بررسی ارتباط چندشکلی FokI ژن XRCC3 با خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان: *گزارش کوتاه*

میلاد پزشکی[۱]
جمشید انصاری[۲*]

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
۲- گروه انکولوژی، بیمارستان آیت‌الله خوانساری، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

*نویسنده مسئول: اراک، خیابان دانشگاه، بیمارستان آیت‌الله خوانساری، بخش رادیوتراپی.
تلفن: ۳۳۶۷۵۰۰۱ -۰۸۶
E-mail: j.ansari@arakmu.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۳/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲ آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۲۰

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در زنان سرتاسر دنیا است. میزان شیوع سرطان پستان در زنان ایرانی در حال افزایش است. عوامل خارجی و داخلی مختلفی بر روی ثبات ژنوم و خطر ابتلا به سرطان پستان تاثیر دارند. چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در ژن‌های تعمیری DNA با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان در ارتباط هستند. هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط بین خطر سرطان پستان و پلی‌مورفیسم FokI در ژن XRCC3 بود.

روش بررسی: این مطالعه موردی- شاهدی در بازه زمانی مهر ۱۳۹۵ تا اسفند ۱۳۹۶ در زنان مبتلا به سرطان پستان و زنان سالم واقع در استان مرکزی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اراک، شهر اراک انجام شد. در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم FokI ژن XRCC3 با خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان با استفاده از روش هضم آنزیمی PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: اختلاف معناداری بین دو گروه بیمار و کنترل برای سه ژنوتیپ جایگاه rs1799794 مشاهده نشد (P=۰/۴۳۵).

نتیجه‌گیری: ارتباط معناداری میان چندشکلی FokI در ژن XRCC3 و خطر ابتلا به سرطان پستان وجود نداشت.

کلمات کلیدی: نئوپلاسم پستان، تخریب DNA، فوک وان، نوترکیبی همولوگی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، ژن XRCC3.

مقدمه

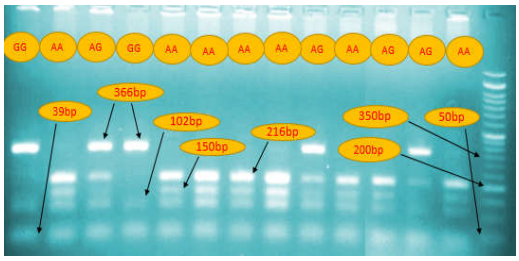
سرطان پستان ۲۳٪ کل سرطان‌ها در زنان را شامل می‌شود به گونه‌ای که شایعترین و کشنده‌ترین بدخیمی در زنان محسوب می‌گردد.[۱و۲] بروز این سرطان در زنان ایرانی روزبه‌روز با افزایش چشمگیری همراه است.[۳] عوامل مختلفی در بروز سرطان پستان دخالت دارند که به‌طور کلی در دو دسته عوامل ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرند که در نهایت می‌توانند منجر به تغییر در ژنوم و سرطانی شدن گردند. اغلب ژن‌های شناسایی شده در سرطان پستان، دارای عملکرد تعمیری می‌باشند.[۴] مطالعات نشان داده است که میان تغییرات ژنتیکی در سیستم‌های ترمیمی DNA و خطر بروز بسیاری از سرطان‌ها به‌خصوص سرطان پستان ارتباط وجود دارد.[۵] ژن XRCC3 در انسان در جایگاه سیتوژنتیکی q32.3١٤ قرارگرفته است که این ژن پروتیینی به‌همین نام را تولید می‌کند که در فرآیند تعمیر نوترکیبی همولوگی دخالت دارد. پلی‌مورفیسم‌های مربوط به این ژن نقش مهمی را در رشد و توسعه سرطان بازی می‌کنند.[۶] پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در ژن تعمیری XRCC3 موجب تغییر باز DNA که به‌دنبال آن موجب تغییر کدون مربوطه و در نهایت منجر به تولید پروتیین ناکارآمدی از XRCC3 می‌گردد که ممکن است با خطر افزایش ابتلا به سرطان پستان در ارتباط باشد. اسنیپ rs1799794 (4541 A>G) در جایگاه UTR'۵ قرار گرفته است. این چندشکلی دارای جایگاه برش برای آنزیم برشگر FokI می‌باشد که در نتیجه برش و ایجاد باندهای متناظر می‌توان ژنوتیپ نمونه‌ها را مورد آنالیز قرار داد.[۷] هدف از پژوهش حاضر بررسی ارتباط چندشکلی FokI ژن XRCC3 با خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان بود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2022-06-29]

