

بررسی پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 در نمونه های سرطانی پستان در اصفهان

دکتر معصومه فغانی*، دکتر فهیمه محمدقاسمی*، دکتر ابراهیم نصیری*، دکتر مهدی نیکبخت**

دریافت: ۸۸/۶/۱۷ ، پذیرش: ۸۸/۱۰/۷

چکیده:

مقدمه و هدف: عوامل ژنتیکی مانند ژن P53 نقش مهمی در ایجاد سرطان دارند. موتاسیون و پلی مورفیسم روی عملکرد پروتئین P53 در سرکوب تومور اثر می گذارد. هدف از این مطالعه تعیین پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 در کارسینومای مجرای مهاجم پستان می باشد.

روش کار: در این مطالعه مورد - شاهدی ۹۶ نمونه سرطانی از نوع کارسینومای مجرای مهاجم و ۹۶ نمونه کنترل در شهر اصفهان بررسی گردید. ژنوتیپ های مختلف ژن P53 با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تعیین شد و از آزمون مجذور کای برای تحلیل آماری داده ها استفاده گردید.

نتایج: توزیع ژنوتیپی این پلی مورفیسم ژن P53 در گروه کنترل برای ژنوتیپ های A1/A1، A1/A2 به ترتیب ۳/۵۷٪ و ۷/۴۲٪ بود. توزیع ژنوتیپ مورد نظر در گروه سرطانی شامل ۸۵/۴٪ ژنوتیپ A1/A2 و ۱۴/۶٪ ژنوتیپ A1/A1 بود. اختلاف بین توزیع این پلی مورفیسم ژن P53 در گروه کنترل و سرطانی معنی دار بود ($P < 0.001$).

نتیجه نهایی: یافته ها نشان داد که پلی مورفیسم ژن P53 احتمالاً یک عامل ژنتیکی مستعد کننده برای ابتلا به کارسینومای مجرای مهاجم پستان می باشد و بهتر است این پلی مورفیسم را به عنوان یک مارکر مولکولی در بررسی ژنتیکی بیماران مبتلا به سرطان پستان در نظر گرفت.

کلید واژه ها: اینترون ۳ / پلی مورفیسم / سرطان پستان / ژن سرکوب کننده تومور P53

مقدمه:

بویژه در اصفهان بالا می باشد (۵،۶) که شاید بتوان آن را ناشی از تفاوت های نژادی و جغرافیایی دانست . ژن P53 به عنوان مهمترین ژن سرکوب کننده تومور روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۷ واقع است و دارای ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون می باشد (۷). این ژن نقش کلیدی در حفظ تمامیت ژنوم دارد و از تکثیر سلول دارای DNA آسیب دیده جلوگیری می کند بدین سبب غیرفعال شدن ژن در ایجاد تومور نقش دارد (۸). موتاسیون و حذف شده گی P53 یک آسیب شایع ژنتیکی در اغلب سرطانها می باشد، سرطان پستان با تغییرات ژنتیکی سوماتیک مانند موتاسیون در انکوژنها و ژنهای سرکوب کننده تومور مرتبط است (۹،۱۰) و در حدود ۴۰٪ موارد کارسینوماهای پستان دارای ژن جهش یافته P53 می باشند (۱۱). گزارش شده است که علاوه بر موتاسیون،

سرطان همواره یکی از مشکلات عمده جوامع انسانی محسوب می شود. از بین سرطانها، سرطان پستان شایعترین سرطان در میان زنان می باشد (۱،۲) و اغلب موارد سرطانهای پستان منجر به مرگ، از نوع کارسینومای مجرای مهاجم است (۳). عوامل متعددی فرد را در معرض ابتلا به سرطان قرار می دهد که از بین آنها میتوان به تغییرات ژنتیکی، رژیم غذایی، شیردهی و فاکتورهای محیطی اشاره نمود. مهمترین عاملی که موجب ابتلا به سرطان می شود تغییرات ژنتیکی در ژنهای مهمی مثل ژنهای سرکوب کننده تومور، تنظیم کننده رشد و انکوژنها می باشد (۴). علیرغم آمار جهانی پایین تر ابتلا به سرطان در کشورهای آسیایی نسبت به کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی (۲) آمار ابتلا به سرطان در کشور ما و

* استادیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان (mfaghani@gums.ac.ir)

** دانشیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

پرایمر Forward : 5'-CTGAAAACAACGTTCTGGTA-3'

