پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، صفحات ۱۷۹ تا ۱۸۲

مقاله اصلی
(Original Article)

ارتباط پلی مرفیسم IVS4 ژن PTEN با سرطان پستان زنان ایرانی

دکتر بهرام مفید[۱]، پریسا اشراقی[۲]، مریم السادات دانشپور[۲]، دکتر مهدی هدایتی[۲*]

[۱] دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *غیر فعال شدن ژن‌های سرکوبگر توموری نظیر ژن PTEN (Phosphatase and Tensin homologue) به دلیل موتاسیون و یا پلی‌مرفیسم سبب رشد کنترل نشده و غیر قابل برگشت می‌شود. در این مطالعه، ارتباط پلی‌مرفیسم IVS4 (Intron Vector Splicing 4) ژن PTEN در سرطان پستان زنان مراجعه کننده به بیمارستان شهدای تجریش در سال ۱۳۸۵ بررسی شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه مورد-شاهدی، ۴۹ داوطلب زن با سرطان تایید شده پستان و ۴۳ زن سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. پلی‌مرفیسم IVS4 ژن PTEN با تکثیر DNA ژنومی و هضم آنزیمی (Restriction Fragment length =RFLP polymorphism) ارزیابی شد. حجم تومور و تعداد غدد لنفاوی درگیر نیز بررسی شد. داده‌ها توسط آزمون t و من ویتنی U و به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۱ تحلیل شدند.*

یافته‌ها: *فراوانی آلل‌های موتان در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۲۷ بود. حجم تومور در گروه حاوی آلل موتان ۲/۲±۵ سانتی‌متر و در گروه حاوی آلل وحشی ۲/۱±۳/۹ سانتی‌متر بود. تعداد غدد لنفاوی درگیر با حضور آلل موتان ارتباطی نداشت (NS). توزیع فرکانس آللی از تعادل هاردی ونبرگ تبعیت می‌کرد.*

نتیجه‌گیری: *افزایش فراوانی آلل موتان در بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به گروه شاهد حاکی از دخالت احتمالی پلی‌مرفیسم IVS4 ژن PTEN در ایجاد سرطان پستان در جمعیت مورد مطالعه است.*

واژگان کلیدی: *سرطان پستان، PTEN، IVS4، پلی‌مورفیسم.*

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان است که در صورت تشخیص زودرس و به موقع در مراحل اولیه، شانس درمان آن افزایش یافته و موجب بالار فتن طول عمر افراد مبتلا به این سرطان خواهد شد. عوامل ژنتیکی در ایجاد سرطان پستان دخیل هستند و این پدیده را به عدم تعادل در فعالیت ژن‌های سرکوبگر تومور و فاکتورهای رشد نسبت می‌دهند. انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر توموری نقش کلیدی در مسیرهای تنظیمی تقسیم سلولی بازی می‌کنند (۱). فعال شدن انکوژن‌ها و یا غیر فعال شدن ژن‌های سرکوبگر تومور سبب رشد غیر قابل برگشت و کنترل نشده سلول‌ها می‌گردند. به هر حال کسب توانایی تهاجم و متاستاز به بافت‌های طبیعی نیز برای سلول‌های سرطانی حیاتی می‌باشد. رشد سلول‌های سرطانی نه تنها به فاکتورهای رشد محلول، بلکه به چسبیدن به ماتریس خارج سلولی وابسته است. این عوامل رشد، حرکت سلولی و نوآرایی بافتی را تنظیم می‌کنند (۴-۲). لذا اینتگرین‌ها در بیولوژی سرطان نقش مهمی را بازی می‌کنند. نقش سرکوبگر توموری PTEN در تنظیم مهاری اینتگرین‌ها اخیرا مطرح شده است (۵). ژن PTEN بروی بازوی بلند

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم ، دکتر مهدی هدایتی (**e-mail:** Hedayati@endocrine.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۳/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۹/۸

