مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۹، شماره ۶
بهمن-اسفند ۹۵، صفحه ۳۰۴-۲۹۳

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 59, No. ٦ P: 293-304
Nov-Jan 2017

مقاله اصلی

افزایش خطر ابتلا به سرطان معده با کاهش تعداد تکرارهای VNTR ناحیه پروموتری ژن RhoB وبررسی اثر تعداد تکرارهابر بیان ژنRhoB

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۰۱- تاریخ پذیرش:۹۵/۱۱/۱۰

فریبا شاکری[۱]
پریسا محمدی نژاد*[۲]
محمد مهدی مغنی باشی منصوریه[۲]

۱-کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲-دکترای ژنتیک، استادیار دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳-دکترای ژنتیک ، استادیار دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

* *دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران*

تلفن: ۰۹۱۳۳۱۹۱۲۶۹
Email:parisa_mohamadynejad@yahoo.com

خلاصه

مقدمه:
ژن RhoB یکی از ژن هایی است که در سرطان ها از جمله سرطان معده دخیل می باشد که در ساختار سیتو اسکلتون و ترابری سلولی نقش دارد و درسرطان معده، بیان آن کاهش می یابد. در ناحیه پروموتری ژنRhoB،چند شکلی تکرارهای پشت سرهم با تعداد متغیر گزارش شده است که در این مطالعه برای اولین بار ارتباط ژنوتیپ های مختلف این چند شکلی با خطر ابتلاء به سرطان معده بررسی می شود.

روش کار:
این مطالعه مورد شاهدی درسال ۱۳۹۳ در دانشگاه آزاد شهرکرد انجام شد. جامعه آماری این مطالعه،۱۰۰بیمار مبتلا به سرطان معده و ۲۵۰ نفر فرد سالم از جمعیت عمومی به عنوان گروه کنترل می باشد. چند شکلی واقع در پروموتر ژن RhoB با تکنیکPCR بررسی شد و با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ژنوتیپ ها تعیین شدند و با آزمون های آماری رگرسیون لجستیک و X^2داده های بدست آمده مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین بیان ژن RhoB در ۱۹ فرد با تکرارهای متفاوت با تکنیک Real Time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج:
نتایج این مطالعه نشان داد که‌در افراد واجد آلل های ۸ و۹ تکرار در مقایسه با افراد با آلل های ۱۰ و ۱۱ تکرار، خطر ابتلا به سرطان معده۱/۹ برابر افزایش می یابد($p=0.044$). اما ارتباطی بین تعداد تکرارها و بیان ژن RhoBمشاهده نگردید($p=0.605$).

نتیجه گیری:
چند شکلی پروموتر ژن RhoB با خطر ابتلاء به سرطان معده در ارتباط است. بررسی این چند شکلی در جمعیت‌های مختلف شاید بتواند یک الگو مناسب برای غربالگری سرطان معده معرفی نماید.

واژه های کلیدی:سرطان معده، ژنRhoB ، چند شکلی تکرارهای پشت سر هم با تعداد متغیر، پروموتر.

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

مقدمه:

سرطان معده درجهان به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ براثرسرطان شناخته می شود (۱).این سرطان از دیدگاه بافت شناسی به دو دسته ی منتشر[1] و روده ای[2] تقسیم می گردد وجزء بیماری های چند عاملی[3] دسته بندی می شود و عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی به عنوان عوامل خطر برای ابتلا به سرطان معده معرفی شده اند(۲). اگر سرطان معده در مراحل اولیه تشخیص داده شود احتمال درمان کامل بیمار بسیار بالاست و با توجه به این که علائم سرطان معده بسیار دیر ظاهر می گردد اهمیت کنترل و سنجش خطر بیماران بر اساس مولفه های اصلی مستعد کننده فرد حائز اهمیت می باشد.(۳، ۴).

سرطان معده تنوع جغرافیایی گسترده ای دارد به طوری که کشور های ژاپن، چین، کره جنوبی، آمریکای جنوبی و مرکزی بیشترین شیوع و کشور های هند، پاکستان، تایلند، شمال و غرب آفریقا و آمریکا ی شمالی کمترین شیوع را دارند (۵).میزان بروز این سرطان در نواحی مختلف ایران نیز متفاوت است، به طور مثال بروز این بیماری در اردبیل ۴۹/۱ نفردر مردان و ۲۵/۴ نفردر زنان در هر ۱۰۰ هزار نفر(بالاترین میزان سرطان معده در ایران) گزارش شده است، در حالی که در کرمان ۱۰/۲ نفر در مردان و ۵/۱ نفردر زنان در هر ۱۰۰ هزار نفر برآورد شده است (۶، ۷). اگر چه شیوع جهانی سرطان معده به طور چشمگیری در چند دهه أخیر کاهش یافته است، اما شایع ترین سرطان در شمال و شمال غرب ایران محسوب می شود (۶، ۷).

