نقش سلولهای بنیادی سرطانی در افزایش ریسک ابتلاء به متاستاز و کاهش میزان بقای افراد مبتلا به سرطان پستان

مجید متولی باشی*، فاطمه کوه کن و زهره حجتی

اصفهان ،دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم ،گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

چکیده

امروزه سلولهای بنیادی سرطانی به عنوان یکی از عوامل اصلی و منشاء متاستاز مطرح می باشند. سلولهای بنیادی سرطانی مواد متعددی از جمله آنزیمهای پروتئازی را از خود ترشح می کنند. آنزیم کلاژناز بینابینی یا کلاژناز فیبروبلاستی عضوی از خانواده بزرگ آنزیمهای پروتئازی مذکور می باشد که با تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی نه تنها گسترش سلولهای سرطانی را تسهیل می نماید بلکه با رهایش فاکتورهای رشد و فاکتورهای رگزایی در بقاء و تغذیه سلولهای سرطانی نیز نقش کلیدی ایفا می کند. دخول یک باز گوانین در موقعیت ۱۶۰۷- پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی یک جایگاه اتصال برای اعضای خانواده ETS از فاکتورهای رونویسی ایجاد می کند. جذب عوامل الگوبرداری در اثر این پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (۲G/۲G) بیان ژن کلاژناز فیبروبلاستی را به طور محسوسی افزایش می دهد که این شرایط می تواند گسترش سلولهای توموری و تهاجم آنها را آسان تر سازد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر پلی مورفیسم مذکور بر گسترش و متاستاز سرطان پستان و میزان بقای کل، بقای ویژه سرطان و بقای عاری از بیماری افراد مبتلا به سرطان پستان است. بدین منظور، نمونه خون ۲۰۰ خانم مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ نمونه کنترل به نسبت مساوی از دو شهر تهران و اصفهان جمع آوری گردید و با روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ گردید. محاسبات آماری نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ ۲G/۲G در بین افراد بیمار نسبت به افراد کنترل بیشتر است (۲۹/۵ درصد در برابر ۲۳ درصد). بیماران در دو دسته متاستازی (M^+) و غیر متاستازی (M^-) طبقه بندی شدند. توزیع ژنوتیپی ۲G/۲G در گروه متاستازی نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنی داری نشان داد (۳/۹۴-۱/۰۵=$CI_{\%95}$ و ۲/۰۳=OR). در مرحله بعد بیماران غیر متاستازی به مدت میانگین ۳۲ ماه تحت نظارت و پیگیری قرار گرفتند. آنالیز بقای کلی ۳ ساله در افراد بیمار واجد ژنوتیپ ۲G/۲G در مقایسه با افراد واجد ژنوتیپهای دیگراز لحاظ آماری معنی دار نبود (تست لاگ-رانک: P=۰/۱۲، χ^2=۲/۳۴). اما میزان بقای ویژه سرطان و بقای عاری از بیماری در بین دو گروه مذکور تفاوت آماری معنی داری نشان داد (بقای ویژه سرطان، تست لاگ-رانک: P=۰/۰۱، χ^2= ۵/۴۵ ، بقای عاری از سرطان، تست لاگ-رانک: P=۰/۰۰۲، χ^2= ۸/۹۹). در مجموع، مطالعه اپیدمیولوژی حاضر برای اولین بار نشان داد که ژنوتیپ ۲G/۲G به عنوان یک فاکتور تسهیل کننده، با گسترش و متاستاز سرطان پستان مرتبط بوده و سبب افزایش ریسک ابتلاء به متاستاز و کاهش میزان بقاء در افراد واجد ژنوتیپ ۲G/۲G می شود.

واژه های کلیدی: سلولهای بنیادی سرطانی ، کلاژناز فیبروبلاستی ، میزان بقاء، متاستاز، سرطان پستان.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۲۸۹۱۳۳، پست الکترونیکی: mbashi@sci.ui.ac.ir

مقدمه

با وجودی که فاکتورهای خطر متعددی در بروز سرطان پستان شناسایی و معرفی گشته اند، اما هنوز علت دقیق و قطعی سرطان مذکور به صورت ابهام باقی مانده است (۲۲). وجود سابقه یا پیشینه سرطان پستان در اقوام درجه یک می تواند یکی از فاکتورهای خطر مهم در ابتلاء به سرطان پستان باشد. حدود ۱۵ درصد از موارد ابتلاء به

Archive of SID

www.SID.ir

سرطان پستان پیشینه خانوادگی مثبت داشته و مطالعات نشان داده اند که درصدی از آنها می تواند مربوط به توارث ژنهای مستعد کننده سرطان باشد (۱۳، ۲۵ و ۲۶). متاستاز مرحله خطرناک سرطان است به طوری که مرحله متاستازی سرطان پستان تقریباً غیر قابل درمان می باشد (۲۷).

امروزه سلولهای بنیادی سرطانی (Cancer stem cell=CSC) به عنوان منشاء متاستاز و عامل عود و برگشت سرطان مطرح هستند (۲). Csc ها سلولهای توموری می باشند که توانایی خودنوسازی و تولید دودمانهای ناهمگونی از سلولهای سرطانی مولد تومور را دارا می باشند (۱۹). Csc ها از بسیاری از سرطانها نظیر سرطانهای پستان، مغز، پروستات، شش، پانکراس و کولون جداسازی و شناسایی شده اند (۲۰ و ۲۱). تومورزایی و گسترش متاستازی Csc ها به توانایی بالای آنها در تولید سیتوکین ها و پروتئازهایی نظیر ماتریکس متالوپروتئینازها بر می گردد (۲، ۱۹، ۲۰ و ۲۱). این آنزیمها خانواده ای از پروتئینهای ترشحی یا غشایی می باشند که قادرند تقریباً کلیه ترکیبات غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی (ECM) را که دو سد فیزیکی مهم در برابر مهاجرت و گسترش سلولهای توموری هستند را تجزیه و تخریب نمایند (۱، ۸ و ۴۱). در واقع Csc ها با ترشح آنزیمهای مذکور، ماتریکس خارج سلولی را شکسته و سبب رهایش فاکتورهای رشد و رگزایی باند شده به ECM می گردند؛ بدین ترتیب می توانند به جریان خون در رگها نفوذ نمایند و سپس در ارگان دیگر از جریان خون خارج شوند و در ارگان جدید ساکن و ایجاد سرطان ثانویه کنند (۱۰، ۲۹ و۴۰).

