

بررسی همبستگی پلی مورفیسم (rs11614913) ژن miR-196a-2 با شانس ابتلا به سرطان روده بزرگ در جمعیت تهران

هانیه میرطالبی^۱، میترا حیدری نصر آبادی^۲، محمد امین پورحسینقلی^۳، حمید اسدزاده عقدایی^۴

^۱ کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند

^۲ دانشیار، زیست شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند

^۳ استادیار، دکتری تخصصی آمار، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۴ استادیار، فوق تخصص گوارش و کبد، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص زودهنگام سرطان روده بزرگ از چالش‌های بزرگ بالینی است. شناسایی و مطالعه پلی مورفیسم در میکروریبونوکلیک اسیدها (میکرو RNAها) نقش بسزایی در به کارگیری آنها به عنوان بیومارکرهای مفید جهت تشخیص زودرس سرطان روده بزرگ دارد. هدف از این مطالعه، بررسی همبستگی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs11614913 ژن miR196a-2 و خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ بود.

روش بررسی: در این مطالعه که به صورت موردی-شاهدی است، ۱۴۹ نمونه بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ و همچنین ۱۴۶ نمونه فرد سالم که به بیمارستان طالقانی شهر تهران مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم روش PCR-RFLP و آنزیم محدودالتر HYPCH4III مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های CC، TT و CT به ترتیب در گروه کنترل ۳۶٪، ۲۴٪ و ۴۰٪ و در گروه بیمار به ترتیب ۴۱٪، ۱۰٪ و ۴۹٪ بود. فراوانی الل C و T به ترتیب در گروه شاهد ۴۲٪ و ۴۸٪ و در گروه بیمار ۳۰٪ و ۷۰٪ بود. از میان ژنوتیپ‌های به دست آمده، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ TT و سرطان روده بزرگ غیر ارثی یافت شد (نسبت شانس ۰/۴، فاصله اطمینان ۹۵ درصد ۰/۰۳-۰/۱۷-۹۲/۰). (p=)

نتیجه‌گیری: نتایج یافت شده در این مطالعه در توالی miR196a-2 بیانگر این مطلب است که تغییرات ایجاد شده در این میکرو RNA بر عملکرد آن اثر گذار بوده و احتمالاً بر میزان حساسیت افراد نسبت به ابتلا به سرطان روده بزرگ مؤثر است.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، میکرو RNA، سرطان روده بزرگ.

مقدمه

که مورد جراحی قرار می‌گیرند بعد از مدتی دچار عود بیماری یا متاستاز می‌گردند. یکی از عمده‌ترین چالش‌های بالینی این بدخیمی تشخیص دیرهنگام است. لذا انجام مطالعات مولکولی که منجر به شناخت بیومارکرهای زیستی گردد، از اهمیت بالینی برخوردار است. تاکنون مطالعات گسترده‌ای نشان داده میکروریبونوکلیک اسیدها (میکرو RNAها)، بیومارکرهای نوین و مفیدی برای تشخیص زودرس، پیش‌آگهی و درمان سرطان روده بزرگ هستند.

بیماری سرطان روده بزرگ سومین بیماری شایع و چهارمین سرطان کشنده در دنیا است (۱) و متأسفانه علیرغم دسترسی به روش‌های درمانی مانند جراحی و شیمی‌درمانی هنوز پیش‌آگهی این بیماری ناامید کننده است و بسیاری از بیماران

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، دکتر میترا حیدری نصر آبادی

(email: heydari_nasr@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۲۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۸

تاثیر آنزیم محدودگر HPYCH4III قرار گرفت. توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای جایگاه miR196a-2 به شرح ذیل است:

Forward: 5'-GTCTACTCTCTAGTCCTTAGG-3'
Reverse: 5'-TTGAGAGGACGGCATAAAGC-3'

