

بررسی ارتباط پلی مورفیسم G/C ۷۶۵- ژن سیکلواکسیژناز ۲ با سرطان ریه در جمعیت اصفهان

دکتر مجید متولی‌باشی*، دکتر زهره حجتی، مسعود عسگری

بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

چکیده

سابقه و هدف: دو نوع آنزیم سیکلواکسیژناز ۱ و ۲ در انسان وجود دارد که فعالیت آنها باعث تولید پروستاگلندین‌ها می‌گردد. پروستاگلندین‌ها در فعالیت‌های متعدد از جمله سیستم ایمنی، تنظیم قطر رگ‌ها، تقسیم سلولی و رگ‌زایی ایفای نقش می‌کنند. گزارشاتی مبنی بر افزایش بیان آنزیم در مراحل شروع، گسترش و فعالیت متاستازی سرطان‌هایی همچون حنجره، معده و روده بزرگ ارائه شده است. هدف از مطالعه حاضر نقش پلی مورفیسم 765G/C- در پروموتور ژن سیکلواکسیژناز ۲ با سرطان ریه و گروه شاهد آن‌ها در جمعیت اصفهان بود.

روش بررسی: تحقیق با روش مورد- شاهدهی انجام گرفت. تعیین ژنوتیپ سیکلواکسیژناز ۲ در ۱۲۰ بیمار سرطان ریه و ۱۱۰ کنترل با استفاده از تکنیک چند شکلی طولی قطعات DNA با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (RFLP-PCR) بر روی DNA ژنومیک استخراج شده از نمونه تام خون انجام شد. شمار ژنوتیپ‌های مشاهده شده با شمار مورد انتظار برای جمعیت در تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون کای دو مقایسه شد. اختلافات ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز نسبت شانس (OR) آزموده شد. یافته‌ها: ژنوتیپ GG پلی مورفیسم 765G/C- در بیماران (۶۲/۵٪) نسبت به گروه کنترل (۵۵/۴۵٪) افزایش معنی‌دار آماری از خود نشان نداد ($P < 0/06$). اما وقتی که بیماران به دو گروه متاستازی و غیر متاستازی تقسیم شدند، ارتباط ضعیفی بین ژنوتیپ GG پلی مورفیسم G/C با متاستاز مشاهده شد ($P < 0/04$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که پلی مورفیسم 765G/C- ژن سیکلواکسیژناز ۲ با شروع سرطان ریه ارتباطی ندارد، ولی ارتباط آماری ضعیفی بین پلی مورفیسم با فعالیت متاستازی مشاهده می‌گردد.

واژگان کلیدی: سیکلواکسیژناز ۲، RFLP-PCR، تعیین ژنوتیپ، سرطان ریه.

مقدمه

اگزون و به طول حدود ۲۲ کیلو جفت باز در ناحیه q32-q33.3 کروموزوم ۹ و ژن سیکلواکسیژناز ۲ با ۱۰ اگزون و به طول حدود ۸/۳ کیلو جفت باز بر روی کروموزوم ۱ در ناحیه q25.2-q25.3 قرار گرفته اند (۳-۶). مطالعات گویای تفاوت در نواحی تنظیمی این دو ژن است، به طوری که ژن سیکلواکسیژناز ۱ در سلول‌ها همیشه بیان شده اما ژن سیکلواکسیژناز ۲ القاء پذیر بوده و بسته به شرایط فیزیولوژیک بدن بیان آن متغیر می‌باشد. در منطقه پروموتوری ژن سیکلواکسیژناز ۲ توالی‌های محافظت شده‌ای وجود داشته که محل اتصال فاکتورهای رونویسی می‌باشند. این

سیکلواکسیژنازها (COX) از خانواده اکسیژنازها بوده، دارای فعالیت سیکلواکسیژنازی و پراکسیدازی هستند که در دو جایگاه متفاوت انجام می‌گیرد (۱، ۲). در انسان دو نوع آنزیم به نام سیکلواکسیژناز ۱ و ۲ وجود دارد، که ژن سیکلواکسیژناز ۱ با ۱۱

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک،

دکتر مجید متولی‌باشی (e-mail: mbashi@sci.ui.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۲۰

نئوپلازی و سرطان درگیری مشهودی داشته و به نظر می‌رسد که تأثیر خود را بیشتر از طریق مکانیسم التهاب و رگ‌زایی انجام می‌دهد. سیکلواکسیژنازها از آنزیم‌های اصلی فرایند التهاب می‌باشند و نقش خود را در شکل‌گیری، توسعه و فعالیت متاستازی سرطان بیشتر از طریق دو فرایند التهاب و رگ‌زایی انجام می‌دهند (۱۹، ۲۰، ۲۶-۲۳).

