BRIEF REPORT

Evaluation of NQO1 Polymorphism in Gastric Adenocarcinoma

Yahya Saleh Tabari[1],
Ommolbanin Bakhshi[2],
Abbas Mohammadpour[3],
Vahid Hoseini[4],
Hamed Haghi Aminjan[5],
, Mohammad Shokrzadeh[6]

[1] PhD Student in Toxicology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

[2] Student in Pharmacy, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

[3] PhD Student in Cell and Molecular Biology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

[4] Associate Professor, Gastrointestinal Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

[5] PhD Student in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[6] Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 25, 2016, Accepted December 11, 2017)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is the second most common cause of cancer worldwide and despite huge advances in treatments, the chance of survival is very low even in surgery cases. Having a genetic predisposition plays an important role in cancer development. Polymorphisms in the NQO1(NAD(P)H Quinone dehydrogenase 1) gene could affect the activity of the gene and also the susceptibility to gastric cancer. The aim of this study was to evaluate the effect of the polymorphism of NQO1 gene on gastric cancer.

Materials and methods: This case-control study was performed in 100 patients with gastric cancer and 100 healthy individuals as benchmarks. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Then, genotyping for detecting NQO1 -609 C>T promoter gene polymorphism was carried out using PCR-RFLP. Data analysis was performed in MedCalc V9.

Results: NQO1 rs1800566 allelic and genotypic frequencies were not significantly different between the patients and controls (P= 0.14 ,χ^2= 2.16)

Conclusion: Screening of -609C>T NQO1 polymorphism was not found as a useful marker in detecting personal sensitivity to gastric cancer, therefore, would not be helpful in gastric cancer prevention and treatment processes.

Keywords: NQO1 promoter, gastric cancer, genetic polymorphism, PCR, RFLP-PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27(157): 230 - 235 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۷ بهمن سال ۱۳۹۶ (۲۳۵ - ۲۳۰)

بررسی پلی مورفیسم ژن NQO1 در آدنوکارسینوم معده دراستان مازندران، شمال ایران

یحیی صالح طبری[۱]
ام البنین بخشی[۲]
عباس محمدپور[۳]
وحید حسینی[۴]
حامد حقی امینجان[۵]
محمد شکرزاده[۶]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده، دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از بدخیمی‌ها در سراسر جهان بوده و علیرغم پیشرفت‌های زیاد در درمان حتی در موارد قابل جراحی، شانس زنده ماندن بسیار پایین می‌باشد. داشتن استعداد ژنتیکی نقش مهمی در پیشرفت سرطان معده دارد. پلی مورفیسم ژن NAD(P)H Quinone dehydrogenase 1 (NQO1)، می‌تواند بر فعالیت این ژن و در نتیجه استعداد ابتلا به سرطان معده تاثیرگذار باشد. هدف این مطالعه، تعیین اثر پلی مورفیسم ژن NQO1 بر روی سرطان معده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد – شاهدی تعداد ۱۰۰فرد مبتلا به سرطان معده و ۱۰۰فرد سالم از نظر پلی مورفیسم در ناحیه C> T 609 پروموتورژن NQO1 مورد ارزیابی قرار گرفت. DNA ژنومی افراد مورد مطالعه از سلول‌های سفید خون محیطی استخراج شده و با استفاده از روش RFLP-PCR به بررسی ژنوتیپی درناحیه C> T 609 پروموتور ژن NQO1 در دو گروه پرداخته شد. آنالیز آماری، با استفاده از نرم افزار Medcalc نسخه ۹، صورت پذیرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان می‌دهدکه غربالگری پلی مورفیسم ژن NQO1 (C> T 609) نمی‌تواند به عنوان یک نشانگر مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و کمک به راهکارهای پیشگیری ودرمانی در افراد مستعد مورد استفاده قرار گیرد.

استنتاج: این مطالعه نشان میدهدکه غربالگری پلی مورفیسم ژن NQO1 (C> T 609) نمی تواند به عنوان یک نشانگرمفیددرتعیین حساسیت فردی به سرطان معده وکمک به راهکارهاپیشگیری ودرمانی درافرادمستعدمورد استفاده قرارگیرد.

