

تغییر تک نوکلئوتیدی rs1800247 پروموتور ژن استئوکلسین در بیماران مبتلا به کارسینوم مدولاری تیروئید

جبار لطفی^۱، دکتر محمد تقی خانی^۲، مرجان ظریف یگانه^۳، سارا شیخ الاسلامی^۳، دکتر مهدی هدایتی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کارسینوم مدولاری تیروئید توموری بدخیم با منشأ سلول‌های پارافولیکولار تیروئید می‌باشد. استئوکلسین مهم‌ترین پروتئین غیر کلاژنی استخوان است و ژن آن بر روی کروموزوم شماره ۱ قرار دارد. پلی مورفیسم مهم در پروموتور ژن استئوکلسین در محل ۲۹۸- (rs1800247) می‌باشد که در آن باز C به T تبدیل می‌شود. در این مطالعه، جهت بررسی حضور این پلی مورفیسم در بیماران مبتلا به کارسینوم مدولاری تیروئید، پروموتور ژن استئوکلسین مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: تعداد افراد بیمار و سالم شامل ۲۰۰ نفر بودند که ۱۰۶ نفر آنان را مرد و ۹۴ نفر آنان را زن تشکیل می‌دادند (۱۰۰ نفر بیمار یا مورد و ۱۰۰ نفر به عنوان شاهد). میانگین سنی در جمعیت بیمار ۱۱/۳ ± ۳۵/۰ سال و در گروه شاهد ۱۳/۸ ± ۳۷/۰ سال بود. DNA ژنومی نمونه‌ها پس از استخراج، به روش نمک اشباع/ پروتئیناز K با روش PCR-sequencing (Polymerase Chain Reaction-sequencing) تحت مطالعه قرار گرفتند. داده‌ها با آنالیز آماری لجستیک رگرسیون و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: در گروه مورد، فراوانی ژنوتیپی هموزیگوت CC ۷ درصد، هموزیگوت TT ۴۸ درصد و هتروزیگوت CT ۴۵ درصد بود. در گروه شاهد، فراوانی‌های ژنوتیپی به شرح زیر بود: CC ۸ درصد، TT ۵۵ درصد و CT ۳۷ درصد بود. در گروه مورد، فراوانی آلی C ۲۹/۵ درصد و فراوانی آلی T ۷۰/۵ درصد و در گروه شاهد فراوانی آلی C ۳۵/۵ درصد و فراوانی آلی T ۶۴/۵ درصد بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بین فراوانی آلی و ژنوتیپی در دو گروه بیمار و سالم تفاوت معنی‌داری دیده نشد، از این رو، پلی مورفیسم ذکر شده با بیماری ارتباطی ندارد و همچنین این تغییر تک نوکلئوتیدی، با بروز بیماری ارتباط ندارد.

واژگان کلیدی: کارسینوم مدولاری تیروئید، پروموتور ژن استئوکلسین، پلی مورفیسم

ارجاع: لطفی جبار، تقی خانی محمد، ظریف یگانه مرجان، شیخ الاسلامی سارا، هدایتی مهدی. تغییر تک نوکلئوتیدی rs1800247 پروموتور ژن استئوکلسین در بیماران مبتلا به کارسینوم مدولاری تیروئید. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۶): ۲۲۰-۲۲۷

مقدمه

سرطان‌ها در انسان می‌باشد (۱). این سرطان به چهار نوع پاپیلاری، مدولاری، فولیکولار و آناپلاستیک طبقه بندی می‌شود. کارسینومای مدولاری تیروئید

سرطان تیروئید شایع‌ترین سرطان بدخیم غدد اندوکرین و مسؤول بروز حدود ۱ درصد کل

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: hedayati@endocrine.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهدی هدایتی

تیروئید، غلظت استئوکلسین نسبت به افراد سالم بالاتر است (۱۲). در مطالعه‌ی Lian و همکاران دیده شد که ناحیه‌ی پروموتوری مورد مطالعه در این تحقیق، ناحیه‌ی بسیار مهمی در تعیین میزان بیان ژن استئوکلسین می‌باشد (۱۳).

