ارزیابی چندشکلی ژن کاسپاز ۳ و ۹ در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان مازندران: *گزارش کوتاه*

سعید عابدیان کناری[۱]
محمد شکرزاده[۲]
حامد حقی امین‌جان[۳*]
نفیسه نصری[۳]، احد علیزاده[۴]

۱- گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات دیابت.
۲- گروه سم‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی.
۳- گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی.
۱،۲و۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۴- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: ساری، خیابان خزر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران تلفن: ۳۲۴۷۸۰۵-۰۱۵۱
E-mail: hamedhaghi.a@gmail.com

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۲۷

زمینه و هدف: سرطان معده از سرطان‌های شایع دستگاه گوارش می‌باشد. کاسپازها نقش مهمی در گسترش و پیشرفت سرطان دارند، لذا در این مطالعه چندشکلی ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی شدند.

روش بررسی: در یک مطالعه مورد- شاهدی، ۱۰۰ فرد مبتلا به سرطان معده و ۱۰۰ فرد سالم از نظر پلی‌مورفیسم ناحیه G>T: 4647601rs ژن کاسپاز ۳ و ناحیه A>G1263- پروموتور ژن کاسپاز ۹ ارزیابی شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه بیانگر افزایش تعداد آلل جهش یافته G در گروه کنترل بود که منجر به کاهش بروز بیماری سرطان معده شده بود (P<۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که غربالگری پلی‌مورفیسم کاسپاز ۹ (A>G1263-) می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و نیز کمک به راه‌کارهای پیشگیری و درمانی در افراد مستعد باشد.

کلمات کلیدی: نواحی پروموتور، سرطان معده، ژنتیک، چندشکلی ژنی.

مقدمه

سرطان‌ها از دلایل مهم مرگ و میر در جهان محسوب می‌شوند. سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها است که به دلیل پیش‌آگهی ضعیف، در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود.[۱و۲] به‌دلیل ناکارآمدی درمان‌های متداول، اکثر بیماران حتی پس از جراحی، دارای بقا پنج ساله پایینی بوده و فوت می‌کنند.[۳و۴] مطالعات بیانگر آن است که سرطان معده توسط عوامل بسیاری، از جمله عفونت هلیکوباکتر پیلوری و عوارض ناشی از آن و چندشکلی‌های ژنتیکی ایجاد می‌شود،[۵] لذا تغییرات ژنتیکی و چندشکلی ناشی از آن می‌تواند اثر گسترده‌ای در حساسیت و گسترش سرطان معده داشته باشد.[۶و۷] آپوپتوز مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و به‌طور کامل حفاظت شده می‌باشد که نقش مهمی را در رشد و نمو اندام‌ها، هموستاز سلولی، انهدام سلول‌های فرسوده، سلول‌های از کنترل خارج شده و سرطانی ایفا می‌کند.[۸] مطالعات نشان می‌دهند که نقص در این مسیر می‌تواند باعث تجمع سلول‌های جهش یافته و در نهایت آغاز، پیشرفت و متاستاز سرطان و نیز مرگ بیمار شود.[۹] کاسپازها انواعی از پروتئازهای سیستیین-آسپارتات مربوط به مسیر آپوپتوز می‌باشند که نقش مهمی در تنظیم و اجرای آپوپتوزیس ایفا می‌کنند. کاسپازها بر اساس عملکرد شان به دو نوع آغازگر شامل کاسپازهای ۸، ۹ و ۱۰ و اجرایی شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ دسته‌بندی می‌شوند. مسیر بیرونی شامل کاسپازهای ۸ و ۱۰ و مسیر داخلی شامل کاسپاز ۹ می‌باشند که هر دو مسیر همگرا بوده و از کاسپازهای اجرایی استفاده می‌نمایند، که

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-09]

