

Increased Risk of Gastric Cancer with VNTR Polymorphism of SIRT3 Gene

Saghar Mohammadi¹,
Parisa Mohamadynejad²,
Mehdi Moghanibashi³

¹ MSc in Genetics, Faculty of Science, Islamic Azad University, Ashkezar Branch, Yazd, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

³ Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Sciences, Islamic Azad university, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

(Received october 17, 2016 Accepted may 29, 2017)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is the most common cancer associated with high mortality worldwide. One of the genes that is down-regulated in gastric cancer, is the SIRT3 that encodes the histone deacetylase enzyme. There is a variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism in the intron 5 of SIRT3 gene and evidence shows that expression of SIRT3 gene increases by increase in the number of repeats. According to the deregulation of SIRT3 gene expression in gastric cancer and the effect of intron 5 VNTR polymorphism in the transcription, we investigated the association between intron 5 VNTR polymorphism of SIRT3 gene and the risk of developing gastric cancer.

Materials and methods: A case-control study was performed in 116 patients with gastric cancer (attending Isfahan Omid Hospital, Iran) and healthy controls (n= 116). After DNA extraction, all samples were genotyped using PCR and electrophoresis techniques and the results were analyzed applying logistic regression and Chi-square tests.

Results: In addition to the alleles that have been reported so far, alleles with 8 and 9 repeats were observed too, in this study. The results showed that genotype 4-1 increases significantly the risk of gastric cancer (P=0.028, OR= 13.00).

Conclusion: Some variants of intron 5 VNTR polymorphism SIRT3 gene is associated with risk of developing gastric cancer.

Keywords: Gastric Cancer, Polymorphism, SIRT3 Gene, Intron, VNTR.

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (152): 23- 30 (Persian).

SIRT3 ژن VNTR افزایش خطر ابتلا به سرطان معده با چند شکلی

ساغر محمدی¹

پریسا محمدی نژاد²

مهدی مغنی باشی³

چکیده

سابقه و هدف: در سراسر جهان، سرطان معده یکی از شایع ترین سرطان‌ها است که با مرگ و میر بالا همراه است. یکی از ژن‌هایی که در سرطان معده کاهش بیان دارد، ژن SIRT3 می‌باشد که کدکننده آنزیم هیستون داستیلاز است. در اینترون 5 ژن SIRT3 یک چند شکلی (Variable Number Tandem Repeat) VNTR است و مطالعات نشان داده است که با افزایش تعداد تکرارها بیان ژن SIRT3 افزایش می‌یابد. با توجه به تغییر بیان ژن SIRT3 در سرطان معده و نقش VNTR اینترون 5 این ژن در میزان رونویسی، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط چند شکلی VNTR اینترون 5 ژن SIRT3 با خطر ابتلا به سرطان معده انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد - شاهدهی 116 بیمار مبتلا به سرطان معده مراجعه کننده به بیمارستان امید اصفهان و 116 فرد سالم طی سال‌های 1392 تا 1394 شرکت داشتند که پس از استخراج DNA با تکنیک PCR و الکتروفورز ژنوتیپ تمامی افراد تعیین گردید و نتایج حاصل با آزمون‌های آماری رگرسیون لجستیک و X2 آنالیز شد.

یافته‌ها: در این مطالعه علاوه بر آللهایی که تاکنون گزارش شده بود، آللهای با 8 و 9 تکرار نیز مشاهده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ 1-4، با خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط معنی‌داری نشان می‌دهد ($P=0/028$) و 13 (OR=

استنتاج: بعضی از واریانت‌های چند شکلی VNTR اینترون 5 ژن SIRT3 با خطر سرطان معده ارتباط آماری معنی‌داری نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، چندشکلی، ژن SIRT3، اینترون 5، VNTR

مقدمه

سرطان بعد از سرطان ریه در سراسر جهان است (1). مطالعات نشان می‌دهد که بروز سرطان معده در نقاط مختلف جهان متفاوت است به طوری که در شرق آسیا، اروپا و جنوب آمریکا بیشترین و شمال آمریکا و آفریقا کم‌ترین فراوانی را نشان می‌دهد (2).