در سرطان ها یکی از مواردی که مشاهده می شود تغییر در سیتواسکلتون و ترابری سلولی است(۸). یکی از پروتئین هایی که در این فرآیندها نقش مهمی دارد RhoB می باشد. RhoB یک GTPaseکوچک عمدتاً اندوزومی است که سازماندهی اکتین و ترابری وزیکولی را تنظیم می کند (۹).ژن RhoB در انسان بر روی کروموزوم ۲ در جایگاه 2p24.1 واقع شده است. این ژن فقط دارای یک اگزون می باشد و پروتئینی به طول ۱۹۶ اسید آمینه با وزن مولکولی ۲۲۱۲۳ دالتون کد می کند(۱۰).

علاوه بر RhoB، خانواده Rho GTPase شامل دو عضو RhoA و RhoC نیز می باشد که۹۰ ٪ در توالی آمینو اسیدی همسان اند. در حالی که هر یک، تشکیل فیبر استرسی اکتین را تنظیم می کنند، با این وجود، عملکردهای فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی متمایزی دارند که احتمالاً به دلیل تفاوت در جای گیری زیر سلولی آن ها می باشد (۱۱). RhoB احتمالاً به عنوان یک تغییر دهنده ی منفی یا سرکوبگر ژن در سرطان عمل می کند و مورد توجه فزاینده ای قرار گرفته است (۱۲). در تومور های جامد، میزان بیان RhoB با پیشرفت تومور کاهش می یابد و افزایش بیان RhoB می تواند مهاجرت سلولی، تهاجم و متاستاز را مهار کند (۱۳،۱۴).

در سرطان معده، بیان RhoB کاهش می یابد و حتی در مواردی بیان نمی شود و همچنین مشخص شده است که بیان این ژن با مقاومت دارویی در سرطان معده نیز مرتبط است (۱۵).

مطالعات قبلی نشان داده است که چند شکلی[4]درژن های دخیل درپاسخ التهابی، ترمیم DNA، آنزیم های متابولیک، آسیب اکسیداتیو وغیره با سرطان معده ارتباط دارد (۱۶).یکی از انواع چند شکلی ها، توالی های تکراری پشت سر هم با تعداد متغیر(VNTR)[5] است که در سراسر ژنوم یافت می شود. VNTR های ناحیه رمز گذار ژن می توانند منجر به تغییرات در خواص بیولوژیکی پروتئین ها شوند، اما همه VNTR ها در ناحیه رمز گذار نیستند و بعضی از آنها در نواحی تنظیمی می باشند (۱۸،۱۷). یکی از عناصر مهم در تنظیم بیان ژن، توالی پروموتر آن می باشد و مطالعه های متعدد، حاکی از ارتباط معنی دار چند شکلی پروموتر ژن های مختلف با انواع

[1]Diffuse

[2] Intestinal

[3] Multifactorial

[4]- Polymorphism

[5]- Variable Number Of Tandem Repeats

سرطان ها است(۱۹-۲۲). وجود VNTR ها در نواحی تنظیمی ژن می تواند بر سطح بیان ژن اثر داشته باشد(۲۳،۱۸،۱۷).

در انسان پروموتر ژن RhoB دارای یک چند شکلی VNTR است که در موقعیت ۸۲۰ جفت بازی بالا دست جایگاه شروع رونویسی قرار دارد که دارای تکرار های پشت سر هم ۳۴ جفت بازی است و بین ۸-۱۴ بار این توالی تکرار می شود. این توالی ۳۴ جفت بازی دارای دو بخش ۱۲ نوکلئوتیدی TTCTATTGTACA است که توسط یک بخش ۱۰ نوکلئوتیدی ATAGTGTATA از هم جدا می شوند (۲۴).

در ارتباط با نقش VNTR ژن RhoB بر بیان آن تنها دو مطالعه وجود دارد که نتایج آن ها متناقض است (۲۴، ۲۵). با توجه به نقش RhoB در سرطان ها از جمله سرطان معده در این مطالعه برای اولین بار ارتباط تعداد تکرارهای VNTR پروموتر ژن RhoB با خطر ابتلا به سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت و سپس نقش تعداد تکرارها بر بیان ژن RhoB نیز بررسی شد.

