

ارتباط ژن ژلاتیناز B با سرطان ریه در افراد سیگاری و غیر سیگاری

دکتر مجید متولی باشی¹، سمیه تقوایی²، دکتر سیمین همتی³

دکتر مجید متولی باشی: استادیار، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده
ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Majid Motovali-Bashi PhD: Assistant Professor, Division of Genetics, Department of Biology, Faculty of
Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

دکتر سیمین همتی: استادیار، گروه رادیوتراپی و انکولوژی، دانشکده ی
پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Simin Hemmati MD: Assistant Professor, Department of Oncology and Radiotherapy, School of
Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

سمیه تقوایی: کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، بخش ژنتیک، گروه زیست
شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Somayeh Taghvaei MSc: Division of Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University
of Isfahan, Isfahan, Iran.

مسئول مکاتبات: دکتر مجید متولی باشی

Corresponding Author: Majid Motovali-Bashi PhD, Email: mbashi@sci.ui.ac.ir

آدرس مکاتباتی: خیابان هزارجریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم،
گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

mbashi@sci.ui.ac.ir

آدرس ایمیل: mbashi02@yahoo.co.uk

تلفن دفتر کار: ۷۹۳۲۴۷۴

تلفن: 09133289133

Association of Gelatinase B with cancer lung and smoking habit

Abstract:

Background & Aim: The accumulating evidence has suggested that in addition to metastasis, Gelatinase B is involved in early carcinogenesis via turnover and processing of growth factors, growth factor receptors, angiogenic factors and other proteinases, then fundamental role in cancer initiation and development. Genetic polymorphism in the promoter of Gelatinase B has been reported to be associated with the risk of several cancers including lung cancer.

Methods: Genotyping of Gelatinase B was carried out by taking blood samples from 172 lung cancer patients and 100 controls using restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (RFLP-PCR) technique. The observed numbers of each Gelatinase B genotype were compared with that expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium by using a χ^2 test. The significance of the differences of observed alleles and genotypes between groups was tested using the odds ratio analysis.

Finding: The percentage of smokers in patients was more than controls (57.5% and 30 % respectively). Distribution of Gelatinase B genotype was significantly associated with the risk of lung cancer (odds ratio = 2.56; 95% confidence interval = 0.06 - 23.82).

Conclusion: Our results indicated that smokers who carry TT and CT+TT genotypes have 4 (OR=3.45; CI=1.28-9.24) and 15 (OR=14.66; CI=3.95-53.47) fold risk of lung cancer, respectively.

Key words: Gelatinase B, RFLP-PCR, Genotyping, Smokers, Lung cancer.

چکیده

سابقه و هدف: شواهد فزاینده‌ای پیشنهاد میکند که آنزیم ژلاتیناز B علاوه بر نقش در متاستاز از طریق تغییر و پردازش فاکتورهای رشد، ریسپتورهای فاکتورهای رشد، فاکتورهای آنژیوژنیک و دیگر پروتئین‌ها در شکل‌گیری سرطان نیز درگیر می‌باشد، بنابراین نقش اساسی در شروع و پیشروی سرطان دارد. وجود پلیمورفیسم ژنتیکی در پروموتور ژن ژلاتیناز B و ارتباط آن با چندین سرطان از جمله سرطان ریه گزارش شده است.

روش بررسی: تعیین ژنوتیپ ژلاتیناز B در ۱۷۲ بیمار سرطان ریه و ۱۲۳ کنترل با استفاده از تکنیک چند شکلی طولی قطعات DNA با استفاده از آنزیمهای محدودالایز-واکنش زنجیرهای پلیمرز (RFLP-PCR) بر روی DNA ژنومیک استخراج شده از نمونه تام خون انجام شد. شمار ژنوتیپهای مشاهده شده با شمار مورد انتظار برای جمعیت در تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون χ^2 مقایسه شد. اختلافات با اهمیت ژنوتیپها و آلله‌ها بین گروهها با استفاده از آنالیز نسبت افزایشنده OR آزموده شد.

یافته‌ها: درصد سیگاریها در بیماران بیشتر از کنترل بود (۵/۵۷٪ در مقابل ۳۰٪). توزیع ژنوتیپی ژن ژلاتیناز B به طور معنی داری با ریسک خطر سرطان ریه مرتبط بود (OR=۲/۵۶، CI=۰/۰۶-۲۳/۸۲).

