

ارتباط پلی مورفیسم ژن $405C/G$ VEGF با سرطان پستان در شمال ایرانهانیه کریمی روزبهانی^۱، دکتر فرهاد مشایخی*^۲، دکتر حمید سعیدی ساعدی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. ۲- استاد، دکتری بیولوژی سلولی و تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. ۳- دانشیار، متخصص رادیوتراپی و آنکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان سراسر جهان است. عامل رشد اندوتلیال رگی (*vascular endothelial growth factor: VEGF*) یکی از مهم ترین عوامل پروآنژیوژنیک است. این مطالعه به منظور تعیین ارتباط پلی مورفیسم $405C/G$ ژن عامل رشد اندوتلیال رگی و خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیتی از زنان استان گیلان انجام شد. **روش بررسی:** این مطالعه مورد - شاهدی روی ۵۰ نمونه از زنان با ابتلا به سرطان پستان و ۵۰ نمونه از زنان بدون ابتلا به سرطان پستان انجام شد. DNA ژنومی از سلول های خونی محیطی استخراج گردید. برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم $405C/G$ ژن VEGF از روش PCR-RFLP استفاده شد.

یافته ها: فراوانی ژنوتیپ CG ، GG و CC پلی مورفیسم $405C/G$ ژن VEGF در نمونه های گروه مورد به ترتیب ۲۲ درصد، ۶۶ درصد و ۳۲ درصد و در نمونه های گروه شاهد به ترتیب ۴۲ درصد، ۴۸ درصد و ۱۰ درصد تعیین شد ($P < 0.05$). الل $405C$ به عنوان یک عامل افزایش خطر در سرطان پستان ارزیابی گردید ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد پلی مورفیسم $405C/G$ ژن VEGF در بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد مطالعه نقش دارد.

کلید واژه ها: سرطان پستان، پلی مورفیسم $405C/G$ ، ژن VEGF

* نویسنده مسؤول: دکتر فرهاد مشایخی، پست الکترونیکی mashayekhi@guilan.ac.ir

نشانی: رشت، خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه بیولوژی، تلفن: ۰۱۳-۳۳۳۴۳۶۳۰-۳۳۳۶۷۰۶۶، نامبر ۱۳۹۴/۷/۵
وصول مقاله: ۱۳۹۴/۵/۱۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۴/۵/۲۸، پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۵

مقدمه

سلول ها به سرطان، میزان بیان این عوامل افزایش می یابد. از میان تمامی عوامل آنژیوژنیک، عامل رشد اندوتلیال رگی (*vascular endothelial growth factor: VEGF*) مهم ترین عامل آنژیوژنز محسوب می شود که اولین بار در سال ۱۹۸۹ توسط Ferrara و Hensel از غده هیپوفیز گاوی استخراج و خالص سازی شد (۵). ژن VEGF در ناحیه کروموزومی 6p21.3 قرار داشته و دارای ۸ اگزون و ۷ اینترون است (۶). VEGF در مهاجرت، تکثیر، تجزیه ماتریکس سلول های اندوتلیال، تشکیل شبکه های عروقی و همچنین تولید نیتریک اکساید و آزادسازی آن در سلول های اندوتلیال نقش دارد. علاوه بر آن یک اثر آنتی آپوپتوتیک بر روی سلول های اندوتلیال داشته که باعث بیان پروتئین های آنتی آپوپتوزی BCL2 و A1 در این سلول ها می گردد (۷). سطح VEGF سرمی می تواند یک مارکر مورد استفاده برای تعیین وضعیت تومور در انواع سرطان ها باشد (۸). از مهم ترین پلی مورفیسم های ژن VEGF، پلی مورفیسم $405C/G$ در ناحیه 5'UTR ژن است که احتمالاً در سطح تغییرات پس از رونویسی ژن اثر دارد. به طوری که سبب تغییر