روش کار:

این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه دانشگاه آزاد شهرکرد انجام شده است. ابتدا، با هماهنگی با بیمارستان امید اصفهان و پس از کسب رضایت نامه، از بین افراد مبتلا به سرطان معده ۱۰۰ نفر به طور تصادفی انتخاب شدندکه شامل ۲۶ زن و ۷۴ مرد با دامنه سنی ۲۶ -۸۵ سال بودند. همچنین ۲۵۰ فرد سالم از جمعیت عمومی شامل ۱۴۹ زن و ۱۰۱ مرد با دامنه سنی ۲۱ تا ۸۹ سال که از لحاظ سن (۵± سال) و جنس با گروه بیمار همسان سازی شده اند و به منظور اهدا خون به انتقال خون مراجعه کرده بودند، به عنوان گروه کنترل (شاهد) در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. از همه افراد ۵ سی سی خون گرفته شد و DNA ژنومی از نمونه خون هایی که در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده بود به روش Salting out استخراج گردید(۲۶). یک جفت پرایمر مناسب برای ناحیه ای از پروموتر ژن RhoB که شامل VNTR می شود با استفاده ازنرم افزار الیگو نسخه ۵ طراحی گردید. توالی پرایمرهای مورد نظر 5´- CCCCTCTTCTCCAGCCTCAA-3´ (رفت) و 5´-TTGACAACGGAAAGGGAAGGT-3´ (برگشت) است که در صورت وجود آلل با ۴ تکرار، قطعه bp ۳۵۱ تکثیر می شود و به ازای اضافه شدن هر تکرار، ۳۴ جفت باز به طول قطعه فوق اضافه خواهد شد. مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ ماکرولیتر Taq2X Master Mix Red(AMOLIQON، دانمارک)، ۰/۵ ماکرولیتر از هر پرایمر (۵ pmol)، یک ماکرولیتر DNA ژنومی و سه ماکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. تکنیک PCR طی مراحل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۲۵ سیکل (۹۴درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه) و طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بهینه شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲/۵٪ به مدت ۶۵ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ الکتروفورز شد. با رنگSafe View DNA STAIN(کیاژن، ایران) ژل رنگ آمیزی شد و بر اساس اندازه باند های ایجاد شده، ژنوتیپ هرنمونه مشخص گردید.علاوه بر این ها، بافت معده ۵۰ فرد سالم که برای انجام آندوسکپی به پزشک متخصص مراجعه کرده بودند، با کسب رضایت نامه شخصی برای بررسی بیان ژن RhoB مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا DNA و RNA نمونه بافت هایی که در لوله های حاوی محلول نگهداری کننده RNA گرفته شده بود با استفاده از ترایزول استخراج گردید. سپس با استفاده از دستورالعمل کیت فرمنتاز cDNA سنتز شد وجهت بررسی صحت سنتز cDNA، برای ژن بتا اکتین -RT PCR گذاشته شد برای این منظور، پرایمرهای 5´CGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGC-3´ (رفت)و 5´-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3´ (برگشت)برای ژن بتا اکتین طراحی شد و سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) برای جفت پرایمر، بهینه سازی شد. مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۱۵ ماکرولیتر جهت تکثیر ژن بتا اکتین شامل ۵ ماکرولیتر Taq2X Master Mix Red،

۰/۶ ماکرولیتر از جفت پرایمر(pmol ۵)، ۰/۶ ماکرولیتر cDNAو ۸/۲ ماکرولیتر آب دو بار تقطیر بود.تکنیک PCR طی مراحل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه) و طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بهینه شد.سپس محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.حضور باند ۳۷۵bp بتا اکتین نشان دهنده صحت سنتز cDNA می باشد.پس از سنتز cDNA بیان ژن RhoB با استفاده از روش RealTimeRT–PCR انجام شد. برای این منظور پرایمرهای 5´-TTGTGCCTGTCCTAGAAGTG-3´ (رفت)و 5´-CAAGTGTGGTCAGAATGCTA-3´ (برگشت) برای ژن RhoB و پرایمرهای 5´- CCACTCCTCCACCTTTGACG-3´ (رفت) و 5´-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3´ (برگشت) برای ژن GAPDH (به عنوان ژن رفرنس) طراحی شد. طول قطعه تکثیر شونده برای ژن RhoB،bp ۱۶۴ و برای ژن GAPDH، bp ۱۰۷ می شود. برای افزایش دقت کار، یک گرادیانت غلظتی برای نمونه cDNA و همچنین برای پرایمر اختصاصی (با سه غلظت ۵، ۷/۵ و ۱۰ پیکو مول)گذاشته شدکه بهترین غلظت برای cDNA، ۳۷/۵ نانوگرم بر ماکرولیتر و برای پرایمر،۷/۵ پیکو مول بود. مواد لازم برای واکنش RealTimeRT–PCR در حجم ۱۰ ماکرولیتر برای ژن RhoB و GAPDH، شامل ۵ ماکرولیتر SYBER GREEN، ۰/۶ماکرولیتر از هر جفت پرایمر، ۰/۷۵ ماکرولیتر cDNA و ۳/۰۵ ماکرولیتر آب DEPS بود. تکنیک RealTimeRT–PCR طی مراحل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه به عنوان مرحله یک و در مرحله دوم در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه و در مرحله Melting Curve در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه بهینه شد.برای تمام نمونه های مورد بررسی،Real Time RT-PCR به صورت دو بار تکرار انجام شد و بیان ژنRhoB و ژن رفرنس(GAPDH)در افراد مختلف، مورد بررسی قرار گرفت.علاوه بر این برای نمونه های بافتی،ژنوتیپ VNTR با همان روشی که قبلا اشاره شد، تعیین گردید.

