Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.41; No.4; 2018

Study of EGFR gene in relationship between polymorphism and miR-214 binding site in lung cancer

Fatemeh Amini[1*], Majid Motovalli-Bashi[1], Simin Hemmati[2]

1. Biology Department, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

2. Radiotherapy and Oncology Department, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Tehran

(Received: 2017/05/18 Accept: 2017/09/02)

Abstract

Backgrond*: Lung cancer is the most common cause of cancer-related deaths worldwide and non-small cell lung cancer (NSCLC), especially adenocarcinoma, is the most common type of lung cancer. Most cases of adenocarcinoma will occur due to KRAS mutations or EGFR mutations and amplifications. The polymorphism rs884225 which is associated with increased EGFR expression is located in the 3'UTR of the EGFR within the miR-214 binding site, and near the miR-27 and miR-128 binding sites. This study aims to investigate the association between rs884225 and lung cancer in Isfahan population.*

Materials and Methods: *This case-control study was conducted on genomic DNA from the blood samples of 111 healthy subjects and 61 patients. After finishing the primer design, the genotypes were determined using the Tetra Primer ARMS-PCR technique. The statistical analysis was performed on the Power Marker software, and the SISA website.*

Findings: *The frequency of the alleles C/T at rs884225 was almost similar among the Isfahan population with and without lung cancer, and a significant association between this polymorphism and lung cancer wasn't observed (CC: OR=2.24, p>0.05). The Odd Ratio (OR) of this polymorphism in different kinds of lung cancer was also determined in the population that were not statistically significant (CC in NSCLC: OR=4.6, p>0.05).*

Conclusion: *It seems that no rs884225 is associated with lung cancer, and for more precise conclusions, it is recommended to study in larger statistical societies.*

Keywords: *Lung cancer, EGFR, polymorphism, miR-214, miR-27, miR-128*

**Corresponding author: Fatemeh Amini*
Email: amini.lale.f@gmail.com

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۹۶، صفحات ۲۶۸ تا ۲۷۴

بررسی رابطه پلی‌مورفیسم در جایگاه اتصال miR-214 در ژن *EGFR* با سرطان ریه

فاطمه امینی[۱*]، مجید متولی‌باشی[۱]، سیمین همتی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲. گروه رادیوتراپی و تومورشناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۱۱

چکیده:

سابقه و هدف: *سرطان ریه شایع‌ترین سرطان عامل مرگ‌ومیر در جهان است و سرطان ریه‌ی سلول غیرکوچک (NSCLC) خصوصاً نوع آدنوکارسینوما شایع‌ترین نوع سرطان ریه می‌باشد. بیشترین موارد آدنوکارسینوما به دلیل جهش در انکوژن KRAS یا جهش و افزایش نسخه‌ی EGFR رخ می‌دهد. پلی مورفیسم rs884225 در EGFR 3'UTR در جایگاه اتصال miR-214 و نزدیک جایگاه اتصال miR-27 و miR-128 قرار دارد که با افزایش بیان EGFR مرتبط است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی ارتباط rs884225 با سرطان ریه در جمعیت اصفهان می‌باشد.*

مواد و روش بررسی: *مطالعه‌ی حاضر به‌صورت شاهد-مورد روی DNAی ژنومی از نمونه‌ی خون ۱۱۱ فرد سالم و ۶۱ فرد بیمار مبتلا به سرطان ریه انجام شد. ژنوتیپ افراد، پس از طراحی پرایمرها با استفاده از تکنیک تتراپرایمرآرمز-PCR تعیین شد. آنالیزهای آماری به‌وسیله‌ی نرم‌افزار Power Marker و پایگاه اینترنتی SISA انجام گرفت.*

یافته‌ها: *فراوانی آلل‌های C/T در rs884225 در جمعیت اصفهانی سالم و مبتلا به سرطان ریه تقریباً مشابه بوده و ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم با سرطان ریه مشاهده نشد (ژنوتیپ، $p>0/05$، $OR=2/24$:CC). همچنین نسبت افزاینده این پلی‌مورفیسم در انواع سرطان ریه در جمعیت اصفهان نیز تعیین شد که ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (ژنوتیپ CC در NSCLC : $p>0/05$، $OR=4/6$).*

