

ارتباط پلی مورفیسم گیرنده ی ۱ آدیپونکتین ۲۲۷۵۷۳۸ rs با سرطان روده ی بزرگ

خانن کریمی*، مارال ارکانی*، اکرم صفائی**، محسن واحدی***، دکتر سیدرضا محبی****
دکتر سیدرضا فاطمی*****، دکتر محمد وفایی*****، دکتر محمدرضا زالی*****

دریافت: ۹۰/۷/۲۸، پذیرش: ۹۱/۲/۱۸

چکیده:

مقدمه و هدف: آدیپونکتین، فعالیت ضد سرطانی خود را از طریق اتصال به گیرنده اش انجام می دهد. مطالعات نشان داده اند که پلی مورفیسم در گیرنده آدیپونکتین باعث مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و سرطان روده ی بزرگ می شود. هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان شیوع آلل موتانت پلی مورفیسم گیرنده ی ۱ آدیپونکتین ۲۲۷۵۷۳۸ rs در یک جمعیت از ایران و بررسی نقش این پلی مورفیسم در افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ است.

روش کار: مطالعه انجام شده از نوع مورد-شاهدی بود. با استفاده از روش PCR-RFLP، ۱۰۶ نفر بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ و ۱۰۶ نفر گروه شاهد تعیین ژنوتایپ شدند. جهت تحلیل آماری و محاسبه ی نسبت شانس و فاصله ی اطمینان از آزمون مجذور کای و نرم افزار SPSS ۱۶ استفاده شد.

نتایج: فراوانی ژنوتایپ های CC,CT,TT برای ADIPOR1 rs ۲۲۷۵۷۳۸ در بیماران به ترتیب ۲۷/۴، ۵۰، ۲۲/۶ درصد بود. فراوانی ژنوتایپ های CC,CT,TT برای ADIPOR1 rs ۲۲۷۵۷۳۸ در گروه شاهد به ترتیب ۲۲/۶، ۳۶/۸، ۴۰/۶ درصد مشاهده شد. فراوانی آلل های C، T به ترتیب ۴۱٪ و ۵۹٪ در شاهدان و ۴۷/۶٪ و ۵۲/۴٪ در بیماران تعیین گردید شیوع آلل موتانت در دو جمعیت بیمار و شاهد اختلاف معنی داری نشان داد (۱/۵۷ = نسبت شانس، ۲/۳۱ - ۱/۰۷ = فاصله اطمینان ۹۵٪، P=۰/۰۱). ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم گیرنده ی ۱ آدیپونکتین و افزایش ریسک ابتلا به سرطان روده بزرگ مشاهده شد (P=۰/۰۱).

نتیجه نهایی: نتایج مطالعه ی حاضر نشان می دهد که پلی مورفیسم در گیرنده ی آدیپونکتین، می تواند فاکتور مستعد کننده برای ابتلا به سرطان روده ی بزرگ باشد.

کلید واژه ها: پلی مورفیسم / ژن گیرنده ی آدیپونکتین / سرطان کولون و راست روده

مقدمه:

سیگار کشیدن، کم تحرکی، مصرف الکل و چاقی (۱). در کنار این عوامل از نقش فاکتور های ژنتیکی در گسترش بدخیمی های روده ی بزرگ نمیتوان چشم پوشی کرد. پاتوژنز کارسینومای کلورکتال، پیچیده و چند عاملی است و بدیهی است که چندین ژن در مسیر های ژنتیکی

سرطان روده بزرگ بیماری است که در آن، سلولهای بدخیم (سرطانی) در بافت روده بزرگ تشکیل می شوند. عوامل متعددی در ایجاد و گسترش سرطان روده ی بزرگ دخالت دارد؛ سن، رژیم غذایی، سابقه خانوادگی افراد،

* کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
** کارشناسی ارشد ژنتیک مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (akramsafaei.134@gmail.com)
*** کارشناسی ارشد آمار زیستی مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
**** دکتری ویروس شناسی پزشکی مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
***** دانشیار گروه داخلی مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
***** متخصص جراحی عمومی
***** استاد گروه داخلی مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