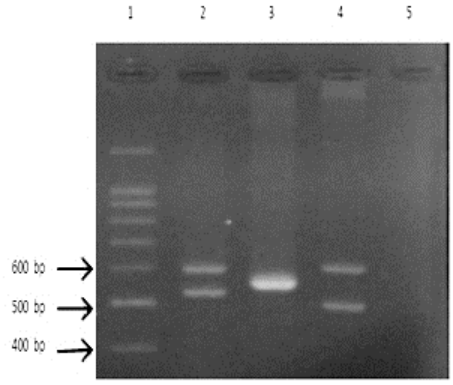
تجزیه و تحلیل داده ها:

تجزیه و تحلیل آنالیزنتایج حاصل از نمونه های خون با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون های آماری رگرسیون لجستیک و X^2 انجام شد. علاوه بر این برای آنالیز نتایج نمونه های بافتی از روش آماری تی تست[1]آزمون دو طرفه (2-tail)، استفاده شد. سطح معناداری در این آنالیز، 0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج:

پس از الکتروفورز محصولات PCR نمونه های خون، انواع باندهای مختلف که نشان دهنده آلل های مختلف می باشد مشاهده شد که نمونه هایی از نتایج حاصل در شکل ۱ مشاهده می شود.(شکل ۱)

[1] T-Test



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصولات PCR. چاهک اول،bp ladder ۱۰۰- چاهک دوم، دو باند ۹و۱۱ تکرار(۵۲۱ و۵۸۹ جفت باز) - چاهک سوم، تک باند ۱۰ تکرار (۵۵۵ جفت باز) - چاهک چهارم، دو باند ۸ و ۱۱ تکرار (۴۸۷ و ۵۸۹ جفت باز) - چاهک پنجم، کنترل منفی است.

در جمعیت مورد مطالعه ۱۰ نوع آلل شناسایی شد که بیشترین فراوانی ها در افراد سالم و بیمار مورد بررسی به ترتیب مربوط به آلل های ۹ تکرار (۴۴٪ در کنترل ها و ۵۴/۵٪ در بیماران) و ۱۰ تکرار (۳۱/۸٪ در کنترل ها و ۳۱/۵٪ در بیماران) می باشد همچنین کمترین فراوانی در افراد سالم و بیمار مربوط به آلل ۶تکرار (۰٪ در کنترل ها و ۰/۵٪ در بیماران)می باشد(جدول۱). فراوانی ژنوتیپی در بیماران (X^2=8.94, df=6, p>0.05) در تعادل هاردی واینبرگ وگروه کنترل (X^2=64.01, df=6, p<0.05) در تعادل نمی باشد. با توجه به این که از آلل های۶، ۴، ۵، ۱۳، ۱۴ و ۱۲ به ترتیب ۲،۱، ۲، ۲، ۴ و ۶ مورد وجود داشت، در آنالیز نتایج این آلل ها حذف شدند و با توجه به نتایج مطالعات قبلی مبنی بر این که آلل ۹ تکرار نسبت به آلل ۱۳ تکرار، بیان ژن RhoB را به مقدار کمتری افزایش می دهد، مابقی آلل ها در دو گروه طبقه بندی شدند به صورتی که آلل های ۱۰ و ۱۱، در گروه اول و آلل های ۸ و ۹ هم در گروه دوم قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گروه دوم نسبت به گروه اول ۱/۴ برابر خطرابتلا به سرطان معده را افزایش می دهند.