کلاژناز فیبروبلاستی یا ماتریکس متالوپروتئیناز-۱ قادر است کلاژنهای فیبری که فراوان ترین پروتئین تشکیل دهنده بدن می باشد را هضم نماید. ناحیه پروموتوری کلاژناز فیبروبلاستی واجد عناصر تنظیمی حفاظت شده ای است که توسط فاکتورهای رشد، سیتوکینها و فاکتورهای محیطی کنترل می گردد (۳۵ و ۳۶). در شرایط نرمال بیان ژن کلاژناز فیبروبلاستی در بافتها پایین است و تنها زمانی که باز آرایش ECM نیاز باشد افزایش می یابد (۶، ۳۸و ۳۹). در مقابل در بسیاری از انواع تومورها سطح بالایی از کلاژناز فیبروبلاستی بیان می گردد (۳، ۵ و ۱۲) . مطالعات اخیر افزایش بیان کلاژناز فیبروبلاستی را در بافتهای توموری مختلفی نشان داده اند و پیشنهاد کرده اند پروتئین مذکور می تواند در تهاجم توموری و متاستاز دخیل باشد (۷، ۱۱، ۲۸، ۳۱، ۳۴ و۴۳).

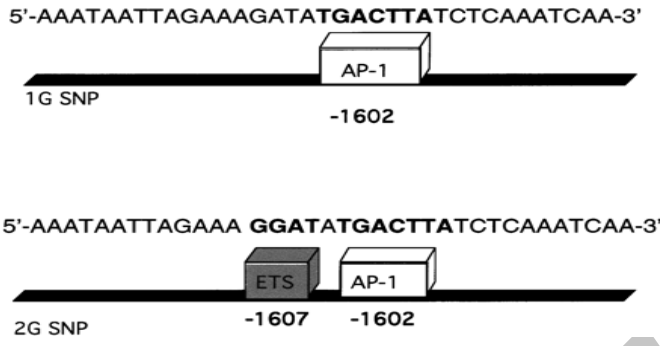
بیان ژن کلاژناز فیبروبلاستی تحت تأثیر یک پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در ناحیه پروموتوری آن قرار می گیرد. این پلی مورفیسم به طور طبیعی در جمعیتها وجود دارد و شامل دخول/حذف یک باز گوانین در موقعیت ۱۶۰۷- جفت بازی پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی است. مطابق با شکل ۱ دخول گوانین یک توالی همسان برای فاکتورهای رونویسی ETS $(5'-GGAT-3')$ ایجاد می کند (۳۰). جایگاه ایجاد شده در اثر دخول گوانین (آلل ۲G) در مجاورت جایگاه اتصال AP-1 در موقعیت ۱۶۰۲- قرار دارد. با توجه به اینکه اعضای خانواده ETS برای القای رونویسی احتیاج به فاکتورهای رونویسی دیگری همچون اعضای خانواده AP-1 دارند، دو جایگاه مجاور مذکور، به صورت سینرژیک عمل می کنند و با همکاری یکدیگر رونویسی را از آلل واجد ۲G افزایش می‌دهند (۳۷ و ۴۲. شکل ۱).

با توجه به مطالب ارائه شده ژنوتیپ ۲G/۲G می تواند پتانسیل بیان ژن کلاژناز فیبروبلاستی را افزایش دهد وگسترش متاستاز و عود و برگشت بیماری را در افراد مبتلا به سرطان پستان تسهیل نماید. لذا در مطالعه حاضر تأثیر ژنوتیپ مذکور بر تهاجم و متاستاز افراد مبتلا به سرطان پستان ارزیابی و ارتباط آن با میزان بقای کلی ۳

Archive of SID

www.SID.ir

ساله، بقای ویژه سرطان و بقای عاری از بیماری بررسی گردید.



شکل ۱- در آلل ۲G ژن کلاژناز فیبروبلاستی ، جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی ETS در مجاورت جایگاه اتصال AP-1 ایجاد می شود.

مواد و روشها

۴ میلی لیتر خون وریدی از ۲۰۰ خانم مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ نمونه کنترل به نسبت مساوی از بیمارستان امید واقع در شهر اصفهان (۱۰۰ نمونه سرطان پستان و ۵۰ نمونه کنترل) و بیمارستان امام خمینی واقع در شهر تهران (۱۰۰ نمونه سرطان پستان و ۵۰ نمونه کنترل) جمع آوری گردید. بیمارستانهای مذکور از بیمارستانهای بزرگ ایران می باشند که افراد مبتلا به سرطان از نواحی دور و نزدیک برای معالجه و درمان به این مراکز مراجعه می کنند. از کلیه افراد بیمار و کنترل شرکت کننده در مطالعه حاضر رضایت نامه کتبی گرفته شد. افراد کنترل به نحوی انتخاب شدند که از لحاظ سنی با گروه بیمار مطابقت داشته و سابقه و پیشینه سرطان در بستگان درجه یک آنها دیده نشده باشد. افراد بیمار به مدت میانگین ۳۲ ماه (۴۶-۲۲ ماه) تحت بررسی و پیگیری قرار گرفتند و هر گونه تغییر در وضعیت بیماری آنها ثبت و ضبط گردید.

DNA ژنومی کلیه نمونه های خون پس از انتقال به دانشگاه اصفهان از روش نمکی میلر با مقداری دستکاری وتغییرات استخراج گردید (۲۴). در مرحله بعد فرآیند PCR به منظور تکثیر پلی مورفیسم پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی با استفاده از پرایمرهای زیر انجام گرفت:

Forward: 5 '-TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA-3'
Reverse: 5'-CTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATA**g**C-3

یک جهش از T به G در دومین نوکلئوتید مجاور انتهای ٣′ پرایمر معکوس ایجاد گردید تا جایگاه شناسایی برای آنزیم محدود کننده *Alu* I در آلل ۱G حاصل شود.