کروموزوم ده (10q23) قرار دارد و دارای ۹ اگزون و طولی معادل ۱۰۵ کیلو باز می‌باشد. این ژن محصول پروتئینی مشابه فسفاتاز و تنسین دارد. علت نام‌گذاری این ژن و پروتئین نیز به همین دلیل است (PTEN=Phosphatase TENsin homologue). این ناحیه کروموزومی جایگاه ژن PTEN/MMAC1/TEP1 تولید کننده تیروزین فسفاتازی است که نقش سرکوبگری تومور برای آن فرض شده است. این آنزیم خاصیت ضد توموری را با فعالیت فسفاتازی و دخالت در چرخه سلولی انجام می‌دهد. جالب است که توالی ژن PTEN حاکی از شباهت آن به دو پروتئین مختلف می‌باشد (۶). ژن PTEN کد کننده پروتئینی با خاصیت کاتالیزوری تیروزین فسفاتازی است که در لوله آزمایش فعالیت فسفاتازی دوگانه‌ای را نشان می‌دهد (۶، ۷). این آنزیم می‌تواند مولکول PIP3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate) که لیپید انتقال دهنده پیام می‌باشد، را دفسفریله نماید (۸). موتاسیون‌های ژرمینال ژن PTEN در سرطان تیروئید و سرطان پستان گزارش شده است (۹، ۱۰). هم‌چنین دخالت موتاسیون‌های سوماتیک PTEN در برخی سرطان‌ها از جمله سرطان پستان نشان داده شده است (۱۴-۱۱). یکی از پلی‌مرفیسم‌های رایج این ژن IVS4 است که درج ۵ نوکلئوتید ACTAA در ۱۰۹ جفت باز پایین‌تر از اگزون ۴، واقع در اینترون ۴ با تشخیص زودرس سرطان پستان همراه بوده است (۱۵). بر این اساس، در این مطالعه ارتباط فراوانی پلی‌مرفیسم مذکور با سرطان پستان در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به بیمارستان شهدای تجریش در سال ۱۳۸۵ بررسی شد.

مواد و روشها

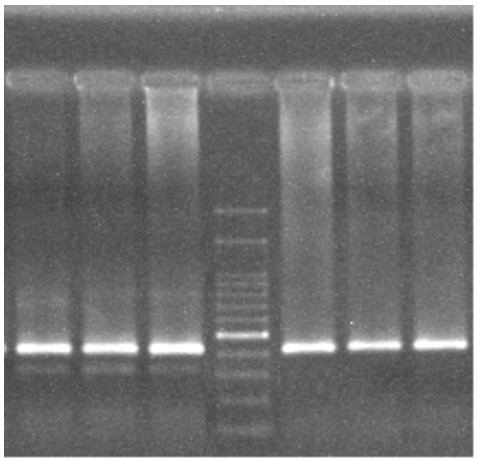
در این مطالعه مورد-شاهدی، ۴۹ زن مبتلا به سرطان پستان و ۴۳ زن عاری از سرطان پستان مراجعه کننده به بیمارستان شهدای تجریش مورد بررسی قرار گرفتند.

از افراد مورد مطالعه، ۵ میلی‌لیتر خون در لوله حاوی ضدانعقاد EDTA گرفته شد و به کمک روش استاندارد رسوب نمکی و پروتئین‌آز کا، DNA ژنومی استخراج شد. برای استخراج DNA ژنومی ابتدا نمونه‌ها توسط بافر لیز کننده (Tris-HCl pH 7.6 %1 Triton X ,5mmo/L MgCl2,10mmol/L) و بافر PBS شسته شدند و RBCها از محیط حذف گردیدند. سپس DNA توسط روش Salting Out Proteinase K استخراج گردیده و DNA حاصل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین ژنوتیپ با روش RFLP (Restriction Fragment length polymorphism) انجام شد. به این منظور، ابتدا قطعه مورد نظر با PCR تکثیر داده شده و سپس محصول آن تحت اثر آنزیم‌های محدودالاثر به شرح ذیل قرار گرفت. پلی‌مرفیسم ژن PTEN با تکثیر یک قطعه ۴۲۰ بازی DNA ژنومی، برش آنزیمی به کمک آنزیم محدوالاثر *MspCI* و روش RFLP انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به قرار ذیل بودند:

5´GGGGGTGATAACAGTATCTA3´
5´CTTTATGCAATACTTTTTCCTA3´

در واکنش PCR، حجم تام ۲۵ میکرولیتر حاوی میزان DNA ۵۰ نانوگرم، غلظت $MgCl_2$ ۲/۵ میلی‌مولار، غلظت دزوکسی ریبونوکلئوتیدهای تری فسفاته ۰/۳ میلی‌مولار، غلظت پرایمرها ۸۰۰ نانومولار، میزان DNA پلی‌مرآز ۱ واحد بود. واکنش PCR ابتدا ۷ دقیقه در ۹۵ درجه برای دناتوراسیون و ۳۰ دقیقه برای تکثیر (۱ دقیقه در ۹۴ درجه، ۱ دقیقه در ۵۵/۴ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه انجام شد. محصول واکنش PCR به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه تحت هضم ۳ واحد آنزیم MspCI (Roche, Germany) قرار گرفت. نتیجه هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز (Cambrex, Denmark) با برمید اتیدیوم رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه ترانس‌لومیناتور و پرتو ماوراء بنفش بررسی گردید. اندازه قطعات در هوموزیگوت‌های حاوی آلل وحشی ۴۲۰ جفت باز و هوموزیگوت‌های موتان ۳۵۰ جفت باز و هتروزیگوت‌ها یک باند ۴۲۰ و یک باند ۳۵۰ جفت بازی بود.