واژه های کلیدی: پروموتور NQO1،سرطان معده، چندشکلی ژنی،RFLP-PCR

مقدمه

سرطان معده دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از بدخیمی‌ها در سراسر دنیا بوده و علیرغم پیشرفت‌های زیاد در درمان، حتی در موارد قابل جراحی،بیماران دارای بقای پایین تر از پنج سال می‌باشند(۱). حساسیت ژنتیکی نقش مهمی در پیشرفت سرطان معده دارد. رادیکال‌های آزاد می‌توانند در سرطان‌زایی و تخریب DNAنقش داشته باشند، افزایش در میزان رادیکال‌های آزاد موجود در بدن می‌تواند منجر به ایجاد استرس

مولف مسئول: محمد شکرزاده– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد ، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)،دانشکد داروسازی Email: mslamuki@gmail.com
۱. دانشجوی دکترای تخصصی سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکترای داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکترای تخصصی سلولی ومولکولی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان معده و روده، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشجوی دکترای تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶. دانشیار ، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۷/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۱/۱۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۹/۲۰

Archive of SID
www.SID.ir

اکسیداتیو و افزایش احتمال بدخیمی‌ها شود(۱،۲). NQO1(NAD(P)H Quinone dehydrogenase یک آنزیم اکسیدوردوکتاز است که نقش مهمی در سم زدایی و آسیب وارده توسط رادیکال‌های کوئینون ومشتقات آن را بر عهده دارد(۳). عملکرد این آنزیم شامل احیا کردن کوئینون و ترکیبات نیترو-کوئینون و ازوکینون و ایجاد فرم های غیر اکسیدانت از ویتامین E و یوبی کوئینون می‌باشد(۴). این آنزیم به مقدار زیادی در کلیه، معده، سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفس و در سلول‌های اندوتلیال رگ ها وجود دارد و هم‌چنین در کبد، کولون و سینه نیز به مقدار اندکی یافت می‌شود(۶،۵).

مطالعات زیادی به منظور بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم NQO1 Pro187Ser و خطر ابتلا به سرطان انجام شده است. سن یانگ وهمکاران با جمع آوری مجموع ۱۵ مطالعه، از جمله ۴۲۹۸ بیمار و ۴۲۷۵ کنترل ودر مطالعه وین ژانگ وهمکاران با جمع آوری مجموع ۲۲ مطالعه شامل ۵۲۷۴ بیمار و ۶۴۵۹ کنترل، با وجود برخی محدودیت‌ها، باتجزیه و تحلیل داده ها دریافتند شواهد کافی که پلی مورفیسم NQO1 Pro187Ser ممکن است کمک به بروز سرطان کند. این یافته‌ها ازاقوام مختلف می‌باشد. ژن NQO1 بر روی کروموزوم 16 q22.1قرار دارد و متشکل از شش اگزون و پنج اینترون می‌باشد و به طور گسترده‌ای در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی بررسی شده است(۷،۸).

با توجه به شیوع بالای آدنوکارسینوم‌های معده پیشرفته غیر قابل جراحی و پاسخ پایین بیماران به درمان‌های رایج (جراحی، رادیو تراپی و کموتراپی) در مازندران و هم‌چنین به علت نقشی که پلی مورفیسم NQO1 در ایجاد سرطان می‌تواند داشته باشد، در این مطالعه پلی مورفیسم ناحیه C> Tموقعیت نوکلئوتیدی ۶۰۹ژن NQO1 که باعث انتقال C-به-T در کدون ۱۸۷ ، اگزون شش واسید آمینه پرولین به سرین تعویض می‌شود مورد بررسی قرار خواهد گرفت(۷،۸). شناسایی پلی مورفیسم‌های ژنتیک افراد مبتلا به سرطان معده ، علاوه بر کمک به شناخت مکانیسم بیماری ، در شناسایی و غربالگری افراد مستعد به بیماری و در نتیجه پیشگیری از آن موثر است.

مواد و روش ها

این مطالعه مورد-شاهدی شامل ۱۰۰بیمار مبتلا به سرطان معده مراجعه کننده به کلینیک طوبی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، می‌باشد که هیچ‌گونه سابقه خانوادگی سرطان معده نداشته‌اند و براساس نتایج بررسی‌های آندوسکوپی و پاتولوژی توسط پزشک متخصص شناسایی شده‌اند. هم‌چنین تعداد ۱۰۰ فرد سالم که بر اساس سن، جنس و محل زندگی استان مازندران همسان‌سازی شده بودند به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرارگرفتند. DNA ژنومی توسط کیت استخراج DynaBio شرکت تکاپو زیست، برای نمونه‌ها استفاده شد و ازلوکوسیت‌های خون محیطی استخراج DNA انجام شد. به منظور بررسی کیفیت و میزان DNA استخراج شده، از اسپکتروفتومتر استفاده گردید. بعد از بررسی کیفیت DNA استخراج شده از افراد کنترل و بیمار، جهت آماده سازی نمونه‌های لازم جهت PCR به مقدار ۲ میکرولیتر از نمونه مورد نظر را با ۱۲,۵ میکرولیتر از mastermix و ۰,۸میکرولیتر از پرایمرهای مربوطه را با هم مخلوط شد و در نهایت با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه bio-rad طبق برنامه جدول ۱ انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای حصول اطمینان از تکثیر، محصول بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و

