Archive of SID

مجلهٔ پژوهشی دانشگاه اصفهان(علوم پایه)
جلد ۳۱ ـ شماره ۲ ـ سال ۱۳۸۷
صص۳۴-۲۳

افزایش احتمال متاستاز سرطان کلورکتال در حاملین آلل 5A پروموتور ژن MMP3

مجید متولی باشی[*] زهره حجتی [*] و سمانه حاجی حسینی [**]
[*] گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان
[**] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان

چکیده

سرطان کلورکتال شایعترین بدخیمی درگیر با سیستم گوارش است. این سرطان پس از سرطان‌های ریه و پستان، سومین عامل مرگ و میر جهان غرب را تشکیل می دهد. تومورهای کلورکتال با بیش از ۹۰ درصد بدخیمی بالاترین نرخ در میان سایر تومورها را به خوداختصاص داده است. تغییر در آرایش مولکول‌های شرکت کننده در چسبندگی سلول‌ها و همچنین آنزیم‌های موثر در تجزیه اتصالات بین سلولی نقش مهمی در ایجاد حالت بدخیمی تومورهای کلورکتال دارد. آنزیم‌های پروتئازی ماتریکس متالوپروتئیناز[1] با تجزیه ترکیبات مختلف ماتریکس خارج سلولی[2] زمینه را جهت ایجاد تومور، گسترش سرطان و متاستاز فراهم می کنند. احتمالا تغییر در افزایش بیان آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز۳[3] در نتیجه چند شکلی تک نوکلئوتیدی[4] ناشی از حذف / دخول داکسی آدنوزین در ناحیه ۱۱۷۱- پروموتور ژن مذکور منجر به سرطانی شدن و ایجاد تومورهای بدخیم می‌شود. مطالعات کنترل / بیمار در ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال بستری در بیمارستان‌های امام خمینی تهران و سیدالشهداء اصفهان و ۶۰ کنترل سالم انجام گرفت. پس از تعیین ژنوتیپ پروموتور ژن MMP3 نتایج توسط نرم افزار آماری SPSS 12.0 تحلیل گردید. بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال به دو گروه بیماران متاستازی +M و غیر متاستازی -M تقسیم گردیدند. توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 در دو گروه کنترل و بیمار یکسان مشاهده شد(P= 0.43, OR= 0.78, 95%CI, 0.34-1.64)، در حالی که ژنوتیپ 5A/5A در بیماران متاستازی نسبت به کنترل‌های سالم از فراوانی بالایی برخوردار می باشند(P= 0.74, OR= 2.91, 95%CI, 0.94-8.98). این فراوانی نسبت به بیماران غیرمتاستازی نیز چشمگیر است(P= 0.65, OR= 1.90, 95%CI, 0.69-5.2). با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که

1 - MMP ; Matrix metalloproteinase
2 - ECM ; Extra Cellular Matrix
3 - MMP3
4 - SNP; Single nucleotide polymorphism

www.SID.ir

Archive of SID

چند شکلی 5A/6A پروموتور ژن MMP3 نقشی در ایجاد تومورهای کلورکتال نداشته باشد ولی ژنوتیپ 5A/5A با افزایش بیان MMP3 می‌تواند زمینه را جهت گسترش تومورهای کلورکتال و متاستاز فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: ماتریکس متالوپروتئیناز ۳، ماتریکس خارج سلولی، چند شکلی تک نوکلئوتیدی، سرطان کلورکتال.

Increased Risk of Colorectal Cancer Metastasis in Host of 5A Allele at MMP3 Gene Promoter

M. Motovali-Bashi*, Z. Hojati* and S.Hajihoseiny**
Biology Department, The University of Isfahan
**** M.SC, Genetic division, Biology Department, The University of Isfahan**

Abstract

Colorectal cancer is the most prevalence malignancy that affect on stomachic system. After lung and breast cancer, colorectal cancer is the most common of death in the western world. Colorectal adenocarcinoma accounts for over 90% of the malignant tumors of the large bowel. Modification in cell adherent molecules and enzymes that degrade intra cellular membrane have important role for colorectal tumor creation. Matrix metalloproteinase enzymes degrade different component of extra cellular matrix and cause tumor creation, cancer development and metastasis. MMP3 overexpression due to single nucleotide polymorphism (SNP) 5A/6A at the -1171 position of the MMP3 gene promoter affects on tumor malignancy and cancer development. A case- control study was performed including 120 cancer patients from Emam Khomeini hospital in Tehran and Seid Alshohada hospital in Isfahan. After MMP3 promoter genotyping, the results were analysed by SPSS 12.0 software. The colorectal cancer patients were divided in to two groups: M+ non- metastasis patients and M-, the metastasis- free patients. The MMP3 genotypes were similar between controls and patients (P= 0.43, OR= 0.78, 95%CI, 0.37-1.64), but the 5A/5A genotype was more prevalent in the M+ groups than controls (P= 0.74, OR= 2.91, 95%CI, 0.94-8.98). This frequency was more prevalent than M-(P= 0.65, OR= 1.90, 95%CI, 0.69-5.2). So we supposed the MMP3 5A/6A promoter polymorphism doesn't appear to influence colorectal among colorectal cancer patients but 5A/5A genotype with MMP3 over-expression cause colorectal cancer development and metastasis.