(P=0.049 df=1, OR=1.407 ,95%CI= 1.001-1.979)

جدول ۱. فراوانی آلل ها در افراد سالم و بیمار

آلل	تعداد (٪) در کنترل ها	تعداد (٪) در بیماران	تعداد (٪) کل
۴	۲ (٪۰/۴)	۰	۲ (٪۰/۳)
۵	۲ (٪۰/۴)	۰	۲ (٪۰/۳)
۶	۰	۱ (٪۰/۵)	۱ (٪۰/۱)
۸	۴۸(٪۹/۶)	۱۵ (٪۷/۵)	۶۳ (٪۹)
۹	۲۲۰(٪۴۴)	۱۰۹(٪۵۴/۵)	۳۲۹ (٪۴۷)
۱۰	۱۵۹(٪۳۱/۸)	۶۳ (٪۳۱/۵)	۲۲۲ (٪۳۱/۷)
۱۱	۶۰ (٪۱۲)	۹ (٪۴/۵)	۶۹ (٪۹/۹)

۱۲	(٪۰/۶) ۳	(٪۱/۵) ۳	(٪۰/۹) ۶
۱۳	(٪۰/۴) ۲	۰	(٪۰/۳) ۲
۱۴	(٪۰/۸) ۴	۰	(٪۰/۶) ۴
	(٪۱۰۰)۵۰۰	(٪۱۰۰) ۲۰۰	(٪۱۰۰) ۷۰۰

در جمعیت مورد مطالعه ۲۲ نوع ژنوتیپ شناسایی شد که بیشترین فراوانی ها در افراد سالم و بیمار مورد بررسی به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های۹-۹ (۲۵/۶٪ در کنترل ها و ۳۳٪ در بیماران) و ۹-۱۰ (۲۴/۸٪ در کنترل ها و ۳۱٪ در بیماران) می باشد. همچنین کمترین فراوانی در افراد سالم و بیمار مربوط به ژنوتیپ های ۵-۵، ۸-۴، ۸-۸، ۹-۱۴، ۱۰-۱۴،۱۱-۱۴، ۹-۴، ۸-۱۴ (۰/۴٪ در کنترل ها و ۰٪ در بیماران)، ۶-۹و۱۲-۱۲(۰٪ در کنترل ها و ۱٪ در بیماران) می باشد (جدول ۲).در آنالیز ارتباط ژنوتیپ و خطر ابتلا به سرطان معده ژنوتیپ هایی که تعداد آن ها یک یا دو مورد در جمعیت بود (۵-۵، ۸-۴،۵-۱۴،۹-۱۴، ۱۰-۱۴،۱۱، ۹-۴، ۸-۱۴، ۸-۶،۹-۱۲،۱۲-۱۲،۹-۱۳، ۹-۱۲ و ۱۰-۱۲)

حذف شدند.همانطور که قبلا اشاره شد با توجه به افزایش بیان ژن RhoB در آلل ۱۳ تکرار نسبت به ۹ تکرار در مطالعات قبلی، در این مطالعه ژنوتیپ های(۱۰-۱۰، ۱۱-۱۰ و ۱۱-۱۱) در گروه اول و ژنوتیپ های (۱۰-۸، ۱۱-۸، ۱۰-۹ و ۱۱-۹)در گروه دوم و ژنوتیپ های (۸-۸، ۹-۸ و ۹-۹) در گروه سوم قرار گرفتند(جدول ۳). نتایج آنالیز نشان داد که گروه سوم نسبت به گروه اول ۱/۹۶ برابر خطر سرطان معده را افزایش می دهند. که نشان دهنده این است که با افزایش تعداد تکرارها خطر ابتلا به سرطان معده افزایش می یابد.

(OR=1.969 , 95%CI= 1.019-3.803, P=0.044)

جدول۲. فراوانی انواع ژنوتیپ ها در افراد سالم و بیمار

ردیف	ژنوتیپ	تعداد (٪) افراد سالم	تعداد (٪) افراد بیمار	مجموع (٪) افراد سالم و بیمار
۱	۵-۵	(٪۰/۴) ۱	۰	(٪۰/۳)۱
۲	۸-۴	(٪۰/۴) ۱	۰	(٪۰/۳)۱
۳	۸-۸	(٪۲/۸) ۷	(٪۲) ۲	(٪۲/۶)۹
۴	۸-۹	(٪۶/۸) ۱۷	(٪۷) ۷	(٪۶/۹)۲۴
۵	۸-۱۰	(٪۴/۴) ۱۱	(٪۴) ۴	(٪۴/۳)۱۵
۶	۸-۱۱	(٪۱/۶) ۴	۰	(٪۱/۱)۴
۷	۹-۶	۰	(٪۱) ۱	(٪۰/۳)۱
۸	۹-۹	(٪۲۵/۶) ۶۴	(٪۳۳) ۳۳	(٪۲۷/۷)۹۷
۹	۹-۱۰	(٪۲۴/۸) ۶۲	(٪۳۱) ۳۱	(٪۲۶/۶)۹۳
۱۰	۹-۱۱	(٪۲/۸) ۷	(٪۴) ۴	(٪۳/۱)۱۱
۱۱	۹-۱۲	(٪۰/۸) ۲	۰	(٪۰/۶)۲

