

Evaluation of NQO1 Polymorphism in Gastric Adenocarcinoma

Yahya Saleh Tabari¹,
Ommolbanin Bakhshi²,
Abbas Mohammadpour³,
Vahid Hoseini⁴,
Hamed Haghi Aminjan⁵,
Mohammad Shokrzadeh⁶

¹ PhD Student in Toxicology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Student in Pharmacy, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Student in Cell and Molecular Biology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Gastrointestinal Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ PhD Student in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶ Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 25, 2016, Accepted December 11, 2017)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is the second most common cause of cancer worldwide and despite huge advances in treatments, the chance of survival is very low even in surgery cases. Having a genetic predisposition plays an important role in cancer development. Polymorphisms in the NQO1(NAD(P)H Quinone dehydrogenase 1) gene could affect the activity of the gene and also the susceptibility to gastric cancer. The aim of this study was to evaluate the effect of the polymorphism of NQO1 gene on gastric cancer.

Materials and methods: This case-control study was performed in 100 patients with gastric cancer and 100 healthy individuals as benchmarks. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Then, genotyping for detecting NQO1 -609 C>T promoter gene polymorphism was carried out using PCR-RFLP. Data analysis was performed in MedCalc V9.

Results: NQO1 rs1800566 allelic and genotypic frequencies were not significantly different between the patients and controls ($P= 0.14$ $\chi^2= 2.16$)

Conclusion: Screening of -609C>T NQO1 polymorphism was not found as a useful marker in detecting personal sensitivity to gastric cancer, therefore, would not be helpful in gastric cancer prevention and treatment processes.

Keywords: NQO1 promoter, gastric cancer, genetic polymorphism, PCR, RFLP-PCR

بررسی پلی مورفیسم ژن NQO1 در آدنوکارسینوم معده در استان مازندران، شمال ایران

یحیی صالح طبری^۱
ام البنین بخشی^۲
عباس محمدپور^۳
وحید حسینی^۴
حامد حقی امینجان^۵
محمد شکرزاده^۶

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده، دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از بدخیمی‌ها در سراسر جهان بوده و علیرغم پیشرفت‌های زیاد در درمان حتی در موارد قابل جراحی، شانس زنده ماندن بسیار پایین می‌باشد. داشتن استعداد ژنتیکی نقش مهمی در پیشرفت سرطان معده دارد. پلی مورفیسم ژن NQO1 (NAD(P)H Quinone dehydrogenase 1)، می‌تواند بر فعالیت این ژن و در نتیجه استعداد ابتلا به سرطان معده تاثیر گذار باشد. هدف این مطالعه، تعیین اثر پلی مورفیسم ژن NQO1 بر روی سرطان معده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد - شاهدی تعداد ۱۰۰ فرد مبتلا به سرطان معده و ۱۰۰ فرد سالم از نظر پلی مورفیسم در ناحیه C> T 609 پروموتورژن NQO1 مورد ارزیابی قرار گرفت. DNA ژنومی افراد مورد مطالعه از سلول‌های سفید خون محیطی استخراج شده و با استفاده از روش RFLP-PCR به بررسی ژنوتیپی در ناحیه C> T 609 پروموتور ژن NQO1 در دو گروه پرداخته شد. آنالیز آماری، با استفاده از نرم افزار Medcalc نسخه ۹، صورت پذیرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان می‌دهد که غربالگری پلی مورفیسم ژن NQO1 (C> T 609) نمی‌تواند به عنوان یک نشانگر مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و کمک به راهکارهای پیشگیری و درمانی در افراد مستعد مورد استفاده قرار گیرد.