تکثیر DNA در حجم ۲۵ µl شامل ۱۰۰ ng از DNA الگو، ۲/۵ µl از بافر ۱۰X PCR، ۲۰۰ mM از MgCl2 و ۲/۵ u از DNA پلیمراز Taq، ۰/۲ mM از مخلوط dNTP، ۲۰ pM از پرایمرهای رفت و برگشت با برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر صورت گرفت: دمای دناتوره اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه که با ۳۰ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد برای پرایمرهای طراحی شده به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه تکرار گردید. در انتها ۱۰

Archive of SID
www.SID.ir

دقیقه ۷۲ درجه سانتی گراد برای تکمیل فرآیند تکثیر انجام گرفت.

سپس ۵-۴ میکروگرم از محصول PCR به مدت ۶-۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در ۲۰ میکرولیتر محلول واجد ۵ واحد آنزیمی *Alu1* (۵/. میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X Tango TM هضم گردید. پس از هضم آنزیمی، محصولات بر روی ژل آگاروز ۳ درصد رنگ شده با اتیدیوم بروماید جداسازی شدند.

هموزیگوت های آلل ۲G با باندی به طول ۲۶۹ جفت باز، هموزیگوت های آلل ۱G با باندی به طول ۲۴۱ جفت باز و هتروزیگوت ها با ترکیبی از هر دو باند (۲۶۹ و ۲۴۱ جفت بازی) بر روی ژل ظاهر شدند.

آنالیزهای آماری:آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. در تحقیق حاضر، به منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروههای مختلف بیماران و افراد کنترل از آزمون χ^2، استفاده گردید. نسبت افزاینده (Odd Ratio) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان پلی مورفیسم پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی و ریسک رشد و تهاجم پستان و میزان مرگ و میر این افراد محاسبه گشت. در کلیه محاسبات، سطح احتمال P<۰/۰۵، از نظر آماری معنی‌دار فرض گردید.

آنالیزهای بقاء: معاینات و آزمایشهای منظمی هر ۳ ماه یک بار بر روی افراد مبتلا به سرطان پستان انجام گرفت. در طول مدت پیگیری با مراجعه به پرونده های پزشکی، آزمایشهای انجام شده و مصاحبه با پزشک معالج هر گونه تغییر در وضعیت بیماری و یا بقای بیمار لحاظ گردید. میزان بقای کل به عنوان مدت زمان بین جراحی تا مرگ به هر دلیل، میزان بقای ویژه سرطان مدت زمان بین جراحی تا مرگ در اثر سرطان و میزان بقای عاری از بیماری به صورت مدت زمان بین جراحی تا عود مجدد و یا متاستاز تعریف گردید. برای بقای کل تمام مرگها بدون توجه به دلیل آن منظور گردید و برای بقای ویژه سرطان تنها مرگهای ناشی از سرطان محاسبه گردیدند.

منحنیهای بقاء با استفاده از روش کاپلان – میر رسم و باتست لاگ- رانک مقایسه گردیدند.

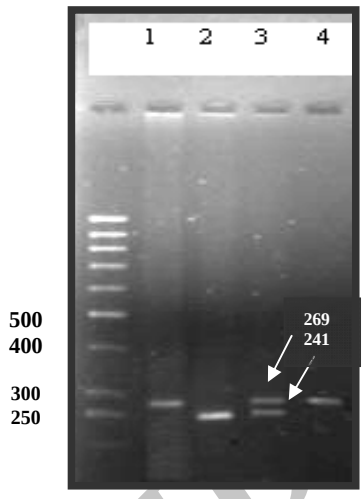
نتایج

۲۰۰ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ نمونه خون از افراد کنترل به طور مساوی از اصفهان و تهران جمع آوری گردید. میانگین سنی افراد بیمار ۵۷/۹ در محدوده ۸۶-۲۵ سال بود و متعاقباً توزیع سنی همسانی نیز در انتخاب افراد کنترل لحاظ گردید (۵ ± سال). کلیه نمونه های گرفته شده با موفقیت تعیین ژنوتیپ شدند (شکل ۲). جدول ۱ توزیع ژنوتیپی را در افراد کنترل و بیمار دو شهر اصفهان و تهران نشان می دهد. مطابق داده های ارائه شده در جدول مذکور تفاوت آماری معنی داری در توزیع ژنوتیپی ژن کلاژناز فیبروبلاستی بین جمعیت کنترل و بیمار دو شهر تهران و اصفهان دیده نمی شود (برای افراد بیمار: P =۰/۹۹، χ^2=۰/۰۰۱۸ و برای افراد کنترل P =۰/۹۷، χ^2=۰/۰۶). لذا، در کلیه محاسبات آماری انجام شده، این دو جمعیت به عنوان یک جمعیت واحد در نظر گرفته شدند.

در ادامه مطالعات آماری، تفاوت معنی داری در توزیع ژنوتیپی ژن کلاژناز فیبروبلاستی در بین افراد بیمار و کنترل جمعیت واحد ملاحظه شد. فراوانی ژنوتیپی ۱G/۱G، ۲G/۱G و ۲G/۲G به ترتیب در افراد بیمار برابر ۱۹/۵٪ ، ۵۱٪ و ۲۹/۵٪ و در افراد کنترل برابر با ۲۶٪، ۵۱٪ و ۲۳٪ بود (P =۰/۰۴، χ^2=۵/۹۹) .

در مرحله بعدی آنالیزها، بیماران به دو دسته متاستازی (M^+، بیمارانی که گسترش متاستاز در آنها تشخیص داده شد) و بیماران غیر متاستازی (M^-، بیمارانی که گسترش متاستاز در آنها دیده نشد) تقسیم گردیدند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲ – الکتروفورز مطالعات PCR-RFLP . الکتروفورز بر روی ژل ۳٪ آگارز و در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت دو ساعت و نیم انجام گرفته است. فرد ۱و ۴ هموزیگوت 2G، فرد۲ هموزیگوت 1G و فرد ۳ هتروزیگوت 1G/2G می باشد (M: DNA مارکر ۵۰bp).

