

پلی مورفیسم DNA ماهواره‌های ژن CYP19 و ارتباط آن با افزایش ریسک ابتلا به سرطان پستان در جمعیت اصفهان

سید مرتضی جوادی راد^۱، دکتر سیمین همتی^۲، دکتر منوچهر توسلی^۳

چکیده

مقدمه: آروماتاز یک آنزیم کلیدی در مسیر سنتز استروژن است و توسط ژن سیتوکروم P-450 (CYP19) کد می‌شود. تماس بیش از حد سلول‌ها با استروژن موجب ایجاد کارسینومای پستان می‌شود و همچنین، بیماران مبتلا به سرطان پستان سطوح بالاتری از بیان آروماتاز را نشان می‌دهند. هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم یک توالی تکراری چهارتایی تیمیدین-آدنین (TTTA)_n واقع در اینترون شماره‌ی چهار ژن CYP19 در بین مبتلایان به سرطان پستان و افراد سالم و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان پستان بود.

روش‌ها: پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی مورد-شاهدی بود که بر روی ۴۲۰ بیمار و ۴۳۲ فرد شاهد متناسب انجام شد. پس از استخراج DNA از خون افراد مورد مطالعه، توالی مورد نظر توسط تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) تکثیر گردید و تعداد تکرار TTTA و توالی آن به وسیله‌ی الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریلامید به دست آمد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که پراکندگی آلی ژن IGF-I در جمعیت اصفهان بین ۷ تا ۱۳ تکرار متغیر بوده و بیشترین فراوانی آلی در بین بیماران و افراد شاهد متعلق به آل (TTTA)_n-TCT به ترتیب، با فراوانی ۳۴/۸ درصد و ۳۴/۳ درصد، بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که فراوانی آل با ۱۰ تکرار TTTA در افراد شاهد ۲/۳ درصد بیشتر از افراد بیمار ۱/۴ درصد می‌باشد. به عبارت دیگر و برخلاف نتایج پیشین، آل (TTTA)_n نه تنها موجب افزایش نرخ بروز سرطان پستان نمی‌شود؛ حتی ممکن است افراد حامل این آل نسبت به بروز سرطان مقاومت بیشتری نشان دهند.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، DNA ماهواره‌ای، پلی مورفیسم، CYP19

مقدمه

هر ۱۰۰۰۰۰ زن، ۱۲۰ نفر در این سرطان مبتلا می‌شوند (۲-۳). اغلب سرطان‌های پستان تک‌گیر (Sporadic) هستند و به صورت چندژنی (Multigenic) بروز می‌کنند (۴). تعداد دقیق ژن‌هایی که در جمعیت‌ها باعث خطر ابتلا به سرطان پستان می‌شوند مشخص نیست.

آروماتاز (EC 1.14.14.1)، یک آنزیم از دسته‌ی آنزیم‌های سیتوکروم P450 (CYP) است که در تبدیل آندروژن‌های ۱۹ کربنه به استروژن‌های ۱۸

سرطان پستان در اثر تجمع آسیب‌های ژنتیکی در سلول‌های طبیعی اپیتلیال بافت پستان و کسب فنوتیپ‌های بدخیم، بروز می‌کند. این سرطان شیوع بالایی در بین زنان دارد به طوری که حدود ۱۰ درصد زنان در طول عمر خود با این بیماری تشخیص داده می‌شوند (۱). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سرطان پستان با رشد رو به افزایش خود، به یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان ایرانی تبدیل شده است و از

^۱ دانشجوی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ استادیار، گروه رادیولوژی و آنکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

مورد بررسی قرار گرفت.

