

ارتباط پلی‌مورفیسم ۱۵۶۲ در ژن کلاژناز نوع IV با کاهش سن بیماری در بیماران مبتلا به سرطان ریه

دکتر مجید متولی باشی^۱، سمیه تقوایی^۲، دکتر سیمین همتی^۳

چکیده

مقدمه: کلاژناز نوع IV می‌تواند کلاژن نوع IV را که جزء ساختاری اصلی غشای پایه است، تجزیه کند و سبب افزایش قابلیت دسترسی فاکتورهای پروآنژیوژنیک شامل فاکتور رشد اندوتلیال رگی و فاکتور رشد تغییردهنده β شود. طبق گزارش‌ها پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی سیتوزین به تیمین در موقعیت ۱۵۶۲ در پروموتور کلاژناز نوع IV بر بیان ژن اثر می‌گذارد. هدف از این مطالعه، جستجوی ارتباط بین پلی‌مورفیسم ۱۵۶۲-C/T با خطر سرطان ریه در گروه‌های سنی بود.

روش‌ها: در ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه و ۱۰۰ فرد مشابه آن‌ها از لحاظ سنی به عنوان شاهد تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ۱۵۶۲-C/T ژن کلاژناز IV انجام شد. این کار توسط استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خونی و با استفاده از تکنیک چند شکلی طولی قطعات DNA با آنزیم‌های محدودالانتر-واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Restriction fragment length polymorphism-Polymerase chain reaction) یا RFLP-PCR صورت گرفت. افراد مبتلا به سرطان در دو گروه سنی کمتر از ۶۰ سال و مساوی یا بیشتر از ۶۰ سال بررسی شدند. محاسبه‌ی خطر نسبت افزایشنده (Odds ratio یا OR) با فاصله‌ی اطمینان (Confidence interval یا CI) ۹۵ درصد توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد.

یافته‌ها: توزیع ژنوتیپ ۱۵۶۲-C/T در پروموتور کلاژناز نوع IV به میزان قابل ملاحظه‌ای با خطر سرطان ریه در گروه سنی کمتر از ۶۰ سال مرتبط بود (OR = ۱۹/۸۹، CI = ۳/۲۱-۱۲۰/۶۰).

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم ۱۵۶۲-C/T در ژن کلاژناز نوع IV بر افزایش خطر بروز سرطان ریه در افراد کمتر از ۶۰ سال اثر دارد.

واژگان کلیدی: کلاژناز نوع IV، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، پروموتور، پلی‌مورفیسم، سرطان ریه

مقدمه

کلاژناز نوع IV قادر به تنظیم تهاجم و متاستاز از طریق تجزیه‌ی ماتریکس خارج سلولی، غشاهای پایه و تنظیم چسبندگی سلولی می‌باشد. علاوه بر تخریب غشای پایه، این آنزیم از طریق برهم‌کنش‌های پیچیده‌ی سلول-سلول و سلول-سلول-ماتریکس بر محیط سلولی اثر می‌گذارد (۷-۶) و منجر به تکثیر، مرگ برنامه‌ریزی شده و ریخت‌زایی می‌شود (۸، ۱).

آنزیم‌های کلاژنازی به طور مستقیم یا از طریق پروتئین‌های اتصال‌ی به عوامل رشد نظیر $TGF-\beta$

سرطان‌زایی یک فرایند چند مرحله‌ای است که با آنژیوژنیز در محل تشکیل، جدایی سلول از تومور اولیه، ورود آن به گردش خون، بقای سلول، مهاجرت آن به اندام‌های دور، خروج آن از رگ‌های خونی و رشد آن در محل ثانویه همراه است (۳-۱). سرطان ریه بیماری کشنده با میزان بقای ۵ ساله‌ی ۱۰ درصد می‌باشد. گزارش‌های بی‌شماری نشان می‌دهند عوامل ژنتیکی در بروز سرطان ریه نقش دارند (۵-۴). آنزیم

^۱ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ استادیار، گروه رادیوتراپی و تومورشناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید متولی باشی

IGFBP3 (IGF binding protein-3) باعث افزایش قابلیت دسترسی IGF و افزایش رشد سلولی می شود (۱۸، ۸).