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که افراد سیگاری واجد ژنوتیپ های TT و CT+TT به ترتیب استعداد خطر ۴ (OR=۳/۴۵، CI=۱/۲۸-۹/۲۴) و ۱۵ (OR=۱۴/۶۶، CI=۳/۹۵-۵۳/۴۷) برابری سرطان ریه دارند.

واژگان کلیدی: ژلاتیناز B، RFLP – PCR، تعیین ژنوتیپ، استعمال دخانیات، سرطان ریه.

مقدمه

مرحله شروع سرطان ناشی از ضربه جبران ناپذیر و نسبتاً سریع به سلول می باشد که می تواند به علت جذب اولیه مواد سرطانزا و صدمه ژنی کشنده ثانویه به دلیل فعالسازی متابولیکی مواد سرطانزا می باشد (۱ و ۲). به منظور یافتن ژنهای درگیر در سرطان ریه در ابتدا از آنجاییکه ارتباط تنگاتنگ سرطان ریه با استعمال دخانیات به اثبات رسیده بود مطالعات بر روی آنزیمهای درگیر در فعالسازی، سم زدایی مواد سرطانزا و ترمیم صدمه ناشی از دخانیات متمرکز شد، زیرا تغییر در این مسیرها بر روی پردازش مواد سرطانزای دخانیات و خطر پیشرفت سرطان ریه اثر م یگذارد (۳). استعمال دخانیات به دو فرآیند پاتولوژیک در ریه منجر می شود، اول تخریب پروتئولیتیک پارانشریم ریه که باعث بزرگی شدگی دائمی فضاهای هوایی می شود و در ادامه باعث فقدان الاستیسیته ریه می شود. فرایند دوم تنگ شدن گشی التهابی مسررهای هوایی که با ادم، ترشح بیش از حد موکوس و فیبروز مسررهای هوایی مشخص می شود (۴). دخانیات حاوی بیش از ۶۰ هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای سرطانزای می باشد، از جمله این ترکیبات می توان نیتروز آمینها و بنزو

پون را نام برد (۵). متابولسم هیدرکربنهای آروماتیک چند حلقه ای، نیتروز آمینهای اختصاصی و آمینهای آروماتیک اختصاصی حاصل ازدخانیات از طریق آنزیمهای میکروزومی فاز ۱ و ۲ شامل CYP1A، اپوکسید هیدرولاز میکروزومی (mEH/EPHX1)، میلوپروکسیداز NADPH، MPO کوینون اکسیدوردوکتاز (NQO1)، GST و سولفو ترانسفرازها انجام میگیرد (۵، ۶ و ۷). ابتدا آنزیمهای میکروزومی فاز ۱ سوبسترا را اکسید، احیاء یا هیدرولیز و به محصول قطبیت تبدیل میکنند. محصول واکنش مرحله یک میتواند به متابولیت سمی ترشح یا فعال شود. متابولیت سمی توسط آنزیمهای کانژوگیتینگ فلز ۲ مثل سولفو ترانسفراز و گلوکوتیون S ترانسفراز به سوبسترای ملحق و ترشح میشود (۸، ۹ و ۱۰). بنابراین حساسیت یک فرد به سرطان ممکن است بوسیله تعادل بین ظرفیت آن برای فعال کردن پیش سرطانزا و ظرفیتش برای سم زدایی مواد سرطانزا تحت تاثیر قرار گیرد (۱۱). سیتوکروم p450 قادر است این ترکیبات را که با اتصال به DNA و ایجاد کمپلکس سبب توقف همانندسازی و رونویسی می شوند را فعال کند. گلوکوتیون S ترانسفراز با سم زدایی حدواسطهای سرطانزا باعث حفاظت در برابر این آسیبها میشود. بنابر این آسیبهای فوق اغلب ترمیم میشوند، ولی در هر حال تشکیل آنها میتواند باعث تغییرات ارثی در توالی DNA گردد (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵). دخانیات همچنین حاوی مقادیر زیادی رادیکالهای آزاد اکسیژن میباشد که باعث اکسیداسیون گوانین و تبدیل آن به ۸-اگزو-گوانین و در نهایت باعث موتاسیون G→T میگردد. ۸-اگزو-گوانین بوجود آمده عموماً توسط آنزیم ۸-اگزو-گوانین-DNA-OGG1 (OGG1) ترمیم میشود، ولی فعالیت پایین آنزیم در سیگارها خطر سرطان ریه را افزایش میدهد (۱۶، ۱۷ و ۱۸). علاوه بر این گونه های فعال اکسیژن باعث انواع صدمه به DNA شده که نیازمند ترمیم از طریق روشهای BER، MMR، NER، SSBRR و DSBRR میباشد. جهش در ژنهای مسرهای ترمیمی BER (OGG1، XRC1، XPD)، NER (XPA، ERCC1)، DSBRR (ERCC3) و MMR (MLH1، MSH2) در ایجاد سرطان یا افزایش استعداد ابتلا به آن تاثیر دارد (۵، ۷، ۱۸ و ۱۹). آدنوکارسینوما در غیر سیگارها شکل غالب سرطان ریه میباشد. در مقایسه با افراد سالم افراد سرطانی بیشتر سیگار یابند یا مدت کمی از توقف استعمال دخانیات در آنها میگذرد. در این راستا میزان استعمال دخانیات، سن شروع و تعداد سالهای مصرف دخانیات مهم میباشد (۱۲، ۲۰ و ۲۱). البته فاکتورهای دیگر شامل محیط، هورمونها، عوامل ژنتیکی و ویروسی نیز در ایجاد سرطان ریه دخالت دارند و هیچ فاکتور منفردی نمیتواند خطر سرطان ریه در غیر سیگارها را توجیه کند (۱۲ و ۲۲). اما در هر حال مطالعات نشان داده استعمال دخانیات بر عامل ژنتیکی (سابقه خانوادگی و حساسیت ژنتیکی) غالب است (۲۰). نظر به اینکه بیان آنزیم ژلاتیناز B میتواند توسط دخانیات القا شود، در این مطالعه فرض گردید که آللهای آنزیم با فعالیت پروموتوری بالاتر نسبت به آللهای با فعالیت کمتر تحت تاثیر بیشتر دخانیات قرار میگیرند. بنابراین افرادی که سیگار میکشند و آللهای مستعد دارند ممکن است به پیشرفت سرطان حساس تر باشند (۲۳ و ۲۴).