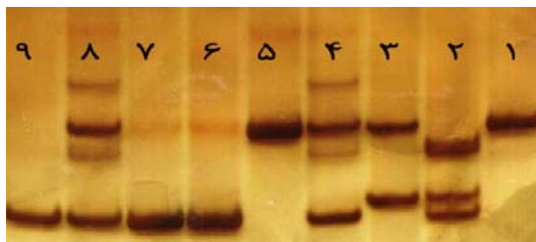
روش‌ها

خون تام ۱۰۰ نفر از زنان مبتلا به سرطان پستان با محدوده‌ی سنی ۲۶-۷۴ سال که تحت شیمی‌درمانی و رادیودرمانی قرار داشتند، از بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان تهیه شد. گروه شاهد متناسب نیز به صورت تصادفی از بین مراجعین کنترل سلامتی به بیمارستان انتخاب شدند. DNA خون این افراد به روش رسوب‌دهی نمکی (Salting out) استخراج گردید و ناحیه‌ی تکراری ایترون شماره‌ی چهار ژن CYP19 توسط پرایمرهای پیشین (پرایمر پیشرو: 5'-TGAAAGGTAAGCAGGTAC TTAG-3' و پرایمر پیرو-5'-GTCGTGAGCCAAGGTCAC-3') تکثیر شد (۱۲). واکنش زنجیر پلیمرز (PCR) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۲۰۰ نانومولار از هر یک از پرایمرهای پیشرو و پیرو، ۲/۵ میلی‌مولار Mgcl₂، ۵ میکرولیتر از 10X بافر PCR و ۰/۴ میکرولیتر آنزیم SmarTag DNA polymerase در دستگاه Mastercycler شرکت Eppendorf انجام شد. بعد از واسرشت شدن اولیه در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۳ سیکل PCR با دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه برای واسرشت شدن رشته‌ها، ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال پرایمرها و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه برای گسترش پرایمرها انجام شد. یک سیکل انتهایی نیز جهت تکثیر توالی‌های ناقص به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه در نظر گرفته شد. محصولات حاصل از PCR بعد از بهینه‌سازی توسط ژل آگارز ۱ درصد تأیید

کرنه آروماتیک نقش دارد. این آنزیم محصول پروتئینی ژن CYP19 است، ۷۰ کیلوباز از DNA ژنومی را اشغال می‌کند و حاوی ۱۰ اگزون می‌باشد (۵). مطالعات Bullun و Simpson نشان داد که بخش‌های توموری بافت پستان در ۶۷ درصد مبتلایان به سرطان پستان دارای بالاترین میزان رونوشت‌های CYP19 می‌باشند (۶).

تعیین توالی ژن CYP19 به همراه مطالعات ژنومیک عملکردی نشان می‌دهد که این ژن دارای ۸۸ نقطه‌ی پلی‌مورف شامل: ۸۵ پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ۲ حذف و اضافه و یک توالی تکراری ۴ نوکلئوتیدی تیمیدین-آدنین (TTTA)_n می‌باشد (۷). از این میان، توالی تکراری چهار نوکلئوتیدی تیمیدین-آدنین (TTTA)_n بیشتر مورد توجه قرار گرفته است؛ زیرا، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که تعداد تکرارهای TTTA این میکروساتلایت با سرطان پستان ارتباط زیادی دارد (۸). مطالعات متعدد در جمعیت‌های مختلف با گروه‌های نژادی متفاوت نشان داده است که آلل‌های بلند میکروساتلایت ژن CYP19 (با ۱۰ تکرار TTTA و بیشتر) موجب افزایش استعداد ابتلا به سرطان پستان می‌شوند. چنانچه، زنان ژاپنی با ۱۰ تکرار TTTA (OR = ۱/۸)، زنان آفریقایی با آلل‌های بزرگ‌تر از ۱۰ تکرار TTTA (OR = ۱/۲۹)، زنان برزیلی با ۱۰ تکرار TTTA (OR = ۳) و زنان اروپایی با ۱۰ و ۱۲ تکرار TTTA (به ترتیب OR = ۷/۸ و OR = ۲/۴۲) در معرض خطر افزایش یافته‌ای برای سرطان پستان هستند (۷-۱۱).

در این مطالعه پلی‌مورفیسم ژن CYP19 بررسی و با دیگر جمعیت‌ها مقایسه شد. همچنین ارتباط این پلی‌مورفیسم با سرطان پستان در جمعیت اصفهان



شکل ۱. ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد جهت بررسی پلی مورفیسم ناحیه‌ی پروموتوری ژن CYP19. در این جا علاوه بر مارکر ۱۰۰ جفت باز (M)، از محصول PCR نمونه‌های شماره‌ی ۱ و ۹ بعد از تعیین توالی، به عنوان مارکر مخصوص آلل استفاده شد. نمونه‌ی شماره‌ی ۱ بلندترین آلل و نمونه‌ی شماره‌ی ۹ کوچک‌ترین آلل موجود در جمعیت مورد مطالعه بود.