از نظر عملکردی تعداد محدودی از SNPها (Single nucleotide polymorphism) بسته به جایگاه قرار گیری آنها در ژنوم انسان فعال می باشند. برای مثال SNP در مناطق تنظیمی بر میزان نسخه برداری، در جایگاه های پیرایش بر پیرایش mRNA، در 3'UTR بر پایداری mRNA اثر می گذارد. همچنین SNP در نواحی کدگذاری باعث جایگزینی اسید آمینه در پروتئین مربوط می گردد (۲۰-۱۹). پلی مورفیسم C/T در بالادست جایگاه شروع نسخه برداری و در موقعیت ۱۵۶۲ ژن کلاژناز نوع IV قرار دارد که باعث از بین رفتن محل اتصال پروتئین های سرکوب کننده ی نسخه برداری می شود و بیان کلاژناز نوع IV را افزایش می دهد (۲۰، ۱۴).

روش ها

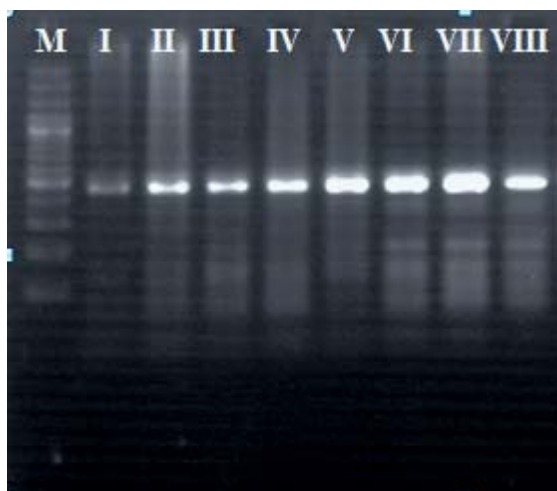
پس از جمع آوری اطلاعات کلینیکوپاتولوژیکی از ۱۷۲ فرد مبتلا به سرطان ریه و ۲۰۰ فرد شاهد، نمونه ی خون گرفته شد. نمونه های خون افراد سرطانی از مرکز پژوهشی درمانی سل و بیماری های ریوی مسیح دانشوری تهران و افراد شاهد از سازمان انتقال خون تهیه گردید. ۵ میلی لیتر خون وریدی از هر فرد گرفته و درون لوله های حاوی EDTA انتقال داده شد و سپس در ۲۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری گردید.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش Miller (۲۱) با تغییرات مختصر انجام گرفت. شکل ۱ تصویر الکتروفورز DNA استخراج شده ی ژنومی افراد شاهد و بیمار را نشان می دهد.

(Transforming growth factor- β)، IGF1، (Insulin-like growth factor-1)، TNF- α ، (Tumor necrosis factor- α) و HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) متصل می شوند و مانع اتصال عوامل به گیرنده های خود می گردند (۹-۱۰). همچنین آنزیم های تجزیه کننده ی ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژناز نوع IV در تنظیم فعالیت مولکول های فعال زیستی مرتبط با فیزیولوژی سلول درگیر می باشند. این مولکول ها شامل سیتوکین و کموکین ها، عوامل رشد و گیرنده های آنها و مولکول های چسبندگی سلول می باشند (۱۱). هورمون های چندگانه، سیتوکین ها و فاکتورهای رشد می توانند بیان این گونه آنزیم ها را القا کنند (۱۲). از طرفی این آنزیم ها می توانند در مراحل رشد سرطان شرکت کنند و با بیان بالای خود با افزایش خطر سرطان زایی ارتباط داشته باشند (۱۳).