سرطان ریه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان به شمار می‌رود و بیش از ۸۰ درصد مبتلایان به این بیماری در فاصله پنج سال از تشخیص بیماری جان خود را از دست می‌دهند. بر اساس تقسیم‌بندی انجمن سرطان آمریکا (American Cancer Society)، دو نوع اصلی سرطان ریه عبارتند از: ۱- سرطان ریه با یاخته‌های کوچک (Small cell lung cancer; SCLC): روند رشد و تکثیر این نوع سرطان سریع بوده و در مدت زمان کوتاهی در اندام‌های دیگر پراکنده می‌شود. حدود ۲۰٪ سرطان‌های ریه از این نوع بوده و شایع‌ترین نوع سرطان ریه می‌باشد. ۲- سرطان ریه با یاخته‌های غیرکوچک (Non-Small cell lung cancer; NSCLC): این نوع سرطان ریه با توجه به نوع سلول موجود در بافت ریه که دچار تریاریختی و سرطانی شده است تعریف می‌شود. بنابراین اشکال مختلفی از این نوع سرطان وجود دارد (۲۷). علایم هشدار دهنده سرطان ریه شامل افزایش یا شدت سرفه در افراد سیگاری، سرفه همراه با خلط خونی، تنگی نفس در اثر فعالیت، خس خس حاد سینه، درد مبهم یا مشخص در قفسه سینه، خشن شدن صدا، کاهش وزن، بی‌اشتهایی، تورم در ناحیه گردن و صورت، ضعف و خستگی مفرط است. این سرطان در مراحل ابتدایی هیچ نشانه‌ای ندارد و بیماران اغلب زمانی به پزشک مراجعه می‌کنند که بیماری در مراحل پیشرفته قرار دارد و همین امر باعث افزایش آمار مرگ و میر در میان مبتلایان سرطان شده است (۲۸). از هنگام شروع تا مراحل پیشرفته سرطان ریه ویژگی‌های متفاوتی مثل اندازه تومور، ضخامت تومور، محل تومور، تغییر بافتی و وضعیت متاستازی در آن دیده می‌شود و بر این اساس به مراحل I، II، III و IV تقسیم می‌گردد. عموماً بیماران در زمانی که سرطان گسترش پیدا نموده و در حالت متاستازی قرار گرفته است، یعنی مرحله III و یا IV به پزشک مراجعه می‌کنند (۲۹).

هدف از مطالعه نمونه - شاهد و بازگشت به گذشته حاضر، ارزیابی اثر پلی مورفیسم G/C 765- در پروموتور ژن سیکلواکسیژناز ۲ بر گسترش و متاستاز سرطان ریه در جمعیت اصفهان در سال - های ۸۹-۱۳۸۷ بود.

توالی‌ها شامل ناحیه ۱/۶۹ کیلوبازی از محل شروع رونویسی و ۰/۸ کیلو بازی از اولین اینترون دارای جعبه TATA متعارف و انواع توالی فاکتورهای رونویسی مثل جعبه NF-IL6, CARG, sp1, cAMP Response Element, GAT-1, PEA-1, PEA و NF-KB می‌باشند (۱۰-۷). این توالی‌ها در روند تکاملی به شدت محافظت شده‌اند و تغییر نوکلئوتیدی در توالی‌های آنها باعث حذف جایگاه اتصال فاکتورها و در بعضی مواقع منجر به ایجاد جایگاه اتصال برای فاکتورهای رونویسی جدید نموده که از لحاظ فعال‌کنندگی یا مهارکنندگی واجد عملکرد متفاوت می‌باشند. پلی مورفیسم‌های شناخته شده در این نواحی با بیماری‌هایی مثل سرطان، آلزایمر و التهاب‌های معده‌ای و روده‌ای ارتباط نشان داده‌اند (۱۴-۱۱).