این پرایمرها محصولی به طول ۳۸۳ جفت باز را تکثیر می‌کنند. واکنش زنجیره پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتری با ترموسایکلر و برنامه زیر در ۳۵ سیکل صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، آنیلینگ ۴۰ ثانیه در ۵۵/۲ درجه سانتی گراد، طولیل شدن ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و طولیل شدن نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد. محصولات تکثیر یافته تحت تاثیر آنزیم محدودگر HPYCH4III در دمای ۳۷ درجه به مدت ۸ ساعت قرار گرفتند. نمونه‌ها جهت بررسی بر روی ژل ۳٪ آگارز با رنگ آمیزی DNA Green viewer الکتروفورز گردید. اطلاعات به دست آمده از مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS تحلیل شدند و احتمال p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین سنی افراد شاهد $44/9 \pm 16/3$ سال و افراد بیمار $62/9 \pm 13/9$ سال بود. همچنین تعداد مردها در گروه شاهد کمتر از گروه بیمار بود که این موارد پس از اتمام مطالعه با روش آماری رگرسیون لجیستیک همسان سازی شد. پیشینه افراد از نظر مصرف سیگار، الکل و اعتیاد در هر دو گروه در جدول ۱ خلاصه شده است و رابطه معنی داری میان متغیرهای جنس و مصرف الکل و اعتیاد با افزایش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ یافت شد. نمونه‌های DNA افراد گروه بیمار و افراد گروه شاهد برای ناحیه ژنی rs11614913 تکثیر شدند. پس از انجام واکنش PCR برای تایید، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ برده شد و طول قطعه حاصله با طراحی پرایمر مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. در مورد پلی مورفیسیم rs11614913 طول قطعه مورد نظر ۳۸۳ نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۱) که برای تایید طول قطعه با داده‌های پایگاه NCBI مقایسه شد. توالی مورد نظر حاوی پلی مورفیسیم rs11614913 پس از تکثیر قطعه مورد نظر در ژن miR196A2 توسط واکنش PCR، تحت اثر آنزیم HPY CH4III قرار گرفته و بریده شد (شکل ۲).

در توزیع ژنوتیپ برای افراد بیمار، ۱۵ نفر هموزیگوت نادر TT (۱۰٪)، ۷۳ نفر هتروزیگوت CT (۴۹٪) و ۶۱ نفر هموزیگوت

میکرو RNA ها، ریبونوکلئیک اسیدهای کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که از نظر تکاملی محافظت شده و معمولاً بین ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید دارند (۲) و بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها، کنترل می‌کنند (۳، ۴). عملکرد نهایی آن‌ها در بیولوژی سلولی منجر به کنترل فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک سلولی می‌شود. لذا اختلال در بیان آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان کبد، پانکراس، مری، معده، روده بزرگ و بیماری‌های قلبی و عصبی در ارتباط است (۵-۸). یکی از مهم‌ترین میکرو RNA ها miR-196 است که شامل سه ژن است. این گروه از میکرو RNA ها در تنظیم بیان ژن‌های خانواده HOX، ژن‌هایی که در تکوین جنینی ضروری هستند، نقش به سزایی دارند (۹). یکی از این سه ژن، miR196a-2 است که جایگاه آن بین HOXC9 و HOXC10 در کروموزوم ۱۲ می‌باشد و نقش مهمی در تعامل با خانواده ژن‌های HOX ایفا می‌کند (۱۰). این مطالعه با هدف مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی (SNP) miR-196-a2 ژن در بیماران سرطان روده بزرگ با افراد شاهد و نقش این پلی مورفیسیم در خطر ابتلا به این بدخیمی انجام گردیده است.

مواد و روشها

مطالعه به صورت مورد-شاهدی از افراد مراجعه کننده به بخش گوارش بیمارستان طالقانی تهران صورت گرفت. گروه بیماران شامل ۱۴۹ فرد مبتلا به سرطان روده بزرگ، که از نظر پاتولوژی و کولونوسکوپی بدخیمی در همه موارد تأیید شده بود و همچنین گروه شاهد ۱۴۶ فرد سالم، که مورد کولونوسکوپی قرار گرفتند و گزارش مذکور به همراه پاتولوژی در موارد مشکوک، وجود سرطان روده بزرگ را در گروه شاهد منتفی کرده بود. همه افراد بیمار و شاهد به صورت اختیاری و با آگاهی وارد این طرح شدند و رضایت نامه مورد تأیید کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گواش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی را امضا کردند.

