوتیپ IL-17F

برای تعیین ژنوتیپ های حاصل از پلی مرفیسم A7488G در ژن IL-17F از روش RFLP استفاده شد. برای این منظور بخش تکثیر یافته ژن IL-17F تحت تأثیر روش هضم آنزیمی با آنزیم های محدود الاثر *NlaIII* (فرمنتاز، آلمان) به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. سپس محصول هضم شده بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز برده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور آشکارسازی باندها صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

برای ارزیابی داده های کمی پس از اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون

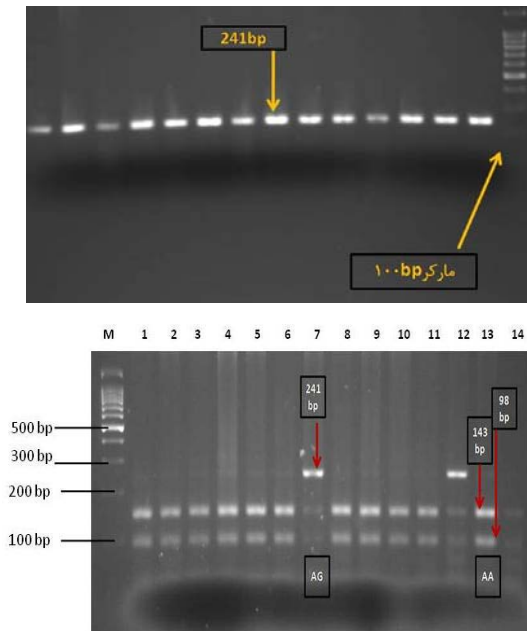
کولموگراف-اسمیرنوف، داده های کمی با استفاده از آزمون Student t Test مستقل و داده های کیفی با استفاده از تست های آماری مربع Chi و یا Fisher Exact test ارزیابی شدند. ارتباط بین ژنوتیپ ها و یا آلل ها پلی مرفیسم ژن ها با بیماری و مراحل مختلف آن با استفاده از آزمون رگرسیون لوژیستیک بررسی شد و میزان نسبت شانس Odd ratio با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد.

یافته ها

الف- ارزیابی یافته های دموگرافی و بالینی و پاتولوژیک بیماران مبتلا به کانسر معده

در این مطالعه ۱۶۱ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم معده شرکت داشتند که از این تعداد ۸۹ (۵۵/۲۴ درصد) مرد و ۷۲ (۴۴/۷۳ درصد) زن با میانگین سنی ۶۲/۱۴±۱۲/۶ سال بودند به طوری حداقل ۲۸ و حداکثر ۸۶ سال داشتند. از ۱۷۱ نفر شاهد سالم ۸۴ (۴۹/۱۲ درصد) مرد و ۸۷ (۵۰/۹ درصد) زن با میانگین سنی ۵۸/۹۳±۱۴/۲ سال وارد مطالعه شدند. همان طور که جدول شماره ۱ نشان می دهد اختلاف معنی داری بین میانگین سن بیماران و افراد شاهد مشاهده نشد (p=۰/۹۹). همچنین اختلاف قابل توجهی بین گروه بیماران و گروه شاهد از نظر جنسی مشاهده نشد (p=۰/۱۶). وضعیت تأهل و شغل در بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود داشت به طوری که گرچه بیشترین جمعیت در هر گروه را افراد متأهل تشکیل می دادند با این حال فراوانی مجردین و افراد مطلقه در مبتلایان به سرطان معده بیشتر از افراد شاهد بود. همچنین اختلاف معنی داری بین دو گروه تحت مطالعه از لحاظ ویژگی های اجتماعی-اقتصادی وجود داشت به طوری که اشتغال در بیماران با سرطان معده کمتر از افراد شاهد بود (p=۰/۰۰۱) و میزان تحصیلات افراد بیمار کمتر از افراد شاهد بود (p=۰/۰۰۳).

کارایی نداشته و بنابراین تنها همان قطعه ۲۶۲ جفت بازی آشکار خواهد شد.



تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفوریتیک محصول PCR بخش تکثیر یافته‌ای از ژن IL-17F بطول 241 جفت باز (شکل بالا) که حاوی ناحیه پلی مرفیک A7488G و قطعات حاصل از هضم آنزیمی در روش RFLP-PCR (شکل پایین) را نشان می دهد. همان طور که دیده می شود ژنوتیپ AA باعث ایجاد دو باند ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی و ژنوتیپ AG باعث ایجاد سه قطعه ۲۴۱، ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی و ژنوتیپ GG تنها بواسطه حضور قطعه ۲۴۱ جفت بازی مشخص می شود.

توزیع فراوانی آلل و ژنوتیپی پلی مرفیسیم A7488G در ژن IL-17F در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم در جدول شماره ۲ آمده است. به علت این که امکان بررسی نتیجه این پلی مرفیسیم در ۷ فرد سالم فراهم نشد عملاً آنالیز آماری تعیین فراوانی ژنوتیپی در مورد ۱۶۴ نفر انجام گردید. توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مرفیسیم در افراد شاهد از قانون هاردی وینبرگ تبعیت می کرد ($p=0/126$). همان طوری که در جدول شماره ۲ دیده می شود فراوانی آلل G که با افزایش تولید IL-17F همراه است، در بیماران مبتلا به سرطان معده بیشتر (۱۲/۱ درصد) از فراوانی آن در گروه سالم (۹/۱۵ درصد) بود در حالی که فراوانی آلل طبیعی A در

سرطان معده در بیماران مورد بررسی از نوع روده‌ای بود و ۷۱/۷ درصد بیماران در مرحله سوم و چهارم بیماری خود قرار داشتند. همچنین بررسی‌های پاتولوژی نشان داد اکثر بیماران مورد مطالعه در مراحل پیشرفته بیماری قرار داشتند و تنها در کمتر از ۱۰ درصد بیماران، تشخیص در مراحل اولیه بیماری انجام شده است. از طرف دیگر طبقه‌بندی بیماران بر اساس درجه بدخیمی نشان داد که درجه تمایز سلول‌ها در بیشتر از دو سوم بیماران نسبتاً تا کاملاً تمایز نیافته بود.

جدول شماره ۱: خصوصیات دموگرافیک در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد شاهد سالم

متغیر	شاهد (n=171)	سرطان معده (n=161)	سطح معنی داری
سن (سال)	58/93±14/2	62/14±12/6	0/99
جنس (زن: مرد)	84 : 87	89 : 72	0/16
وضعیت تاهل			
مجرد	3 (1/9)	7 (4/1)	
متاهل	166 (97/6)	149 (93/8)	0/002
متلقه	1 (0/5)	3 (2/1)	
شغل			
بی کار	1 (0/6)	4 (2/7)	
کارمند	35 (20/4)	24 (15)	0/001
خانه دار	74 (43/1)	46 (29/2)	
سایر	60 (36)	85 (53/1)	
تحصیلات در حد دیپلم و بالاتر	85 (49/7)	53 (33/9)	0/003

ب) تعیین ژنوتیپ حاصل از پلی مرفیسیم A7488G در بیماران مبتلا به سرطان معده

تغییر باز آلی گوانین به جای آدنین در موقعیت A7488G پروموتور ژن IL-17F که موجب جایگزینی اسید آمینه آرژنین به جای هیستیدین در موقعیت ۱۶۱ پروتئین (H161R) می گردد موجب ایجاد سه ژنوتیپ GG، GA و AA می شود. این ژنوتیپ‌ها همان طور که در قسمت پایین تصویر شماره ۱ دیده می شود بر اساس تعداد و اندازه قطعه حاصل از برش توسط آنزیم محدودالتر مشخص می شوند به طوری که ژنوتیپ هموزیگوت AA دو قطعه ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی، ژنوتیپ هتروزیگوت GA سه قطعه ۲۴۱، ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی، ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG آنزیم محدودالتر

افراد شاهد بیشتر از بیماران مبتلا به سرطان معده بود (۹۰/۸۵ درصد در مقابل ۸۷/۹ درصد) ولی این اختلافات از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/22$). بررسی چگونگی توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مرفیسم در ژن IL-17F نشان داد ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG در بیماران مبتلا به سرطان معده به مرتب از افراد سالم بیشتر می‌باشد (۴/۳ درصد در مقابل ۱/۸ درصد) با این وجود این تفاوت از نظر آماری قابل توجه نبود ($p=0/182$). همان‌طور که جدول شماره ۲ نشان می‌دهد گرچه فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی AA در افراد سالم بیشتر از بیماران مبتلا به سرطان معده می‌باشد (۸۵/۵ درصد در مقابل ۸۰/۱ درصد) ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/4$).