Keywords: Matrix metalloproteinase-3 (MMP3), extra cellular matrix (ECM), single nucleotide polymorphism (SNP), colorectal cancer.

مقدمه

سرطان کلورکتال[1] شایعترین بدخیمی درگیر با سیستم گوارش بوده و پس از سرطان‌های ریه و پستان سومین عامل مرگ و میر در جمعیت‌های اروپایی می‌باشد(۱). سالانه ۳۰۰۰۰۰ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال در اروپا و آمریکا شناسایی می‌شود و از این تعداد سالانه ۱۷۰۰۰ نفر در نتیجه متاستاز به کبد، ریه و لنف و همچنین عود مجدد بیماری از بین می‌روند(۲، ۳ و ۴). متاسفانه نرخ ابتلای به سرطان کلورکتال در کشورهای مختلف از جمله ایران در حال افزایش است و با وجود پیشرفت در روش‌های درمانی و تشخیصی، میزان مرگ و میر در خلال ۴۰ سال اخیر افزایش یافته است(۱).

1 - Colorectal cancer

www.SID.ir

Archive of SID

۶۰ % از تومورهای کلورکتال به خصوص در مراحل اولیه شکل گیری، ناحیه رکتوم[1] و سیگموئید[2] را درگیر می‌کنند و سایر تومورهای کلورکتال مربوط به ناحیه سکیوم[3] می باشند(۱).

سرطان کلورکتال بر اساس پیشرفت سرطان به مراحل[4] مختلفی تقسیم می شوند که بر اساس سیستم تقسیم بندی Dukes عبارتند از: A، B، C و D. همچنین بر اساس میزان تمایز، تومورها به درجه[5] خوب، متوسط و ضعیف تقسیم می شوند(۳ و۵). متاسفانه ۴۰ درصد بیماران پس از تشخیص و شروع درمان و حتی جراحی، با عود مجدد بیماری و متاستاز به نواحی دیگر بدن بخصوص کبد روبرو شده و می‌میرند(۴).

تغییر در چسبندگی سلولی و آنزیم های دخیل در تجزیه اتصالات بین سلولی نقش مهمی در ایجاد حالت بدخیمی تومورهای سرطانی دارد. خانواده بزرگ آنزیم های پروتئازی ماتریکس متالوپروتئیناز(MMP) با تجزیه ترکیبات مختلف ماتریکس خارج سلولی(ECM) زمینه را جهت ایجاد تومور، گسترش سرطان و متاستاز فراهم می کند(۶، ۷، ۸ و ۹). ماتریکس متالوپروتئیناز ۳(MMP3) یکی از اعضای مهم خانواده MMPs می باشدکه باعث تجزیه کلاژن های مختلف غشای پایه، فیبرونکتین، الاستین و سایر ترکیبات موجود در ECM می‌گردد. علاوه بر این MMP3 قادر به فعال‌سازی سایر آنزیم‌های خانواده ماتریکس متالوپروتئیناز نظیر MMP1 و MMP9 می باشد(۱۰، ۱۱،۱۲ و۱۳).

ژن MMP3 بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۱ در جایگاه q22.q23 و در مجاورت ژن MMP1 قرار گرفته است. کنترل بیان ژن MMP3 در منطقه تنظیمی ژن توسط توالی های تنظیمی Ap1، ETS و همچنین توالی های سرکوب کننده تنظیم می گردد(۱۴ و ۱۵). بیان MMP3 در نتیجه حذف نوکلئوتید داکسی آدنوزین در ناحیه ۱۱۷۱- پروموتور به دلیل از بین رفتن توالی سرکوب کننده در منطقه تنظیمی ژن افزایش یافته و علاوه بر این منجر به فعال شدن سایر آنزیم های ماتریکس متالوپروتئیناز می شود(۱۶، ۱۷، ۱۸ و۱۹).

افزایش بیان آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز منجر به تجزیه ماتریکس خارج سلولی و در نهایت باعث القاء آنژئوژنز می گردند و از طرفی با تجزیه اتصالات بین سلول های اندوتلیال امکان ایجاد حالت تهاجمی[6] و متاستاز را فراهم می کنند(۲۰، ۲۱ و ۲۲).