حدود ۱۲۴ پلی مورفیسم در درون ژن سیکلواکسیژناز ۲ (COX 2) شناسایی شده که در نواحی مختلف آن پراکنده شده است. بعضی از آنها در درون اینترون‌ها رخ داده و بنابراین عملکرد ناشناخته‌ای دارند، اما پلی مورفیسم‌های مهم در نواحی اگزونی و تنظیمی آن وجود دارد که با تغییراتی مثل حذف جایگاه اتصال فعال‌کننده‌ها، ایجاد جعبه‌های تنظیمی جهت اتصال فاکتورهای رونویسی، ایجاد و حذف توالی‌های محافظت‌کننده و تغییر در کدون اسید آمینه در بیان و پایداری mRNA و پروتئین تأثیر می‌گذارند (۲، ۱۵). پلی مورفیسم G/C 765- با تغییر نوکلئوتید به C در توالی CCCGCC که ۷۶۳ جفت باز بالا دست محل آغاز رونویسی بوده و محل اتصال فاکتور رونویسی SPI1 بوده، باعث کاهش رونویسی تا حد ۳۷٪ می‌شود. در حضور نوکلئوتید G فاکتور رونویسی به توالی متصل و باعث افزایش رونویسی از ژن می‌شود، اما موقعی که نوکلئوتید C در توالی وارد شود SPI1 نمی‌تواند به توالی متصل شود و بنابراین رونویسی از ژن کمتر صورت می‌گیرد (۱۳، ۱۸-۱۶). در مطالعات انجام گرفته، این پلی مورفیسم ارتباط‌های معنی‌داری با بیماری‌های مختلف مثل سرطان، آلزایمر، بیماری‌های سیستم ایمنی و بیماری‌های قلبی-عروقی مشاهده شده است (۲۲-۱۹). آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ به خاطر تولید مواد مهمی مثل پروستاگلندین H نقش‌های گوناگونی در بدن از قبیل مکانیسم التهاب، رگ‌زایی، باروری در فرد ماده، درد، تب، مهارسیستم ایمنی، عملکردهایی مثل انقباض ماهیچه‌های صاف لوله گوارش، گشاد کردن رگ‌های دیواره تولیدکننده موکوس معدی و آزاد سازی موکوس معدی در لوله گوارش، مهار انقباض رگ‌ها، گشاد کردن رگ‌های کلیوی و در نتیجه افزایش جریان خون در آنها، تنگ شدن مسیرهای هوایی ششها و افزایش قطر سیاهرگ‌های ششی دارند (۱، ۸). علاوه بر این تحقیقات گسترده نشان داده که این آنزیم در بیماری‌های

مواد و روشها

مطالعه حاضر بین سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۹ در دانشگاه اصفهان، با طراحی مورد-شاهدی انجام گرفت. تعداد ۱۲۰ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان ریه مورد تأیید متخصص پاتولوژیست از مرکز آموزشی-پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان امید اصفهان و ۱۱۰ نمونه خون مربوط به افراد سالم و منطبق با شرایط سن، جنس، استعمال دخانیات، روابط فامیلی در ازدواج، سابقه فامیلی از نظر سرطان با گروه بیماران از بانک خون تهیه گردید. مطالعه بر روی بیمارانی صورت گرفت که مبتلا به سرطان ریه از نوع سلول‌های غیرکوچک بوده و در وضعیت متاستازی قرار داشتند (اصولاً بیماران سرطان ریه به دلیل متاستاز مورد تشخیص و شناسایی قرار می‌گیرند). نمونه‌گیری افراد پس از کسب اجازه و اطلاع‌رسانی در حین تکمیل نمودن پرسشنامه در راستای یکسان‌سازی معیارهای مطالعه انجام پذیرفت. در مورد وضعیت سیگاری بودن اطلاعات کاملی در رابطه با استعمال سیگار در گذشته و حال، تعداد سیگارهای استعمال شده در روز و مدت زمان مصرف آن از افراد اخذ گردید و شاخص مصرف سیگار (S.I) برای تعریف افراد سیگاری، مصرف پنج سیگار در روز و به مدت زمان حداقل دو سال تعریف شد (۳۰، ۳۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده به داخل لوله‌های ونجکت حاوی ده درصد EDTA ریخته شدند. پس از مخلوط نمودن، در دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت مطالعات کوتاه مدت و دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای بررسی‌های طولانی مدت نگهداری گردید. استخراج DNA ژنومی با استفاده از تکنیک نمکی (Salting out) مطابق روش Miller (۳۲) با کمی تغییرات جهت افزایش کارایی و سرعت انجام گرفت. کیفیت و کمیت استخراج DNA ژنومی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و ژل آگاروز الکتروفورز ۰/۷ درصد مورد سنجش قرار گرفت. نمونه‌هایی که نسبت OD260/OD280 آنها بین ۱/۸-۲ بود، جهت بررسی و مطالعه انتخاب شدند. غلظت DNA ژنومی استخراج شده بین ۱۷۵-۲۰۰ n/gμl محاسبه شد. طراحی پرایمرها با توجه به موقعیت پلی مورفیسم G/C-765 در ناحیه پروموتری ژن سیکلواکسیژناز ۲ با استفاده از سایت‌های NCBI، European Promoter، (EPD) Databas و Ensembl، SGD طراحی و توسط شرکت یاساطب سفارش داده شد (جدول ۱).