با توجه به این که فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مورد مطالعه کم می‌باشد برای آن که بتوان تأثیر حضور آن را ارزیابی نمود کل جمعیت حامل یک نسخه و یا دونسخه از آلل موتان G با هم ترکیب گردید و به صورت مدل غالب آلل موتان G (شامل ژنوتیپ‌های GG+AG) ارائه شد. سپس جمعیت مورد مطالعه براساس حضور (ژنوتیپ‌های GG+AG) یا عدم حضور (ژنوتیپ GG) آلل G مورد مقایسه قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول شماره ۲ دیده می‌شود گرچه حضور آلل G در بیماران بیشتر از افراد شاهد دیده شد (۲۰ درصد در برابر ۱۶/۵ درصد) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/42$).

ارزیابی ارتباط پلی مرفیسم IL-17F با پیشرفت سرطان معده

به منظور ارزیابی تاثیر آلل 7488G در پیشرفت سرطان معده و درجه بدخیمی آن، ارتباط مراحل تومور با حضور آلل 7488G (ژنوتیپ AG+GG) یا فقدان این آلل (ژنوتیپ AA) بررسی شد. از آن جا که فراوانی آلل موتان G کم می‌باشد به جای بررسی تأثیر آلل G، مدل غالب این آلل یعنی ژنوتیپ‌های حاوی این آلل

(AG+GG) با اندیس‌های مرتبط با سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. به همین دلیل برای ارزیابی نقش پلی مرفیسم A7488G از ژن IL-17F در میزان تمایز تومور، ارتباط حضور یا فقدان این آلل با درجات تمایزی تومور بررسی شد. همان‌طور که جدول شماره ۳ نشان می‌دهد ارتباط معنی داری بین حضور آلل 7488G با مراحل بالینی تومور ($p=0/28$)، درجه بدخیم ($p=0/36$) و عفونت هلیکوباکتریلوری ($p=0/89$) دیده نشد. به طوری که وجود یا عدم حضور آلل موتان G که باعث جایگزینی آرژنین در موقعیت ۱۶۱ سیتوکاین IL-17F می‌شود، موجب افزایش یا کاهش معنی دار شانس ابتلا به سرطان معده نمی‌شود.

جدول شماره ۲: ارتباط فراوانی آللی و توزیع ژنوتیپی حاصل از پلی مرفیسم A7488G (rs763780) از ژن IL-17F با سرطان معده

سطح معنی داری	سطح اطمینان ۹۵ درصد	OR	سرطان معده n(=161)	شاهد (n=164)	پلی مرفیسم A7488G
					ژنوتیپ
			۱۲۹ (۸۰/۱)	۱۳۷ (۸۵/۵)	AA
۰/۸۴	۰/۶-۲/۰۳	۱/۱	۲۵ (۱۵/۵)	۲۴ (۱۴/۶)	GA
۰/۱۸۲	۰/۶۳-۹/۷۹	۲/۵	۷ (۴/۳)	۳ (۱/۸)	GG
			۲۸۳ (۸۷/۹)	۲۹۸ (۹۰/۸۵)	آلل A
۰/۲۲	۰/۸۳-۲/۲۶	۱/۴	۳۹ (۱۲/۱)	۳۰ (۹/۱۵)	آلل G
۰/۴۲	۰/۷۱-۲/۲۲	۱/۵	۳۲ (۱۹/۹)	۲۷ (۱۶/۴۶)	ناقل آلل G (GG+AG vs. AA)

توزیع ژنوتیپی و فراوانی آللی بصورت فراوانی مطلق و نسبی (اعداد داخل پرانتز) نشان داده شده است. اولین آلل یا ژنوتیپ طبیعی بعنوان رفرانس در نظر گرفته شده است.

