ارتباط پلی مورفیسم ۱۵۶۲- در ژن کلاژناز تیپ IV با کاهش سن بیماری در بیماران سرطان ریه

دکتر مجید متولی باشی[1]، سمیه تقوایی[2] ، دکتر سیمین همتی[3]

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

آدرس ایمیل: mbashi02@yahoo.co.uk mbashi@sci.ui.ac.ir

تلفن: 09133289133 **تلفن دفتر کار:** ۷۹۳۲۴۷۴

Association of -1562 polymorphism in the collagenase IV with reduction of initiation age of cancer lung

Majid Motovali-Bashi PhD[1], Somayeh Taghvaei MSc[2], Simin Hemmati MD[3]

Abstract:

Background & Aim: Collagenase type IV is capable of degrading type IV collagen, the major structural component of basement membrane and increasing the bioavability of pro-angiogenic factors including vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-β. A cytosine (C) →thymine (T) single nucleotide polymorphism (SNP) at position 1562 in the *collagenase type IV* promoter is reported to affect expression of the gene. The purpose of this study was to investigate the association between the -1562C/T polymorphism and risk of lung cancer in age groups in Iran population.

Methods: Genotyping of -1562 C>T polymorphism in the collagenase IV was performed by taking out genomic DNA from blood samples of 120 lung cancer patients and 100 age matched control by using restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (RFLP-PCR). Chi square exam (SPSS software) was used to calculate adjusted odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI).

Finding: The distribution of C -1562 T genotype in the collagenase IV promoter was significantly associated with the risk of lung cancer in age groups (in group of <60 years).

Conclusion: Our results indicate that -1562 C/T polymorphism in the collagenase IV affects risk of lung cancer in age groups. In this study cancerous people was divided into two groups according to their age. The group of under 60 showed significant relation with initiation of lung cancer (OR=19.89; CI=3.21-120.60).

Key words: Collagenase type IV, RFLP-PCR, promoter polymorphism، Lung cancer.

ارتباط پلی مورفیسم ۱۵۶۲- در ژن کلاژناز تیپ IV با کاهش سن بیماری در بیماران سرطان ریه

دکتر مجید متولی باشی[1]، سمیه تقوایی[2] ، دکتر سیمین همتی[3]

چکیده

سابقه و هدف: کلاژناز تیپ IV قادر به تجزیه کلاژن تیپ IV، جزء ساختاری اصلی غشای پایه، و افزایش قابلیت دسترسی فاکتورهای پروآنژیوژنیک شامل فاکتور رشد اندوتلیال رگی، فاکتور رشد تغییر دهنده β میباشد. گزارش شده که پلیمورفیسم تک نوکلئوتیدی سیتوزین به تیمین در موقعیت ۱۵۶۲ در پروموتور کلاژناز تیپ IV بر بیان ژن اثر میگذارد. هدف از این مطالعه جستجوی ارتباط بین پلیمورفیسم ۱۵۶۲- C/T با خطر سرطان ریه در گروههای سنی در ایران میباشد.

روش بررسی: تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم ۱۵۶۲- C/T ژن کلاژناز IV در ۱۲۰ بیمار سرطان ریه و ۱۰۰ کنترل مشابه از لحاظ سنی توسط استخراج DNA ژنومی از نمونه های خونی با استفاده از تکنیک چند شکلی طولی قطعات DNA با آنزیمهای محدودالاثر- واکنش زنجیرهای پلیمراز (RFLP-PCR) انجام گرفت. آزمون کای مربع (با استفاده از نرم افزار SPSS) به منظور محاسبه ریسک نسبت افزاینده (OR) و ۹۵٪ فاصله اطمینان (۹۵٪CI) استفاده شد.

یافته ها: توزیع ژنوتیپ C-۱۵۶۲ T در پروموتر کلاژناز IV به میزان قابل ملاحظهای با خطر سرطان ریه در گروههای سنی (در گروه کمتر از ۶۰ سال) مرتبط بود.

نتیجهگیری: نتایج ما نشان می دهد که پلیمورفیسم ۱۵۶۲- C/T در ژن کلاژناز تیپ IV بر خطر سرطان ریه در گروههای سنی اثر دارد. در این تحقیق افراد سرطانی به دو گروه بر اساس سن تقسیم شدند. گروه سنی کمتر از ۶۰ سال ارتباط معنی داری با سرطان ریه نشان دادند (OR=۱۹/۸۹، CI=۳/۲۱-۱۲۰/۶۰).

