

بررسی فراوانی نسبی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی G870A (rs9344) در ژن CyclinD1 (CCND1) در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و افراد سالم در جمعیت اصفهان

شیمیا رحیمی راد^۱، رسول صالحی^۲، بهناز صفار^۳، مصطفی نیایی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال (Colorectal cancer یا CRC) یکی از سرطان‌های شایع در جهان است. فعالیت بیش از حد ژن CyclinD1 در پیشبرد این سرطان دیده شده است. پلی‌مورفیسم G870A در اگزون ۴ این ژن، منجر به تولید یک رونوشت متناوب می‌شود که نیمه عمر طولانی‌تری دارد و ممکن است با رشد سلولی غیر قابل کنترل به توسعه‌ی سرطان کمک کند. مطالعه‌ی حاضر، به منظور بررسی فراوانی نسبی پلی‌مورفیسم G870A در ژن CCND1 در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال تک‌گیر (Sporadic) و افراد سالم در جمعیت اصفهان انجام شد.

روش‌ها: نمونه‌ی DNA از لکوسیت‌های خون محیطی ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال تک‌گیر و ۵۰ فرد سالم فاقد سرطان از جمعیت استان اصفهان استخراج شد. پلی‌مورفیسم G870A در ژن CCND1 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز-پلی‌مورفیسم طولی قطعات محدود شده (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism یا PCR-RFLP) در افراد سالم و بیمار تعیین ژنوتیپ شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با کمک آزمون χ^2 انجام شد.

یافته‌ها: ارتباط معنی‌داری بین فراوانی آلل پلی‌مورفیسم G870A در ژن CCND1 در بین گروه‌های مورد و شاهد دیده نشد ($P = ۰/۲۰۴$). در حالی که فراوانی ژنوتیپ AA در گروه مورد به صورت معنی‌داری بیشتر بود ($P = ۰/۰۴۰$ ، $CI = ۱/۱۳-۵/۵۴$ ، $OR = ۲/۲۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به ارتباط معنی‌دار مشاهده شده بین ژنوتیپ خاصی از این جایگاه (AA) با سرطان کولورکتال، می‌توان در آینده از آن به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی دهنده‌ی مناسب در غربالگری سرطان کولورکتال استفاده نمود.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ژن CyclinD1

ارجاع: رحیمی راد شیمیا، صالحی رسول، صفار بهناز، نیایی مصطفی. بررسی فراوانی نسبی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی G870A (rs9344) در ژن CyclinD1 (CCND1) در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و افراد سالم در جمعیت اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۵): ۶۴۹-۶۵۶

بهترین روش‌های غربالگری، از نتایج بررسی بیماری‌زایی این سرطان می‌باشند (۳).

پروتئین CyclinD1 که توسط ژن CCND1 کد می‌شود، یک عامل تنظیمی مهم در چرخه‌ی سلولی است و گذر از مرحله‌ی G₁ به S را کنترل می‌کند (۴). فعالیت بالای ژن CCND1 و بیان بیش از حد پروتئین آن، اغلب در تومورهای نظیر سرطان کولورکتال دیده شده است (۵).

مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal cancer یا CRC)، از شایع‌ترین سرطان‌های میان انسان‌ها می‌باشد و از عوامل مرگ و میر مهم در سرتاسر دنیا به شمار می‌آید (۱). شیوع این سرطان در ایران، به نسبت بالا و رو به افزایش می‌باشد و به طور تقریبی، حدود ۷ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت است (۲). در توسعه‌ی این سرطان، تعاملات ژن‌ها و عوامل محیطی درگیر هستند و تشخیص زودهنگام و تعیین

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

سرطان کلورکتال سالم بودند و برای معاینه‌ی سالانه به دستور پزشک یا برای انجام آزمایش کلونوسکوپی به این مرکز مراجعه کردند.

با توجه به این که در جمعیت ایران در مورد ارتباط این پلی مورفیسم با خطر سرطان کلورکتال و فراوانی آلل‌ها اطلاعاتی در دست نبود؛ به صورت مطالعه‌ی Pilot، تعداد ۵۰ نفر مورد (Case) و ۵۰ نفر شاهد (Control) در نظر گرفته شدند. پرسش‌نامه‌ای تهیه شد و از افراد دو گروه در مورد اطلاعات دموگرافیک، سن، شاخص توده‌ی بدن، تاریخچه‌ی مصرف سیگار و داروهای NSAIDs و انجام فعالیت بدنی پرسیده شد. تمام شرکت کنندگان از نوع مطالعه آگاه شدند و رضایت‌نامه‌ی کتبی از همه دریافت شد.