Archive of SID
www.SID.ir

سپس با استفاده از دستگاه ژل داک شناسایی محصول صورت گرفت(۹).

جدول شماره۱: برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن NQO1

Denaturing-1	در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل
	در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
Annealing-2	در دمای ۵۹ درجه ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
Extension-3	در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
	در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه یک سیکل

پس از مشاهده قطعه مورد نظر، برای هضم آنزیمی ۸ میکرولیتر از محصول PCRجایگاه C>Tرا با ۱ میکرولیتر از بافرx10آنزیم و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم محدود الأثر (Thermo fisher) hinf1 که در نهایت با آب مقطر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد.

جدول شماره۲: ویژگی پرایمر

محصول PCR	آنزیم محدودالاثر	توالی پرایمر	محل برش
T: ۸۳+۱۲۶bp C: ۲۰۹bp	Hinf1	Forward:TACTGAGAAGCCCAGACCAAC Reverse:CTCCAGGCGTTTCTTCCATC	C>T rs ۱۸۰۰۵۶۶

پس از اتمام زمان مجاورت با آنزیم محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بر اساس شرایط فوق الکتزوفورز شد.

شکل شماره ۱: ژل آگارز ۱/۵٪ مربوط به RFLP جهت بررسی پلی مورفیسم rs۱۸۰۰۵۶۶ ژن NQO1، M مارکر ۱۰۰ جفت بازی. قطعات بازی ۲۰۹، ۱۲۶ و ۸۳ جفت بازی قابل رویت و با فلش مشخص شده است. شماره های شماره۱:کنترل منفی،شماره۲:محصول PCR و شمار۳: افراد هموزیگوت طبیعی (CC)، شماره ۴: هتروزیگوت موتانت (TC)

یافته ها و بحث

برای این پلی مورفیسم سه حالت ژنوتیپی TT، CT و CC وجود دارد.آنالیزآماری با استفاده از نرم افزار Med calc صورت گرفت و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه بیمار و کنترل نشان نداد (P=۰,۱۴) توزیع فراوانی ژنوتیپی درجدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳: نتایج مربوط به فراوانی ژنوتیپ های مشاهده شده در پلی مورفیسم rs۱۸۰۰۵۶۶ژن NQO1

ژن	ژنوتیپ	nگروه بیمار (٪)	nگروه کنترل (٪)	P
NQO1	CC	۷۰ (۷۰)	۸۰ (۸۰)	۰,۱۴
	CT	۳۰ (۳۰)	۲۰ (۲۰)	
	TT	۰ (۰)	۰ (۰)	

بررسی فراوانی آللی NQO1

بر اساس نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون Chi-Square (P=۰,۲۶) ، (x^2=۱,۲۲) ، چون P-value کمتر از ۰,۰۵ نمی‌باشد، بنابراین تفاوت معنی‌داری در توزیع آللی ،بین دو گروه بیمار و کنترل وجود ندارد.

جدول شماره ٤: بررسی فراوانی آللی NQO1

ژن	ژنوتیپ	گروه بیمار(درصد)	گروه کنترل (درصد)	X^2	P
NQO1	G	۸۵	۹۰	۱,۸۵	۰,۱۷
	A	۱۵	۱۰		

مطالعه جینگ چن و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی اثرات پلی مورفیسم NAD(P)H کوئینون اکسیدوردوکتاز(NQO1 (1800566Serrs187Pro حاکی از افزایش ریسک سرطان کولورکتال می‌باشد(۱۰). زیان و همکاران در سال ۲۰۱۳ و دینگ همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی رابطه بین پلی مورفیسم NQO1 C>T609 و سرطان کلورکتال در جمعیت چین پرداختند ونتایج مطالعات آن‌ها به این صورت بیان شد که پلی مورفیسم NQO1 C>T 609 نقش مهمی در پیشرفت سرطان کلورکتال ایفا می کند اما مطالعه یو و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی رابطه