مطالعات کنترل/ بیمار[7] گویای فراوانی بالای آلل MMP3 حاوی حذف نوکلئوتید داکسی آدنوزین(MMP-3-1171 del A) در گروه بیماران متاستازی نسبت به غیر متاستازی است(۲۳ و ۲۴)، بنابراین گمان می‌رود که بین ریسک سرطان کلورکتال وچند شکلی پروموتور ژن MMP3 پیوستگی وجود داشته باشد(۲۵، ۲۶ و ۲۷). مطالعه حاضر به بررسی تاثیر چند شکلی تک نوکلئوتیدی(SNP) پروموتور ژن MMP3 بر سرطان

1 - Rectome
2 - Sygmoide
3 - Caecum
4 - Stages
5 - Grade

6 - Invasive
7 - case/ control

www.SID.ir

Archive of SID

کلورکتال می‌پردازد. بهبود یافتن روش‌های درمانی بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال مستلزم آگاهی از سازوکار بیماری و عوامل موثر در شروع و گسترش سرطان مذکور می‌باشد. در مطالعه حاضر ارتباط بسیار بالایی بین آلل 5A و گسترش تومور و فعالیت متاستازی در سرطان کلورکتال مشاهده گردید(۱، ۲۸ و ۲۹).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از بیماران بستری شده یا تحت درمان در بیمارستان های سیدالشهداء اصفهان و امام خمینی تهران انجام گرفت. بدلیل موقعیت شهرهای مذکور و مراجعه بیماران از شهرهای مختلف اطراف می‌توان نتایج گرفته شده از مطالعه حاضر را بعنوان نمونه‌ای از جمعیت ایران دانست ولی نتیجه‌گیری نهایی احتیاج به بررسی در سطح گسترده‌تر دارد. نمونه‌گیری از بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال در فاصله تیرماه سال ۱۳۸۴ تا تیر ماه سال ۱۳۸۵ بر روی ۱۲۰ بیمار انجام گرفت.

بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال به دو گروه بیماران متاستازی +M و غیر متاستازی -M تقسیم شدند. جهت اطمینان و مقایسه نتایج، مطالعات بر روی یک گروه ۶۰ نفره سالم به عنوان کنترل نیز انجام گرفت. از ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال ۷۵ نفر مرد و ۴۵ نفر زن بودند(۶۰ نفر با فعالیت متاستازی و ۶۰ نفر بدون فعالیت متاستازی). متوسط سن بیماران در حدود ۵۵ سال(۴۰ تا ۷۰ سال) بوده و گزینش کنترل ها نیز بر اساس همین میانگین سنی انجام گرفت. میانگین طول درمان بیماران اعم از متاستازی و غیر متاستازی ۱۸ ماه بود. بیماران در طول این مدت هر ۶-۳ ماه مورد معاینه و بررسی پزشکی قرارگرفتند. مقایسه نتایج در زمان شروع و انتهای درمان تفاوت چشمگیری از لحاظ آماری نداشت.

از افراد مراجعه کننده سابقه خانوادگی از نظر وجود فرد مبتلا به سرطان، نوع سرطان و نسبت فرد بیمار با افراد مبتلا، زمان تشخیص بیماری و نوع درمان‌های انجام شده جمع‌آوری گردید.

استخراج DNA ژنومی

حدود ۴ میلی لیتر خون وریدی در لوله های حاوی اتیلن دی آمینو تترااستیک اسید(EDTA) ریخته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت مطالعات کوتاه مدت و ۲۰- درجه سانتیگراد جهت مطالعات طولانی مدت نگهداری گردید. EDTA از رسوب سلول های خونی جلوگیری می کند، همچنین به دلیل حذف در مراحل اولیه استخراج DNA ژنومی ممانعتی برای مراحل بعدی آزمایش ایجاد نمی کند. سپس DNA ژنومی با روش رسوب نمکی میلر[1] استخراج گردید(۳۰). جهت کاهش مدت زمان استخراج و افزایش کیفیت و کمیت DNA استخراجی در روش مذکور تغییراتی انجام گرفت و جهت خلوص بیشتر DNA علاوه بر نمک از کلروفورم استفاده گردید(۳۱).

تعیین ژنوتیپ چند شکلی پروموتور ژن MMP3

با توجه به موقعیت SNP مذکور در ناحیه ۱۱۷۱- پروموتور ژن MMP3، توالی پروموتور از بانک های ژنی

1 - Miller

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج و ناحیه چند شکل مشخص گردید. در محدوده SNP مذکور توالی ۶ نوکلئوتیدی داکسی آدنوزین وجود دارد(فرم آللی 6A)، در نتیجه حذف نوکلئوتید داکسی آدنوزین فرم آللی 5A ایجاد می شود.