تغییر پذیری در حساسیت ژنتیکی به مواد سرطانزا نیز نقش مهمی در اپیدمیولوژی سرطان ریه دارد (۳ و ۱۵). ژلاتیناز B در مقادیر کم در ریه افراد سالم وجود دارد. ژلاتیناز B علاوه بر هضم پروتئینهای ساختاری و آنژیوتنازها میتواند با تنظیم سیتوکینها و فاکتورهای رشد متصل به ماتریکس، عملکرد سلول را تغییر دهد (۲۵). تعیین نقش این آنزیم در سلامت و بیماری مفید است، زیرا مهارکنندههای اختصاصی و عمومی آن موجود میباشد تا بتوان به منظور یافتن راهحلهایی برای درمان این بیماریها استفاده نمود (۲۵، ۲۶ و ۲۷).

افزایش بیان آنزیم ژلاتیناز B در بسیاری از بیماری های ریوی چون آسم، امپیزما و فیبروز سیستیک گزارش شده است (۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱ و ۳۲). در NSCLC ارتباط تنگاتنگی بین سطوح در حال گردش آنزیم ژلاتیناز B و میزان بقا گزارش شده است (۲۳). آنزیم ژلاتیناز B توسط ماکروفاژهای آلوئولی، لوکوسیت های چند هسته ای و استئوکلاست ها تولید میشود. دارای یک دمین فیرونکتین اضافی در دمین کاتالیتیک بوده و قادر است کلاژن تیپ I، IV، V، IX، X، الاستین، فیرونکتین، ویترونکتین، آگرکلن، لامینین، همچنین مولکول های غیر ماتریکسی پرو $TNF-\alpha$ ، IL-8، IL-1 β ، TGF- β و MCP-3 را تجزیه کند. همچنین قادر به آزادسازی فاکتورهایی با خصوصیات پروآنژیوژنیک میباشد (۳۳). آنزیم ژلاتیناز B با شکاف ریسپتور آلفا اینترلوکین ۲، فعالسازی TGF- β و جدانمودن ICAM-1 باعث گریز سلول های سرطانی از سیستم ایمنی می شود، بنابراین تکثیر لنفوسیت های T و پاسخ ایمنی به تومور را مهار می کند (۳۴). تنظیم بیان آنزیم ژلاتیناز B اساساً در سطح نسخه برداری از طریق فاکتورهای نسخه برداری API، SP1، STAT، NFKB، PEA3، RXR-RAR، TCF-LEF و فاکتورهای رشد چون TGF- β صورت می گیرد. TGF- β باعث القاء بیان آنزیم ژلاتیناز B، PDGF-A و PDGF-B توسط سلول های اندوتلیال و کاهش بیان مهارکننده های بافتی میشود. همچنین TGF- β باعث تحریک ترشح کندروسیتن سولفات و بلوغ رگ های خونی میگردد (۳۵).

