DOI: 10.48305/jims.v41.i725.0517

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۲۵/هفته‌ی اول شهریور ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۴ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۷ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۶/۷

ارتباط پلی‌مورفیسم rs6065668 و بیان ژن *TOX2* با خطر ابتلا به سرطان کولورکتال

فروغ عیدی خوش[۱]، زهره ولی‌زاده[۲]، عباس مریدنیا[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال (Colorectal cancer) CRC، سومین سرطان شایع و چهارمین علت مرگ در اثر سرطان محسوب می‌شود. چندین ژن با نفوذ متفاوت و همچنین واریانت‌های مختلف ژنتیکی برای خطر ابتلا به CRC شناسایی شده است. بر اساس مطالعات، ژن *TOX2* به عنوان ژن کاندید درCRC مطرح می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط پلی‌مورفیسم rs6065668 و بیان ژن *TOX2* با خطر ابتلا به CRC بررسی شد.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، ۲ سی‌سی خون وریدی از ۵۰ نفر بیمار مراجعه‌کننده به مرکز درمانی سرطان امام حسن مجتبی (ع) دزفول و ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد (همسان‌سازی شده از نظر سن و جنس) جمع‌آوری گردید. در این مطالعه پلی‌مورفیسم rs6065668 ژن *TOX2* با تکنیک HRM (High Resolution Melting) و بیان ژن بوسیله‌ی تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌ها در بیماران ۴۲ درصد برای ژنوتیپ CC، ۴۶ درصد برای CT و ۱۲ درصد برای TT بود و در گروه شاهد برای ژنوتیپ‌هایCC، CT و TT به ترتیب ۲۶، ۵۴ و ۲۰ درصد بود که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد و نتایج بیان ژن نیز در بین گروه‌ها و در ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CT، CC و همچنین بیان ژن *TOX2* از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین افراد CRC در مقایسه با افراد سالم نشان ندادند، بنابراین نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تغییرات در ژن *TOX2* با خطر ابتلا به CRC مرتبط نمی‌باشد.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال؛ *TOX2*؛ ژنوتیپ؛ پلی‌مورفیسم

ارجاع: عیدی خوش فروغ، ولی‌زاده زهره، مریدنیا عباس. **ارتباط پلی‌مورفیسم rs6065668 و بیان ژن *TOX2* با خطر ابتلا به سرطان کولورکتال.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۲۵): ۵۲۳-۵۱۷

مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal cancer) CRC سومین سرطان شایع و چهارمین علت مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان است (۱). ۱/۷ میلیون مورد جدید CRC و ۸۳۲۰۰۰ مرگ در سال وجود دارد (۲). سبک زندگی غربی که شامل عوامل خطر مانند چاقی، رفتار کم تحرک و رژیم غذایی پر گوشت، پرچرب و کمبود فیبر می‌باشد، با افزایش خطر CRC مرتبط است (۳). علاوه بر این، تقریباً ۳۰ درصد از تمام بیماران مبتلا به CRC دارای سابقه‌ی خانوادگی به این بیماری هستند (٤) و افزایش خطر تقریباً ۲ برابری برای ابتلا به CRC در بین بیمارانی که دارای بستگان درجه یک مبتلا به CRC هستند، در بین جمعیت اروپایی و ژاپنی مشاهده می‌شود (۵). تصور می‌شود که استعداد ارثی، عامل ۳۵ درصد از کل موارد CRC و جهش‌های ژرم لاین با ریسک بالا در ژن APC (آدنوماتوز پولیپوز کولی)، ژن‌های ترمیم عدم تطابق DNA (*MSH2*، *PMS2*، *MSH6*، *MLH1*)، MUTYH، *SMAD4*، *BMPR1A* و *LKB1* کمتر از ٦ درصد از کل موارد را به خود اختصاص می دهند (٦). بنابراین، ریسک خطر باقی ماندهCRC وراثتی، ترکیبی از واریانت‌های شایع با اثرات متوسط می‌باشد. بیش از ۲۰ مطالعه، همبستگی سراسر ژنوم (GWAS) سرطان کولورکتال، SNPهای رایج (پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی) مرتبط با خطر CRC را در جایگاه‌های ژنومی مختلف شناسایی کرده‌اند (۷، ۸). از آن‌جا که بیشتر این مطالعات در جمعیت اروپایی یا چینی انجام شده است، تجزیه و تحلیل بیشتر نمونه‌ها با

