

بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در نمونه‌های آدنوکارسینوما کولورکتال در استان گیلان

معصومه فغانی^۱، صبا فخریه اصل^۲

^۱ استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
^۲ استادیار، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

سرطان کولورکتال دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای توسعه یافته است. یکی از دلایل ابتلا به سرطان درگیری ژنهای از جمله P53 است و برخی پلی مورفیسم‌های این ژن با بروز سرطان ارتباط دارد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در نمونه‌های آدنوکارسینوم کولون و رکتوم با نمونه‌های سالم در استان گیلان است.

روش بررسی:

در این مطالعه مورد شاهدی ۱۱۲ نمونه سرطانی آدنوکارسینوما کولورکتال و ۱۱۲ نمونه کنترل بررسی شد. با استفاده از روش Allele specific PCR ژنوتیپ‌های مختلف کدون ۷۲ تعیین شد.

یافته‌ها:

در گروه کنترل توزیع ژنوتیپ‌های Arg/Arg، Arg/Pro، و Pro/Pro به ترتیب ۳۷/۵٪، ۵۰٪ و ۱۲/۵٪ بود، در حالی که در گروه سرطانی فراوانی ژنوتیپ Arg/Arg در ۴۰ مورد از افراد گروه بیماران (۳۵/۷٪) وجود داشت، فراوانی ژنوتیپ Arg/Pro در گروه بیماران ۵۰/۹٪ بود و نیز ژنوتیپ Pro/Pro در ۱۳/۴٪ از افراد گروه بیمار دیده شد (p=۰/۹۵). ۶۸/۸٪ از بیماران هموزیگوت آرژینین (Arg/Arg) در این مطالعه دارای سرطان کولورکتال در منطقه چپ کولون بودند. بین میزان بروز آلل آرژینین در نمونه‌های سرطانی و متاستاز ارتباط معنی دار آماری دیده شد (p=۰/۰۰۳).

نتیجه‌گیری:

نتایج نشان داد که اکثر افراد دارای ژنوتیپ Arg/Arg از سرطان در ناحیه چپ کولون رنج می‌برند و چون این ژنوتیپ با درگیری گره‌های لنفاوی و متاستاز تومور ارتباط داشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود ارتباط این پلی مورفیسم با محل تومور و ریسک متاستاز بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد تا کارایی آن به عنوان یک فاکتور تشخیصی مشخص شود.

کلید واژه: ژن P53، آدنوکارسینوما، سرطان کولورکتال، پلی مورفیسم کدون ۷۲

گوارش / دوره ۱۷، شماره ۱ / بهار ۱۳۹۱ / ۲۵-۳۲

زمینه و هدف:

سرطان کولورکتال یکی از مهم ترین تومورهای بدخیم انسان می‌باشد و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای توسعه یافته است. (۱)، ابتلا به سرطان کولورکتال در مردان بعد از سرطان ریه و پروستات و در زنان بعد از سرطان پستان است. (۱)، این بدخیمی در اکثر موارد از خم طحالی کولون تا رکتوم و به عبارت دیگر در بخش دیستال روده بزرگ (سمت چپ کولون) دیده می‌شود. (۲)، حدود ۹۸٪ از سرطان‌های روده بزرگ را آدنوکارسینوما کولورکتال تشکیل می‌دهد. حداکثر میزان شیوع در سن ۶۰ تا ۷۰ سالگی و کمتر از ۲۰٪ آن در سنین قبل از ۵۰ سالگی گزارش شده است. (۲)، اگرچه فاکتورهای محیطی مانند سبک

نویسنده مسئول: صبا فخریه اصل

مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان رازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تلفن: ۰۱۳۱-۳۲۲۴۱۲۵

نمابر: ۰۱۳۱-۳۲۲۷۳۴۶

پست الکترونیک: sfakhrieh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۲

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲۱

کولون صعودی، خم کولیک راست و کولون عرضی) و دیستال (منطقه چپ کولون شامل: خم کولیک چپ، کولون نزولی، سیگموئید و رکتوم) تقسیم شدند. برای استخراج DNA از ۲۵-۲۰ میلی گرم نمونه بافتی (بافت سالم مجاور تومور) استفاده شد.

افراد گروه کنترل در این مطالعه از میان افرادی انتخاب شدند که جهت انجام کولونوسکوپی به بخش اندوسکوپی بیمارستان پورسینای رشت مراجعه کرده بودند و از نظر سنی با افراد گروه بیماران مطابقت داشتند، این افراد ضایعه سرطانی در ناحیه کولون نداشتند. خون محیطی این افراد بعد از گرفتن رضایتنامه مورد استفاده قرار گرفت. تاریخچه خانوادگی این بیماران مورد بررسی قرار گرفت و افرادی انتخاب شدند که در خانواده آنها سابقه ابتلا به سرطان وجود نداشت.