جدول شماره ۳: ارتباط پیشرفت و درجه بدخیمی تومور معده با ژنوتیپ حاصل از پلی مرفیسم A7488G از ژن IL-17F

سطح معنی داری	95% CI	OR	ژنوتیپ AA (n=32)	ژنوتیپ AG+GG (n=129)	مرحله بندی تومور TNM*
۰/۲۸	۰/۱۹-۱/۵۵	۰/۵۴	۱۹ (۳۲/۸)	۹ (۴۷/۴)	I+II
			۳۹ (۶۷/۲)	۱۰ (۵۲/۶)	III+IV
			۲۰ (۲۳/۵)	۲ (۱۱/۸)	تمایز تومور**
۰/۳۶	۰/۴۲-۱۰/۳۷	۲/۰۸	۴۸ (۵۶/۵)	۱۰ (۵۸/۸)	بخوبی تمایز یافته
۰/۲۲	۰/۵۰-۱۷/۱۴	۲/۹۴	۱۷ (۲۰)	۵ (۲۹/۴)	تمایز متوسط
			۷۸ (۶۰/۵)	۲۰ (۶۲/۵)	تمایز نامناسب
۰/۸۹	۰/۴۱-۲/۰۴	۰/۹۲	۵۱ (۳۹/۵)	۱۲ (۳۷/۵)	عفونت هلیکوباکتریلوری
					دارد
					ندارد

طبقه بندی تومور براساس مینای TNM انجام گردید.

* داده حاصل ۷۷ بیمار مبتلا به سرطان معده می‌باشد

** داده ها حاصل ۱۰۷ بیمار مبتلا به سرطان معده می‌باشد

بحث

روماتوئید در سفید پوستان اروپایی (Nordang GB 2009) گزارش شده است. از آنجا که نقش IL-17 و سلول‌های Th17 در بروز پاسخ‌های التهابی معده مرتبط با عفونت *H. pylori* شده است (Luzza F and 2000, 2000) به طوری که مقدار پروتئین IL-17 در مخاط معده بیماران مبتلا به *H. pylori* از افراد فاقد این باکتری بیشتر بوده و در نواحی زخم معده نیز غلظت IL-17 از نواحی سالم بیشتر می‌باشد (Mizuno T and 2005;11: 2005)، بنابراین IL-17 نقش به سزایی در التهابات معده ناشی از وجود هلیکوباکتر پیلوری و به دنبال آن بیماری‌های معده از جمله کارسینوم معده خواهد داشت. به همین دلیل تصور می‌شود که پلی مرفیسم عملکردی در ژن IL-17 استعداد ابتلا به سرطان معده را افزایش دهد. با توجه به یافته‌های این مطالعه که بیانگر عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین بروز واریانت‌های ژنتیکی IL-17F در موقعیت A7488G و سرطان معده می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است سایر همولوگ‌ها سیتوکاینی IL-17F از جمله IL-17A در این میان نقش داشته باشند.

در خانواده IL-17 پنج سیتوکاین وجود دارد که بیشترین تشابه ساختاری بین IL-17A و IL-17F وجود دارد. این دو سیتوکاین عملکرد مشترکی در القای تولید کموکاین‌هایی دارند که نقش به سزایی در فراخوان و فعال کردن نوتروفیل‌ها ایفا می‌کنند. مطالعاتی بسیار کمی وجود دارد که به بررسی تأثیر پلی مرفیسم IL-17F در بروز اختلالاتی انسانی پرداخته‌اند. کاواگوچی نشان داد که بیان و یا عملکرد IL-17F در افراد حامل آلل موتان 7488G ساپرس می‌شود (Kawaguchi M2004). این محققین همچنین نشان دادند که حضور واریانت موتان A7488G که باعث جایگزینی آرژنین در موقعیت ۱۶۱ به جای هیستیدین می‌شود موجب جلوگیری از تأثیر IL-17F طبیعی در تحریک بیان سیتوکاین‌های التهابی نظیر IL-8 و IL-6 در مطالعات تجربی می‌گردد (Kawaguchi M 2006).