اتانول انجام شد و روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتایپ، به کار گرفته شد. پرایمرهای به کار گرفته شده در این آزمایش، پرایمر پیش برنده 3' tttgtggaagactctggctggt 5' و پرایمر معکوس 3' ttagtgaggcttctggtaaagggtgacatt 5' برای تکثیر قطعه ۳۰۰ bp بودند (۸). شرایط PCR برای یک واکنش با حجم ۲۵ μl به این شرح بود: DNA ۱ μl ژنومی (۱۰۰ ng)، ۲۰ μl از هر پرایمر، ۰/۲ mmol از tag پلیمر از ۲ mM، d NTP، ۲ mM، MgCl₂ از ۰/۲ μl استفاده شد. (مواد مذکور از شرکت کیژن تهیه شد). برنامه ی PCR، شامل ۳۵ سیکل با برنامه ۱۰ دقیقه ۹۳ درجه، ۴۵ ثانیه ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه ۵۸ درجه، ۴۵ ثانیه ۷۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه بود. بعد از انجام PCR، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، تمامی نمونه ها روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردیدند، سپس باقیمانده محصول جهت هضم آنزیمی به مدت ۳ ساعت در مجاورت آنزیم MSL I قرار گرفت. آنزیم در دمای ۶۰ درجه غیر فعال می شود. پس از اتمام مدت انکوباسیون، محصولات مجدداً روی آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و مورد بررسی قرار گرفتند. باندهای مشاهده شده شامل: سه باند ۲۰، ۱۸۰، ۳۰۰، که نشان دهنده نوع هتروزیگوت، دو باند ۱۸۰، ۲۰۰، ۱۸۰ bp نشان دهنده هموزیگوت موتانت و تک باند ۳۰۰ bp نشان دهنده هموزیگوت طبیعی بود.

از تست χ^2 به منظور بدست آوردن اختلاف فراوانی آلی بین گروه های بیمار و شاهد و تجزیه و تحلیل متغیرهای گروه بندی شده استفاده شد. با استفاده از آنالیز آماری رگرسیون لجستیک، نسبت شانسی (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) محاسبه و ارتباط بین پلی مورفیسم و بیماری مشخص گردید. آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SPSS ۱۶ انجام و احتمال کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

ژنوتیپ افراد مورد مطالعه در دو گروه بیمار و شاهد بر حسب جنسیت در جدول ۱ مشاهده می شود.

جدول ۱: توزیع ژنوتیپ افراد مورد مطالعه بر اساس جنسیت

| | ژنوتیپ بیماران | | | ژنوتیپ شاهدان | | | |
|-----|----------------|----|----|---------------|----|----|--|
| | TT | CT | CC | TT | CT | CC | |
| مرد | ۱۷ | ۲۵ | ۸ | ۱۱ | ۱۴ | ۲۷ | |
| زن | ۱۲ | ۲۸ | ۱۶ | ۱۷ | ۲۵ | ۸ | |

TT: هموزیگوت موتانت، CT: هتروزیگوت، CC: هموزیگوت طبیعی

در پیشرفت و توسعه ی سرطان دخالت دارد (۲،۳). یکی از پروتئین هایی که به عنوان آنتی - تومور مطرح می شود، آدیپونکتین است. آدیپونکتین با اتصال به گیرنده اش باعث فعال شدن کاسپازهای ۸ و ۹ و ۳ (که در مرگ برنامه ریزی شده ی سلول نقش دارند) می شود (۴) -۲ از رشد و تکثیر سلولی جلوگیری می کند (۴) -۳ آدیپونکتین باعث افزایش سطح بیان پروتئین BCL-2 (پروتئینی که در مرگ برنامه ریزی شده سلول نقش دارد) می شود (۵). پلی مورفیسم در گیرنده آدیپونکتین باعث کاهش بیان این گیرنده شده (۶) که رابطه ی معناداری با مقاومت به انسولین (۷،۸) و سرطان روده ی بزرگ دارد (۸). گیرنده آدیپونکتین ۱ روی بازوی بزرگ کروموزوم ۱ واقع شده (1q 32.1) و ۱۷ kb را به خود اختصاص داده است (۷). در گیرنده آدیپونکتین rs2275738 (NM_015999/3) در اینترون شماره ۱ (-۱۰۶)، تیمیدین جایگزین سیتوزین می شود؛ هتروزیگوسیتی پلی مورفیسم گیرنده ی مذکور ۰/۴۹ گزارش شده است (۹).

از آنجایی که کاهش بیان گیرنده ی ۱ آدیپونکتین با افزایش مقاومت به انسولین مرتبط است (۱۰-۱۲) لذا این مطالعه با هدف ارزیابی نقش پلی مورفیسم ژن گیرنده آدیپونکتین rs 2275738 در افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ (CRC) و اندازه گیری میزان شیوع این پلی مورفیسم انجام شد.