پرایمر Reverse : 5'-AAGGGGGACTGTAGATGGGTG-3'

تنظیم دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر توالی پلی مورفیک اینترون ۳ ژن P53 به ترتیب زیر انجام گرفت:
مرحله اول : Denaturation ابتدایی با دمای 95°C به مدت ۵ دقیقه
مرحله دوم: شامل ۳۵ سیکل است و هر سیکل از سه بخش زیر تشکیل میشود:

الف- Denaturation با دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه

ب- Annealing با دمای 60°C به مدت ۳۰ ثانیه

ج- Extension با دمای 72°C به مدت ۶۰ ثانیه

مرحله سوم: Extension نهایی با دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه

بعد از اتمام کار محصول PCR تا زمان الکتروفورز در یخچال نگهداری شد. برای مشخص نمودن تکثیر اینترون ۳ ژن P53 ابتدا محصول PCR روی ژل آگاروز ۲٪ برده شد. سپس برای مشخص نمودن وجود آلل A1 (Wild type) بدون 16bp duplication (با اندازه ۱۹۹ bp) و آلل A2 دارای 16bp duplication (با اندازه ۱۳۵bp) محصول PCR روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ برده شد و توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید.

شیوه تجزیه و تحلیل داده ها: اطلاعات بدست آمده از طریق نرم افزار SPSS، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه توزیع فراوانی سه ژنوتیپ مختلف اینترون ۳ در نمونه های سرطانی با توزیع فراوانی این سه ژنوتیپ در نمونه های شاهد؛ Chi-squared test استفاده شد و P-Value کوچکتر از 0.05 معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

برای انجام این مطالعه ۱۲۵ نمونه جمع آوری گردید. تعدادی از نمونه ها بدلیل نداشتن شرایط مناسب حذف شدند و در نهایت ۹۶ عدد مورد بررسی قرار گرفتند. سن نمونه ها بین ۲۳-۷۹ سال بود و نمونه های توموری از نوع کارسینوما مجرای می (invasive ductal carcinoma) انتخاب شدند.

نتایج بدست آمده در خصوص محصول PCR تکثیر یافته اینترون ۳ ژن P53 در ژل پلی آکریل آمید ۲٪ در شکل ۱ و محصول تکثیر یافته آن در ژل پلی آکریل آمید

پلی مورفیسم هم روی عملکرد ژن تاثیر می گذارد (۱۲) ۱۴ نوع پلی مورفیسم در ژن P53 گزارش شده است که شایعترین آنها پلی مورفیسم کدون ۷۲، اینترون ۳ و اینترون ۶ می باشد (۱۳). پلی مورفیسم ژنتیکی ژن P53 ممکن است تعیین کننده حساسیت افراد در سرطان هایی مانند پستان (۱۴،۱۵)، کولورکتال (۱۶) ریه (۱۷) و مثانه (۱۸) باشد. بیان شده است که پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 در ایجاد سرطان پستان فامیلی دخالت دارد (۲۱-۱۹).

با توجه به مطالعات انجام شده روی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 روی سرطان پستان در ایران (۱۴،۲۲) و گزارشات ضد و نقیض موجود در مورد ارتباط پلی مورفیسم اینترون ۳ با خطر ابتلا به سرطان (۲۰،۲۲) این مطالعه با هدف تعیین پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 در نمونه های سرطانی پستان در شهر اصفهان انجام گرفت.

روش کار:

در این مطالعه مورد شاهدی ۹۶ فرد مبتلا به سرطان پستان از نوع کارسینوما مجرای میهاجم و ۹۶ نمونه کنترل بررسی گردید. روش نمونه گیری از نوع آسان و افراد گروه کنترل از نظر سن و جنس با گروه سرطانی همانند انتخاب شدند و ضایعه شناخته شده سرطانی نداشتند. از افراد هر دو گروه برای انجام نمونه گیری رضایتنامه دریافت گردید.

برای استخراج DNA از نمونه خون استفاده شد. با استفاده از کیت استخراج DNA کمپانی Roche و دستورالعمل آن DNA استخراج گردید و برای تعیین غلظت DNA استخراج شده از اسپکتروفتومتر و تعیین جذب نوری (OD) $260/280$ استفاده گردید که در نمونه های این تحقیق میزان آن $1/4$ تا $1/85$ بود.