اخیراً اثبات شده است که کاهش بیان IL-17 در تومور می‌تواند نشان دهنده پیش‌آگهی نامناسب سرطان معده باشد (Chen JG 2011). گرچه در مطالعات متعدد عملکرد IL-17A در بروز و پیشرفت تومورهای مختلف گزارش شده است و بر نقش پاتوژنیک آن در سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله سرطان کولون تأکید گردیده ولی نقش IL-17F در تومورزایی به خوبی مشخص نشده است. به طوری که حتی برخی از مطالعات نقش حفاظتی برای IL-17F در سرطان کولون گزارش نموده‌اند که بر خلاف نقش IL-17A می‌باشد (Tong Z 2012). به همین خاطر این مطالعه انجام گردید تا مشخص شود آیا بروز تغییرات ژنی در IL-17F می‌تواند با استعداد ابتلا به سرطان معده در ارتباط باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ هموزیگوت GG در موقعیت ۷۴۸۸ ژن IL-17F به میزان ۳ درصد در افراد شاهد و ۴/۳ درصد بیماران مبتلا به سرطان معده شیوع داشته که عملاً اختلاف معنی‌داری را از نظر آماری به وجود نیاورد. این فراوانی با فراوانی گزارش شده در سفید پوستان اروپایی (۴/۵ درصد) بسیار نزدیک می‌باشد حال آنکه فراوانی ژنوتیپ موتان 7488 G/G در جمعیت ژاپن بیشتر می‌باشد (۱۱/۴ درصد) (Shibata T 2009). همچنین فراوانی آلل موتان G در افراد شاهد ۹/۱۵ درصد و در مبتلایان به سرطان معده ۱۲/۱ درصد به دست آمد که این اختلاف باز هم از نظر آماری معنی‌دار نبود. به عبارت دیگر ارتباط بین ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مرفیسم و سرطان معده به دست نیامد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه Shibata و همکاران در ژاپن همسو می‌باشند که نشان دادند فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مبتلا به سرطان معده و افراد غیر مبتلا ۴ درصد می‌باشد (Shibata T 2009). در حالی که ارتباط پلی مرفیسم 7488G از ژن IL-17F با بیماری کولیت اولسرو در جمعیت ژاپن (Arisawa T 2008) و با آرتریت

در مجموع عدم وجود ارتباط معنی داری بین پلی مرفیسم IL-17F و سرطان معده بیان می نماید که آلل G نمی تواند به تنهایی به عنوان یک فاکتور خطر ژنتیکی در پیش گویی استعداد ابتلا به سرطان معده نقش داشته باشد. بنابراین با توجه به نقش ثابت شده IL-17 در روند کارسینوژنز سرطان معده، بررسی ارتباط سایر مولکول های خانواده IL-17 می تواند در تعیین ژنوتیپ و هاپلو تیپ مستعد کننده مفید باشد تا بتواند در تشخیص سریع و غربالگری افراد مستعد به سرطان معده کمک کند.

سپاسگزاری

محققین لازم می دانند از زحمات و همکاری های پرسنل محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی ساری و همین طور بخش انکولوژی بیمارستان امیرکلاهی بابل و پلی کلینیک طبوبی و همچنین کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که امکان انجام این مطالعه را فراهم آوردند تشکر نمایند.

References

1. Arisawa T, T. T., Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, (2008). "The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis." *J Clin Immunol* 28: 44-49.
2. Benchetrit F, C. A., Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. (2002). "Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism.." *Blood* 99(6): 2114-2121.
3. Chabaud M, F. F., Taupin JL, Miossec, (1998). "Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor

بر اساس طبقه بندی Lauren سرطان معده به دو دسته تقسیم می گردد: نوع روده ای که ساختارهای غده ای شبیه غدد روده در معده ایجاد می شود و ارتباط تنگاتنگی با التهاب مزمن و به ویژه با گاستریت آتروفیک و به دنبال آن متاپلازی روده ای دارد و نوع منتشر که فاقد ساختار غده ای بوده و در مجاورت لبه های مخاط ملتهب معده پدید می آید. بنابراین التهاب شدید مخاط معده به همراه سایر ویژگی های میزبان می تواند مستقیماً باعث به راه انداختن وقایع موتاژن گردد و شرایط را برای رخداد نوع منتشر نیز فراهم سازد. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین حضور آلل موتان G از ژن IL-17F با ویژگی های بالینی سرطان معده از جمله اندازه تومور و متاستاز به مخاط معده و همچنین درجه تمایز تومور مشاهده نشد. این امر شاید به واسطه تأثیر ضد التهابی واریانت ژنی IL-17F-7488G باشد که باعث می شود پروتئین حاصل فاقد خواص پیش التهابی نظیر پروتئین طبیعی IL-17F باشد به طوری که گزارش شده است که این واریانت ژنی دارای اثرات مهار متاستاز و همچنین کاهش تحریک تولید متالوپروتئینازها می باشد (Kolls JK 2004).