سرطان پستان یکی از شایع ترین سرطان های شناخته شده زنان در تمام گروه های نژادی است (۱) و در کشورهای پیشرفته و آسیایی روند رو به رشدی دارد (۲ و ۳). سالانه حدود ۱/۳۸ میلیون نفر در دنیا به سرطان پستان مبتلا شده و ۳۶ درصد آنان (تقریباً ۵۰۰ هزار نفر) در اثر این بیماری جان خود را از دست می دهند. در خصوص سن ابتلا و میزان بروز موارد جدید سرطان پستان در ایران آمارهای متفاوتی منتشر شده است. نرخ مرگ و میر ناشی از آن کمتر از شیوع آن بوده و از هر ۱۸-۱۰ زن یک نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست می دهد (۴). سرطان پستان از نظر ژنتیکی به عنوان یک بیماری پیچیده طبقه بندی می شود و عقیده بر این است که فنوتیپ بیماری ناشی از ارتباطات میان بعضی ژن ها و عوامل محیطی است. برای ایجاد سرطان نیاز به عوامل ایجاد کننده و پیشبرنده است. یکی از عوامل مهم پیشبرنده، ایجاد عروق خونی در تومورها است و عوامل رشد مختلفی در ایجاد آن نقش دارد. عوامل رشد به طور طبیعی در تمام بافت های سالم بیان می شوند؛ ولی هنگام ابتلا

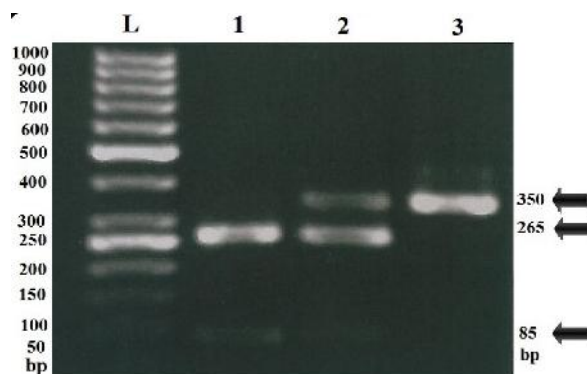
نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بسط نهایی انجام شد. برای سنجش کیفیت محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد انتقال داده شد. سپس برای انجام روش RFLP PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) محصول PCR تحت تیمار با آنزیم FagI (BsmFI) قرار گرفت و پس از مخلوط شدن مواد با یکدیگر، به مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا آنزیم عمل کند. قطعه تکثیر شده حاوی پلی مورفیسم +405C/G بود که با وجود نوکلئوتید G در این ناحیه یک جایگاه برش برای آنزیم محدود کننده BsmFI ایجاد شد. بنابراین در ال ال G برش آنزیمی صورت گرفت. بر این اساس در دو ژنوتیپ GG و CG باندهای حاصل از برش آنزیم مشاهده شد. به طوری که با وجود ژنوتیپ GG، دو باند ۲۶۵ و ۸۵ جفت بازی و در مورد ژنوتیپ CG سه باند ۳۵۰، ۲۶۵ و ۸۵ جفت بازی حاصل گردید. در مورد ژنوتیپ CC نیز برشی صورت نگرفت و تنها باند ۳۵۰ جفت بازی مشاهده شد.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار MedCalc-v.12.1.4.0 و آزمون آماری کای اسکور و نسبت شانسن (Odd's Ratio: OR) در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

میانگین سنی زنان گروه مورد و شاهد به ترتیب ۵۶/۵±۲۴/۵ سال و ۵۶/۵±۲۴/۵ سال بود.

نتیجه محصول واکنش با آنزیم محدود کننده BsmFI در شکل یک آمده است.



شکل ۱: ژل آگارز ۲ درصد مربوط به هضم آنزیمی BsmFI ردیف تک باند ۱: ژنوتیپ GG، ردیف تک باند ۳: ژنوتیپ CC، ردیف دو باند: ژنوتیپ هتروزیگوت CG، L و DNA: مارکر ۵۰ جفت بازی قطعات ۳۵۰، ۲۶۵ و ۸۵ جفت بازی قابل رویت بوده و با فلش مشخص شده‌اند.