نتیجه‌گیری: *بنابر مطالعه‌ی حاضر، این پلی‌مورفیسم نمی‌تواند با افزایش بیان EGFR در افزایش خطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت اصفهان دخیل باشد. گرچه ممکن است به دلیل کم بودن حجم نمونه‌ی موردمطالعه این نتایج حاصل شده باشد ولی به دلیل اختلاف زیاد p از ۰/۰۵، بعید به نظر می‌رسد که با افزایش تعداد نمونه تغییر زیادی در نتایج حاصل شود. در مطالعات آینده می‌توان با بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم با بیان EGFR و نیز بررسی در جوامع دیگر با نمونه‌ی بسیار بزرگ نتایج به‌دست‌آمده را تایید کرد.*

واژگان کلیدی: *سرطان ریه، EGFR، پلی‌مورفیسم، miR-214، miR-27، miR-128*

* **نویسنده مسئول:** فاطمه امینی
پست الکترونیک: *amini.lale.f@gmail.com*

مقدمه:

سرطان ریه شایع‌ترین سرطان عامل مرگ‌ومیر در جهان است که شامل رشد کنترل نشده‌ی سلول‌های اپیتلیالی ریه می‌باشد و بر اساس ساختار بافت‌شناسی به دو نوع اصلی سرطان ریه‌ی سلول‌کوچک Small cell lung cancer (SCLC) (۲۰-۱۵ درصد موارد سرطان ریه) و سرطان ریه‌ی سلول‌غیرکوچک Non-small cell lung cancer (NSCLC) (۸۵-۸۰ درصد موارد) دسته‌بندی می‌شود. سرطان ریه‌ی سلول‌غیرکوچک خود شامل سه نوع آدنوکارسینوما، سرطان سلول‌های فلسی Squamous or epidermoid cell carcinoma (SCC) و سرطان ریه‌ی سلول‌بزرگ می‌باشد (۱,۲). سیگار کشیدن، گاز رادون، آزبست، آلودگی هوا، مواد سرطان‌زا و ژنتیک، عوامل ایجادکننده‌ی این سرطان می‌باشند (۳). در NSCLC به‌ویژه نوع آدنوکارسینوما احتمال وراثتی بودن سرطان ریه بیشتر است (۴,۵). تاکنون ۲۱۳ ژن مرتبط با سرطان ریه شناسایی‌شده‌اند (۶). عامل بیشترین موارد سرطان ریه جهش در پروتوانکوژن Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) و نیز جهش و افزایش نسخه‌ی پذیرنده‌ی عامل رشد روپوستی Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) می‌باشد که در سرطان ریه‌ی سلول‌غیرکوچک خصوصاً نوع آدنوکارسینوما رایج است و توسط داروهای شیمی‌درمانی مهار می‌گردد (۷). *EGFR* اولین ژنی است که ارتباط افزایش بیان آن با سرطان به اثبات رسید. جهش و افزایش تعداد نسخه‌های ژن *EGFR* در NSCLC و گلیوبلاستوما و نیز افزایش بیان EGFR در سرطان روده‌ی بزرگ، آدنوکارسینومای پانکراس و سرطان سلول‌های فلسی سر و گردن، به اثبات رسیده است؛ به همین دلیل از مهارکننده‌های آن در درمان یا افزایش بقای مبتلایان به این بیماری‌ها استفاده می‌گردد. همچنین در سرطان پستان و سرطان معده، افزایش بیان HER2 که معمولاً به‌صورت هترودیمر با EGFR عمل می‌کند سبب شده که مهارکننده‌های EGFR برای جلوگیری از پیشرفت این سرطان نیز به‌کار روند (۸). ژن *EGFR* که به نام‌های *Human epidermal receptor-1 (HER1)* و *Erythroblastosis B1 (ERBB1)* نیز شناخته می‌شود، واقع بر کروموزوم ۷ (ناحیه‌ی ۷p۱۲)، شامل ۲۸ اگزون است که حدود ۲۰۰kb را در بر می‌گیرد (۹). این ژن کد کننده‌ی رونوشت ۵۶۱۶ نوکلئوتیدی است که پروتئینی با ۱۲۱۰ اسیدآمینه و جرم مولکولی ۱۳۴ کیلو دالتون ایجاد می‌کند (۱۰). این پروتئین، پذیرنده‌ی عامل رشد روپوستی و اولین تیروزین‌کیناز کشف شده است که در اعمال گوناگون سلولی مانند رشد، تکثیر، تمایز، بقا، تحرک سلولی و تکامل بافت نقش دارد. ژن *EGFR*، حاوی ۴۴۲۳ پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی می‌باشد که ارتباط ۱۶ پلی‌مورفیسم تک-نوکلئوتیدی در ژن EGFR با سرطان ریه تعیین شده که چندین پلی‌مورفیسم در آن به‌عنوان زیست‌نشانگر در سرطان ریه تعیین‌شده‌اند (۱۱).