استنتاج: این مطالعه نشان می‌دهد که غربالگری پلی مورفیسم ژن NQO1 (C> T 609) نمی‌تواند به عنوان یک نشانگر مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و کمک به راهکارهای پیشگیری و درمانی در افراد مستعد مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پروموتور NQO1، سرطان معده، چندشکلی ژنی، RFLP-PCR

مقدمه

ژنتیکی نقش مهمی در پیشرفت سرطان معده دارد. رادیکال‌های آزاد می‌توانند در سرطان‌زایی و تخریب DNA نقش داشته باشند، افزایش در میزان رادیکال‌های آزاد موجود در بدن می‌تواند منجر به ایجاد استرس

سرطان معده دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از بدخیمی‌ها در سراسر دنیا بوده و علیرغم پیشرفت‌های زیاد در درمان، حتی در موارد قابل جراحی، بیماران دارای بقای پایین تر از پنج سال می‌باشند (۱). حساسیت

Email: mslamuki@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد شکرزاده - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی دکتری داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان معده و روده، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۶. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۱۱/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۹/۲۰

می‌شود مورد بررسی قرار خواهد گرفت (۷، ۸). شناسایی پلی مورفیسم‌های ژنتیک افراد مبتلا به سرطان معده، علاوه بر کمک به شناخت مکانیسم بیماری، در شناسایی و غربالگری افراد مستعد به بیماری و در نتیجه پیشگیری از آن موثر است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی شامل ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان معده مراجعه کننده به کلینیک طوبی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، می‌باشد که هیچ‌گونه سابقه خانوادگی سرطان معده نداشته‌اند و براساس نتایج بررسی‌های آندوسکوپی و پاتولوژی توسط پزشک متخصص شناسایی شده‌اند. هم‌چنین تعداد ۱۰۰ فرد سالم که بر اساس سن، جنس و محل زندگی استان مازندران همسان‌سازی شده بودند به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ژنومی توسط کیت استخراج DynaBio شرکت تکاپو زیست، برای نمونه‌ها استفاده شد و از لوکوسیت‌های خون محیطی استخراج DNA انجام شد. به منظور بررسی کیفیت و میزان DNA استخراج شده، از اسپکتروفتومتر استفاده گردید. بعد از بررسی کیفیت DNA استخراج شده از افراد کنترل و بیمار، جهت آماده سازی نمونه‌های لازم جهت PCR به مقدار ۲ میکرولیتر از نمونه مورد نظر را با ۱۲٫۵ میکرولیتر از mastermix و ۰٫۸ میکرولیتر از پرایمرهای مربوطه را با هم مخلوط شد و در نهایت با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه bio-rad طبق برنامه جدول ۱ انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای حصول اطمینان از تکثیر، محصول بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و

اکسیداتیو و افزایش احتمال بدخیمی‌ها شود (۱، ۲). آنزیم اکسیدوردوکتاز است که نقش مهمی در سم زدایی و آسیب وارده توسط رادیکال‌های کوئینون و مشتقات آن را بر عهده دارد (۳). عملکرد این آنزیم شامل احیا کردن کوئینون و ترکیبات نیترو-کوئینون و ازوکینون و ایجاد فرم‌های غیر اکسیدانت از ویتامین E و یوبی کوئینون می‌باشد (۴). این آنزیم به مقدار زیادی در کلیه، معده، سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفس و در سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها وجود دارد و هم‌چنین در کبد، کولون و سینه نیز به مقدار اندکی یافت می‌شود (۶، ۵).

مطالعات زیادی به منظور بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم NQO1 Pro187Ser و خطر ابتلا به سرطان انجام شده است. سن یانگ و همکاران با جمع‌آوری مجموع ۱۵ مطالعه، از جمله ۴۲۹۸ بیمار و ۴۲۷۵ کنترل و در مطالعه وین ژانگ و همکاران با جمع‌آوری مجموع ۲۲ مطالعه شامل ۵۲۷۴ بیمار و ۶۴۵۹ کنترل، با وجود برخی محدودیت‌ها، با تجزیه و تحلیل داده‌ها دریافتند شواهد کافی که پلی مورفیسم NQO1 Pro187Ser ممکن است کمک به بروز سرطان کند. این یافته‌ها از اقوام مختلف می‌باشد. ژن NQO1 بر روی کروموزوم 16q22.1 قرار دارد و متشکل از شش اگزون و پنج اینترون می‌باشد و به طور گسترده‌ای در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی بررسی شده است (۷، ۸).