سپس فراوانی ژنوتیپی که سبب تولید بالاترین مقدار آنزیم کلاژناز فیبروبلاستی می گردد (ژنوتیپ ۲G/۲G) با ژنوتیپهای دارای حداقل یک آلل ۱G (۱G/۲G و ۱G/۱G) در بین افراد M^+ ، M^- و کنترل مقایسه گردید. نتایج نشان داد که هیچ اختلاف مهم آماری در توزیع گروههای ژنوتیپی افراد غیر متاستازی و کنترل وجود ندارد (۰/۷۸= P، ۰/۰۷۸=χ^2). اما در مقابل، ژنوتیپ هموزیگوت ۲G/۲G در مقایسه با گروه کنترل، ارتباط و پیوستگی قوی با گروه متاستازی نشان داد (۱/۰۵–۳/۹۴= $CI_{95\%}$ و ۲/۰۳= OR، جدول ۲). به منظور بررسی دقیق نقش ژنوتیپ هموزیگوت ۲G در میزان تهاجم و متاستاز سرطان پستان، افراد غیر متاستازی به مدت ۲۲–۴۶ ماه (میانگین ۳۲ ماه) تحت بررسی و پیگیری قرار گرفتند. مطابق آخرین بررسیهای انجام شده وضعیت بیماران به صورت زیر به دست آمد (جدول ۳):

۷۸ درصد بیماران بدون بروز هیچ نشانه مجددی از بیماری زنده بودند. در ۱۴ درصد بیماران گسترش بیماری گزارش گردید. ۳ درصد بیماران در اثر گسترش سرطان فوت کرده بودند و حدود ۱/۶ درصد بیماران به علت حوادث دیگر غیر از سرطان مذکور جان سپرده بودند. نتایج حاصل از مطالعات آماری نشان دادند که افراد واجد ژنوتیپهای ۲G/۲G نسبت به افراد واجد ژنوتیپهای ۱G/۲G و ۱G/۱G در معرض خطر فزآینده ای برای متاستاز و تهاجم سرطان پستان روبه رو هستند.

جدول ۱– توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی افراد کنترل و بیمار در جمعیت تهران، اصفهان و جمعیت کل.

گروه	تهران			اصفهان			جمعیت کل		
	۱/۱	۱/۲	۲/۲	۱/۱	۱/۲	۲/۲	۱/۱	۱/۲	۲/۲
کنترل n(%)	۱۳(٪۲۶)	۲۶(٪۵۲)	۱۱(٪۲۲)	۱۳(٪۲۶)	۲۵(٪۵۰)	۱۲(٪۲۴)	۲۶(٪۲۶)	۵۱(٪۵۱)	۲۳(٪۲۳)
بیمار n(%)	۱۹(٪۱۹)	۵۰(٪۵۰)	۲۹(٪۲۹)	۲۰(٪۲۰)	۵۲(٪۵۲)	۳۰(٪۳۰)	۳۹(٪۱۹/۵)	۱۰۲(٪۵۱)	۵۹(٪۲۹/۵)

n : تعداد افراد. – توزیع ژنوتیپی ژن کلاژناز فیبروبلاستی بین جمعیت کنترل و بیمار دو شهر تهران و اصفهان تفاوت آماری معنی داری نشان نداد (برای افراد بیمار: ۰/۹۷= P، ۰/۰۶=χ^2 و برای افراد کنترل ۰/۹۹= P، ۰/۰۰۱۸=χ^2). لذا، در کلیه محاسبات آماری انجام شده، این دو جمعیت به عنوان یک جمعیت واحد در نظر گرفته شدند. – ژنوتیپ ۱G/۲G در دوگروه کنترل و بیمار فراوانی یکسانی نشان می دهد، لذا در کلیه محاسبات آماری، این ژنوتیپ همراه با ژنوتیپ ۱G/۱G به عنوان گروه واحد در نظر گرفته شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- آنالیز ارتباط و پیوستگی گروههای ژنوتیپی ژن کلاژناز فیبروبلاستی در افراد متاستازی و غیرمتاستازی

گروه ها	ژنوتیپهای کلاژناز فیبروبلاستی ۱/۱+۱/۲	۲/۲	OR (95% CI) [a]
کنترل	۷۷(٪۷۷)	۲۳(٪۲۳)	–
غیرمتاستازی(M^-)	۹۵(٪۷۵)	۳۱(٪۲۵)	۱/۰۹(۰/۵۸–۲/۰۲) [b]
متاستازی (M^+)	۴۶(٪۶۲)	۲۸(٪۳۸)	۲/۰۳(۱/۰۵–۳/۹۴) [c]

[a]: OR محاسبه شده برای ژنوتیپ ۲G/۲G در برابر ژنوتیپهای ۱G/۱G +۱G/۲G در مقایسه گروههای غیر متاستازی و متاستازی با گروه کنترل.

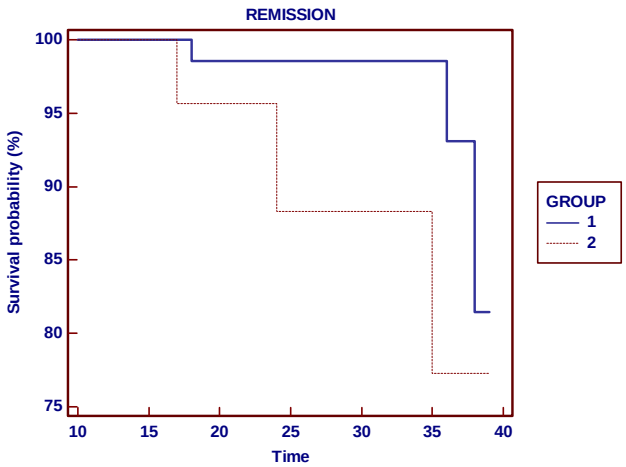
[b]: ژنوتیپ ۲G/۲G ارتباط و پیوستگی معنی داری با گروه غیر متاستازی در مقایسه با گروه کنترل نشان نمی دهد.

[c]: ارتباط و پیوستگی معنی داری بین ژنوتیپ ۲G/۲G با گروه متاستازی در مقایسه با گروه کنترل دیده می شود.

جدول ۳- بررسی ارتباط پلی مورفیسم پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی و میزان بقای بیماران.