بیش از ۱۰ پلای مورفیسیم تک نوکلئوتیدی در ژن آنزیم ژلاتیناز B شناسایی شده است. پلی مورفیسیم C→T در بالادست جایگاه شروع نسخه برداری، در مجاورت عنصری که، در پروموتور C-fos یافت می شود، قرار گرفته است. وجود این پلی مورفیسیم باعث از بین رفتن محل اتصال پروتئین رپرسور نسخه برداری شده و بیان آنزیم ژلاتیناز B را افزایش میدهد (۱۴، ۳۶، ۳۷ و ۳۸). هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی C/T پروموتور ژن آنزیم ژلاتیناز B با حساسیت سرطان ریه در گروه های سنیگاری و غیر سنیگاری می باشد.

روشها

۱۷۲ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان ریه بدون سابقه فامیلی و مورد تأیید متخصص پاتولوژیست از مرکز آموزشی-پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی تهیه و در لوله های واجد EDTA در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت جمع آوری اطلاعات بیماران و انجام مطالعات آماری، فرم های پرسش نامه طراحی شد که حاوی اطلاعاتی از جمله وضعیت از نظر استعمال دخانیات بود. در ادامه ۱۲۳ نمونه خون مربوط به افراد سالم و منطبق با شرایط بیماران از بانک خون تهیه گردید. از ۵ml خون تهیه شده از هر فرد ۵۰۰ μ l به منظور استخراج DNA ژنومی به روش نمکی مورد استفاده قرار گرفت (۳۹). موارد کمی و کیفی DNA استخراج شده از طریق دو روش ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. در روش اسپکتروفتومتری جذب (OD260/OD280) بین ۱/۸-۲ برای نمونه ها انتخاب و در غیر این صورت استخراج مجدداً انجام گرفت.

تکثیر منطقه ژنی مورد نظر و واجد پلی مورفیسیم با استفاده از تکنیک PCR با ترکیبات ۱۵۰ng DNA ژنومی، ۲/۵ μ l بافر PCR10X، ۰/۷۵ μ l کلرید منیزیم ۵۰میلیمولار، ۰/۵ μ l dNTP ۱۰ میلی مولار، پرایمر رفت ۲۰pm، پرایمر برگشت ۲۰pm، Taq پلیمراز ۰/۳ μ l و dH₂O تا رسیدن به ۲۵ μ l در شرایط دمایی: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد سپس ۳۰ سیکل: ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در

۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه هیبریداسیون در ۶۵ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه تکثیر در ۷۲ درجه سانتیگراد و در انتها ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). پس از انجام PCR یکی از تکنیک هایی که می تواند صحت عملکرد پرایمر، PCR، صحیح بودن تکثیر قطعه مورد نظر و ژنوتیپ افراد را بر حسب ناحیه پلی مورفیسم تایید کند، برش و هضم آنزیمی آن قطعه با یک آنزیم محدودالانثر با حداقل یک جایگاه برش در ناحیه پلی مورفیسم می باشد. هضم آنزیمی با استفاده از ۲/۵ واحد آنزیم *Pae I* و ۱ μl بافر آنزیم و انکوباسیون در ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. و سپس محصولات حاصل توسط ژل آگارز ۲٪ بررسی شدند. بدین ترتیب تمام افراد سیگاری و غیرسیگاری اعم از بیمار و کنترل تعیین ژنوتیپ شدند (شکل ۲).

در مطالعه حاضر با استفاده از ژنوتیپ های بدست آمده از RFLP-PCR فراوانی آللی C/T در گروه های مورد مطالعه محاسبه گشت. در مرحله بعد اختلاف در توزیع ژنوتیپ ژلاتیناز B در گروه های مطالعه شده با استفاده از آزمون کای مربع توسط نرم افزار SPSS (Statistical Processor for Social Science) ویرایش ۱۹ محاسبه گردید. نسبت افزایش (OR) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان همکاری پلی مورفیسم مورد نظر با دخانیات و ریسک سرطان ریه محاسبه شد. در تمامی این محاسبات سطح احتمال $P < 0/05$ ، از نظر آماری معنی دار فرض شده است.