واژگان کلیدی: کلاژناز تیپ IV، RFLP-PCR، پروموتر پلیمورفیسم، سرطان ریه.

مقدمه

سرطان زایی فرآیند چند مرحله ای است که با آنژیوژنیز در محل تشکیل، جدایی سلول از تومور اولیه، ورود به گردش خون، بقاء، مهاجرت به اندام های دور، خروج از رگ های خونی و رشد در محل ثانویه همراه است (۱، ۲ و ۳). سرطان ریه یک بیماری کشنده با نرخ بقاء ۵ ساله ۱۰٪ می‌باشد. گزارشها ی بی‌شماری وجود دارد که نشان میدهد فاکتورهای ژنتیکی در حساسیت به سرطان ریه نقش

دارند(۴ و ۵). آنزیم کلاژناز نوع IV می تواند تهاجم و متاستاز را از طریق تجزیه ماتریکس خارجسلولی، غشاهای پایه و تنظیم چسبندگی سلولی تنظیم کند. علاوه بر تخریب غشای پایه قادر است از طریق برهمکنش‌های پیچیده سلول-سلول و سلول-ماتریکس بر محیط سلولی اثر گذارد (۶ و ۷) و منجر به تکثیر، مرگ برنامه ریزی شده و ریخت زایی شود (۸ و ۱).

آنزیم های کلاژنازی بطور مستقیم یا از طریق پروتیینهای اتصالی قادرند به فاکتورهای رشد نظیر TGF-β، IGF1، TNF-α و HB-EGF متصل شوند و مانع اتصال فاکتورها به رسپتورها یشان شوند (۹ و ۱۰). علاوه بر این خانواده آنزیم های تجزیه کننده ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژناز نوع IV در تنظیم فعالیت ملکول‌های فعال زیستی مرتبط با فیزیولوژی سلول در گیر میباشند. این ملکول‌ها شامل سیتوکین و کموکینها، فاکتورهای رشد و رسپتورها یشان و ملکول های چسبندگی سلول می باشند (۱۱). هورمونهای چندگانه، سیتوکینها و فاکتورهای رشد قادرند بیان اینگونه آنزیم ها را القاء کنند (۱۲). از طرفی این آنزیم ها می توانند در مراحل رشد سرطان شرکت و بیان بالای آن ها با افزایش خطر ریسک سرطانزایی گزارش شده است (۱۳).

ژن آنزیم کلاژناز IV در موقعیت 20q12.2-13.1، قرار گرفته است (۱۴) که به عنوان کلاژناز ۹۲ کیلودالتونی نیز شناخته شده و در بسیاری از سرطانهای انسانی از جمله سرطان ریه افزایش بیان نشان داده است (۱۵). پروموتور کلاژن تیپ IV در یک منطقه ۲/۲ کیلوبازی مجاور انتهای ´۵ ژن قرار گرفته است (۱۶)، که دارای جایگاه اتصال فاکتورهای نسخه برداری شامل SP1، AP1، STAT، PEA3، NF-kB، RAR/RXR و TCF/LEF می‌باشد (۱۷). کلاژن تیپ IV از طریق اثرگذاری بر IGFBP3 باعث افزایش قابلیت دسترسی IGF و افزایش رشد سلولی میشود (۸ و ۱۸)، شکل ۱ عملکرد کلاژن تیپ IV در فعال‌سازی سیتوکینها، فاکتورهای رشد و مسیرهای پیامرسانی AKT و MAPK را نشان میدهد که در نهایت باعث افزایش بیشتر بیان ژن کلاژن تیپ IV و فرآیندهای رشد و ... میشود.

تعداد کمی از SNP ها در ژنوم انسان از نظر عملکردی فعال میباشند . اثر عملکردی SNP توسط مکان آن تعیین میشود، برای مثال SNP در مناطق تنظیمی بر میزان نسخه‌برداری اثر میگذارد، SNP در جایگاههای پیوایش بر پیوایش mRNA اثر می‌گذارد، SNP در 3´UTR بر پایداری mRNA اثر میگذارد و SNP در نواحی کدینگ باعث جایگزینی آمینو اسید در پروتیین مربوطه می شود (۱۹ و ۲۰). پلی مورفیسم C/T در بالادست جایگاه شروع نسخه برداری و در موقعیت ۱۵۶۲- ژن کلاژناز نوع IV قرار دارد، وجود این پلی مورفیسم باعث از بین رفتن محل اتصال پروتئین های سرکوب کننده نسخه برداری شده و بنابراین بیان کلاژناز نوع IV را افزایش می دهد (۱۴ و ۲۰).