طراحی پرایمرهای PCR به گونه ای انجام گرفت که امکان تکثیر فرم های مختلف آللی ژن MMP3 با استفاده از پرایمرهای یکسان وجود داشته باشد در انتهای '3 پرایمر Forward جایگزینی A به G اعمال گردید(۳۲). توالی پرایمرهای طراحی شده به قرار زیر می‌باشد (جایگزینی A به G به صورت g در پرایمر R نشان داده شده است):

توالی پرایمر رو به جلو(F):

5'-CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT-3'

توالی پرایمر برگشتی(R):

5'-GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGGAAAgA-3'

این تغییر در فرم آللی 5A سایت برش آنزیم محدود کننده Tth111I(GACN) را ایجاد می کند. آنزیم مذکور با تاثیر متفاوت بر فرم های آللی مختلف پروموتور ژن MMP3 امکان شناسایی آلل های 5A و 6A را فراهم می کند.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۵۰ پیکو مول از هر جفت پرایمر و ۲۰۰ میکرو مولار dNTP، ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمر از Taq(Taq DNA polymerase, Cinagen) در ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR و با شرایط ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای اتصال ۶۵ درجه سانتیگراد برای پرایمرها به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی انجام گرفت.

هضم آنزیمی توسط ۵ میکرولیتر محصول PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر حاوی ۵ واحد آنزیم Tth111I و بافر B انجام گرفت. محصول واکنش روی ژل ۳ درصد آگارز حاوی اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی برده، نتایج به صورت نوارهای ۹۷ و ۳۲ جفت بازی برای آلل 5A و ۱۲۹ جفت بازی برای آلل 6A مشاهده گردید. باند ۳۲ جفت بازی توسط ژل آگارز الکتروفورز قابل شناسایی نمی باشد که به دلیل عملکرد اختصاصی آنزیم و محدود بودن طول محصول PCR جهت شناسایی ژنوتیپ ضروری نمی باشد.

مطالعات آماری

مطالعات آماری روی ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال(۶۰ بیمار متاستازی و ۶۰ بیمار غیر متاستازی) و ۶۰ کنترل سالم که مراحل آزمایشگاهی را طی کرده بودند انجام گرفت.

تست های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 12.0 و از Odd ratio(OR) جهت بررسی تاثیر ژنوتیپ های پروموتور ژن MMP3 در بیماران با توجه به جنس و سن بیماران بهره گرفته شد. انحراف از تعادل هاردی – واینبرگ با استفاده از تست $\chi 2$ با درجه آزادی ۱(df=1) تایید گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

از ۱۲۵ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال که در بیمارستان‌های امام خمینی تهران و سیدالشهداء اصفهان جهت نمونه‌گیری خون مراجعه کرده بودند به همراه۶۰ کنترل سالم مجموعا ۱۸۰ نفر(۱۲۰+۶۰) با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر TthIII1 و الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین ژنوتیپ گردیدند. محصول PCR ژن MMP3 با توجه به نوع پرایمرهای طراحی شده ۱۲۹ جفت باز می باشد. آلل 6A بدلیل عدم وجود ناحیه برش آنزیمی به صورت نوار ۱۲۹ جفت بازی و آلل 5A با نوارهای ۹۷ و ۳۲ جفت بازی قابل شناسایی می باشند(شکل۱).

از ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال ۳۴ نفر هموزیگوت آلل 5A، ۲۸ نفر هموزیگوت آلل 6A و ۵۸ نفر نیز هتروزیگوت 5A/6A بودند. فراوانی آلل 5A(MMP3-1171 del. A) و آلل 6A(MMP3-1171 ins. A) به ترتیب ۵۲ /۰ و ۰/۴۸ بدست آمد(جدول ۱).

جدول ۱: توزیع ژنوتیپ‌های مختلف پروموتور ژن MMP3 در دو گروه کنترل و بیمار

MMP3	بیمار		کنترل	
	N=120	%	N=60	%
5A/5A	۳۴	۲۸/۳	۸	۱۳/۳
5A/6A	۵۸	۴۸/۳	۳۸	۶۳/۳
6A/6A	۲۸	۲۳/۳	۱۴	۲۳/۳
5A frequency		۵۲/۴۵		۴۴/۹۵
6A frequency		۴۷/۵۵		۵۵/۰۵