نمونه‌ی DNA از لکوسیت‌های خون محیطی شرکت کنندگان با استفاده از کیت استخراج DNA (Genet Bio) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری بررسی شد. تعیین ژنوتیپ‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز - پلی مورفیسم طولی قطعات محدود شده (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism یا PCR-RFLP) انجام شد.

مجموعه‌ی پرایمرهای مناسب (جدول ۱) برای تولید ۲۵۱ جفت باز محصول PCR که حاوی ناحیه‌ی پلی مورفیسم G870A بود، استفاده شد. شرایط PCR به صورت یک چرخه‌ی دناتوره کننده‌ی اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل دناتوره کننده در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر در ۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طول‌سازی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طول‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به صورت یک چرخه انجام شد.

حجم نهایی واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر بود و شامل ۱۴ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار) (سیناژن، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (۱۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، ۲ میکرولیتر پرایمر F (۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر) (ژن فن‌آوران)، ۲ میکرولیتر پرایمر R

این تقویت و افزایش بیان، منجر به گذر نابه‌جای G₁ به S همراه با عبور DNA آسیب دیده‌ی ترمیم نشده و در نهایت، تکثیر غیر طبیعی سلول‌ها می‌شود (۶). پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی SNP یا (Single nucleotide polymorphism) شایع G به A در نوکلئوتید CCND1 (rs9344, CCND1 G870A polymorphism) ۸۷۰ ژن به عنوان یک آلل مستعد کننده با نفوذ پایین در خطر سرطان کلورکتال میان جمعیت‌های نژادی مختلف بررسی شده است (۷).

جایگزینی G/A مرتبط با کدون ۲۴۱ (Pro-241-Pro) در ناحیه‌ی حفظ شده‌ی پرودازش آگزون ۴، منجر به تولید رونوشت متناوب از ژن CCND1 می‌شود که «b Transcript» نام دارد و فاقد آگزون ۵ و موتیف تنظیمی برای تجزیه (دامین PEST یا Point estimation by sequential testing) است (۸).

آلل G، یک رونوشت کامل به نام «a Transcript» تولید می‌کند که مانع از بیان بیش از حد CyclinD1 می‌شود. «رونوشت b» (آلل A) نیمه عمر طولانی‌تری نسبت به «رونوشت a» دارد و در نتیجه، منجر به عبور بیشتر G₁ به S و کمک به توسعه‌ی سرطان می‌شود (۹).

هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی فراوانی نسبی و ارتباط پلی مورفیسم G870A در ژن CCND1 با خطر ابتلا به سرطان کلورکتال میان افراد بیمار و سالم در جمعیت اصفهان است. چنین مطالعه‌ای تا کنون در ایران انجام نشده بود. همچنین، در این مطالعه، ارتباط بین تعدادی از عوامل محیطی نظیر فعالیت بدنی، مصرف داروهای غیر استروئیدی ضد التهابی (NSAIDs) یا (Non-steroidal anti-inflammatory drugs)، شاخص توده‌ی بدنی (BMI یا Body mass index)، مصرف سیگار، با خطر سرطان کلورکتال و ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم بررسی شد.

روش‌ها

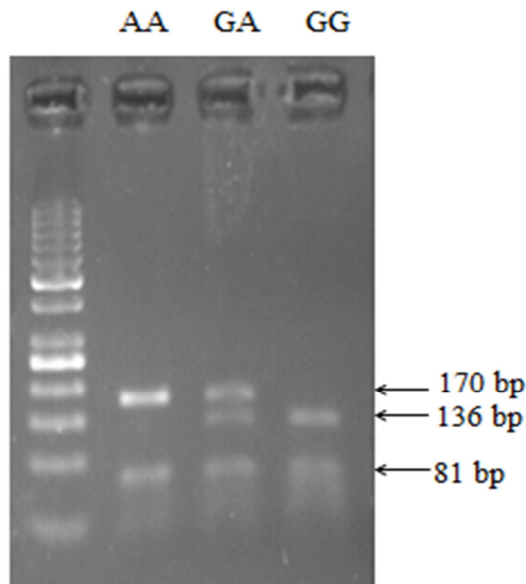
در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، ۵۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال تک‌گیر (Sporadic) و ۵۰ نفر فرد سالم بدون سرطان از جمعیت استان اصفهان شرکت داشتند. دو گروه، از افراد مراجعه کننده به مؤسسه‌ی پژوهشی-درمانی پورسینای حکیم اصفهان و بیمارستان سیدالشهدای (ع) (امید) اصفهان انتخاب شدند. افراد شاهد، از نظر