روش بررسی

این مطالعه موردی- شاهدی پس از دریافت کد اخلاق (IR.ARAKMU.REC.1395.288) از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک در فاصله زمانی مهر ۱۳۹۵ تا اسفند ۱۳۹٦ در زنان مبتلا به سرطان پستان و زنان سالم واقع در استان مرکزی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اراک انجام شد. ۸۰ نمونه خون از جامعه بیماران مبتلا به سرطان پستان بیمارستان آیت‌الله خوانساری اراک به‌همراه ۸۰ نمونه خون از افراد سالم به‌طور تصادفی دریافت گردید. داده‌های دموگرافیک در قالب یک پرسشنامه گردآوری شد. استخراج DNA براساس پروتکل کیت DNG-Plus (SinaClon BioScience Co., Karaj, Iran) انجام شد. نمونه‌ها پس از استخراج با به‌کارگیری روش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) در جایگاه چندشکلی rs1799794 ژن XRCC3 توسط آنزیم محدودگر FokI (New England Biolab, Hitchin, United Kingdom) تعیین ژنوتیپ شدند. جهت انجام واکنش PCR از پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده گردید.

واکنش PCR در حجم نهایی µl ۲۵، شامل µl ۱۰ مسترمیکس، µl ۱/۵ پرایمر فوروارد و µl ۱/۵ پرایمر ریورز (Takapouzist Co., Tehran, Iran)، µl ۷ آب دو بار تقطیر و µl ۵ DNA استخراج شده انجام گرفت. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ °C به مدت پنج دقیقه و ٤۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ °C به مدت ٤۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ٦۱ °C به مدت ٤۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ °C به مدت ٤۵ ثانیه و یک دمای تکثیر نهایی ۷۲ °C به مدت هفت دقیقه استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ که حاوی ماده فلوروسانس ران شده و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده و عکسبرداری شدند. برای تشخیص قطعات تکثیر شده از نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp (SinaClon BioScience Co., Karaj, Iran) استفاده شد. پس از تأییـد صحت اندازه باند تکثیری، محصولات حاصل از PCR تحت عمل هضم آنزیمی آنزیم محدوگر FokI قرار گرفتند. واکنش برش آنزیمی در حجم µl ۱۵ حاوی µl ۰/٤ آنزیم FokI، µl ۱/۵ بافر مخصوص این آنزیم، µl ۵/٦ آب استریل و µl ۷/۵ محصول PCR آماده گردید و در دمای ٤۰ °C به مدت پنج ساعت مورد برش آنزیمی قرار گرفت. در حضور آلل موتانت A، برش آنزیمی دو قطعه ۱۵۰ و ۲۱٦ و در حضور آلل وحشی G جایگاه برش وجود نخواهد داشت و باند ۳٦٦ جفت بازی حاصل خواهد شد و در صورت هتروزیگوت بودن هر سه قطعه گفته شده حاصل می‌گردد. این در حالی است که وجود دو جایگاه برش دیگر در محصول تکثیری، همواره دو باند ۳۹ و ۱۰۲ جفت بازی ایجاد می‌کند که هیچ نقشی در تعیین ژنوتیپ نخواهد داشت. پس از برش آنزیمی، محصولات برش داده شده با استفاده از ژل آگارز ۳٪ حاوی ماده فلورسانس DNA Green Viewer (SinaClon BioScience Co., Karaj, Iran)، الکتروفورز گردید (شکل ۱). جهت ارزیابی اثر چند شکلی با خطر ابتلا به سرطان پستان از روش آماری رگرسیون لجستیک و محاسبه Chi-square test و با در نظر گرفتن مقدار P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری و همچنین محاسبه نسبت خطر نسبی (OR) با فاصله اطمینان (۹۵٪ CI) با به‌کارگیری SPSS software, version 20 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) صورت گرفت.



