

تأثیر ژنوتیپ های پلی مورفیسم C>T 61968 ژن گیرنده ویتامین D و سرطان روده بزرگ

مهدی منتظر حقیقی*، دکتر سیدرضا محبی**، محمدامین پورحسینقلی***، دکتر سیدرضا فاطمی****
آتنا ایرانی شمیرانی*****، دکتر محمدرضا زالی*****

دریافت: ۸۸/۵/۲۳ ، پذیرش: ۸۸/۱۰/۷

چکیده:

مقدمه و هدف: میزان بیان ژن گیرنده ویتامین D (VDR) در تنظیم رشد و تکثیر سلولی دخالت دارد. بنابراین این ژن ممکن است در ایجاد سرطان و از جمله سرطان روده بزرگ نقش داشته باشد. در این میان پلی مورفیسم های یک ژن می توانند در عملکرد آن ژن تاثیر گذار باشند. یکی از پلی مورفیسم های مهم در این ژن، پلی مورفیسم C>T 61968 می باشد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین ارتباط این پلی مورفیسم و سرطان روده بزرگ می باشد.

روش کار: در این مطالعه مورد-شاهدی تعداد ۱۳۰ نمونه بیمار و ۱۳۰ نمونه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و چند شکلی طولی قطعات برش یافته (RFLP) به منظور ارزیابی ژنوتیپ ها انجام گرفت.
نتایج: فراوانی ژنوتیپ های CT و TT به ترتیب در گروه کنترل ۱۰٪، ۳۱/۵٪ و ۵۸/۵٪ و در گروه بیماران ۳۷/۷٪، ۱۵/۴٪ و ۴۶/۹٪ می باشند. همچنین فراوانی آلل های T, C به ترتیب ۳۹/۳٪ و ۶۰/۷٪ در کنترل ها و ۳۴/۲٪ و ۶۵/۸٪ در بیماران تعیین گردید. بین ژنوتیپ CT و سرطان روده بزرگ ارتباط معنی داری یافت شد $OD = ۰/۴۴۹$ ($CI = 95\% - ۰/۲۵۷ - ۰/۷۸۳$) و بین ژنوتیپ CC و این سرطان ارتباط معنی دار وجود نداشت $OD = ۰/۹۹۶$ ($CI = 95\% - ۰/۴۳۳ - ۲/۲۸۹$) $P = ۰/۰۰۵$ و $P = ۰/۹۹۲$.

نتیجه نهایی: یافته های این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ CC و سرطان روده بزرگ وجود ندارد. در حالیکه ژنوتیپ CT همبستگی معکوس معنی داری با سرطان کولورکتال را مشخص کرد. نتایج حاصل از مطالعات قبلی در جمعیت های دیگر نیز این یافته ها را تایید می کنند.

کلید واژه ها: پلی مورفیسم / سرطان روده بزرگ / گیرنده های ویتامین D

مقدمه:

ویتامین D یک هورمون استروئیدی است که کارایی بیولوژیکی آن از طریق فعال کردن متابولیت $\alpha 1$ و 25 دی هیدروکسی ویتامین D₃ می باشد. فعالیت آن احتیاج به اتصالش به رسپتور ویتامین D دارد. ژن رسپتور ویتامین D (OMIM 601769) دارای چندین پلی مورفیسم ژنتیکی است که ارتباط آنها با خطر ابتلا به چند سرطان مشخص شده است. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۲ (12q13.1) قرار گرفته و دارای ۹ اگزون می باشد. VDR

سرطان کولورکتال بعد از سرطان ریه بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان ها را در هر دو جنس به خود اختصاص داده است. در سال ۲۰۰۲ میزان شیوع ثبت شده این سرطان در اروپا ۳۷۱۷۰۶ بوده است یعنی ۵/۱٪ کل سرطانها و ۲۰۳۲۹۶ مورد مرگ یعنی ۲/۸۱٪ تمام مرگهای مرتبط با سرطانها را شامل می شود (۱). بروز این سرطان در دهه های اخیر در کشور ما نیز افزایش داشته است (۲).

