

ارتباط ژن ژلاتیناز B با سرطان ریه در افراد سیگاری و غیر سیگاری

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

چکیده

مقدمه: شواهد فزاینده‌ای پیشنهاد می‌کند که آنزیم ژلاتیناز B علاوه بر نقش در متاستاز از طریق تغییر و پردازش فاکتورهای رشد، گیرنده‌های فاکتورهای رشد، فاکتورهای آنژیوژنیک و دیگر پروتئین‌ها در شکل‌گیری سرطان نیز درگیر می‌باشد و بنابراین نقش اساسی در شروع و پیشروی سرطان دارد. وجود پلی‌مورفیسم ژنتیکی در پروموتور ژن ژلاتیناز B و ارتباط آن با چندین سرطان از جمله سرطان ریه گزارش شده است.

روش‌ها: در ۱۷۲ بیمار مبتلا به سرطان ریه و ۱۲۳ فرد شاهد ژنوتیپ ژلاتیناز B تعیین شد. این کار بر روی DNA ژنومیک استخراج شده از نمونه‌ی تام خون با تکنیک چند شکلی طولی قطعات DNA و با استفاده از آنزیم‌های محدودالایر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RFLP-PCR) یا Restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction انجام شد. شمار ژنوتیپ‌های مشاهده شده با شمار مورد انتظار برای جمعیت در تعادل هاردی واینبرگ توسط آزمون χ^2 مقایسه شد. اختلافات با اهمیت ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز نسبت افزایشده (OR یا Odds ratio) آزموده شد.

یافته‌ها: فراوانی مصرف سیگار در بیماران (۵۷/۵ درصد) بیشتر از افراد گروه شاهد (۳۰ درصد) بود. توزیع ژنوتیپی ژن ژلاتیناز B به طور معنی‌داری با خطر ابتلا به سرطان ریه مرتبط بود (OR = ۲/۵۶، CI: ۰/۰۶-۲۳/۸۲). افراد سیگاری واجد ژنوتیپ‌های TT و TT + CT بودند و به ترتیب استعداد خطر OR = ۳/۴۵ یا OR = ۱/۲۸-۹/۲۴ و CI: ۱۴/۶۶ یا OR = ۳/۹۵-۵۳/۴۷ برای سرطان ریه داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که توزیع ژنوتیپی ژن ژلاتیناز B به طور معنی‌داری با افزایش خطر ابتلا به سرطان ریه مرتبط بود و افراد سیگاری واجد ژنوتیپ‌های TT و TT + CT بودند.

واژگان کلیدی: ژلاتیناز B، RFLP-PCR، تعیین ژنوتیپ، استعمال دخانیات، سرطان ریه

مقدمه

گرفته است. به طور کلی تغییر در این مسیرها بر روی پردازش مواد سرطان‌زای دخانیات و خطر پیشرفت سرطان ریه اثر می‌گذارد (۳).

استعمال دخانیات به دو فرآیند پاتولوژیک مهم در ریه منجر می‌گردد. نخست این که تخریب پروتئولیتیک پارانشیم ریه باعث بزرگ شدن دائمی فضا‌های هوایی می‌شود که در ادامه فقدان الاستیسیته‌ی ریه را به دنبال دارد. فرآیند دیگر تنگ‌شدگی التهابی مسیرهای هوایی است که با ادم، ترشح بیش از حد موکوس و فیبروز

مرحله‌ی شروع سرطان ناشی از ضربه‌ی جبران‌ناپذیر و به نسبت سریع به سلول است که می‌تواند به علت جذب اولیه‌ی مواد سرطان‌زا و صدمه‌ی ژنی کشنده‌ی ثانویه به دلیل فعال‌سازی متابولیکی مواد سرطان‌زا ایجاد گردد (۱-۲). به منظور یافتن ژن‌های درگیر در سرطان ریه و ارتباط نزدیک آن با استعمال دخانیات، مطالعات بر روی آنزیم‌های درگیر در فعال‌سازی، سم‌زدایی مواد سرطان‌زا و ترمیم صدمه‌ی ناشی از دخانیات صورت

^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

مسیرهای هوایی مشخص می‌شود (۴).
 دخانیات حاوی بیش از ۶۰ هیدروکربن آروماتیک
 چند حلقه‌ای سرطان‌زا است که از جمله‌ی آن‌ها
 می‌توان به نیتروزآمین‌ها و بنزوپیرن اشاره کرد (۵).
 آنزیم‌های میکروزومی فاز ۱ و ۲ شامل CYP1A،
 اپوکسید هیدرولاز میکروزومی ۱ (mEH/EPHX1)،
 میلوپرووکسیداز (MPO)، NADPH کوئینون
 اکسیدوردوکتاز ۱ (NQO1)، GST و سولفوترانسفرازها
 منجر به متابولیسم هیدروکربن‌های آروماتیک چند
 حلقه‌ای، نیتروزآمین‌های اختصاصی و آمین‌های
 آروماتیک اختصاصی حاصل از دخانیات می‌گردند
 (۵-۷). ابتدا سوبسترا توسط آنزیم‌های میکروزومی فاز
 ۱ اکسید، احیا و یا هیدرولیز می‌شود و به محصول
 قطبی‌تر تبدیل می‌شود. محصول واکنش مرحله‌ی اول
 نیز به متابولیت سمی، ترشح یا فعال‌شده تبدیل
 می‌شود که توسط آنزیم‌های کونژوگه‌کننده‌ی فاز ۲ (از
 قبیل سولفوترانسفراز و گلوکوتایون S ترانسفراز) به
 سوبسترا ملحق و ترشح می‌گردد (۸-۱۰). بنابراین
 حساسیت یک فرد در ابتلا به سرطان ممکن است
 تحت تأثیر تعادل ظرفیت آن بین فعال کردن مواد پیش
 سرطان‌زا و سم‌زدایی مواد سرطان‌زا قرار بگیرد (۱۱).
 به عبارت دیگر سیتوکروم p450 با فعال‌سازی این
 ترکیبات منجر به اتصال آن‌ها به DNA می‌شود که با
 تشکیل کمپلکس باعث توقف همانندسازی و رونویسی
 می‌گردد. از طرفی گلوکوتایون S ترانسفراز با سم‌زدایی
 حد واسط‌های سرطان‌زا باعث حفاظت در برابر این
 آسیب‌ها می‌گردد. بنابراین آسیب‌های فوق اغلب ترمیم
 می‌شوند، ولی در هر حال تشکیل آن‌ها می‌تواند باعث
 تغییرات وراثتی در توالی DNA شود (۱۱-۱۵).
 همچنین دخانیات حاوی مقادیر زیادی

رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند که با اکسیداسیون
 گوانین و تبدیل آن به ۸-اگزو گوانین منجر به تولید
 جهش گوانین به تیمین (G→T) می‌گردند.
 ۸-اگزوگوانین به وجود آمده توسط آنزیم ۸
 اگزوگوانین DNA گلیکوزیلاز ۱ (OGG1) یا
 (Oxoguanine DNA glycosylase 1 repair enzyme)
 ترمیم می‌شود، ولی فعالیت پایین آنزیم در سیگاری‌ها
 خطر سرطان ریه را افزایش می‌دهد (۱۶-۱۸).
 گونه‌های فعال اکسیژن نیز باعث انواع آسیب به DNA
 می‌شوند که نیازمند ترمیم از طریق روش‌های BER
 (Base excision repair)، NER (Nucleotide
 excision repair)، MMR (Mismatch repair)،
 SSBRR (Single-strand breaks) و DSBRR
 (Double-strand breaks) می‌باشند. جهش در ژن‌های
 مسیرهای ترمیمی (XRCC1، XPD، BEROGG1)،
 NER (ERCC1، XPA)، DSBRR (ERCC3) و MMR
 (MLH1، MSH2) در ایجاد سرطان یا افزایش استعداد
 ابتلا به آن، تأثیر دارند (۱۹-۱۸، ۷، ۵).

آدنوکارسینوما در غیر سیگاری‌ها شکل غالب
 سرطان ریه می‌باشد. در مقایسه با افراد سالم افراد
 سرطانی بیشتر سیگاری هستند یا مدت کمی از توقف
 استعمال دخانیات در آن‌ها می‌گذرد. در این راستا میزان
 استعمال دخانیات، سن شروع و تعداد سال‌های مصرف
 دخانیات در کنار عواملی از قبیل محیط، هورمون‌ها،
 عوامل ژنتیکی و ویروسی در ایجاد سرطان ریه دخالت
 دارند. هیچ عامل منفردی نمی‌تواند خطر سرطان ریه در
 غیر سیگاری‌ها را توجیه کند (۲۰-۲۲، ۱۲). اما در هر
 حال مطالعات نشان داده‌اند که استعمال دخانیات
 نسبت به عامل ژنتیکی (سابقه‌ی خانوادگی و
 حساسیت ژنتیکی) غالب‌دست (۲۰). با توجه به بیان

است (۳۳). آنزیم ژلاتیناز B با شکاف رسپتور آلفا اینترلوکین ۲، فعال‌سازی $TGF-\beta$ و جدا نمودن ICAM-1 باعث فرار سلول‌های سرطانی از سیستم ایمنی می‌شود. بنابراین تکثیر لنفوسیت‌های T و پاسخ ایمنی به تومور را مهار می‌کند (۳۴).

تنظیم بیان آنزیم ژلاتیناز B از اساس در سطح نسخه‌برداری از طریق فاکتورهای نسخه‌برداری API، TCF-، RXR-RAR، PEA3، NFkB، STAT، SP1 و Lef و فاکتورهای رشد چون $TGF-\beta$ صورت می‌گیرد. $TGF-\beta$ باعث القای بیان آنزیم ژلاتیناز B، PDGF-A و PDGF-B توسط سلول‌های اندوتلیال و کاهش بیان مهارکننده‌های بافتی می‌شود. همچنین $TGF-\beta$ باعث تحریک ترشح کندرویتین سولفات و بلوغ رگ‌های خونی می‌گردد (۳۵).

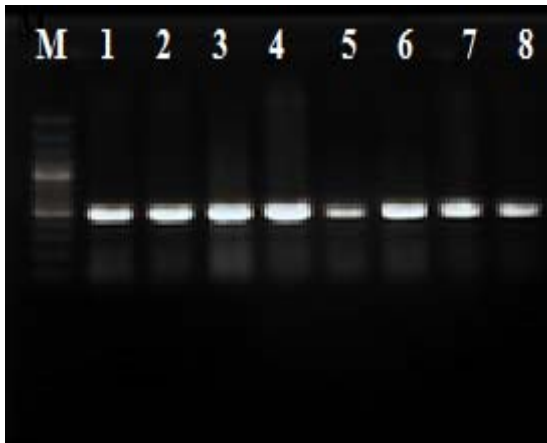
بیش از ۱۰ پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن آنزیم ژلاتیناز B شناسایی شده است که از آن جمله می‌توان به پلی‌مورفیسم C→T در بالادست جایگاه شروع نسخه‌برداری و در مجاورت عنصری که در پروموتور C-fos یافت می‌شود، اشاره کرد. این پلی‌مورفیسم با از بین بردن جایگاه اتصال پروتئین رپرسور نسخه‌برداری، باعث افزایش بیان آنزیم ژلاتیناز B می‌شود (۳۶-۳۸، ۱۴). هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی C/T پروموتور ژن آنزیم ژلاتیناز B با حساسیت سرطان ریه در گروه‌های سیگاری و غیر سیگاری بود.

روش‌ها

۱۷۲ نمونه‌ی خون از بیماران مبتلا به سرطان ریه بدون سابقه‌ی فامیلی و مورد تأیید متخصص پاتولوژی از مرکز آموزشی-پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های

القا شده‌ی آنزیم ژلاتیناز B توسط دخانیات، فرض می‌گردد که آلل‌های آنزیمی با فعالیت پروموتوری بالاتر نسبت به آلل‌های آنزیمی با فعالیت پروموتوری کمتر می‌توانند تحت تأثیر بیشتر دخانیات قرار گیرند. بنابراین افرادی سیگاری با آلل‌های مستعد ممکن است نسبت به پیشرفت سرطان حساس‌تر باشند (۲۳-۲۴).

تغییرپذیری در حساسیت ژنتیکی به مواد سرطان‌زا نیز نقش مهمی در اتیولوژی سرطان ریه دارد (۱۵، ۳). ژلاتیناز B در مقادیر کم در ریه‌ی افراد سالم وجود دارد که علاوه بر هضم پروتئین‌های ساختاری و آنتی‌پروتئازها می‌واند با تنظیم سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد متصل به ماتریکس، عملکرد سلول را تغییر دهد (۲۵). تعیین نقش این آنزیم در سلامت و بیماری مفید است؛ چرا که با وجود مهارکننده‌های اختصاصی و عمومی آن می‌توان برای درمان این بیماری‌ها راه حل‌هایی یافت (۲۷-۲۵). افزایش بیان آنزیم ژلاتیناز B در بسیاری از بیماری‌های ریوی چون آسم، آمفیوزم و فیروز سیستمیک گزارش شده است (۲۸-۳۲). در سرطان ریه سلول غیر کوچک (Non-small cell lung cancer یا NSCLC) ارتباط نزدیکی بین سطوح در حال گردش آنزیم ژلاتیناز B و میزان بقا گزارش شده است (۲۳). آنزیم ژلاتیناز B توسط ماکروفاژهای آلوئولی، لوکوسیت‌های چند هسته‌ای و استئوکلاست‌ها تولید می‌شود و واجد یک Domain فیرونکتین اضافی در Domain کاتالیتیکی است که قادر به تجزیه‌ی کلاژن تیپ I، IV، V، IX، X، الاستین، فیرونکتین، ویترونکتین، آگرکان، لامینین، همچنین مولکول‌های غیر ماتریکسی پرو $TNF-\alpha$ ، IL-8، IL-1 β ، $TGF-\beta$ و MCP-3 می‌باشد. از طرفی این آنزیم قادر به آزادسازی فاکتورهایی با خصوصیات پروآنژیوژنیک



شکل ۱. تکثیر ۸ نمونه‌ی مختلف در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با استفاده از تکنیک PCR. نمونه‌های ۴-۱ از افراد مبتلا به سرطان و نمونه‌های ۸-۵ از افراد شاهد به طور تصادفی انتخاب شده‌اند و M مارکر ۱۰۰ جفت بازی اندازه‌ی DNA است. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد در ولتاژ ۷۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت.

پس از انجام PCR به منظور تأیید صحت عملکرد پرایمرها، PCR، صحیح بودن تکثیر قطعه‌ی مورد نظر و ژنوتیپ افراد بر حسب ناحیه‌ی پلی‌مورفیسمی از برش و هضم آنزیمی آن قطعه با یک آنزیم محدودالانتر (Restriction fragment length polymorphism-PCR) یا RFLP-PCR) با حداقل یک جایگاه برش در ناحیه‌ی پلی‌مورفیسم استفاده شد. هضم آنزیمی با استفاده از ۲/۵ واحد آنزیم Pae I و ۱ میکرولیتر بافر آنزیم و انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. سپس محصولات حاصل توسط ژل آگارز ۲ درصد بررسی شدند. بدین ترتیب تمام افراد سیگاری و غیر سیگاری اعم از بیمار و شاهد تعیین ژنوتیپ شدند (شکل ۲).

در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از ژنوتیپ‌های به دست آمده از RFLP-PCR فراوانی آلی C/T در گروه‌های مورد مطالعه محاسبه گردید. سپس اختلاف در توزیع ژنوتیپ ژلاتیناز B در گروه‌های مطالعه شده

ریوی تهیه شد و در لوله‌های واجد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت جمع‌آوری اطلاعات بیماران و انجام مطالعات آماری، فرم‌های پرسش‌نامه طراحی شد. در ادامه ۱۲۳ نمونه‌ی خون مربوط به افراد سالم و منطبق با شرایط بیماران از بانک خون تهیه گردید. از ۵ میلی‌لیتر خون تهیه شده از هر فرد ۵۰۰ میکرولیتر به منظور استخراج DNA ژنومی به روش نمکی مورد استفاده قرار گرفت (۳۹). موارد کمی و کیفی DNA استخراج شده از طریق دو روش ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. در روش اسپکتروفتومتری جذب (OD260/OD280) بین ۲-۱/۸ برای نمونه‌ها انتخاب شد و در غیر این صورت استخراج به طور مجدد انجام گرفت.

تکثیر منطقه‌ی ژنی مورد نظر و واجد پلی‌مورفیسم با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) با ترکیبات ۱۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10X، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، پرایمر رفت ۲۰ پیکومولار، پرایمر برگشت ۲۰ پیکومولار، Taq پلیمراز ۰/۳ میکرولیتر و dH₂O تا رسیدن به ۲۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط دمایی برای این تکثیر شامل ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای دناتوراسیون در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه هیبریداسیون در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه تکثیر در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در انتها ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. در نهایت محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

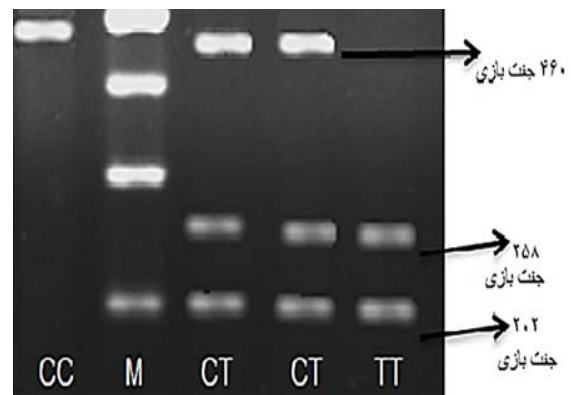
یافته‌ها

در این مطالعه تعیین ژنوتیپ از ۲۲۰ فرد مبتلا به سرطان و سالم انجام شد. ۵/۵۷ درصد از مبتلایان به سرطان و ۳۰ درصد از افراد گروه شاهد سیگار مصرف می‌کردند ($P < ۰/۰۰۱۰$ ، $OR = ۳/۱۵$ ، $CI: ۱/۸-۵/۵۱$). جدول ۱ توزیع فراوانی ژنوتیپی را در افراد دو گروه نشان داده است.

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، آلل T و ژنوتیپ‌های TT و CT در سیگاری‌های مبتلا به سرطان بیشتر از سیگاری‌های شاهد بود.

در مرحله‌ی بعد ارتباط ژنوتیپ TT در برابر ژنوتیپ‌های CC + CT و ارتباط ژنوتیپ‌های CT + TT در برابر ژنوتیپ CC بررسی شد. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، فراوانی ژنوتیپ TT و ژنوتیپ‌های واجد حداقل یک آلل T در افراد سیگاری مبتلا به سرطان از افراد شاهد سیگاری بیشتر بود (به ترتیب $OR = ۳/۴۵$ با $CI: ۱/۲۸-۹۴/۲۴$ ، $OR = ۱۴/۶۶$ با $CI: ۳/۹۵-۵۳/۴۷$).

با استفاده از χ^2 توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) محاسبه شد. نسبت افزایش یافته (OR یا Odds ratio) با فاصله‌ی اطمینان (Confidence interval یا CI) ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان همکاری پلی مورفیسم مورد نظر با دخانیات و خطر بروز سرطان ریه محاسبه گردید. در تمامی این محاسبات سطح احتمال $P < ۰/۰۵$ ، از نظر آماری معنی‌دار فرض شد.



شکل ۲. الکتروفورز محصولات RFLP-PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر، CT: ژنوتیپ هتروزیگوت، CC: ژنوتیپ هموزیگوت، TT: ژنوتیپ هموزیگوت

جدول ۱. توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی در افراد بیمار و شاهد

مقدار P*	شاهد (درصد) تعداد	سرطانی (درصد) تعداد	آللو تیپ
< ۰/۰۰۱	۱۰۶ (۵۳)	۸۶ (۳۵/۸۳)	C
	۹۴ (۴۷)	۱۵۴ (۶۴/۱۷)	T
	۲۹ (۲۹)	۱۸ (۱۵)	ژنوتیپ CC
	۴۸ (۴۸)	۵۰ (۴۱/۷)	CT
	۲۳ (۲۳)	۵۲ (۴۳/۳)	TT

*: آزمون χ^2

جدول ۲. توزیع آلی و ژنوتیپی ژلاتیناز B در افراد سیگاری و غیر سیگاری

آلوتیپ و ژنوتیپ	گروه مبتلایان به سرطان ریه		گروه شاهد	
	سیگاری درصد	غیر سیگاری درصد	سیگاری درصد	غیر سیگاری درصد
C	۴۵	۲۹	۵۰	۶۰
T	۵۵	۷۱	۵۰	۴۰
CC	۳۰	۴	۲۴/۳	۴۰
CT	۳۱	۴۹	۵۱/۴	۴۰
TT	۳۹	۴۷	۲۴/۳	۲۰

جدول ۳. توزیع ژنوتیپ‌های ژلاتیناز B در افراد سیگاری و غیر سیگاری

مصرف سیگار	گروه مبتلا به سرطان		شاهد		OR (۹۵ CI درصد)	
	CC	TT + CT	TT	TT + CT	TT ^b	TT + CT ^a
سیگاری	۳	۶۶	۶	۱۸	۳/۴۵ (۱/۲۸-۹/۲۴)	۱۴/۶۶ (۳/۹۵-۵۳/۴۷)
غیر سیگاری	۱۵	۳۶	۱۷	۵۳	۲/۰۱ (۰/۹۲-۴/۳۷)	P = ۰/۵۲ عدم ارتباط

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

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

بحث

مطالعات این پلی مورفیسم در یک آلل از ۲۰ درصد جمعیت مورد مطالعه گزارش شده است (۳۰). بیان ژلاتیناز B تحت تأثیر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی C/T در پروموتور آن قرار می‌گیرد. در آلل واجد T جایگاه اتصال برای اعضای خانواده فاکتورهای مهارکننده رونویسی از بین می‌رود و در نتیجه آلل‌های T رونویسی بیشتری نسبت به آلل‌های واجد C را نشان می‌دهند (۴۰، ۳۷). علت این خطر فزاینده در افراد سیگاری ممکن است ناشی از مواد سرطان‌زای دخانیات باشد. در واقع احتمال آن وجود دارد که تغییرات متابولیسمی القا شده به واسطه‌ی مواد سرطان‌زای شیمیایی دخانیات بر روی بیان ژلاتیناز B اثر بگذارد و باعث افزایش بیشتر بیان پروموتور حامل آلل T گردد. مواد سرطان‌زا و گونه‌های فعال اکسیژن

در مطالعه‌ی حاضر هدف بررسی نقش پلی مورفیسم C/T در پروموتور ژن ژلاتیناز B و حساسیت ابتلا به سرطان ریه در گروه‌های سیگاری و غیر سیگاری در جمعیت ایران با استفاده از تکنیک RFLP-PCR بود. با توجه به یافته‌های این مطالعه فراوانی آلل T در بیماران سیگاری در مقایسه با افراد شاهد افزایش چشمگیری نشان داد و اختلاف قابل توجهی در توزیع ژنوتیپ ژلاتیناز B گروه شاهد و گروه سرطان ریه مشاهده گردید. در مقایسه با ژنوتیپ CC ژنوتیپ‌های واجد آلل T قادر بودند خطر ابتلا به سرطان ریه را به میزان قابل ملاحظه‌ای متأثر سازند. پلی مورفیسم C/T تنها یک وارپته‌ی ژنتیکی که فقط در معدودی از سلول‌های توموری وجود داشته باشد، نیست. با توجه به

سرطان ریه در افراد غیر سیگاری گزارش شد (۲۱). علت اختلاف در نتایج به دست آمده در تحقیقات مختلف می‌تواند به دلایل اختلافات محیطی علاوه بر برهم‌کنش‌های اپی‌ستاتیک، برهم‌کنش لوکوس‌های مختلف، مصرف الکل، رژیم غذایی، زمینه‌ی ژنتیکی و تفاوت‌های ژنتیکی، مطالعات ناپیوسته و نتایج مثبت و منفی کاذب به دلیل اندازه‌ی نمونه‌ای کوچک باشد (۲۳).

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر بر روی جمعیت ایران سهم آلل T در بیماران مبتلا به سرطان ریه را بیشتر از افراد شاهد نشان داد. این یافته پیشنهاد می‌کند که افراد حامل آلل T از لحاظ ژنتیکی برای گسترش سرطان ریه مستعدتر هستند. استعمال دخانیات بیشتر از هر عامل مطالعه شده‌ی دیگر چون سن و جنس خطر ابتلا به سرطان ریه را افزایش می‌دهد. اهمیت و نتایج این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر در جهت کنترل سرطان ریه و ایجاد جامعه‌ای سالم باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت‌های پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر کمک‌های مالی و تجهیزات، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به خاطر فراهم کردن اطلاعات پزشکی و از همکاری‌های سازمان انتقال خون اصفهان و بیمارستان سیدالشهدا (ع) برای جمع‌آوری نمونه‌ها صمیمانه تشکر می‌شود.

موجود در دخانیات باعث انواع صدمه به DNA می‌شوند. صدمه به DNA در صورت ترمیم نادرست می‌تواند باعث انواع جهش‌ها شود که زمینه را برای سرطان ریه مساعد می‌کند. از جمله تغییرات ژنتیکی به وجود آمده تبدیل C به T می‌باشد که باعث غیر فعال‌سازی P53 و فعال‌سازی K-ras می‌شود و زمینه را برای رشد از هم گسیخته‌ی سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند (۱، ۱۱، ۱۴، ۲۶).

P53 از طریق تخریب ارتباط کمپلکس رونویسی پایه و فعال‌کننده‌ی API بیان ژلاتیناز B را مهار می‌کند و از این رو در تومورهایی که P53 در آن‌ها جهش می‌یابد، عملکرد مهاری از روی بیان ژن از بین می‌رود و بنابراین بیان ژلاتیناز B در این تومورها افزایش می‌یابد. جهش‌های P53 در تومورهای ریه با استعمال دخانیات مرتبط است و اغلب جهش تقاطعی G→T ایجاد می‌کند (۶، ۹، ۱۴، ۱۹، ۲۶). مواد سرطان‌زای دخانیات از طریق تجزیه‌ی IKB و آزادسازی NF-kB و غیر فعال‌سازی هیستون داستیلازها بیان آنزیم ژلاتیناز B را در ریه افزایش می‌دهند (۴۱-۴۲).

Su و همکاران (۲۱) و Sauter و همکاران (۳) افزایش سرطان ریه را در افراد سیگاری با ژنوتیپ MMP1 گزارش نمودند. همچنین Hu و همکاران (۴۳) و Jin و همکاران (۲۴) افزایش بروز سرطان ریه را در افراد سیگاری با ژنوتیپ MMP9 گزارش نمودند. Zhang و همکاران ارتباط مثبت پلی‌مورفیسم MMP7 و سیگار را در کارسینومای مری نشان دادند (۴۴)، اما در مطالعه‌ی Su و همکاران افزایش وقوع

References

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40.
- Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 2002; 3(5): 420-5.
- Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, Kropp S, Mittelstrass K, Timofeeva M, et al. Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(5): 1127-35.
- Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 2002; 11(5): 569-76.
- Shields PG. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* 2002; 21(45): 6870-6.
- Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28(3): 507-18.
- Miller MC, III, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett* 2001; 120(1-3): 269-80.
- Law MR. Genetic predisposition to lung cancer. *Br J Cancer* 1990; 61(2): 195-206.
- 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* 2003; 9(2): 551-4.
- Kiyohara C, Ohno Y. Sex differences in lung cancer susceptibility: a review. *Gend Med* 2010; 7(5): 381-401.
- Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J* 2006; 8(3): E443-E449.
- Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118(6): 1136-52.
- Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res* 2003; 4: 12.
- Boffetta P, Nyberg F. Contribution of environmental factors to cancer risk. *Br Med Bull* 2003; 68: 71-94.
- Thomas L, Doyle LA, Edelman MJ. Lung cancer in women: emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest* 2005; 128(1): 370-81.
- Wu X, Zhao H, Suk R, Christiani DC. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene* 2004; 23(38): 6500-23.
- Hung RJ, Brennan P, Canzian F, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, et al. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(8): 567-76.
- MacKinnon AC, Kopatz J, Sethi T. The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *Br Med Bull* 2010; 95: 47-61.
- Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J* 2009; 33(6): 1485-97.
- Reid ME, Santella R, Ambrosone CB. Molecular epidemiology to better predict lung cancer risk. *Clin Lung Cancer* 2008; 9(3): 149-53.
- Su L, Zhou W, Park S, Wain JC, Lynch TJ, Liu G, et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(3): 567-70.
- 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.
- Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 497-503.
- Jin G, Miao R, Hu Z, Xu L, Huang X, Chen Y, et al. Putative functional polymorphisms of MMP9 predict survival of NSCLC in a Chinese population. *Int J Cancer* 2009; 124(9): 2172-8.
- Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de MM, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99(14): 1788-94.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14(2): 163-76.
- Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11): 3974-86.
- Ii 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.
- Nenan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(Suppl 1): 167-72.
- Pinto LA, Depner M, Klopp N, Illig T,

- Vogelberg C, von ME, et al. MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children. *Respir Res* 2010; 11: 23.
31. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(1): 12-24.
 32. Han Z, Junxu, Zhong N. Expression of matrix metalloproteinases MMP-9 within the airways in asthma. *Respir Med* 2003; 97(5): 563-7.
 33. Hubner RH, Meffert S, Mundt U, Bottcher H, Freitag S, El Mokhtari NE, et al. Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Eur Respir J* 2005; 25(3): 494-501.
 34. 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.
 35. Park JK, Park SH, So K, Bae IH, Yoo YD, Um HD. ICAM-3 enhances the migratory and invasive potential of human non-small cell lung cancer cells by inducing MMP-2 and MMP-9 via Akt and CREB. *Int J Oncol* 2010; 36(1): 181-92.
 36. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 9-34.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Decock J, Paridaens R, Ye S. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer. *Clin Genet* 2008; 73(3): 197-211.
 40. 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.
 41. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37(6): 375-536.
 42. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(1): 27-45.
 43. 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.
 44. Zhang J, Jin X, Fang S, Wang R, Li Y, Wang N, et al. The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 2005; 26(10): 1748-53.

The Association between Gelatinase B and Lung Cancer in Smokers and Non-Smokers

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

Abstract

Background: Gelatinase B is not only involved in metastasis, but also alters and processes growth factors, growth factor receptors, angiogenic factors, and other proteinases and thus affects early carcinogenesis. In other words, it has a fundamental role in initiation and development of cancer. Genetic polymorphism in the promoter of gelatinase B has been reported to be associated with the risk of several cancers including lung cancer.

Methods: Genotyping of gelatinase B was carried out by taking blood samples from 172 patients with lung cancer and 100 controls using restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (RFLP-PCR) technique. The observed numbers of each gelatinase B genotype were compared with that expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium by χ^2 test. The significance of the differences of the observed alleles and genotypes between groups was tested using the odds ratio (OR) analysis.

Findings: The percentage of smokers in patients was more than controls (57.5% vs. 30%). Distribution of gelatinase B genotype was significantly associated with the risk of lung cancer [OR = 2.56; 95% confidence interval (CI) = 0.06-23.82].

Conclusion: Our results indicated that smokers who carry TT and CT+TT genotypes have 4 (OR = 3.45; 95% CI = 1.28-9.24) and 15 (OR = 14.66; 95% CI = 3.95-53.47) fold risks of lung cancer, respectively.

Keywords: Gelatinase B, Restriction fragment length polymorphism, Polymerase chain reaction, Genotyping, Smokers, 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 Oncology and Radiotherapy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Motovali-Bashi PhD, Email: mbashi@sci.ui.ac.ir