شکل ۱: ژل محصول PCR پس از هضم آنزیمی FokI.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر چندشکلی FokI.

طول قطعه تکثیری	توالی آغازگر (۳'-۵')	محل	چندشکلی
۵۰۷ جفت باز	F: 5'- CACACTGCGGTCTTGCAGTG -3' R : 5'- CAGGCTGGGTCTGGATACAA -3'	اگزون ۲	FokI

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2022-06-29]

یافته‌ها

چندشکلی rs1799794 در دو جمعیت بیمار مبتلا به سرطان پستان و کنترل مورد بررسی قرار گرفت به گونه‌ای که انجام Chi-square test حدود اطمینان P=۰/۴۳۵ را نشان داد و مشخص شد رابطه آماری معناداری بین ژنوتیپ‌های حاصل و بیماری وجود ندارد (جدول ۲). فراوانی پلی‌مورفیسم rs1799794(A/G) برای آلل A در گروه بیمار ۶۹/۳۷۵ و در گروه کنترل ۶۳/۱۲۵٪ محاسبه شد و برای آلل G برای بیماران ۳۰/۶۲۵ و برای گروه کنترل ۳۶٪/۸۷۵ محاسبه شد.

براساس محاسبات آماری انجام شده، ارتباط معناداری بین فراوانی آللی و بیماری مشاهده نشد. فراوانی ژنوتیپی نیز به‌ترتیب در گروه بیمار و کنترل برای ژنوتیپ AA ۴۷/۵ و ۳۷/۵٪، ژنوتیپ AG ۴۳/۷۵ و ۵۱/۲۵٪، ژنوتیپ GG ۸/۷۵ و ۱۱٪/۲۵ به‌دست آمد که بر اساس محاسبات آماری ارتباط معناداری بین این ژنوتیپ و بیماری مشاهده نشد.

بحث

به‌طور کلی در پژوهش حاضر ارتباط معناداری بین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی مورد مطالعه و سرطان پستان وجود نداشت (P=۰/۴۳۵). نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر با مطالعه صورت گرفته توسط Su و همکاران بر روی اسنیپ rs1799794 همخوانی دارد.[۶] در مقابل، دیگر مطالعه‌ای که در کشور عربستان سعودی توسط Ali و همکاران بر روی اسنیپ rs1799794 صورت گرفت، فرکانس بالایی از ارتباط میان این اسنیپ در بیماران مبتلا به سرطان پستـان در مقایسه با افراد سالم به‌دست آمد که با نتایج حاصل در مطالعه حاضر همخوانی ندارد.[۷] در دیگر مطالعات صورت گرفته در جمعیت‌های مختلف در مورد این چند شکلی، نتایج چشمگیری وجود داشت، به‌طوری که آلل G یک نقش حفاظتی در مقابل ابتلا به سرطان ریه در جمعیت چینی‌ها نشان داد. افزون‌براین آلل نقش حفاظتی در مقابل خطر ابتلا به سرطان معده در جمعیت آلمانی‌ها نشان داد به گونه‌ای که دارای نقش حفاظتی در مقابل عوارض جانبی ناشی از پرتودرمانی دارد.[۸و۹]