جدول ۱. توالی پرایمر و طول آمپلیکون برای پلی مورفیسم G870A در ژن CCND1

کد شناسایی SNP	آلل اجدادی	توالی پرایمر	طول محصول PCR	آنزیم محدود کننده	اندازه‌ی قطعات RFLP (bp)
Rs9344	G	Forward: ATTTCCAATCCGCCCTCCAT Reverse: CCCCAACCTTGTACCCCTT	۲۵۱	MspI	۱۳۶+۸۱+۳۴GG: ۱۷۰+۱۳۶+۸۱+۳۴AG: ۱۷۰+۸۱AA:

SNP: Single nucleotide polymorphism; RFLP: Restriction fragment length polymorphism

مورد کمتر از داروهای NSAIDs به صورت منظم نسبت به گروه شاهد (۲۶ درصد در مقابل ۸ درصد) استفاده می کردند و ارتباط معکوس معنی داری بین خطر سرطان کلورکتال و مصرف داروهای NSAIDs مشاهده شد ($P = 0/020$).



شکل ۱. قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصولات

Polymerase chain reaction (PCR) حاوی پلی مورفیسم G870A در ژن CyclinD1. در این شکل، افراد هموزیگوت AA و GG و هتروزیگوت (GA) برای این پلی مورفیسم مشاهده می شوند. Ladder 50 bp SM 0373

(۱۰۰ میکرومول بر میکرولیتر) (ژن فن آوران)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq (۵ واحد بر میکرولیتر) (سیناژن، ایران) و ۳ میکرولیتر DNA بود.

محصولات PCR توسط آنزیم محدودالثر MspI (فرمتاز، فرانسه) مورد هضم قرار گرفت و الکتروفورز روی ژل آگارز ۲/۵ درصد حاوی ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر DNA Green viewer برای مشاهده قطعات حاصل از هضم آنزیمی انجام شد. با توجه به موقعیت هضم آنزیمی، سه الگوی مختلف شامل سه بانده ۱۳۶، ۸۱ و ۳۴ جفت باز برای ژنوتیپ وحشی (GG)، دو بانده ۱۷۰ و ۸۱ برای ژنوتیپ واریانت (AA) و چهار بانده ۱۷۰، ۱۳۶، ۸۱ و ۳۴ جفت باز برای ژنوتیپ هتروزیگوت (GA) در ژل الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۱).

به منظور تأیید نتایج PCR-RFLP، ۱۰ درصد محصولات PCR به صورت تصادفی انتخاب و برای تعیین توالی ارسال شد. داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و با کمک آزمون χ^2 تجزیه و تحلیل شدند. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. توزیع ژنوتیپ و آلل این پلی مورفیسم در معادله Hardy-Weinberg می باشد.

یافته ها

ویژگی های افراد گروه های مورد و شاهد در جدول ۲ آمده است. تجزیه و تحلیل آماری، هیچ اختلاف معنی داری بین سن، جنس و استعمال دخانیات در بین گروه های مورد و شاهد نشان نداد. گروه

جدول ۲. اطلاعات نمونه های جمع آوری شده افراد گروه های مورد و شاهد

مقدار P	گروه مورد (n = 50)	گروه شاهد (n = 50)		
0/548	26 (52)	23 (46)	مرد تعداد (درصد)	جنس
	27 (54)	24 (48)	زن تعداد (درصد)	
0/670	59/1 ± 10/6	58/2 ± 10/8		سن (سال) (میانگین ± انحراف معیار)
0/040	26/8 ± 5/6	25/8 ± 3/6		شاخص توده ای بدن (kg/m ²) (میانگین ± انحراف معیار)
0/750	5 (10)	6 (12)	همیشه	مصرف سیگار
	45 (90)	44 (88)	هرگز	
0/001	13 (26)	0 (0)	خیلی کم	فعالیت بدنی
	21 (42)	19 (38)	کم	
	15 (30)	22 (44)	متوسط	
	1 (2)	9 (18)	زیاد	
0/020	4 (8)	13 (26)	به طور معمول	مصرف NSAIDs
	46 (92)	37 (74)	هرگز	