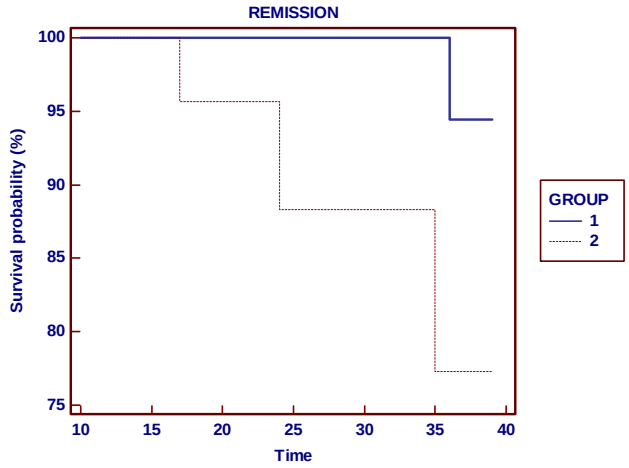
آنالیزهای بقاء	ژنوتیپ	n	موارد ابتلاء	P (Log-rank test)
میزان بقای کلی				
	۱/۱ +۱/۲	۹۵	۳	
	۲/۲	۳۱	۳	۰/۱۲
میزان بقای ویژه سرطان				
	۱/۱ +۱/۲	۹۵	۱	
	۲/۲	۳۱	۳	۰/۰۱
میزان بقای عاری از بیماری [a]				
	۱/۱ +۱/۲	۹۵	۹	
	۲/۲	۳۱	۸	۰/۰۰۲

n: تعداد کل افراد. [a]: افراد واجد ژنوتیپ ۲G/۲G نسبت به افراد واجد ژنوتیپهای دیگر در معرض خطر فزاینده متاستاز سرطان پستان قرار می گیرند (OR =۲/۷ و $CI_{٪۹۵}$=۱/۴۵–۵/۰۷).

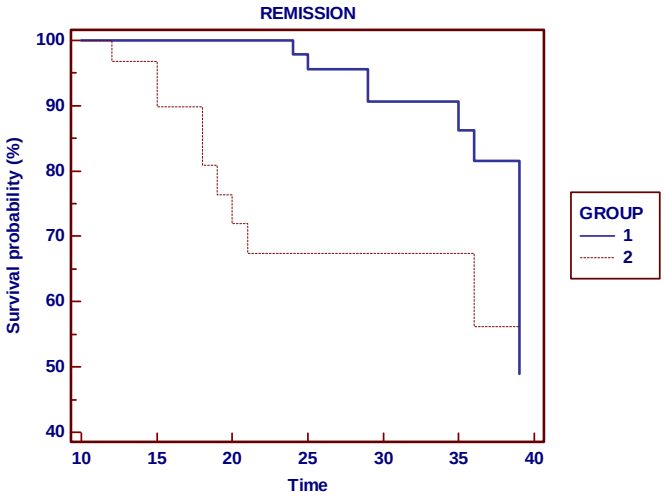


نمودار ۱- مقایسه گروه های ژنوتیپی ۱ و ۲ در نمودار کاپلان- میر، هیچ تفاوت آماری معنی داری در میزان بقای کلی ۳ ساله افراد نشان نداد (تست لاگ-رانک: P=۰/۱۲، χ^2=۲/۳۴). گروه۱: ۱G/۱G +۱G/۲G گروه ۲: ۲G/۲G

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۲- نمودار کاپلان – میر تفاوت آماری معنی داری بین میزان بقای ویژه سرطان دو گروه ژنوتیپی نشان می دهد (تست لاگ-رانک:P=۰/۰۱، χ^2= ۵/۴۵). گروه۱: ۱G/۱G +۱G/۲G گروه ۲: ۲G/۲G



نمودار ۳- نمودار کاپلان- میر تفاوت آماری معنی داری بین میزان بقای عاری از بیماری دو گروه ژنوتیپی نشان می دهد (تست لاگ-رانک: P=۰/۰۰۲، χ^2= ۸/۹۹). گروه۱: ۱G/۱G +۱G/۲G گروه ۲: ۲G/۲G

در مرحله بعدی مطالعات، ارتباط ژنوتیپ ۲G/۲G با میزان بقای کل ۳ ساله، بقای ویژه سرطان و بقای عاری از بیماری بررسی گردید. میزان بقای کل ۳ ساله به ترتیب در افراد واجد ژنوتیپ ۲G/۲G و افراد با ژنوتیپهای واجد حداقل یک آلل ۱G برابر ۹۰ درصد و ۹۶ درصد محاسبه گردید. میزان بقای ویژه سرطان در افراد هموزیگوت ۲G برابر ۹۰ درصد و در افراد هموزیگوت و هتروزیگوت ۱G ، ۹۹ درصد به دست آمد. میزان بقای عاری از بیماری در افراد واجد ژنوتیپ ۲G/۲G برابر با ۷۱ درصد و در افراد واجد گروه ژنوتیپی دیگر ۹۲ درصد محاسبه گردید.

در مجموع، در میزان بقای ویژه سرطان و بقای عاری از بیماری، تفاوت آماری معنی داری بین گروه ژنوتیپی ۲G/۲G و گروه ژنوتیپی ۱G/۲G و ۱G/۱G مشاهده گردید (نمودارهای ۲ و۳، بقای ویژه سرطان، تست لاگ-رانک: P=۰/۰۱، χ^2= ۵/۴۵ ، بقای عاری از سرطان، تست لاگ-رانک : P=۰/۰۰۲، χ^2= ۸/۹۹). اما در میزان بقای کل ۳ ساله

www.SID.ir

بین گروههای مذکور تفاوت آماری معنی داری وجود نداشت (نمودار ۱، تست لاگ-رانک: P=۰/۱۲، χ^2=۲/۳۴).

بحث

تاکنون، ارتباط پلی مورفیسم کلاژناز فیبروبلاستی با چندین نوع سرطان از جمله سرطان شش، کولورکتال ، سینه و تخمدان بررسی شده است (۹، ۱۲، ۱۷، ۱۸ ، ۲۳ و ۳۱. جدول ۴). طبق نتایج به دست آمده در این مطالعات، سلولهای توموری و بافتهای گوناگون، مقادیر متفاوتی از کلاژناز فیبروبلاستی را بیان می‌کنند، از این رو، این احتمال وجود دارد که آنزیم مذکور در ابتلاء، گسترش و متاستاز یک نوع سرطان نقش عمده‌ای ایفا کند، اما در سرطان دیگر نقش حائز اهمیتی نداشته باشد. برای مثال، کلاژناز فیبروبلاستی در کارسینومای اندومتریال و سرطان کولورکتال در مقادیر زیاد بیان می شود اما در کارسینومای شش، ارتباطی میان پلی مورفیسم پروموتور ژن مذکور و سرطان وجود ندارد (۹، ۱۸ و ۳۱).