OR= 1.35, 95%CI, 0.72-2.5, P= 0.57

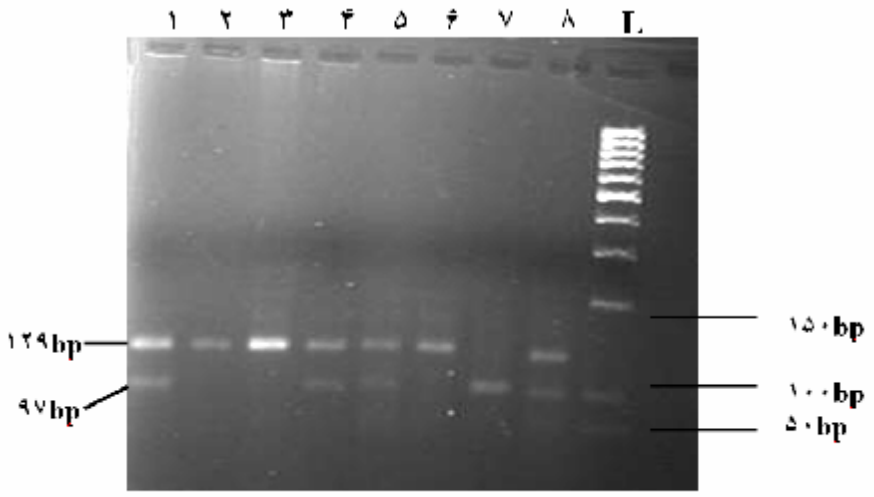
توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال از تعادل هاردی واینبرگ تبعیت می کند(P= ۰/۱۱ و ۴/۴ = $\chi 2$). هیچ پیوستگی آماری بین سن و جنس بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال وچند شکلی پروموتور ژن MMP3 مشاهده نشد.

توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال نسبت به کنترل های سالم از تفاوت معنی داری برخوردار نیست، این امر گویای عدم پیوستگی و ارتباط ژنوتیپ های ژن MMP3 با شروع و شکل گیری سرطان کلورکتال می باشد(OR= 1.35, 95%CI, 0.72 – 2.5).

بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال به دو گروه بیماران متاستازی +M و غیر متاستازی -M تقسیم شدند. توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 بیماران متاستازی در مقایسه با بیماران غیر متاستازی از لحاظ آماری معنی دار است(P = ۰/ ۹۳ ؛ $\chi 2$=۱/۰ ,OR= 1.9, 95%CI, 0.69 – 5.2، جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ : نتایج حاصل از RFLP در دو گروه کنترل و بیمار.
ردیف‌های ۱ و ٤ ژنوتیپ 5A/6A در نمونه فرد سالم، ردیف‌های ۲ و۳ ژنوتیپ 6A/6A در نمونه افراد سالم، ردیف ۵ ژنوتیپ 5A/6A در نمونه فرد بیمار غیر متاستازی، ردیف ٦ ژنوتیپ 6A/6A در نمونه فرد بیمار غیر متاستازی، ردیف ۷ ژنوتیپ 5A/5A در نمونه فرد بیمار متاستازی، ردیف ۸ ژنوتیپ 5A/6A در نمونه فرد بیمار متاستازی.
L مارکر استفاده شده از نوع Gene Ruler TM 50bp DNA Ladder (# SM 0373)

با توجه به چند شکلی پروموتور ژن MMP3، پیوستگی بسیار بالایی بین آلل 5A و بیماران متاستازی در مقایسه با کنترل های سالم مشاهده شد(P = ۰/۰۱ ؛ OR= 2.91, 95% CI, 0.94 – 8.98). ژنوتیپ 5A/5A در بیماران M+ در مقایسه با کنترل های سالم و بیماران M- از فراوانی بالایی برخوردار می باشد(P= ۰/۰۱۱).

جدول ۲ : توزیع ژنوتیپ و آللوتایپ در سه گروه کنترل ، بیماران متاستازی و غیر متاستازی.

	کنترل	M-	M+
5A/6A +5A/5A	46	46	48
5A/5A	8	14	20
6A/6A	14	16	12
5A frequency	0.45	0.48	0.56
6 A frequency	0.55	0.52	0.54

Control/patients 5A/5A:6A/6A OR=2.12, 95%CI, 0.77 – 5.79, P= 0.67
Control/patients 5A/5A+5A/6A:6A/6A OR=0.78, 95%CI, 0.37 – 1.64, P= 0.43
M+/Control OR=2.91, 95%CI, 0.94 – 8.98, P= 0.74
M+/M- OR=1.90, 95%CI, 0.69 – 5.2, P= 0.65

www.SID.ir

Archive of SID

بنابراین به نظر می‌رسد که ژنوتیپ 5A/5A می تواند بعنوان یک فاکتور در تشخیص افراد مستعد به حالت متاستازی در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال موثر باشد. توزیع و فراوانی ژنوتیپ 6A/6A و همچنین آلل 6A در سه گروه کنترل، بیماران غیر متاستازی و متاستازی از لحاظ آماری تقریباً یکسان بود.

بحث

مطالعات گویای تاثیر پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی 5A/6A پروموتور ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ بر میزان بیان آنزیم می باشد. در این راستا مشخص شده است که بیان آلل 5A بیش از دو برابر آلل 6A می باشد(۳۳، ۱۶،۳۴ و ۲۳). افزایش بیان MMP3 در فرم آللی 5A می تواند منجر به سهولت در آزاد سازی سلول توموری و نفوذ آن درون عروق و بنابراین گسترش تومور و متاستاز گردد(۳۵، ۲و۲۴). سرطان کلورکتال از جمله شایعترین بدخیمی‌های سیستم گوارشی است و متاسفانه نرخ ابتلای به این سرطان در حال افزایش است(۱). دوسوم بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال با عود مجدد بیماری روبرو شده و در نهایت در نتیجه متاستاز می‌میرند(۱و ۲).