اختصاصات	توالی پرایمر	طول درصد GC
پرایمر رفت	-GTCCATCAGAAGGCAGGAAACTTTA- 53'	۲۵ ۴۴
پرایمر برگشت	-TGTCTGGTCTGTACGTCTTTAGAGG- 53'	۲۵ ۴۸

محصول مورد انتظار PCR پرایمرها بر روی DNA ژنومی قطعه‌ای به طول ۴۰۶ جفت باز می‌باشد. آنزیم *Aci I* در ناحیه پلی مورفیسم G/C برای آلل G واجد محل شناسایی و برش می‌باشد، ولی قادر به شناسایی و برش آلل C نمی‌باشد. تکثیر منطقه ژنی مورد نظر و واجد پلی مورفیسم با استفاده از تکنیک PCR با ترکیبات ۱۵۰ng DNA ژنومی، ۲/۵μl بافر PCR10X، ۲/۵mM کلرید منیزیم، ۲۰۰μM Taq dNTP، پرایمر رفت ۲۰۰nM، پرایمر برگشت ۲۰۰nM، ۲۰۰nM پلیمراز ۰/۳μl و dH2O تا رسیدن به ۲۵μl در شرایط دمایی: دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد سپس ۳۰ سیکل: ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه هیبریداسیون در ۵۸ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه تکثیر در ۷۲ درجه سانتیگراد و در انتها ۱۲ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. هضم آنزیمی با استفاده از ۲/۵ واحد آنزیم *Aci I* بانضمام ۱μl بافر آنزیم و انکوباسیون در ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت. محصولات حاصل از هضم آنزیمی توسط الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ تفکیک و مورد بررسی قرار گرفتند.

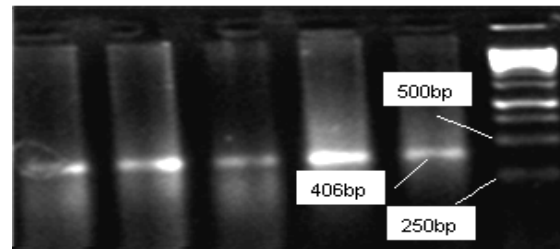
با استفاده از ژنوتیپ‌های به دست آمده از RFLP فراوانی آللی G و C در ناحیه پروموتری گروه‌های مورد مطالعه محاسبه گردید. در مرحله بعدی، اختلاف در توزیع ژنوتیپ سیکلواکسیژناز ۲ در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون کای‌دو توسط نرم افزار SPSS (Statistical Processor for Social Science) ویرایش ۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. نسبت شانسن Odd Ratio (OR) با فاصله اطمینان ۹۵٪ به عنوان شاخص ارتباط پلی مورفیسم ژنوتیپ GG در ناحیه پروموتری با خطر سرطان ریه و متاستاز در گروه‌های مورد مطالعه محاسبه گردید. در تمامی محاسبات سطح احتمال $P < 0.05$ ، از نظر آماری معنی‌دار فرض شد.

یافته‌ها

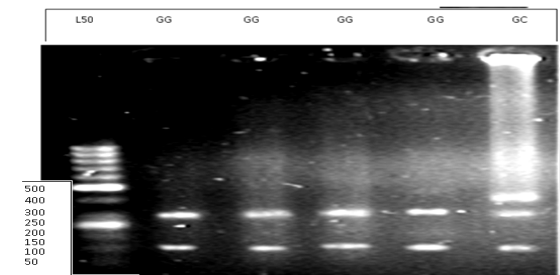
نتایج استخراج DNA ژنومی بیماران و کنترل بر روی ژل آگارز مطابق یکدیگر و مورد انتظار بود. ناحیه پلی مورفیسم توسط پرایمرهای طراحی شده و تکنیک PCR مورد تکثیر قرار گرفت و سپس جهت آنالیز نتایج، محصولات حاصل از PCR توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۱). کلیه نمونه‌ها توسط هضم آنزیمی و تکنیک RFLP-PCR تعیین ژنوتیپ شدند (شکل ۲). اطلاعات مربوط به جنس، سن و فاکتور سیگار گروه‌های کنترل و بیمار جمع آوری شد (جدول ۲).