به طور آبشاری فعال شده و منجر به انهدام سلول‌ها می‌شود.[۱۰و۱۱] در بسیاری از مطالعات دیده شده است که چندشکلی در کاسپازها می‌تواند باعث تغییر عملکرد و در نتیجه ایجاد سرطان‌های مختلف شود. یکی از رایج‌ترین شکل تفاوت‌های ژنتیکی Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) می‌باشد، که ممکن است باعث تغییر عملکرد پروتیین‌ها شود و در نتیجه سبب تغییر فرایندهای داخلی شده و لذا در بروز سرطان نقش دارند.[۱۲] بررسی‌ها نشان داده‌اند، که چندشکلی در ژن کاسپازها با سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان‌های ریه، معده، سر و گردن مرتبط می‌باشد،[۴و۸و۱۲] لذا در این مطالعه ارتباط چندشکلی ۱۲۶۳A>G- مربوط به کاسپاز ۹ و چندشکلی (rs۴۶۴۷۶۰۱ :G>T) مربوط به کاسپاز ۳ به منظور پی بردن به ارتباط بین چندشکلی کاسپازها و سرطان معده جهت شناسایی فرایندهای مولکولی مرتبط با سرطان معده در جمعیت شمال ایران (مازندران) در بین بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در یک مطالعه مورد- شاهدی، ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان معده تایید شده بر اساس نتایج پاتولوژی مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) و کلینیک طوبی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، از شهریور ۱۳۹۰ تا تیر ۱۳۹۱ تحت‌نظر پزشک متخصص بعد از دریافت رضایت آگاهانه و قبل از شروع درمان و ۱۰۰ نفر به‌عنوان گروه شاهد سالم که هیچ‌گونه علایم و سابقه خانوادگی بیماری نداشتند و بر اساس سن، جنس و موقعیت جغرافیایی (مازندران) همسان‌سازی شده بودند نمونه‌برداری انجام شد و مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA: پس از گرفتن خون محیطی از بیماران و گروه شاهد، DNA ژنومی با کیت استخراج DNA (Roche, Germany) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با هضم آنزیمی Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) برای تعیین ژنوتیپ در این مطالعه انجام شد. از جفت پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) برای تکثیر ناحیه مورد نظر DNA ژنومی استفاده شد که قطعاتی به طول ۱۰۳ (مربوط به کاسپاز ۳) و ۱۳۱ (مربوط به کاسپاز ۹) جفت باز تکثیر گردید. برای شناسای ژنوتیپ، محصول PCR با دو واحد آنزیم محدودالاثر مربوطه (Hpych4V و BsmAI) (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) بر اساس دستورالعمل آنزیم به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ ºC انکوبه شدند (مشخصات آنزیم‌های محدودالاثر و قطعات حاصله از اثر آن بر محصول PCR در جدول ۱ ذکر شد).

برای مشاهده اثر آنزیم، محصول هضم یافته بر روی ژل آگارز ۳٪ برده و الکتروفورز به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰ در دمای آزمایشگاه انجام شد و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، آشکارسازی باندها با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مدل UV) (transilluminator, EBox-Vx2, France، صورت گرفت. تحلیل‌های آماری به‌کار رفته شامل روش‌های مبتنی بر جداول پیشایندی برای بررسی وجود ارتباط در متغیرهای کیفی و آزمون‌های پارامتری Student's t-test و ANOVA جهت مقایسه شاخص‌های مرکزی در دو یا چند گروه بود.

از رگرسیون لجستیک برای محاسبه اثر آلل‌ها در بروز بیماری، با کنترل اثر متغیرهای مداخله‌گر استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۵ استفاده شد و P<۰/۰۵ معنادار می‌باشد.

یافته‌ها

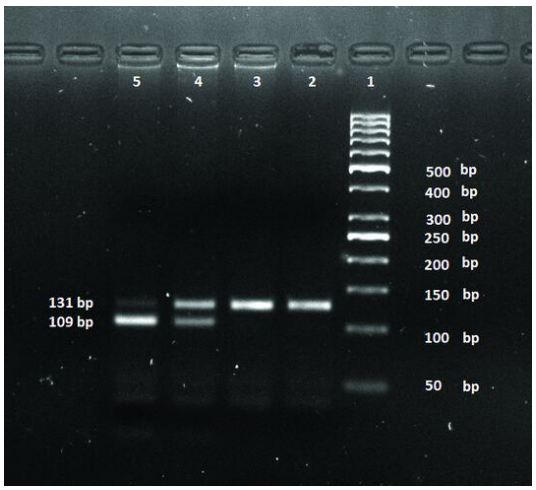
در این بررسی، چندشکلی کاسپاز ۹ A>G ۱۲۶۳- آلل G در گروه سالم نسبت به گروه بیمار بیش‌تر دیده شد.

در رگرسیون لجستیک ارتباط بین سه وضعیت ژنوتایپ و بیماری در شرایط کنترل اثر سن و جنس دیده شد. نسبت خطر افرادی که دارای ژنوتایپ AG بود به افرادی که AA بودند برابر ۰/۲۹ (P=۰/۰۰۱، CI٪۹۵:۰/۱۴-۰/۵۸) و هم‌چنین نسبت خطر افرادی با ژنوتایپ GG به AA مساوی ۰/۰۹۶ بود (P<۰/۰۰۰۱، ۰/۲۳- CI٪۹۵:۰/۰۴)، که نشان‌دهنده نقش محافظتی آلل G در بروز سرطان معده بوده است. لذا افرادی که دارای ژنوتیپ‌های AG و GG بودند احتمال خطر کم‌تری در بروز سرطان نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها داشتند. در حالی که توزیع آللی در ناحیه چندشکلی کاسپاز ۳ از لحاظ آماری معنادار نبود و تاثیری بر سرطان معده در جمعیت مورد مطالعه نداشت (شکل ۱، P=۰/۱۵).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-09]