سرطان معده یکی از سرطان‌های شایع دستگاه گوارش در سراسر جهان می‌باشد و به تنهایی نزدیک به 10 درصد کل سرطان‌ها در جهان را تشکیل می‌دهد. سرطان معده چهارمین سرطان شایع پس از سرطان ریه، سینه و روده بزرگ و دومین علت مرگ و میر ناشی از

مؤلف مسئول: مهدی مغنی باشی - شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

Email: parisa_mohamadynejad@yahoo.com

1. کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

2. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

3. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت: 1395/7/26 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/8/1 تاریخ تصویب: 1396/3/8

سرطان معده در چین، ژاپن، آمریکای جنوبی و اروپای شرقی شایع تر است و مهم ترین بدخیمی در این نواحی محسوب می شود (2).

در ایران 50 درصد سرطان های شایع کشور مربوط به دستگاه گوارش است و از بین سرطان های دستگاه گوارش، سرطان معده از همه شایع تر است و میزان مرگ و میر بسیار بالایی را به خصوص در ناحیه شمال غرب کشور نشان می دهد و هر چه از شمال به سمت جنوب کشور می رویم، میزان مرگ و میر سرطان معده کاهش می یابد (3).

مطالعات اخیر نشان می دهد که حدود 80 تا 90 درصد سرطان های معده تک گیر (Sporadic) و 10 تا 20 درصد خانوادگی (Familial) و حدود 1 تا 3 درصد موارد سرطان معده ارثی می باشد. عوامل محیطی و ارثی در سرطان معده دخیل است. مهم ترین عوامل خطر سرطان معده شامل باکتری هلیکوباکتریلوری، رژیم غذایی سرشار از نمک، چربی و عدم مصرف کافی میوه جات و سبزیجات، سیگار کشیدن و فاکتورهای ژنتیکی می باشد (1، 2).

هنگامی که عوامل ژنتیکی ایجاد کننده سرطان مطالعه می گردد، بیش ترین توجه معطوف به جهش ها می باشد ولی تاکنون جهش های مشخصی که تعیین کننده حتمی ایجاد سرطان باشند برای همه انواع سرطان شناخته نشده است (4). امروزه مطالعات گسترده و متعددی در مورد تغییرات ژنتیکی مانند پلی مورفیسم ها و خطر ابتلاء به انواع سرطان ها صورت می گیرد (5). پلی مورفیسم ها به دو دسته کلی مارکرهای دو آللی (SNP) و (RFLP) و مارکرهای چند آللی (VNTR) و (STR) تقسیم می شوند. وجود میلیون ها پلی مورفیسم ژنی در ژنوم انسان، باعث تنوع ژنتیکی وسیعی بین انسان ها شده است. تاکنون ارتباط چندین پلی مورفیسم VNTR در ژن های مختلف با سرطان معده گزارش شده است (6، 8).

یکی از ژن هایی که در انواع سرطان ها از جمله سرطان معده نقش دارد، ژن SIRT3 می باشد (9) که جزء

خانواده ژنی سیرتوئین ها است که در میتوکندری یافت می شوند (10). این ژن یک آنزیم هیستون داستیلاز وابسته به NAD کد می کند که یک پروتئین 44 کیلو دالتونی است. به طور کلی سیرتوئین ها در متابولیسم سلولی، چرخه سلولی، تقسیم سلولی و تنظیم رونویسی نقش دارند و اختلال در آن ها در پاتوژنز چندین بیماری از جمله بیماری های متابولیک، بیماری های قلبی و عروقی، فرآیند پیری و سرطان ها نقش دارد. آنزیم SIRT3 در اکسیداسیون چربی ها، متابولیسم اسید آمینه ها و انتقال الکترون نقش دارد (11). هم چنین تنظیم کننده اصلی داستیلاسیون پروتئین های میتوکندریایی می باشد (10) و از این طریق چندین مسیر متابولیکی را تحت تأثیر قرار می دهد و در عملکرد میتوکندری و متابولیسم انرژی در شرایط استرس و فقر مواد غذایی نقش مهمی دارد (11).

در سال های اخیر نشان داده شده است که SIRT3 هم چنین در سم زدایی ROS ها نقش دارد (12، 13). مطالعات اخیر انجام گرفته در موش نشان می دهد که عدم بیان SIRT3 یا کاهش بیان SIRT3، استعداد ابتلا به انواع تومورها را افزایش می دهد (14، 15).

در بعضی از سرطان ها مثل کارسینومای مری SIRT3 نقش انکوژنی دارد (16) اما در بعضی از سرطان ها به عنوان سرکوب کننده تومور عمل می کنند. کاهش بیان این ژن در سرطان معده نیز گزارش شده است و به نظر می رسد در سرطان معده به عنوان ژن مهار کننده تومور عمل می کند (9).