از میان ۵۲ پلی‌مورفیسم که در EGFR 3'UTR وجود دارد، rs884225 در محل اتصال miR-214 واقع شده و بر اتصال این microRNA اثر می‌گذارد و در مقاومت بیماران NSCLC به جفیتینیب مؤثر است (۱۲,۱۳,۱۴) و نیز این پلی‌مورفیسم در نزدیکی دو جایگاه اتصال miR-27 و miR-128 واقع شده که احتمالاً بر اتصال این microRNAها اثر می‌گذارد (۱۵) که ارتباط این microRNAها با NSCLC نشان داده شده است (۱۸, ۱۷, ۱۶, ۱۴). microRNAها گروهی از RNAهای غیر کد کننده با طول حدود ۱۸-۲۵ نوکلئوتید و از مهم‌ترین عوامل تنظیمی بیان ژن‌ها هستند که اثر خود را بر بیان ژن از طریق جفت شدن با نواحی مکمل خود که اغلب در ناحیه‌ی 3´UTR مربوط به mRNAی هدف است اعمال می‌کنند (۱۹). microRNAها حدود ۶۰٪ همه‌ی ژن‌های کد کننده را تنظیم کرده و نقش‌های مهمی در بسیاری از فرایندهای زیستی شامل تکثیر، تمایز، نمو، ایمنی، کهولت و مرگ سلول، و نیز در سرطان می‌باشد (۲۰). پلی‌مورفیسم در 3'UTR از mRNAی هدف، بر میان‌کنش آن با microRNA و از این طریق در سرطان‌ها تأثیرگذار است (۲۱). Chu و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از سنجش لوسیفرازی تعیین کردند که rs884225 در EGFR 3'UTR می‌تواند بر بیان این ژن اثر بگذارد و نیز ارتباط این پلی‌مورفیسم با افزایش خطر ابتلا به سرطان مثانه تعیین شد (۱۲). گزارش شده است که ژنوتیپ CC در این پلی‌مورفیسم با افزایش ۱/۹ برابری خطر بیماری‌های ریوی و افزایش فشارخون ریوی Pulmonary hypertension در ارتباط است (۲۲). مطالعه‌ی انجام‌شده بر روی این پلی-مورفیسم در بیماران سرطان ریه در جمعیت کره ، بیانگر ارتباط اندکی بین این پلی‌مورفیسم با سرطان ریه بود (۲۳) و لذا هدف از پژوهش حاضر، تعیین ارتباط پلی‌مورفیسم rs884225 با سرطان ریه و انواع آن، با استفاده از تکنیک تتراپرایمر-آرمز در جمعیت اصفهان می‌باشد.

مواد و روشها:

تحقیق با طراحی موردی شاهدی با استفاده از ۱۱۱ نمونه‌ی خون از افراد کنترل فاقد سابقه‌ی خانوادگی ابتلا به سرطان ریه به‌صورت داوطلبانه، و ۶۱ فرد بیمار مبتلا به سرطان ریه که طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۲ به بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان مراجعه کرده بودند با رضایت بیماران انجام شد. برای جمع‌آوری خون از لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA استفاده شد و اطلاعات بیمار (شامل سن، جنس، استعمال دخانیات و نوع سرطان ریه) از پرونده‌های بیماران جمع‌آوری گردید. برای استخراج DNA از خون تام، از روش نمکی میلر با کمی تغییرات استفاده شد (۲۴). برای اندازه‌گیری مقدار، خلوص و غلظت DNAی استخراج‌شده، از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. نسبت جذب ۲۶۰nm به ۲۸۰nm یا A_{260}/A_{280} (نسبت جذب اسیدهای هسته‌ای به پروتئین) بین ۱/۸ تا ۲ به دست آمد که نشانه‌ی خلوص قابل قبول DNA است. کیفیت DNAی ژنومی استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (شکل۱).