NSAIDs: Non-steroidal anti-inflammatory drugs

* $P < 0/050$

جدول ۳. فراوانی آللی و ژنوتیپی در گروه‌های مورد و شاهد

مقدار P	گروه شاهد تعداد (درصد)	گروه مورد تعداد (درصد)	متغیر
۰/۲۷۱	۲۷/۰ (۵۴)	۲۱/۵ (۴۳)	G
	۲۳/۰ (۴۶)	۲۸/۵ (۵۷)	A
۰/۲۰۴	۱۴/۰ (۲۸)	۱۱/۰ (۲۲)	GG
	۲۶/۰ (۵۲)	۲۱/۰ (۴۲)	AG
	۱۰/۰ (۲۰)	۱۸/۰ (۳۶)	AA

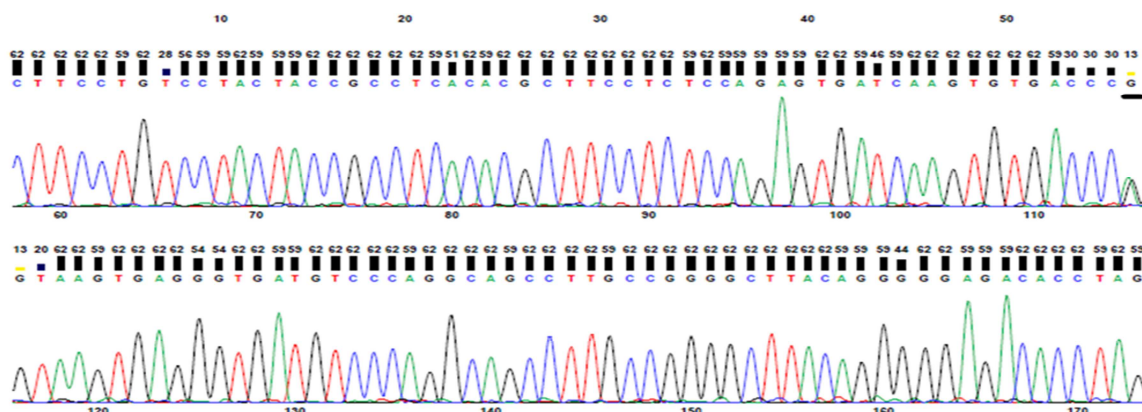
شدن، $1/55$ بیشتر از حاملین آلل G بود ($CI = 0/856-2/528$)
 $OR = 1/55$ درصد، 95).

در این مطالعه، فراوانی ژنوتیپ AA در مقابل ژنوتیپ‌های GA و GG تجزیه و تحلیل شد. فراوانی ژنوتیپ AA در گروه مورد 80 درصد و در گروه شاهد 64 درصد و فراوانی ژنوتیپ‌های GA و GG در گروه مورد 20 و در گروه شاهد 36 درصد بود. نتایج آماری نشان داد که فراوانی ژنوتیپ AA در گروه مورد به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد است و نسبت شانس حاملین ژنوتیپ AA برای ابتلا به سرطان، $2/25$ با فاصله‌ی اطمینان $CI = 1/130-5/540$ ، $P = 0/040$ به دست آمد. $OR = 2/25$

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که افراد حامل ژنوتیپ AA خطر بیشتری برای توسعه‌ی سرطان کولورکتال در مقایسه با حاملین ژنوتیپ GG دارند ($OR AA VS. GG = 2/29$ ، $CI = 1/050-5/010$ ، $P = 0/040$)؛ به عبارت دیگر، در این مطالعه پلی‌مورفیسم G870A در ژن CCND1 در حالت مغلوب تأثیرگذار است؛ به طوری که در هر دو جایگاه ژنی آلل A قرار داشته باشد. در محاسبه‌ی توزیع فراوانی ژنوتیپ GG در مقایسه با ژنوتیپ‌های AA و GA در دو گروه، نتایج آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($P = 0/488$)، $CI = 0/265-1/975$ ، $OR = 0/725$ ، 95 درصد).