* دانشجوی دوره دکتری ژنتیک مولکولی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (mah_haghighi@hotmail.com)

** متخصص ویروس شناسی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** دانشجوی دوره دکتری آمار زیستی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

**** استادیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

***** کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

***** استاد مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

کسانی انتخاب شدند که دارای نتایج کولونوسکوپی و پاتولوژی منفی برای سرطان روده بزرگ بودند. به کلیه افراد در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت یا عدم شرکت در این مطالعه، توضیح داده شد و از داوطلبین شرکت در مطالعه، رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. فرم رضایت‌نامه اخلاقی شرکت افراد در مطالعه، توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تصویب قرار گرفت. کلیه بیماران توسط پزشک آموزش‌دیده، مشاوره شدند و اطلاعات کلینیکی و شرح حال از ایشان کسب گردید و در فرم‌های اطلاعاتی مربوطه وارد شد. از تمامی بیماران و کنترل‌ها، نمونه خون محیطی به میزان پنج سی سی جهت انجام آزمایشات ژنتیکی PCR-RFLP و الکتروفورزیس گرفته شد.

DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد فنل کلروفورم از خون محیطی استخراج شد. توالی پلی مورفیسم TaqI (rs731236) با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی

5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' و

5'-GCAACTCCTCATGGGCTGAGGTCTCA-3'

انجام شد. شرایط و برنامه PCR در جدول ۱ خلاصه شده است.

| زمان | دما (درجه سانتیگراد) |
|----------|----------------------|
| ۱۰ دقیقه | ۹۳ |
| ۳۰ سیکل | |
| ۴۵ ثانیه | ۹۳ |
| ۳۰ ثانیه | ۶۶ |
| ۴۵ ثانیه | ۷۲ |
| ۱۰ دقیقه | ۷۲ |

محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدود الاثر TaqI در دمای C ۶۵ به مدت ۲۴ ساعت هضم شدند. با توجه به اینکه برای این آنزیم دو جایگاه برش در قسمت تکثیر شده وجود دارد بنابراین در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت برای جایگاه مورد نظر، حاصل از RFLP سه قطعه به طول های ۲۰۵bp و ۲۹۰bp و ۲۴۵ bp خواهد بود. ولی در افراد هموزیگوت برش داده نشده برای جایگاه SNP فوق، دو قطعه ۴۹۵bp و ۲۴۵ bp مشاهده می شود و در افراد هتروزیگوت ۴ قطعه bp (۲۰۵، ۲۴۵، ۲۹۰ و ۴۹۵) حاصل می شود. آنالیز تمام محصولات RFLP بر روی ژل ۲ درصد

ژن نسبتاً بزرگ با اندازه ای در حدود ۱۰۰ Kbp می باشد و پروموتور قوی آن توانایی تولید چندین رونوشت را در بافتهای اختصاصی دارد (۳) نقش اصلی این ژن در مسیرهای متعدد متابولیسمی و بیولوژیکی مختلف مثل جذب کلسیم، متابولیسم استخوان، تمایز و تکثیر سلولهای ایمنی، سرطانزایی و آپوپتوز گزارش شده است (۴،۵) همچنین در سیستم درون ریز نشان داده شده که ویتامین D در تعدادی از مسیرهای درون ریز همانند متابولیسم کلسیم، تنظیم رشد و تمایز سلولی دخیل است (۶) بنابراین با توجه به اثر پلیوتروپیک (یک ژن با چندین فنوتیپ) این ژن انتظار می رود که پلی مورفیسم های ژن VDR با بیماریها و فنوتیپهای مختلف همبستگی داشته باشد.