ژن آنزیم کلاژناز IV در موقعیت 20q12.2-13.1 قرار گرفته است (۱۴) و افزایش بیان آن تحت عنوان کلاژناز ۹۲ کیلودالتونی در بسیاری از سرطان های انسانی از جمله سرطان ریه دیده شده است (۱۵). پروموتور کلاژن نوع IV در یک منطقه ی ۲/۲ کیلوبازی مجاور انتهای ۵ ژن قرار گرفته است (۱۶) و دارای جایگاه اتصال عوامل نسخه برداری شامل SP1 (Specificity Protein 1)، AP1 (Activator protein 1)، STAT (Signal transducers and activators of transcription)، NF-kB (Nuclear factor- κ B)، PEA3، RAR/RXR (Retinoic acid receptor/Retinoid receptor) و TCF/LEF (Transcription factors/Lymphoid enhancer factor) می باشد (۱۷). کلاژن نوع IV از طریق اثرگذاری بر

پرایمر بالادست ۲۰ پیکومولار، پرایمر پایین دست ۲۰ پیکومولار، پلیمراز Taq ۰/۳ میکرولیتر و dH₂O تا رسیدن به ۲۵ میکرولیتر بود. به علاوه این تکثیر در شرایط دمایی: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۰ سیکل: ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه جفت شدگی در ۶۵ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد و سپس ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد، انجام گرفت. سپس محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند (شکل ۲).

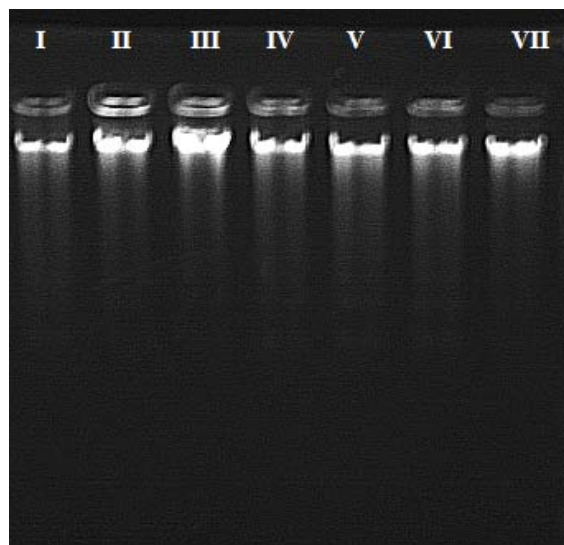


شکل ۲. تصویری از ژل الکتروفورز قطعات DNA تکثیر شده ی

ژنومی توسط **Polymerase chain reaction (PCR)**.

نمونه های I-IV از افراد شاهد و نمونه های V-VIII از افراد مبتلا به سرطان انتخاب شده اند.

پس از آن از روش آنزیم های محدودالثر یا Restriction fragment length polymorphism (RFLP) بر روی محصولات PCR استفاده شد. شناسایی آلل های مختلف از طریق برش یا عدم برش در توالی تکثیر یافته صورت گرفت. در صورت وجود توالی قابل شناسایی توسط آنزیم محدودالثر، برش در



شکل ۱. الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از افراد بیمار و شاهد. نمونه های I، II و III متعلق به افراد شاهد و نمونه های IV،

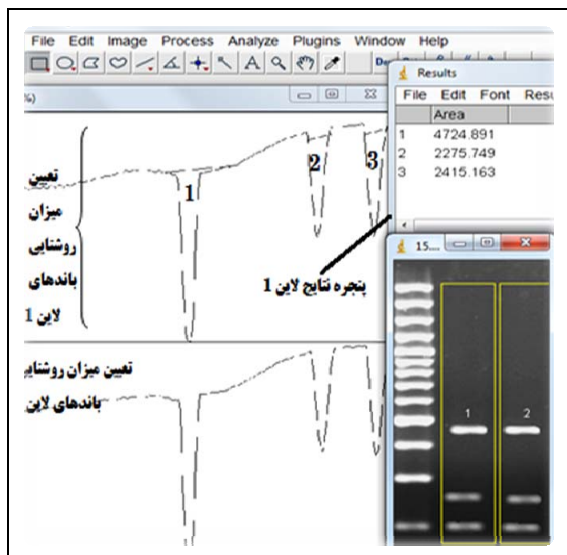
V، VI و VII متعلق به افراد بیمار می باشد.