جدول ۱. فراوانی آلل‌های مختلف در بین بیماران، افراد شاهد و کل

افراد مورد آزمایش			آلل
فراوانی در کل افراد	فراوانی در افراد شاهد	فراوانی در بیماران	
تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
۲۹۴ (۳۴/۶)	۱۴۸ (۳۴/۳)	۱۴۶ (۳۴/۸)	۷-TCT
۱۸۳ (۲۱/۵)	۸۹ (۲۰/۶)	۹۴ (۲۲/۴)	۷+TCT
۸۲ (۹/۷)	۴۴ (۱۰/۲)	۳۸ (۹/۱)	۸
۵ (۰/۶)	۳ (۰/۷)	۲ (۰/۵)	۹
۱۶ (۱/۹)	۱۰ (۲/۳)	۶ (۱/۴)	۱۰
۲۳۲ (۲۷/۳)	۱۱۵ (۲۶/۶)	۱۱۷ (۲۷/۹)	۱۱
۳۵ (۴/۱)	۲۰ (۴/۶)	۱۵ (۳/۶)	۱۲
۴ (۰/۵)	۳ (۰/۷)	۱ (۰/۳)	۱۳
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	جمع

T: Thymine C: Cytosine

اختلاف این دو در یک توالی سه تایی TCT واقع در بالادست تکرار TTTA می‌باشد که در برخی حذف شده است این دو آلل را به صورت $[(TTTA)7-TCT]$ و $[(TTTA)7+TCT]$ نشان می‌دهند (۸). ما نیز در این تحقیق این دو آلل متفاوت را مشاهده نمودیم. بیشترین فراوانی آللی در بین بیماران و افراد شاهد متعلق به آلل $(TTTA)7-TCT$ با فراوانی ۳۴/۸ درصد در بیماران و ۳۴/۳ درصد در

و جهت بررسی پلی مورفیسم ژن CYP19 از الکتروفورز ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد معمولی (Non-denaturing PAGE) استفاده شد. ژل توسط روش نیترات نقره رنگ آمیزی و نتایج توسط اسکنر ثبت شد. بعد از مشاهده‌ی پلی مورفیسم، دو آلل هموزیگوت در ژل‌های رنگ آمیزی شده که دارای بلندترین و کوتاه‌ترین طول تکرار بودند (به ترتیب، نمونه‌ی شماره ۶ و ۱۳) توسط کیت استخراج DNA از ژل آگارز شرکت فرمتاز خالص سازی شدند. سپس جهت تعیین توالی به شرکت سیناژن (www.cinnagen.com) ارسال شدند تا به عنوان مارکر آللی مورد استفاده قرار گیرند. به کمک این مارکرها طول تکرار آلل‌های بیمار و شاهد تعیین شد و فراوانی آللی ژن CYP19 محاسبه گردید.

بررسی‌های آماری به کمک نرم افزار ایترنی SISA انجام شد. ابتدا ترکیبات آللی و فراوانی آلل‌های ژن CYP19 در جمعیت مورد مطالعه، تعیین شد. در نهایت ارتباط این تکرارها با بروز سرطان در جمعیت به کمک آزمون χ^2 به دست آمد و OR (Ratio odd) محاسبه گردید.

یافته‌ها

با توجه به توانایی کم ژل آگارز در جداسازی قطعات DNA با اختلاف طول نزدیک به هم، برای اندازه‌گیری دقیق تعداد تکرارهای توالی TTTA واقع در پروموتور ژن CYP19، بررسی‌های بعدی محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد انجام شد (شکل ۱).

آلل ژن CYP19 در جمعیت اصفهان بین ۷ تا ۱۳ تکرار متغیر بود (جدول ۱). Baxter و همکاران دو آلل متفاوت برای آلل ۷ تکرار TTTA مشاهده کردند.

نسبت به افراد شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداشت (OR = ۱/۱۱۱۳, P = ۰/۵۲۷۲) و فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد: (۰/۸۰۱۲-۱/۵۴۱۳). همچنین، بالاتر بودن فراوانی آلل بلند با سیزده تکرار TTTA در افراد شاهد نسبت به بیماران، موجب افزایش معنی‌دار مقاومت به بروز سرطان پستان نبود (OR = ۰/۳۴۱۳, P = ۰/۳۲۹۹) و فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد: (۰/۰۳۵۴-۳/۲۹۴۳).