- production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines." *J Immunol* 161: 409-414.
4. Chen B, Z. Z., Hou J, Chen M, Gao X, Hu P, (2009). "Association of interleukin-17F 7488 single nucleotide polymorphism and inflammatory bowel disease in the Chinese population." *Scand J Gastroenterol* 44: 720-726.
5. Chen D, H. Q., Mao C, Jiao Z, Wang S, Yu L, Xu Y, Dai D, Yin L, Xu H, (2012). "Increased IL-17-producing CD4(+) T cells in patients with esophageal cancer." *Cell Immunol* 272(2): 166-174.

6. Chen JG, X. J., Liang XT, Pan K, et al. (2011). "Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients." *Int J Biol Sci* 7: 53- 60.
7. Espinoza JL, T. A., Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. (2011). "A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation." *PLoS One*. 6(10): e26229.
8. Horlock C, S. B., Dyson PJ, Morishita M, Coombes RC, Savage P, Stebbing J. (2009). "The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer." *Br J Cancer* 100(7): 1061-1067.
9. Jemal A, M. T., Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. (2005). "Cancer statistics, 2005." *CA Cancer J Clin* 55 (1): 10-30.
10. Kato T, F. H., Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, Kamada M, Aono T. (2001). "Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer." *Biochem Biophys Res Commun*. 282(3): 735-738.
11. Kawaguchi M, A. M., Oda N, Kokubu F, Huang SK, (2004). "IL-17 cytokine family." *J Allergy Clin Immunol* 114: 1265-1274.
12. Kawaguchi M, T. D., Hizawa N, (2006). "IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity." *J Allergy Clin Immunol* 117: 795-801.
13. Kolls JK, L. A. (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." *Immunity* 21: 467-476.
14. Lauren P (1965). "The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification." *Acta Pathol Microbiol Scand*. 64: 31-49.
15. Lichtenstein P, H. N., Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." *N Engl J Med* 343(2): 78-85, PMID: 10891514.
16. Luzzi F, P. T., Monteleone G, et al, and 2000. (2000). "Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa." *J Immunol* 165: 5332-5337.
17. Mizuno T, A. T., Nobata K, et al, and 2005;11: (2005). "Interleukin-17 levels in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization." *World J Gastroenterol* 11: 6305-6311
18. Nordang GB, V. M., Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Forre OT, Helgetveit K, et al (2009). "Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand." *Rheumatol Oxf* 48: 397-370.
19. Nordang GB, V. M., Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre ØT, Helgetveit K, Kvien TK, Lie BA. (2009). "Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand." *Rheumatology (Oxford)* 48(4): 367-370.
20. Prinz C, S. M., Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rösch T, Schepp W, Gerhard M. (2001). "Key importance of

-
- the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation." *Cancer Res* 61(5): 1903-1909, PMID: 11280745.
21. Shibata T, T. T., Hirata I, Arisawa T. (2009). "Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis." *Hum Immunol.* 70 (7): 547-551.
22. Steiner GE, N. M., Paikl D, Stix U, et al. (2003). "Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate " *Prostate* 56: 171-182.
23. Suerbaum S, M. P. (2002). "Helicobacter pylori infection." *N Engl J Med* 347: 1175-1186.
24. Tahara T, S. T., Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. (2009). "Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa." *Int J Mol Med.* 24(4): 563-569.
25. Tahara T, S. T., Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. (2010). "Association between IL-17A, -17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer." *Int J Mol Med.* 25(3): 471-477.
26. Tong Z, Y. X., Yan H, Liu W, Niu X, Shi Y, Fang W, Xiong B, Wan Y, Dong C. (2012). "A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis." *PLoS One.* 7(4): e34959.
27. Wang L, Y. T., Zhang W, Pardoll DM, Yu H, (2010). "IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer." *Cancer Res* 70: 10112-10120.
28. Weaver CT, H. R., Mangan PR, Harrington LE, (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." *Annu Rev Immunol* 25: 821-852.
29. Ye ZJ, Z. Q., Gu YY, Qin SM, Ma WL, Xin JB, Tao XN, Shi HZ, (2010). "Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion." *J Immunol* 185(10): 6348-6354.
30. Zhang B, R. G., Wei H, Zhang M, Bi J, et al, (2008). "The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer." *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 533-537.