پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۷، صفحات ۸۹ تا ۹۳

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی نقش آنزیم ژلاتیناز- B در گسترش سلول‌های توموری و فعالیت متاستازی سرطان سینه

مجید متولی باشی، زهره حجتی، مرتضی صادقی ،

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

چکیده

سابقه و هدف: *افزایش بیان بیش از حد ژلاتیناز B می‌تواند نقش بسیار مهمی در مرحله متاستاز چندین سرطان ازجمله کولون، مثانه و دستگاه گوارش داشته باشد. وجود پلی‌مرفیسم تک نوکلئوتیدی جابجایی باز C→T در ناحیه ۱۵۶۲- پروموتوری ژن آنزیم ژلاتیناز B باعث افزایش بیان این ژن در سطح رونویسی از طریق کاهش اتصال پروتئین‌های مهار کننده رونویسی در آلل واجد T می‌گردد. هدف تحقیق حاضر، بررسی نقش این پلی‌مرفیسم در پیشرفت و متاستاز سرطان سینه در جمعیت زنان شهر اصفهان می‌باشد.*

روش بررسی: *این پلی‌مرفیسم در ۹۰ بیمار دارای سرطان سینه با فعالیت متاستازی و ۱۰۰ نمونه شاهد از طریق واکنش زنجیره‌ای PCR و هضم آنزیم محدود کننده مورد بررسی قرار گرفت. میانگین مراقبت‌های پزشکی ۲سال بود. بیماران هر ۵-۳ ماه مورد بررسی‌های پزشکی قرار گرفته و هر گونه تغییر وضعیت در محاسبات نهایی مورد استفاده قرار گرفت.*

یافته‌ها: *ارتباط زیادی بین وجود آلل T و گسترش تومور وفعالیت متاستازی سرطان سینه وجود داشت (میزان فاکتور ابتلا: ۵/۸۵، فاصله اطمینان ۹۵٪: ۱۲/۹۳-۲/۶۴؛ P<۰/۰۰۰۱).*

نتیجه‌گیری: *بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، نقش اصلی این پلی‌مورفیسم در متاستاز سلول‌های سرطانی و تهاجم آنها به بافت‌های مجاور است.*

واژگان کلیدی: *پلی مرفیسم هضم آنزیم محدود کننده (RFLP)، سرطان سینه، ژلاتیناز B، متاستاز.*

مقدمه

خانواده بزرگ ماتریکس متالوپروتئینازها، آنزیم‌هایی هستند که در تجزیه اتصالات بین غشاء پایه سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی ایفای نقش می‌کنند (۱). تقسیم‌بندی آنها بر اساس تشابهات ساختاری ونوع سوبسترای تخصصی هر یک صورت می‌گیرد (۲). این آنزیم‌ها در حالت عادی در سلول‌های طبیعی بیان می‌شوند ودرفرایندهائی مانند تغییر فرم بافت‌ها، ترمیم زخم‌ها و رگ‌زائی یا آنژیوژنز شرکت می‌کنند (۳). تفاوت در افزایش بیان انواع مختلف این آنزیم‌ها در رده‌های سلولی سرطانی در مراحل مختلف روند سرطانی شدن گویای تاثیر آنزیم‌های مذکور در مراحل مختلف تومرزایی می‌باشد. ولی عموما نکته مشترک در بین آنها این است که سلول‌های بدخیم درمقایسه با سلول‌های خوش‌خیم آنزیم بیشتری ترشح می‌کنند (۴). ژلاتیناز B یا کلاژناز نوع IV یکی از مهم‌ترین اعضاء این خانواده می‌باشد (MMP-9) که بر روی اتصالات بین سلولی شامل انواع مختلف کلاژن‌ها، الاستین و پروتئوگلایسین‌ها اثر می‌کند (۵، ۴). این پروتئین به دلیل دارا بودن فعالیت کلاژنازی در حالت افزایش بیان باعث از هم گسیختگی غشاء پایه می‌گردد و به همین دلیل نقشی اساسی در متاستاز سرطان‌ها ایفا می‌کند (۶). میزان بیان این آنزیم و