ارتباط معنی‌داری در فعالیت فیزیکی بین گروه‌های مورد و شاهد مشاهده شد و آزمون Mann-Whitney نشان داد، فعالیت فیزیکی در گروه مورد به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد است ($P = 0/010$). تجزیه و تحلیل BMI در دو گروه نشان داد که میانگین شاخص توده‌ی بدنی در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد است ($P = 0/040$). در این مطالعه، میان‌کنش سن، جنسیت، استعمال دخانیات و مصرف داروهای NSAIDs با ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم بررسی شد، اما ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم و این متغیرها دیده نشد.

همان‌طور که در جدول ۳ فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های این پلی‌مورفیسم مشاهده می‌شود، میان بیماران سرطان کولورکتال فراوانی ژنوتیپ‌های G870A در ژن CCND1 به صورت 22 درصد = GG، 36 درصد = AA و 42 درصد = GA بود، در حالی که فراوانی ژنوتیپ‌ها در افراد سالم به صورت 28 درصد = GG، 20 درصد = AA و 52 درصد = GA بود. نتایج حاصل از تعیین توالی محصولات PCR نشان داد که مقایسه‌ی توالی تکثیر شده و توالی موجود در بانک اطلاعات ژنی تشابه کامل دارند (شکل ۲). توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های G870A در ژن CCND1 میان گروه‌های شاهد و مورد معنی‌دار نبود ($P = 0/204$). فراوانی نسبی آلل A در گروه مورد $0/57$ و در گروه شاهد $0/46$ بود. نسبت شانس حاملین آلل A برای بیمار



شکل ۲. نتیجه‌ی تعیین توالی نمونه‌ی هتروزیگوت AG مربوط به پلی‌مورفیسم G870A در ژن CyclinD1

بحث

علاوه بر جهش در ژن‌های با نفوذ بالا، واریانت‌های ژنتیک با نفوذ کم یا متوسط همانند پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در استعداد به خطر سرطان کولورکتال دخیل هستند (۱۱-۱۰). پلی‌مورفیسم G870A در ژن CCND1 در میان پلی‌مورفیسم‌های مشخص شده‌ی ژن CyclinD1 بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲). ژن CyclinD1 از پنج اگزون تشکیل شده است، این پلی‌مورفیسم در محدوده‌ی مرزی ایترون ۷۴گزون ۵ رخ می‌دهد که دو رونوشت ایجاد می‌شود.

آلل G870 یک جایگاه دهنده‌ی پیرایش بهینه ایجاد می‌کند که رونوشت مناسب به نام «Transcript a» را تولید می‌کند. آلل A870 با پردازش متناوب، یک رونوشت دیگر به نام «Transcript b» ایجاد می‌کند که فاقد اگزون ۵ می‌باشد. این رونوشت، فاقد موتیف‌هایی است که تغییر و تبدیل CyclinD1 را تنظیم می‌کنند، مانند موتیف تنظیمی دامین PEST که نقش مهمی در تجزیه‌ی CyclinD1 دارد و از بیان بیش از حد آن جلوگیری می‌کند و ترئونین ۲۸۶، باقی‌مانده‌ی آمینواسیدی است که خروج از هسته و ثبات پروتئین را کنترل می‌کند. رونوشت CyclinD1 b نیمه‌عمر طولانی‌تری دارد و باعث فعالیت بیشتر چرخه‌ی سلولی می‌شود.

همچنین، این رونوشت به صورت ساختمانی یک پروتئین هسته‌ای است (به دلیل حذف ترئونین ۲۸۶). به همین دلیل، باعث افزایش دگرگونی‌های انکوژنی می‌شود (۱۳، ۹، ۵).

مطالعه‌ی بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم G870A در ژن CyclinD1 و سرطان کولورکتال، در ایران صورت نگرفته بود و از طرفی، مطالعات در کشورهای مختلف دیگر دارای نتایج متناقض بود. ارتباط این پلی‌مورفیسم با خطر سرطان‌های مختلفی نظیر سرطان سینه، ریه، معده و مثانه مطالعه شده است. این مطالعات، نشان داده است که پلی‌مورفیسم G870A در ژن CyclinD1، به صورت یک نشانگر استعداد خطر چند سرطانی می‌باشد که همراه میان‌کنش با عوامل بیولوژیک، فیزیولوژیک و عوامل محیطی مختلف عمل می‌کند (۱۶-۱۴).