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی، مشخصات آنزیم محدودالاثر، طول قطعه تکثیرشده و قطعات ایجاد شده در اثر آنزیم محدودالاثر

چندشکلی	پرایمرهای اختصاصی	Tm (C)	آنزیم محدودالاثر	طول قطعات تکثیر شده	طول قطعات ایجاد شده
G>T (rs۴۶۴۷۶۰۱)	F:GCGGTAGCGCCGTCCGTTGC R:ACCGAGCTCCGAGGGCGGGAG	۵۹	Hpych4V	۱۰۳	۸۲ ،۲۱
−۱۲۶۳ A>G (rs۴۶۴۵۹۷۸)	F: ACGATTATTTTTGAAATGTGA R:TCTTCCATTCCCTCTTCCGTC	۵۹	BsmAI	۱۳۱	۱۰۹ ،۲۲



شکل ۱: چندشکلی ایجاد شده A>G در پروموتور ژن کاسپاز ۹ با استفاده از آنزیم محدودالاثر را نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های A>G ۱۲۶۳−، ردیف‌های شماره ۳، ٤ و ٥ به‌ترتیب بیانگر ژنوتیپ‌های AA، AG و GG می‌باشند. نتایج در مقابل محصول PCR فاقد اثر آنزیم (ردیف ۲) و DNA Ladder (ردیف ۱) نشان داده شده‌اند.

بحث

در این مطالعه ارتباط بین چندشکلی ژن‌های کاسپاز ۳ (rs ۴۶۴۷۶۰۱: G>T) و کاسپاز ۹ (rs۴۶۴۵۹۷۸) A>G ۱۲۶۳− به‌عنوان مولکول‌های موثر در مرگ سلولی و انهدام سلول‌های سرطانی در سرطان معده به روش RFLP-PCR با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مطالعه‌ای که Park با استفاده از روش RFLP-PCR بر روی سرطان اولیه ریه انجام داد، مشخص شد که وجود چندشکلی در ناحیه A>G ۱۲۶۳− با بروز سرطان ریه مرتبط بود و به‌طور چشمگیری با کاهش خطر سرطان ریه ارتباط داشت. این مطالعه با استفاده از آزمون Luciferase ثابت کرد که چندشکلی ژنی در ناحیه A>G ۱۲۶۳− در ناحیه پروموتور می‌تواند باعث افزایش رونویسی ژن کاسپاز ۹ شود.[۱۳] در مطالعه دیگری که توسط Yoo بر روی سرطان ریه انجام شد هیچ‌گونه ارتباطی بین چندشکلی ژنی پروموتور کاسپاز ۹ در ناحیه A>G ۱۲۶۳− مشاهده نشد.[۱۴]

هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که چندشکلی ژنی در این ناحیه نقش محافظتی در بروز سرطان معده ایفا می‌کند. لذا احتمال دارد وجود آلل G با کاهش خطر سرطان معده به‌دلیل چندشکلی در ناحیه A>G ۱۲۶۳− در تمایل اتصال و پایداری آپوپتوزوم یا فعال‌سازی دیگر کاسپازها توسط کاسپاز ۹ مرتبط باشد.[۱۲] نتایج حاصله از مطالعه حاضر، بیانگر کاهش حضور آلل جهش یافته G در افراد بیمار نسبت به گروه شاهد بوده که بیانگر آن است که جهش آلل A به آلل G نقش محافظتی داشته و باعث کاهش چشمگیری در بروز سرطان معده می‌شود و با توجه به قرارگیری در ناحیه پروموتور، طبق مطالعات پیشین صورت گرفته این بحث پیش می‌آید که این جهش می‌تواند باعث افزایش رونویسی از ژن کاسپاز ۹ و افزایش این پروتیین شود. در مطالعه صورت گرفته بر روی سرطان ریه و مطالعه دیگری توسط Liamarkopoulos بر روی سرطان معده نیز حاکی از نقش محافظتی آلل G بوده که هم راستا با مطالعه حاضر است.[۱۳و۱۲] در این مطالعه از لحاظ آماری ارتباط معناداری بین چندشکلی کاسپاز ۳ (rs۴۶۴۷۶۰۱: G>T) و سرطان معده دیده نشد که با نتیجه مطالعه حاضر بر روی سرطان معده مغایرت دارد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که مطالعات بیش‌تری در نژادهای

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-09]