M: شناساگر DNA ۱۰۰ جفت بازی

تکثیر DNA توسط تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR) ارتباط زیادی به کیفیت و خلوص DNA دارد. میزان جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نیز غلظت محلول DNA بر حسب نانوگرم در میکرولیتر توسط اسپکتروفتومتری انجام شد.

برای تکثیر منطقه ی حاوی پلی مورفیسم با استفاده از تکنیک PCR قطع های از DNA واجد ناحیه ی پلی مورفیسم مورد نظر با به روش PCR و با استفاده از پرایمر بالادست، 5'-ATATAAAATGCCTGGCACATAGTA-3' و پایین دست، 3'-CTCCCTCACTCCTTCTTC-5' تکثیر داده شد. پس از بهینه سازی های متعدد تکثیر بهینه انجام شد. شرایط واکنشی این تکثیر شامل ۱۵۰ نانوگرم نمونه ی DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR X ۱۰، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار،

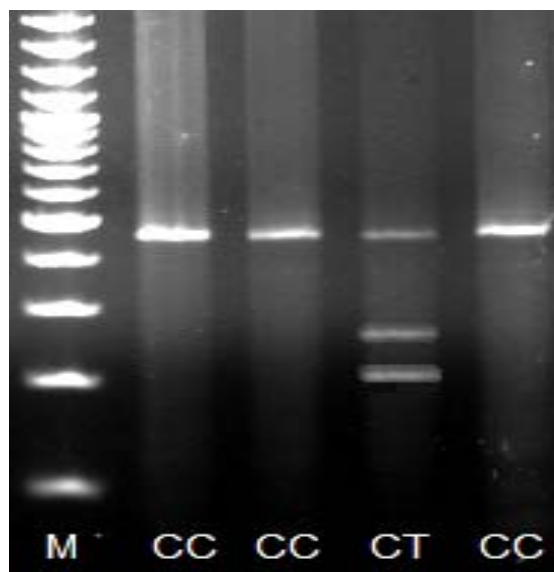
میزان روشنایی را ترسیم نمود و سطح زیر نمودار را به صورت کمی نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴. نتایج حاصل از نرم افزار ImageJ یک فرد با ژنوتیپ هتروزیگوت TC بعد از هضم آنزیمی. سطح زیر نمودار به صورت کمی نیز نشان داده شده است.

سپس با استفاده از ژنوتیپ‌های به دست آمده از RFLP، فراوانی ژنوتیپی در گروه‌های مورد مطالعه محاسبه گردید. به منظور بررسی اختلاف فراوانی توزیع ژنوتیپی موجود در گروه‌های مجزای مورد مطالعه، از آزمون χ^2 استفاده شد. مقایسه‌ی میانگین سنی در گروه‌های مورد مطالعه نیز با استفاده از آزمون Student-t انجام گرفت. در مرحله‌ی بعد اختلاف در توزیع ژنوتیپ کلاژناز نوع IV در گروه‌های مطالعه شده با استفاده از آزمون χ^2 بررسی شد. نسبت افزایش یافته Odds ratio (یا OR) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد به عنوان شاخص ارتباط پلی مورفیسم ژنوتیپ کلاژناز نوع IV با خطر بروز سرطان ریه در گروه‌های مورد مطالعه محاسبه گردید. در تمامی محاسبات سطح احتمال $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

داخل قطعه‌ی تکثیر یافته‌ی DNA رخ داد و باند اولیه به دو باند کوچک‌تر شکسته شد. آنزیم Sph1 قادر است آلل T را در یک ناحیه قطع کند و دو قطعه به طول‌های ۲۵۸ و ۲۰۲ جفت بازی تولید کند که توسط ژل ۲ درصد از همدیگر قابل تفکیک هستند. اما آلل C توسط آنزیم Sph1 برش نمی‌خورد و بعد از الکتروفورز یک قطعه‌ی کامل ۴۶۰ جفت بازی تولید می‌کند، 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 ۳).