روشها

۱۷۲ فرد مبتلا به سرطان ریه و ۲۰۰ فرد کنترل بعد از جمع آوری اطلاعات کلینیکوپاتولوژیکی مورد نمونهگیری خون قرار گرفتند. نمونههای خون افراد سرطانی از مرکز پژوهشی درمانی سل و بیماریهای ریوی مسیح دانشوری تهران و افراد کنترل از سازمان انتقال

خون تهیه شد. ۵ میلی لیتر خون وریدی از هر فرد تهیه و در ون لوله های حاوی EDTA انتقال و سپس در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش میلر (۲۱) با تغییرات مختصر انجام گرفت. شکل ۲ نمونهای از تصویر الکتروفورز DNA استخراج شده ژنومی افراد کنترل و بیمار را نشان میدهد. از آن جا که تکثیر DNA توسط تکنیک PCR ارتباط بالایی به کیفیت و خلوص DNA دارد، بنابراین میزان جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نیز غلظت محلول DNA بر حسب نانوگرم در میکرولیتر توسط اسپکتروفتومتری بدست آمد.

تکثیر منطقه حاوی پلی مورفیسم با استفاده از تکنیک PCR

قطعه ای از DNA واجد ناحیه پلی مورفیسم مورد نظر با استفاده از تکنیک PCR با استفاده از پرایمر بالادست: 5´-ATATAAAATGCCTGGCACATAGTA-3´ و پایین دست: 5´-CTCCCTCACTCCTTTCTTC-3´ تکثیر داده شد. پس از بهینه سازی های متعدد تکثیر بهینه در شرایط واکنشی: نمونه DNA ژنومی (۱۵۰ng)، ۲/۵µl بافر 10X PCR، ۰/۷۵µl کلرید منیزیم ۵۰ میلیمولار، ۰/۵µl dNTP ۱۰ میلیمولار، پرایمر بالادست ۲۰pm، پرایمر پایین دست ۲۰pm، Taq پلیمراز ۰/۳µl و dH2O تا رسیدن به ۲۵µl در شرایط دمایی: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد سپس ۳۰ سیکل: ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه جفت شدگی در ۶۵ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه تکثیر در ۷۲ درجه سانتیگراد و سپس ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت. سپس محصولات روی ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند(شکل ۳).

انجام RFLP بر روی محصولات PCR

آللهای مختلف را میتوان از طریق برش یا عدم برش در توالی تکثیر یافته از یکدیگر افتراق داد. در صورت وجود توالی قابل شناسایی توسط آنزیم محدودالاثر، برش در داخل قطعه تکثیر یافته DNA رخ داده و باند اولیه به دو باند کوچکتر شکسته میشود. آنزیم *Sph1* قادر است آلل T را در یک ناحیه بریده و دو قطعه به طولهای ۲۵۸ و ۲۰۲ جفتبازی تولید کند که توسط ژل ۲ درصد از همدیگر قابل تفکیکاند. اما آلل C توسط آنزیم *Sph1* برش نمی خورد و بعد از الکتروفورز یک قطعه کامل ۴۶۰ جفتبازی تولید می کند، در حالت هتروزیگوت هر سه باند قابل مشاهده خواهد بود. هضم آنزیمی توسط ۲/۵ واحد آنزیم *Sph1* و ۱ میکرولیتر بافر آنزیم و انکوباسیون به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. سپس الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد در ولتاژ ۶۰ ولت به مدت ۷۵ دقیقه انجام شد (شکل ۴).

آنالیزهای آماری

در مطالعه حاضر با استفاده از ژنوتیپ های بدست آمده از RFLP، فراوانی ژنوتیپی در گروه های مورد مطالعه محاسبه گردید. در صورت مستقل بودن دو متغیر تصادفی جهت مقایسه آن ها می‌توان از آزمون $\chi 2$ استفاده نمود. بنابراین در مطالعه حاضر نیز به منظور بررسی اختلاف فراوانی توزیع ژنوتیپی موجود در گروه‌های مجزای مورد مطالعه، این آزمون مورد استفاده قرار گرفت. سپس اختلاف میانگین سنی در گروههای سرطان ریه و کنترل با استفاده از آزمون **T** محاسبه و در مرحله بعد اختلاف در توزیع ژنوتیپ کلاژناز نوع IV در گروه های مطالعه شده با استفاده از آزمون کای مربع مورد بررسی قرار گرفت. نسبت افزاینده (OR) با فاصله اطمینان ۹۵٪ به عنوان شاخص ارتباط پلی‌مورفیسم ژنوتیپ کلاژناز نوع IV با ریسک سرطان ریه در گروه‌های مورد مطالعه محاسبه گردید، در تمامی محاسبات سطح احتمال P <۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار فرض شده و مورد قبول واقع گردید.

یافته ها:

DNA ژنومی نمونه های بیمار و کنترل استخراج و نمونه هایی که واجد سرطان از نوع سابقه فامیلی بودند از روند مطالعه حذف گردیدند. نمونه هایی که واجد جذب نوری ۲-۱/۸ نانومتر بودند جهت مطالعات بعدی در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری و استخراج سایر نمونه ها مجددا تکرار گردید. تکنیک RFLP-PCR بر روی کلیه نمونه ها انجام و ژنوتیپ آن ها مورد شناسایی قرار گرفت، این تکنیک به طور تصادفی در برخی از نمونه ها به تعداد سه مرتبه تکرار گردید. در مطالعه حاضر افراد سرطانی از میانگین سنی بالاتری (۱۵ ± ۵۵) نسبت به افراد سالم (۲۰ ± ۵۵) برخوردار بودند، ولی محاسبات آماری نشان داد که این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. در مرحله بعد افراد بیمار به دو گروه کمتر از ۶۰ سال و بالای ۶۰ سال تقسیم و توزیع ژنوتیپ کلاژناز نوع IV در دو گروه مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات آماری نشان داد که افراد با ژنوتیپ CT+TT ((OR=۴/۶۰; CI=(۲/۱۳-۹/۹۵)) ریسک خطر حدود ۴/۵ برابری و افراد با ژنوتیپ TT (OR=۱۹/۸۹ CI=(۳/۲۱-۱۲۰/۶۰)) ریسک خطر حدود ۲۰ برابری جهت ابتلا به بیماری سرطان ریه در افراد گروه سنی زیر ۶۰ سال نسبت به افراد بالای ۶۰ سال دارند (جدول شماره ۱).

بحث:

بیماری سرطان می‌تواند در اثر تجمع جهش ها بروز کند و به دلیل نیاز به زمان جهت تجمع جهش ها معمولا سرطان در سنین بالا دیده می شود (۲۲). از طرفی برخی از آسیب ها به ژنوم مثل تاثیر رادیکال های آزاد، اکسیدان های تولید شده در روند فعالیت های متابولیسمی و تشعشعات یونیزه کننده می توانند ماهیت تجمعی داشته باشند و بنابراین با افزایش سن و تجمع باعث بروز جهش و سرطان شوند (۲۳). در این تحقیق میانگین سنی افراد سرطانی بیشتر از افراد سالم بود اما محاسبات آماری نشان داد که تفاوت معنی دار نمی باشد. ولی وقتی افراد سرطانی به دو گروه از لحاظ سنی زیر ۶۰ و بالای ۶۰ سال تقسیم بندی شدند، افراد با ژنوتیپ TT ارتباط تقریبا ۲۰ برابری با سرطان ریه نشان دادند.