یافته ها:

در این تحقیق ۲۹۵ فرد در دو گروه سرطانی و کنترل شامل: ۵۷/۵٪ سیگاری، ۴۲/۵٪ غیر سیگاری (سرطانی) و ۳۰٪ سیگاری، ۷۰٪ غیر سیگاری (کنترل) تعیین ژنوتیپ شدند. از لحاظ آماری اختلاف معنی داری در توزیع افراد سیگاری و غیرسیگاری در دو گروه کنترل و بیمار مشاهده گردید ($P=0/000$)، $(OR=3/15)$ (۱/۸-۵/۵۱)، $P=0/000$). فراوانی افراد سیگاری در گروه سرطانی بیشتر از گروه کنترل بود. همان طور که در جدول ۱ ملاحظه میگردد آلل T و ژنوتیپهای TT و CT در سیگاریهای سرطانی بیشتر از سیگاریهای کنترل میباشد. بنابراین در مرحله بعد ارتباط ژنوتیپ TT در برابر ژنوتیپهای CT+CC و ارتباط ژنوتیپهای CT+TT در برابر ژنوتیپ CC سنجیده شد. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده فراوانی ژنوتیپ TT و ژنوتیپهای واجد حداقل یک آلل T در افراد سیگاری سرطانی از افراد کنترل سیگاری بیشتر میباشد (به ترتیب $OR=3/45$ ، $CI=(1/28-94/24)$ ، $OR=14/66$ ، $CI=(3/95-53/47)$).

بحث:

در مطالعه حاضر هدف بررسی نقش پلی مورفیسم C/T در پروموتور ژن ژلاتیناز B و حساسیت ابتلا به سرطان ریه در گروه های سیگاری و غیر سیگاری در جمعیت ایران با استفاده از تکنیک RFLP-PCR بود. با توجه به یافته های این مطالعه فراوانی آلل T در بیماران سیگاری در مقایسه با افراد کنترل افزایش چشم گیری نشان داد و اختلاف قابل توجهی در توزیع ژنوتیپ ژلاتیناز B گروه کنترل و گروه سرطانی ریه مشاهده گردید و در مقایسه با ژنوتیپ CC ژنوتیپهای حامل آلل T قادرند ریسک ابتلا به سرطان ریه را به میزان قابل ملاحظه متاثر سازند. پلی مورفیسم C/T یک وارینه ژنتیکی که فقط در معدودی از سلول های توموری وجود داشته باشد نیست. چنانکه مطالعات نشان داده این پلی مورفیسم در یک آلل از ۲۰٪ جمعیت مورد مطالعه گزارش شده است (۳۰). بیان ژلاتیناز B

تحت تاثیر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی C/T در پروموتور آن قرار می گیرد. در آلل واجد تیمین جایگاه اتصال برای اعضای خانواده فاکتورهای مهارکننده رونویسی از بین می رود و در نتیجه آللهای T رونویسی بیشتری نسبت به آلل های واجد C نشان می دهند (۳۷ و ۴۰). علت این ریسک فزاینده در افراد سرگاری احتمالاً ناشی از مواد سرطان زای دخانیات میباشد. در واقع احتمال آن وجود دارد که تغییرات متابولیسمی القا شده بواسطه مواد سرطان زای شیمیایی دخانیات بر روی پیلان ژلاتیناز B اثر گذاشته و سبب افزایش پیلان آن شوند و این امر سبب افزایش پیش پیلان پروموتور حامل آلل T میگردد. مواد سرطان زا و گونه های فعال اکسیژن موجود در دخانیات باعث انواع صدمه به DNA میشوند. صدمه به DNA در صورت ترمیم نادرست میتواند باعث انواع موتاسیونها شود که زمینه را برای سرطان ریه مساعد میکند. از جمله تغییرات ژنتیکی بوجود آمده تبدیل C به T میباشد که باعث غیر فعال سازی P53 و فعال سازی K-ras شده و زمینه را برای رشد از هم گسیخته سلول های سرطانی فراهم میکند (۱، ۱۱، ۱۴ و ۲۶). P53 از طریق تخریب ارتباط کمپلکس رونویسی پایه و فعال کننده API پیلان ژلاتیناز B را مهار می کند و از این رو تومورهاهایی که P53 در آنها جهش یافته عملکرد مهارتی از روی پیلان ژن از بین رفته و بنابراین پیلان ژلاتیناز B در این تومورها افزایش می یابد. موتاسیونهای P53 در تومورهای ریه با استعمال دخانیات مرتبط بوده و غالباً موتاسیون تقاطعی G→T ایجاد می کند (۶، ۹، ۱۴، ۱۹ و ۲۶). مواد سرطان زای دخانیات از طریق تجزیه IKB و آزادسازی NF-kB و غیرفعال سازی هستون داسیتلازها پیلان آنزیم ژلاتیناز B را در ریه افزایش می دهند (۴۱).