پروتئین VDR با گیرنده رتینوئید X یک هتروداپمر تشکیل می دهد و این هتروداپمر به عناصر پاسخ دهنده به ویتامین D در ناحیه پروموتوری ژنهای هدف (دخیل در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی نظیر تکثیر، تمایز و مرگ سلولی) سلولهای کولون، استخوان، غدد پستانی و غده پروستات متصل می شود (۷). نقش واسطه ای ژن VDR در ابتلا به سرطان روده بزرگ می تواند بصورت مستقل یا همراه با ویتامین D و جذب کلسیم باشد (۸). افزایش سطح ویتامین D با کاهش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ همراه است و ویتامین D سبب کاهش تکثیر و افزایش در تمایز در سلولهای روده بزرگ می شود. بنابراین ویتامین D به عنوان یک عامل موثر در جلوگیری از سرطان روده بزرگ از طریق مکانیسم های مرتبط با گیرنده ویتامین D عمل می کند (۸). در مراحل اولیه سرطان زایی روده بزرگ سطح mRNA و میزان پروتئین ژن VDR افزایش می یابد که با عدم تمایز مستمر همراه است. در حالیکه در اواخر مراحل سرطانزایی میزان ناچیزی از mRNA قابل تشخیص است. این یافته ها منجر به این پرسش می شود که آیا پلی مورفیسم های مختلف ژن VDR می توانند در مستعد شدن افراد در ابتلا به سرطان موثر باشند (۸). بهمین لحاظ این مطالعه با هدف تعیین ارتباط پلی مورفیسم 61868T>C ژن VDR و سرطان روده بزرگ انجام گرفت.

روش کار:

در این مطالعه مورد- شاهی تعداد ۱۳۰ نمونه کنترل و ۱۳۰ نمونه بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران شامل افرادی بودند که از نظر پاتولوژی و علائم بالینی مبتلا به سرطان روده بزرگ بودند و افراد کنترل از میان

همچنین در این مطالعه هیچ رابطه معنی داری بین جنسیت ژنوتیپهای CT,CC و سرطان کولورکتال یافت نشد.

بحث:

تا کنون مطالعات زیادی در ارتباط با همبستگی سرطان های مختلفی نظیر روده بزرگ، سینه، اندومتر و پروستات و پلی مورفیسم های ژن VDR انجام شده است. در حال حاضر نیز تحقیقات زیادی بر روی آنها در حال انجام است. لیکن مطالعات همبستگی پلی مورفیسم های ژنتیکی ژن VDR با سرطان روده بزرگ مورد توجه قرار گرفته است. چرا که این پروتئین بوسیله ژنی کد می شود که ممکن است از نظر عملکردی مرتبط با پیشرفت بیماری باشد. در مطالعه ای که در جمعیت سفید پوستان انجام گرفت مشخص شد که واریانت 61968C با کاهش سرطان روده بزرگ در ارتباط است (۹). در حالیکه در مطالعه ای دیگر که در جمعیت کره ایها انجام شد هیچ ارتباطی بین واریانت 61968C با سرطان روده بزرگ مشاهده نشد و فراوانی این پلی مورفیسم در این جمعیت خیلی نادر بود (۸). با این حال در مطالعه حاضر بین ژنوتیپ CT و سرطان روده بزرگ همبستگی معکوس یافت شد ولی ژنوتیپ CC با این سرطان هیچ همبستگی را نشان نداد. در دو مطالعه دیگر نیز این نتایج تایید شدند (۱۰، ۱۱).

گزارش شده پلی مورفیسم های موجود در ناحیه غیر ترجمه شونده 3 ژن VDR مثل TaqI که در اگزون ۹ قرار گرفته بیشترین همبستگی را در سفید پوستان داشته است البته مکانیسمی که مشخص می کند این پلی مورفیسم ها چگونه بر روی VDR تاثیر می گذارند هنوز نامشخص است چرا که این پلی مورفیسم ها سبب تغییر اسید آمینه توالی پروتئین VDR نمی شوند (۱۲).