تعداد نمونه با در نظر گرفتن پراکندگی صفت و بررسی مطالعات گذشته و با ضریب اطمینان ۹۵٪، با خطای ۱٪ در دو گروه شاهد و بیمار ۱۱۲ نفر محاسبه گردید. برای استخراج DNA از نمونه‌های سرطانی و خون افراد گروه کنترل از کیت استخراج High pure PCR Template preparation کمپانی Roche آلمان بر اساس دستورالعمل آن استفاده گردید. سپس DNA هر دو گروه از لحاظ کمیت و کیفیت مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان از آنها در PCR استفاده کرد.

تکثیر توالی پلی مورفیک کدون ۷۲ ژن P۵۳

برای این عمل از ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA، ۱ واحد تک پلی مراز، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۰ میکرومول از dNTPs و ۲ میکرومول از زوج پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر کدون ۷۲ ژن P۵۳ استفاده شد. پرایمرها به صورت لیوفیلیزه از شرکت زیست فناوری کوثر تهیه و طبق دستورالعمل شرکت آماده سازی شد. توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر پرولین عبارتند از (۸):

F: GCCAGAGGCTGCTCCCCC

R: CGTGCAAGTCACAGACTT

توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر آرژینین عبارتند از:

F: TCCCCCTTGCCGTCCCAA

R: CTGGTGCAGGGGCCACGC

تنظیم دستگاه ترمال سایکلر برای تکثیر کدون ۷۲ ژن P۵۳

(۱) Denaturation به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد.

(۲) ۳۵ سیکل که هر کدام شامل:

الف) Denaturation با دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه

ب) Annealing با دمای ۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه برای پرولین و دمای ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه برای آرژینین.

ج) Extension با دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه.

(۳) Extension نهایی با دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه تا تمامی DNAهای تک رشته ای موجود در محلول مورد استفاده قرار گیرد. بعد از انجام کار، محصول PCR برای الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت.

زندگی و تغذیه از عوامل موثر در شیوع سرطان کولورکتال می‌باشند ولی عوامل فAMILIARY و ارثی نیز جزء فاکتورهای خطر مهم محسوب می‌شوند، که در پولیپوز فAMILIARY^۱ و در کارسینوم ارثی غیر پولیپوزی^۲ نقش دارند. (۳)، در سرطان کولورکتال ژن‌های مختلفی درگیر می‌شوند که یکی از مهم ترین آنها ژن P۵۳ می‌باشد. ژن P۵۳ (OMIM no:۱۹۱۱۷۰)^۳ به عنوان مهم ترین ژن سرکوب کننده تومور روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ (۱۷P۱۳،۱) واقع است و دارای ۱۱ اگزون است. (۴)، این ژن فسفوپروتئین هسته ای ۳۹۳ آمینواسیدی را کد می‌کند، عملکرد طبیعی آن محافظت از ژنوم در مقابل صدمات وارده است که منجر به ترمیم ژنوم و یا آپوپتوز می‌شود و از این طریق سلول‌های کارسینومژنیک را حذف می‌کند. (۵)، عدم فعالیت P۵۳ بدلیل جهش، تجزیه پروتئین و یا فقدان آللی رخ می‌دهد. این ژن در تنظیم سرنوشت سلول در پاسخ به استرس‌های مختلف از قبیل پرتوافکنی، کارسینوژن‌ها، داروهای سمی، هیپوکسی، نقص نوکلئوتید، فعالیت انکوژن‌ها، بهم ریختگی میکروتوبول‌ها، از بین رفتن اتصال طبیعی سلول‌ها نقش مهمی دارد. (۶)، علاوه بر این کدون ۷۲ اگزون شماره ۴ ژن P۵۳ دارای پلی مورفیسیم شایعی است که در آن در اثر جابجایی C→G موجب تولید دو پروتئین دارای آرژینین یا پرولین می‌گردد، فعالیت این دو پروتئین با هم متفاوت است و روی عملکرد ژن تاثیر می‌گذارد (۷) و با بروز سرطان‌های مختلف از جمله کولورکتال، پستان و ریه ارتباط دارد. (۷-۱۱)

با توجه به این که این پلی مورفیسیم وابسته به موقعیت جغرافیایی و نژادی است (۱۲) و فراوانی برخی از سرطان‌های انسانی از جمله سرطان کولون و رکتوم با آن مرتبط است و نیز پیشنهاد شده است برای پیش بینی نحوه پاسخ دهی تومورهای بدخیم به داروهای شیمی درمانی (۱۳) ژنوتیپ‌های مختلف کدون شماره ۷۲ ژن P۵۳ مشخص شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسیم کدون ۷۲ ژن P۵۳ در نمونه‌های سرطانی کولون و رکتوم با نمونه‌های سالم در استان گیلان است.