مطالعات متعددی که در کشورهای مختلف ارتباط پلی‌مورفیسم G870A در ژن CyclinD1 و خطر سرطان کولورکتال را بررسی کردند، نشان دادند که این SNP، یک عامل خطر با نفوذ کم برای سرطان کولورکتال است، اما از آن جایی که شیوع این SNP در جامعه بالا می‌باشد و با تعامل با دیگر عوامل ژنتیک و عوامل محیطی، خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد، مطالعه بر روی آن اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۷-۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر تفاوت معنی‌داری بین فراوانی آلل‌ها بین دو

گروه مورد و شاهد وجود نداشت ($P = 0/204$). همچنین، Yaylim-Eraltan و همکاران نشان دادند که توزیع فراوانی ژنوتیپ G870A در ژن CyclinD1 بین بیماران و افراد سالم تفاوت معنی‌داری نداشت ($P = 0/203$) (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی ژنوتیپ AA در مقابل ژنوتیپ GA و GG بین افراد بیمار و سالم بررسی و مشخص شد که فراوانی ژنوتیپ AA در گروه مورد، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد است ($P = 0/040$)؛ به عبارت دیگر، آلل A، در مدل مغلوب وارث ممکن است در افزایش خطر سرطان کولورکتال اثر داشته باشد و با قرار گرفتن آلل A در هر دو جایگاه ژنی یعنی حالت مغلوب، ارتباط این پلی‌مورفیسم با خطر سرطان کولورکتال مشاهده می‌شود.

همچنین، Kong و همکاران در مطالعه‌ی خود بیان کردند که پلی‌مورفیسم G870A در ژن CyclinD1، با افزایش خطر ابتلا به سرطان کولورکتال مرتبط است و داده‌ها بیشتر با تأثیر پلی‌مورفیسم در مدل توارث مغلوب مرتبط است (۲۱). Jiang و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود نتیجه‌ی مشابهی داشتند؛ آن‌ها نشان دادند که خطر افزایش یافته‌ی ابتلا به سرطان کولورکتال برای ژنوتیپ AA در مقایسه با ژنوتیپ AG+GG وجود دارد (۲۲)، اما از طرفی، Sameer و همکاران در مطالعه‌ی خود ژنوتیپ‌های AG و AA را در مقایسه با ژنوتیپ GG، با افزایش خطر سرطان کولورکتال مرتبط نشان دادند (۲۳). همچنین، Zhang و همکاران بیان نمودند که آلل A مرتبط با افزایش خطر سرطان کولورکتال است (۲۴).

به طور کلی، نتایج متناقضی در مورد ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و خطر سرطان کولورکتال وجود دارد که شاید یکی از علل معنی‌دار نبودن ارتباط آللی با سرطان در این مطالعه، میزان پایین حجم نمونه باشد؛ انجام مطالعات بیشتری با حجم نمونه‌ی بالاتر در این زمینه، ضروری به نظر می‌رسد.

همچنین، ارتباط بین برخی عوامل محیطی با خطر سرطان کولورکتال و نیز با ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم نیز در این مطالعه تجزیه و تحلیل گردید. بر اساس آزمون Logistic regression، مشاهده شد که گروه مورد نسبت به گروه شاهد کمتر از داروهای NSAIDs به صورت منظم استفاده می‌کردند و همچنین، میزان فعالیت فیزیکی در گروه مورد به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود و نیز مشاهده شد که میانگین شاخص توده‌ی بدنی در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد است. متغیری که ارتباط آن با ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم بررسی شد، مصرف داروهای غیر استروئیدی ضد التهابی بود. مشخص شد که اثر استفاده از NSAIDs و عدم استفاده از این داروها بر اساس ژنوتیپ‌ها تغییر نمی‌کند و تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P = 0/280$).