در مطالعه حاضر، ارتباط بین پلی مورفیسم ۱G/۲G (دخول / حذف گوانین) پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی و ریسک شروع و متاستاز سرطان پستان و میزان بقای بیماران ارزیابی گردید. فراوانی ژنوتیپ ۲G/۲G در افراد بیمار برابر با ۲۹/۵ درصد است که این مقدار در افراد کنترل به ۲۳ درصد کاهش می یابد. از طرفی، ژنوتیپ ۲G/۲G نسبت به ژنوتیپهای واجد حداقل یک آلل ۱G در افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد کنترل فراوانی بیشتری دارد (۲/۴۴-۰/۸۰=٪۹۵CIو ۱/۴۰= OR). نتایج مذکور برخلاف یافته های گزارش شده در مطالعه جیلاردی، ارتباط بین ژنوتیپ ۲G/۲G و سرطان پستان را نشان می دهد. این اختلاف می تواند در نتیجه وجود تفاوتهای اتینیکی و تفاوت در زمینه های ژنتیکی و محیطی در جمعیت ایران و ایتالیا باشد. برای مثال فراوانی و میزان جهش در ژنهای ویژه مرتبط با سرطان پستان که بر روی بیان کلاژناز فیبروبلاستی نیز اثر دارند (نظیر P۵۳) ممکن است در جمعیتهای مختلف متفاوت باشد.

به منظور روشن شدن این ابهام که ژنوتیپ ۲G/۲G دقیقاً در کدام مرحله سرطان پستان (شروع یا متاستاز) ایفای نقش می کند، بیماران به دو دسته متاستازی و غیرمتاستازی تفکیک گشتند. آنالیزهای آماری انجام شده نشان دادند اختلاف آماری معنی داری در توزیع ژنوتیپی گروه ۲G/۲G و گروه ۱G/۲G و ۱G/۱G بیماران غیر متاستازی و کنترل وجود ندارد (P =۰/۷۸، χ^2=۰/۰۷۸) . اما در مقابل فراوانی ژنوتیپ ۲G/۲G در گروه متاستازی نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده و ارتباط و پیوستگی معنی داری نشان می دهد (۳/۹۴-۱/۰۵=٪۹۵CIو ۲/۰۳= OR). لذا می توان این فرضیه را مطرح نمود که ژنوتیپ ۲G/۲G در ابتلاء به سرطان پستان نقشی ندارد اما می تواند یکی از فاکتورهای مهم دخیل در فرآیند گسترش و متاستاز سرطان مذکور باشد.

به منظور تأیید این فرضیه آنالیزهای بیشتری بر روی گروه غیر متاستازی صورت گرفت. بیماران گروه مذکور برای مدت ۴۶-۲۲ ماه (میانگین ۳۲ ماه) تحت پیگیری و مراقبت قرار گرفتند و هر گونه تغییر در وضعیت آنها ثبت گردید. در انتها، میزان بقای کل ۳ ساله، بقای ویژه سرطان و بقای عاری از سرطان محاسبه گردید. اگرچه میزان بقای کل ۳ ساله برای بیماران ۲G/۲G و بیماران ۱G/۲G و ۱G/۱G مشابه بود (تست لاگ-رانک: P=۰/۱۲، χ^2=۲/۳۴) اما میزان بقای ویژه سرطان و بقای عاری از بیماری تفاوت آماری معنی داری نشان داد (بقای ویژه سرطان، تست لاگ-رانک: P= ۰/۰۱، χ^2= ۵/۴۵ , ، بقای عاری از سرطان، تست لاگ-رانک: P=۰/۰۰۲، χ^2= ۸/۹۹).

مطابق اطلاعات جمع آوری شده و آنالیزهای آماری انجام گرفته در میان بیمارانی که در اثر سرطان فوت کردند، فراوانی افرادی که واجد ژنوتیپ ۲G/۲G بودند نسبت به افراد دیگر بیشتر بود. همچنین در بازه زمان ذکر شده، ۹

Archive of SID

www.SID.ir

درصد از بیماران مبتلا به سرطان پستان واجد ژنوتیپهای ۱G/۲G و ۱G/۱G به متاستاز دچار شدند. در مقابل، این رقم در مورد بیماران واجد ژنوتیپ ۲G/۲G به ۲۶ درصد افزایش یافت.

جدول ۴- مروری بر مطالعات انجام شده بر نقش کلاژناز فیبرویلاستی در سرطانهای مختلف.

OR	(٪)					
۲/۲	۲/۲	۱/۲	۱/۱	N	جمعیت	محقق
۰/۸۰	۴۳ ۳۷	۳۷ ۵۲	۲۰ ۱۱	۱۵۰ ۱۶۳	کنترل سرطان تخمدان	**کاناموری و همکاران**
۳/۲۵	۵۰/۷ ۶۵	۳۲/۷ ۲۸	۱۶/۷ ۷	۱۵۰ ۱۰۰	کنترل کارسینومای اندومتریال	**شان و همکاران**
۱	۵۵/۴ ۵۵/۵	۳۰ ۳۴/۶	۱۴/۶ ۹/۹	۳۵۰ ۲۴۳	کنترل کارسینومای شش	**فانگ و همکاران**
۱/۳۹	۱۴/۶ ۶۱/۲	۵۵ /۴ ۲۷/۳	۳۰/۰ ۱۰/۹	۳۵۰ ۱۸۳	کنترل کارسینومای گا ستریک	**ماتسوموری و همکاران**
۰/۷۷	۲۵ ۳۰	۵۶ ۴۵	۱۹ ۲۵	۸۶ ۱۱۰	کنترل سرطان سینه	**جیلاردی و همکاران**
۲/۱۷	۲۳ ۵۹	۴۸ ۶۱	۲۹ ۳۰	۱۰۰ ۱۵۰	کنترل سرطان کولورکتال	**کوه کن و همکاران**

از طرفی محاسبات نشان دادند که افراد واجد ژنوتیپ ۲G/۲G نسبت به افراد دیگر در معرض حدود ۲/۵ برابر خطر بیشتر ابتلاء به متاستاز قرار دارند (۵/۰۷-۱/۴۵=CI_{95}و ۲/۷ =OR). از این رو می توان ادعا نمود پلی مورفیسم ۲G/۲G در پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی می تواند یک فاکتور تسهیل کننده در گسترش و متاستاز سرطان پستان محسوب گردد. نقش پلی مورفیسم ۲G/۲G پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی را در گسترش متاستاز و برگشت بیماری می توان به دلایل ذیل نسبت داد.