روش بررسی

این پژوهش یک مطالعه مورد-شاهدی می‌باشد. جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش بیمارانی دچار سرطان کولورکتال از نوع آدنوکارسینوما بودند. بلوک‌های پارافینی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال از بخش پاتولوژی بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های شهر رشت جمع آوری شد. اطلاعات کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران از قبیل وجود یا عدم وجود متاستاز در گره‌های لنفاوی، اندازه تومور و درجه پاتولوژی آن، تاریخچه فAMILIARY، سن و جنس بیماران از پرونده آنان جمع آوری شد. علاوه بر این تومورها به دو دسته پروگزیمال (منطقه راست کولون شامل: سکوم،

1. Familial Adenomatous Polyposis-FAP
2. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer- HNPCC
3. Online Mendelian Inheritance in Man

نمونه‌های سرطانی با توزیع فراوانی این سه ژنوتیپ و آلل‌ها در نمونه‌های شاهد از آزمون Chi-squared و Odds Ratio (OR) استفاده شد. p-Value کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۱۱۲ نمونه سرطانی و ۱۱۲ نمونه کنترل در شهر رشت (از سال ۸۹-۸۵) استفاده شد. لازم به ذکر است در ابتدا ۱۴۰ نمونه سرطانی جمع آوری شد، چون DNA استخراج شده در برخی از نمونه‌ها کیفیت مناسبی برای PCR نداشتند و از مطالعه خارج شدند. سن نمونه‌ها بین (mean = ۶۱/۹۴) ۸۵-۲۷ سال بود و نمونه‌های توموری از نوع آدنوکارسینوما انتخاب شدند. ۴۴/۷٪ از افراد مورد پژوهش در این مطالعه را زنان و ۵۵/۳٪ از افراد را مردان تشکیل می‌دادند و ۸۰/۴٪ افراد مبتلا به سرطان سن بالای ۵۰ سال داشتند (جدول ۱). اطلاعات پاتولوژیک استخراج شده از پرونده بیماران نشان داد که میزان متاستاز در گره‌های لنفاوی در افراد این پژوهش ۵۲/۷٪ بود، بیشترین میزان متاستاز در زنان (۶۶/۷٪) دیده شد و بین متاستاز و جنس رابطه معنی دار آماری وجود داشت (p = ۰/۰۰۸). اندازه تومور در ۶۶ مورد (۵۷/۱٪) از افراد کمتر از ۲۰ میلی متر، در ۳۸ نفر (۳۳/۹٪) بین ۲۰-۵۰ میلی متر و در ۱۰ مورد (۸/۹٪) بیشتر از ۵۰ میلی متر بود. بین

تعیین کمیت DNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتری در ارزیابی DNA در اسپکتروفوتومتری از طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. جذب نوری (OD) در ۲۶۰ نانومتر غلظت DNA و در ۲۸۰ نانومتر غلظت پروتئین را نشان می‌دهد. با بدست آوردن نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ درجه خلوص DNA محاسبه شد. در نمونه‌های این تحقیق ۱/۴ تا ۱/۸۵ بود.

تکثیر منطقه مورد مطالعه توسط PCR

برای بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ از Allele specific PCR استفاده شد. بعد از بهینه سازی PCR، با استفاده از DNA استخراج شده بافتی گروه بیماران و خون گروه کنترل (که از نظر سن با گروه بیماران مطابقت داشتند) و پرایمر اختصاصی، PCR انجام شد. برای مشخص نمودن تکثیر پلی مورفیسم کدون ۷۲، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ تفکیک شد. طول قطعه تکثیر شده در کدون ۷۲ ژن P۵۳ بر اساس وجود آرژینین و پرولین به ترتیب ۱۴۱bp و ۱۷۷bp است. (۸و۷)

تجزیه و تحلیل یافته‌ها:

اطلاعات بدست آمده از طریق نرم افزار SPSS نسخه ۱۶، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه توزیع فراوانی سه ژنوتیپ مختلف کدون ۷۲ ژن P۵۳ و آلل‌های آرژینین و پرولین در