سو در سال ۲۰۰۵ و سوتر در سال ۲۰۰۸ افزایش سرطان ریه را در افراد سرگاری با ژنوتیپ MMP1 گزارش نمودند (۳ و ۲۰). همچنین هو در سال ۲۰۰۵ و چین در سال ۲۰۰۹ افزایش سرطان ریه را در افراد سرگاری با ژنوتیپ MMP9 گزارش نمودند (۲۳ و ۴۲). در سال ۲۰۰۴ زانگ و همکاران ارتباط مثبت پلی مورفیسم MMP7 و سیگار را در کارسینوما می نشان دادند (۴۳). اما در مطالعه ای که توسط سو در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت افزایش وقوع سرطان ریه در افراد غیرسیگاری گزارش داده شد (۲۰). علت اختلاف در نتایج بدست آمده در تحقیقات مختلف میتواند به دلایل اختلافات محیطی علاوه بر بهمکنش های ایپی ستاتیک، بهمکنش لوکوس های مختلف، مصرف الکل، رژیم غذایی، زمینه ژنتیکی و تفاوت های اتنیک، مطالعات ناپیوسته و نتایج مثبت و منفی کاذب به دلیل اندازه نمونه ای کوچک باشد (۲۳).

نتیجه گیری کلی:

مطالعه حاضر بر روی جمعیت ایران سهم آلل T در بیماران سرطان ریه را بیشتر از افراد کنترل نشان داد. این یافته پیشنهاد می کند که افراد حامل آلل T از لحاظ ژنتیکی برای گسترش سرطان ریه مستعدترند. استعمال دخانیات بیشتر از هر فاکتور دیگر چون سن، جنس و ... خطر ابتلا به سرطان ریه را افزایش میدهد. اهمیت و نتایج این تحقیق می تواند گامی موثر در جهت کنترل سرطان ریه و ایجاد جامعه ای سالم باشد.

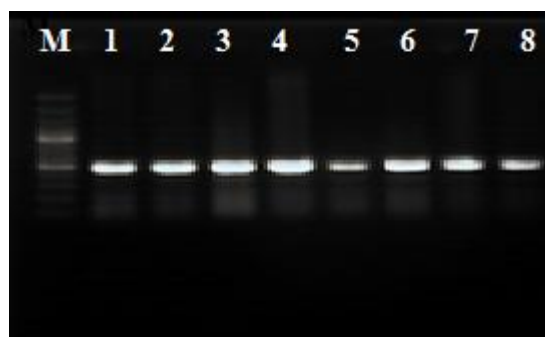
تشکر و قدردانی: از معاونت های پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر کمک های مالی و تجهیزات، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به خاطر فراهم کردن اطلاعات پزشکی و از همکارهای سازمان انتقال خون اصفهان و بیمارستان سید الشهداء برای جمع آوری نمونه ها صمیمانه تشکر میشود.

References:

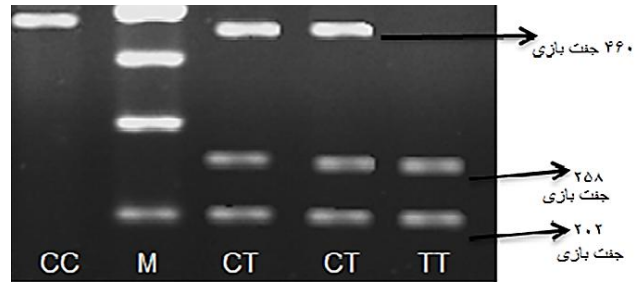
1. Valkoa. M., Rhodesb. J. C., Moncola. J., Izakovica. M., Mazura. M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemical-Biological Interactions*; 160: 1-40.
2. Benhar. M., Engelberg. D., Levitzki. A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO*; 3: 420-425.
3. Sauter. W., Rosenberger. R., Beckmann. L., Kropp. S., Mittelstrass. K., Timofeeva. M. *et al.* (2008). Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. *Cancer*; 17(5): 1127-1135.
4. Joos. L., He. L., Shephrdson. B. M., Connett. E. J., Anthonisen. R. N., Pare. D. P., Sandford. J. A. (2002). The role of Matrix Metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Human Molecular Genetics*; 11: 569-576.
5. Shields. G. P. (2002). Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene*; 21: 6870 -6876.
6. Schwartz. G. A., Pysak. M. G., Bock. H. C., Cot. L. M. (2007). The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis*; 28: 507-518.
7. Miller. C. M., Mohrenweiser. W. H., Bell. A. D. (2001). Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*; 120: 269-280.
8. Law. M. R. (1990). Genetic predisposition to lung cancer. *Br. J. Cancer*; 61: 195-206.
- Lockhart. C. A. *et al.* (2003). Matrix Metalloproteinases, angiogenesis, and cancer. *Clinical Cancer Research*; 9: 551-554.
9. Kiyohara. C. and Ohno. Y. (2010). Sex differences in lung cancer susceptibility: a review. *Gender Medicine*; 7: 381-401.
10. Thangapazham. L. R., Sharma . A., Maheshwari. K. R. (2006). Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS*; 8 (3): E443-E449.
11. Fong. M. K., Sekido. Y., Minna. D. J. (1999). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Thorac Cardiovasc Surg*; 118: 1136-1152.
12. Massion. P. P., Carbone. P. D. (2003). The molecular basis of lung cancer: Molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respiratory Research*; 4: 1-15.
13. Boffetta. P. and Nyberg. F. (2003). Contribution of environmental factor to cancer risk. *British Medical Bulletin*; 68: 71-94.

14. Thomas, L., Doyle, L. A. and J. Edelman, M. (2005). Lung cancer in women biology: emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest*; 128; 370-381.
15. Wu, X., Zhao, H., Suk, R., Christiani, C. D. (2004). Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene*; 23: 6500-6523.
16. Hung, J. R., Brennan, P., Canzian, F., Szeszenia-Dabrowska, N., Zaridze, D., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Foretova, L., Janout, V., Bencko, V., Chabrier, A., Borel, S., Hall, J., Boffetta, P. (2005). Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute*; 97: 567-576.
17. MacKinnon, C. A., Kopatz, J. and Sethi, T. (2010). The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *British Medical Bulletin*; 95: 47-61.
18. Brambilla, E. and Gazdar, A. (2009). Pathogenesis of lung cancer signaling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir*; 33: 1485-1497.
19. Reid, E. M., Santella, R., Ambrosone, B. C. (2008). Molecular epidemiology to better predict lung cancer risk. *Clinical Lung Cancer*; 9: 149-153.
20. Su, L., Zhou, W., Park, S., Wain, C. J., Lynch, J. T., Liu, G., Christiani, C. D. (2005). Matrix Metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk. *Cancer*; 14(3): 567-570.
21. Zhu, Y., Spitz, R. M., Lei, L., Mills, B. G., Wu, X. (2001). A single nucleotide polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Research*; 61: 7825-7829.
22. Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*; 21: 497-503.
23. Jin, G., Miao, R., Hu, Z., Xu, L., Huang, X., Chen, Y., Tian, T., Wei, Q., Boffetta, P., Shen, H. (2008). Putative functional polymorphisms of MMP9 predict survival of NSCLC in a Chinese population. *Cancer*; 124: 2172-2178.
24. Zhang, B., Ye, S., Hermann, S.M., Eriksson, P. de., Matt, M., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Cambien, G., Hamsten, A., Watkins, H. and Henny, A.M. (1999). Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*; 99: 1788-794.
25. Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized Matrix Metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*; 14: 163-176.
26. Singhal, S., Vachani, A., Antin-Ozerkis, D., Kaiser, R. L., Albelda, M. S. (2005). Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: A Review. *Clin Cancer Res*; 11: 3974-3985.
27. Ii, M., Yamamoto, H., Adachi, Y., Maruyama, Y., Shinomura, Y. (2006). Role of Matrix Metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*; 231: 20-27.
28. Nenan, S., Boichot, E., Lagente, V., Bertran, P. C. (2005). Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator?. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*; 100: 167-172.