در یک مطالعه صورت گرفته در جمعیت اردنی‌ها، آلل G ارتباط معناداری را با خطر ابتلا به سرطان پستان از خود نشان داد، این در حالی بود که در جمعیت زنان انگلستان ارتباط معناداری میان این آلل و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد.[۱۰و۱۱] در متاآنالیز انجام شده توسط Yuan و همکاران، ارتباط معناداری میان این اسنیپ و خطر ابتلا به سرطان تخمدان مشاهده شد.[۱۲] در مقابل، این اسنیپ ارتباط معناداری در میان زنان بریتانیایی و خطر ابتلا به سرطان پستان نشان نداد.[۱۱] از دلایل عدم همخوانی نتایج این پژوهش با برخی مطالعات یادشده می‌توان به تنوع جمعیت مورد مطالعه، موقعیت منطقه جغرافیایی، وضعیت جهش در ژن XRCC3 و شرایط عوامل محیطی سرطان‌زا اشاره کرد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، ارتباط معناداری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs1799794 و سرطان پستان مشاهده نشد.

سپاسگزاری: این پژوهش بخشی از پایان‌نامه با عنوان "بررسی دو پلی‌مورفیسم ژن XRCC3 با خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان" در مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک در سال ۱۳۹۵ و کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1395.288 است که با حمایت دانشگاه اراک و پرسنل بیمارستان آیت‌الله خوانساری اجرا شده است.

جدول ۲: محاسبه فراوانی ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و گروه کنترل

ژنوتیپ	فراوانی در افراد بیمار (درصد)	فراوانی آللی در افراد بیمار	فراوانی در افراد سالم (درصد)	فراوانی آللی در افراد کنترل	P*	OR(CI 95%)
AA	۳۸(٪۴۷/۵)		۳۰(٪۳۷/۵)		۰/۴۳۶	
AG	۳۵(٪۴۳/۷۵)	A=۱۱۱(٪۶۹/۳۷۵)	۴۱(٪۵۱/۲۵)	A=۱۰۱(٪۶۳/۱۲۵)	۰/۳۸۴	۰/۶۱۴(۰/۲۰۵–۱/۸۴۰)
GG	۷(٪۸/۷۵)	G=۴۹(٪۳۰/۶۲۵)	۹(٪۱۱/۲۵)	G=۵۹(٪۳۶/۸۷۵)	۰/۷۶۸	۰/۹۱۱(۰/۳۰۸–۲/۶۹۹)
Total	۸۰	۱۶۰	۸۰	۱۶۰	۰/۴۳۵	

* آنالیز داده‌ها با استفاده از روش رگرسیون لجستیک صورت گرفت و P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2022-06-29]

References

1. Banegas MP, Bird Y, Moraros J, King S, Prapsiri S, Thompson B. Breast cancer knowledge, attitudes, and early detection practices in United States-Mexico border Latinas. *J Womens Health (Larchmt)* 2012;21(1):101-7.
2. Nafissi N, Saghafinia M, Motamedi MH, Akbari ME. A survey of breast cancer knowledge and attitude in Iranian women. *J Cancer Res Ther* 2012;8(1):46-9.
3. Yavari P, Mosavizadeh M, Sadrol-Hefazi B, Mehrabi Y. Reproductive characteristics and the risk of breast cancer--a case-control study in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005;6(3):370-5.
4. Osawa K, Nakarai C, Uchino K, Yoshimura M, Tsubota N, Takahashi J, et al. XRCC3 gene polymorphism is associated with survival in Japanese lung cancer patients. *Int J Mol Sci* 2012;13(12):16658-67.
5. Motovali-Bashi M, Maleki J, Hemmati S, Korbekandi H. Correlation of homologous recombination repair system by studying a single-nucleotide polymorphism in XRCC3 gene with initiation and progression of colorectal cancer. *Basic Clin Cancer Res* 2013;5(3):23-7.
6. Su CH, Chang WS, Hu PS, Hsiao CL, Ji HX, Liao CH, et al. Contribution of DNA double-strand break repair gene XRCC3 genotypes to triple-negative breast cancer risk. *Cancer Genomics Proteomics* 2015;12(6):359-67.
7. Ali AM, AbdulKareem H, Al Anazi M, Reddy Parine N, Shaik JP, Alamri A. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC3 and susceptibility to breast cancer in Saudi females. *Biomed Res Int* 2016;2016:8721052.
8. Guo S, Li X, Gao M, Li Y, Song B, Niu W. The relationship between XRCC1 and XRCC3 gene polymorphisms and lung cancer risk in northeastern Chinese. *PLoS One* 2013;8(2):e56213.
9. Ott K, Rachakonda PS, Panzram B, Keller G, Lordick F, Becker K, et al. DNA repair gene and MTHFR gene polymorphisms as prognostic markers in locally advanced adenocarcinoma of the esophagus or stomach treated with cisplatin and 5-fluorouracil-based neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2011;18(9):2688-98.
10. Al Zoubi MS. X-ray repair cross-complementing protein 1 and 3 polymorphisms and susceptibility of breast cancer in a Jordanian population. *Saudi Med J* 2015;36(10):1163-7.
11. Kuschel B, Auranen A, McBride S, Novik KL, Antoniou A, Lipscombe JM, et al. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2002;11(12):1399-407.
12. Yuan C, Liu X, Yan S, Wang C, Kong B. Analyzing association of the XRCC3 gene polymorphism with ovarian cancer risk. *Biomed Res Int* 2014;2014:648137.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2022-06-29]