طراحی پرایمر

تکنیک Tetra Primer ARMS-PCR فنی است که با استفاده از چهار پرایمر (دو پرایمر داخلی و دو پرایمر خارجی) در یک ویال PCR، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی Single Nucleotide Polymorphism (SNP) را موردبررسی قرار می‌دهد. پرایمرهای داخلی به‌گونه‌ای طراحی می‌شوند که هرکدام یکی از حالت‌های پلی‌مورفیسم را

تکثیر کنند. جهت بررسی rs884225 در ناحیه‌ی 3'UTR ژن *EGFR* با استفاده از تکنیک تتراپرایمر، توالی ژن از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد و پرایمرهای داخلی رفت و برگشت با استفاده از سایت Primer1 و سپس پرایمرهای خارجی با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد. بهترین پرایمرها بر اساس طول قطعات (۲۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز)، طول پرایمر (۱۸ تا ۳۰ نوکلئوتید)، Tm مناسب (۶۴-۵۵°C)، شباهت Tm (اختلاف کمتر از ۳°C)، درصد بازهای گوانین و سیتوزین (۴۰ تا ۶۰ درصد)، عدم اتصال پرایمر در انتهای ' ۳ با خود یا با پرایمر جفت و ΔGی مناسب انتخاب شدند. جهت اطمینان از عدم جفت‌شدگی پرایمرهای انتخاب‌شده با نواحی دیگر ژنوم انسان، عملیات Blast از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام شد و درنهایت پرایمرها توسط شرکت سپاهان طب ساخته شد. پرایمرهای طراحی‌شده در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

پرایمرهای طراحی‌شده جهت بررسی rs884225 با تکنیک تترا پرایمر

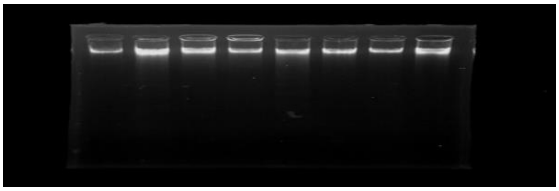
پرایمر	توالی	Tm
پرایمر خارجی رفت	TGGTTCTGCTTCAAG GCTTC	۵۸/۹۹
پرایمر خارجی برگشت	GTCTTCTGATCTATG CCCCAA	۵۷/۶۵
پرایمر داخلی رفت	CCATTGTTTTGAAAC TCAGTATtCc	۵۸/۸۵
پرایمر داخلی برگشت	ATGACAGCAAGACA GGGtCA	۵۷/۶۳

ژنوتایپینگ

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)در حجم ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از ۲۵۰ نانوگرم DNAی ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR(10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر منیزیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPی ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم SmarTaq DNA Polymerase تهیه شده از شرکت سیناژن انجام شد. تکثیر DNA با شرایط ۵ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سپس ۳۳ سیکل شامل ۳۵ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه، ۳۵ ثانیه اتصال پرایمرها در دمای ۵۹ درجه و ۳۵ ثانیه تکثیر در دمای ۷۲ درجه و درنهایت ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه انجام شد. ژنوتیپ در افراد کنترل و بیمار با استفاده از تکنیک تتراپرایمر تعیین شد و فراوانی‌های ژنوتیپی TT,TC,CC و فراوانی‌های آللی T و C در پلی‌مورفیسم rs884225 در گروه‌های موردمطالعه محاسبه گردید.

آنالیز آماری

رای بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه‌های کنترل و بیمار، از آزمون مربع کای استفاده شد. برای این منظور، نسبت افزاینده با فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ به‌عنوان شاخص ارتباط پلی‌مورفیسم‌های نام‌برده با خطر ابتلا به سرطان ریه، با استفاده از پایگاه داده SISA محاسبه شد. همچنین در جمعیت‌های



شکل ۱ الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های DNAی ژنومی تخلیص شده‌ی افراد بیمار و کنترل در ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت و جریان متغیر. باندهای DNA از طریق رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و با کمک نور UV قابل‌مشاهده شدند. باندهایی که کم‌تحرک‌تر و پرنورتر هستند، دارای DNAی تخلیص-شده‌ی مناسب‌تری می‌باشند.