MMP-1 یا آنزیم کلاژناز فیبروبلاستی توسط سلولهای بنیادی توموری و فیبروبلاستی بیان می گردد و با تجزیه و تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی نه تنها سدهای فیزیکی پیش روی گسترش و تهاجم سلولهای

Archive of SID
www.SID.ir

سرطانی را بر می دارد بلکه با رهایش فاکتورهایی نظیر bFGF و IGF و فاکتورهای رگزایی مانندVEGF شرایط مناسبی را برای رشد و تغذیه توموری فراهم می سازد (۱۴، ۱۵، ۱۶، ۳۲ و ۳۳).

از طرفی این آنزیم قادر است گیرنده PAR-1 را فعال سازد. PAR-1 ، یکی از اعضای خانواده گیرنده های فعال شونده با پروتئازها (PARs)، از گیرنده های جفت شونده با G پروتئینها می باشدکه در اثر شکست در قلمرو ساختاری خارج سلولی فعال می گردد. مطالعات اخیر نشان داده اند که PAR-1 نقش مهمی در تهاجم ومتاستاز سرطانهایی نظیر سرطان پستان، کولون و شش ایفا می کند. در شرایط توموری، آنزیم کلاژناز فیبروبلاستی قادر است به طور کارآیی PAR-1 را بشکند و آن را فعال سازد. PAR-1 فعال شده سپس با G پروتئینها جفت می شود و مسیر سلولی را که منجر به تهاجم و متاستاز توموری می گردد، راه اندازی می کند (۴).

افزون بر موارد ذکر شده، ترشح آنزیمهای پروتئازی توسط Csc ها به منظور حرکت و تهاجم آنها از تومور اولیه به ارگانهای دیگر و لذا پخش آنها در بدن ضروری است(۲، ۱۹، ۲۰ و ۲۱).

بنابراین نقش آنزیم کلاژناز فیبروبلاستی در گسترش و تهاجم سرطان پستان بسیار گسترده می باشد و لذا حضور پلی مورفیسم ۲G در پروموتور ژن کلاژناز فیبروبلاستی می تواند پتانسیل تولید پروتئیناز مذکور را در شرایط توموری افزایش دهد. افزایش بیان بالقوه مذکور در کنار افزایش بیان القاء شده، می تواند نقش این آنزیم را در رشد و تهاجم توموری بسیار پر رنگ سازد. لذا، پیشنهاد می شود افراد مبتلا به سرطان پستان واجد ژنوتیپ ۲G/۲G ، با توجه به اینکه در معرض خطر بیشتر متاستاز و مرگ ناشی از انتشار سلولهای بنیادی سرطانی در بدن می باشند، تحت درمان و مراقبتهای پیگیر و دقیق قرار گرفته و در کنار شیمی درمانی از استراتژیهای درمانی مؤثر دیگری نیز در معالجه آنها استفاده شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از مدیریت تحصیلات تکمیلی و پژوهشی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایتهای مالی و سهولت در اجرای این تحقیق، و همچنین از بیمارستانهای امام خمینی تهران و سیدالشهداء اصفهان به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه خون بیماران و اطلاعات پزشکی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Arribas, J. (2005) Matrix metalloproteinase and tumor invasion. Clin. Implication of Basic Res., 19:2020-2022.

2. Beate, H., Hattori, K. and Dias, S. (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand. Cell, 109:625–637.

3. Biondi, M. L., Torri, O., Leviti, S., Seminati, R., Cecchini, F., Bernini, M., Ghilardi, G. and Guagenellini, E. (2000) MMP-1 and MMP-3 polymorphism in promoter region and cancer. Clin. Chem., 46: 2023-2024.

4. Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S. and Kuliopulos, A. (2005) PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. Cell, 120:303-313.

5. Brinckerhoff, C. E., Rutter, J. L., and Benbow, U. (2000) Interstitial collagenase as marker of tumor progression. Clin. Cancer Res., 6: 4823-4830.

6. Charles, S. (2003) Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. Curr. Opin. Cell Biol., 11: 634-640.

7. Chambers, A. F. and. Matrisian, L. A. (1997) Changing views on the role of matrix metalloproteinases in metastasis. J. Natl. Cancer Inst., 89: 1260-1270.

8. Folgueras, A. R., Pendás, A. M., Sánches, L. M. and López, C. (2004) Matrix metalloproteinases in cancer: from new function to improved inhibition strategies. Int. J. Dev. Biol., 48:411-424.

Archive of SID
www.SID.ir

9. Fong, Y., Datton, C., Cha, E., Sim, H. and Scully, P. (2004) Absence of a correlation between the presence of a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase 1 promoter and outcome in patients of chondrosarcoma. Clin. Cancer Res., 10: 739-7334.

10. Fridman, R. (2006) Metalloproteinases and cancer. Cancer and Metastasis Rev., 25:7-8.

11. Ghilardi, G., Biondi, M. L., Mangoni, J., Leviti, S., DeMonti, M., Guagnellini, E. and Scorza, R. (2001) Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. Clin. Cancer Res., 7: 2344-2346.

12. Ghilardi, G., Biondi, M. L., Mangoni, J., Leviti, S., DeMonti, M., Guagnellini, E. and Scorza, R. (2002) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase -3 promoter enhances breast cancer susceptibility. Clin. Cancer Res., 8: 3820-3823.

13. Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B. and King, M. C. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science., 250: 1684–1689.

14. Hijova, E. (2005) Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. Bratisl. Lek. Listy., 131: 127-132.

15. Johansson, N., Ahonen, M. and Kähäri, V. –M. (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion. Cell Mol. Life Sci., 57: 5-15.

16. John, A. and Tuszynsky, G. (2001) The role of matrix metalloproteinase in tumor angiogenesis and tumor metastasis. Pathol. Oncol. Res., 1: 14-23.

17. Kanamori, Y., Matsushima, M., Minaguchi, T., Kobayashi, K., Sagae, S., Kudo, R., Terakawa, N. and Nakamura, Y (1999) Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. Cancer Res., 59: 4225-4227.

18. Kouhkan, F,. Motovali-Bashi, M. and Hojati, Z. (2008) The Influence of Interstitial Collagenas-1 Genotype Polymorphism on Colorectal Cancer Risk in Iranian Population. Cancer Inves., 26:836-842.