نتایج این تحقیق می تواند گویای این مسئله باشد که ایجاد سرطان ریه در افراد جوانتر بدلیل تجمع عوامل سرطانزا و محیطی از جمله سیگار نمی باشد. از دلایل مهم دیگر ایجاد سرطان عوامل ژنتیکی است که بعضا با همکاری سایر عوامل محیطی و غیر محیطی می توانند در مرحله خاصی باعث بروز سرطان شوند. ارتباط آماری آلل T با شکل گیری سرطان ریه در مطالعه حاضر می تواند گویای ارتباط ژنتیکی شکل گیری سرطان ریه در جمعیت افراد زیر ۶۰ سال باشد. آلل T به دلیل از بین بردن جعبه سرکوب کننده بیان ژن باعث افزایش بیان ژن می گردد (۱۴ و ۲۰). از طرفی مطالعات نشان داده است که افراد جوان نسبت به افراد مسن دچار تغییرات دائمی بیشتری می شوند بنابراین نیاز آن ها به بیان آنزیم های کلاژناز بیشتر می باشد (۲۴). با توجه با دانش کنونی، مطالعه حاضر اولین گزارش از ارتباط پلی مورفیسم در منطقه تنظیمی ژن کلاژناز نوع IV با کاهش سن سرطان ریه میباشد . در مطالعه‌ای که توسط صادقی و همکاران در سال ۲۰۰۹ در اصفهان انجام گرفت این پلیمورفیسم با کاهش سن بدخیمی سرطان پستان ارتباط نشان داد (۲۵). نتیجه گیری قطعی نیاز به مطالعات گسترده تر در آینده و تکرار آزمایشات در جمعیت های بزرگتری در سطح ایران می باشد.

نتیجه گیری کلی:

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می توان ادعا نمود که آلل T در همکاری با سایر ژن های دخیل در شروع سرطان ریه، شرایط را برای شکل گیری سلول‌های سرطان در جمعیت مورد مطالعه فراهم ساخته و بدین ترتیب سن شروع سرطان ریه را در افراد واجد این ژنوتیپ تا حدودی کاهش میدهد.

منابع:

1. Lockhart، C. A، et al. (2003). Matrix Metalloproteinases، angiogenesis، and cancer. Clinical Cancer Research; 9: 551-554.

2. Chambers، F، A.، Matrisian، M. L. (1997). Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in metastasis. Journal of the National Cancer Institute; 89: 1260-1270.

3. Deryugina، I.، Quigley، E. P، J. (2006). Matrix Metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev; 25: 9-34.

4. Forgacs، E.، Zochbauer-Moller، S.، Olah، E.، Minnn، J. D. (2001). Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. Pathology Oncology Research; 7: 1-8.

5. Risch، A، and Plass، C. (2008). Lung cancer epigenetics and genetics. J. Cancer; 123: 1-7.

6. Suk Heist، R.، Marshall، L . A.، Liu، G.، Zhou، W.، Su، L.، Neuberg، D.، Wain، L.، Christiani، D. C. (2006). Matrix Metalloproteinase polymorphisms and survival in stage I Non small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2006; 12(18): 5448-5453.

7. Mcgowan، E، S، (1992)، Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair، FASEB; 6: 2895-2904.

8. Vu، H. T.، ena، W. Matrix Metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. (2000). Genes & Development; 14:2123-2133.

9. Schultz، G. S.، Wysocki، A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. Wound Rep Reg ; 17: 153-162.

10. Somerville، P. T، R.، Oblander، A. S.، Apte، S. A. (2003). Matrix Metalloproteinases: old dogs with new tricks. Genome Biol; 4(6): 216.

11. Chaussain-Miller، C.، Fioretti، F.، Goldberg، M، and Menashi، S. (2006). The role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res; 85(1): 22-32.

12. 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.

13. 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.

14. Wanga، Y.، Fanga، S.، Weia، L.، Wangc، R.، Jina، X.، Wena، D.، Li، Y.، Guoa، W.، Wanga، N.، Zhanga، J. (2005). No association between the C-1562Tpolymorphism in the promoter of matrixmetalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma .Lung Cancer; 49: 155-161.

15. 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.

16. Atkinson، J. J.، Senior، M. R. (2003). Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol; 28: 12-24.

17. Woessner، F.، Nagase، H. (2000). Matrix Metalloproteinases and TIMPs. Oxford، UK: Oxford Univ Press: 223.

18. 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.

19. Decock، J.، Paridaens، R.، Ye، S. (2008). Genetic polymorphisms of Matrix Metalloproteinases in lung، breast and colorectal cancer. Clin Genet; 73: 197-211.

20. 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.

21. Miller ،S. A.، Dybes، D. D.، Polesky، H. F. (1998). A simple salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res; 16: 1215-25.