روش کار:

در این مطالعه مورد-شاهدی، به تمامی ۱۰۶ بیمار و ۱۰۶ فرد گروه شاهد در مورد نحوه ی استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن شرکت در این مطالعه توضیح داده شد و از داوطلبین شرکت در مطالعه، رضایت نامه ی آگاهانه ی کتبی اخذ گردید. با استفاده از فرمول تعیین حجم نمونه تعداد ۱۰۷۴ نفر بدست آمد اما با توجه به مشکلات اجرایی در جمع آوری نمونه ها آزمایش های مربوطه روی ۱۰۶ بیمار و ۱۰۶ شاهد انجام شد (۱۳) از تمامی بیماران و شاهدان، نمونه ی خون محیطی به میزان ۱۰ سی سی جهت انجام آزمایشات ژنتیکی اخذ شد و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. در مورد افراد بیمار و شاهد اطلاعاتی شامل وضعیت استعمال دخانیات، سن و جنسیت تهیه گردید. نمونه های مورد استفاده در این مطالعه طی سالهای ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۹، جمع آوری شدند. استخراج DNA با روش فنل- کلروفورم و رسوب گیری با

بحث:

تاکنون مطالعات کمی در ارتباط با پلی مورفیسم در ژن گیرنده ی ۱ آدیپونکتین و سرطان روده ی بزرگ گزارش شده است. در مطالعه ی حاضر نشان داده شد که پلی مورفیسم در ژن گیرنده ی ۱ آدیپونکتین عامل مستعد کننده برای افزایش خطر ابتلا به سرطان روده ی بزرگ به شمار می آید؛ از آنجا که کاهش بیان در ژن گیرنده ی ۱ آدیپونکتین با ایجاد مقاومت به انسولین (۱۲) و چاقی (۱۴) مرتبط است؛ ارتباط بین پلی مورفیسم مذکور (که باعث کاهش بیان گیرنده ی ۱ آدیپونکتین می شود) با سرطان روده ی بزرگ چندان دور از انتظار نیست. فرضیه ای که برای علت همبستگی مستقیم بین سرطان روده ی بزرگ و پلی مورفیسم در ژن گیرنده ی آدیپونکتین وجود دارد این است که، پلی مورفیسم در ژن گیرنده ی ۱ آدیپونکتین باعث کاهش بیان این پروتئین می شود (۶) و در نتیجه اثر ضد سرطانی آدیپونکتین روی سلول ها کمتر القا می شود. بر طبق نتایج حاصل از مطالعه لیو و همکارانش پلی مورفیسم در ژن ADIPOQR1 باعث افزایش احتمال خطر ابتلا به سرطان روده ی بزرگ می شود. همچنین، این مطالعه نشان داد که فاکتور های محیطی مثل سیگار کشیدن، تاریخچه ی خانوادگی سرطان، مصرف الکل و BMI همراه با پلی مورفیسم گیرنده ی آدیپونکتین تاثیر بسزایی در افزایش خطر ابتلا به سرطان روده ی بزرگ دارد این مطالعه بر ارتباط ژن- محیط و تاثیر آن بر بیماری اشاره دارد (۱۵).

کاکلامن و همکارانش نشان داده اند که کاهش سطح بیان گیرنده ی ۱ آدیپونکتین به دلیل پلی مورفیسم در ژن آن با سرطان سینه (۱۶) سرطان پروستات (۱۷) و سرطان روده ی بزرگ (۸) مرتبط است.

اوتانی و همکارانش نشان دادند که سطح m RNA ی گیرنده های آدیپونکتین در سلول های سرطانی نسبت به سلول های سالم کمتر میشود (۱۸) این در حالی است که بیون و همکارانش نشان دادند که بیان زیاد گیرنده آدیپونکتین در پیشرفت سرطان روده ی بزرگ موثر است (۱۹). در مطالعه ای در چین در سال ۲۰۱۱، ثابت شد که پلی مورفیسم در ژن گیرنده ی ۱ آدیپونکتین اثر محافظت کننده ی در برابر سرطان روده ی بزرگ دارد (۲۰).