شکل ۳. تصویر ژل الکتروفورز افراد CT و CC. همان طور که مشاهده می‌شود، در نمونه‌ی مربوط به افراد CT سه باند به ترتیب از پایین: ۲۰۲، ۲۵۸ و ۴۶۰ جفت بازی ایجاد می‌شود.

سپس برای تأیید هضم آنزیمی تصاویر ژل الکتروفورز با نرم افزار ImageJ بررسی شدند. این نرم افزار در ارتباط با باند یا باندهای هر خط نمودار

یافته‌ها

DNA ژنومی نمونه‌های بیماران و افراد شاهد استخراج شد و نمونه‌هایی که واجد سرطان با سابقه‌ی فامیلی بودند از روند مطالعه حذف شدند. نمونه‌هایی که جذب نوری 2-1/8 نانومتر داشتند جهت مطالعات بعدی در 20- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و استخراج سایر نمونه‌ها تکرار شد. تکنیک RFLP-PCR بر روی کلیه‌ی نمونه‌ها انجام شد و ژنوتیپ آن‌ها مورد شناسایی قرار گرفت. این تکنیک به طور تصادفی در برخی از نمونه‌ها سه مرتبه تکرار گردید. به طور کلی برای بررسی ژنوتیپ 120 بیمار مبتلا به سرطان و 100 فرد شاهد بررسی شدند. با توجه به این که بر اساس مطالعات قبلی انتظار می‌رفت که بیان ژن در افراد سرطانی نسبت به افراد

سالم افزایش نشان دهد، وجود تعادل Hardy-Weinberg نیز به اثبات رسید؛ اعداد و ارقام در جدول 1 نشان داده شده است.

به طور کلی افراد مبتلا به سرطان از میانگین سنی بالاتری (15 ± 55 سال) نسبت به افراد سالم (20 ± 55 سال) برخوردار بودند، ولی محاسبات آماری نشان داد که این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در مرحله‌ی بعد افراد بیمار به دو گروه کمتر از 60 سال و بالای 60 سال تقسیم شدند و توزیع ژنوتیپ کلاژناز نوع IV در دو گروه مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات آماری نشان داد که احتمال ابتلا به سرطان در افراد کمتر از 60 سال نسبت به افراد بیشتر از 60 سال با ژنوتیپ CT + TT، OR = 4/6، CI: 2/13-9/95 و با ژنوتیپ TT، OR = 19/89، CI: 3/21-120/60 بود (جدول 2).

جدول 1. فراوانی (درصد) آلی و ژنوتیپی در افراد بیمار و شاهد

مقدار P	افراد شاهد	افراد مبتلا به سرطان	آلوتیپ
< 0/001	106 (53)	86 (35/84)	C
	94 (47)	154 (64/16)	T
	29 (29)	18 (15)	ژنوتیپ CC
	48 (48)	50 (41/67)	CT
	23 (23)	52 (43/33)	TT

مقدار P از آزمون χ^2 محاسبه شد

جدول 2. ارتباط ژنوتیپ‌های کلاژناز نوع IV و سن شروع بیماری

OR (فاصله‌ی اطمینان 95 درصد)	مبتلایان به سرطان			افراد کمتر از 60 سال
	TT ^b	CT + TT ^a	TT	
19/89 (3/21-120/60)	4/60 (2/13-9/95)	35	55	1
0/20 (0/10-0/46)	0/05 (0/008-0/31)	17	47	17