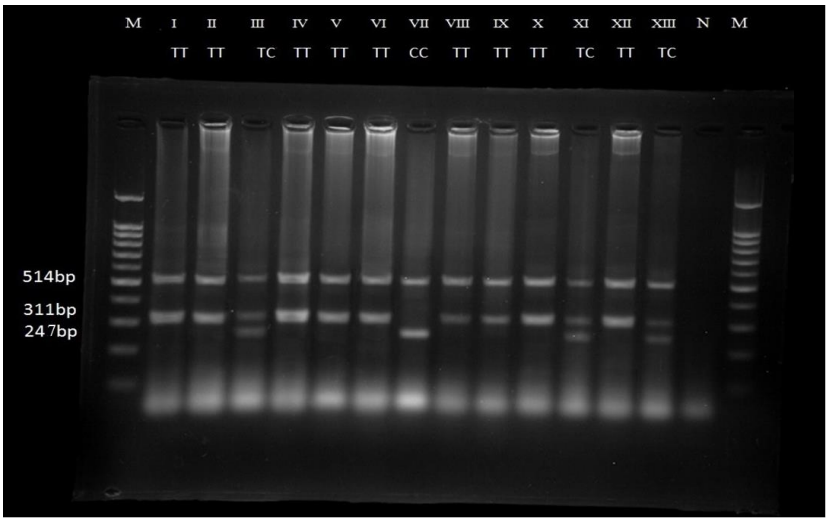
بزرگ که در آن‌ها آمیزش‌ها به‌صورت تصادفی صورت می‌گیرد، نسبت آلل-های غالب به مغلوب و نیز نسبت فراوانی افراد خالص به ناخالص در نسل‌های پی‌درپی ثابت است؛ مگر اینکه جمعیت تحت‌فشار نیروهای تغییردهنده (شامل جهش، انتخاب طبیعی، مهاجرت، شارش و رانش ژنی Genetic drift) قرار گیرد. به این امر اصل هاردی–واینبرگ گویند. برای اینکه نسبت آلل‌ها طی نسل‌های متمادی ثابت باشد باید تعادل هاردی-واینبرگ برقرار باشد. برقراری تعادل هاردی–واینبرگ در گروه‌های موردمطالعه با استفاده از نرم‌افزار Power Marker ویرایش ۳/۲۵ بررسی شد.

یافته‌ها:

تحقیق روی دو گروه کنترل و بیمار مبتلا به سرطان ریه که همه در فاز III و IV سرطان بودند انجام شد و ژنوتیپ افراد تعیین شد (شکل ۲).

برقراری تعادل هاردی–واینبرگ در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم‌افزار Power Marker بررسی شد که Exact p-value در کل جمعیت، برابر با ۰/۵۸۵۳، در جمعیت بیمار برابر ۱ و در جمعیت سالم ۰/۵۱۳۷ محاسبه شد که هر سه، از ۰/۰۵ بزرگ‌تر می‌باشند؛ درنتیجه، طبق آزمون دقیق فیشر، فرض صفر مبنی بر برقرار بودن تعادل هاردی–واینبرگ در جمعیت‌های بررسی‌شده، پذیرفته می‌شود. پس‌ازآن، فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و نیز نسبت افزاینده‌ی این پلی‌مورفیسم درخطر ابتلا به سرطان ریه با فاصله‌ی اطمینان۹۵٪ محاسبه شد و pی کوچک‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد (جدول ۲ و ۳). بر این اساس، ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم حاضر و خطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت اصفهان مشاهده نشد (ژنویپCC: ,p>۰/۰۵ ،OR=۲/۲).

به سبب ارتباطی که بین ژن *EGFR* و سرطان ریه نوع NSCLC و به‌خصوص نوع آدنوکارسینوما وجود دارد، ارتباط این پلی‌مورفیسم با انواع سرطان ریه نیز موردبررسی قرار گرفت (جدول ۴). بر این اساس، نسبت افزاینده آلل T در NSCLC برابر ۰/۴۶۷ محاسبه شد که به دلیل p>۰/۰۵ ارتباط مشاهده‌شده معنی‌دار نبود. همچنین ارتباط ژنوتیپ ها در NSCLC به دلیل بزرگ‌تر بودن p از ۰/۰۵ معنی‌دار نبود (ژنویپTT: ,p>۰/۰۵، OR=۰/۵۹) و (ژنویپCC: p>۰/۰۵ ،OR=۴/۶).