از اینرو در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر چند شکلی پروموتور ژن MMP3 بر رشد و گسترش سرطان کلورکتال در ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال پرداخته شده است.

توزیع ژنوتیپی MMP3 در جمعیت کنترل و بیمار از تعادل هاردی واینبرگ تبعیت می کند، با این حال توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 در دو گروه کنترل و بیمار نشان دهنده پیوستگی ضعیف چند شکلی ژنوتیپ 5A/5A ژن MMP3 با سرطان کلورکتال است(OR=1.35, 95% CI, , 0.72 – 2.5). مطالعات انجام شده توسط Zinzindohoue در سال ۲۰۰۵ گویای عدم پیوستگی ژنوتیپ های مختلف ایجاد شده توسط چند شکلی تک نوکلئوتیدی 5A/56A پروموتور ژن MMP3 با سرطان کلورکتال در جمعیت اروپا است(۲).

Gillardi در مطالعه ای مشابه در سال ۲۰۰۱ در جمعیت اروپا، فراوانی بالای ژنوتیپ 5A/5A در گروه بیماران متاستازی را نشانه تاثیر این ژنوتیپ بر رشد و گسترش تومورهای کلورکتال می‌داند(۱۸). این تفاوت نتایج میتواند بدلیل تفاوت زمینه ژنتیکی جمعیت های مورد مطالعه باشد. پدیده گسترش سلول توموری به سایر بافت‌ها وفعالیت متاستازی یک پروسه بسیار پیچیده می‌باشد و بنابراین عوامل مختلف ژنتیکی و غیر ژنتیکی در آن در گیر می باشد. نتایج مطالعه حاضر از بررسی تاثیر ژنوتیپ 5A/5A در بیماران متاستازی نسبت به کنترل های سالم و بیماران غیر متاستازی نتایج مطالعات Gillardi را تایید می‌کند(جدول ۲).

یکی از فاکتورهای مهم در درمان بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال تشخیص زودهنگام آن است، بنابراین شناخت فاکتور تشخیصی مناسب اهمیت بالایی دارد(۱). افزایش بیان MMP3 در نتیجه تاثیر ژنوتیپ چند شکلی 5A/5A در ناحیه ۱۱۷۱- پروموتور منجر به افزایش فعالیت آنزیم به همراه فعال نمودن سنتز سایر آنزیم‌های

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئازی(MMP1, MMP9، ژلاتیناز و کلاژناز ؛ ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳) و همچنین آزادسازی ملکول‌های سطحی سلول مثل کدهرین(۳۶) در سلول های توموری و سلول‌های ملتهب مجاور تومور زمینه را جهت رگ‌زایی و متاستاز سرطان فراهم می‌نماید(۵ و ۲۸). از اینرو در برخی از مطالعات از آن بعنوان یک فاکتور موثر جهت شناسایی ریسک سرطان و گسترش متاستازی سلول های سرطانی نام برده شده است(۱۸، ۳۵، ۳۷ و ۳۸).

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر به نظرمیرسد که چند شکلی مذکور در جمعیت‌های ایرانی فاکتور مناسبی در راستای تشخیص زودرس سرطان کلورکتال نمی باشد. با این وجود به دلیل بالا بودن نرخ متاستاز و بدخیمی سرطان کلورکتال، مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال تعیین ژنوتیپ شده و حاملین آلل 5A بخصوص ژنوتیپ هموزیگوت 5A/5A تحت مراقبت‌های پیشگیرانه قرار گیرند.

این امر گامی موثر در راستای کاهش تلفات ناشی از متاستاز سرطان کلورکتال خواهد بود. بنابراین امید است به دنبال این مطالعه با شناسایی و تعیین ژنوتیپ مارکرهای موثر در شروع و گسترش سرطان بتوان راهی موثر جهت تشخیص زودرس بیماری ارایه نمود تا در اعمال روش‌های درمانی کارا و به موقع پزشکان را یاری نمود.

تقدیر و تشکر

کلیه مراحل این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک دانشگاه اصفهان انجام گرفته است. لذا از دانشگاه اصفهان و همچنین از بیمارستان‌های امام خمینی تهران و سیدالشهداء اصفهان به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه خون بیماران و اطلاعات پزشکی سپاسگزاریم.

منابع

1- R.S., Houlston, What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. Clinical pathology: molecular pathology. 54, 206-214; (2001).

2- F., Zinzindohoue, T., Lecomte, J.M., Ferraz, A.M., Houllier, P.H., Cugence, A., Berger, H., Blons, and P., Laurent- puig, Prognostic significant of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. Clinical Cancer Research. 11, 594-599; (2005).

3- M., Woo, K., Park, J., Nam, and J., Kim, Clinical implications of matrix metalloproteinase -1, -3, -7, -9, -12 and plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphism in colorectal cancer. Journal of Gastroenterogy and Hepatology. 10, 1440-1746; (2006).

4- B., Cady, RL., Jenkins, G.D., Steele, W.D., Lewis, M.D., Stone, W.V., McDermott, J.M., Jessup, A.L., Bothe, E.J., Lovett, P., Lavin, and D.C., Linehan, Surgical Margin in Hepatic Resection for Colorectal Metastasis: A Critical and Improvable Determinant of Outcome. Annals of Surgery. 227(4),:566-571; (1998).

5- Y., Hinoda, N., Okayama, and N., Takano, Association of functional polymorphism of matrix metalloproteinase(MMP)-1 and MMP-3 gene with

www.SID.ir

Archive of SID

13- B., Smolars, K., Szyllo, E., Kozlowska, and A., Kulig, PCR analysis of MMP3 gene promoter polymorphism in ovarian cancer. Journal of Pathology. 54, 233-238; (2003).

14- K.M., Baker, G., Wei, A.E., Schaffner, and M.C., Ostrowski, Ets-2 and Components of Mammalian SWI/SNF Form a Repressor Complex That Negatively Regulates the BRCA1 Promoter. J. Biol. Chem., 278(20), 17876-17884; (2003).

15- M., Laurent, C., Martinerie, H., Thibout, M.P., Hoffman, F., Verrecchia, Y., Le Bouc, A., Mauviel, and H.K., Kleinman, NOVH increases MMP3 expression and cell migration in glioblastoma cells via a PDGFR-α-dependent mechanism. The FASEB Journal. 10.1096-1119; (2003).

16- S., Ye, P., Erikssons, A., Hamstens, M., Kurkinen, S.E., Humphries, and A.D., Henney, Progression of coronary atherosclerosis is associated with a which results in reduced gene expression. Journal of Biological Chemistry. 271(22), 13055-13060; (1996).

17- S., Arumugam, G., Gao, B.L., Ptton, V., Semenchenko, K., Brew, and S.R., Vandorcen, Increased backbone mobility of N-TIMP-1 to MMP3. Molecular Biology. 327, 719-734; (2003).

18- G., Ghilardi, M.L., Bionidi, M., Caputo, S., Leviti, M., DeMonti, E., Guagenellini, and R., Scotza, Asingle nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances colorectal cancer. International Journal of Cancer. 102, 526-529; (2002).

6- F., Lonueville, S., Boffe, M., Brasseur, B., Vanbellinhen, M., Lacroix, M., Scheidel, and N., Pavlovic, For gene expression profiling of human tumors. Human Cancer. 108, 1-10; (2004).

7- G.I., Murray, M.E., Duncan, E., Arbuchle, W.T. Melvin, and J.E., Fothergill, Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. Gutton, 43, 791-797; (1998).

8- H., Nagase, and J.F., Woessener, Matrix metalloproteinases. Journal Biology and Chemistry. 274, 21492-21494; (1999).

9- I., Stamekovic, Extra cellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. Journal of Pathology. 200, 448-464; (2003).

10- M.D., Sternlicht, and Z., Werb, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Ann. Rev. Cell Development of Biology. 17, 463–516; (2001).

11- M.D., Sternlicht, A., Lochter, C.J., Sympson, B., Huey, J.P., Rougier, J.W., Gray, D., Pinkel, M.J., Bissell, and Z., Werb, The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. Cell, 98, 137–146; (1999).

12- E., Cox, M., Piva, and K.L., Sharpe-Timms, Differential regulation of MMP3 gene expression in endometriotic lesions compered with endometrium. Biology Report. 65, 1297-1303; (2001).

www.SID.ir

Archive of SID

breast cancer susceptibility. Clinical Cancer Research. 8, 3820-3823; (2002).

19- A.M., Pendas, I., Santamaria, M.V., Alvarez, M., Pritchara, and C., Lopez- Otin, Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase gene clustered on chromosome 11q22.3. Genomics. 37, 266-269; (1996).

20- R.A., Gatti, O., Sanal, S., Wei, P., Charmely, P., Concannon, T., Foroud, J., Renold, and K., Lange, Fine mapping the ataxia- telangieactasia locus within the chromosome 11q22-23 region. American Jornal of human genetic. 45, 140; (1989).

21- S., Humphries, C., Bauters, L., Luong, and P., Amouyel, The 5A/6A polymorphism in the promoter of stromelysin-1(MMP-3) gene as a risk factor for restenosis. European Heart Journal. 23, 721-725; (2002).

22- P., Kripple, U., Langsenlehner, W., Renner, B., Yazdani- Biuki, H., Koppel, A.C., Leithner, T., Wascher, B., Paulweber, and H., Samonigg, The 5A/6A polymorphism of matrix metalloproteinase-3 gene promoter and breast cancer. Clinical Cancer Research. 10, 3518-3520; (2004).

23- J., Zhang, X., Jin, S.H., Li, Y., Fang, R., Wang, W., Guo, N., Wang, Y., Wang, D., Wen, L., Wei, G., Kuang, and Z., Dong, The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric adeno carcinoma. Carcinogenesis. 25, 2519-2524; (2004).

24- K., Shan, W., Ying, Z., Jian-Hui, G., Wei, W., Na, and L., Yan, The function of the SNP in the MMP1 and MMP3 promoter in susceptibility to endometrosis in China. Molecular human Reproduction. 11, 423-427; (2005).

25- J., Cardoso, J., Boer, H., Morreau, and R., Fodde, Expression and genomic profiling of colorectal cancer. Biochimica et Biophysica Acta(BBA) , Reviews on Cancer. 1775(1), 103-137; (2007).

26- L., Astrid, M., Jacqueline, C., Jérôme, L.C., Delphine, M., Chantal, P., Alexandre, N., Bernard, L., Jacques, F., Jean, B.K., Claire, O., Sylviane, B.P., Catherine, and L.P., Pierre, Genetic polymorphisms of MMP1, MMP3 and MMP7 gene promoter and risk of colorectal adenoma. BMC cancer. 6(1),270; (2006).

27- J., Rhys, MMP1 and MMP3 polymorphisms in promoter regions and cancer. Clinical Chemistry. 46, 2023-2024; (2000).

28- H., Hirata, N., Okayama, K., Natio, and Y., Hinoda, Association of haplotype of matrix metalloproteinase (MMP-1) and MMP-3 polymorphisms with colorectal cell carcinoma. Carcinogenesis. 25, 2379-2384; (2004).

29- M., Johnsen, L.R., Lund, J., Romer, and K., Dano, Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degredation. Current Opinion Cell Biology. 10, 667-671; (1998).

www.SID.ir

Archive of SID

30- S.A., Miller, D.D., Dykes, and H.F., Polesky, A simple salting out produce for extracting DNA from hman nucleated cells. Nucleic Acids Research. 16, 1215; (1988).

31- L., Davis, M., Kuehl, J., Battey, Preparation of genomic DNA. Basic Methods in Molecular Biology. 2, 305-314; (1994).

32- S., Fang, X., Jin, R., Li, Y., Wang, W., Guo, N., Wang, Y., Wang, D., Wen, L., Wei, and J., Zhang, Polymorphism in the MMP-1 and MMP-3 promoter and non- small cell lung carcinoma in the north of China. Carcinogenesis, 26, 481-486; (2005).

33- J., Deguara, K.G., Burnand, J., Berg, P., Green, Cathryn, M., Lewis, G., Chinien, M., Waltham, P., Taylo, R.F., Stern, E., Solomon, and A., Smith, An increased frequency of the 5A allele in the promoter region of the MMP3 gene is associated with abdominal aortic aneurysms. Hum Mol Genet. 16(24): 3002 – 3007; (2007).

34- S., Hughes, O., Agbaje, R.L, Bowen, D.L., Holliday, J.A., Shaw, A., Duffy, and J.L., Jones, Matrix Metalloproteinase Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes Predict Breast Cancer Progression. Clinical Cancer Research. 13, 6673-6680; (2007).

35- D., Stanciute, A., Girulyte, A., Ulys, F., Jankevicius, K., Suziedelis, and G., Chvatovic, Matrix metalloproteinase 3 and matrix metalloproteinase 9 expression and polymorphisms analysis in bladder cancer. ACTA MEDICA LITUANICA. 14(3), 174-177; (2007).

36- M.L., Biondi, O., Turri, S., Leviti, R., Seminati, F., Cecchini, M., Bernini, G., Ghilardi, and E., Guagnellini, MMP1 and MMP3 polymorphisms in promoter regions and cancer. Clinical Chemistry. 46(12), 2023-2024; (2000).

37- M., Shinozaki, E., Inoue, A., Nakajima, M., Hara, T., Tomatsu, N., Kamatani, and H., Yamanaka, Elevation of serum matrix metalloproteinase-3 as a predictive marker for the long-term disability of rheumatoid arthrits patients in a prospecive observational cohort IORRA. Japan College of Rheumatology. Online; (2007).

38- T., Hagemann, T., Bozanovic, S., Hooper, A., Ljubic, V.I.F., Slettenaar, J.L., Wilson, N., Singh, S.A., Gayther, J.H., Shepherd, and P.O.V., Van Trappen, Molecular profiling of cervical cancer progression. 96, 321-328; (2007).

www.SID.ir