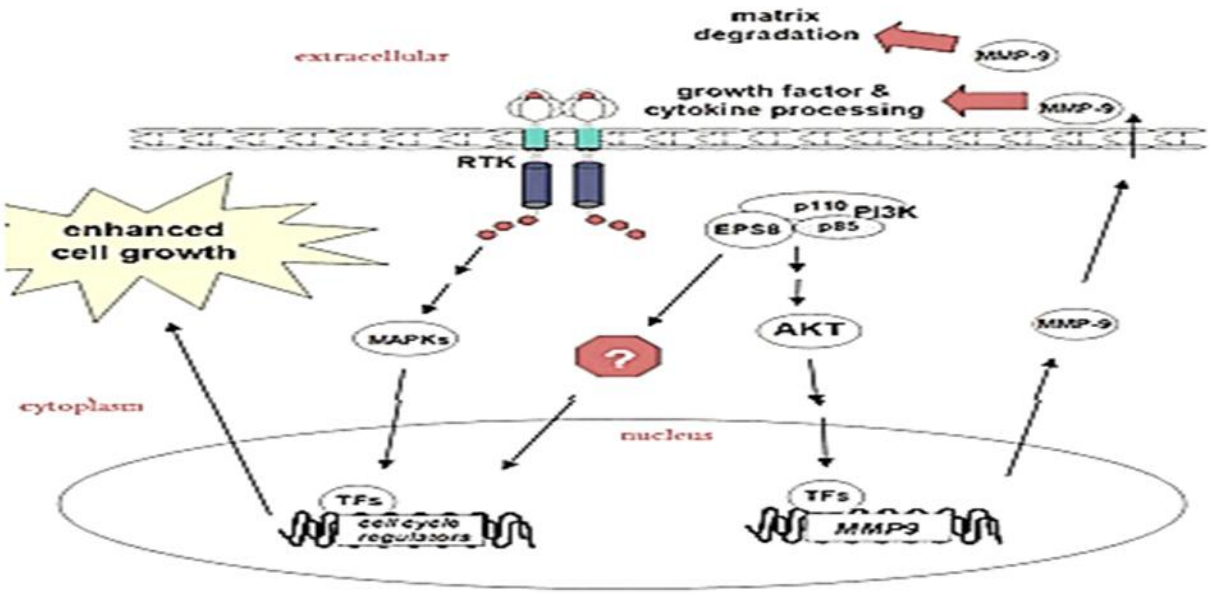
22. Benbow، U.، Schoenermark، M. P.، Mitchell، T. I.، Rutter، J. L.، Shimokawa، K.، Nagase، H، and Brinckerhoff، C. E. (1999). A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. J. B. Chem. 274: 25371-25378.

23. Miller، C. M.، Mohrenweiser، W. H.، Bell، A. D. (2001). Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. Toxicology Letters; 120: 269-280.

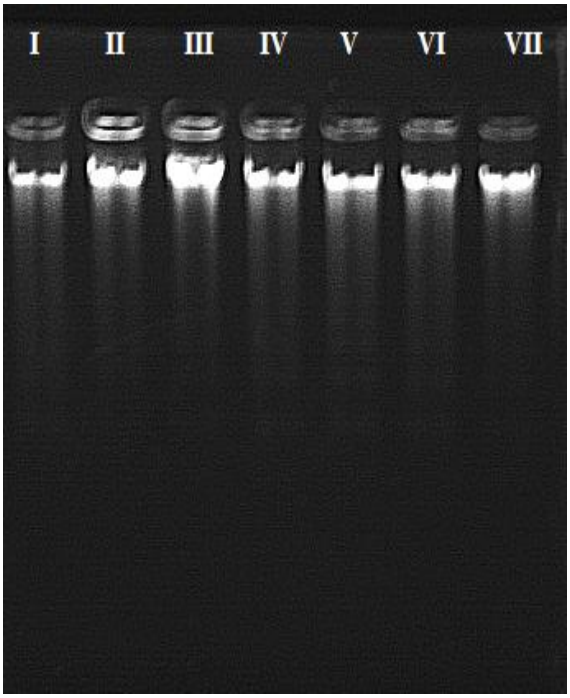
24. Massion، P. P.، Carbone، P. D. (2003). The molecular basis of lung cancer: Molecular abnormalities and therapeutic implications. Respiratory Research; 4: 1-15.

25. Sadeghi ،M.، Motovali-bashi ،M.، Hojati ،Zohreh. (2010). Collagenase gene nucleotide polymorphism IV 1562 age and type of malignancy in patients with breast cancer. Journal of babol university of medical sciences; 10: 7-13.