بزرگ چند قومیتی برای کمک به مشخص کردن تأثیر دقیق این پلی‌مورفیسم در سرطان مورد نیاز است. این احتمال که پلی‌مورفیسم G870A ممکن است یک نشانگر برای واریانت‌های دیگر در ژن CyclinD1 باشد، لازم است تا ارزش پیش‌آگهی این پلی‌مورفیسم مشخص شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه شهرکرد که تأمین مالی این پایان‌نامه به شماره‌ی ۱۶۱/۳۶۴ را بر عهده داشتند و نیز دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مسؤولین آزمایشگاه گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی این دانشکده که شرایط انجام این پایان‌نامه را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

بر خلاف نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر، Lewis و همکاران نشان دادند که در میان افراد حامل آلل A، خطر سرطان کلورکتال برای کسانی که الکل مصرف می‌کنند و سیگار می‌کشند، بیشتر است و در میان کسانی که ژنوتیپ GG دارند، خطر سرطان کلورکتال برای مصرف‌کنندگان NSAIDs و کلسیم کمتر است (۲۵). البته، همان‌طور که اثر محافظتی این داروها علیه این سرطان شناخته شده است (۲۶-۲۷). در مطالعه‌ی حاضر نیز این اثر دیده شد که مصرف NSAIDs با کاهش خطر سرطان کلورکتال ارتباط دارد، اما در ارتباط با ژنوتیپ‌ها تفاوتی دیده نشد.

در انتها، باید ذکر شود که ارتباط این پلی‌مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان کلورکتال، به عوامل مختلفی همچون تفاوت نژادی و جغرافیایی، بر هم‌کنش این پلی‌مورفیسم با سایر عوامل ژنتیک و یا زمینه‌ی ژنتیک و عوامل محیطی بستگی دارد. در نتیجه، مطالعات

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(1): 5-29.
2. Mahmodlou R, Mohammadi P, Sepehrvand N. Colorectal cancer in northwestern iran. *ISRN Gastroenterol* 2012; 2012: 968560.
3. Li D, Conti DV. Detecting gene-environment interactions using a combined case-only and case-control approach. *Am J Epidemiol* 2009; 169(4): 497-504.
4. Kato JY, Yoneda-Kato N. New twist in the regulation of cyclin D1. *Biomol Concepts* 2010; 1(5-6): 403-9.
5. Yang Y, Wang F, Shi C, Zou Y, Qin H, Ma Y. Cyclin D1 G870A polymorphism contributes to colorectal cancer susceptibility: evidence from a systematic review of 22 case-control studies. *PLoS One* 2012; 7(5): e36813.
6. Loh SF, Cooper C, Selinger CI, Barnes EH, Chan C, Carmalt H, et al. Cell cycle marker expression in benign and malignant intraductal papillary lesions of the breast. *J Clin Pathol* 2015; 68(3): 187-91.
7. Pabalan N, Bapat B, Sung L, Jarjanazi H, Francisco-Pabalan O, Ozcelik H. Cyclin D1 Pro241Pro (CCND1-G870A) polymorphism is associated with increased cancer risk in human populations: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(10): 2773-81.
8. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006; 25(11): 1620-8.
9. Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, et al. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem* 2003; 278(32): 30339-47.
10. Gylfe AE, Katainen R, Kondelin J, Tanskanen T, Cajuso T, Hanninen U, et al. Eleven candidate susceptibility genes for common familial colorectal cancer. *PLoS Genet* 2013; 9(10): e1003876.
11. Abuli A, Bessa X, Gonzalez JR, Ruiz-Ponte C, Caceres A, Munoz J, et al. Susceptibility genetic variants associated with colorectal cancer risk correlate with cancer phenotype. *Gastroenterology* 2010; 139(3): 788-96, 796.
12. Le ML, Seifried A, Lum-Jones A, Donlon T, Wilkens LR. Association of the cyclin D1 A870G polymorphism with advanced colorectal cancer. *JAMA* 2003; 290(21): 2843-8.
13. Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res* 2003; 63(21): 7056-61.
14. Li Y, Zhang S, Geng JX, Yu Y. Effects of the cyclin D1 polymorphism on lung cancer risk--a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(5): 2325-8.
15. Rydzanicz M, Golusinski P, Mielcarek-Kuchta D, Golusinski W, Szyfter K. Cyclin D1 gene (CCND1) polymorphism and the risk of squamous cell carcinoma of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263(1): 43-8.
16. Yu CP, Yu JC, Sun CA, Tzao C, Ho JY, Yen AM. Tumor susceptibility and prognosis of breast cancer associated with the G870A polymorphism of CCND1. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107(1): 95-102.
17. Chen B, Cao L, Yang P, Zhou Y, Wu XT. Cyclin D1 (CCND1) G870A gene polymorphism is an ethnicity-dependent risk factor for digestive tract cancers: a meta-analysis comprising 20,271 subjects. *Cancer Epidemiol* 2012; 36(2): 106-15.
18. Forones NM, de Lima JM, de Souza LG, da Silva ID. Cyclin D1 A870G polymorphism in Brazilian colorectal cancer patients. *J Gastrointest Cancer* 2008; 39(1-4): 118-23.
19. Hong Y, Eu KW, Seow-Choen F, Fook-Chong S, Cheah PY. GG genotype of cyclin D1 G870A polymorphism is associated with increased risk and advanced colorectal cancer in patients in Singapore. *Eur J Cancer* 2005; 41(7): 1037-44.
20. Yaylim-Eraltan I, Arikian S, Yildiz Y, Cacina C, Ergen HA, Tuna G, et al. The influence of cyclin D1 A870G polymorphism on colorectal cancer risk and prognosis in a Turkish population. *Anticancer Res* 2010; 30(7): 2875-80.