۱- فوق لیسانس، گروه علوم، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

۲- استادیار، گروه پرستاری و مامایی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

۳- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: عباس مریدنیا: استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

Email: moridnia@gmail.com

پیشینه‌های قومی مختلف برای تأیید ژن‌های استعداد ابتلا به CRC ضروری است. عوامل ژنتیکی نقش مهمی در اتیولوژی CRC اسپورادیک و خانوادگی بازی می‌کنند. چندین ژن با نفوذ متوسط یا بالا از جمله *APC*، *MUTYH*، *MLH1*، *PMS2*، *MSH2*، *MSH6*، *PTEN*، *SMAD4*، *BMPR1A*، *POLE* و *POLD* به عنوان مسؤول سندرم‌های خانوادگی CRC مانند سندرم لینچ معرفی شده‌اند (۹، ۱۰). علاوه بر این، ژن‌های شناخته شده با نفوذ متوسط یا بالا، حدود ۱۵۰ واریانت ژنتیکی برای خطر ابتلا به CRC از طریق مطالعات GWAS شناسایی شده است (۱۱، ۱۲). با این حال، مکانیسم‌های بیولوژیکی و ژن‌های هدف بالقوه برای اکثر این مکان‌های خطر شناسایی شده، نامشخص است.

پروتئین TOX (Thymocyte selection-associated HMG box) متعلق به خانواده‌ای از پروتئین‌های متصل شونده به DNA حفاظت شده در طی تکامل است. علاوه بر TOX، اعضای خانواده شامل TOX2، TOX3 و TOX4 هستند. پروتئین TOX در سلول‌های iNK و mNK در مغز استخوان بیان بالایی دارند (۱۳). TOX2 نقش مهمی در بلوغ سلول‌های NK انسان دارد (۱٤).

Vong و همکاران دریافتند که *TOX2* ترجیحاً در سلول‌های NK انسان در میان چندین جمعیت سلول ایمنی بیان می‌شود و در طول بلوغ سلول‌های NK انسان افزایش بیان می‌یابد و برای بلوغ سلول‌هایNK انسان ضروری است (۱۵). جایگاه کروموزومی ژن *TOX2* در موقعیت 20q13.12 بوده و دارای ۱۳ اگزون می‌باشد. پلی‌مورفیسم rs6065668 یک نوع اینترونیک واریانت در ژن *TOX2* است که بر اساس پروژه هزار ژنوم دارای فراوانی آلل مینور (MAF) برابر ۰/۲۷٤ برای آلل T می باشد (chr20:43904181 (GRCh38.p14)).

بر اساس مطالعاتی مانند Tanikawa و همکاران، پلی‌مورفیسم rs6065668 ژن *TOX2* به عنوان واریانت ژنتیکی در ارتباط باCRC در جمعیت ژاپنی مطرح می‌باشد (٦). هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs6065668 و بیان ژن *TOX2* با خطر ابتلا بهCRC در جمعیت بیماران ایرانی بود.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: این مطالعه‌ی مورد- شاهدی بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به CRC (۳۱ مرد و ۱۹ زن) که بیماری آن‌ها توسط پاتولوژیست تأیید شده بود و ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد انجام گرفت. افراد گروه شاهد، هیچ نوع سابقه‌ای از سرطان و یا بدخیمی‌های دیگر نداشتند و از لحاظ سن و جنس با گروه بیمار همسان‌سازی شدند. برای بررسی ژنوتیپ افراد مورد مطالعه پس از اخذ رضایت نامه‌ی آگاهانه از آن‌ها، ۲ سی‌سی خون وریدی از افراد گرفته شد و به درون لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA ریخته شد و نمونه‌ها بر روی یخ به آزمایشگاه تحقیقات مرکزی دانشگاه علوم پزشکی دزفول منتقل شدند و سریعاً مورد استخراج RNA قرار گرفتند. برای استخراج DNA نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری گردیدند. برای استخراج RNA از کیت BioFACT™ Total RNA Prep Kit (South Korea Ver.2.0) طبق پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده گردید. DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت PrimePrep Genomic DNA Extraction Kit (South Korea, Cat.No. K-2000) طبق پروتوکل پیشنهادی شرکت سازنده‌ی کیت، استخراج شدند. بررسی کمی و کیفی نمونه‌ها به ترتیب با روش های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام شد.