شکل ۱- محصول تکثیر PCR پس از برش آنزیمی.

تکرار سه تایی نمونه مثبت در سمت چپ و تکرار سه تایی نمونه منفی در سمت راست ژل الکتروفورز مشاهده می شود.

داده ها بوسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ تجزیه و تحلیل شد. متغیرهای کمی به صورت میانگین±انحراف معیار و متغیرهای کیفی بصورت درصد بیان شد. از تقسیم تعداد غدد لنفاوی درگیر به تعداد غدد لنفاوی مورد بررسی، فاکتوری به نام نسبت غدد لنفاوی درگیر تعریف شد. جهت مقایسه یافته‌های کمی در دو گروه زنان مبتلا به سرطان و زنان سالم از آزمون t مستقل استفاده گردید. برای مقایسه آلل در دو گروه از آزمون من ویتنی U استفاده شد. سطح معنی‌دار آماری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۴۹ زن مبتلا به سرطان پستان با میانگین سنی ۱۱±۴۹ و ۴۳ زن سالم با میانگین سنی ۱۰±۴۸ سال مورد بررسی قرار گرفتند و سن دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت. وزن و قد بیماران به ترتیب ۱۱±۶۷ کیلوگرم و ۵±۱۵۴ سانتی‌متر و وزن و قد افراد سالم به ترتیب ۱۴±۷۳ کیلوگرم و ۵±۱۵۶ سانتی‌متر بود و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت. در کل جمعیت مورد بررسی، ۴۱ نفر آلل WW (هموزیگوت وحشی)، ۸ نفر آلل MM (هموزیگوت موتان) و ۴۳ نفر آلل MW داشتند. فراوانی آلل‌های وحشی و موتان در گروه مبتلا به سرطان پستان به ترتیب ۰/۶۳ و ۰/۳۷ بود، در حالی که این میزان در گروه سالم به ترتیب ۰/۷۳ و ۰/۲۷ بود، به عبارتی فرکانس آلل موتان در گروه مبتلا به سرطان ۱۰ درصد بیشتر از گروه سالم بود (جدول ۱).

جدول ۱- تعداد و فراوانی آلل های وحشی (W) و موتان(M) در گروه های مورد و شاهد

الل	شاهد (n=۴۳)		مورد (n=۴۹)	
	تعداد (درصد)	فراوانی	تعداد (درصد)	فراوانی
MM	۲ (۴/۷)	۰/۲۷	۶ (۱۲)	۰/۳۷
MW	۱۹ (۴۴/۲)		۲۴ (۴۹)	
WW	۲۲ (۵۱/۱)	۰/۷۳	۱۹ (۳۸)	۰/۶۳

فرکانس ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی ونبرگ تبعیت می‌کرد. در گروه مبتلا به سرطان پستان در گروه حاوی آلل موتان، حجم توده توموری ۲/۲± ۵ سانتی‌متر و در گروه حاوی آلل وحشی ۲/۱± ۳/۹ سانتی‌متر بود و ارتباط معنی‌داری میان حجم تومور و نوع آلل یافت نشد. نسبت غدد لنفاوی درگیر در گروه حاوی آلل موتان ۰/۳۴۱±۰/۴۵۳ و در گروه حاوی آلل وحشی ۰/۰۱۹±۰/۳۱۱ بود که آزمون من ویتنی U اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. هم‌چنین در آزمون t ارتباطی بین سن افراد و نوع آلل موتان و یا وحشی یافت نشد.