شکل ۲ تعیین ژنوتیپ rs884225 (T>C) در افراد کنترل و بیمار با تکنیک تترا پرایمر. M: مارکر ۱۰۰bp. N: کنترل منفی. نمونه‌ی هموزیگوت غالب دارای باندهای ۵۱۴، ۳۱۱ جفت‌بازی و هموزیگوت مغلوب دارای باندهای ۵۱۴، ۲۴۷ جفت‌بازی و هتروزیگوت دارای باندهای ۵۱۴، ۳۱۱، ۲۴۷ جفت‌بازی می‌باشد. نمونه‌های یک تا هفت از افراد سالم و نمونه‌های هشت تا سیزده از افراد بیمار می‌باشند. الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ ثابت ۶۰ ولت و جریان متغیر انجام گرفت.

جدول ۱. فراوانی آللی rs884225 در دو گروه کنترل و بیمار و نسبت افزاینده‌ی آن درخطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت اصفهان.

آلل	مورد	شاهد	کل	OR	مقدارp	فاصله اطمینان ۹۵٪	
	فراوانی(تعداد)	فراوانی(تعداد)	فراوانی(تعداد)			بالا	پایین
T	۱۰۵(۰/۸۶۱)	۱۸۲(۰/۸۲)	۲۸۷(۰/۸۳۴)	آلل T نسبت به C: ۰/۷۳۷	۰/۳۲۹	۱/۳۶۴	۰/۳۹۸
C	۱۷(۰/۱۳۹)	۴۰(۰/۱۸)	۵۷(۰/۱۶۶)				

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی rs884225 در دو گروه کنترل و بیمار و نسبت افزاینده‌ی آن درخطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت اصفهان.

ژنوتیپ	مورد	شاهد	OR	مقدارp	فاصله اطمینان ۹۵٪	
	فراوانی(تعداد)	فراوانی(تعداد)			بالا	پایین
TT	۴۵(۰/۷۳۸)	۷۵(۰/۶۷۶)	ژنوتیپ TT نسبت به TC+CC: ۰/۷۴	۰/۳۹۷	۱/۴۸۵	۰/۳۷
TC	۱۵(۰/۲۴۶)	۳۲(۰/۲۸۸)	ژنوتیپ TC نسبت به TT+CC: ۱/۲۴	۰/۵۵	۲/۵۳۴	۰/۶۱
CC	۱(۰/۰۱۶)	۴(۰/۰۳۶)	ژنوتیپ CC نسبت به TT+TC: ۲/۲۴۳	۰/۴۶	۲۰/۵۳	۰/۲۴۵

بحث:

در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی آلل T و C در rs884225 تقریباً مشابه جمعیت اروپایی–قفقازی می‌باشد. فراوانی جهانی این آلل‌ها به ترتیب ۰/۸۶۹ و ۰/۱۳۱ تخمین زده شده است. در جمعیت آسیایی این میزان برابر ۰/۵۲۵ و ۰/۴۷۵ و در جمعیت آفریقایی–امریکایی ۰/۹۷۵ و ۰/۰۲۵ می‌باشد که شباهت چندانی با جمعیت اصفهانی نشان نمی‌دهند. همچنین در مطالعه‌ی حاضر درجه‌ی هتروزیگوسیتی افراد کنترل برابر ۰/۲۸۸ محاسبه شد که مشابه جمعیت اروپایی–قفقازی با میزان ۰/۳ می‌باشد. درجه‌ی هتروزیگوسیتی در جهان ۰/۲۱۶ تخمین زده شده و این میزان در جمعیت آسیایی و جمعیت آفریقایی–امریکایی به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۵ می‌باشد (۲۵). این آمار نشان‌دهنده‌ی شباهت ژنتیکی بیشتر جمعیت ایرانی با جمعیت اروپایی–قفقازی و شباهت ژنتیکی جمعیت آفریقایی–آمریکایی با آسیای میانه و شرقی می‌باشد. در این پژوهش، فراوانی آللی T و C در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان ریه در ایران به ترتیب ۰/۸۶۱ و ۰/۱۳۹ و درجه‌ی هتروزیگوسیتی ۰/۲۴۶ محاسبه شد که تفاوت معنی‌داری با جمعیت سالم نشان نمی‌دهد. البته این امکان وجود دارد که به علت کوچک بودن نمونه‌ی موردمطالعه، نتایج حاصل معنی‌دار نبوده است. همچنین ارتباط آللی SNP با انواع سرطان ریه بررسی شد که به علت زیاد بودن داده‌های گمشده و عدم تعیین نوع سرطان در تعداد زیادی از بیماران، جامعه‌ی آماری موردبررسی کوچک‌تر شده و همچنان نتایج مشاهده‌شده معنی‌دار نبود. همچنین طبق مطالعه‌ی مشابه انجام‌شده در جمعیت کره توسط