کنترل ۴۸ سال با محدوده سنی ۶۲-۲۵ سال و افراد بیمار ۵۷ سال با محدوده سنی ۷۶-۲۵ سال بود. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد اختلاف میانگین سنی افراد کنترل و بیمار از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P=۰/۹۲$). مقایسه افراد سیگاری و غیر سیگاری در گروه‌های کنترل و بیمار از لحاظ آماری معنی‌دار بود، به طوری که دخانیات خطر ابتلا به بیماری را حدود دو برابر افزایش می‌داد ($P=۰/۰۰۱$ ، $OR=۲/۶۸$). تفکیک گروه‌ها به زنان و مردان، ارتباط فاکتور سیگار را در افزایش خطر ابتلا به سرطان در گروه مردان نشان داد ($OR=۳/۲۸$ ، $P=۰/۰۰۱$)، ولی فاکتور سیگار در زنان ارتباطی با بیماری را نشان نداد ($P=۰/۲۱$ ، جدول ۲).

D D N N N L1kb



شکل ۱- ژل آگارز الکتروفورز قطعات DNA های تکثیر شده از ناحیه پروموتری ژن سیکلواکسیژناز ۲. N: محصول PCR از DNA ژنومیک افراد سالم D: محصول PCR از نمونه DNA ژنومیک افراد بیمار L: مارکر DNA ۱ کیلو جفت بازی. الکتروفورز با بافر TBE روی ژل ۱ درصد با ولتاژ ۵۵ به مدت ۷۰ دقیقه انجام گرفت.



شکل ۲- ژل آگاروز الکتروفورز محصولات PCR- RFLP ناحیه پروموتری ژن سیکلواکسیژناز ۲. هضم آنزیمی Aci I بر روی قطعات ۴۰۶ جفت بازی محصولات PCR. فرد واجد ژنوتیپ GC حاوی سه باند در نواحی حدود ۴۰۶، ۲۹۸ و ۱۰۸ جفت بازی و فرد با ژنوتیپ GG واجد دو باند در نواحی ۱۰۸ و ۲۹۸ جفت بازی می باشند (الکتروفورز بر روی ژل با ۲/۵٪ آگارز و ولتاژ ۸۰ به مدت ۲ ساعت انجام گرفت).

جدول ۲- توزیع افراد مورد بررسی بر حسب ابتلا به سرطان ریه و به تفکیک خصوصیات

p-value	نسبت شانس	بیمار	کنترل
۰/۹۶۳		جنس	
		مرد	۶۲(۵۶/۴)*
		زن	۴۸(۴۳/۶)
		مرد	۶۸(۵۶/۲)
		زن	۵۲(۴۳/۸)
۰/۹۲		سن	
		میانگین سنی	۴۸
		محدوده سنی	۲۵-۶۲
		مرد	۵۷
		محدوده سنی	۲۵-۷۶
۰/۰۰۱	۲/۱۶	مصرف سیگار	
		سیگاری	۲۱(۱۹/۰۹)
		غیر سیگاری	۸۹(۸۰/۹۱)
		مرد سیگاری	۳۳(۴۱/۲۵)
		مرد غیر سیگاری	۴۷(۵۹/۷۵)
۰/۰۰۱	۳/۲۸	مصرف سیگار در مردان	
		مرد سیگاری	۱۵ (۲۴/۱۹)
		مرد غیر سیگاری	۴۷(۷۵/۸۱)
		مرد سیگاری	۲۵(۵۵/۵۶)
		مرد غیر سیگاری	۲۰(۵۴/۴۴)
۰/۲۱		مصرف سیگار در زنان	
		زن سیگاری	۶ (۱۲/۵)
		زن غیر سیگاری	۴۲(۸۷/۵)
		زن سیگاری	۸(۲۲/۸۶)
		زن غیر سیگاری	۲۷(۷۷/۱۴)

* تعداد (درصد)