جدول ۱- خصوصیات کلینیکی پاتولوژیکی بیماران دارای آدنوکارسینومای کولورکتال بر اساس محل تومور

Variables	Left CRC (n=66)	Right CRC (n=30)	p- value (left vs. right)
Age			0.19
Mean±SD	62.58 ±13.86	58.4± 14.7	
Median (range)	64.5(27-85)	60(27-85)	
Gender (%)			0.40
Male	45(72.6)	17(27.4)	
Female	33(68.6)	15(31.3)	
Metastasis of lymph node (%)			0.023*
Yes	60(76.9)	19(55.9)	
No	18(23.1)	15(44.1)	
Tumor size (%)			0.005*
<20mm	51(65.4)	14(41.2)	
20-50 mm	23(29.5)	13(38.2)	
>50mm	4(5.1)	7(20.6)	
Tumor grade (%)			0.125
Well differentiated	37(47.4)	19(55.9)	
Moderate differentiated	38(48.7)	11(32.4)	
Poor differentiated	3(3.8)	4(11.8)	

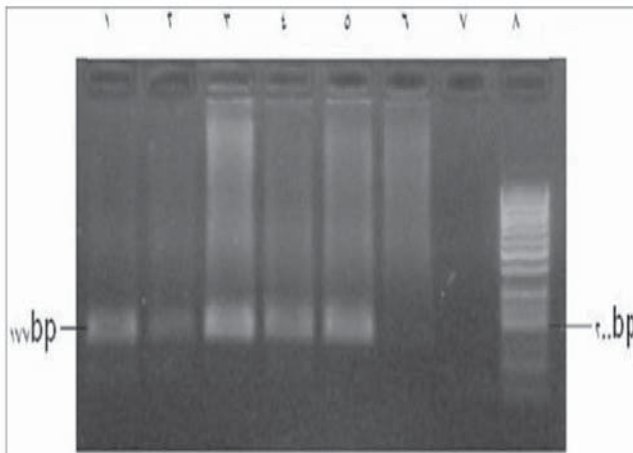
*Significant , SD: Standard deviation , CRC: Colorectal Cancer :

هر دو آلل در الکتروفورز محصول PCR انجام شده با استفاده از پرایمر اختصاصی بود به ترتیب به عنوان هموزیگوت آرژینین یا پرولین و یا هتروزیگوت آرژینین-پرولین در نظر گرفته شد.

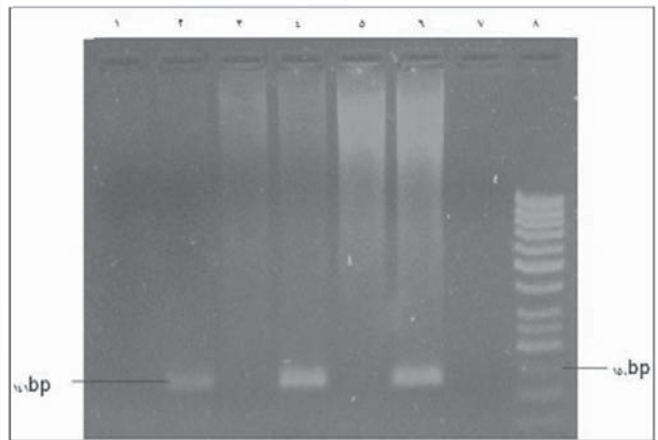
ژنوتیپ Arg/Arg در ۴۰ مورد از افراد گروه بیماران (۳۵/۷٪) وجود داشت در حالی که ۴۲ نفر از افراد گروه کنترل (۳۷/۵٪) دارای این ژنوتیپ بودند، فراوانی ژنوتیپ Arg/Pro در گروه بیماران ۵۰/۹٪ بود ولی در گروه کنترل ۵٪ از افراد دارای این ژنوتیپ بودند. ژنوتیپ Pro/Pro در ۱۳/۴٪ از افراد گروه بیمار و ۱۲/۵٪ از گروه کنترل دیده شد ارتباط معنی دار آماری بین توزیع ژنوتیپ‌های کدون ۷۲ ژن P۵۳ در

اندازه تومور و جنس ارتباط معنی دار آماری وجود نداشت. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که ۶۸/۸٪ از افراد دارای سرطان در منطقه چپ کولون بودند. برای مشخص نمودن پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای آلل آرژینین و پرولین PCR انجام شد و آلل آرژینین با اندازه ۱۴۱ جفت باز و آلل پرولین با اندازه ۱۷۷ جفت باز بطور جداگانه مشخص شد (شکل ۱ و ۲).