۱۲	۹–۱۳	۲ (٪۰/۸)	۰	۲(٪۰/۶)
۱۳	۹–۱۴	۱ (٪۰/۴)	۰	۱(٪۰/۳)
۱۴	۱۰–۱۰	۲۱ (٪۸/۴)	۱۲ (٪۱۲)	۳۳(٪۹/۴)
۱۵	۱۰–۱۱	۴۲ (٪۱۶/۸)	۳ (٪۳)	۴۵(٪۱۲/۹)
۱۶	۱۰–۱۲	۱ (٪۰/۴)	۱ (٪۱)	۲(٪۰/۶)
۱۷	۱۱–۱۱	۳ (٪۱/۲)	۱ (٪۱)	۴(٪۱/۱)
۱۸	۱۱–۱۴	۱ (٪۰/۴)	۰	۱(٪۰/۳)
۱۹	۱۲–۱۲	۰	۱ (٪۱)	۱(٪۰/۳)
۲۰	۱۰–۱۴	۱ (٪۰/۴)	۰	۱(٪۰/۳)
۲۱	۹–۴	۱ (٪۰/۴)	۰	۱(٪۰/۳)
۲۲	۸–۱۴	۱ (٪۰/۴)	۰	۱(٪۰/۳)
		۲۵۰ (٪۱۰۰)	۱۰۰(٪۱۰۰)	۳۵۰(٪۱۰۰)

جدول ۳. ارتباط ژنوتیپ ها با خطر ابتلا به سرطان معده

افراد بیمار	افراد سالم	upper	lower	OR	P	df	ژنوتیپ ها	گروه
۱۶	۶۶	–	–	–	۰/۱	۲	۱۱–۱۱ ، ۱۱–۱۰ ، ۱۰–۱۰	۱
۳۹	۸۴	۳/۷۲۵	۰/ ۹۸۵	۱/۹۱۵	۰/۰۵۶	۱	۱۱–۹ ، ۱۰–۹ ، ۱۱–۸ ، ۱۰–۸	۲
۴۲	۸۸	۳/۸۰۳	۱/۰۱۹	**۱/۹۶۹**	**۰/۰۴۴**	۱	۹–۹ ، ۹–۸ ، ۸–۸	۳

در این مطالعه علاوه بر بررسی ارتباط تعداد تکرارهای VNTR پروموتر ژن RhoB با خطر ابتلا به سرطان معده، تاثیر تعداد تکرار ها بر بیان ژن RhoB نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه بیان ژن RhoB در ۱۹ فرد سالم با ژنوتیپ های متفاوت نشان داد که علی رغم افزایش میانگین بیان ژن در گروه دوم با ژنوتیپ های ۱۰–۹، ۹–۹، ۱۱–۹ و ۱۱–۸ (۱/۱۰۴) نسبت به گروه اول با ژنوتیپ های ۱۰–۱۰ و ۱۱–۱۰ (۰/۸۵۳) از نظر آماری این تفاوت معنی دار نیست.

(df= 17, t= -0.526 , P=0.605)

بحث

در جمعیت مورد بررسی، ۱۰ آلل متفاوت از نظر تعداد واحد تکراری ۳۴ جفت بازی مشاهده شد در حالی که دنیل تاور[1] و همکارانش در سال ۲۰۰۳، ۷ آلل راگزارش کرده بودند که شامل آلل هایی با تعداد ۱۴–۸ تکرار می باشد اما در این مطالعه آلل های ۴، ۵ و۶ تکرار نیز مشاهده گردید(۲۴).

ماهر[2] در سال ۲۰۰۷ در جمعیتی که مورد مطالعه قرار داد، گزارش داد که فراوانترین آلل ها، ۱۰ و ۱۱ تکرار و

[1] Daniel Tovar

[2] Sandra Mahr

کمترین،آلل ۸ تکرار هستند اما در مطالعه کنونی که انجام شد بیشتر افراد دارای آلل هایی با ۹ (۴۷٪) و ۱۰ (۳۱/۷٪) واحد تکراری بودند و کمترین تعداد مربوط به آللی با ۶ (۰/۱٪) واحد تکراری بوده است که می تواند به دلیل تفاوت ژنتیکی در دو جمعیت ایران و اروپا باشد(۲۵).