برای بررسی پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 از PCR استفاده گردید. بعد از بهینه سازی PCR، با استفاده از ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA، ۱ واحد تک پلی مرز، $1/5$ میلی مولار MgCl_2 ، ۲۰ میکرومولار از هر یک از dATP، dGTP، dTTP، dCTP و ۲ میکرومولار از زوج پرایمرهای اختصاصی، برای مشخص نمودن 16bp duplication در اینترون ۳ ژن P53، PCR انجام شد.

توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر اینترون ۳ ژن P53 عبارتند از (۲۳):

۱۵٪ در شکل ۲ نشان داده شده است.

حالیکه ۵۵ نفر از افراد گروه کنترل دارای این ژنوتیپ بودند، فراوانی ژنوتیپ A1/A1 در گروه بیماران ۱۴/۶٪ بود ولی در گروه کنترل ۴۲/۷٪ از افراد دارای این ژنوتیپ بودند. فراوانی آلل A1 در گروه بیماران ۴۲/۷٪ و در گروه کنترل ۷۱/۳٪ بود. میزان آلل A2 در گروه بیماران ۵۷/۳٪ در حالی که در گروه کنترل ۲۸/۷٪ بود. بین توزیع آلل های A1 و A2 در گروه بیماران و کنترل تفاوت معنی دار آماری وجود داشت.

جدول ۱: توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف اینترون ۳ ژن P53 در گروههای کنترل و بیماران

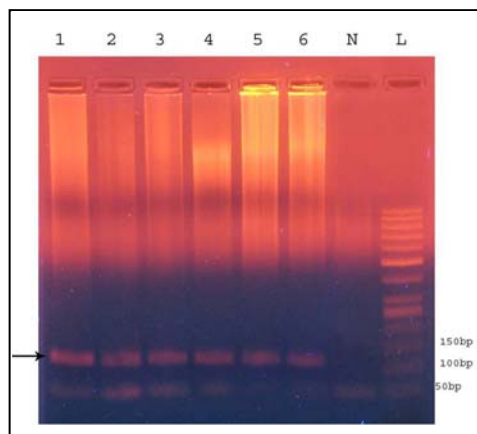
| ارزش P | کنترل | | بیمار |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------------------------|
| | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) | |
| 0.04 Odds= 1.48, 0.97-2.42 | ۱۳۷ (۷۱/۳) | ۸۲ (۴۲/۷) | A ₁ |
| | ۵۵ (۲۸/۷) | ۱۱۰ (۵۷/۳) | A ₂ |
| 0.001 Odds= 4.36, 2.17-8.76 | ۴۱ (۴۲/۷) | ۱۴ (۱۴/۶) | A ₁ /A ₁ |
| | ۵۵ (۵۷/۳) | ۸۲ (۸۵/۴) | A ₁ /A ₂ |

بحث:

با وجود مطالعات گسترده روی پلی مورفیسم های شایع ژن P53 مانند کدون ۷۲، اینترون ۳ و اینترون ۶ نقش این پلی مورفیسم ها در کارسینوژنز پستان هنوز مورد بحث است. تفاوت های اینترونی ژن P53 همانند تفاوت های ژنتیکی در کدون ۷۲ روی عملکرد پروتئین در چرخه سلولی، آپوپتوز و ترمیم DNA تاثیر می گذارد (۲۴).

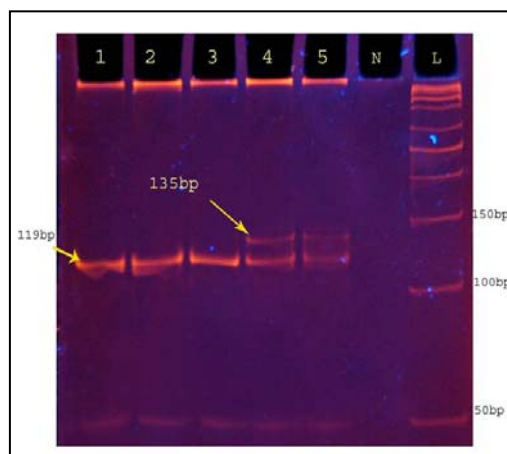
چون پلی مورفیسم به نژاد و موقعیت جغرافیایی بستگی دارد (۲۵) بر خلاف یافته های این تحقیق، نتایج مطالعه بویرو و همکارانش در ترکیه (۲۴) روی زنان مبتلا به سرطان پستان نشان داد که بین پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 و سرطان پستان ارتباط وجود ندارد که ممکن است اختلافات نژادی علت وجود این تفاوت باشد.