بحث

در این مطالعه فراوانی آلل موتان ژن PTEN در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان (۳۷ درصد) بیش از زنان سالم (۲۷ درصد) بود. در سال ۲۰۰۱، دپاسکی و همکاران نقش آسیب ژن PTEN در سرطان پستان را مطرح نمودند (۱۶). با توجه به نقش عمومی محصول پروتئینی ژن مذکور به عنوان یک فسفاتاز با نقش کلیدی در سرکوبگری تومور، بسیاری از محققان ارتباط پلی مرفیسم IVS4 با سرطان پستان را مطرح نمودند. آقای بوس و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۲ دریافتند که در سرطان پستان، موتاسیون ژن PTEN سبب افزایش احتمال متاستاز لنفاوی می‌گردد (۱۷)، در حالی که در این تحقیق ارتباط معنی‌داری میان نسبت غدد لنفاوی درگیر با آلل موتان یافت نشد. موتاسیون ژن PTEN در جمعیت فرانسوی و کانادایی مبتلا به سرطان پستان نادر است و لذا احتمالا دخالت آن را در این نوع سرطان ناچیز در نظر گرفته‌اند (۱۸)، اما در گزارش سایر محققان فراوانی موتاسیون ژن مذکور بالاست (۱۹). فراوانی آلل موتان در جمعیت مورد بررسی، نادر بودن موتاسیون این ژن را تایید نمی‌کند.

در مطالعه ما، فراوانی آللی ژن موتان در جمعیت مبتلا به سرطان پستان بیش از جمعیت سالم بدست آمد، اما احتمالا به دلیل کوچک بودن حجم نمونه این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود که از محدودیت‌های این مطالعه به شمار می‌رود. به هر حال مشاهده وقوع سرطان‌ها در برخی خانواده‌ها، یا افزایش شیوع آن در برخی مناطق و جمعیت‌ها جنبه ژنتیکی سرطان‌ها را مطرح ساخته است. کنترل تقسیم سلولی توسط عوامل محرک (فاکتورهای رشد) و عوامل مهاری (سرکوبگرهای توموری) انجام می‌شود. آسیب عملکرد سرکوبگرهای توموری در اثر موتاسیون یا پلی‌مرفیسم از عوامل زمینه‌ساز سرطان محسوب می‌شود. از دست رفتن آللی، موتاسیون و پلی‌مرفیسم ژن سرکوبگر توموری PTEN در سرطان‌هایی مانند سرطان لوله گوارش، پروستات، تخمدان و آندومتریوم گزارش شده است (۲۵-۲۰). امید است با یافتن ژن‌های دخیل در سرطان پستان در جمعیت ایرانی بتوان به تشخیص زودرس و درمان موثرتر این بیماری نایل آمد.

REFERENCES

1. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. Cell 1991; 64: 235-48.
2. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 701-706.
3. Schwartz MA. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. J Cell Biol 1997; 139: 575-78.
4. Giancotti FG, Uoslahti E. Integrin signaling. Science 1999; 285: 1028-32.
5. Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN gene and integrin signaling in cancer. J Natl Cancer Inst 1999; 91; 1820-28.
6. Li MD, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. Cancer Res 1997; 57: 2124-29.
7. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wigler MH. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 9052-57.
8. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate. J Biol Chem 1998; 273: 13375-78.
9. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EAJ. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. Nat Genet 1996; 13: 114-16.
10. Liaw D, Marsh DJ, Li J. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet 1997; 16: 64-67.
11. Li J, Yen C, Liaw D. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. Science 1997; 275: 1943-46.
12. Dahia PLM, marsh DJ, Zheng Z. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. Cancer Res 1997; 57:4710-13.
13. Liu W, James CD, Frederick L, Alderet BE, Jenkins R. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. Cancer Res 1997; 57: 5254-57.
14. Kong D, Susuki A, Zou TT. PTEN is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. Nat Genet 1997; 17: 143-44.
15. Carroll BT, Couch FJ, Rebbeck TR, Weber BL. Polymorphisms in breast cancer families. J Med Genet 1999; 36: 94.
16. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. Mod Pathol 2001; 14: 672-76.
17. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. Hum Pathol 2002; 33: 405-409.
18. Guénard F, Labrie Y, Ouellette G, Beauparlant CJ, Bessette P, Chiquette J, et al. Germline mutations in the breast cancer susceptibility gene PTEN are rare in high-risk non-BRCA1/2 French Canadian breast cancer families. Fam Cancer 2007; 6: 483-90.
19. Chung MJ, Jung SH, Lee BJ, Kang MJ, Lee DG. Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis, of breast cancer. Pathol Int 2004; 54: 10-15.
20. Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, Jaffe ES, Raffeld M. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. Blood 1998; 92: 3410–15.
21. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. Cancer Res 1997; 57: 3935–40.
22. Okami K, Wu L, Riggins G, Cairns P, Goggins M, Evron E, et al. Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. Cancer Res 1998; 58: 509–11.
23. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet 1997; 16: 64–67.
24. Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, et al. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. Nat Genet 1997; 16: 333–34.
25. Ali IU, Shrimi L, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. J Natl Cancer Inst 1999;21:348-57.