متفاوت برای روشن‌شدن ارتباط بین چندشکلی‌های ژن کاسپاز و سرطان معده نیاز است. طبق نتایج به‌دست آمده از این بررسی، چند شکلی در کاسپازها می‌تواند منجر به کاهش خطر ابتلا به سرطان معده شود و پیشنهاد می‌شود که تغییرات ژنتیکی در ژن کاسپازها به‌عنوان یکی از مولکول‌های مهم در سرطان معده مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۱ به شماره الف-۵ با عنوان بررسی پلی‌مورفیسم‌های کاسپاز ۳ و ۹ در آدنوکارسینوم معده می‌باشد که با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

References

1. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg* 2005;241(1):27-39.
2. Ghasemi M, Vahedi Larijani L, Abediankenari S. Investigation of Relationship between Hepatitis B Virus and Gastric Adenocarcinoma. *Iran Red Crescent Med J* 2012;14(7):453-4.
3. Abediankenari S, Janbabaei Mollae G, Ghasemi M, Yousefzadeh Y, Bahrami M, Alimoghaddam K. Vaccination of diffuse large B- cell lymphoma patients with antigen-primed dendritic cells. *Acta Med Iran* 2013;51(5):284-8.
4. Abediankenari S, Jeivad F. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms and gastric cancer in iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(5):3187-90.
5. Zhang J, Dou C, Song Y, Ji C, Gu S, Xie Y, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2008;53(6):479-89.
6. Jeivad F, Abediankenari S, Shokrzadeh M, Ghasemi M, Taghvaei T, Ansari Z, et al. Tyrosine kinase domain gene polymorphism of epidermal growth factor receptor in gastric cancer in northern Iran. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2012;69(10):619-23.
7. Liu J, Zhang Y, Qu J, Xu L, Hou K, Zhang J, et al. Beta-Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. *BMC Cancer* 2011;11(183):3-10.
8. Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 2004;9(6):691-704.
9. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22(8):299-306.
10. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
11. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003;22(53):8543-67.
12. Liamarkopoulos E, Gazouli M, Aravantinos G, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Rizos S, et al. Caspase 8 and caspase 9 gene polymorphisms and susceptibility to gastric cancer. *Gastric Cancer* 2011;14(4):317-21.
13. Park JY, Park JM, Jang JS, Choi JE, Kim KM, Cha SI, et al. Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Hum Mol Genet* 2006;15(12):1963-71.
14. Yoo SS, Choi JE, Lee WK, Choi YY, Kam S, Kim MJ, et al. Polymorphisms in the CASPASE genes and survival in patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5823-9.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-09]

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal

Tehran University Medical Journal, November 2013; Vol. 71, No. 8: 536-540 *Brief Report*

Evaluation of caspase3 and 9 gene polymorphisms in gastric cancer patients in Mazandaran province: *a brief report*

Saeid Abediankenari Ph.D.[1]
Mohammad Shokrzadeh Ph.D.[2]
Hamed Haghi Aminjan M.Sc.[3*]
Nafiseh Nasri M.Sc.[1]
Ahad Alizadeh M.Sc.[4]

1- Department of Immunology, Diabetes Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
2- Pharmacutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
3- Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Phamacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
4- Department of Epidemiology and Biostatistics- Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Mazandaran University of Medical Sciences, Khazar St., Sari, Iran.
Tel: +98- 151- 3247805
E-mail: hamedhaghi.a@gmail.com

Abstract

Received: April 19, 2013 Accepted: June 17, 2013

***Background*:** Gastric cancer is the most prevalent cancer with poor survival in gastrointestinal tract. Caspase 3 and 9 play an important role in the development and progression of cancer. Polymorphisms in the genes for these enzymes can affect gene activity and thus may influence susceptibility to gastric cancer. In this study, caspase 3 and 9 genes polymorphisms in patients with gastric cancer were examined.

***Methods*:** In a case - control study, 100 patients with gastric cancer and 100 healthy individuals were evaluated in the region rs4647601: G> T for caspase-3 and -1263 A> G gene promoter for caspase 9. DNA extraction was performed from whole blood according to manufacture protocol. RFLP-PCR method was carrying out for detection of caspase 3 and 9 genes genotype in two groups.

***Results*:** In this study, 143 men and 57 women were evaluated. All of them were selected from the same race and geographical area. The results indicated an increase of the mutant G allele in the control group, which leads to a decreasing in the incidence of gastric cancer (P<0.0001, OR: 0.096, (%0.95CL) =0.04-0.23).

Conclusion: It seems that screening of -1263 A> caspase 9 polymorphism could be a useful marker in personal sensitivity to gastric cancer and help to cancer treatment and prevention process. It is concluded that caspase gene variation may be a diagnostic factor in the gastric cancer.

Keywords: genetic, polymorphism, promoter regions, stomach neoplasm.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-09]