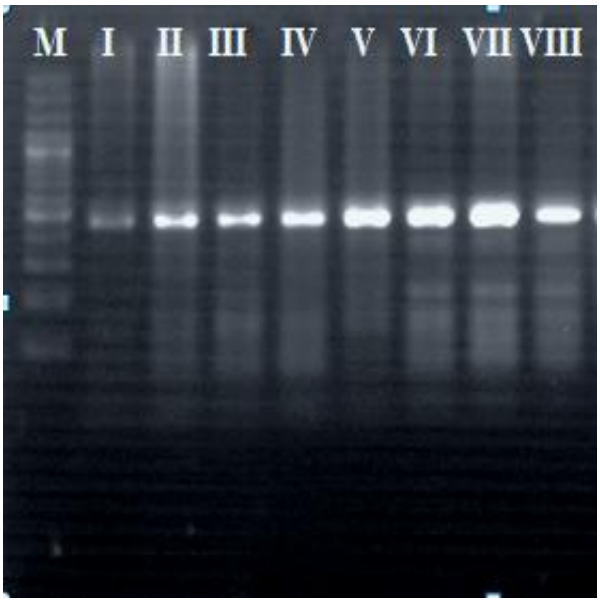
MMP-9 gene.



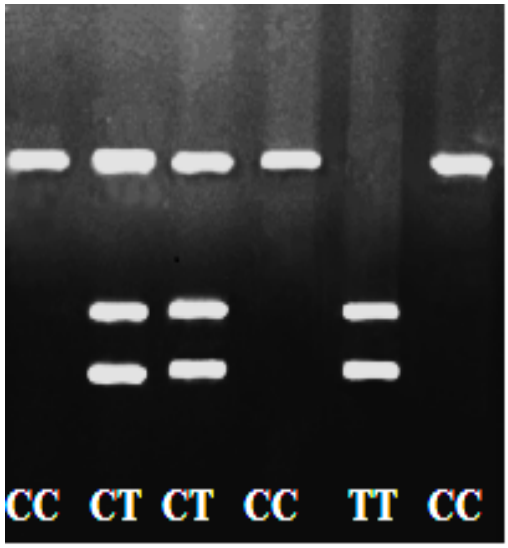
شکل ۱: نقش آنزیم کلاژناز نوع IV و مسیرهای سیگنالینگ MAPK و AKT در افزایش رشد سلول: پردازش فاکتورهای رشد توسط آنزیم کلاژناز نوع IV که از طریق فعالسازی مسیرهای پیامرسانی AKT/PI3K و MAPK باعث افزایش رشد و بیان بیشتر ژن کلاژناز نوع IV میشود .


I
II
III
IV
V
VI
VII

شکل ۲ : الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از افراد بیمار و کنترل. نمونه های I ، II و III افراد کنترل و نمونه های IV ، V ، VI و VII افراد بیمار می باشد.


M
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII

شکل ۳ : الکتروفورز قطعه DNA تکثیر شده حاوی ناحیه پلی مورفیسم با استفاده از تکنیک PCR . نمونه های I ، II ، III و IV قطعه تکثیر یافته از DNA ژنومی افراد کنترل و نمونه های V ، VI ، VII و VIII قطعه تکثیر یافته از DNA ژنومی افراد بیمار. M : شناساگر DNA ۱۰۰ جفت بازی.


CC
CT
CT
CC
TT
CC

شکل ۴: تصویر ژل الکتروفورز نمونه های RFL-PCR واجد ژنوتیپهای CC، CT و TT. افراد CT سه باند به ترتیب از پایین: ۲۰۲، ۲۵۸ و ۴۶۰ جفت بازی و فرد TT دو باند ۲۰۲ و ۲۵۸ جفت بازی و افراد CC فقط یک باند ۴۶۰ جفت بازی بعد از هضم انزیمی ایجاد نمودهاند.

جدول ۱: ارتباط ژنوتیپ های کلاژناز نوع IV و سن شروع بیماری.

	سرطانی			OR(95%CI)	
	CC	CT+TT	TT	CT+TT[a]	TT[b]
تعداد افراد کمتر از ٦٠ سال	١	٥٥	٣٥	۴/۶٠(٢/١٣-٩/٩٥)	١٩/٨٩(٣/٢١-١٢٠/۶٠)
تعداد افراد بالای ٦٠ سال	١٧	۴٧	١٧	٠/٠٥ (٠/٠٠٨-٠/٣١)	٠/٢(٠/١-٠/۴۶)

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

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