پلی مورفیسم G/C ژن COX-2 در گروه‌های کنترل و بیمار مورد مطالعه قرار گرفت و فراوانی آلل‌های G و C به ترتیب در افراد کنترل ۴۵٪ و ۵۵٪ و در افراد بیمار ۶۲/۵٪ و ۳۷/۵٪

در افراد کنترل، ۵۶/۳۷٪ مرد و ۴۳/۶۳٪ زن و در افراد بیمار، ۵۶/۶۷٪ مرد و ۴۳/۳۳٪ زن بودند. میانگین سنی افراد

بیماری مرتبط نمی‌باشد ($P=0/13$). علاوه بر این در توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم نیز اختلاف قابل توجهی مشاهده نشد ($P=0/1$). مطابق با نتیجه مطالعه حاضر در سال ۲۰۰۴ دانیل و کامپا در بررسی پلی مورفیسم فوق با سرطان ریه ارتباطی مشاهده نکردند (۳۸). اما بعدکورنلیا و همکارانش گزارش نمودند که ژنوتیپ هموزیگوت CC در میان افرادی که داروهای ضد التهابی مصرف نمی‌کنند، باعث کاهش خطر سرطان به طور خیلی جزئی شده است ($OR=0/26$) (۳۹). همچنین آنها گزارش کردند که استفاده از آسپرین فقط خطر بیماری را در ژنوتیپ‌های GG کاهش می‌دهد. این داده پیشنهاد می‌کند که در بیمارانی که دارو استفاده نمی‌کنند ژنوتیپ CC یک فاکتور کاهنده خطر بوده، ولی در آنهایی که ژنوتیپ GG دارند داروهای مهار کننده باعث کاهش خطر می‌شود (۳۹). از طرفی همکاری پلی مورفیسم با عوامل جنس، سن و سیگار در ایجاد سرطان ریه مورد بررسی قرار گرفت، ولی از لحاظ آماری ارتباطی بین آنها دیده نشد. اما ارتباط سیگار با بیماری از لحاظ آماری بدون در نظر گرفتن پلی مورفیسم معنی‌دار بود و خطر بیش از دو برابری ایجاد می‌نمود ($OR = 2/68$ ، $P = 0/001$). عامل خطر سیگار در مردان بسیار بالا و به میزان ۳/۲۸ بود، ولی در زنان از لحاظ آماری ارتباطی مشاهده نشد. مطالعات نشان داده که تنباکو از اصول بنیادین ابتلا به سرطان ریه بوده و در حقیقت حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد کل بیماری‌های ریوی به دلیل مصرف تنباکو بروز می‌کنند (۴۰). از طرفی تأثیر سیگار در ایجاد یا توسعه سرطان ریه به نسبت سایر سرطان‌ها بیشتر می‌باشد (۴۱). بررسی‌ها نشان داده که مرگ و میر ناشی از سرطان ریه به دلیل افزایش تعداد افراد سیگاری به میزان قابل توجهی در جمعیت مردان نسبت به جمعیت زنان بیشتر می‌باشد، به عبارتی خطر سیگار جهت شکل‌گیری سرطان ریه در مردان بیشتر از زنان می‌باشد. مردهایی که در طول روز یک پاکت سیگار می‌کشند، ۲۲ مرتبه بیشتر از افراد غیرسیگاری در معرض ابتلا به این سرطان قراردارند. در حالی که زنانی که همین مقدار سیگار مصرف می‌کنند، خطر ابتلا را ۱۲ مرتبه افزایش می‌دهند (۴۲). مطالعات ما در ارتباط با سیگار بدون در نظر گرفتن نقش پلی‌مورفیسم مطابق نتایج سایرین بود. عدم ارتباط سیگار با سرطان ریه در جمعیت زنان به دلیل پایین بودن جمعیت زنان سیگاری می‌باشد که می‌تواند بدلیل مخفی نمودن استعمال دخانیات در جمعیت زنان ایرانی باشد.

محاسبه گردید. با وجود اینکه فراوانی آلل G در پلی مورفیسم G/C در جمعیت بیمار نسبت به جمعیت کنترل افزایش ظاهری نشان داد، ولی این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p=0/13$ ، جدول ۳). مقایسه و محاسبه فراوانی ژنوتیپی ژن COX 2 در جمعیت بیمار و کنترل از لحاظ آماری ارتباطی با سرطان نشان نداند ($p=0/096$ ، جدول ۳).