با توجه به شیوع بالای آدنوکارسینوم‌های معده پیشرفته غیر قابل جراحی و پاسخ پایین بیماران به درمان‌های رایج (جراحی، رادیوتراپی و کموتراپی) در مازندران و هم‌چنین به علت نقشی که پلی مورفیسم NQO1 در ایجاد سرطان می‌تواند داشته باشد، در این مطالعه پلی مورفیسم ناحیه T > C موقعیت نوکلئوتیدی ۶۰۹ ژن NQO1 که باعث انتقال C-به-T در کدون ۱۸۷، اگزون شش و اسید آمینه پرولین به سرین تعویض

سپس با استفاده از دستگاه ژل داک شناسایی محصول صورت گرفت (۹).

یافته ها و بحث

برای این پلی مورفیسم سه حالت ژنوتیپی CT، TT و CC وجود دارد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Med calc صورت گرفت و اختلاف معنی داری بین دو گروه بیمار و کنترل نشان نداد ($P=0,14$) توزیع فراوانی ژنوتیپی در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳: نتایج مربوط به فراوانی ژنوتیپ های مشاهده

شده در پلی مورفیسم rs1800566 NQO1 ژن				
P	n گروه کنترل (n)	n گروه بیمار (n)	ژنوتیپ	زن
0,14	80 (80)	70 (70)	CC	
	20 (20)	30 (30)	CT	NQO1
	0 (0)	0 (0)	TT	

بررسی فراوانی آللی NQO1

بر اساس نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون Chi-Square ($P=0,26$)، $(x^2=1,22)$ ، چون P-value کمتر از 0,05 نمی باشد، بنابراین تفاوت معنی داری در توزیع آللی، بین دو گروه بیمار و کنترل وجود ندارد.

جدول شماره ۴: بررسی فراوانی آللی NQO1

P	X ²	گروه کنترل (درصد)	گروه بیمار (درصد)	ژنوتیپ	ژن
0,17	1,85	90	85	G	
		10	15	A	NQO1

مطالعه جینگ چن و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی اثرات پلی مورفیسم NAD(P)H کوئینون اکسیدوردوکتاز (NQO1 1800566Serrrs187Pro) حاکی از افزایش ریسک سرطان کولورکتال می باشد (۱۰). زیان و همکاران در سال ۲۰۱۳ و دینگ همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی رابطه بین پلی مورفیسم NQO1 C>T609 و سرطان کولورکتال در جمعیت چین پرداختند و نتایج مطالعات آنها به این صورت بیان شد که پلی مورفیسم NQO1 C>T 609 نقش مهمی در پیشرفت سرطان کولورکتال ایفا می کند اما مطالعه یو و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی رابطه

جدول شماره ۱: برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن

NQO1	
Denaturing-1	در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل
Annealing-2	در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
Extension-3	در دمای ۵۹ درجه ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
	در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
	در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه یک سیکل

پس از مشاهده قطعه مورد نظر، برای هضم آنزیمی ۸ میکرولیتر از محصول PCR جایگاه T >C را با ۱ میکرولیتر از بافر x10 آنزیم و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم محدود الاثر (Thermo fisher) hinfI که در نهایت با آب مقطر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد.

جدول شماره ۲: ویژگی پرایمر

محل برش	توالی پرایمر	آنزیم محدود الاثر	محصول PCR
C>T rs 1800566	Forward: TACTGAGAAGCCAGACCAAC Reverse: CTCACAGCGTTCTCCATC	HinfI	T: ۸۳+۱۲۸bp C: ۲۰۹bp

پس از اتمام زمان مجاورت با آنزیم محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بر اساس شرایط فوق الکتروفورز شد.