جدول ۳. تعیین نسبت افزاینده‌ی پلی‌مورفیسم rs884225 در انواع سرطان ریه.

	OR	مقدار p	فاصله‌ی اطمینان	
			بالا	پایین
نسبت آلل T به C در آدنوکارسینوما	۱/۱۹	۰/۷۶	۳/۶	۰/۳۹
نسبت آلل T به C در SCC	۱	۱	۳/۳	۰/۳۲
نسبت آلل T به C در NSCLC	۰/۴۶۷	۰/۳	۲/۰۵	۰/۱
نسبت آلل T به C در SCLC	۱/۴	۰/۶۸	۶/۹۸	۰/۲۸
نسبت ژنوتیپ TTبه TC+CC در آدنوکارسینوما	۱/۱۶	۰/۸۳	۴/۳۵	۰/۳
نسبت ژنوتیپ TCبه TT+CC در آدنوکارسینوما	۰/۹۵	۱	۴	۰/۲۳
نسبت ژنوتیپ CCبه TC+TT در آدنوکارسینوما	۰/۷	۰/۷۸	۴/۷	۰/۰۴
نسبت ژنوتیپ TTبه TC+CC در NSCLC	۰/۵۹	۰/۵۹	۴	۰/۰۹
نسبت ژنوتیپ TCبه TT+CC درNSCLC	۰/۸۳	۰/۸۸	۸/۴	۰/۸۲
نسبت ژنوتیپ CCبه TC+TT درNSCLC	۴/۶	۰/۲	۶۳	۰/۳۴
نسبت ژنوتیپ TCبه TT+CC در SCLC	۱/۴۵	۰/۶۹	۸/۹	۰/۲۴
نسبت ژنوتیپ TCبه TT+CC در SCC	۰/۸۹	۱	۴/۱۵	۰/۱۹

Choi و همکاران، فراوانی آلل C در افراد کنترل ۰/۳۷ محاسبه شد که در مقایسه با افراد بیمار که فراوانی ۰/۳۱ را نشان دادند، تفاوت زیادی مشاهده نشد (۲۳). گرچه فراوانی این آلل در جمعیت اصفهان تفاوت قابل ملاحظه‌ای با جمعیت کره نشان می‌دهد ولی نتایج حاکی از عدم ارتباط این پلی‌مورفیسم با سرطان ریه مشابه می‌باشد. همچنین تفاوت ژنتیکی قابل توجهی بین جمعیت ایرانی با آسیای شرقی بر اساس International HapMap Project وجود دارد (۲۵). هتروزیگوسیتی‌های محاسبه‌شده با هتروزیگوسیتی مورد انتظار تقریباً برابر بود (2pq در افراد سالم برابر ۰/۲۹۵ و در افراد بیمار ۰/۲۳ محاسبه شد) که نشان‌دهنده‌ی وجود تعادل هاردی–واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه و نشانه‌ی قابل تعمیم بودن نتایج به نسل بعد می‌باشد. برقراری تعادل هاردی–واینبرگ به‌وسیله‌ی نرم‌افزار Power Marker با $p>0/05$ نیز تأیید شد.

با بررسی فراوانی ژنوتیپی، نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ CC در rs884225 با افزایش۲/۲ برابری سرطان ریه و افزایش۴/۶ برابری NSCLC در اصفهان مرتبط است ولی این ارتباط ازلحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p>0/05$). درحالی‌که Chu و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده بودند که rs884225 می‌تواند با افزایش بیان EGFR خطر ابتلا به سرطان مثانه را افزایش دهد (۱۲) و در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط Zhou و همکاران انجام شد، نشان داده شد که ژنوتیپ CC در این پلی‌مورفیسم با افزایش ۱/۹ برابری خطر ابتلا به بیماری‌های ریوی و افزایش فشارخون ریوی Pulmonary hypertension در ارتباط است (۲۲).می‌توان با بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم با بیان EGFR و نیز بررسی در جوامع دیگر با نمونه‌ی بسیار بزرگ نتایج به‌دست‌آمده را تایید کرد.