استخراج DNA ژنومی از خون محیطی افراد با روش استاندارد نمکی انجام شد. واکنش PCR-RFLP برای SNP مورد نظر انجام شد. همچنین برای انجام واکنش PCR نیاز به پرایمر اختصاصی و حساسیت برای جایگاه مورد نظر بود. برای این کار طراحی پرایمر با استفاده از بانک اطلاعات Pubmed و نرم افزار Gene Runner انجام شد و محصول به دست آمده تحت

جدول ۱. متغیر های جمعیت شناختی در گروه شاهد و بیمار

P-value	بیمار(درصد)	شاهد(درصد)	متغیر ها
۰/۰۰۶			جنسیت
	۸۸(۵۹/۱)	۶۴(۴۳/۸)	مرد
	۶۱(۴۰/۹)	۸۲(۵۶/۲)	زن
۰/۱۸			مصرف سیگار
	۲۳(۱۵/۵)	۱۵(۱۰/۳)	دارد
	۱۲۶(۸۴/۶)	۱۳۱(۸۹/۷)	ندارد
۰/۰۰۳			مصرف الکل
	۱۷(۱۱/۴)	۳(۲/۱)	دارد
	۱۳۲(۸۸/۶)	۱۴۳(۹۷/۹)	ندارد
۰/۰۱			اعتیاد
	۱۰(۶/۴)	۱(۷)	دارد
	۱۳۸(۹۳/۶)	۱۴۵(۹۹/۳)	ندارد

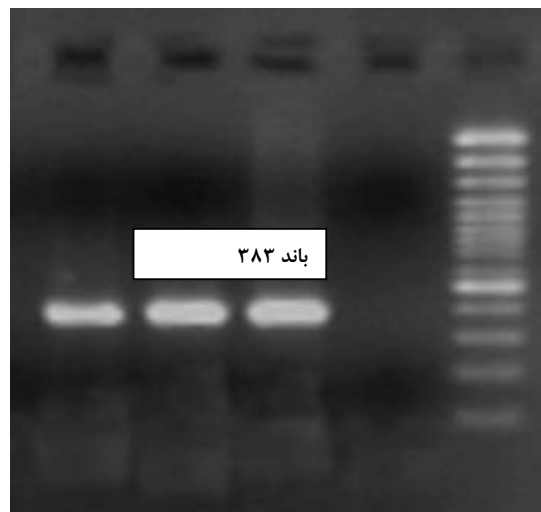
جدول ۲. توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسیم rs:11614913 و فراوانی الل در دو گروه شاهد و بیمار

P-value	فاصله اطمینان درصد	نسبت شانس	بیمار (درصد)	شاهد (درصد)	SNP
۰/۰۳	۰/۱۷-۰/۹۲	۰/۴	۱۵(۱۰)	۳۵(۲۴)	TT
۰/۷	۰/۴۸-۱/۶۳	۰/۸	۷۳(۴۹/۱)	۵۹(۴۰/۴)	CT
		مرجع	۶۱(۴۰/۹)	۵۲(۳۵/۶)	CC
					فراوانی الل
		مرجع	۶۹/۵	۵۸/۲	C
۰/۰۸	۰/۴۷-۱/۰۴	۰/۷۰	۳۰/۵	۴۱/۸	T

بحث

بروز سرطان روده بزرگ در سه دهه اخیر در ایران افزایش قابل توجهی داشته است. جهش های متوالی در ژن های انکوژن یا مهار کننده سرطان (Tumor suppressor gene) از کلیدی ترین مسیر های مولکولی در رشد گسترش سرطان روده بزرگ است (۱۱). میکرو RNA ها می توانند به عنوان انکوژن و یا مهار کننده تومور (Oncomir) از طریق مهار ژن های هدف وابسته به سرطان عمل کنند. لذا مطالعه آنها به عنوان نشانگرهای مناسبی جهت تشخیص سرطان می تواند مفید باشند (۱۲، ۱۳). تاکنون مطالعات گسترده نشان از ارتباط پلی مورفیسیم rs11614913 ژن miR196-a2 با خطر ابتلا به بسیاری از بدخیمی ها داده است (۱۴-۱۶). برای مثال، Hu و همکارانش در سال ۲۰۰۸ گزارش کرده اند که ژنوتیپ هموزیگوت CC از rs11614913 واقع در miR-196a2 با سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) متناسب بوده و به طور معناداری پیش آگهی ضعیفی برای این بیماری ارائه داده

CC (۴۱٪) بودند. در توزیع ژنوتیپ برای افراد سالم، ۳۵ نفر هموزیگوت نادر TT (۲۴٪)، ۵۹ نفر هتروزیگوت CT (۴۰٪) و ۵۲ نفر هموزیگوت CC (۳۶٪) بودند.