شکل شماره ۱: ژل آگارز ۱/۵٪ مربوط به RFLP جهت بررسی پلی مورفیسم rs1800566 NQO1؛ مارکر ۱۰۰ جفت بازی. قطعات بازی ۱۲۶، ۲۰۹ و ۸۳ جفت بازی قابل رویت و با فلش مشخص شده است. شماره های شماره ۱: کنترل منفی، شماره ۲: محصول PCR و شماره ۳: افراد هموزیگوت طبیعی (CC)، شماره ۴: هتروزیگوت موتانت (TC)

جغرافیایی و با تعداد بیش تر افراد و هم چنین روی خزانه ژنتیکی متفاوت صورت گیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است که محققان تشکر و قدردانی خود را از آن معاونت محترم اعلام می دارند. (کد اخلاق پزشکی از کمیته اخلاق علوم پزشکی مازندران: IR.MAZUMS.REC.96.1440).

بین پلی مورفیسم ژن NQO1 609 C>T C>T و سرطان های دستگاه گوارش پرداختند و متا آنالیز آن ها نشان داد که آلل T 609 NQO1 ارتباط چندانی با بروز سرطان دستگاه گوارش ندارد و این مطالعه با تحقیق ما هم سویی دارد (۱۱، ۱۲). پیشنهاد می شود که برای اینکه بتوان با قاطعیت بیش تری نسبت به میزان رابطه پلی مورفیسم ژن NQO1 و سرطان معده دست یافت، تعداد بیش تری از SNP های این ژن و دیگر ژن های دخیل بررسی و در افراد متفاوت از لحاظ نژاد، مناطق

References

1. Shokrzadeh M, Fattahi I, Mohammadpour A, Mashhadban AH. Presence of CagA Gene and Its Antibiotic Resistance Pattern in Helicobacter Pylori Isolates. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2017 Nov 15;27(154):60-72.
2. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J. 2007;401(1):1-11.
3. Zhang Y, Wang Z, Zhong J. Meta-analysis demonstrates that the NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) gene 609 C> T polymorphism is associated with increased gastric cancer risk in Asians. Genet Mol Res. 2012;11(3):2328-2337.
4. Akkiz H, Bayram S, Bekar A, Akgollu E, Ulger Y, Kaya BY, et al. No association of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish subjects. Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11(4):1051-1058.
5. Huang X, Dong Y, Bey EA, Kilgore JA, Bair JS, Li L-S, et al. An NQO1 substrate with potent antitumor activity that selectively kills by PARP1-induced programmed necrosis. Cancer Res. 2012;72(12):3038-3047.
6. Lee JC, Espéli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, et al. Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. Cell. 2013;155(1):57-69.
7. Yang S, Jin T, Su HX, Zhu JH, Wang DW, Zhu SJ, et al. The association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and bladder cancer susceptibility: a meta-analysis of 15 studies. PloS one. 2015 Jan 20;10(1):e0116500.
8. Zhang Y, Yang D, Zhu JH, Chen MB, Shen WX, He J. The association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and urinary system cancer susceptibility: a meta-analysis

- of 22 studies. Cancer investigation. 2015;33(2):39-40.
9. Shokrzadeh M, Rahbari Jeyd P, Mohammadpour A, Zaboli F, Mohammadnejad FZ, Ghaffari Charati M, Saleh Tabari Y. Frequency of *exoT* and *exoS* Genes among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates and Antibiotic Resistance in Burn Patients in Sari Zare Hospital, Iran. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2017 Nov 15;27(154):51-9.
 10. Jing C, Yuan L, Ru Z, Zhi-jie Huang, Xing-guo P. Contribution of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase1 (NQO1) Pro187Ser Polymorphism and Risk of Colorectal Adenoma and Colorectal Cancer in Caucasians: A Meta-analysis.; Arch Med Res.2012;43(1): 58-66.
 11. Peng X-E, Jiang Y-Y, Shi X-S, Hu Z-J. NQO1 609C> T polymorphism interaction with tobacco smoking and alcohol drinking increases colorectal cancer risk in a Chinese population. Gene. 2013;521(1):105-110.
 12. Yu H, Liu H, Wang L-E, Wei Q. A functional NQO1 609C> T polymorphism and risk of gastrointestinal cancers: a meta-analysis. PLoS One. 2012;7(1):e30566.