همانطور که مشاهده می شود نتایج متفاوتی در مطالعات گوناگون بدست آمده است. این اختلاف در یافته ها

فراوانی ژنوتیپ های CC,CT,TT برای rs ۲۲۷۵۷۳۸ ADIPOR1 در بیماران به ترتیب ۲۷/۴، ۵۰، ۲۲/۶ درصد بود. فراوانی ژنوتیپ های CC,CT,TT در گروه شاهد به ترتیب ۲۲/۶، ۳۶/۸، ۴۰/۶ درصد مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج نهایی حاصل از بررسی پلی مورفیسم آدیپونکتین rs ۲۲۷۵۷۳۸ و سرطان روده ی بزرگ در دو گروه بیمار و شاهد

| پلی مورفیسم ژن گیرنده آدیپونکتین rs ۲۲۷۵۷۳۸ | | شاهدان | | بیماران | | نسبت | | فاصله | |
|---|-------|-------------|-----------|-------------|------------|--------------------------------|-----|--------|-----|
| | | تعداد(درصد) | | تعداد(درصد) | | شانس ^a اطمینان(۹۵٪) | | ارزش P | |
| ژنوتایپ | ۰/۰۱۷ | ۴۳(۴۰/۶) | ۲۴(۲۲/۶) | ۱* | --- | --- | --- | --- | --- |
| CC | --- | ۳۹(۳۶/۸) | ۵۳(۵۰) | ۲/۷۳ | ۱/۳۶-۵/۴۶ | ۰/۰۴ | --- | --- | --- |
| CT | --- | ۲۴(۲۲/۶) | ۲۹(۲۷/۴) | ۱/۹۵ | ۰/۸۹-۴/۲۵ | ۰/۰۹ | --- | --- | --- |
| TT | --- | ۶۳(۵۹/۴) | ۸۲(۷۷/۴) | ۲/۳۳ | ۱/۲۸-۴/۲۳ | ۰/۰۵ | --- | --- | --- |
| CT&TT | --- | ۱۲۵(۵۹) | ۱۰۱(۴۷/۶) | ۱* | --- | --- | --- | --- | --- |
| مقایسه فراوانی آلی | --- | ۸۷(۴۱) | ۱۱۱(۵۲/۴) | ۱/۵۷ | ۱/۰۷۳-۲/۳۱ | ۰/۰۱۹ | --- | --- | --- |
| C | --- | | | | | | | | |
| T | --- | | | | | | | | |

^a تطبیق یافته با سن و جنس * فرنیس در نظر گرفته شده است

فراوانی آلل های C، T، به ترتیب ۴۱٪ و ۵۹٪ در گروه شاهد ۵۲/۴٪ و ۴۷/۶٪ در بیماران تعیین گردید؛ علاوه بر این مشخص شد که ژنوتیپ CT با افزایش سرطان روده بزرگ ارتباط معناداری دارد (OR=۲/۷۳ CI=۱/۳۶-۵/۴۶) (P=۰/۰۴). براساس نتایج این مطالعه هیچ ارتباط معناداری بین ژنوتیپ موتانت TT و سرطان روده ی بزرگ یافت نشد (P=۰/۰۹ OR= ۱/۹۵ CI=۰/۸۹-۴/۲۵)؛ شیوع آلل موتانت در دو جمعیت بیمار و شاهد اختلاف معنی دار نشان داد (P=۰/۰۱۹).

در مطالعه ی حاضر نسبت مرد به زن در گروه بیمار ۰/۸۹ و در گروه شاهد ۰/۹۶ بود. اکثر افراد در دو گروه بیمار و شاهد غیر سیگاری بودند (جدول ۳).

جدول ۳: مشخصات گروه های بیمار و شاهد مورد مطالعه

| بیماران | شاهدان | میانگین سن(سال) |
|-------------|-------------|--------------------------------|
| (تعداد=۱۰۶) | (تعداد=۱۰۶) | جنسیت تعداد (درصد) |
| ۵۴/۵۹±۱۲/۷۳ | ۴۴/۰۷±۱۷/۵۵ | مرد |
| ۵۰ (۴۷/۰) | ۵۲(۴۹/۶) | زن |
| ۵۶ (۵۲/۰) | ۵۴ (۵۰/۰) | وضعیت سیگار کشیدن تعداد (درصد) |
| ۸۹(۸۴/۰) | ۸۸(۸۳) | افراد غیر سیگاری |
| ۳ (۲/۸) | ۱ (۰/۹) | افراد با استعمال قبلی سیگار |
| ۱۴(۱۳/۲) | ۱۷ (۱۶/۲) | افراد سیگاری |