همان‌طور که پیش از این گفته شد، کارسینومای مدولاری تیروئید از منشأ سلول‌های C می‌باشد که در متابولسیم کلسیم با تولید و ترشح هورمون کلسی‌تونین تأثیرگذار است و با پروتئین‌های درگیر در روند استخوان‌سازی از قبیل استئوکلسین در ارتباط هستند. بنابراین، سؤالاتی مطرح بودند که «آیا در بدخیمی سلول‌های پارافولیکولار غده‌ی تیروئید، این تغییر تک نوکلئوتیدی در پروموتور ژن استئوکلسین مشاهده می‌گردد؟» و «آیا می‌توان از وجود احتمالی آن در تشخیص ژنتیکی کارسینومای مدولاری تیروئید استفاده کرد؟».

در نهایت، در این مطالعه به منظور بررسی وجود احتمالی پلی مورفیسم ذکر شده با سرطان مدولاری تیروئید و همچنین درک بیشتر ارتباط کارسینوم مدولاری تیروئید با بافت استخوان و استفاده از آن به عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای تشخیص کارسینوم فوق، ناحیه‌ی پروموتوری ژن استئوکلسین مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

در این تحقیق، ۱۰۰ نفر بیمار مبتلا به کارسینومای مدولاری تیروئید به صورت پایلوت به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ نفر از افراد سالم به عنوان گروه شاهد بودند. این افراد به صورت داوطلبانه و پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. بر اساس شواهد

(MTC یا Medullary thyroid cancer) از سلول‌های پارافولیکولار منشأ می‌گیرد و به دو صورت تک گیر (۷۵ درصد موارد) و ارثی (۲۵ درصد موارد) دیده می‌شود. این نوع حدود مسؤل ۱۰-۵ درصد از سرطان‌های تیروئید می‌باشد (۴-۲).

استئوکلسین که به عنوان گاما کربوکسی گلوتامیک اسید استخوان نیز مطرح است. استئوکلسین مهم‌ترین پروتئین غیر کلاژنی استخوان است و در استخوان و دندان‌ها یافت می‌شود. استئوکلسین نشانگر ساخت استخوانی است و کربوکسیلاسیون آن وابسته به ویتامین K می‌باشد. این زنجیره‌ی پلی پپتیدی حاوی ۴۹ اسید آمینه با وزن مولکولی ۵/۸ کیلو دالتون است. در انسان ژن استئوکلسین بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱ قرار دارد (q۳۱-q۲۵) که در سطح نسخه‌برداری توسط ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D_۳ کنترل می‌شود (۷-۵). استئوکلسین ابتدا به صورت پره-پرو استئوکلسین حاوی ۹۸ اسید آمینه سنتز می‌شود و پس از مراحل پردازش به صورت استئوکلسین بالغ پدیدار می‌گردد (۸).

یکی از مهم‌ترین نواحی پلی مورفیک در ژن استئوکلسین واقع در نوکلئوتید شماره‌ی ۲۹۸ می‌باشد که برای اولین بار توسط Dohi و همکاران گزارش شد (rs۱۸۰۰۲۴۷) (۹). در این تغییر تک نوکلئوتیدی، باز C تبدیل به باز T می‌شود که ۱۹۸ نوکلئوتید بالاتر از آگزون شماره‌ی ۱ ژن استئوکلسین است (۹). در تعدادی از مطالعات، وجود رابطه بین این پلی مورفیسم و بروز برخی سرطان‌ها به اثبات رسیده است (۱۱-۱۰).

همچنین در مطالعه‌ی Simionescu و همکاران مشخص شد که در بیماران مبتلا به بیماری‌های

مدت ۱ دقیقه، واکنش Annealing در دمای ۵۷/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه، واکنش Extension در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، واکنش Final extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه و در مجموع، در ۳۰ سیکل توسط دستگاه Thermal cycler (TC-XP-E) ساخت شرکت Bioner (چین) به انجام رسید.

در انجام تمامی مراحل، میکروتیوب‌ها در ظرف یخ قرار گرفته بودند. پس از انجام واکنش در شرایط پیش‌گفته، جهت تأیید تکثیر DNA مورد نظر از ژل پلی‌آکریل آمید (۸ درصد) تانک کوچک (شرکت پایا پژوهش تهران)، ولتاژ ۲۰۰ مدت زمان ۹۰ دقیقه، استفاده گردید. پس از انجام الکتروفورز، ژل‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نترات نقره، رنگ‌آمیزی و بررسی شدند. سپس محصولات جهت انجام تعیین توالی بر اساس پرایمر Forward به میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به کشور کره‌ی جنوبی ارسال شد. پس از تعیین توالی، سکانس‌ها توسط نرم‌افزار Chromas مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت اطمینان از وجود تغییر تک نوکلئوتیدی در پایگاه NCBI (National Center for Biotechnology Information) تحت BLAST (Basic local alignment search tool) کردن قرار گرفتند (شکل ۱).