توزیع سه ژنوتیپ پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ در گروه بیماران و کنترل در نمودار ۱ و جدول ۲ خلاصه شده است. تعیین ژنوتیپ بدین صورت انجام شد که اگر فردی فقط دارای آلل آرژینین یا پرولین و یا



شکل ۲: ژل الکتروفورز محصول PCR برای آلل پرولین در آگارز ۱٪



شکل ۱: ژل الکتروفورز محصول PCR برای آلل آرژینین در آگارز ۱٪

نمونه‌های شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ دارای باند
نمونه شماره ۶ فاقد باند
نمونه شماره ۱ کنترل مثبت
نمونه شماره ۷ کنترل منفی
نمونه شماره ۸ مارکر

نمونه‌های شماره ۴ و ۶ دارای باند
نمونه‌های شماره ۳، ۵ و ۷ فاقد باند
نمونه شماره ۲ کنترل مثبت
نمونه شماره ۱ کنترل منفی
نمونه شماره ۸ مارکر

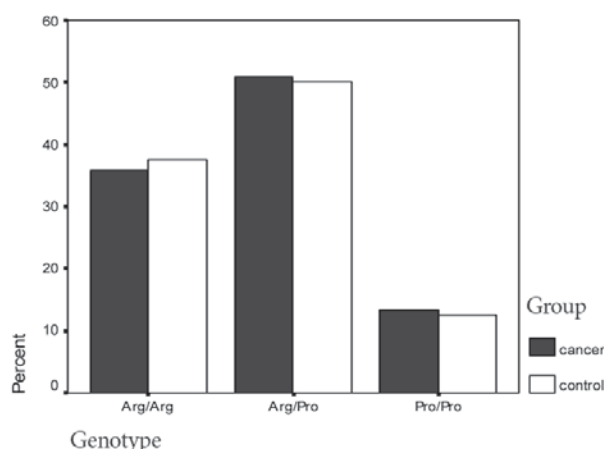
جدول ۲: توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ در گروه‌های کنترل و بیماران

پ- value	95% CI ^b	OR ^a	Pro/Pro (درصد) تعداد	Arg/Pro (درصد) تعداد	Arg/Arg (درصد) تعداد	نمونه
-----	مرجع	۱	۱۴(۱۲/۵)	۵۶(۵۰)	۴۲(۳۷/۵)	کنترل
$p = ۰/۹۵$	$f_{۰/۴۹-۲/۳۶}$	$d_{۱/۰۸}$	۱۵(۱۳/۴)	۵۷(۵۰/۹)	۴۰(۳۵/۷)	بیمار

a: Odds ratio b: confidence interval

d: Odds ratio computed for Arg/Arg versus non- Arg/Arg (i.e. Arg/Pro and Pro/Pro) between the cases and controls

f: P-value computed for Arg/Arg versus non- Arg/Arg (i.e. Arg/Pro and Pro/Pro) between the cases and controls



نمودار ۱: توزیع ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در گروه‌های کنترل و بیماران

جدول ۳: توزیع فراوانی آلل‌های مختلف کدون ۷۲ ژن P53 در گروه‌های کنترل و بیماران

پ- value	۹۵٪ CI ^b	OR ^a	Pro (%)	Arg (%)	نمونه
-----	مرجع	۱	۸۷ (۳۸/۸)	۱۳۷ (۶۱/۲)	کنترل
p = ۰/۴۲	۰/۴۶ - ۱/۳۸	۰/۹۴	۸۴ (۳۷/۵)	۱۴۰ (۶۲/۵)	بیماران

a: Odds ratio

b: confidence interval

بحث

سرطان کولورکتال چهارمین سرطان شایع در مردان ایرانی بعد از سرطان معده، مثانه و پروستات و دومین سرطان شایع در میان زنان ایرانی می‌باشد و بر اساس گزارشات موجود هر ساله ۴۰۰۰ مورد جدید ابتلا به سرطان در ایران تشخیص داده می‌شود. (۱۴)، شیوع و میزان مرگ و میر در اثر سرطان در نژادها و نواحی جغرافیایی مختلف، متفاوت است. کمترین میزان شیوع در آسیا و آفریقا و بیشترین میزان شیوع در آمریکای شمالی و اروپا می‌باشد. (۱۵)، احتمالاً این امر به عوامل محیطی، سبک زندگی و فاکتورهای ژنتیکی ارتباط دارد.