Study of the association FokI polymorphisms of the XRCC3 gene with the risk of breast cancer in women: *brief report*

Milad Pezeshki M.Sc.[1]
Jamshid Ansari M.D.[2*]

1- Department of Genetics, University of Arak, Arak, Iran.
2- Department of Oncology, Ayatollah Khansari Hospital, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Abstract

Background: Breast cancer is one of the most common worldwide malignancies among women. Biological data suggest that damage induced by endogenous and exogenous factors affects the integrity of DNA and associated with susceptibility to breast cancer. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes can associated with differences in the repair efficiency of DNA damage and may affect breast cancer. The XRCC3 protein participates in DNA double-strand breaks and recombinational repair, in other words the product of XRCC3 gene, plays a key role in homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. The polymorphism of FokI plays critical roles in breast cancer development. The aim of the present study was to evaluate associations between the risk of breast cancer and FokI polymorphism in the XRCC3 gene.

Methods: This case-control study was carried out on the women with breast cancer and healthy women located in Markazi province at Arak University Research, Iran, from October 2016 to March 2017. In the present study, the association of FokI polymorphisms and the risk of breast cancer was assessed by Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques. In this method, genomic DNA was extracted from blood samples using the kit procedure. Then, PCR was performed and the SNP-containing DNA amplicons were subjected to digestion of enzymes. Following digestion, each sample was immediately analyzed by 3% agarose gel electrophoresis. Statistical analysis was done using SPSS and SNP Analyzer softwares and the final results were determined.

Results: No statistically significant difference was observed between the two groups of patients and controls for three genotypes the site rs1799794 (P=0.435). Genotype AG (P=0.384, OR=0.614, CI=95%, 0.205-1.840) and GG (P=0.867, OR=0.911, CI=95%; 0.308-2.699) had no significant associations with risk of breast cancer.

Conclusion: There was no significant association between FokI polymorphisms of the XRCC3 and risk of susceptibility to breast cancer, which was in accordance to some researchers. FokI polymorphisms of XRCC3 gene cannot be used as a biomarker in clinical predictive studies in relation to risk of breast cancer.

Received: 08 Jun. 2018 Revised: 15 Jun. 2018 Accepted: 02 Jan. 2019 Available online: 10 Jan. 2019

Keywords: breast neoplasms, DNA damage, fokI, homologous recombination, polymerase chain reaction, single nucleotide polymorphism, XRCC3 gene.

* Corresponding author: Department of Radiotherapy, Ayatollah Khansari Hospital, Daneshgah St., Arak, Iran.
Tel: +98- 86- 33675001
E-mail: j.ansari@arakmu.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2022-06-29]