- and adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) genes and colorectal cancer risk. *JAMA* 2008; 300: 1523-31.
9. Collins S, Luan A, Thompson D, Daly A, Semple R, Rahilly S. Adiponectin receptor genes: mutation screening in syndromes of insulin resistance and association studies for type 2 diabetes and metabolic traits in UK populations. *Diabetologia* 2007; 50: 555-62.
 10. Hara K, Boutin P, Mori Y. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002;51(2):536-540.
 11. Menzaghi C, Ercolino T, Di PR. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002;51(7):2306-12.
 12. Heid IM, Wagner SA, Gohlke H. Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes* 2006;55(2):375-84.
 13. Potapov V, Chistiakov D, Dubinina A, Shamkhalova M, Shestakova M. Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to type 2 diabetes and insulin resistance-related phenotypes. *Rev Diabet Stud* 2008; 5: 28-37.
 14. Wade TE, Mathur A, Lu D, Swartz-Basile DA, Pitt HA, Zyromski NJ. Adiponectin receptor-1 expression is decreased in the pancreas of obese mice. *J Surg Res* 2009;154:78-84.
 15. Liu L, Zhong R, Wei S, Yin JY, Xiang H, Zou L, et al. Interactions between genetic variants in the adiponectin, adiponectin receptor 1 and environmental factors on the risk of colorectal cancer. *PLoS One* 2011;6:27301-8.
 16. Kaklamani V, Sadim M, Hsi A, Offit K, Oddoux C, Ostrer H. Variants of the adiponectin and adiponectin receptor 1 genes and breast cancer risk. *Cancer Res* 2008;68: 3178-82.
 17. Kaklamani V, Yi N, Zhang K, Sadim M, Offit K. Polymorphisms of ADIPOQ and ADIPOR1 and prostate cancer risk. *Metabolism* 2011; 60: 1234-1243.
 18. Otani K, Kitayama J, Kamei T, Soma D, Miyato H, Yamauchi T, et al. Adiponectin receptors are downregulated in human gastric cancer. *J Gastroenterol* 2010; 45:918-27.
 19. Byeon JS, Jeong JY, Kim MJ, Lee SM, Nam WH, Myung SJ. Adiponectin and adiponectin receptor in relation to colorectal cancer progression. *Int J Cancer* 2010;127: 2758-67.
 20. He B, Pan Y, Zhang Y, Bao O, Chen L, Nie Z, et al. Effects of genetic variations in the Adiponectin pathway genes on the risk of colorectal cancer in the Chinese population. *BMC Med Genet* 2011;12:94-8.

می تواند به اختلاف نژادی مربوط باشد و یا فاکتور های محیطی متفاوت که افراد جامعه با آن مواجهند. از طرفی، در مسیر های بیوشیمیایی ممکن است پروتئینی مشابه از نظر عملکرد با پروتئین معیوب، نقصان فعالیت آن را جبران کند و یا حداقل عملکرد پروتئین معیوب برای پیشبرد مسیر کافی باشد. در مطالعه ی حاضر با محدودیت هایی روبه رو بودیم، از جمله ی این محدودیتها می توان به تعداد کم نمونه های مورد بررسی به دلیل محدودیت های اجرایی اشاره کرد، لذا انجام مطالعات مشابه با تعداد نمونه ی بیشتر پیشنهاد می شود.

نتیجه نهایی:

به طور کلی، بر اساس یافته های این مطالعه، بین بروز سرطان کولورکتال و پلی مورفیسم ژن گیرنده ی ۱ آدیپونکتین رابطه ی مستقیم وجود دارد.

منابع:

1. Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980; 9:227-31.
2. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995 ; 87(4): 265-73.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
4. Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 24; 101:2476-81.
5. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; 96:1723-32.
6. Soccio T, Zhang Y, Bacci S, Mlynarski W, Placha G, Raggio G. Common haplotypes at the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 2006 ; 55 : 2763-70.
7. Potapov VA, Chistiakov DA, Dubinina A, Shamkhalova MS, Shestakova MV, Nosikov VV. Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to type 2 diabetes and insulin resistance-related phenotypes. *Rev Diabet Stud* 2008;5:28-37.
8. Kaklamani V, Wisinski KB, Sadim M, Gulden C, Do A. Variants of the adiponectin (ADIPOQ)