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک
(email: mbashi@sci.ui.ac.ir.)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۰/۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۳/۱

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

در نتیجه مقدار مشارکت آن درهضم اتصالات بین سلولی و پیشروی سرطان میتواند تحت تاثیر توالی‌های تنظیمی در پروموتور ژن باشد. تنظیم بیان این ژن درسطح رونویسی در دو منطقه با جذب عوامل مختلف الگوبرداری صورت می‌گیرد. در منطقه بالادست (UP Stream) از طریق سایت‌های EtS، NFKB و SP1 و در منطقه پائین دست (Down Stream) از طریق سایت AP-1 انجام می‌گیرد (۸، ۷). وجود یک پلی‌مرفیسم تک نوکلئوتیدی از نوع جابجایی باز C→T درناحیه ۱۵۶۲- می‌تواند یک عامل تنظیمی مهم باشد. مطالعات حاکی از آن است که این ناحیه به عنوان سایتی برای اتصال پروتئین‌های مهار کننده رونویسی عمل می‌کند، بطوری که جابه‌جائی C→T در جایگاه پلی‌مرفیسم، مانع برهم‌کنش این پروتئین‌ها با DNA واجد آلل T می‌گردد. در نتیجه باعث افزایش بیان ژن در آلل‌های واجد T می‌شود که می‌تواند منجر به متاستاز سلول‌های سرطانی و بدخیمی آنها گردد (۱۰، ۹). هدف این مطالعه مشخص نمودن رابطه جابجائی تک نوکلئوتیدی ذکر شده با شروع و تکمیل تومور و هم‌چنین فعالیت متاستازی سرطان سینه می‌باشد.

مواد و روشها

۱۹۰ نمونه شامل ۹۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه با فعالیت متاستازی و ۱۰۰ شاهد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. افراد سالم به صورت تصادفی از افراد مراجعه کننده به بیمارستان امید و سازمان انتقال خون اصفهان جهت انجام تست سلامتی انتخاب شدند. موارد سرطان سینه شامل ۹۰ بیمار زن دارای متاستاز از بخش سرطان بیمارستان امید اصفهان بودند. ۵ میلی‌لیتر خون وریدی به لوله‌های درب‌دار حاوی EDTA انتقال و بلافاصله مخلوط گردید. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت مطالعات کوتاه مدت و ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت مطالعات طولانی مدت نگهداری شدند. میانگین طول درمان بیماران۲ سال بود. بیماران هر سه ماه در طی ۱۶ ماه دوره اولیه درمان و سپس هر ۵ ماه مورد بررسی بالینی قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی و آنالیز توسط تکثیر DNA و هضم آنزیم محدود کننده (PCR-RFLP) صورت گرفت. برای استخراج DNA ژنومی از روش نمکی میلر (بافرهای کافپی A و B) با مقدار جزئی دست‌کاری استفاده شد (۱۱). جهت آنالیز پلی مرفیسم C/T 1562– و مشخص شدن ژنوتیپ افراد، یک ناحیه از پروموتور ژن ژلاتیناز B به طول ۴۶۰ جفت باز توسط پرایمر رفت با توالی

5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3'