در سرطان برخی از ژن‌های سرکوب کننده تومور دچار جهش می‌شوند و عملکرد آنها تغییر می‌کند، مهم ترین آنها ژن سرکوب کننده تومور P53 می‌باشد و در فعالیت‌های حیاتی سلول از جمله آپوپتوز، تنظیم سیکل سلولی و ترمیم DNA نقش اساسی دارد. (۱۶)، با وجودی که نقش جهش‌های P53 در ایجاد سرطان مورد قبول اکثر محققین می‌باشد ولی با وجود مطالعات گسترده روی پلی مورفیسم‌های شایع ژن P53 مانند کدون ۷۲، اینترون ۳ و اینترون ۶ نقش این پلی مورفیسم‌ها در کارسینوژنز هنوز مورد بحث است.

در مطالعه ما پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در ۱۱۲ بیمار دارای

گروه مورد و شاهد در این مطالعه دیده نشد (, OR= ۲.۳۶ , p=۰.۹۵). ارتباط بین ژنوتیپ‌های کدون ۷۲ با اندازه، محل تومور، جنس، سن و متاستاز نیز بررسی شد. تفاوت معنی داری آماری بین ژنوتیپ‌های کدون ۷۲ با اندازه، محل تومور، جنس در این مقایسه وجود نداشت، ولی بین این ژنوتیپ با متاستاز و سن بیماران ارتباط معنی دار آماری دیده شد (p<۰/۰۵).

فراوانی آلل آرژنینین و پرولین در نمونه‌های سرطانی کولورکتال و افراد گروه کنترل نیز با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ سنجیده شد و مقایسه توزیع فراوانی آلل‌های مختلف کدون ۷۲ در نمونه‌های سرطانی با توزیع فراوانی این آلل‌ها در نمونه‌های سالم نیز صورت گرفت (جدول ۳). فراوانی آلل آرژنینین در گروه بیماران ۰/۶۲۵ و در گروه کنترل ۰/۶۱۲ بود. میزان آلل پرولین در گروه بیماران ۰/۳۷۵ در حالی که در گروه کنترل ۰/۳۸۸ بود. بین توزیع آلل‌های آرژنینین و پرولین در گروه بیماران و کنترل تفاوت معنی دار آماری وجود نداشت (p=۰/۴۲). ولی بین میزان بروز آلل آرژنینین و متاستاز در گروه سرطانی اختلاف معنی دار آماری دیده شد و ۹۴/۹٪ از افرادی که متاستاز در آنها دیده شد دارای آلل آرژنینین بودند (p=۰/۰۳).

ارتباط معنی دار آماری بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ و سرطان کولورکتال گزارش شده است. در این تحقیق ۲۸/۹٪ از بیماران در مقایسه با ۳۴/۶٪ از افراد گروه کنترل دارای ژنوتیپ Arg/Arg بودند. (۲۱)، داکوراس^۴ و همکاران در یونان پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ را در ۹۳ بیمار مبتلا به آدنوکارسینومای اسپورادیک کولورکتال را بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که در افراد هموزیگوت آرژینین احتمال ابتلا به سرطان کولون چپ بیشتر است و این ژنوتیپ با خطر ابتلا به آدنوکارسینومای اسپورادیک کولورکتال در جمعیت یونانی‌های سفیدپوست ارتباط دارد. (۲۲). در پژوهش انجام شده توسط اشنایدر استوک^۵ روی بیماران دارای متاستاز بیان شده است که از دست دادن ترجیحی آلل پرولین، باقی ماندن آلل آرژینین و کاهش عملکرد طبیعی (LOH) آلل پرولین عامل مهمی در متاستاز تومور بویژه در تومورهای قسمت چپ کولون شود. (۲۳)

در پژوهش حاضر نیز ۶۸/۸٪ از افراد هموزیگوت آرژینین (Arg/Arg) دارای سرطان کولورکتال در منطقه چپ کولون بودند و در ۶۱٪ از این افراد متاستاز گره‌های لنفاوی وجود داشت. لازم به ذکر است که ۵۷/۸٪ از افرادی که دارای سرطان در منطقه چپ کولون بودند را مردان تشکیل می‌دادند. با توجه به این که سرطان کولورکتال جزء سرطان‌های شایع در مردان است باید به آن توجه گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش چون اکثر افراد دارای ژنوتیپ Arg/Arg دچار سرطان کولورکتال در ناحیه چپ کولون بودند و با توجه به ارتباط این ژنوتیپ با متاستاز در افراد مبتلا به سرطان (۲۳)، ممکن است بتوان پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ را به عنوان یک فاکتور پیشنهادی تشخیصی برای انجام مطالعات بیشتر در ارتباط با محل تومور و شناسایی افراد دارای ریسک بالای متاستاز در نظر گرفت.