جدول ۳- آنالیز فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم G/C ناحیه پروموتوری ژن COX-2 و ارتباط آن با شروع سرطان ریه

آلل / ژنوتیپ	گروه کنترل		گروه بیمار		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
G C	۱۲۲	۵۵/۴۵	۱۵۰	۶۲/۵۰	۰/۱۳
	۹۸	۴۴/۵۴	۹۰	۳۷/۵۰	
GG GC CC	۳۸	۵/۳۴	۴۸	۴۰	۰/۰۹۶
	۴۶	۸/۴۱	۵۴	۴۵	
	۲۶	۲۳/۷	۱۸	۱۵	

* مقایسه به صورت GG + GC/GG انجام گرفته است.

از آنجایی که متاسفانه بیماران مبتلا به سرطان ریه عمدتاً در مرحله متاستاز (IV) مورد شناسایی قرار می‌گیرند، امکان بررسی تأثیر و ارتباط آماری پلی مورفیسم با فعالیت متاستازی نمی‌باشد. بررسی انجام گرفته جهت تعیین نقش پلی مورفیسم با استعمال دخانیات، جنس و سن ارتباط آماری معنی‌داری را نشان نداد (اطلاعات نشان داده نشده است).

بحث

مطالعات انجام گرفته در طی سال‌های گذشته دلالت دارند که آنزیم‌های سیکلواکسیژناز در رشد و گسترش سرطان‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی مثل التهاب، تهاجم بافتی، رگ-زایی، تحریک تقسیم سلولی و مهار آپوپتوز و سیستم ایمنی دخالت دارند (۳۳-۳۶). بنابراین در مطالعه حاضر سعی شده است با بررسی پلی مورفیسم G/C-765 در ژن COX2، نقش آنزیم در شروع، متاستاز و تأثیر عوامل محیطی از جمله سیگار در سرطان ریه مورد بررسی قرار گیرد. در سال ۲۰۰۲، پاپیلی و همکارانش نشان دادند که تغییر نوکلئوئید G به C در ناحیه پروموتوری ژن باعث خراب شدن جایگاه اتصال sp_1 و در نتیجه کاهش میزان بیان COX-2 تا ۳۷٪ می‌گردد (۳۷). در مطالعه حاضر، فراوانی آلل G در بیماران مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با گروه کنترل افزایش چندانی نشان نداد (۶۲/۵٪ در مقابل ۵۵/۴۵٪)، بنابراین حضور آللی از لحاظ آماری با

تشکر و قدردانی

انتقال خون اصفهان، بیمارستان سیدالشهدا برای جمع‌آوری نمونه‌ها و فراهم کردن اطلاعات پزشکی صمیمانه تشکر می‌شود.

از معاونت‌های پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر کمک‌های مالی و تجهیزات و از همکاری‌های سازمان

REFERENCES

1. Daniel L, Simmons RM, Botting R, Timothy H. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 387-437.
2. Marshall PJ, Kulmacz RJ. Prostaglandin H synthase: distinct binding sites for cyclooxygenase and peroxidase substrates. *Arch Biochem Biophys* 1988; 266: 162-70.
3. Smith WL, Lands WE. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 1972; 11: 3276-85.
4. Hamberg M, Sanz A, Castresana C. Oxidation of fatty acids in higher plants. *J Biol Chem* 1999; 274: 24503-13.
5. Kraemer SA., Meade EA, De Witt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5 flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992; 293: 391-400.
6. Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1209: 130-39.
7. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 3824-28.
8. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 1976; 251: 2629-36.
9. Derek B, Jean S. Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in pre ovulatory follicles. *Endocrinology* 1998; 139: 1662-70.
10. Xie W, Merrill JR, Bradshaw WS, Simmons DL. Structural determination and promoter analysis of the chicken mitogen inducible prostaglandin G/H synthase gene and genetic mapping of the murine homolog. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 247-52.
11. Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1209: 130-39.
12. Ogino N, Ohki S, Yamamoto S, Hayaishi O. Prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes: inactivation and activation by heme and other metalloporphyrins. *J Biol Chem* 1978; 253: 5061-68.
13. Inoue H, Nanayama T, Hara S, Yokoyama C, Tanabe T. The cyclic AMP response element plays an essential role in the expression of the human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene in differentiated U937 monocytic cells. *FEBS Lett* 1994; 350: 51-54.
14. Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Translational regulation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 gene by lipopoly saccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 24965-71.
15. Huang MH, Chao HK, Chien HL, Chen W, Ka WL, Jang ML, et al. Polymorphism in COX-2 modifies the inverse association between *Helicobacter pylori* seropositivity and esophageal squamous cell carcinoma risk in Taiwan: a case control study. *BMC Gastroenterology* 2009; 9: 37.
16. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature (Lond)* 1971; 231: 232-35.
17. Albright son CR, Baenziger NL, Needleman PA. Mononuclear cell factor is a potent agonist of prostaglandin biosynthesis in cultured human fibroblasts and smooth muscle and endothelial cells. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1985; 15: 213-16.
18. Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, et al. Characterization of the human gene (PTGS2) Encoding prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Eur J Biochem* 1994; 221: 889-97.
19. Christine L, Aaron M, Jim B, Joan CH, Chaka R, Michelle FB. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struc Molec Biol* 1996; 3: 927-33.