و پرایمر برگشت با توالی

5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC –3' تکثیر شد. تکنیک PCR (واکنش زنجیره پلی‌مراز) در حجم کل ۲۵ میکرولیتر با غلظت‌های ذیل انجام گرفت : DNA ژنومی ۲۰-۱۰ نانوگرم، ۰/۲ میکرومول dNTP، ۲ میلی‌مول MgCl2، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl، ۵۰ میلی‌مول KCl ، ۰/۳ میکرومول از هر پرایمر و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز (ساخت شرکت سیناژن). واکنش تکثیر به صورت زیرانجام گرفت: ۴ دقیقه در ۹۵ درجه به همراه ۳۰ سیکل هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه برای دناچوراسیون، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه برای اتصال پرایمرها،۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه برای فعالیت تکثیری آنزیم، در انتها ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه. قطعه ۴۶۰ جفت بازی حاصل از واکنش PCR توسط آنزیم محدود کننده *Sph* I که در جایگاه پلی‌مرفیسم آلل‌های حاوی T دارای محل تشخیص می‌باشد مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. جهت هضم آنزیمی، محصول PCR به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با غلظت مناسب از آنزیم (مطابق با پروتکل همراه آنزیم) انکوبه گردید. این آنزیم در جایگاه پلی‌مرفیسم مورد نظر فقط قادر به برش آلل های واجد T می‌باشد (حاصل مورد انتظار برش دو قطعه ۲۵۸ و ۲۰۲ جفت بازی است). آلل های واجد C مورد شناسایی آنزیم قرار نگرفته و بنابراین مورد برش قرار نمی‌گیرند (قطعه ۴۶۰ جفت بازی). محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند و بدین صورت قطعات حاصل از برش از یکدیگر تفکیک شدند (شکل۱).

یافته‌ها

در شکل ۱ آنالیز ژنوتیپ ۹ بیمار که به طور تصادفی انتخاب شده‌اند نشان داده شده است. بیماران ۱، ۲، ۶، ۷، ۸ و ۹ بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ایجاد تک باند ۴۶۰ جفت بازی کردند و بنابراین دارای ژنوتیپ CC می باشند (آنزیم مورد نظر قادر به برش هیچ یک از دو آلل آنها نبود). بیمار ۵ دو باند ۲۵۸ و ۲۰۲ جفت بازی را ایجاد کرد و بنابراین دارای ژنوتیپ TT می‌باشد. بیماران ۳ و ۴ هر سه باند را نشان دادند و بنابراین دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT هستند. توزیع فراوانی ژنوتیپ پلی مرفیسم جابجایی تک باز C/T 1562– در بیماران

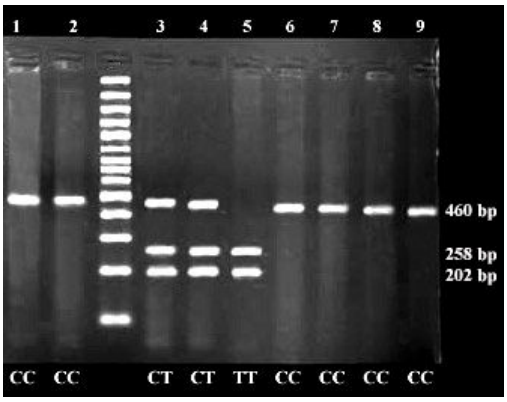
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

سرطان سینه و گروه شاهد در جدول ۱ آورده شده است. توزیع ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی واینبرگ تبعیت می‌کند. ژنوتیپ‌های CT, TT و CC ژن ژلاتیناز B به ترتیب در ۹۱، ۹ و صفر درصد افراد گروه شاهد و ۶۳/۳۳، ۳۱/۱۱ و ۵/۵۶ درصد بیماران سرطانی دارای متاستاز مشاهده شد. در مقایسه با ژنوتیپ نوع طبیعی CC ارتباط معنی‌دار مثبتی بین وجود آلل T و متاستاز سرطان سینه مشاهده شد (نسبت شانس: ۵/۸۵، فاصله اطمینان ۹۵٪: ۱۲/۹۳-۲/۶۴؛ P<۰/۰۰۰۱) (جدول ۱).

جدول ۱- توزیع ژنوتیپ های ژن ژلاتیناز B در دو گروه شاهد و بیماران دارای متاستاز.