افراد شاهد بود. به این ترتیب، در میان کل افراد مورد بررسی، آلل ۷-TCT (TTTA) با فراوانی ۳۴/۶ درصد و آلل ۱۱ (TTTA) با فراوانی ۲۷/۳ درصد رایج‌ترین آلل‌ها بودند. فراوانی آلل‌های با ۱۰ و ۱۳ تکرار TTTA در افراد سالم دو برابر افراد بیمار بوه (۲/۳) در برابر ۱/۴ برای آلل با ۱۰ تکرار TTTA و ۰/۷ در برابر ۰/۳ برای آلل با ۱۳ تکرار (TTTA). بنابراین آلل‌های بلند در افراد سالم رایج‌تر بودند.

بحث

این پژوهش که برای اولین بار در ایران انجام شده است، الگوی پراکندگی و فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف میکروستلایت ایترون شماره‌ی چهار ژن CYP19 در منطقه‌ی اصفهان را نشان می‌دهد. در تحقیق حاضر، برای بررسی اثر پلی مورفیسم تعداد تکرار ریزماهواره‌ی TTTA ژن CYP19 بر سرطان پستان، یک مطالعه‌ی اپیدمیولوژیک از نوع مورد-شاهدی بر روی جمعیت منطقه‌ی اصفهان انجام شد.

در عوض فراوانی آلل‌های کوتاه ۷-TCT (TTTA) و TCT + (TTTA) در افراد بیمار بیشتر از افراد شاهد بود (جدول ۱). همچنین، در افراد مورد بررسی ۲۷ ترکیب الی (ژنوتیپ) مختلف مشاهده شد که در این میان ترکیب الی ۷-TCT/۱۱ بیشترین فراوانی را در هر دو گروه بیمار (۲۳/۳٪ درصد) و شاهد (۱۹/۰ درصد) به خود اختصاص داده بود (جدول ۲).
آزمون χ^2 (جدول ۳) نشان داد که افزایش فراوانی آلل کوتاه با هفت تکرار TTTA (۷+TCT) در بین بیماران

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف در بین بیماران و افراد شاهد

ژنوتیپ	بیماران	افراد شاهد	ژنوتیپ	بیماران	افراد شاهد
7-TCT / 7-TCT	۲۳	۲۷	7+TCT / 13	۰	۲
7-TCT / 7+TCT	۳۴	۲۳	8 / 8	۲	۱
7+TCT / 7+TCT	۱۲	۱۵	8/10	۰	۱
7-TCT / 8	۱۲	۱۹	8 / 11	۱۰	۱۲
7-TCT / 9	۱	۱	9/11	۰	۱
7-TCT / 10	۱	۲	8 / 12	۳	۱
7-TCT / 11	۴۹	۴۱	10 / 10	۰	۱
7-TCT / 12	۳	۷	10 / 11	۳	۲
7-TCT / 13	۰	۱	10 / 12	۰	۱
7+TCT / 8	۹	۹	11 / 11	۱۴	۱۶
7+TCT / 9	۱	۱	11 / 12	۵	۷
7+TCT / 10	۹	۲	12 / 12	۱	۱
7+TCT / 11	۲۲	۲۰	11/13	۱	۰
7+TCT / 12	۲	۲	Total	۲۱۰	۲۱۶

T: Thymine C: Cytosine

جدول ۳. جدول ارتباط فراوانی آللی تعداد تکرار TTTA ژن CYP19 با ریسک ابتلا به سرطان پستان در جمعیت اصفهان

آلل	تعداد تکرار TTTA	OR	فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد	مقدار P
v-TCT	۷	۱/۰۲۲۵	۰/۷۷۰۸-۱/۳۵۶۳	۰/۸۷۷۳
v+TCT	۷	۱/۱۱۱۳	۰/۸۰۱۲-۱/۵۴۱۳	۰/۵۲۷۲
۸	۸	۰/۸۷۷۲	۰/۵۵۵۷-۱/۳۸۴۷	۰/۵۷۳۵
۹	۹	۰/۶۸۴۲	۰/۱۱۳۷-۴/۱۱۵۷	۰/۶۷۶۶
۱۰	۱۰	۰/۶۱۱۶	۰/۲۲۰۳-۱/۶۹۸۱	۰/۳۴۰۷
۱۱	۱۱	۱/۰۶۴۴	۰/۷۸۷۲-۱/۴۳۹۳	۰/۶۸۵۱
۱۲	۱۲	۰/۷۶۳	۰/۳۸۵۲-۱/۵۱۱۱	۰/۴۳۶۵
۱۳	۱۳	۰/۳۴۱۳	۰/۰۳۵۴-۳/۲۹۴۳	۰/۳۲۹۹