نتیجه‌گیری:

بنابر مطالعه‌ی حاضر، این پلی‌مورفیسم نمی‌تواند با افزایش بیان EGFR در افزایش خطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت اصفهان دخیل باشد. گرچه ممکن است به دلیل کم بودن حجم نمونه‌ی موردمطالعه این نتایج حاصل شده باشد ولی به دلیل اختلاف زیاد p از ۰/۰۵، بعید به نظر می‌رسد که با افزایش تعداد نمونه تغییر زیادی در نتایج حاصل شود. در مطالعات آینده

تقدیر و تشکر:

از معاونین محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و نیز سرکار خانم دکتر سیمین همتی متخصص انکولوژی بابت پشتیبانی مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از بیماران مبتلا به سرطان ریه شرکت‌کننده در طرح و کارکنان زحمتکش بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان به دلیل همکاری در طرح سپاسگزاری می‌شود.

منابع:

1. Lu C, Onn A, Vaporciyan AA, et al. Cancer of the lung. Holland-Frei Cancer Medicine. People's Medical Publishing House 2010; 18.
2. Horn L, Pao W, Johnson DH. In Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, Harrison TR. Harrison's principles of internal medicine 2012; 18.
3. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs291/en
4. Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to

ambient air pollution and chronic diseases. Rev Environ Health 2008; 23: 243-297.
5. Davies RJO, Lee YCG. Oxford Textbook Medicine. OUP Oxford 2010; 5:18,19.
6. http://genome.ucsc.edu
7. Chen YM. Update of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors. Journal of the Chinese Medical Association 2013; 76 : 249-257 .
8. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacol Res 2014; 79: 34-74.
9. Reiter JL, et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. Genomics 2001; 71: 1-20.
10. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956
11. http://www.snpedia.com/index.php/EGFR
12. Chu H, et al. EGFR 3'UTR 774T>C polymorphism contributes to bladder cancer risk. Mutagenesis 2013; 28: 49-55.
13. Yuan Z, et al. An A13 repeat within the 3'-untranslated region of epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequently mutated in microsatellite instability colon cancers and is associated with increased EGFR expression. Cancer Res 2009; 69: 7811-7818.
14. Donzelli S, Mori F, Biagioni F, Bellissimo T, Pulito C, Muti P, Strano S, Blandino G. MicroRNAs: short non-coding players in cancer chemoresistance. Mol Cell Ther 2014; 2: 16.
15. http://mirdsnp.ccr.buffalo.edu/gene_display?id=4d88de4a7a87940f06002ce6&a=tscan&hd=0
16. Jiang J, Lv X, Fan L, Huang G, Zhan Y, Wang M, Lu H. MicroRNA-27b suppresses growth and invasion of NSCLC cells by targeting Sp1. Tumour Biol 2014; 35: 10019-10023.
17. Weiss GJ, et al. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. Ann Oncol 2008; 19: 1053-1059.
18. Wan L, Zhang L, Fan K, Wang J. MiR-27b targets LIMK1 to inhibit growth and invasion of NSCLC cells. Mol Cell Biochem 2014; 390: 85-91.
19. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Biochim Biophys Acta 2010; 1803: 1231-1243.
20. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol 2007; 23: 175-205.
21. Salzman DW, Weidhaas JB. SNPing cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. Pharmacol Ther 2013; 137: 55-63.
22. Zhou S, Li M, Zeng D, Xu X, Fei L, Zhu Q, Zhang Y, Wang R. A single nucleotide polymorphism in 3' untranslated region of epithelial growth factor receptor confers risk for pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. Cell Physiol Biochem 2015; 36: 166-178.
23. Choi JE, et al. Polymorphisms in the epidermal growth factor receptor gene and the risk of primary lung cancer: a case-control study. BMC Cancer 2007; 7: 199.
24. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 1988; 16: 1215.
25. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/?gts=rs884225.