بر اساس یافته های قبلی فراوانی آلل 61968C در آسیایی ها پایین است (۲۰-۲/۶٪) ولی در جمعیت سفید پوستان نسبتا بالا و حدود (۵۱/۶٪) می باشد (۱۵-۱۳). نتایج تحقیق ما نشان داد که فراوانی آللی هم در کنترلها و هم در گروه بیماران در جمعیت مورد مطالعه بیشتر از

آگروز انجام شد و رنگ آمیزی ژلها با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت. رابطه ژنوتیپهای CT,CC و سرطان روده بزرگ با تحلیل رگرسیون لجستیک انجام شد و شدت رابطه با استفاده از نسبت شانس و فواصل اطمینان ۹۵٪ بیان شدند. توزیع آللی با استفاده از تعادل هاردی واینبرگ در بیماران و در کنترلها بطور مجزا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج تحلیلها نشان داد که در هر دو گروه فراوانی آللها با تعادل هاردی - واینبرگ مطابقت داشت.

اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۳) آنالیز شدند و احتمال P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

ژنوتیپ افراد مورد مطالعه در دو گروه کنترل و بیمار بر حسب جنسیت آنان در جدول ۲ مشاهده می شود.

جدول ۲: ژنوتیپ افراد بیمار و کنترل بر حسب جنسیت

| ژنوتیپ | بیمار | | | کنترل | | |
|--------|-------|----|----|-------|----|----|
| | CC | CT | TT | CC | CT | TT |
| مرد | ۷ | ۲۶ | ۳۱ | ۹ | ۳۳ | ۱۹ |
| زن | ۱۳ | ۲۳ | ۳۰ | ۴ | ۴۳ | ۲۲ |

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

یافته های حاصل از این مطالعه نشان دادند که فراوانی ژنوتیپهای CT,TT و CC در نمونه های کنترل به ترتیب ۱۰٪، ۳۱/۵٪ و ۵۸/۵٪ و بیماران ۱۵/۴٪، ۳۷/۷٪ و ۴۶/۹٪ می باشد. همچنین فراوانی آللهای T و C به ترتیب ۳۹/۳٪ و ۶۰/۷٪ در کنترلها و ۳۴/۲٪ و ۶۵/۸٪ در بیماران تعیین گردید. علاوه بر این مشخص شد که ژنوتیپ CT با سرطان کولورکتال ارتباط معکوس معنی داری دارد $OR = 0/449$ (CI=95% 0/257-0/783) و $P = 0/005$.

به بیان دیگر افراد واجد این ژنوتیپ دارای اثر محافظتی در مقابل سرطان کولورکتال می باشند. براساس نتایج این مطالعه هیچ ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ CC و سرطان روده بزرگ یافت نشد $95\% CI = 0/433-2/289$ $OR = 0/996$ (جدول ۳).

جدول ۳: ارتباط بین ژنوتیپ $T>C61968$ و سرطان روده بزرگ در دو گروه کنترل و بیمار

| ژنوتیپ | بیمار | | کنترل | | ارزش P |
|--------|--------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|--------|
| | تعداد (درصد) | OR ^a فاصله اطمینان ۹۵٪ | تعداد (درصد) | OR ^b فاصله اطمینان ۹۵٪ | |
| TT | ۶۱ (۴۶/۹) | ۳۱ (۳۱/۵) | — | — | — |
| CT | ۴۹ (۳۷/۷) | ۵۸/۵ (۰/۲۵۴-۰/۷۳۹) | ۰/۴۴۳ | ۰/۴۴۹ (۰/۲۵۷-۰/۷۸۳) | ۰/۰۰۵ |
| CC | ۲۰ (۱۵/۴) | ۱/۰۲۴ (۰/۴۶۲-۲/۳۰۷) | ۰/۹۳۵ | ۰/۹۹۶ (۰/۴۳۳-۲/۲۸۹) | ۰/۹۹۲ |