T: Thymine C: Cytosine A: Adenine

درصد و ۳۲ درصد به ترتیب در بین مبتلایان به سرطان پستان و افراد شاهد می‌باشد (۸). در مطالعه‌ی سفیدپوستان قفقازی مشخص شد که آلل $(TTTA)_{11}$ با فراوانی $38/2$ درصد و $37/9$ درصد، و آلل $(TTTA)_v$ با فراوانی $33/8$ درصد و $35/3$ درصد به ترتیب بیشترین فراوانی را در بین بیماران و افراد شاهد، دارند (۱۵). تعیین توالی مجدد ژن CYP-19 مشخص کرد که، با وجود این که فراوان‌ترین آلل در هر سه نژاد: سفیدپوست قفقازی، سیاهپوستان آمریکایی و آمریکایی‌های آسیایی تبار آلل $(TTTA)_v$ می‌باشد ولی آفریقایی‌های آمریکا دارای بیشترین فراوانی $(TTTA)_v$ (۸۳/۳ درصد) برای آلل کوتاه $(TTTA)_v$ هستند و بعد از آن به ترتیب آسیایی‌ها ($53/3$ درصد) و قفقازی‌ها ($47/5$ درصد) قرار دارند (۷). در عوض دومین آلل رایج در هر سه نژاد $(TTTA)_{11}$ ، دارای بیشترین فراوانی در آسیایی‌ها ($35/0$ درصد) و سفیدپوستان قفقازی ($34/2$ درصد) می‌باشد. در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق، بیشترین فراوانی آللی در بین بیماران و افراد شاهد متعلق به آلل TCT- $(TTTA)_v$ ، به ترتیب با فراوانی $34/8$ درصد و $34/3$ درصد، بود. دومین آلل در هر دو گروه بیماران و افراد شاهد $(TTTA)_{11}$ به ترتیب با فراوانی $27/9$ درصد و $26/6$ درصد بود. نتایج این مطالعه با یافته‌های Ma و همکاران مطابقت داشت (۷) و با توجه به شباهت جمعیت ایرانی به جمعیت سفیدپوستان قفقازی، شاید بتوان گفت که احتمال دارد دو جمعیت ایرانی و سفیدپوستان قفقازی از جد مشترکی مشتق شده باشند. Kristensen و همکاران بیان کردند که یک آلل نادر دارای بلندترین تکرار $(TTTA)_{12}$ ، خطر افزایش یافته‌ی ابتلا به سرطان پستان در بیماران را، نسبت به

در مطالعه‌ی نژادهای مختلف ساکن در ایالات متحده‌ی آمریکا مشخص شد که ۶ آلل مختلف برای توالی تکراری TTTA در محدوده‌ی ۷-۱۳ تکرار وجود داشته است و فراوان‌ترین آلل‌های توالی تکراری TTTA در همه‌ی زنان آفریقایی-آمریکایی، ژاپنی، سفیدپوستان آمریکای لاتین و سفیدپوستان غیر آمریکای لاتین، آلل $(TTTA)_v$ و $(TTTA)_{11}$ بودند (۱۰). این نتایج با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد. Okobia و همکاران نشان دادند که فراوان‌ترین آلل‌ها در بین هر دو گروه زنان بیمار و شاهد نیجریایی متعلق به آلل‌های $(TTTA)_8$ و $(TTTA)_v$ بوده است و فراوانی این دو آلل به ترتیب $49/78$ درصد و $33/85$ درصد در بیماران و $55/04$ درصد و $30/26$ درصد در افراد شاهد بود (۱۴). Baxter و همکاران نشان دادند که، هفت آلل مختلف در محدوده‌ی ۷ تا ۱۳ تکرار از توالی تکراری TTTA، در زنان انگلیسی وجود دارد و فراوان‌ترین آلل در بین این زنان، $(TTTA)_{11}$ با فراوانی $37/9$ درصد و $36/2$ درصد به ترتیب در بین مبتلایان به سرطان پستان و افراد شاهد می‌باشد. دومین آلل رایج در زنان انگلیسی، $(TTTA)_v$ با فراوانی $35/8$