Archive of SID
www.SID.ir

بـین پلـی مورفیسـم ژن NQO1 C>T 609 C>T و سرطان‌های دستگاه گوارش پرداختند و متا آنـالیز آن‌هـا نشان داد که آلل NQO1 609 T ارتباط چندانی با بـروز سرطان دستگاه گوارش ندارد و این مطالعه با تحقیـق مـا هم‌سویی دارد(۱۲، ۱۱). پیشنهاد می‌شود کـه بـرای اینکـه بتوان با قاطعیـت بـیش‌تـری نسـبت بـه میـزان رابطـه پلـی مورفیسم ژن NQO1 و سرطان معده دست یافت، تعـداد بیش‌تری از SNP های ایـن ژن و دیگـر ژن‌هـای دخیـل بررسـی و در افـراد متفـاوت از لحـاظ نـژاد، منـاطق جغرافیایی و با تعداد بیش‌تر افراد و هم‌چنین روی خزانـه ژنتیکی متفاوت صورت گیرد.

سپاسگزاری

ایـن مطالعـه باحمایـت مـالی معاونـت تحقیقـات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده اسـت کـه محققـان تشـکر وقـدردانی خـود را از آن معاونـت محترم اعلام مـی‌دارنـد. (کـد اخـلاق پزشـکی از کمیتـه اخـــــلاق علـــــوم پزشـــــکی مازنـــــدران: IR.MAZUMS.REC.96.1440).

References

1. Shokrzadeh M, Fattahi I, Mohammadpour A, Mashhadban AH. Presence of CagA Gene and Its Antibiotic Resistance Pattern in Helicobacter Pylori Isolates. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2017 Nov 15;27(154):60-72.
2. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J. 2007;401(1):1-11.
3. Zhang Y, Wang Z, Zhong J. Meta-analysis demonstrates that the NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) gene 609 C> T polymorphism is associated with increased gastric cancer risk in Asians. Genet Mol Res. 2012;11(3):2328-2337.
4. Akkiz H, Bayram S, Bekar A, Akgollu E, Ulger Y, Kaya BY, et al. No association of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish subjects. Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11(4):1051-1058.
5. Huang X, Dong Y, Bey EA, Kilgore JA, Bair JS, Li L-S, et al. An NQO1 substrate with potent antitumor activity that selectively kills by PARP1-induced programmed necrosis. Cancer Res. 2012;72(12):3038-3047.
6. Lee JC, Espéli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, et al. Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. Cell. 2013;155(1):57-69.
7. Yang S, Jin T, Su HX, Zhu JH, Wang DW, Zhu SJ, etal. The association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and bladder cancer susceptibility: a meta-analysis of 15 studies. PloS one. 2015 Jan 20;10(1):e0116500.
8. Zhang Y, Yang D, Zhu JH, Chen MB, Shen WX, He J. The association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and urinary system cancer susceptibility: a meta-analysis

Archive of SID

www.SID.ir

of 22 studies. Cancer investigation. 2015;33(2):39-40.

9. Shokrzadeh M, Rahbari Jeyd P, Mohammadpour A, Zaboli F, Mohammadnejad FZ, Ghaffari Charati M, Saleh Tabari Y. Frequency of exoT and exoS Genes among Pseudomonas Aeruginosa Isolates and Antibiotic Resistance in Burn Patients in Sari Zare Hospital, Iran. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2017 Nov 15;27(154):51-9.
10. Jing C, Yuan L, Ru Z, Zhi-jie Huang, Xing-guo P. Contribution of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase1 (NQO1) Pro187Ser Polymorphism and Risk of Colorectal Adenoma and Colorectal Cancer in Caucasians: A Meta-analysis.; Arch Med Res.2012;43(1): 58-66.
11. Peng X-E, Jiang Y-Y, Shi X-S, Hu Z-J. NQO1 609C> T polymorphism interaction with tobacco smoking and alcohol drinking increases colorectal cancer risk in a Chinese population. Gene. 2013;521(1):105-110.
12. Yu H, Liu H, Wang L-E, Wei Q. A functional NQO1 609C> T polymorphism and risk of gastrointestinal cancers: a meta-analysis. PLoS One. 2012;7(1):e30566.

Archive of SID

www.SID.ir