	گروه متاستاز (n=۱۰۰)	گروه شاهد (n=۱۰۰)	نسبت شانس (فاصله اطمینان ۹۵٪)	P-value
CC	۵۷(۶۳/۳۳)*	۹۱(۹۱)	۰/۱۷۱ (۰/۰۸-۰/۳۸)	<۰/۰۰۰۱
CT	۲۸(۳۱/۱۱)	۹(۹)	۴/۹۶ (۲/۲۲-۱۱/۱۱)	<۰/۰۰۰۱
TT	۵(۵/۵۶)	۰	—	۰/۰۰۶
TT+CT	۳۳(۳۶/۶)	۹(۹)	۵/۸۵ (۲/۶۴-۱۲/۹۳)	<۰/۰۰۰۱

* اعداد داخل پرانتز در دو گروه متاستاز و شاهد معرف درصد هستند.



شکل۱- قطعات حاصل از آنالیز PCR-RFLP در ۹ بیمار واجد سرطان سینه.

منطقه مورد نظر از پروموتور ژن ژلاتیناز B با طول ۴۶۰ جفت باز توسط PCR تکثیر و توسط آنزیم محدود کننده *Sph*1 برش داده شد. این آنزیم فقط قادر به برش آلل های T می باشد (قطعات ۲۵۸ و ۲۰۲ جفت بازی) ولی آلل های C را نمی تواند برش دهد (قطعه ۴۶۰ جفت بازی). در بالای شکل شماره افراد و در پایین آن ژنوتیپ آنها مشخص شده است.

بحث

شناسایی افراد مبتلا به سرطان سینه در مراحل اولیه بیماری و نیز افراد مستعد به این بیماری در زمانی که آزمایشات بالینی قادر به شناسایی نیست، در نحوه و عملکرد درمان اهمیت قابل توجهی دارد. لذا در مطالعه حاضر به بررسی ارتباط پلی مرفیسم 1562C/T- در پروموتور ژن ژلاتیناز B با پیشرفت و گسترش متاستاز سرطان سینه در جمعیت اصفهان پرداخته شد. سرطان یک فرایند چند مرحله‌ای و بسیار پیچیده است و برای تبدیل بافت عادی به بافت سرطانی نیاز به ایجاد تغییراتی در فضای بین سلولی و اتصالات آن می‌باشد (۱۲). این مطالعه نشان داد که فراوانی آلل T و C در افراد سالم و سرطانی دارای اختلاف معنی‌داری است. ارتباط این پلی‌مرفیسم با سرطان می‌تواند ناشی از تغییر و افزایش بیان ژن ژلاتیناز B در افراد واجد آلل T باشد (۱۰).

پلی‌مرفیسم‌های موجود در پروموتور ژن می‌توانند بر روی تنظیم بیان ژن تاثیر بگذارند و از این طریق پتانسیل ابتلای افراد به بیماری‌ها را تغییر دهند. این تاثیر می‌تواند در نتیجه عملکرد یک پلی‌مرفیسم تنها یا در اثر عملکرد چندین پلی‌مرفیسم به همراه یکدیگر باشد (۱۲). بسیاری از مشاهدات حاکی است که میزان رگ‌زایی یک عامل کلیدی در رشد و گسترش متاستاز تومورهای جامد است (۱۳). از عملکردهای مهم آنزیم ژلاتیناز B رگ‌زایی و علاوه بر آن هضم اتصالات خارج سلولی شامل کلاژن‌ها و الاستین می‌باشد (۱۴). ارتباط پلی‌مرفیسم مذکور با گسترش سرطان سینه مشابه یا فته‌های مطالعات قبلی در مورد سایر سرطان‌ها نظیر سرطان معده، ملانوما، لمفوما، سرطان سینه، سرطان‌های بافت مغز، سرطان پروستات و سرطان کلیه می‌باشد(۲۰-۱۵). با توجه به نقش اساسی ژلاتیناز B در تومورزایی و گسترش و متاستاز تومورها، مطالعه حاضر نشان داد که پلی‌مرفیسم عملکردی 1562C/T- در پروموتور ژن ژلاتیناز B می‌تواند بطور چشم‌گیری با پیشرفت متاستاز در سرطان سینه و تا حدودی در شروع سرطان تاثیرگذار باشد. اطلاعات حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که پلی‌مرفیسم مذکور زمینه پیشرفت و متاستاز سرطان سینه را بیش از پنج برابر در فرد حامل (آلل T) نسبت به سایر افراد افزایش می‌دهد. ژنوتیپ CT و وجود آلل T در این قسمت از پروموتور ژن ژلاتیناز B به طور قابل توجهی (نسبت شانس ۴/۹۶ برای CT و نسبت شانس ۵/۸۵ برای آلل T) خطر پیشرفت سرطان سینه را در فرد افزایش می‌دهد. یافته‌های جدید بیان می‌دارد که جابه‌جایی آلل C با T در جایگاه 1562- پروموتور ژن ژلاتیناز B مانع اتصال پروتئین‌های مهار کننده رونویسی به این ناحیه از پروموتور می‌گردد (۸، ۹). از این‌رو پیشنهاد می‌گردد، بیان بالای این ژن در آلل T با هضم اتصالات بین سلولی و در نتیجه مستعد کردن سلول سرطانی برای متاستاز در ارتباط می‌باشد. مطالعه حاضر اولین