از نظر ارتباط تعداد تکرارهای VNTR ژن RhoB با خطر ابتلا به بیماری ها، فقط یک مطالعه وجود دارد که بر روی بیماری استئو آرتریت انجام شده است و ارتباطی بین ژنوتیپ و خطر ابتلا به بیماری استئوآرتریت مشاهده نشده است (۲۵). در مطالعه ی حاضر ارتباط بین سرطان معده و پلی مورفیسم VNTR بررسی شد و نتایج حاصل از آنالیز داده های این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ های ۱۰-۱۰، ۱۱-۱۰ و۱۱-۱۱ نسبت به ژنوتیپ های با تعداد واحد تکراری کمتر (ژنوتیپ های ۸-۸، ۹-۸ و ۹-۹) خطر ابتلا به سرطان معده را به طور معنی داری کاهش می دهد. به نظر می رسد که هر چه تعداد واحدهای تکراری بیشتر باشد تاثیر مهارکنندگی آن بر روی خطر ابتلا به سرطان معده هم افزایش یافته و بروز سرطان معده را کاهش می دهد که این نتیجه با نتایج ماهِر هم خوانی دارد. وی در سال ۲۰۰۷ مشاهده کرد که آلل واجد ۱۳ تکرار نسبت به آلل واجد ۹ تکرار، بیان ژن RhoB را افزایش می دهد (۲۵).

در ارتباط با تاثیر تعداد تکرارها بر بیان ژن RhoB تا کنون دو مطالعه انجام شده است: تاور و همکارانش در سال ۲۰۰۳ به این نتیجه رسیدند که تعداد تکرارها بر بیان این ژن تاثیری ندارد و ماهِر و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که تعداد تکرار ها بر بیان این ژن تاثیر گذار است(۲۵،۲۴). در مطالعه حاضر علاوه بر بررسی ارتباط تعداد تکرارها با سرطان معده، در ۱۹ نفر از افراد سالم بیان ژن RhoB نیز مورد مطالعه قرار گرفت که در دو گروه تقسیم بندی شدند. گروه اول شامل ژنوتیپ های ۱۰-۱۰ و ۱۱-۱۰ و گروه دوم شامل ژنوتیپ های ۹-۹، ۱۰-۹، ۱۱-۹ و ۱۱-۸ بودند. نتایج نشان داد که میانگین بیان ژن در گروه اول ۰/۸۵۳ و در گروه دوم ۱/۱۰۴ می باشد که از نظر آماری معنی دار نیست. نتایج در راستای نتایج مطالعات تاور می باشد که نشان داد که اگرچه VNTR می تواند بیان ژن را تنظیم کند اما الزاما تعداد تکرارها تاثیری بر بیان این ژن ندارد. همچنین می تواند این نتایج به دلیل تعداد کم نمونه های مورد مطالعه باشد.

نتیجه گیری:

نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که چند شکلی VNTR پروموتر ژن RhoB با خطر ابتلا به سرطان معده در ارتباط است و با بررسی بیشتر این چند شکلی در جمعیت های مختلف شاید بتوان یک الگو مناسب برای غربالگری سرطان معده معرفی نمود.

پیشنهادات

با توجه به نتایج این مطالعه، بررسی فراوانی آلل هایVNTR ژن RhoB در جمعیت های دیگر، ارتباط ژنوتیپ VNTR ژن RhoB با خطر ابتلا به سرطان های دیگر و همچنین بررسی بیان ژنRhoB و ارتباط آن با تعداد تکرارهای VNTR پروموتر ژن RhoB در تعداد نمونه های بیشتر پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی:

در پایان از پرسنل بیمارستان امید اصفهان و تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه سپاسگزاری می شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

Refrences

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61:69-90.
2. Kwon SJ. Evaluation of the 7th UICC TNM staging system of gastric cancer. J Gastric Cancer 2011; 11:78-85.
3. Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. Methods Mol Biol 2012; 863:411-35.
4. Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 1998; 114:1169-79.
5. He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, et al. Major causes of death among men and women in China. N Engl J Med 2005; 353:1124-34.
6. Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, et al. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. J Clin Pathol 2004; 57:37-42.
7. Mashhadi M, Nezam K, Abdollahnejad MJ. Gastric cancer in south East of Iran. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2009; 3:38-42.
8. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. Adv Cancer Res 2002; 84:57-80.
9. Huang M, Prendergast GC. RhoB in cancer suppression. Histol Histopathol 2006; 21:213-8.
10. Karnoub AE, Symons M, Campbell SL, Der CJ. Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. Breast Cancer Res Treat 2004; 84:61-71.
11. Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the p21rho proteins. J Cell Biol 1992; 119:617-27.
12. Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. Nat Rev Cancer 2001; 1:162-8.
13. Ridley AJ. Rho proteins and cancer. Breast Cancer Res Treat 2004; 84:13-9.

14. Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sebti S. Akt mediates Ras down regulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. Mol Cell Biol 2004; 24:5565-76.
15. Zhou J, Zhu Y, Zhang G, Liu N, Sun L, Liu M, et al. A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. Int J Cancer 2011; 128:1057-68.
16. Roberts-Thomson IC, Butler WJ. Polymorphism and gastric cancer. J Gastroentero1 Hepatol 2005; 20:793-4.
17. Nakamura Y, Koyama K, Matsushima M. VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulators. J Hum Genet 1998; 43:149-52.
18. Brookes KJ. The VNTR in complex disorders: the forgotten polymorphisms? A functional way forward? Genomics 2013; 101:273-81.
19. Wang S, Wang M, Yin S, Fu G, Li C, Chen R, et al. A novel variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism containing Sp1 binding elements in the promoter of XRCC5is a risk factor for human bladder cancer. Mutat Res 2008; 638:26-36.
20 Cui J, Luo J, Kim Y, Snyder C, Becirovic D, Downs B, et al. Differences of variable number tandem repeats in *XRCC5* promoter are associated with increased or decreased risk of breast cancer in *BRCA* gene mutation carriers. Front Oncol 2016; 6:92.
21 Saadat M, Pashaei S, Amerizade F. Susceptibility to gastric cancer and polymorphisms of insertion/deletion at the intron 3 of the XRCC4 and VNTR at the promoter region of the XRCC5. Pathol Oncol Res 2015; 21:689-93.
22 Rajaei M, Saadat I, Omidvari S, Saadat M. Association between polymorphisms at promoters of XRCC5 and XRCC6 genes and risk of breast cancer. Med Oncol 2014; 31:885.
23 Gymrek M, Willems T, Guilmatre A, Zeng H, Markus B, Georgiev S, et al. Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. Nat Genet 2016; 48:22-9.

24 Tovar D, Faye JC, Favre G. Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. Genomics 2003; 81:525-30.

25 Mahr S, Muller-Hilke B. Transcriptional activity of the RHOB gene is influenced by regulatory polymorphisms in its promoter region. Genomic Med 2007; 1:125-8.

26 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16:1215.

Original Article

Increased risk of gastric cancer with decreased numbers of VNTR in the promoter region of RhoB gene and assessment of repeats number effect on expression of RhoB gene

Received:21/11/2016 - Accepted: 29/01/2017

Fariba Shakeri[1]
Parisa Mohammadinejad[2]
Mohammad Mehdi Moghanibashi[3]
Mansouriye

1-Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

2-Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

3-Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

** Islamic Azad University, shahrekord*

Branch, shahrekord, Iran

Tel:09133191269
Email:
parisa_mohamadynejad@yahoo.com

Abstract

Introduction: The RhoB gene is one of the genes that are involved in cancers such as gastric cancer. This gene is contributed in cytoskeletal organization and cell trafficking and its expression is decreased in gastric cancer. There are a VNTR polymorphism in the promoter of the RhoB gene and in this study different genotypes of this VNTR was assessed with risk of gastric cancer, for the first time.

Materials and Methods: In this study, the VNTR polymorphism of the promoter region in 250 controls and 100 patients with gastric cancer, was assessed by PCR and electrophoresis on agarose gel. Then, the result was assessed by regression logistic and X^2 tests. Also expression of the RhoB gene in 19 controls with different repeats in promoter region was compared by Real Time RT-PCR.

Results: Our result showed the 1.9 folds increase risk of gastric cancer with 8 and 9 repeats allele in comparison with 10 and 11 repeats ($p=0.044$). But we found no association of number of repeats with expression of RhoB gene ($p=0.605$).

Conclusion: The VNTR polymorphism of the RhoB gene promoter is associated with risk of gastric cancer and may be used for screening of gastric cancer if was confirmed by other studies.

Keywords: Gastric cancer, RhoB gene, Variable number of tandem repeats, Promoter.

Acknowledgement: There is no conflict of interest.