پلی‌مورفیسم ژن CYP19 در زنان آفریقایی (نیجریه) نشان داد که زنان حامل آلل‌های بزرگ‌تر از ۱۰ دارای خطر افزایش ابتلا به سرطان پستان ($OR = 1/29$) بودند که معنی‌دار نبود (فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد: ۰/۸۳-۲/۰۰). این تفاوت همچنین، در زنان قبل و بعد از دوران یائسگی مشاهده شد (۷). Ribeiro و همکاران نشان دادند که، در جمعیت برزیلی، فراوانی آلل 10 (TTTA) در بیماران ۳ برابر بیشتر از افراد شاهد بوده است و این تفاوت معنی‌دار ($OR = 0/048$) بود (۱۱). Probst-Hensch و همکاران (۱۰) و Healy و همکاران (۱۵، ۱۳)، ارتباط بین توالی ایترونی 10 (TTTA) و افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان را نفی کردند. در این مطالعه نیز، اختلاف معنی‌داری بین آلل کوتاه با هفت تکرار TTTA (TCT+V) و افزایش خطر ریسک ابتلا به سرطان پستان و همچنین، آلل بلند با سیزده تکرار TTTA و افزایش معنی‌دار مقاومت به بروز سرطان پستان مشاهده نشد. بررسی نتایج این پروژه نشان داد که افراد با آلل‌های بلند (۱۰ و ۱۳ تکرار TTTA) نه تنها استعداد بیشتری برای ابتلا به سرطان پستان ندارند، بلکه؛ این افراد ممکن است به ترتیب ۲ و ۳ برابر بیشتر نسبت به بروز سرطان پستان مقاوم باشند (جدول ۲)، هر چند محاسبات آماری افزایش معنی‌دار برای این مقاومت را نشان نمی‌دهد.

افراد شاهد، نشان می‌دهد ($OR = 2/42$) و این ارتباط را معنی‌دار (فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد: ۱/۰۳-۵/۸۰) بیان کردند (۹). Miyoshi و همکاران نشان دادند که افراد هموزیگوت برای آلل 10 (TTTA) در معرض خطر افزایش یافته‌ای ($OR = 1/8$) برای سرطان پستان هستند و این اختلاف معنی‌دار (فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد: ۰/۹۷-۳/۳۶) می‌باشد (۱۰). Haiman و همکاران با مطالعات مورد-شاهدی خود نشان دادند که در مقایسه با افراد شاهد، فرکانس آلل 10 (TTTA) در بیماران بالاتر بود ولی این تفاوت تنها در مورد آلل 10 (TTTA) معنی‌دار ($P = 0/005$) است (۱۶). در مطالعه‌ای که روی زنان انگلیسی انجام شد، Baxter و همکاران نشان دادند که فراوانی سه آلل ۸، ۱۰ و ۱۲ در بیماران نسبت به افراد شاهد بیشتر است اما، تنها دو آلل ۸ و ۱۰ (به ترتیب $P = 0/012$ و $P = 0/028$ بترتیب) و نه آلل ۱۲ ($P = 1/000$)، اختلاف معنی‌داری بین بیماران و افراد شاهد نشان می‌دهند (۸). ایشان نشان دادند که افراد با ۱۰ تکرار TTTA به طور معنی‌داری در معرض خطر افزایش یافته برای ابتلا به سرطان پستان (بیش از ۷ برابر) قرار دارند (۸). Ahsan و همکاران نشان دادند که آلل 11 (TTTA) در ارتباط با افزایش ریسک ابتلا به سرطان پستان در زنان حامل این آلل، و همچنین در زنان با مادران حامل این آلل، می‌باشد (۱۷). مطالعات

References

1. Aronson K. Alcohol: a recently identified risk factor for breast cancer. *CMAJ* 2003; 168(9): 1147-8.
2. Yavari P, Mosavizadeh M, Sadrol-Hefazi B, Mehrabi Y. Reproductive characteristics and the risk of breast cancer--a case-control study in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6(3): 370-5.
3. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
4. Figer A, Karasik YP, Baruch RG, Chetrit A, Papa MZ, Sade RB, et al. Insulin-like growth factor I polymorphism and breast cancer risk in Jewish women. *Isr Med Assoc J* 2002; 4(10): 759-62.
5. Toda K, Terashima M, Kawamoto T, Sumimoto H, Yokoyama Y, Kuribayashi I, et al. Structural