^a تطبیق نیافته برای سن و جنس، ^b تطبیق یافته برای سن و جنس

- 367:284-87.
6. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13:325-49.
 7. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177: 145-59.
 8. Park K, Woo M, Nam J, Kim JC. Start codon polymorphisms in the vitamin D receptor and colorectal cancer risk. *Cancer Lett* 2006; 237(2): 199-06.
 9. Slattery ML, Yakumo K, Hoffman M, Neuhausen S. Variants of the VDR gene and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control* 2001; 12: 359-64.
 10. Peters U, Hayes RB, Chatterjee N, Shao W, Schoen RE, Pinsky P, et al. Circulating vitamin D metabolites, polymorphism in vitamin D receptor, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13: 546-52.
 11. Ingles SA, Wang J, Coetzee GA, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. Vitamin D receptor polymorphisms and risk of colorectal adenomas. *Cancer Causes Control* 2001;12: 607-14.
 12. Yayl L, Eraltan M, Arzu Ergen H, Arıkan S, Okay E, Oztu O, et al. Investigation of the VDR gene polymorphisms association with susceptibility to colorectal cancer. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 731-737.
 13. Sun JL, Meng HX, Cao CF, Tachi Y, Shinohara M, Ueda M, et al. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and periodontitis. *J Periodontol Res* 2002; 37:263-67.
 14. Collins JE, Heward JM, Nithiyananthan R, Nejentsev S, Todd JA. Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK Caucasians. *Clin Endocrinol* 2004; 60:618-24.
 15. Huang SP, Chou YH, Wayne WS, Chang MT, Wu, Chen YY, Yu CC, et al. Association between vitamin D receptor polymorphisms and prostate cancer risk in a Taiwanese population. *Cancer Lett* 2004; 207: 69-77.
 16. Carling T, Rastad J, Akerstrom G, Westin G. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2255-59.
 17. K. Suzuki, H. Matsui, N. Ohtake, S. Nakata, T. Takei, H. Koike, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism in familial prostate cancer in a Japanese population. *Int J Urol* 2003;10:261-66.

مطالعات فوق بود بطوریکه درصد فراوانی آللی ۳۹/۵٪ در کنترل ها و ۳۴/۲٪ در بیماران ثبت گردید. براساس مطالعه انجام شده توسط کارلینگ و همکارانش مشخص شد که آلل C از جایگاه پلی مورفیک TaqI در مقایسه با آلل T همراه با افزایش سطح mRNA ژن VDR می باشد (۱۶) چون ویتامین D برای ایفای نقشش به گیرنده اش یعنی VDR متصل می شود پس کاهش یا افزایش در سطح VDR میتواند بر میزان نقش این هورمون تاثیر گذار باشد (۱۷). در مطالعه ای دیگر که توسط پیترز در سال ۲۰۰۴ در آمریکا انجام شد نیز ارتباطی بین پلی مورفیسم VDR و TaqI سرطان روده بزرگ مشاهده نکردند (۱۰) در حالیکه در یک مطالعه مورد-شاهدی دیگر نشان داده شد که یک کاهش در خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ در افراد واجد ژنوتیپ CC در مقایسه با ژنوتیپهای CT, TT وجود دارد (۹).

نتیجه نهایی:

یافته های مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتیپ CC ارتباط معنی داری با سرطان روده بزرگ ندارد اما ژنوتیپ CT واجد همبستگی معکوس و معنی داری با این سرطان است، بنابراین در مورد ارتباط بین پلی مورفیسم TaqI در ناحیه غیرترجمه شونده 3' ژن VDR احتمال خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ هنوز تضاد هایی باقی است. به منظور برطرف کردن این تضاد ها و تعیین دقیق احتمال نوع همبستگی و یا عدم وجود آن در جمعیت ایران و یا سایر جمعیتها، انجام یک تحقیق با تعداد نمونه های بیشتر پیشنهاد می گردد.

منابع:

1. Li C, Li Y, Gao LB, Wang YY, Zhou B, LV ML, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer in a Chinese population. *Dig Dis Sci* 2009;54(3):634-9.
2. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Zali MR. Prognostic factors in 1,138 Iranian colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23(7):683-8.
3. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89-90(1-5):187-93.
4. Ochs-Balcom HM, Cicek MS, Thompson CL, Tucker TC, Elston RC, J Plummer S, et al. Association of vitamin D receptor gene variants, adiposity and colon cancer. *Carcinogenesis* 2008;29(9):1788-93
5. Morrison NA, Qi JJC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;