سپس برای بررسی ارتباط ژنوتیپی افراد مورد مطالعه با بیماری و همین‌طور بررسی ارتباط آلل‌ها، از روش رگرسیون لجستیک مقادیر Odds ratio و Confidence interval به دست آمد و با مقدار P به دست آمده، ارتباط فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) بررسی شد.

آسیب شناختی وجود MTC در افراد مبتلا در بیمارستان‌های دانشگاهی و مراکز درمانی نقاط مختلف کشور به تأیید پاتولوژیست رسیده بود و جهت انجام اقدامات درمانی بیشتر به بیمارستان طالقانی تهران و پژوهشکده‌ی غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارجاع داده می‌شدند. برای تعیین ژنوتیپ و فراوانی آللی، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی از افراد اخذ و سپس DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع/ پروتئیناز K استخراج شد. برای اطمینان از کیفیت و خلوص DNA به دست آمده، نسبت جذب نوری نمونه‌ها در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این مطالعه، از پرایمرهایی استفاده شد که در مطالعه‌ی Dohi و همکاران مورد استفاده قرار گرفتند (۹) که توالی آن‌ها به صورت زیر می‌باشد:

Forward: ۵'-AGGCAGTGTCAAGAGC-۳'

Reverse: ۵'-CAATAGGGCGAGGAGT-۳'

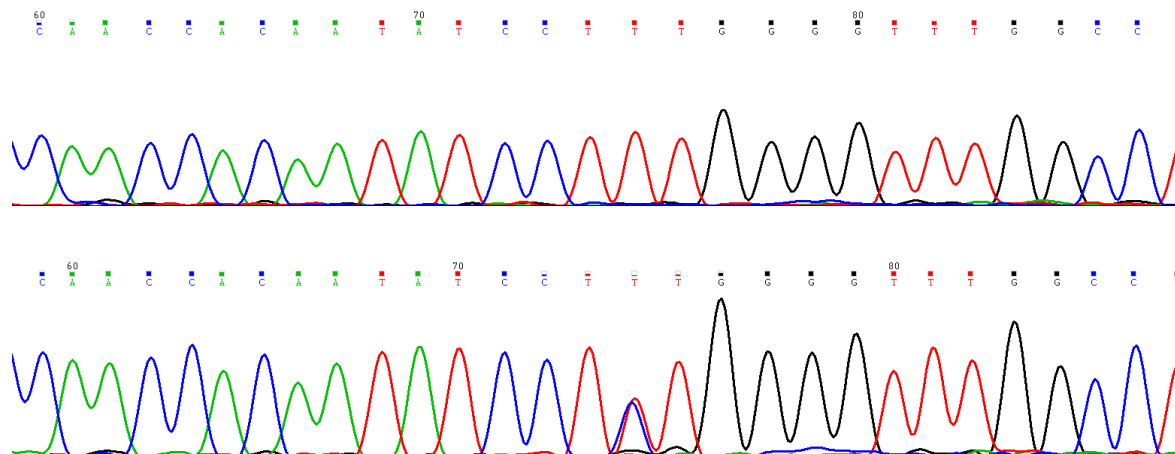
این پرایمرها قطعه‌ای به طول ۳۲۶ جفت باز را در ناحیه‌ی پروموتور ژن BGLAP (Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein) تکثیر می‌نمایند. واکنش PCR (Polymerase chain reaction) در میکروتیوب‌های لیوفلیزه آماده‌ی PCR (Premix, Bioneer, Korea) با اضافه کردن پرایمر Forward و Reverse هر کدام به مقدار ۰/۷ μM (۱۰ pmol/ μl)، DNA به مقدار ۱۰۰ ng/ μl (۱ μl) و DMSO (Dimethyl sulfoxide) به مقدار ۱/۵ μl و آب مقطر استریل به حجم ۲۵/۹ μl در حجم نهایی ۳۰ μl انجام گرفت.

شرایط بهینه برای انجام واکنش PCR نیز به قرار زیر بود: دمای Denaturation اولیه‌ی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، Denaturation ثانویه به

یافته‌ها

جمعیت مورد مطالعه ۲۰۰ نفر شامل ۱۰۰ نفر بیمار (گروه مورد) و ۱۰۰ فرد سالم (گروه شاهد) بودند. گروه مورد شامل ۵۱ نفر مرد و ۴۹ نفر زن بودند. در گروه شاهد تعداد ۵۵ نفر مرد و ۴۵ نفر زن بودند. میانگین سن در گروه مورد $35/0 \pm 11/3$ سال و در گروه شاهد $37/0 \pm 13/8$ سال بود. در گروه مورد، فراوانی ژنوتیپی هموزیگوت CC ۷ درصد، هموزیگوت TT ۴۸ درصد و هتروزیگوت CT ۴۵

درصد به دست آمد. در گروه شاهد، فراوانی‌های ژنوتیپی به شرح CC ۸ درصد، TT ۵۵ درصد و CT ۳۷ درصد بود. فراوانی آللی C در جمعیت بیماران $29/5$ درصد و فراوانی آللی T $70/5$ درصد، در گروه شاهد فراوانی آللی C $35/5$ درصد و فراوانی آللی T $64/5$ درصد مشاهده گردید. همان‌طوری که در جداول ۱ و ۲ دیده می‌شود، این تغییر تک نوکلئوتیدی با بیماری ارتباط معنی‌داری نداشت.



شکل ۱. نتیجه‌ی تعیین توالی DNA در ناحیه‌ی پرموتری ژن استنوکلسین. پیک مشخص‌شده‌ی شکل بالا، توالی DNA طبیعی و شکل

پایین تغییر تک نوکلئوتیدی مورد انتظار (T > C) را که به صورت هتروزیگوت می‌باشد، نمایش می‌دهد.

جدول ۱. فراوانی ژنوتیپی rs1800247 در دو گروه مورد و شاهد

مقدار P	OR	CI	گروه مورد (n = 100)	گروه شاهد (n = 100)	Genotype
-	1 (Reference)	-	7 (7)	8 (8)	CC
0/48	1/47	0/4-4/6	48 (48)	37 (37)	TT
0/9	0/9	0/3-2/9	45 (45)	55 (55)	CT

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval

جدول ۲. فراوانی آللی rs1800247 در دو گروه مورد و شاهد

مقدار P	OR	CI	گروه شاهد	گروه مورد	Allele type
-	1 (Reference)	-	71 (35/5)	59 (29/5)	C
0/2	1/31	0/86-2	129 (64/5)	141 (70/5)	T

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval

بحث

همان‌گونه که اشاره شد، MTC کارسینوما می‌باشد که بهبودی آن به میزان بالایی به تیروئید است که بهبودی آن به میزان بالایی به تشخیص زود هنگام آن بستگی دارد. کشف آل‌های جهش یافته در بیماران، توارث بیماری را پیش‌بینی می‌کند و اساسی برای تیروئیدکتومی پیشگیرانه در کودکان فراهم می‌کند. در این مطالعه به منظور بررسی ارتباط تغییر تک نوکلئوتیدی در ناحیه‌ی پروموتوری ژن استئوکلسین با وجود کارسینوم مدولاری تیروئید، نمونه‌ی DNA ۲۰۰ نفر با روش PCR-Sequencing مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، مشاهده شد که فراوانی آللی و ژنوتیپی افراد مبتلا به بیماری با افراد سالم تفاوتی ندارد. در تمامی پژوهش‌هایی که از گذشته تا به حال انجام گرفته‌اند، از روش RFLP (Restriction fragment length polymorphism) استفاده شده است که در مقایسه با روش Sequencing از لحاظ علمی، اعتبار کمتری دارد و از طرفی، شناسایی تغییرات تک نوکلئوتیدی جدید را امکان پذیر نمی‌نماید. از این رو، استفاده از روش تعیین توالی از نقاط قوت مطالعه‌ی حاضر بود و بیشتر با اهداف کشف تغییرات تک نوکلئوتیدی جدید انجام گرفت. هر چند که در این مطالعه، تغییر جدیدی در افراد مورد مطالعه یافت نشد، اما ابزار تحقیق به درستی انتخاب شده بود. در این مطالعه، برای اولین بار توالی ناحیه‌ی مورد تکثیر به روش Sequencing مورد بررسی قرار گرفت که از نوآوری‌های این مطالعه محسوب می‌شود.

در تمامی مطالعات صورت گرفته تا زمان اجرای این پژوهش، ناحیه‌ی پروموتوری ژن استئوکلسین تنها از نظر وجود یک پلی مورفیسم در نوکلئوتید شماره‌ی

۲۹۸ مورد بررسی قرار گرفت و نوکلئوتیدهای قبل یا بعد بررسی نشدند. غربالگری بیوشیمیایی بر اساس سطح افزایش کلسی‌تونین سرم برای تشخیص بیماران در خطر ابتلا به MTC اثری استفاده می‌شود. در واقع از نظر بالینی، هیچ علائم و نشانه‌های واضحی وجود ندارد و برترین سنجش، اندازه‌گیری کلسی‌تونین سرم بوده است که با یک ژن روی کروموزوم ۱۱p کد می‌شود و دو نوع mRNA مجزا تولید می‌کند (۱۴) و اغلب با یک سطح افزایش یافته‌ی آنتی ژن CEA (Carcino-embriionario) همراه است؛ اگر چه مورد آخر مخصوص MTC نیست (۱۵).

جهش‌های ژرم‌لاین مرتبط با FMTC (Familial medullary thyroid carcinoma) و MEN2A (Multiple endocrine neoplasia 2A) که در ناحیه‌ی تیروزین کیناز رخ می‌دهند، فعالیت تغییر دهنده‌ی اندکی دارند و کمتر در حالت حاد بیماری دیده شده‌اند و بیماری حاصل از این جهش از طریق اندازه‌گیری سطح کلسی‌تونین در سنین بالاتر که بیماری پیشرفت زیادی کرده است، تشخیص داده می‌شود.

در برخی افراد مبتلا -اگر چه دارای سطح کلسی‌تونین طبیعی هستند- احتمال وجود چنین جهش‌هایی وجود دارد و افزایش در سطح کلسی‌تونین این افراد دیرتر رخ می‌دهد (۱۶). بنابراین، احتمال دارد که بسیاری افراد مبتلا دارای سطح کلسی‌تونین طبیعی باشند. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های زیادی در فهم بیولوژی رشد کریستال‌های عصبی جهت توضیح صورت گرفته است و پاتوفیزیولوژی MTC بیشتر شفاف شده است (۱۷-۱۸). برای مثال، عوامل مهم رشد عصبی

پلی مورفیسم‌ها از جمله پلی مورفیسم بررسی شده در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط معنی‌داری وجود دارد و در استئوپروز، ژن‌های مختلفی دخیل هستند که یکی از آن‌ها می‌تواند ژن استئوکلسین باشد.

در پژوهشی که توسط Das و همکاران بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در دو جمعیت سفید پوست و آفریقایی انجام گرفت (۲۳)، مشاهده شد که در این بیماران پلی مورفیسم rs1800247 واقع در پروموتور ژن استئوکلسین با برخی خصوصیات سندرم متابولیک از جمله غلظت بالای گلوکز ناشتا و حساسیت پایین به انسولین، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد، اما پلی مورفیسم غیر معمول rs34702397 در جمعیت آفریقایی با برخی خصوصیات ذکر شده در مورد سندرم متابولیک مرتبط است.

در نهایت، می‌توان این گونه بیان کرد که با توجه به عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین فراوانی آللی و ژنوتیپی ناحیه‌ی مورد مطالعه در پروموتور ژن استئوکلسین در افراد مبتلا به کارسینوم مدولاری تیروئید نسبت به افراد سالم، پلی مورفیسم ذکر شده کاندیدای مناسبی جهت تشخیص ژنتیکی نیست و احتمال می‌رود که این تغییر تک نوکلئوتیدی، نقشی در بیماری‌زایی سرطان تیروئید نداشته باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود از تمامی این عزیزان را اعلام می‌دارند.

(Neurotropic) شامل عامل رشد عصبی مشتق شده از گلیا (Glial cell line-derived neurotrophic factor یا GDNF) که یک لیگاند طبیعی برای گیرنده‌ی RET (Rearranged during transfection) است. همچنین، دیگر عوامل رشد عصبی که نقش اساسی در افزایش بقا و تمایز مشتقات سستیغ عصبی (Neural crest derivatives) دارند (۱۹).

در مطالعه‌ی Toivonen و همکاران، مشخص شد که در بیماران مبتلا به سرطان‌های تیروئید که تحت درمان با لیوتیروکسین هستند، میزان نشانگرهای بافت استخوانی از قبیل استئوکلسین بالاتر از افراد شاهد است (۲۰).

در مطالعه‌ی Hoffmann و همکاران اطلاعات زیادی درباره‌ی پروموتور ژن استئوکلسین به دست آمد (۲۱). از طرف دیگر، در مطالعه‌ی Lian و همکاران مشخص شد که ناحیه‌ی بالادست اگزون شماره‌ی ۱ ژن استئوکلسین یکی از مناطق بسیار مهم در تنظیم بیان ژن استئوکلسین می‌باشد، از این رو، وجود تغییرات پلی مورفیسمی در این ناحیه می‌تواند بر میزان پروتئین استئوکلسین تأثیرگذار باشد (۱۳).

در مطالعه‌ی Wu و همکاران دیده شد که فراوانی آللی و ژنوتیپی rs1800247 در افراد مبتلا به سرطان پروستات نسبت به افراد سالم متفاوت است (۱۱). در مطالعه‌ی Lin و همکاران ۱۱ پلی مورفیسم در ژن‌های مختلف از قبیل TGFβ1-509 (rs1800469) و TNFα-857 (rs1799724) و rs1800247) Osteocalcin جهت بررسی ارتباط آن‌ها با تراکم مواد معدنی استخوان مطالعه گردید (۲۲). در نهایت مشخص شد که در زنان پس از سن یائسگی بین پایین بودن تراکم مواد معدنی استخوان با تعدادی از

References

- Sywak M, Pasieka JL, Ogilvie T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation. *J Surg Oncol* 2004; 86(1): 44-54.
- Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, et al. New multiple somatic mutations in the RET proto-oncogene associated with a sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2006; 16(3): 311-6.
- Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. *Thyroid* 1995; 5(5): 407-24.
- Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingues R, Santos JR, Cid MO, et al. Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 2009; 100(11): 1777-83.
- Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* 1980; 66(5): 878-83.
- Price PA, Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1980; 255(24): 11660-3.
- Price PA, Nishimoto SK. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(4): 2234-8.
- Ducy P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* 2011; 54(6): 1291-7.
- Dohi Y, Iki M, Ohgushi H, Gojo S, Tabata S, Kajita E, et al. A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: the possibility of a correlation with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1998; 13(10): 1633-9.
- Koeneman KS, Kao C, Ko SC, Yang L, Wada Y, Kallmes DF, et al. Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis. *World J Urol* 2000; 18(2): 102-10.
- Wu HC, Lin CC, Chen WC, Chen HY, Tsai FJ. Osteocalcin gene HindIII C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer and responsiveness to hormone therapy. *Eur Urol* 2003; 43(2): 197-200.
- Simionescu L, Dumitriu L, Dumitriu V, Zamfir-Grigorescu D, Campean G, Dumitriu E, et al. The serum osteocalcin levels in patients with thyroid diseases. *Endocrinologie* 1988; 26(1): 27-33.
- Lian J, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Shalhoub V, Collart D, et al. Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(4): 1143-7.
- Ainahi A, Kebbou M, Timinouni M, Benabdeljalil N, Fechtali T, Oufara S, et al. Study of the RET gene and his implication in thyroid cancer: Morocco case family. *Indian J Cancer* 2006; 43(3): 122-6.
- Jackson CE, Tashjian AH, Jr., Block MA. Detection of medullary thyroid cancer by calcitonin assay in families. *Ann Intern Med* 1973; 78(6): 845-52.
- Wohlk N, Schweizer H, Erlic Z, Schmid KW, Walz MK, Raue F, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24(3): 371-87.
- Prazeres HJ, Rodrigues F, Figueiredo P, Naidenov P, Soares P, Bugalho MJ, et al. Occurrence of the Cys611Tyr mutation and a novel Arg886Trp substitution in the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 families and sporadic medullary thyroid carcinoma cases originating from the central region of Portugal. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64(6): 659-66.
- Chang CF, Yang WS, Su YN, Wu IL, Chang TC. Mutational spectrum of multiple endocrine neoplasia type 2 and sporadic medullary thyroid carcinoma in taiwan. *J Formos Med Assoc* 2009; 108(5): 402-8.
- Machens A, Hauptmann S, Dralle H. Modification of multiple endocrine neoplasia 2A phenotype by cell membrane proximity of RET mutations in exon 10. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(1): 171-7.
- Toivonen J, Tahtela R, Laitinen K, Risteli J, Valimaki MJ. Markers of bone turnover in patients with differentiated thyroid cancer with and following withdrawal of thyroxine suppressive therapy. *Eur J Endocrinol* 1998; 138(6): 667-73.
- Hoffmann HM, Beumer TL, Rahman S, McCabe LR, Banerjee C, Aslam F, et al. Bone tissue-specific transcription of the osteocalcin gene: role of an activator osteoblast-specific complex and suppressor hox proteins that bind the OC box. *J Cell Biochem* 1996; 61(2): 310-24.
- Lin GT, Tseng HF, Chang CK, Chuang LY, Liu CS, Yang CH, et al. SNP combinations in chromosome-wide genes are associated with bone mineral density in Taiwanese women. *Chin J Physiol* 2008; 51(1): 32-41.
- Das SK, Sharma NK, Elbein SC. Analysis of osteocalcin as a candidate gene for type 2 diabetes (T2D) and intermediate traits in Caucasians and African Americans. *Dis Markers* 2010; 28(5): 281-6.