- and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Eur J Biochem* 1990; 193(2): 559-65.
6. Bulun SE, Simpson ER. Regulation of aromatase expression in human tissues. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 30(1): 19-29.
 7. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pellemounter L, Wang L, et al. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res* 2005; 65(23): 11071-82.
 8. Baxter SW, Choong DY, Eccles DM, Campbell IG. Polymorphic variation in CYP19 and the risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2001; 22(2): 347-9.
 9. Kristensen VN, Andersen TI, Lindblom A, Erikstein B, Magnus P, Borresen-Dale AL. A rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer. *Pharmacogenetics* 1998; 8(1): 43-8.
 10. Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, Egawa C, Noguchi S. Breast cancer risk associated with polymorphism in CYP19 in Japanese women. *Int J Cancer* 2000; 89(4): 325-8.
 11. Ribeiro FS, de Amorim LM, de Almeida ST, Mendonca GA, de Moura Gallo CV, Pinto LF. CYP19 (TTTA)_n polymorphism and breast cancer risk in Brazilian women. *Toxicol Lett* 2006; 164(1): 90-5.
 12. Tsuchiya N, Wang L, Suzuki H, Segawa T, Fukuda H, Narita S, et al. Impact of IGF-I and CYP19 gene polymorphisms on the survival of patients with metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(13): 1982-9.
 13. Probst-Hensch NM, Ingles SA, Diep AT, Haile RW, Stanczyk FZ, Kolonel LN, et al. Aromatase and breast cancer susceptibility. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6(2): 165-73.
 14. Okobia MN, Bunker CH, Zmuda JM, Ezeome ER, Anyanwu SN, Uche EE, et al. Simple tandem repeat (TTTA)_n polymorphism in CYP19 (aromatase) gene and breast cancer risk in Nigerian women. *J Carcinog* 2006; 5: 12.
 15. Healey CS, Dunning AM, Durocher F, Teare D, Pharoah PD, Luben RN, et al. Polymorphisms in the human aromatase cytochrome P450 gene (CYP19) and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2000; 21(2): 189-93.
 16. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, De V, I, Colditz GA, Willett WC, et al. A tetranucleotide repeat polymorphism in CYP19 and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2000; 87(2): 204-10.
 17. Ahsan H, Whittemore AS, Chen Y, Senie RT, Hamilton SP, Wang Q, et al. Variants in estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 and breast cancer risk: a family-based genetic association study. *Breast Cancer Res* 2005; 7(1): R71-R81.

Polymorphisms of Satellite DNA CYP19 Gene and its Association with Increased Risk of Breast Cancer in Isfahan, Iran

Seyed Morteza Javadirad¹, Simin Hemati PhD², Manochehr Tavassoli PhD³

Abstract

Background: Aromatase is a key enzyme in the synthesis of estrogen. This enzyme is encoded by the cytochrome P-450 (CYP19) gene. Overexposure of cells to estrogen causes breast carcinoma and breast cancer patients show a higher level of aromatase expression. The purpose of this study was to investigate polymorphism of the CYP19 intron 4 (TTTA)_n among breast cancer patients and healthy individuals, and its correlation to risk of breast cancer.

Methods: This study was a case-control study on 420 patients and 432 control women. DNA was extracted from the blood of the study subjects, and then the sequence was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Thereafter, the number and sequence of TTTA was measured by electrophoresis in Polyacrylamide gel.

Findings: The results of this study show that IGF-I gene allele distribution in the population of Isfahan varies between 7-13 repetitions. The most common allele in both controls and cases was (TTTA)₇-TCT with frequencies of 34.3% and 34.8%, respectively.

Conclusion: The results of the current study show that the frequency distribution of 10 TTTA repeats is higher in the controls (2.3%) than in patients (1.4%). In other words, not only does 10 TTA not increase the rate of breast cancer, but it may even cause people with this allele to be more resistant to cancer.

Keywords: Breast cancer, Microsatellite, Polymorphism, CYP19

¹ Student, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

² Assistant Professor, Department of Radiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Seyed Morteza javadirad, Email: javadirad@yahoo.com