شکل ۱. نتیجه PCR برای توالی مورد نظر از چپ به راست: سایز مارکر ۱۰۰ (ladder)، کنترل منفی، کنترل مثبت، ۱ و ۲ باند قطعه تکثیر شده با PCR ژن miR196A2



شکل ۲. RFLP با آنزیم HPYCH4III از چپ به راست: سایز مارکر ۱۰۰ (ladder)، ۲۵۴ ژنوتیپ C/C، ۲۴۷ ژنوتیپ T/T، ۲۴۶ ژنوتیپ C/T

فراوانی الل T و C به ترتیب در گروه شاهد ۴۲٪ و ۴۸٪ و در گروه بیمار ۳۰٪ و ۷۰٪ بود. توزیع ژنوتیپی و الی پلی مورفیسیم ژن miR-196a-2 rs11614913 در دو گروه بیمار و شاهد در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج این مطالعه ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ TT و احتمال کاهش ابتلا به سرطان دیده شد (نسبت شانس ۰/۴، فاصله اطمینان ۹۵ درصد (p=۰/۰۳؛ ۰/۱۷-۹۲/۰).

فاکتورهای ارزیابی پیشروی CRC از جمله تمایز تومور، مرحله سرطان، گرفتاری غدد لنفاوی و متاستاز گزارش کرده‌اند (۱۸). جالب توجه است که در مطالعه دیگر در کشور چین که توسط Peng و همکاران بر روی بیماران مبتلا به سرطان معده صورت گرفته، افراد دارای ژنوتیپ CC برای ژن miR-196a-2 خطر ابتلای بالاتری را به بیماری در مقایسه با افراد حامل هموزیگوت TT و هتروزیگوت CT نشان داده‌اند. لذا به نظر می‌رسد ال C در جامعه بیماران مبتلا به سرطان دستگاه گوارش کشور چین از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۰). تفاوت نتایج این مطالعه و مطالعات بیان شده می‌تواند ناشی از تفاوت در فاکتورهای مختص جمعیت‌ها مانند سوابق ژنتیکی گوناگون گروه‌های مورد مطالعه، تاثیر عوامل محیطی مانند تغذیه باشد که می‌تواند در کنار عوامل ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف متفاوت بوده و باعث افزایش و یا کاهش احتمال ابتلا به بیماری شود.

با توجه به بررسی‌های انجام شده بر روی این پلی مورفیسم و سرطان روده در جمعیت ایرانی به این نتیجه می‌رسیم که این پلی مورفیسم می‌تواند به عنوان یک عامل کاهش شانس ابتلاء برای تشخیص سرطان روده بزرگ استفاده شود. از آنجایی که یافتن عامل خطر برای افراد در معرض ابتلا به سرطان همیشه یک چالش بزرگ در علم پزشکی بوده است، استفاده از این پلی مورفیسم در بررسی ژنتیکی بر روی افراد می‌تواند به عنوان عاملی برای پیش آگهی به کار رود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صورت پذیرفته و حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد هانیه میرطالبی بوده است.