19. Kucia, R., Reca, K. and Miekus, M. (2005) Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1–CXCR4. Stem Cells, 23:879–894.

20. Levina1, V., Marrangoni1, A. M. and DeMarco1, R. (2008) Drug-selected human lung cancer stem cells: Cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. PLoS ONE, 3:1-16.

21. Li, F., Tiede, B., Massagué, J. and Kang, Y. (2007) Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. Cell Res., 17: 3–14.

22. Malone, K. E., Daling, J. R., Thompson, J. D., O'Brien, C. A., Francisco, L. V. and Ostrander, E. A. (1998) BRCA1 mutations and breast cancer in the general population. Analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. JAMA; 279:922-9.

23. Matsumura, S., Oue, N. and Kitadai, Y. (2004) A single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter is correlated with histological differentiation of gastric cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 10: 146-152.

24. Miller, S. A., Dybes, D. D. and Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res., 16: 1215.

25. Newman, B., Mu, H., Butler, L. M., Milliken, R. C., Moorman, P. G. and King, M.C. (1998) Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. JAMA; 279:915-21.

26. Paroah, P. D., Day, N. E., Duffy, S., Easton, D. F. and Ponder,B.A.J. (1997) Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Int. J. Cancer, 71: 800–809.

27. Peto, J., Easton, D. F., Matthews, F. E., Ford, D. and Swerdlow, A. J. (1996) Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS study. Int. J. Cancer, 65:273–283.

28. Riyad, B., Abdelbaset, B., Raija, R., Kari, S., Seppo, P. (2007) MMP-1 (collagenase-1) expression in primary colorectal cancer and its metastases. Scandinavian J. of Gastroentero., 42:1473–8.

29. Rundhaug, J. E. (2005) Matrix metalloproteinase and angiogenesis. J. Cell. Mol. Med., 9: 267-285.

30. Rutter, J. L., Mitchell, T. I., Buttice, G., Meyers, J., Gusella, J. F., Ozelius L. J., and Brinckerhoff, C. E. (1998) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. Cancer Res., 58: 5321-5325.

31. Shan, K., Ying, W., Jian- Hui, Z., Wei, G., Wang, Na. and Yan, L. (2005) The function of the SNP in the MMP1 and MMP3 promoter in susceptibility to endometriosis in china. Mol. Hum. Reproduction., 6: 423-4327.

Archive of SID
www.SID.ir

32. Shapiro, S. D. (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr. Opin. Cell Biol., 10:602-608.

33. Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 17: 463–516.

34. Su, L., Zhou, W., Park, S., Wain, J., Lynch, T. and Liu, G. (2005) Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Prev., 14: 567-70.

35. Sun, Y., Sun, Y., Wenger, L., Rutter, J. L., Brinckerhoff, C. E. and Cheung, H. S. (1999) p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene expression. J. Biol. Chem., 274:11535–40.

36. Sun, Y., Zeng, X. R., Wenger, L., Firestein, G. S. and Cheung, H. S. (2004) P53 down-regulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. J. Cell Biochem., 92:258–69.

37. Tower, G. B., Conn, C., I., Belguise, K., Dany, C. and Brinkerhoff, C. E. (2003) Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism (ETS site) in the MMP-1 promoter. Eur. Biochem. 270: 4216-4225.

38. Vinkenti, M. P. and Brinckerhoff, C. I. (2001) Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene- specific transcription factors. Arthritis Res., 4: 157-164.

39. Vincenti, M. P., White, L. A., Schroen, D. J., Benbow, U. and Brinckerhoff, C. E. (1996) Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp., 6:391-411.

40. Visse, F., Nagase, H. (2003) Structure and function of MMPs and TIMPs. Circulation Res., 92:827-839.

41. Westermarck, J. and Kähäri, V. M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J., 13:781-792.

42. Ye, S., Dhillon, S., Turner, S. J., Bateman, A. C., Theaker, J. M., Pickering, R. M., Day, I. and Howell, W. M. (2001) Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism. Cancer Res., 61: 1296-1298.

43. Zhu, Y., Spitz, M. R., Lei, L., Mills, G. B. and Wu, X. (2001) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. Cancer Res., 61: 7825-7829.

Archive of SID

www.SID.ir

The role of SNP in fibroblast collagenase gene with increasing of metastasis risk and viability reduction in breast cancer patients

Motovali-Bashi M., Kouhkan F. and Hojati Z.

Genetic division, Biology dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Today, role of cancer stem cells as a basic and original factor in cancer metastasis is discussed. Cancer stem cells secret different materials such as protease enzymes. Interstitial collagenase or fibroblast collagenase is a member from large family of protease enzymes destroying basic membrane and extracellular matrix. Therefore, it is not only facilitates progression of cancer cells but also having key role in cancer cell viability through releasing of growth and angiogenesis factors. Insertion of a guanine nucleotide at the position of -1607 introduces a binding site for ETS transcriptional factor in the promoter of the gene. Binding ETS to the 2G polymorphism allele would be increased expression of fibroblast collagenase gene which it could be progressed releasing of cancer stem cells, and therefore, it could be facilitated metastasis. Goal of this study is valuation of association between the 2G/1G polymorphism with progression and metastasis of breast cancer, and also patient viability. Blood samples of 200 cases and 100 controls were collected from two capital cities, Tehran and Isfahan; equally. Samples were genotyped using PCR-RFLP method. Statistical analyses show that 2G/2G genotype frequency is much more in cases rather than controls (29.5% compare with 23%). Patients were divided into two groups of with metastatic activity (M^+) and without metastatic activity (M^-). The 2G/2G genotype was more frequent in M^+ group compared with control group (OR = 2.03, $CI_{95\%}$ = 1.05–3.94). In next step, patients without metastasis were followed up for 32 months. Three years total viability analyses in patients who carrying the 2G/2G genotype in comparing with other patients showed no significantly difference. However rate of cancer special viability and viability without disease in the two groups were statistically significant. In conclusion, to our knowledge, the present epidemiological study for the first time indicates that the 2G/2G genotype polymorphism could be a facilitated factor for progression and metastasis of breast cancer and causing of viability reduction in patients.

Keywords: Cancer stem cells, Collagenase fibroblast, Viability rate, Metastasis, Breast cancer

Archive of SID

www.SID.ir