در مطالعه دیگری که توسط پاول و همکارانش در استرالیا بر روی ۷۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان انجام شد در ۹۸/۴٪ از بیماران ژنوتیپ A1/A2 وجود داشت (۲۶) ایشان مشخص نمودند که این پلی مورفیسم با درجه هیستولوژیکی تومور ارتباط دارد ولی با خصوصیات کلینیکی و پاتولوژیکی تومورها از جمله رسپتور استروئید، اندازه تومور و درگیری گره های لنفاوی ارتباط ندارد. در مطالعه ما ارتباط بین این پلی مورفیسم با خصوصیات هیستولوژیکی، کلینیکی و پاتولوژیکی تومورها بررسی نشد و لازم است



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر اینترون ۳ ژن P53 در ژل آگاروز ۲٪

در شماره ۱ تا ۶ وجود باند نشاندهنده تکثیر اینترون ۳ ژن P53 می باشد
N: نمونه کنترل منفی
L: استاندارد وزن ملکولی DNA
باند پائین ژل، پرایمر دایمر می باشد



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر اینترون ۳ ژن P53 در پلی اکریل آمید ۱۵٪

نمونه های شماره ۱، ۲ و ۳ دارای آلل A1 می باشند
نمونه های شماره ۴ و ۵ دارای آلل A1 و A2 هستند
N: نمونه کنترل منفی
L: استاندارد وزن ملکولی DNA
باند پائین ژل، پرایمر دایمر می باشد

توزیع سه ژنوتیپ اینترون ۳ ژن P53 در گروه بیماران و کنترل در جدول ۱ خلاصه شده است. در تجزیه و تحلیل داده ها اختلاف معنی دار آماری در توزیع ژنوتیپی اینترون ۳ ژن P53 در گروه بیماران و کنترل وجود داشت. ژنوتیپ A1/A2 در ۸۲ نفر از افراد گروه بیماران وجود داشت در

در درمان بیماری دارد و با تشخیص به موقع بیماری، می توان کمک موثری در درمان این بیماران نمود.

سپاسگزاری:

منابع مالی این پژوهش در غالب طرح تحقیقاتی توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تامین شده است و بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی و گروه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان سپاسگزاری می گردد.

منابع:

1. Ferlay J, Bray F, Pisane P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Lyon: Globocan IARC Press, 2000.
2. Albano JD, Ward E, Jemal A, Anderson R, Cokkinides VE. Cancer mortality in the United States by education level and race. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(18):1384-94.
3. Li Ci, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristic of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:1046-52.
4. Turnpenny PD, Ellard S. Emery's elements of medical genetics. 13th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2007:192-219.
5. Asadpour A. [Isfahan: First degree of cancer in Iran]. *Jame Jam* 2007; 15. (Persian)
6. [Breast cancer age in Iran is 10 years lower than the world statistics] Available from <http://www.irna.ir/View/FullStory/?NewsId=609984>.
7. Borresen -Dale A. Tp53 and breast cancer. *Hum Mutat* 2003; 21: 292-300.
8. Barnes DM, Camplejohn RS. P53, apoptosis, and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996 ;1(2):163-75.
9. Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, He X, Hoadley KA, Barbier CS, et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer* 2006 ;6:276
10. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999; 19(2): 1092-100.
11. Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* 2004; 23(10):1954-6.
12. Faghani M, Nikbahkt M, Rabbani M, Talebi A, Soleimani B. [Investigation of codon 72 polymorphism of p53 gene in breast cancer specimen in Isfahan]. *Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2007, 84:26-33. (Persian)
13. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14):5098-103.

این موارد در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. بر اساس گزارش ماهاسنه و همکارانش در بررسی پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 در افراد مبتلا به سرطان پستان و ریه در دو نژاد Charkas و Bedouin شیوع این پلی مورفیسم در نژادهای مختلف حتی در مناطق مختلف یک کشور هم یکسان نیست (۲۵). برخلاف یافته های ما که میزان آلل A2 (دوتایی شدن توالی ۱۶bp در اینترون شماره ۳) در نمونه های سرطانی از نمونه های گروه کنترل بیشتر بود (۰/۵۷۳) و این موضوع موجب افزایش میزان ژنوتیپ A1/A2 در گروه بیماران شده بود در تحقیق فوق الذکر فراوانی ژنوتیپ A1/A1 بیشتر از ژنوتیپ A1/A2 گزارش شده است.