21. Kong S, Wei Q, Amos CI, Lynch PM, Levin B, Zong J, et al. Cyclin D1 polymorphism and increased risk of colorectal cancer at young age. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(14): 1106-8.
22. Jiang J, Wang J, Suzuki S, Gajalakshmi V, Kuriki K, Zhao Y, et al. Elevated risk of colorectal cancer associated with the AA genotype of the cyclin D1 A870G polymorphism in an Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132(3): 193-9.
23. Sameer AS, Parray FQ, Dar MA, Nissar S, Banday MZ, Rasool S, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism and risk of colorectal cancer: a case control study. *Mol Med Rep* 2013; 7(3): 811-5.
24. Zhang LQ, Wang J, Shang JQ, Bai JL, Liu FY, Guan X, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 populations. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26(10): 1249-55.
25. Lewis RC, Bostick RM, Xie D, Deng Z, Wargovich MJ, Fina MF, et al. Polymorphism of the cyclin D1 gene, CCND1, and risk for incident sporadic colorectal adenomas. *Cancer Res* 2003; 63(23): 8549-53.
26. Ruder EH, Laiyemo AO, Graubard BI, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Cross AJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(7): 1340-50.
27. Vainio H, Morgan G, Kleihues P. An international evaluation of the cancer-preventive potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6(9): 749-53.

Evaluation of Relative Frequency of Single Nucleotide Polymorphism G870A (rs9344) in CyclinD1 Gene in Colorectal Cancer Patients and Healthy Subjects of Isfahan Province, Iran

Shima Rahimirad¹, Rasoul Salehi², Behnaz Saffar³, Mostafa Niaee³

Original Article

Abstract

Background: Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the world. High activity of CyclinD1 gene has been seen in the progress of this cancer. A common polymorphism (G870A) in exon 4 of CyclinD1 produces a variant transcript with longer half-life and may cause uncontrollable cellular growth thus contributing to cancer development. This study was performed to evaluate the frequency of CCND1 G870A polymorphism between CRC cases and controls.

Methods: DNA samples from peripheral blood leukocytes of 50 patients with sporadic colorectal cancer and 50 healthy subjects were extracted. CCND1 G870A polymorphism was genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in healthy subjects and patients. Statistical analysis was performed by chi-squared test via SPSS software.

Findings: Relationship between CCND1 G870A polymorphism in allele frequencies between cases and controls were not observed ($P = 0.204$). While the frequency of AA genotype was significantly higher in patients ($P = 0.040$, 95% CI = 1.13-5.54, OR = 2.25).

Conclusion: According to the significant association observed between certain genotypes of this locus (AA) with colorectal cancer, it can be used in the future as a good prognostic marker in CRC screening programs.

Keywords: Colorectal cancer, Single nucleotide polymorphism, CyclinD1 gene

Citation: Rahimirad S, Salehi R, Saffar B, Niaee M. Evaluation of Relative Frequency of Single Nucleotide Polymorphism G870A (rs9344) in CyclinD1 Gene in Colorectal Cancer Patients and Healthy Subjects of Isfahan Province, Iran. J Isfahan Med Sch 2016; 34(385): 649-56.

1- MSc Student, Department of Genetic, School of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Rasoul Salehi, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir