

اپیدمیولوژی ژنتیک سرطان و بررسی‌های ژنتیک در سرطان کولورکتال

دکتر پروین مهدی‌پور^۱، دکتر مرتضی عطری^۲، سعید هاشمی^۱، هیام نصاری‌زاده^۱، غلامرضا طاووسی^۱، سیدسعید حسینی‌اصل^۱

۱ - گروه ژنتیک انسانی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

۲ - گروه جراحی، دانشکده پزشکی، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

چکیده:

سرطان روده به عنوان دومین سرطان رایج در اکثر کشورهای توسعه‌یافته و با شیوع کمتر در بیشتر کشورهای در حال توسعه شناخته می‌شود. پانزده تا بیست درصد از موارد سرطان کولورکتال (CRC) به شکل توارثی است. بنابراین، مطالعه جنبه‌های ژنتیکی و به ویژه ژن‌های درگیر در این سرطان، از بسیاری جهات همچون جنبه پیش‌آگهی، واجد اهمیت بسیار بالائی است. در این تحقیق، پس از انجام بررسی‌های لازم بر روی شجره‌نامه بیماران، مشخص شد که در میان وابستگان ایشان، ۳۴/۱ درصد سرطان کولورکتال، ۲۱/۹ درصد سرطان معده و ۹/۷ درصد سرطان ریه وجود داشت. از میان ژن‌های دخیل در این سرطان، ژن‌های سرکوبگر تومور P53 و APC و نیز انکوژن K-Ras مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از روش PCR-SSCP، وجود تغییرات حرکتی (جهش) در ۹/۵ درصد از بیماران در ژن APC، ۳۷/۵ درصد در ژن K-Ras و ۳۵ درصد در ژن P53 مشاهده شد. در حال حاضر، مطالعه بر روی نمونه‌های بیشتر و نیز بر روی دیگر ژن‌های درگیر، در حال انجام است.

مقدمه:

کولورکتال، جهش در ژن Ras پیدا شده است و اکثریت (تقریباً تمام) جهش‌ها در کدون ۱۲ رخ داده‌اند^(۱،۲).

ژن سرکوبگر تومور p53، یک فسفوپروتئین هسته‌ای تولید می‌کند که یک فعال‌کننده بالقوه رونویسی است. مطالعات متعدد بر این مسئله اذعان دارند که پروتئین p53 نقش مهمی در تنظیم منفی چرخه سلولی و نیز در پدیده خودکشی سلولی (Apoptosis) دارد. جهش در ژن p53 و علی‌الخصوص در اگزون‌های ۵ تا ۸ موجب پایداری پروتئین در هسته می‌شود. این جهش‌ها، با تجلی هسته‌ای افزایش یافته و پروتئین p53 کارسینومای کلون مرتبط می‌باشند. البته، اخیراً مواردی از آدنوما و آدنوکارسینومای کولورکتال که واجد سطوح افزایش‌یافته پروتئین p53 در غیاب هرگونه جهش ژنی بودند یافته شده است. وجود تغییرات در ژن p53 با بقای کوتاه و عود مجدد احتمالی مرتبط می‌باشد^(۳).

در ژن APC نیز که مانند p53، یک ژن سرکوبگر تومور است، جهش خاصی (جهش I1307) با وجود سرطان کولورکتال در جمعیت‌های خاصی از یهودیان ارتباط داده شده است. جهش در APC برای رشدی حدود یک سانتیمتر در تومورهای کولورکتال کفایت می‌کند، اگرچه، ممکن است برخی از تومورهای کولورکتال از طریق مسیرهای فاقد ژن APC توسعه یابند. تقریباً دو سوم از جهش‌های سوماتیک در ژن APC در منطقه توده‌ای جهش (MCR) رخ می‌دهند^(۴).

با این وجود، تغییرات ژنتیکی در سرطان کولورکتال، آنچنان که پروفیسور وگلشتاین در سال ۱۹۸۸ ارائه کرده، به ترتیب شامل ژن‌های APC، k-Ras، DCC و P53 است. در این مدل، درگیری ژن k-Ras و کروموزوم 5q به عنوان اولین اتفاق و درگیری کروموزوم‌های 17p و 18q نیز به عنوان وقایع انتهایی در نظر گرفته شده‌اند^(۵،۶).

سرطان روده دومین سرطان رایج در زنان و مردان در اکثر کشورهای توسعه‌یافته جهان است و بیشترین میزان شیوع آن در ایالات متحده، کانادا و ژلاندنو گزارش شده است. در حالی که کمترین میزان شیوع آن در آسیا، آفریقا و امریکای لاتین می‌باشد^(۱).

عوامل خطر را برای سرطان کولورکتال می‌توان به سه دسته عوامل خطر پایین، متوسط و بالا دسته‌بندی کرد که از آن میان، عوامل خطر پایین شامل سن پایین‌تر از ۵۰ سال و عدم وجود سابقه خانوادگی، عوامل خطر متوسط شامل سن بالاتر از ۵۰ سال و نیز عوامل خطر بالا شامل وجود پیشینه فامیلی و فردی سرطان کولورکتال و یا سندرم‌های مربوط به آن است.

سرطان کولورکتال در ۱۵ تا ۲۰ درصد از موارد به صورت توارثی است. رایجترین اشکال توارثی سرطان کولورکتال، آدنوپولیپوزیس خانوادگی (FAP) و سرطان کولورکتال غیرپولیپوزیس (APC) توارثی است.

پیشرفت سرطان کولورکتال فرایندی چندمرحله‌ای است که چندین ژن سرطانزا (انکوژن) و ژن سرکوبگر تومور در این مسیر درگیر می‌شوند. این حالت چند مرحله‌ای، در هر دو حالت (سرطان‌های FAP و APC ژن‌های خانواده Ras) واجد نقش مهمی در انتقال علائم رشد سلولی هستند. فعال شدن این ژن‌ها و تبدیل پروتئین انکوژن Ras به انکوژن، به واسطه جهش، یکی از فراوانترین و رایجترین مکانیزم‌های موجود است. طبق مطالعات به عمل آمده، در ۲۰ تا ۵۰ درصد از سرطان‌های

Abstract:**Cancer-Genetics Epidemiology and Genetics investigation in Colorectal Carcinomas: Directions towards prevention**

Mehdipour P., Atri M., Nassarizadeh H., Hashemi S, Tavousi Gh.R

Department of Human Genetics, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran university of Medical Sciences - mehdipour@sphums.com

INTRODUCTION: Carcinomas of the colon and rectum are the second most common cause of death due to malignancy. Risk factors are categorized as: Low risk: age 50 years, no family history of early onset colorectal cancer (CRC) or personal history of high risk disease. Average risk: age >50 years and asymptomatic. High risk: personal history and family history of CRC and associated syndromes. Research into the genetics of CRC is vital for both the potential population and for the genetically mediated therapies which could lead to early detection, and improved surveillance of the disease. These could possibly improve the outlook of colorectal cancers.

CRC is a disease in which 15% to 20% of cases are inherited. Familial adenomatous polyposis and hereditary non-polyposis CRC represent the two most common forms of inherited CRC. Mutation of APC (I1307K) is associated with CRC in certain Jewish populations. APC, K-ras, DCC, and P53 mutations occur and vary in specific types of CRC and specific lesions of CR. APC mutations are sufficient for colorectal tumors to grow to about 1 cm in diameter, although chance mutations at other loci can provide the early colorectal adenomas with a selective advantage and some colorectal tumors may develop along a pathway not involving the APC-gene. The occurrence of CRC and brain tumors (Turcott's syndrome) and other cancers are important paradigms in the dual look, including the study of cancer genetic epidemiology and genetics in different populations.

MATERIALS and METHOD: Our preliminary patients with CRC included 13 females and 8 males with an age range of 22 to 71 years in females and 32 to 73 years in males. The epidemiologic analysis on the patient's pedigrees was carried out by SPSS/Windows. The detection of APC, K-ras, and P53 gene mutations was performed on the basis of PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) and heteroduplex analysis.

Characteristics of genes in CRC patients

Genes	Exons	Nucleotides	Protein-M. W(kd)	Amino acids
APC	15	8532	311.8	2843
K-RAS	4	56	21	189
P53	11	23000	53	393

RESULTS and CONCLUSION: Cancer genetics epidemiology: Consanguineous marriage was found in 6.21 patients (28%) and in 3.21 patients (14%) parents. In 21 pedigrees with the probands affected with CRC, 41 relatives with different cancers were recorded. Among these, the more frequent types, were 26.41 (63%) with GI cancers, including 34.1% (14.41) CRC and 9.41 (21.9%) gastric cancers and 4.41 (9.7%) lung cancers.

The preliminary comparative study revealed that the genetic alteration is most frequently observed in K-ras (37.5%; 6.16), followed by P53 (all exons: 25%; 5.20) and APC (9.5%; 2.21). The pathologic and clinical correlation will be also discussed. Regarding the order of genetic alterations in CRC i.e., involvement of APC, K-ras, and P53, it is also important for Iranian patients to be screened for CRC. These could contribute to the predictive and prognostic values, so that Iranian patients with CRC are diagnosed early and receive the appropriate management.

A. Molecular Genetics results

Gene	Exon	Frequency
APC	15	9.52% (2.21)
K-RAS	1	37.5% (6.16)
P53	5	5% (1.20)*
P53	6	10% (2.20)
P53	7	0%
P53	8	10% (2.20)*

* - Kharolahi, Atri, Mehdipour

Key words:

colorectal cancer, cancer-genetics epidemiology, pedigree, family history. APC. K-ras. P53. Iran.

ژنتیک - سرطان و نیز بررسی‌های ژنتیکی در جمعیت‌های گوناگون است.

تاکنون هیچگونه تحقیق و نیز اطلاعاتی در مورد جنبه‌های ژنتیکی سرطان کولورکتال در بیماران ایرانی وجود نداشته است، بنابراین، این تحقیق، اولین و نخستین محسوب می‌شود، در این تحقیق بررسی بر روی ۲۱ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شده است. در این مجموعه، گروه‌های مختلفی از بیماران وجود داشتند که برخی به عنوان پروباند (probands) سرطان کولورکتال و برخی نیز به عنوان یک پیشینه

به طور خلاصه می‌توان به میزان درگیری ژن‌های ذکر شده در سرطان کولورکتال بدین ترتیب پرداخت:

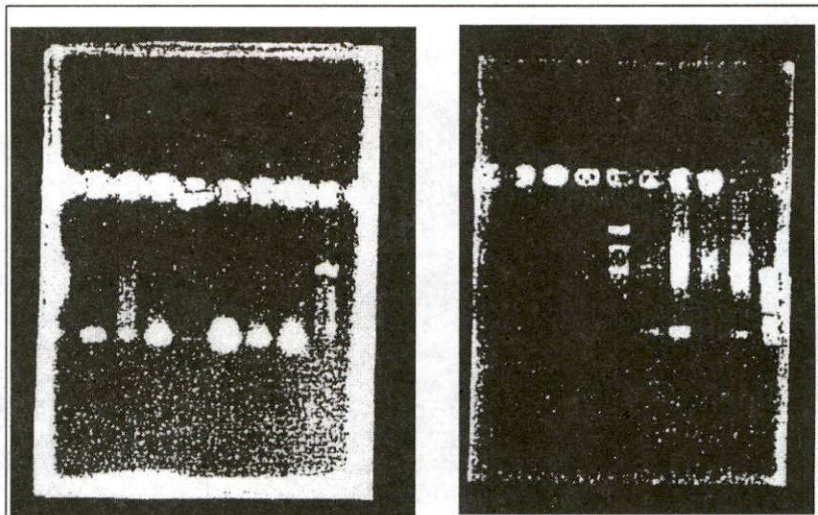
۴۰ - ۵۰ درصد در مورد جهش‌های ژن K-Ras، ۵۰ - ۷۰ درصد در مورد جهش‌های ژن P53 و ۶۰ - ۸۰ درصد در مورد جهش در ژن APC^(۱،۲،۳،۴،۵،۶)

مطالعه ژن K-Ras واجد ارزش تشخیصی در ایران خواهد بود. وقوع تومورهای مغز و سرطان کولورکتال (سندرم تورکوت) و دیگر سرطان‌ها، الگوهای مهمی برای مطالعات دوگانه‌ای نظیر اپیدمیولوژی

بلوک‌های پارافینه، عمل استخراج DNA انجام گردید و سپس برای بررسی ژن‌های ذکر شده، توسط واکنش PCR، قطعات مورد نظر تکثیر یافته و سپس توسط روش SSCP به بررسی وجود جهش پرداخته شد. قطعه DNA دو رشته‌ای پس از تبدیل به حالت تک‌رشته‌ای، اشکال فضایی خاص و وابسته به توالی از خود نشان می‌دهد که این خصوصیت، اساس روش SSCP را تشکیل می‌دهد. بدین ترتیب که در اثر وقوع جهش در قطعه مورد نظر و متعاقب آن تغییر شکل فضایی آن قطعه، این تغییر شکل به صورت تفاوت در سرعت حرکت (Shift) در ژل پلی‌اکریل آمید خود را نشان می‌دهد.

نتایج و بحث:

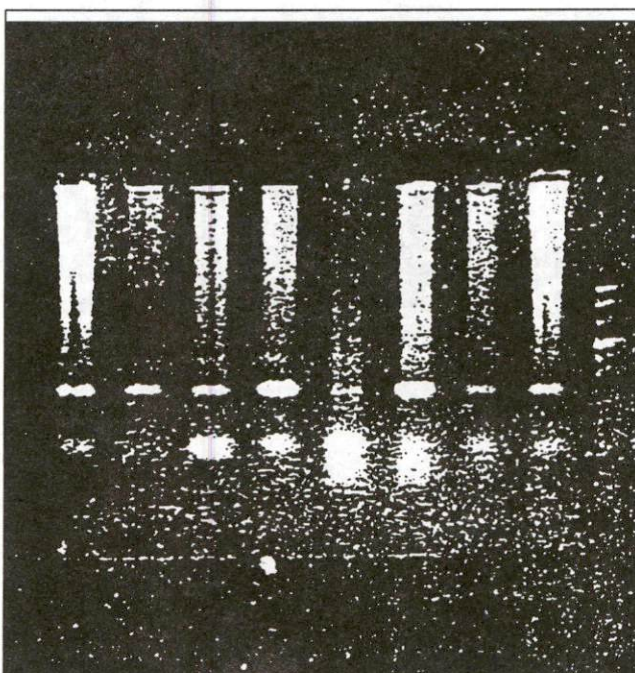
نمونه‌های مورد بررسی از بیمارانی انتخاب شد که دارای پیشینه سرطان در خانواده خود بودند. از میان ۲۱ بیمار مورد مطالعه، در ۲۸ درصد ($\frac{6}{21}$) از بیماران و ۱۴ درصد ($\frac{2}{14}$) از والدین بیماران، ازدواج خویشاوندی صورت گرفته است. در این ۲۱ شجره‌نامه



الف

ب

شکل ۱. الف - طرح الکتروفورزی تعدادی از نمونه‌های PCR شده آگزون ۶ ژن P53 بر روی آگارز (۲٪). ردیف ۲ از سمت راست شاخص وزن ملکولی XIV. ب - نمونه‌های الکتروفورز شده آگزون ۷ ژن P53 پس از انجام عمل PCR.



شکل ۲ - طرح الکتروفورزی تعدادی از نمونه‌های PCR شده آگزون ۱۵ ژن APC.

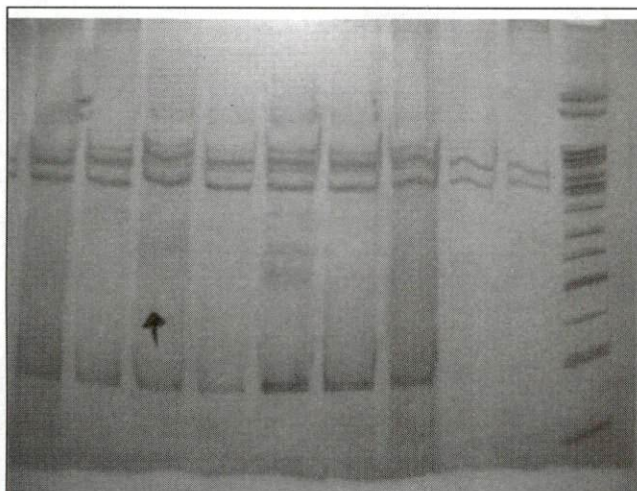
فامیلی، که منسوبین پروباندهای مبتلا به سرطان پستان بودند مورد توجه قرار گرفتند. ما در حال حاضر در حال افزایش اطلاعات و انجام تحقیقات گسترده‌تر در زمینه‌های سیتوژنتیک، ملکولی و اپیدمیولوژی ژنتیک - سرطان هستیم.

جدول ۱ - ویژگی‌های ملکولی ژن‌های مورد مطالعه

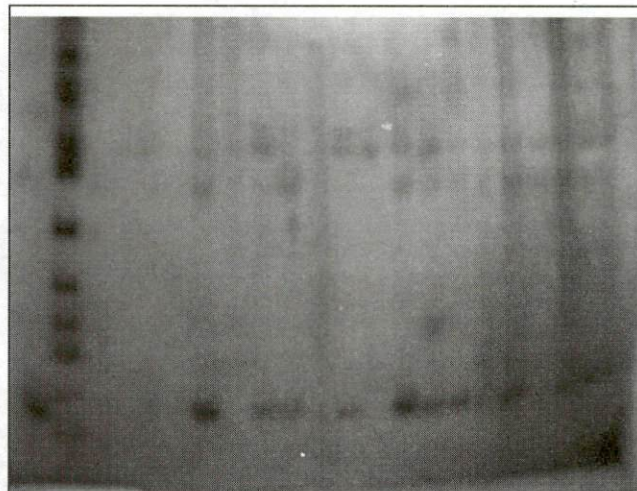
ژن	تعداد آگزون‌ها	طول (جفت باز)
APC	۱۵	۸,۵۳۲
k-Ras	۶	۵۰,۰۰۰ - ۶۰,۰۰۰
P53	۱۱	۲۰,۰۰۰

مواد و روش‌ها:

۲۱ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال مطالعه شده شامل ۱۳ فرد مؤنث با دامنه سنی ۲۲ تا ۷۱ سال و ۸ فرد مذکر با دامنه سنی ۳۲ تا ۷۳ سال می‌باشند. بررسی‌های آماری بر روی شجره‌نامه‌ها توسط نرم‌افزار SPSS-Windows انجام شد. ابتدا با روش استاندارد فنل - کروفورم، از نمونه بافت‌های تازه و یا



شکل ۵ - نتایج حاصل از بررسی SSCP اگزون ۱ ژن k-Ras. ردیف چهارم از سمت چپ دچار تغییر حرکت (Shift) می‌باشد.



شکل ۳ - بررسی SSCP محصولات واکنش PCR ژن P53 بر روی ژل MDE با رنگ‌آمیزی نیترات نقره.

کلورکتال رخ می‌دهد و این امر واجد ارزش پیش‌آگهی و پیشگیری می‌باشد.

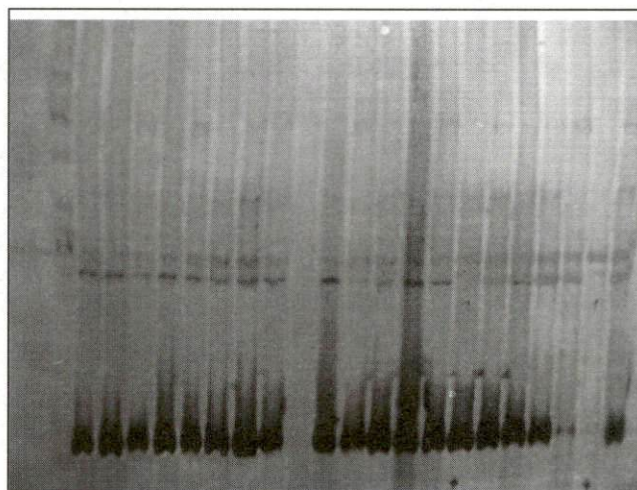
یکی دیگر از نکات مثبت اینست که برای انجام عمل PCR می‌توان DNA را از سرم و یا مدفوع بیمار استخراج کرد و مورد بررسی قرار داد. اخیراً برای پیشگیری از سرطان کلورکتال، RNA آنتی‌سنس ساخته شده است که مهارکننده ایجاد سرطان کلورکتال بوده و هیچگونه آثار منفی برای بیماران ندارد.

در خاتمه لازم به تذکر است که نمونه‌های بیشتری از بیماران مبتلا به CRC تحت بررسی ۳ ژن مورد نظر قرار دارند که بر اساس پیشینه فAMILI سرطان CRC و یا انواع دیگر سرطان در بررسی غربالگری ما جایگاه ویژه‌ای دارند. به امید این که مقوله تشخیص بهنگام و پیشگیری برای منسوبین بیماران در صدر توجه جامعه پزشکی قرار گیرد.

جدول ۲ - فراوانی Shifts در اگزون‌های ژن‌های APC، k-Ras و P53

ژن	اگزون	فراوانی
APC	۱۵	۹/۵ درصد ($\frac{2}{41}$)
k-Ras	۱	۳۷/۵ درصد ($\frac{6}{16}$)
P53	۵*	۵ درصد ($\frac{1}{20}$)
P53	۶	۱۰ درصد ($\frac{2}{20}$)
P53	۷	۱۰ درصد ($\frac{2}{20}$)
P53	۸*	۱۰ درصد ($\frac{2}{20}$)

* - خیرالهی، عطری، مهدی‌پور



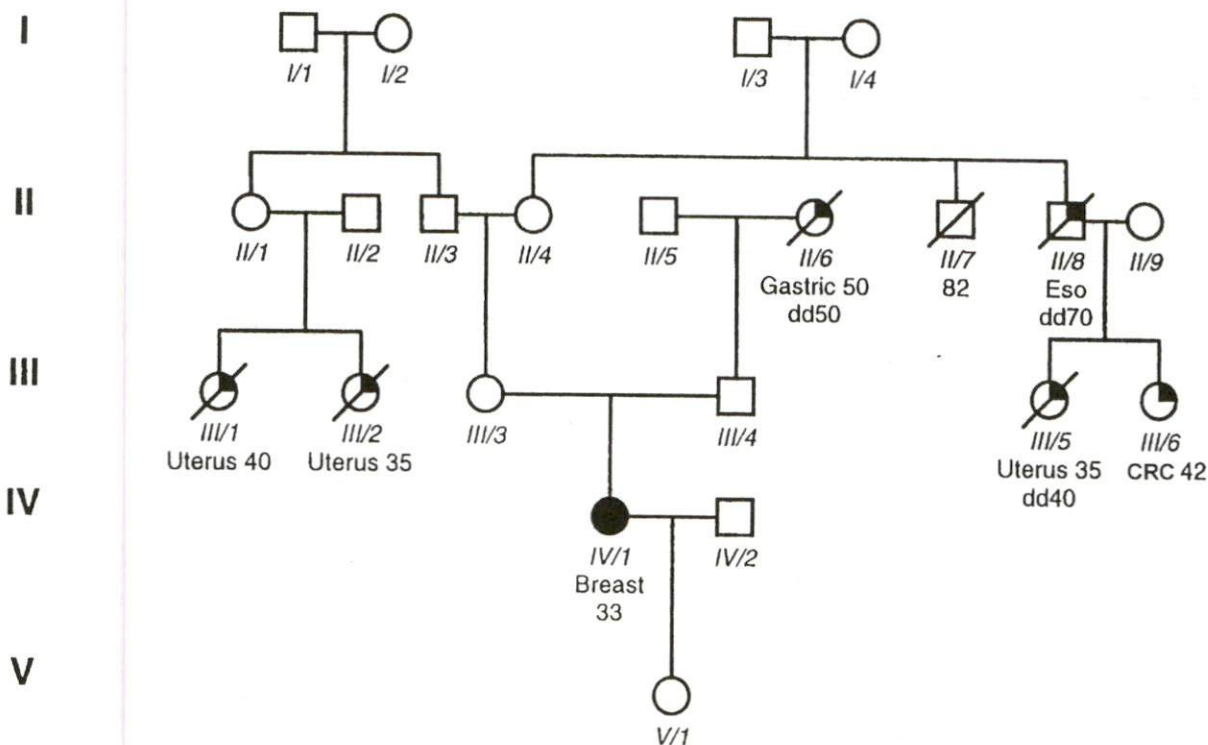
شکل ۴ - نتایج مربوط به بررسی SSCP در قطعه ۷ ژن APC. ردیف‌های دوم و هفتم از سمت راست دچار تغییر حرکت می‌باشند.

واجد پروباند مبتلا به سرطان کلورکتال، تعداد ۴۱ مورد ابتلا به سرطان‌های گوناگون، از میان وابستگان، مشاهده گردید که انواع فراوانتر این سرطان‌ها به صورت زیر است:

۶۳ درصد ($\frac{26}{41}$) سرطان در سیستم گوارشی که خود شامل ۳۴/۱ درصد ($\frac{12}{41}$) ابتلا به سرطان کلورکتال و ۲۱/۹ درصد ($\frac{9}{41}$) ابتلا به سرطان معده بود و نیز ۹/۷ درصد ($\frac{4}{41}$) ابتلا به سرطان ریه.

نتایج حاصل از این مطالعه در جدول ۲ ذکر شده است. یکی از نکاتی که در این جدول وجود دارد وجود مقادیر بالای جهش در مورد ژن k-Ras است که همراه با ژن APC در مراحل ابتدایی سرطان

Iran Pedigree 66



شکل ۶ - شجره‌نامه مربوط به یکی از بیماران مورد مطالعه.

References:

1. Ghadirian P., Maisonneuve P. and Perret C. Epidemiology of soisodemographic characteristics, lifestyle, medical history and colon cancer: A case-control study among French Canadians in Montreal. Cancer detection and prevention. 1998; 22:396-404.
2. Pilar I., Carmen J. and Trinidad C. Genetic abnormalities and microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer detection and prevention. 1998;22:383-395.
3. Okada F., Jansuz W.R., Brad S.C. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: Mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. 1998;95:3609-3614.
4. Petersen M.G. Genetics of hereditary colorectal cancer. American society of hematology. 1999:26-32.
5. Tina B., Ruschoff J. and Fishel R. Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polypsis colorectal carcinoma and mismatch repair defects. Biochemica et Biophysica Acta. 1999;1423:1-10.
6. Toyota M., Toyota O., Ahuja N. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. PANAS. 2000;97:710-715.
7. Pharoah D.P., Carlos C. Prevalence (%) of some common somatic genetic alterations in common sporadic cancers. (Shortcode:taboo l ccc):1999.
8. Jennifer T.S., Senagroc A.J., Krygier S. K-ras mutational analysis of polyclonal cancers identifies uniclonal circulating tumor cells. The American surgeon. 2001;67:82-85.
9. Dan Z., Keohavong P., Finkelstien S.D. K-ras gene in normal colorectal tissues from k-ras mutation -positive colorectal cancer patients. Cancer research. 1997;57:2485-2492.
10. Toyota C., Salbe T.S., Ferruzzi E. Molecular detection of codon 12 k-ras mutations in circulating DNA from serum of colorectal cancer patients. The Int.J.Bio. Markers. 2000;15:300-307.