ملاحظات اخلاقی: از همه‌ی افراد شرکت‌کننده در مطالعه‌ی حاضر رضایت آگاهانه اخذ گردید. این مطالعه به وسیله‌ی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی دزفول (IR.DUMS.REC.1397.022) مورد تأیید قرار گرفت.

ژنوتایپینگ rs6065668 به وسیله‌ی روش ذوب با وضوح بالا (High Resolution Melting) HRM: ژنوتایپینگ پلی‌مورفیسم rs6065668 با استفاده از دستگاه (Roche Life Science) Roche LightCycler® 96 به روش ذوب با وضوح بالا (HRM) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ٤µL ،5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (Solis BioDyne) ۲µL پرایمر، ۲µL ازDNA و ۱۲µL آب بدون DNase و RNase در سه تکرار انجام شد. پروتکل تکثیر PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ٤۰ سیکل در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٦۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. در نهایت، HRM از ٦۵ تا ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با میزان افزایش ۰/۱ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. در نهایت، برای تأیید نتایج HRM، ۱۰ درصد نمونه‌ها به صورت تصادفی با روش PCR و بوسیله‌ی پرایمرهای اختصاصی (پرایمر مستقیم:'5'CTTACCCAGTGCTGCTAGAG3 و پرایمر معکوس: '5'ACTGTCGACAACCTTCCATG3 و طول محصول bp۲۵۹) تکثیر و سپس با استفاده از دستگاه توالی‌یابی ABI 3130XL (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی به صورت الکتروفروگرام مشاهده گردید و توسط نرم‌افزار Chromas v. 2.6.6 آنالیز شدند.

سنتز cDNA و بررسی بیان ژن TOX2: برای بررسی بیان ژن

TOX2 از روش ریل تایم (qRT-PCR) استفاده شد. برای سنتز cDNA از کیت سنتز BioFACT™ 5X RT Pre-Mix استفاده گردید. با استفاده از BioFACT™ 2X Real-Time PCR Master Mix و پرایمرهای اختصاصی (پرایمر مستقیم: 5'ACGAAGCCAGCTACCACTC3' و پرایمر معکوس: 5'GTCATAGGCAGCCACTTCC3') qPCR انجام گردید. از *GAPDH* (پرایمر مستقیم: 5'GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA3' و پرایمر معکوس: 5'GAGTCCTTCCACGATACCAAAG3') به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. پروتکل تکثیر PCR برای بیان ژن شامل یک مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۵ سیکل در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. همچنین از دستگاه LightCycler® 96 (Roche) و روش ΔΔ Ct برای آنالیز داده‌ها در روش qPCR استفاده شد.

در این پژوهش، آنالیز ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs6065668 و خطر ابتلا به CRC با به کارگیری روش آماری Chi-square و برای بررسی بیان ژن بین گروه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف از آزمون One way ANOVA به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) و با در نظر گرفتن مقدار P کوچکتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار بودن اختلاف، استفاده گردید. تجزیه و تحلیل ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار LightCycler® 96 v.1.1.0.1320 و روش نمودار Different plot انجام شد. طراحی پرایمر توسط نرم‌افزار Gene Runner انجام گردید.

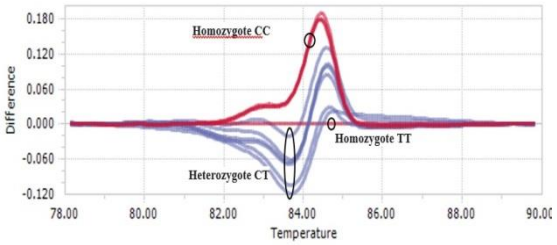
یافته‌ها

تجزیه و تحلیل ارتباط پلی‌مورفیسم rs6065668 در بیماران CRC

در این مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم rs6065668 ژن *TOX2* به وسیله‌ی روش HRM و نمودار Different plot انجام گردید. گروه شاهد، در تعادل هاردی واینبرگ (HWE) قرار داشت. تفاوت در فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی بین بیماران و افراد سالم با آزمون Chi-square مقایسه شد. فراوانی ژنوتیپ CC، CT و TT و فراوانی آللی در گروه بیمار و شاهد در جدول ۱ آورده شده است. فراوانی ژنوتیپی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد. فراوانی ژنوتیپ CC در بین گروه‌ها نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر تفاوت بیشتری نشان داد و نزدیک به سطح معنی‌دار بود، ولی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. فراوانی آلل C در گروه CRC بیشتر از گروه شاهد بود (جدول ۱).

آنالیز نتایج HRM و توالی یابی DNA

در روش HRM به وسیله‌ی نمودار Different plot تفاوت منحنی‌ها به وضوح در وضعیت هتروزیگوت و هموزیگوت تشخیص داده شد (شکل ۱). برای تأیید نتایج HRM، ۱۰ درصد نمونه‌ها به صورت تصادفی با روش PCR تکثیر شده و توالی‌یابی گردیدند که پس از Blast کردن توالی‌ها به وسیله‌ی سایت NCBI ژنوتیپ هر نمونه بدست آمد. در توالی‌یابی DNA وضعیت هتروزیگوت‌ها و هموزیگوت‌ها نشان داده شد (شکل ۲).

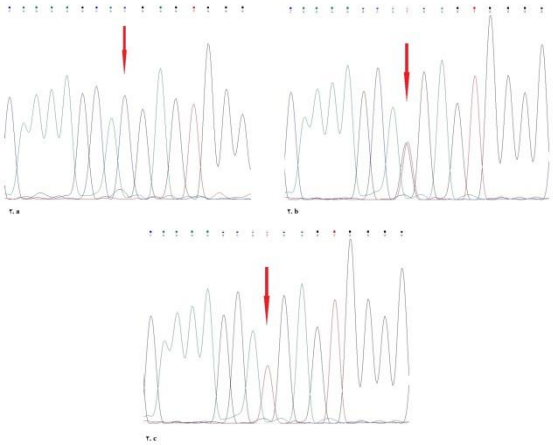


شکل ۱. نمودار Different plot برای ژنوتایپ‌های مختلف. خطوط قرمز بالا: هموزیگوت CC، خطوط آبی: هتروزیگوت CT، خطوط قرمز مستقیم: هموزیگوت TT که به عنوان baseline sample در نظر گرفته شد.

جدول ۱. فراوانی آلل C در گروه‌های مورد مطالعه

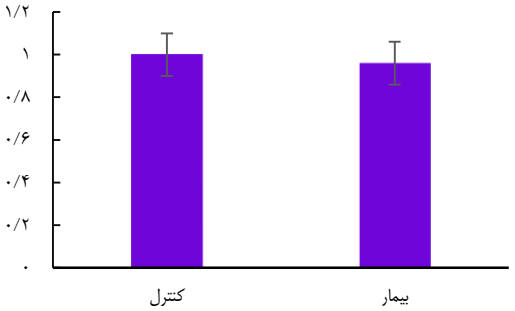
متغیر	توزیع ژنوتیپی (درصد)		فراوانی آللی (درصد)		P	OR	CI: 95%
بیمار	۴۲	CC	۶۵	C	۰/۱۱۸	۲/۴۵۵	۰/۹۵-۶/۳۳۹
	۴۶	CT	۳۵	T			
	۱۲	TT					
شاهد	۲۶	CC	۵۳	C			
	۵۴	CT	۴۷	T			
	۲۰	TT					

CI: Confidence of Interval



شکل ۲. a . ۲: ژنوتیپ CC، b . ۲: ژنوتیپ CT، c . ۲: ژنوتیپ TT

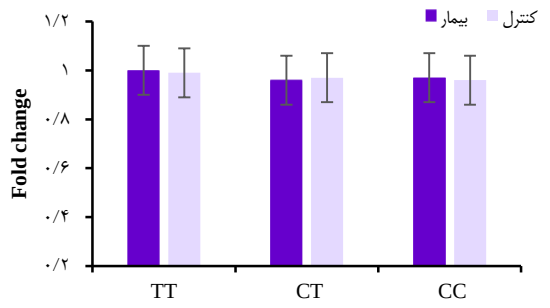
بیان ژن TOX2: ارزیابی بیان ژن *TOX2* در بین گروه‌های بیمار و سالم و در ژنوتیپ‌های مختلف CC، CT و TT به روش qPCR انجام گردید. نتایج qPCR بیان ژن *TOX2* نشان داد که بین گروه‌های بیمار و سالم و ژنوتیپ‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۳ و ٤).



شکل ۳. مقایسه‌ی بیان ژن *TOX2* در ۱.۳: گروه‌ها و ۲.۳: ژنوتایپ‌های مختلف به روش qPCR. روش ΔΔ Ct برای آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار در هر سه بار آزمایش می‌باشند.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌مورفیسم rs6065668 ژن *TOX2* در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به وسیله‌ی روش HRM مورد بررسی قرار گرفت و بعد از آن بیان این ژن در ژنوتیپ‌های مختلف در بین بیماران و افراد شاهد سالم آنالیز گردید. اگرچه ارتباط این پلی‌مورفیسم با CRC به وسیله‌ی GWAS در جمعیت ژاپنی مورد بررسی قرار گرفته است (٦)، ولی بدلیل تفاوت ژنتیکی در اقوام و جمعیت‌های متفاوت نیاز به تأیید یافته‌های مطالعات GWAS در جمعیت‌های مختلف می‌باشد. نتایج ما نشان داد که از لحاظ فراوانی ژنوتیپی rs6065668 در بین گروه بیمار و سالم تفاوت معنی‌داری ندارد ($P > ۰/۰۵$). فراوانی ژنوتیپ CC در بین گروه‌ها نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر تفاوت بیشتری نشان داد و نزدیک به سطح معنی‌دار بود. ژنوتیپ CC نسبت به CT+TT میزان P برابر با ۰/۰٦۱ را نشان داد و از طرفی میزان Odds Ratio یعنی نسبت ژنوتایپ CC در گروه بیماران ۲/٤٥ نسبت به ژنوتایپ CT+TT در گروه افراد سالم بود و افراد دارای ژنوتایپ CC نسبت به افراد دارای ژنوتایپ CT و یا TTدر حدود ۲/۵ برابر ریسک ابتلا به سرطان کولورکتال را نشان دادند. هرچند این ارتباط از لحاظ آماری معنی‌دار نشد ولی شاید با افزایش حجم نمونه در مطالعات آتی بتوان ارتباط معنی‌داری را مشاهده کرد. بررسی بیان ژن *TOX2* در بین گروه‌های بیمار و سالم و در ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد که بین گروه‌های بیمار و سالم و ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$).



شکل ٤. مقایسه‌ی بیان ژن *TOX2* در ۱.۳: گروه‌ها و ۲.۳: ژنوتایپ‌های مختلف به روش qPCR. روش ΔΔ Ct

TOX2 یک فاکتور رونویسی است که در دمین اتصال DNA گروه با تحرک بالا با سایر اعضای TOX مشترک است. *TOX2* به طور مستقیم بیان *T-BET* را در طی بلوغ سلول‌های NK انسانی تنظیم می‌کند (۱۵). علاوه بر این، بیان ژن *TOX2* به وسیله‌ی هیپرمتیلاسیون DNA در بافت‌های سرطان پستان و ریه کاهش پیدا کرده است (۱٦).

مطالعه‌ی Zeng و همکاران، بلوک هاپلوتیپ در ژن *TOX2* را به عنوان یک ژن کاندید جدید برای اختلال افسردگی ماژور (Major depressive disorder) MDD نشان داد (۱۷). *TOX2* یک فعال‌کننده‌ی رونویسی است که در سیستم غدد جنسی – هیپوتالاموس– هیپوفیز دخیل است (۱۷، ۱۹، ۲۰) و در یک ناحیه‌ی ژنومی بزرگ قرار دارد که قبلاً در ارتباط با علائم افسردگی در بیماری روان‌پریشی گزارش شده است (۱۸–۲۰).

در مطالعه‌ی Sima و همکاران در جمعیت اروپای شرقی که به وسیله‌ی GWAS انجام شد، سه پلی‌مورفیسم (rs4437026, rS10917682 rS1118528) را در ارتباط با

نفرولیتیازیس پیدا کردند. rs4437026 در ژن *TOX2* قرار دارد و در چندین نوع تومور افزایش بیان یافته و با پیشرفت تومور مرتبط است (۲۱). rs4437026 یک واریانت اینترونیک در ژن *TOX2* می‌باشد که ساختار کروماتین را تغییر می‌دهد و تقریباً مشابه دمین‌های اتصال به DNA گروه با تحرک بالا است (۲۲).

در یک مطالعه‌ی اخیر نشان داده شد که *TOX* و *TOX2* اهداف فاکتور رونویسی *NFAT* تنظیم شده با کلسیم/کلسینوورین هستند (۲۳). علاوه بر این، بیان *TOX* اغلب در انواع مختلف تومورهای انسانی افزایش یافته و این افزایش بیان اغلب با پیشرفت تومور و با کنترل آپوپتوز، رشد سلولی، متاستاز و ترمیم DNA همراه است (۲۱). پلی‌مورفیسم rs6065668 یک واریانت اینترونیک بوده که در ژن *TOX2* قرار دارد. تغییرات در ناحیه‌ی اینترونیک می‌توانند منجر به ایجاد محل‌های برش نهفته و یا پرش اگزون شوند که اساساً از برش جایگزینی متمایز بوده و پتانسیل تأثیرگذاری بر بیان mRNA را دارند.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب فوق‌الذکر و به دلیل این تنوع نقش‌ها برای *TOX2* و نبود مطالعات در مورد نقش تغییرات در ژن *TOX2* در جمعیت ایرانی در ارتباط با CRC مطالعه‌ی حاضر انجام گردید. بر اساس یافته‌های ما تغییرات ژنتیکی پلی‌مورفیسم rs6065668 در ژن *TOX2* در بیماران CRC و افراد کنترل سالم تفاوت معنی‌داری نداشت و این تغییرات نیز بر بیان ژن، تأثیر معنی‌داری را نشان ندادند. بر اساس یافته‌های ما، CRC با تغییرات ژنتیکی پلی‌مورفیسم rs6065668 ژن *TOX2* مرتبط نبود. از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به همسان بودن پیشینه‌ی ژنتیکی افراد شرکت‌کننده و نسبتاً پایین بودن حجم نمونه اشاره کرد، لذا پیشنهاد می‌گردد که مطالعات آینده در جمعیت‌های مختلف و با حجم نمونه‌ی بالاتر انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی سلولی مولکولی (۱۶۵۳۰۵۵٤۹٦۲۰۰٤) دانشگاه آزاد واحد دزفول می‌باشد. بدین‌وسیله از کلیه‌ی افرادی که در انجام مطالعه‌ی حاضر همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Sabouri S, Esmaily H, Shahid Sales S, Emadi M. Determining related factors to survival of colorectal cancer patients using cox regression [in Persian]. Med J Mashhad Univ Med Sci 2018; 61(4): 1083-92.
2. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Alam T, Alizadeh-Navaei R, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: a systematic analysis for the global burden of disease study. JAMA Oncol 2018; 4(11): 1553-68.
3. Rychter AM, Łykowska-Szuber L, Zawada A, Szymczak-Tomczak A, Ratajczak AE, Skoracka K, et al. Why does obesity as an inflammatory condition predispose to colorectal cancer? J Clin Med 2023; 12(7): 2451.
4. Jones WF, Ahnen DJ, Schroy 3rd PC. Improving on-time colorectal cancer screening through lead time messaging. Cancer 2020; 126(2): 247-52.
5. Hirata M, Kamatani Y, Nagai A, Kiyohara Y, Ninomiya T, Tamakoshi A, et al. Cross-sectional analysis of BioBank Japan clinical data: a large cohort of 200,000 patients with 47 common diseases. J Epidemiol 2017; 27(3S): S9-21.
6. Tanikawa C, Kamatani Y, Takahashi A, Momozawa Y, Leveque K, Nagayama S, et al. GWAS identifies two novel colorectal cancer loci at 16q24.1 and 20q13.12. Carcinogenesis 2018; 39(5): 652-60.
7. Cui R, Okada Y, Jang SG, Ku J, Park JG, Kamatani Y, et al. Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population. Gut 2011; 60(6): 799-805.
8. Dunlop MG, Dobbins SE, Farrington SM, Jones AM, Palles C, Whiffin N, et al. Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk. Nat Genet 2012; 44(7): 770-6.
9. Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. Nat Genet 2013; 45(2): 136-44.
10. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 2012; 487(7407): 330-7.
11. Law PJ, Timofeeva M, Fernandez-Rozadilla C, Broderick P, Studd J, Fernandez-Tajes J, et al. Association analyses identify 31 new risk loci for colorectal cancer susceptibility. Nat Commun 2019; 10(1): 2154.
12. Yuan Y, Bao J, Chen Z, Villanueva AD, Wen W, Wang F, et al. Multi-omics analysis to identify susceptibility genes for colorectal cancer. Hum Mol Genet 2021; 30(5): 321-30.
13. Aliahmad P, De La Torre B, Kaye J. Shared dependence on the DNA-binding factor TOX for the development of lymphoid tissue-inducer cell and NK cell lineages. Nat Immunol 2010; 11(10): 945-52.
14. Bi J, Wang X. Molecular regulation of NK cell maturation. Front Immunol 2020; 11: 1945.
15. Vong QP, Leung WH, Houston J, Li Y, Rooney B, Holladay M, et al. TOX2 regulates human natural

killer cell development by controlling T-BET expression. Blood 2014; 124(26): 3905-13.
16. Tessema M, Yingling CM, Grimes MJ, Thomas CL, Liu Y, Leng S, et al. Differential epigenetic regulation of TOX subfamily high mobility group box genes in lung and breast cancers. PloS One 2012; 7(4): e34850.
17. Zeng Y, Navarro P, Shirali M, Howard DM, Adams MJ, Hall LS, et al. Genome-wide regional heritability mapping identifies a locus within the TOX2 gene associated with major depressive disorder. Biol Psychiatry 2017; 82(5): 312-21.
18. Kajitani T, Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, et al. Cloning and characterization of granulosa cell high-mobility group (HMG)-box protein-1, a novel HMG-box transcriptional regulator strongly expressed in rat ovarian granulosa cells. Endocrinology 2004; 145(5): 2307-18.
19. Bigdeli TB, Maher BS, Zhao Z, van den Oord EJ, Thiselton DL, Sun J, et al. Comprehensive gene-based association study of a chromosome 20 linked region implicates novel risk loci for depressive symptoms in psychotic illness. PloS One 2011; 6(12): e21440.
20. Fanous AH, Neale MC, Webb BT, Straub RE, O'Neill FA, Walsh D, et al. Novel linkage to chromosome 20p using latent classes of psychotic illness in 270 Irish high-density families. Biol Psychiatry 2008; 64(2): 121-7.
21. Sima C, Iordache P, Poenaru E, Manolescu A, Poenaru C, Jinga V. Genome-wide association study of nephrolithiasis in an Eastern European population. Int Urol Nephrol 2021; 53(2): 309-13
22. .O'Flaherty E, Kaye J. TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins. B BMC Genomics 2003; 4(1): 1-10.
23. Seo H, Chen J, González-Avalos E, Samaniego-Castruita D, Das A, Wang YH, et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8+ T cell exhaustion. Proc Natl Acad Sci U S A 2019; 116(25): 12410-5.

DOI: *10.48305/jims.v41.i725.0517*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 725, 1st Week, September 2023**

Received: 05.07.2023 Accepted: 29.07.2023 Published: 29.08.2023

Association of rs6065668 Polymorphism and *TOX2* Gene Expression with Colorectal Cancer Risk

Forough Eidikhosh[1], Zohreh Valizadeh[2], Abbas Moridnia[3]

Original Article

Abstract

Background: Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the fourth cause of death due to cancer. Several genes with different penitence, as well as different genetic variants, have been identified in CRC risk. Based on the studies, the *TOX2* gene is proposed as a candidate gene for CRC. In the present study, the relationship between rs6065668 polymorphism and *TOX2* gene expression was investigated with the risk of CRC.

Methods: In the present study, 2 CC of venous blood was collected from 50 patients referred to the Imam Hassan Mojtabi Cancer Treatment Center in Dezful, and 50 healthy individuals as a control group (matched in terms of age and gender). In this study, rs6065668 polymorphism of the *TOX2* gene was investigated by the High-Resolution Melting (HRM) technique and gene expression by the Real-time PCR method.

Findings: Findings: The frequency of genotypes in patients was 42% for the CC genotype, 46% for CT, and 12% for TT, and in the control group, CC, CT, and TT genotypes were 26%, 54%, and 20%, respectively, which had no significant difference between the groups and as well as the results of gene expression were not significantly different between groups and different genotypes.

Conclusion: Considering that the frequency of CC, CT, and TT genotypes as well as *TOX2* gene expression did not show a statistically significant difference between CRC patients compared to healthy subjects, the results of this study showed that changes in *TOX2* gene are not related to the risk of CRC.

Keywords: Colorectal cancer; *TOX2*; Genotype; Polymorphism

Citation: Eidikhosh F, Valizadeh Z, Moridnia A. **Association of rs6065668 Polymorphism and *TOX2* Gene Expression with Colorectal Cancer Risk.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(725): 517-23.

1- MSc, Department of Science, School of Basic Sciences, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran
2- Assistant Professor, Department of Nursing and Midwifery, Dezfoul Branch, Islamic Azad University, Dezfoul, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran
Corresponding Author: Abbas Moridnia, Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran; Email: moridnia@gmail.com