Single Nucleotide Polymorphism of rs1800247 in Promoter Region of Osteocalcin Gene in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma

Jabar Lotfi MSc¹, Mohammad Taghikhani PhD², Marjan Zarif-Yeganeh³,
Sara Sheikholeslami³, Mehdi Hedayati PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Medullary thyroid carcinoma is a malignant tumor originated from parafollicular cells. Osteocalcin (OC) is the most non-collagenous protein in bone and its gene is located on chromosome 1 (1q25-q31). Important polymorphism in promoter region of osteocalcin gene is located at 298nt (rs1800247), in which C base is converted to T base. In this study, to evaluate the presence of this polymorphism with existence of medullary thyroid carcinoma (MTC), the rs1800247 polymorphism in promoter region of osteocalcin was studied.

Methods: In a case-control study, we evaluated the single nucleotide polymorphism (SNP) of rs1800247 in osteocalcin gene promoter in 200 volunteers, including 100 cases and 100 controls, consist of 106 men and 94 women. The mean age was 35.0 ± 11.3 and 37.0 ± 13.8 years in patients and controls, respectively. Thyroid biopsies and pathology confirmation were considered as confirmation of the medullary thyroid carcinoma diagnosis. Genomic DNA was extracted from the leukocytes using the standard Salting Out/Proteinase K method. Polymorphism detection was performed by polymerase chain reaction-sequencing (PCR-sequencing) and direct DNA sequencing methods. Obtained results were statistically analyzed using logistic regression method. The confidence level considered at 95%.

Findings: In patients' population, the genotype frequency was 7%, 48%, and 45% for CC, TT, and CT, respectively; these amounts were 8%, 55%, and 37% in controls, respectively. The frequency of C allele was 29.5% in patients 35.5% in controls; and the frequency of T allele frequency was 70.5%, and 64.5% in patients and controls, respectively. There was not any statistically significant difference between the groups in any of the cases.

Conclusion: There was no association between the single nucleotide polymorphism of rs1800247 in promoter region of osteocalcin gene in patients with medullary thyroid carcinoma compared with normal individuals. According to no difference between allelic and genotypic frequencies between patients and controls, the mentioned polymorphism is not suitable candidate for genetic diagnosis of medullary thyroid carcinoma.

Keywords: Medullary thyroid carcinoma, Promoter, Osteocalcin gene, Polymorphism

Citation: Lotfi J, Taghikhani M, Zarif-Yeganeh M, Sheikholeslami S, Hedayati M. **Single Nucleotide Polymorphism of rs1800247 in Promoter Region of Osteocalcin Gene in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(276): 220-7

1- Department of Clinical Biochemistry, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Mehdi Hedayati PhD, Email: hedayati@endocrine.ac.ir