20. Chen YN, Bienkowski MJ, Marnett LJ. Controlled tropic digestion of prostaglandin H synthase. Characterization of protein fragments and enhanced rate of proteolysis of oxidatively inactivated enzyme. *J Biol Chem* 1987; 262: 16892–99.
21. Goodman JE, Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. Nitric oxide and p53 in Cancer prone chronic inflammation and x-radical overload disease. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44: 3–9.
22. Cohen AJ, Ross AH, Ostro B, Pandey KD, Krzyzanowski M, Kunzli N, et al. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *J Toxicol Environ Health* 2005; 68:1301-307.
23. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3073–76.
24. Roth GJ, Siok CJ, Ozols J. Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular glands. *J Biol Chem* 1980; 255: 1301–304.
25. Kalgutkar AS, Zhao Z. Discovery and design of selective cyclo-oxygenase-2 Inhibitors as non ulcerogenic, anti-inflammatory drugs with potential utility as Anti-cancer agents. *Cur Drug Targets* 2001; 2 :79–106.
26. Picot D, Loll P, Garavito M. The X-ray crystal structure of the membrane Protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994; 367: 243–49.
27. Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG, Editors. *Molecular biology of cancer*. 2nd Ed. Philadelphia: Bios Scientific Publishers; 2005. P.101-104.
28. Alkattan K, Sepsas E, Fountain SW, Townsend ER. Disease recurrence after resection for stage I lung cancer. *Cancer Res* 1997; 12: 380-84.
29. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 15: 4-9.
30. Zhang J, Xia J, Fang S, Li Y, Wang R, Guo W, et al. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 12: 2519–24.
31. Fang S, Jin X, Wang R, Li Y, Guo W, Wang N, et al. Polymorphism in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small lung carcinoma in north china. *Carcinogenesis* 2005; 6: 481–86.
32. Miller SA, Dybes DD, Polesky HF. A single salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 16: 1215-25.
33. Achyut BR, Uday CG, Nikhil M, Balraj M. Role of cyclooxygenase-2 functional gene polymorphisms in *Helicobacter pylori* induced gastritis and gastrectomy. *Mol Cell Biochem* 2009; 321: 103–109.
34. Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Can Epid Bioma Prev*, et al. Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Can Epid Bioma Prev* 1998; 7: 97–102.
35. Oyama K, Fujimura T, Ninomiya I, Miyashita T, Kinami S, Fushida S, et al. A COX-2 inhibitor prevents the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence in rats. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 565-70.
36. Wang W, Bergh A, Damber JE. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3250-56.
37. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, Canulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1631-36.
38. Daniele C, Shanbeh Z, Valentina M, Vidar S, Aage H, Federico C. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase-2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 229–35.
39. Cornelia MU, John W, John H.Y, Justin S, Rachel S, John D, et al. PTGS2 (COX-2) -765G/C promoter variant reduces risk of colorectal adenoma among nonusers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 616-19.
40. Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Darby SC, et al. Multi center case control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1440-50.
41. Jahn I, Ahrens W, Bruske-Hohlfeld I, Kreuzer M, Mohner M, Pohlabein H, et al. Occupational risk factors for lung cancer in women: results of a case-control study in Germany. *Am J Ind Med* 1999; 36: 90-100.

42. Kreuzer M, Krauss M, Kreienbrock L, Jockel KH, Wichmann HE. Environmental tobacco smoke and lung cancer : a case-control study in Germany. Am J Epidemiol 2000; 151: 241-50.
43. Brennan P, Butler J, Agudo A, Benhamou S, Darby S, Fortes C, et al. Joint effect of diet and environmental tobacco smoke on risk of lung cancer among non smokers. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 426-27.