^a: خطر محاسبه شده برای ژنوتیپ‌های CT + TT در برابر ژنوتیپ CC^b: خطر محاسبه شده برای ژنوتیپ TT در برابر ژنوتیپ‌های CT + CC

بحث

سرطان می تواند در اثر تجمع جهش ها بروز کند. به دلیل نیاز به زمان جهت تجمع جهش ها، اغلب سرطان در سنین بالا دیده می شود (۲۲). از طرفی برخی از آسیب ها به ژنوم مثل تأثیر رادیکال های آزاد، اکسیدان های تولید شده در روند فعالیت های متابولیسمی و تشعشعات یونیزه کننده می تواند ماهیت تجمعی داشته باشند و بنابراین با افزایش سن و تجمع باعث بروز جهش و سرطان شوند (۲۳). در این تحقیق میانگین سنی افراد مبتلا به سرطان بیشتر از افراد سالم بود، اما محاسبات آماری نشان داد که این تفاوت معنی دار نبود. افراد کمتر از ۶۰ سال با ژنوتیپ TT نزدیک به ۲۰ برابر احتمال ابتلا به سرطان ریه را داشتند. ۷۶ درصد از سرطان ها در سن ۵۵ سالگی و یا بیشتر ظاهر می شوند؛ بنابراین سرطان یک بیماری پیری به شمار می آید (۲۴-۲۵). بروز انواع سرطان ها در سنین بالا به دو دلیل عمده رخ می دهد: ۱- تجمع جهش های نقطه ای، حذف، نفوذ، و وارونگی و دو برابر شدن توالی ژن و ۲- کاهش کارایی و ظرفیت سیستم های ترمیمی DNA (۲۶).

از طرفی در سنین ۷۰ و بالای ۷۰ سال اغلب مطالعه بر روی سرطان ها به علت افزایش احتمال مرگ و میر مبتلایان، مقدور نیست. بنابراین در این مطالعه بیماران به دو گروه کمتر از ۶۰ سال و بیشتر از ۶۰ سال تقسیم شدند.

نتایج این تحقیق می تواند گویای این مسأله باشد که ایجاد سرطان ریه در افراد جوان تر به دلیل تجمع عوامل سرطان زای محیطی از جمله سیگار است. عوامل ژنتیکی از دلایل مهم دیگر ایجاد سرطان است که با همکاری سایر عوامل محیطی و غیر محیطی

می توانند در مرحله ی خاصی باعث بروز سرطان شوند. ارتباط آماری آلل T با شکل گیری سرطان ریه در مطالعه ی حاضر می تواند گویای ارتباط ژنتیکی شکل گیری سرطان ریه در افراد زیر ۶۰ سال باشد. آلل T به دلیل از بین بردن جعبه ی سرکوب کننده ی بیان ژن باعث افزایش بیان ژن می گردد (۲۰، ۱۴).

از طرفی مطالعات نشان داده است که افراد جوان نسبت به افراد مسن دچار تغییرات دایمی بیشتری می شوند و نیاز آن ها به بیان آنزیم های کلاژناز بیشتر می باشد (۲۷). با توجه با دانش کنونی، مطالعه ی حاضر اولین گزارش از ارتباط پلی مورفیسم در منطقه ی تنظیمی ژن کلاژناز نوع IV با کاهش سن سرطان ریه در جمعیت ایران بود. در مطالعه ای که توسط صادقی و همکاران در اصفهان انجام گرفت این پلی مورفیسم با کاهش سن بدخیمی سرطان پستان ارتباط نشان داد (۲۸). نتیجه گیری قطعی نیاز به مطالعات گسترده تر در آینده و تکرار آزمایش ها در جمعیت های دیگر دارد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه ی حاضر می توان گفت که آلل T در همکاری با سایر ژن های دخیل در شروع سرطان ریه، شرایط را برای شکل گیری سلول های سرطانی در جمعیت مورد مطالعه فراهم می سازد و بدین ترتیب سن شروع سرطان ریه را در افراد واجد این ژنوتیپ تا حدودی کاهش می دهد.