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

بررسی بر روی ژن ژلاتیناز B و ارتباط آن با سرطان سینه در ایران است. این تحقیق، ژنوتیپ‌های CT و TT را جزء ژنوتیپ‌های مستعد کننده ابتلا به سرطان سینه و خصوصاً پیشرفت و متاستاز آن معرفی می‌کند، بطوری که این افراد ۵/۸۵ برابر بیشتر از افراد دارای ژنوتیپ CC در معرض خطر می‌باشند. به دلیل محدودیت در نمونه‌های مورد مطالعه که همگی از شهر اصفهان جمع آوری شده بودند، ضرورت انجام تحقیق وسیع‌تری از کل جامعه ایران برای اثبات این نظریه لازم بنظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با همکاری و مساعدت بخش سرطان بیمارستان امید اصفهان، سازمان انتقال خون اصفهان و همچنین حمایت مالی تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان انجام گرفت که بدین وسیله از آنها سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Forget MA, Desrosiers RR, Beliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases; implications for tumor growth and metastasis. Can J Physiol Pharmacol 1999;77:465-80.
2. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinase in metastasis. J Natl Cancer Inst 1997;89:1260-70.
3. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 2001;17:463–516.
4. Przybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kulig A, Rykala J, et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2006;95:65-72.
5. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2002;2: 61–174.
6. Ozalp HM, Tanir OT, Yalcin S. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) expression in epithelial ovarian tumors. Eur J Gynaecol Oncol 2003;24:417–20.
7. Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks MJ, Plinkert PK, Koitschev A, et al. The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. Exp Cell Res 2001;271:344-55.
8. Chandrasekar B, Mummidi S, Mahimainathan LN. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-B- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. J Biol Chem 2006;281:15099-109.
9. Ogawa K, Chen H, Kuang C. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-β is mediated by a nuclear factor-κB site. Biochem J 2004;381:413–22.
10. Zhang B, Ye S, Hermann SM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. Circulation 1999;99:1788–94.
11. Miller SA, Dybes DD. Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.
12. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. Mol Med Today 2000;6:324–29.
13. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol 1992;3:65–71.
14. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa V, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 1980;284:67–68.
15. Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. Gut 1998;43:791–97.
16. Hujanen ES, Vaisanen A, Zheng A, Tryggvason K, Turpeenniemi-Hujanen T. Modulation of M(r) 72,000 and M(r) 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. Int J Cancer 1994;58:582–86.
17. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. J Pathol 1999;189:161–68.
18. Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler- Stevenson WG, Liotta LA, et al. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. Cancer Res 1993;53:2208–11.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

19. Sehgal I, Baley PA, Thompson TC. Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. Cancer Res 1996;56:3359–65.

20. Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 2001;7:3113 -19.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]