سپاسگزاری:

بدینوسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان برای حمایت مالی این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

4. Dakouras
5. Schneider-Stock
6. Loss of Heterozygosity

سرطان کولورکتال از نوع آدنوکارسینوما از شهر رشت مورد بررسی قرار گرفت، ارتباط معنی دار آماری بین این پلی مورفیسم و سرطان کولورکتال در نمونه‌های مورد بررسی ما وجود نداشت (p=۰/۹۵). لوئیس اورلاندو پرز^۱ و همکاران در آرژانتین دریافتند که پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ با سرطان کولورکتال ارتباط دارد. (۱۱)، علاوه بر این در مطالعه انجام شده توسط نیکبخت دستجردی و همکاران در اصفهان (۷) گزارش شد که پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ با سرطان کولورکتال و میزان بقای بیماران ارتباط دارد (p<۰/۰۵) و علی‌رغم توزیع تقریباً مشابه ژنوتیپی در گروه کنترل، در مطالعه ما این ارتباط دیده نشد ممکن است اختلافات نژادی و جغرافیایی علت وجود این تفاوت باشد. لازم به ذکر است که در مطالعه انجام شده در شیراز نیز بین این پلی مورفیسم و سرطان کولورکتال ارتباط معنی دار آماری دیده نشد. لازم به ذکر است میزان آلل Arg در مطالعه انجام شده توسط نیکبخت و همکاران روی ۲۵۰ نمونه سرطانی در استان اصفهان ۰/۵۹۰ و در مطالعه مجتهدی و همکاران در شیراز روی ۱۳۲ نمونه سرطانی ۰/۵۸۸ می‌باشد که این میزان کمتر از مطالعه ما (۰/۶۲۵) است. علاوه بر این برخلاف مطالعه ما، متآنالیز انجام شده در آسیا نشان می‌دهد که میزان بروز آلل پرولین در کشورهای آسیایی (بررسی ۱۹۶۴ بیمار و ۲۹۴۳ فرد سالم) اختلاف معنی دار آماری در توزیع ژنوتیپی در افراد بیمار و سالم وجود ندارد. (۱۸)، علاوه بر این بر اساس این متآنالیز هیچ ارتباط آماری بین این ژنوتیپ و الکل، تنباکو، مرحله تمایز بافتی، متاستاز غدد لنفاوی به سرطان روده بزرگ وجود نداشت، ولی میزان بروز آلل پرولین در مطالعه ما با میزان بیان شده در این مقاله متفاوت است. ممکن است این اختلاف در نتیجه تفاوت آللی در گروه‌های نژادی مختلف و تعداد نمونه‌ها باشد. (۱۹)

همانند مطالعه ما پژوهش مورد-شاهدی انجام شده در ترکیه نیز وجود ارتباط بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P۵۳ و سرطان کولورکتال را نقض می‌نماید. (۲۰)، سیهان^۲ و همکاران در این مطالعه ابتلا به HPV را نیز در افراد مبتلا به سرطان کولون بررسی کردند و بیان کردند که ژنوتیپ‌های مختلف کدون ۷۲ ژن P۵۳ در مبتلایان به سرطان کولون با این عفونت مرتبط نیست. (۲۰)، ولی در مطالعه دیگری که در کره توسط کاو^۳ و همکاران در ۱۵۶ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد

1. Perez LO
2. Sayhan
3. Cao

REFERENCES

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:43-66 .
- Kummar V, and Fausto A. *Pathology Basis of Disease*, 7th ed. Saunders: 2007. p. 862-86.
- Aaltonen LA, Aslovaara MD, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338:1481-7.
- Khan SA, Thomas HC, Toledano MB, Cox IJ, Taylor-Robinson SD. P53 mutations in human cholangiocarcinoma: a review. *Liver Int* 2005;25:704-16.
- Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordan J. P53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem*. 2004;60:287-307.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999;19:1092-1100.
- Nikbakht Dastjerdi M, Salehi M, Mohajeri MH, Morsali F, Mirmohammad Sadeghi H, Esfandiary E. Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with sporadic colorectal cancer risk in Isfahan. *JRMS* 2008;13:317-23.
- Faghani M, Nikbakht M, Salehi M, Rabbani M, Talebi A, Soleimanie B, et al. Investigation of p53 codon 72 polymorphism in breast cancer in Isfahan. *J Isfahan Univ Med Sci* 2007;84:26-33. (In Persian)
- Fan R, Wu M, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, et al. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1037-42.
- Noma CC, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Letters* 2004;210:197-203.
- Pérez LO, Abba MC, Dulout FN, Golijow CD. Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina. *World J Gastroenterol* 2006;12:1426-9.
- Mahasneh AA, Abdel-Hafiz SS. Polymorphism of p53 gene in Jordanian population and possible associations with breast cancer and lung adenocarcinoma. *Saudi Med J* 2004; 25:1568-73.
- Godai TI, Suda T, Sugano N, Tsuchida K, Shiozawa M, Sekiguchi H, et al. Identification of colorectal cancer patients with tumors carrying the TP53 mutation on the codon 72 proline allele that benefited most from 5-fluorouracil (5-FU) based postoperative chemotherapy. *BMC Cancer* 2009;9:420.
- Moradi A, Khayamzadeh M, Guya MM, Mirzaei HR, Salmanian R, Rakhsha A, et al. Survival of colorectal cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009;10:583-6.
- Albano JD, Ward E, Jemal A, Anderson R, Cokkinides VE. Cancer mortality in the United States by education level and race. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1384-94.
- Bai L, Zhu W-G. P53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J Cancer Mol* 2006;2:141-53.
- Mojtahedi Z, Haghshenas MR, Hosseini SV, Fattahi MJ, Ghaderi A. P53 codon 72 polymorphism in stomach and colorectal adenocarcinomas in Iranian patients. *Indian J Cancer* 2010;47:31-4.
- Liu Y, Qin H, Zhang Y, Shi T, Liu B, Sun Y, et al. P53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Hepatogastroenterology* 2011;58:1926-9.
- Katkoori VR, Jia X, Shanmugam C, Wan W, Meleth S, Bumpers H, et al. Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism differs with race in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:2406-16.
- Sayhan N, Yazici H, Budak M, Bitisik O, Dalay N. P53 codon 72 genotypes in colon cancer. Association with human papillomavirus infection. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001;109: 25-34.
- Cao Z, Song JH, Park YK, Maeng EJ, Nam SW, Lee JY, et al. The p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to colorectal cancer in Korean patients. *Neoplasia* 2009;56:114-8.
- Dakouras A, Nikiteas N, Papadakis E, Perakis M, Valis D, Rallis G, et al. P53Arg72 homozygosity and its increased incidence in left-sided sporadic colorectal adenocarcinomas, in a Greek-Caucasian population. *Anticancer Res* 2008;28:1039-43.
- Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Szibor R, Landt O, Meyer F, et al. Selective loss of codon 72 proline p53 and frequent mutational inactivation of the retained arginine allele in colorectal cancer. *Neoplasia* 2004;6:529-35.

Evaluation of p53 codon 72 Polymorphism in Adenocarcinoma of the Colon and Rectum in Guilan Province

Masoumeh Faghani¹, Saba Fakhrieh²

¹Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

²Assistant Professor, Digestive Disease Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

ABSTRACT

Background :

Colorectal cancer is the second cause of mortality in developed countries. The p53 gene and some of its polymorphisms are among the causes for cancer development. The purpose of this study is to evaluate the relationship between the p53 codon 72 polymorphism in colorectal adenocarcinoma specimens compared with controls.

Materials and Methods :

We performed a case-control study among 112 patients with colorectal carcinoma and 112 controls in Rasht, Iran. Different genotypes of codon 72 were determined by allele-specific polymerase chain reaction (PCR).

Results :

The frequency of the Arg/Arg genotype of the p53 codon 72 polymorphism was 35.7%, for Arg/Pro it was 50.9%, and for Pro/Pro it was 13.4% in colorectal cancer patients. Among controls, the Arg/Arg genotype was seen in 37.5%, Arg/Pro was noted in 50%, and Pro/Pro was seen in 12.5% ($p = 0.95$). When tumor location was taken into consideration, 68.8% of the Arg/Arg carrier genotypes were associated with an increased incidence of left colon cancer. There was a significant statistical relationship between expression of the Arg allele in colorectal cancer samples and metastases ($p = 0.003$).

Conclusion :

The majority of colorectal cancer patients with p53 Arg homozygosity had left-sided colon cancer. There was also a relation between p53 Arg homozygosity, lymph node involvement, and metastases. Thus, we have suggested that the correlation between this polymorphism, tumor risk, and metastasis should be studied to determine its effectiveness as a diagnostic factor.

Keywords : p53 gene; Colorectal cancer; Codon 72 polymorphism

Govaresh/ Vol.17, No.1, Spring 2012; 25-32

Corresponding author:

Saba Fakhrieh asl, MD

Digestive Disease Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Tel: + 981313224125

Fax: + 981313227346

E-mail: sfakhrieh@yahoo.com

Received: 12 Jan. 2012

Edited : 10 Mar. 2012

Accepted : 11 Mar. 2012