تشکر و قدردانی

از معاونت های پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به دلیل کمک های مالی و تجهیزات

سازمان انتقال خون اصفهان و بیمارستان سیدالشهدا (ع) برای جمع آوری نمونه‌ها صمیمانه تشکر می‌شود.

دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل فراهم کردن اطلاعات پزشکی و از همکاری‌های

References

1. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2): 551-4.
2. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(17): 1260-70.
3. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 9-34.
4. Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Olah E, Minna JD. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(1): 6-13.
5. Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008; 123(1): 1-7.
6. Heist RS, Marshall AL, Liu G, Zhou W, Su L, Neuberg D, et al. Matrix metalloproteinase polymorphisms and survival in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18): 5448-53.
7. McGowan SE. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J* 1992; 6(11): 2895-904.
8. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14(17): 2123-33.
9. Schultz GS, Wsocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2009; 17(2): 153-62.
10. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003; 4(6): 216.
11. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006; 85(1): 22-32.
12. Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(1): 3-19.
13. Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7825-9.
14. Wang Y, Fang S, Wei L, Wang R, Jin X, Wen D, et al. No association between the C-1562T polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2005; 49(2): 155-61.
15. Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, et al. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5433-9.
16. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(1): 12-24.
17. Woessner JF, Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 2000.
18. Li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231(1): 20-7.
19. Decock J, Paridaens R, Ye S. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer. *Clin Genet* 2008; 73(3): 197-211.
20. Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet* 1999; 105(5): 418-23.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
22. Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H, et al. A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. *J Biol Chem* 1999; 274(36): 25371-8.
23. Miller MC, III, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett* 2001; 120(1-3): 269-80.
24. Young RP, Hopkins RJ, Hay BA, Epton MJ, Mills GD, Black PN, et al. Lung cancer susceptibility model based on age, family history and genetic variants. *PLoS One* 2009; 4(4): e5302.
25. Radzikowska E, Glaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases.

- Ann Oncol 2002; 13(7): 1087-93.
26. Bain C, Feskanich D, Speizer FE, Thun M, Hertzmark E, Rosner BA, et al. Lung cancer rates in men and women with comparable histories of smoking. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(11): 826-34.
27. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res* 2003; 4: 12.
28. Sadeghi M, Motevali-Bashi M, Hojati Z. Association of a polymorphism in 1562 promoter nucleotide of collagenases IV with the age and type of metastasis in breast cancer. *J Babol Univ Med Sci* 2009; 10(6): 7-13.

The Association between the C(-1562)T Polymorphism of Type IV Collagenase Gene and Reduced Age of Onset of Lung Cancer

Majid Motovali-Bashi PhD¹, Somayeh Taghvaei², Simin Hemmati MD³

Abstract

Background: Type IV collagenase gene is capable of degrading type IV collagen which is the major structural component of basement membrane. It also increased the bioavailability of pro-angiogenic factors including vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β . A cytosine (C) thymine (T) single nucleotide polymorphism (SNP) at position 1562 of the type IV collagenase promoter has been reported to affect gene expression. The purpose of this study was to investigate the association between the C(-1562)T polymorphism and risk of lung cancer in different age groups in Iran population.

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

Findings: Distribution of C(-1562)T genotype in type IV collagenase promoter was significantly associated with the risk of lung cancer in the age group of < 60 years (OR = 19.89; 95% CI = 3.21-120.60).

Conclusion: Our results indicated that C(-1562)T polymorphism in type IV collagenase gene affects the risk of lung cancer in different age groups, i.e. aging less than 60 years was significantly related with initiation of lung cancer.

Keywords: Type IV collagenase gene, Restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction, Promoter polymorphism, Lung cancer

¹ Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

² MSc Student, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Radiotherapy and Oncology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Motovalibashi PhD, Email: mbashi@sci.ui.ac.ir