فراوانی ژنوتیپی GG، CG و CC پلی مورفیسم +405C/G ژن VEGF در نمونه‌های گروه مورد به ترتیب در ۱۱ بیمار (۲۲ درصد)، ۲۳ بیمار (۴۶ درصد) و ۱۶ بیمار (۳۲ درصد) و در نمونه‌های گروه شاهد به ترتیب در ۲۱ نفر (۴۲ درصد)، ۲۴ نفر (۴۸ درصد) و ۵ نفر

فعالیت جایگاه داخلی ورود ریوزوم و افزایش ترجمه در کدون آغاز AUG و تنظیم بیان ایزوفرم بزرگ VEGF در سطح ترجمه می‌شود (۹). این پلی مورفیسم در جایگاه پتانسیلی اتصال عامل رونویسی MZF1 واقع شده و اثرات مستقیمی بر سطح رونویسی ژن و در نهایت بیان وابسته به LPS پروتئین VEGF در سلول خونی و محیطی دارد (۱۰). ژن VEGF یک ژن پلی مورفیک بوده و دارای پلی مورفیسم‌هایی به ویژه در ناحیه راه انداز 5'UTR و 3'UTR است (۱۱) و در آسیب‌شناسی انواع گوناگونی از بیماری‌ها مانند سرطان پستان (۱۲)، سرطان پروستات (۱۳) و رتینوپاتی دیابتی (۱۴) نقشی موثری ایفا می‌کنند. این پلی مورفیسم‌های ژنتیکی در سطح بیان پروتئین VEGF اثرگذارند. این مطالعه به منظور تعیین ارتباط پلی مورفیسم +405C/G (rs2010963) ژن عامل رشد اندوتلیال رگی و خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیتی از زنان استان گیلان انجام گردید.

روش بررسی

این مطالعه مورد - شاهدی روی ۵۰ نمونه از زنان با ابتلا به سرطان پستان و ۵۰ نمونه از زنان بدون ابتلا به سرطان پستان در بیمارستان رازی شهر رشت طی مهرماه ۱۳۹۳ لغایت آذرماه ۱۳۹۳ انجام شد.

از بیماران مورد مطالعه رضایت‌نامه کتبی آگاهانه شرکت در مطالعه اخذ شد. معیارهای ورود به مطالعه شامل زنان با سن بالاتر از ۱۸ سال و تاییدیه هیستولوژیکی و سیتولوژیکی سرطان پستان بود. معیارهای عدم ورود به مطالعه شامل عدم انجام شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی، عدم سابقه ابتلا به دیابت و تومورهای دیگر بود.

از آزمودنی‌ها ۲ میلی لیتر خون تهیه و برای استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA به آزمایشگاه منتقل گردید.

DNA ژنومی توسط کیت Gpp Solution (شرکت ژن پژوهان، ساخت ایران) و بر اساس پروتکل کیت استخراج گردید. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از لوکوسیت‌های خون محیطی از روش الکتروفورز استفاده شد. در ابتدا نمونه‌های DNA روی ژل آگارز یک درصد مورد الکتروفورز قرار گرفتند و سپس عکسبرداری از ژل توسط دستگاه Gel Doc انجام گردید.

با استفاده از روش PCR-RFLP پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی +405C/G در ژن VEGF تعیین ژنوتیپ گردید. در ابتدا PCR برای تکثیر قطعه ۳۵۰ جفت بازی حاوی SNP مورد نظر انجام و محل پلی مورفیسم ژن به وسیله واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مستقیم و معکوس به ترتیب 5'-AGCTCCAGAGAGAAGTCGAG-3' و 5'-GAACAGCCAGAAGTTGGAC-3' تکثیر شد. مراحل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس ۳۴ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، یک دقیقه در ۵۷ درجه سانتی گراد و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. در

جدول ۱: نتیجه نسبت شانس در ژنوتیپ‌های مشاهده شده ژن VEGF

p-value	نسبت شانس فاصله اطمینان ۹۵ درصد	گروه شاهد تعداد (درصد)	گروه مورد تعداد (درصد)	ژنوتیپ
-	۱/۰۰ (Ref)	۴۱ (۴۲)	۱۱ (۲۲)	GG
۰/۰۳۵	۲/۲۳ (۵/۱۱-۱/۰۱)	۲۴ (۴۸)	۲۳ (۴۶)	CG
۰/۰۰۰۶	۶/۵۸ (۱۷/۴۵-۲/۲۷)	۵ (۱۰)	۱۶ (۳۲)	CC

مطالعه Kapahi و همکاران روی بیماران ایالت پنجاب در شمال هندوستان نیز بین پلی مورفیسیم‌های C/T +936 و C/G +405 و افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان ارتباط آماری معنی‌داری یافت شد (۲۰). در مطالعه انجام شده Li و Ju بر روی پلی مورفیسیم C/T +936 ژن VEGF بیماران مبتلا به سرطان پستان، این پلی مورفیسیم با خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط نبود (۲۱).

از محدودیت این مطالعه می‌توان به حجم کم نمونه‌ها اشاره نمود. با توجه به چندعاملی بودن سرطان و تحت تاثیر قرار داشتن عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی؛ ممکن است نتایج حاصل از مطالعه حاضر در جمعیت‌های دیگر به‌واسطه تفاوت در خزانه ژنتیکی جمعیت‌ها و یا تغییر اندازه جمعیت مورد مطالعه تغییر کند و حصول نتیجه قطعی نیازمند مطالعات با جامعه آماری بیشتری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که احتمال می‌رود پلی مورفیسیم C/G +405 ژن VEGF در بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد مطالعه نقش داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۳۹۳-۴) خانم هائیه کریمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از پردیس بین‌الملل دانشگاه گیلان بود. بدین وسیله از مسؤولین محترم دانشگاه گیلان به خاطر فراهم نمودن امکانات و تجهیزات مورد نیاز برای اجرای مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2002 Jan-Feb; 52(1): 23-47.
- Russo IH. Cigarette smoking and risk of breast cancer in women. Lancet. 2002 Oct; 360(9339): 1033-34.
- Ng EH, Gao F, Ji CY, Ho GH, Soo KC. Risk factors for breast carcinoma in Singaporean Chinese women: the role of central obesity. Cancer. 1997 Aug; 80(4): 725-31.
- Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahan AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev. 2004 Jan-Mar; 5(1): 24-7.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Jun; 161(2): 851-8.
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. Circulation. 1996 Apr; 93(8): 1493-5.
- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and

(۱۰ درصد) تعیین شد (جدول یک). در افراد گروه مورد و شاهد، ژنوتیپ CG بیشترین فراوانی و ژنوتیپ GG و CC به ترتیب کم‌ترین فراوانی را به خود اختصاص داد.

افراد دارای ژنوتیپ CG پلی مورفیسیم C/G +405 به میزان ۲/۲ برابر بیشتر در معرض خطر ابتلا به سرطان پستان هستند. لذا ال C/G +405 به عنوان یک عامل افزایش خطر در سرطان پستان ارزیابی گردید ($P < 0.0006$).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه ال C/G +405 به عنوان یک عامل افزایش خطر در سرطان پستان ارزیابی شد.

مبحث ارتباط پلی مورفیسیم‌های ژنتیکی و استعداد ابتلا به برخی بیماری‌ها از جمله مباحث پراهمیت است (۱۵). در مطالعه معماریان و همکاران روی پلی مورفیسیم C/G +405 ژن VEGF، بین این پلی مورفیسیم و استعداد ابتلا به اندومتروز رابطه‌ای یافت نشد (۱۶). در مطالعه Yang و همکاران روی پلی مورفیسیم C/T +936، این پلی مورفیسیم اثری بر خطر ابتلا به سرطان پستان نداشت (۱۷). در مطالعه Luo و همکاران در چین بین افزایش بیان پلی مورفیسیم‌های C/T +936 و G/C -634 و وقوع سرطان پستان ارتباط معنی‌داری یافت شد (۱۸). در مطالعه James و همکاران پلی مورفیسیم VEGF در ناحیه G/A -1154 و C/G +405 در جمعیتی از هندوستان بررسی و ارتباط معنی‌داری بین افزایش این پلی مورفیسیم‌ها و احتمال ابتلا به سرطان پستان یافت شد (۱۹). در

A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 1998 May; 273(21): 13313-6.

8. Chin KF, Greenman J, Gardiner E, Kumar H, Topping K, Monson J. Pre-operative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colorectal cancer. Br J Cancer. 2000 Dec; 83(11): 1425-31.

9. Huez I, Bornes S, Bresson D, Créancier L, Prats H. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. Mol Endocrinol. 2001 Dec; 15(12): 2197-210.

10. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. Cytokine. 2000 Aug; 12(8): 1232-5.

11. Schneider BP, Radovich M, Miller KD. The role of vascular endothelial growth factor genetic variability in cancer. Clin Cancer Res. 2009 Sep; 15(17): 5297-302. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2576

12. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf

G, Wascher TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2003 Sep; 106(4): 468-71.

13. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res*. 2002 Jun; 62(12): 3369-72.

14. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 May; 51(5): 1635-9.

15. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr; 61(2): 69-90. doi: 10.3322/caac.20107

16. Memariani T, Salimi Nejad K, Kamali K, Shervin A, Mohajer-Maghari B, Akhondi MM, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G>C polymorphism with endometriosis in an Iranian population. *J Reprod Infertil*. 2010 Apr-Jun; 11(1): 33-37.

17. Yang DS, Park KH, Woo OH, Woo SU, Kim AR, Lee ES,

et al. Association of a vascular endothelial growth factor gene 936 C/T polymorphism with breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Feb; 125(3): 849-53. doi: 10.1007/s10549-010-1070-1

18. Luo T, Chen L, He P, Hu QC, Zhong XR, Sun Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and breast cancer risk in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(4): 2433-7.

19. James R, Ramesh G, Krishnamoorthy L, Bhagat R, Chadaga S, Deshmane V, et al. Prevalence of +405G>C,-1154G>A vascular endothelial growth factor polymorphism in breast cancer. *Indian J Clin Biochem*. 2014 Jan; 29(1): 21-28. doi: 10.1007/s12291-013-0307-2

20. Kapahi R, Manjari M, Sudan M, Uppal MS, Singh NR, Sambyal V, et al. Association of +405C>G and +936C>T polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene with sporadic breast cancer in North Indians. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(1): 257-63.

21. Li J, Ju Y. Association between the Functional Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor Gene and Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Iran J Med Sci*. 2015 Jan; 40(1): 2-12.

Original Paper

Association of VEGF gene +405C/G polymorphism with the risk of breast cancer in northern Iran

Karimi-Rouzbahani H (B.Sc)¹, Mashayekhi F (Ph.D)*², Saeedi-Saedi H (Ph.D)¹

¹M.Sc Student in Genetic, University of Guilan, University Campus, Rasht, Iran. ²Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. ³Associate Professor, Radiotherapy and Oncology Specialist, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Abstract

Background and Objective: Breast cancer is a cancer in women with high prevalancy worldwide. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important Pro-angiogenic factors. +405C/G is one of the common VEGF polymorphism which may have an impact on the level of gene expression and over loading of gene products. This study was done to evaluate the association between VEGF +405C/G gene polymorphism and breast cancer risk in north of Iran.

Methods: This case-control study was carried out on 50 patients with breast cancer and 50 normal aged-matched controls in north of Iran. Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells. To determine the genotype of +405 C/G VEGF gene polymorphism, PCR-RFLP method was used.

Results: The prevalence of genotypic frequencies of GG, GC and CC in controls were 42%, 48% and 10%, respectively and in patients were 22%, 46% and 32%, respectively (P<0.05). The +405C allele was considered as a risk factor in breast cancer (P<0.05).

Conclusion: It seems +405 C/G VEGF gene polymorphism may be associated with the breast cancer in northern Iran.

Keywords: Breast cancer, Polymorphism VEGF, +405C/G gene, Iran

* Corresponding Author: Mashayekhi F (Ph.D), E-mail: mashayekhi@guilan.ac.ir

Received 2 Aug 2015

Revised 19 Aug 2015

Accepted 27 Sep 2015