از سوی دیگر در نتایج بدست آمده در مطالعه ما، وانگ و همکارانش (۱۷) پلی مورفیسم اینترون ۳ ژن P53 را در ۵۶۳ زن مبتلا به سرطان پستان در آلمان بررسی کردند. نتایج تحقیق آنان نشان داد که آلل A2 خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان بالای ۵۰ سال و دارای فامیل درجه یک مبتلا به سرطان را ۵/۳ برابر افزایش می دهد، همچنین در افراد بدون تاریخچه خانوادگی نیز خطر ابتلا به سرطان ۱/۷ برابر افزایش داشت ($P < 0/04$). در مطالعه ما نیز میزان آلل A2 در گروه بیماران بیشتر از گروه کنترل بود و این نشان می دهد که شاید این آلل با خطر ایجاد سرطان ارتباط داشته باشد، البته برای اثبات این ارتباط نیاز به انجام مطالعات گسترده تری می باشد.

نتیجه نهایی:

با توجه به یافته های این تحقیق فراوانی آلل A2 در افراد گروه بیمار بیشتر (۰/۵۷۳) از گروه کنترل (۰/۲۸۷) بود ($P < 0/001$). از سوی دیگر در بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در نمونه های سرطانی پستان در اصفهان (۱۲) ۷۰/۸٪ از نمونه های سرطانی در مقایسه با ۳۶/۵٪ از افراد گروه کنترل دارای ژنوتیپ آرژینین/آرژینین بودند ($P < 0/001$) چون این ژنوتیپ با رشد سریعتر تومور و خصوصیات تهاجمی بیشتر آن ارتباط دارد (۲۷) و نیز موجب تغییر فعالیت آپوپتوزی ژن P53 می شود (۱۰) به نظر می رسد که این دو پلی مورفیسم احتمالاً با هم روی بروز سرطان تاثیر گذاشته باشند. پس می توان با مشخص نمودن این دو پلی مورفیسم ژن P53، افراد در معرض خطر برای ابتلا به سرطان پستان را غربالگری کرد. مسلم است که تشخیص زود هنگام سرطان نقش مهمی

14. Zhu ZZ, Wang AZ, Jia HR, Jin XX, He XL, Hou LF, et al. Association of the TP53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in a Chinese population. *Jpn J Clin Oncol* 2007;37(5): 385-90.
15. Nadji SA, Mahmoodi M, Ziaee AA, Naghshvar F, Torabizadeh J. An increased lung cancer risk associated with codon 72 polymorphism in the TP53 gene and human papillomavirus infection in Mazandaran province, Iran. *Lung Cancer* 2007; 56(2):145-51
16. Soultz N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett* 2002; 179:175-83.
17. Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang- Claude J. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 269-72.
18. Wirtenberger M, Frank B, Hemminki K, Klaes R, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, et al. Interaction of Werner and Bloom syndrome genes with p53 in familial breast cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27:1655-60.
19. Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene* 1993; 8(6): 1703-5.
20. Khadang B, Fattahi MJ, Talei A, Dehaghani AS, Ghaderi A. Polymorphism of TP53 codon 72 showed no association with breast cancer in Iranian women. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 173(1):38-42.
21. De Vecchi G, Verderio P, Pizzamiglio S, Manoukian S, Bernard L, Pensotti V, et al. The p53 Arg72Pro and Ins16bp polymorphisms and their haplotypes are not associated with breast cancer risk in BRCA-mutation negative familial cases. *Cancer Detect Prev* 2008;32(2):140-3.
22. Sjalander A, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 1996; 46:41-48.
23. Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer*. 2008 Jan 29;8:32.
24. Buyru N, Altinisik J, Demokan S, Dalay N. P53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. *Cancer Detect Prev* 2007; 31(3):207-13.
25. Mahasneh AA, Abdel-Hafiz SS. Polymorphism of p53 gene in Jordanian population and possible associations with breast cancer and lung adenocarcinoma. *Saudi Med J* 2004; 25(11): 1568-73.
26. Powell BL, van Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns EM, Iacopetta B. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis* 2002;23(2):311-5.
27. Langerød A, Zhao H, Borgan Ø, Nesland JM, Bukholm IR. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9(3):R30.