29. Pinto, A. L., Depner, M., Illig, T., Vogelberg, C., von Mutius, E., Kabesch, M. (2010). MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children. *Respiratory Research*; 11(23): 1-9.
30. Atkinson, J. J., Senior, M. R. (2003). Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*; 28: 12-24.
31. Han, Z., Jun, XU., Zhong, N. (2003). Expression of Matrix Metalloproteinases -9 within the airways in asthma. *Respir Med*; 97: 563-567.
32. Hubner, RH., Meffert, S., Mundt, U., Bottcher, H., Freitag, S., El Mokhtari NE, Pufe T, Hirt S, Folsch UR, Bewig B. (2005). Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Eur Respir J*; 25: 494-501.
33. Fanjul-Fernández, M., Folgueras, R. R., Cabrera, S., López-Otín, C. (2009). Matrix Metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*; 4: 1-17.
34. Kuk Park, J., Ho Park, S., So, K., Bae, H., Do Yoo, Y., Um, H-D. (2010). ICAM-3 enhances the migratory and invasive potential of human non-small cell lung cancer cells by inducing MMP-2 and MMP-9 via Akt and CREB. *International Journal of Oncology*; 36: 181-192.
35. Deryugina, I. E., Quigley, P. J. (2006). Matrix Metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*; 25: 9-34.
36. Wanga, Y., Fanga, S., Weia, L., Wangc, R., Jina, X., Wena, D., Li, Y., Guoa, W., Wang, N., Zhanga, J. (2005). No association between the C-1562T polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*; 49: 155-161.
37. Zhang, B., Henney, A., Eriksson, P., Hamsten, A., Watkins, H., Ye, S. (1999). Genetic variation at the Matrix Metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1; *Human Genetics* 105: 418-423.
38. Decock, J., Paridaens, R., Ye, S. (2008). Genetic polymorphisms of Matrix Metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer. *Clin Genet*; 73: 197-211.
39. Miller, S. A., Dybes, D. D., Polesky, H. F. (1998). A single salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; 16: 1215-25.
40. Van den Steen, PE., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, PM., Dwek, RA, and Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9). *Crit rev Biochem Mol Biol*; 37: 375-536.
41. Hulboy, L. D., Rudolph, A. L., Matrisian, M. L. (1997). Matrix Metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction*; 3: 27-45.
42. Hu, Z., Huo, X., Lu, D., Qian, J., Zhou, J., Chen, Y., Xu, L., Ma, H., Zhu, J., Wei, Q. and Shen, H. (2005). Functional polymorphisms of Matrix Metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res*; 11(15): 5433-5439.
43. Zhang, J., Jin, X., Fang, S., Wang, R., Li, Y., Wang, N., Guo, W., Wang, Y., Wen, D., Wei, L., Dong, Z., Kuang, G. (2005). The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*; 26: 748-753.



شکل ۱: تکثیر ۸ نمونه مختلف در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد با استفاده از تکنیک PCR. نمونه‌های ۱-۴ از افراد سرطانی و نمونه‌های ۵-۸ از افراد کنترل بطور تصادفی انتخاب شده اند، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی اندازه DNA، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ ۷۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات RFLP-PCR بر روی ژل آگارز ۲٪. M: مارکر، CT: ژنوتیپ هتروزیگوت، CC: ژنوتیپ هموزیگوت، TT: ژنوتیپ هموزیگوت

جدول ۱: توزیع آلی و ژنوتیپی ژلانتیناز B در افراد سیگاری و غیرسیگاری

آللویتپ و ژنوتیپ	کنترل		سرطان ریه	
	سیگاری %	غیرسیگاری %	سیگاری %	غیرسیگاری %
C	%۶۰	%۲۹	%۵۰	%۴۵
T	%۴۰	%۷۱	%۵۰	%۵۵
CC	%۴۰	%۰/۰۴	%۲۴/۳	%۳۰
CT	%۴۰	%۴۹	%۵۱/۴	%۳۱
TT	%۲۰	%۴۷	%۲۴/۳	%۳۹

جدول ۲: توزیع ژنوتیپهای ژلاتیناز B در افراد سیگاری و غیرسیگاری

	کنترل			سرطانی			OR(95% CI)	
	CC	CT+TT	TT	CC	CT+TT	TT	CT+TT ^a	TT ^b
سیگاری	۱۲	۱۸	۶	۳	۶۶	۳۲	(۳/۹۵-۵۳/۴۷)۱۴/۶۶	(۱/۲۸-۹/۲۴)۳/۴۵
غیر سیگاری	۱۷	۵۳	۱۷	۱۵	۳۶	۲۰	P=۰/۵۲ عدم ارتباط	(۰/۹۲-۴/۳۷)۲/۰۱

a: ریسک محاسبه شده برای ژنوتیپ های CT+TT در برابر ژنوتیپ CC

b: ریسک محاسبه شده برای ژنوتیپ TT در برابر ژنوتیپ های CC+CT