است (۱۷). همچنین در مطالعه Hoffman و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی بیماران دارای سرطان سینه مشخص شد که ژنوتیپ هموزیگوت نادر (TT) ارتباط مستقیمی با کاهش شانس ابتلا به سرطان سینه نشان دارد (۱۴). بررسی مطالعات صورت گرفته در سرطان کولورکتال نشان می‌دهد که در مورد نقش rs11614913 در پیش آگهی بیماری اختلاف نظر وجود دارد (۱۸). در این مطالعه توزیع ژنوتیپی و الی پلی مورفیسم C/T برای اولین بار در جمعیت ایرانی بیماران سرطان کولورکتال مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود آیا این پلی مورفیسم می‌تواند به عنوان فاکتور ژنتیکی مرتبط با بروز سرطان کولورکتال در نظر گرفته شود؟ شیوع ژنوتیپ‌ها و ال‌های به دست آمده در این مطالعه بسیار شبیه به شیوع ژنوتیپ‌ها و ال‌های به دست آمده در جامعه بیماران سرطان روده بزرگ قفقازی است، در صورتی که به صورت قابل توجهی با مطالعه صورت گرفته در چین متفاوت است (۱۶). این تفاوت می‌تواند ناشی از قرابت‌های ژنتیکی و اجتماعی جامعه ایرانی با جامعه مورد نظر باشد. البته بررسی‌های بیشتر در قومیت‌های متفاوت ایران در جمع بندی این دید کمک شایانی می‌کند. در این مطالعه، بر خلاف دو مطالعه دیگری که بر روی نمونه‌های کولورکتال انجام گرفته بود، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ TT و سرطان روده بزرگ غیر ارثی یافت شد. Hezoa و همکاران در سال ۲۰۱۲ که به بررسی ۱۹۷ بیمار دارای سرطان روده بزرگ غیر ارثی و ۲۱۲ فرد شاهد در جمعیت اروپایی پرداختند و گزارشی ارائه کردند که هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم miR-196a2 و خطر ابتلا به CRC وجود ندارد (۱۶) و البته این یافته در مطالعه Chen و همکارانش نیز به دست آمد (۱۹).

از سوی دیگر، Zhan و همکاران آل C را به عنوان فاکتور خطری برای CRC در جمعیت چینی توصیف کرده‌اند. اگرچه هیچ گونه ارتباطی بین پلی مورفیسم rs11614913 و

REFERENCES

- Li C, Li Y, Gao L-B, Wang Y-Y, Zhou B, Lv M-L, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer in a Chinese population. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 634-39.
- Storz G, Opdyke JA, Zhang A. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 140-44.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
- Azizmzadeh P, Romani S, Mohebbi SR, Mahmoudi T, Vahedi M, Fatemi SR, et al. Association of polymorphisms in microRNA-binding sites and colorectal cancer in an Iranian population. *Cancer Genet* 2012; 205: 501-507.
- Novakova J, Slaby O, Vyzula R, Michalek J. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 1-5.
- Kocerha J, Kauppinen S, Wahlestedt C. microRNAs in CNS disorders. *Neuromolecular Med* 2009; 11: 162-72.

7. Zhou B, Rao L, Peng Y, Wang Y, Chen Y, Song Y, et al. Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1287-1290.
8. Qi P, Dou T-h, Geng L, Zhou F-g, Gu X, Wang H, et al. Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol* 2010; 71: 621-626.
9. Tanzer A, Amemiya CT, Kim CB, Stadler PF. Evolution of microRNAs located within Hox gene clusters. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2005; 304:75-85.
10. Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* 2003; 9: 112-123.
11. Wang WS, Chen PM, Su Y. Colorectal carcinoma: from tumorigenesis to treatment. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:663-71.
12. Wouters MD, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Pothof J. MicroRNAs, the DNA damage response and cancer. *Mutat Res* 2011; 717: 54-66.
13. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett* 2009; 285: 116-26.
14. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res* 2009; 69: 5970-77.
15. Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, Jin G, et al. A Functional Genetic Variant in microRNA-196a2 Is Associated with Increased Susceptibility of Lung Cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1183-1187.
16. Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Redova M, Vasku A, et al. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2827.
17. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 2008; 118: 2600.
18. Zhan J-f, Chen L-h, Chen Z-x, Yuan Y-w, Xie G-z, Sun A-m, et al. A functional variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility of colorectal cancer in a Chinese population. *Arch Med Res* 2011; 42: 144-48.
19. Chen H, Sun LY, Chen LL, Zheng HQ, Zhang QF. A variant in microRNA-196a2 is not associated with susceptibility to and progression of colorectal cancer in Chinese. *Intern Med J* 2012; 42: e115-e119.
20. Peng S, Kuang Z, Sheng C, Zhang Y, Xu H, Cheng Q. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2288-93.