ژن SIRT3 روی کروموزوم 11p15.5 می باشد و حاوی 7 اگزون است که در اینترون 5 ژن SIRT3 یک چندشکلی VNTR¹ گزارش شده است که حاوی توالی 72 جفت بازی با 6 آلل یک تا شش تکرار می باشد. این VNTR حاوی توالی تنظیمی رونویسی می باشد و با افزایش تعداد تکرارها، بیان ژن SIRT3 افزایش می یابد (17). هم چنین نشان داده شده است که پروتئین SIRT3

¹ Variable number tandem repeat

5' -3' TTCCTGAAGCTGGGTACA و پرایمر برگشت 5' -3' CATTACCTTCCCAAAGTGG بود که با نرم افزار الیگو طراحی گردید. مواد مورد استفاده در واکنش PCR به صورت 2 μl AMS، 0.6 μl buffer، 0.6 μl dNTP، 1.2 μl MgCl₂، 0.16 μl Taq DNA، 0.6 μl Primer F، Primer R، Polymerase (DNA) Sample، 2 μl و 12,84 μl از آب مقطر استریل با حجم نهایی 20 μl بود. برنامه PCR در 27 سیکل به صورت 1 دقیقه در 95 درجه، 1 دقیقه در 58 درجه و 1 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد انجام شد. علاوه بر این 5 دقیقه در دمای 95 درجه به عنوان دناتوراسیون اولیه و 5 دقیقه در دمای 72 درجه به عنوان طولیل سازی نهایی نیز جزء برنامه بود. برای تعیین ژنوتیپ افراد، محصولات PCR روی ژل آگارز 2/5 درصد به مدت 40 دقیقه الکتروفورز شد.

در نهایت با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 21، آزمون‌های آماری X² و رگرسیون لجستیک ارتباط سرطان معده با چندشکلی VNTR اینترون 5 ژن SIRT3 بررسی شد. قابل ذکر است که سطح معنی داری 0/05 در نظر گرفته شده است.

یافته ها

سن بیماران مورد مطالعه در دامنه سنی 91-2626 تا 91 سال و گروه شاهد 89-2121 تا 89 سال و میانگین سنی بیماران و افراد سالم به ترتیب $58/54 \pm 12/791$ و $56/48 \pm 12/644$ سال می باشد بود و با آزمون t نشان داده شد که از نظر آماری تفاوت معنی داری بین میانگین سنی دو گروه وجود ندارد. 62% درصد بیماران را افراد مبتلا به نوع سرطان معده Intestinal و 30% درصد نوع سرطان معده Diffuse و 8% درصد ناشناخته تشکیل می دادند. هم چنین در 50% درصد بیماران سابقه ابتلا به زخم معده گزارش شده بود.

می تواند با داستیله کردن p53 باعث مهار آپوپتوز شود (18).

از آنجا که اکثر سرطان‌ها از جمله سرطان معده در مراحل ابتدایی شناسایی نمی شوند، تاکنون استراتژی‌های درمانی سرطان‌ها به خصوص سرطان معده که جزء سرطان‌های با درجه کشندگی بالا می باشد، ناموفق بوده است. بنابراین شناسایی و غربالگری افراد مستعد سرطان معده (چندشکلی‌ها می تواند افراد را مستعد بیماری‌های چند عاملی از جمله سرطان‌ها نماید) می تواند راه کاری مناسب در آگاهی دادن به این افراد باشد. با توجه به تغییر بیان ژن SIRT3 در سرطان معده و نقش VNTR اینترون 5 این ژن در میزان رونویسی، در این مطالعه ارتباط چندشکلی VNTR اینترون 5 ژن SIRT3 با خطر ابتلا به سرطان معده بررسی شده است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی (case-control) بوده است و بیماران و افراد گروه کنترل بر اساس جنس و سن ($5 \pm$ سال) همسان سازی شدند به طوری که طی سال‌های 1392 تا 1394 به طور تصادفی از 116 بیمار مبتلا به سرطان معده (32 زن و 84 مرد) مراجعه کننده به بیمارستان امید اصفهان که بیماری آن‌ها توسط پزشک متخصص تایید شده بود و 116 نفر فرد سالم که سابقه هیچ گونه بیماری گوارشی (به خصوص زخم معده) نداشتند به میزان 3 سی سی خون وریدی گرفته شد و در لوله های حاوی EDTA جمع آوری و تا زمان استخراج DNA در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. تمامی افراد فرم رضایت نامه را تکمیل کرده و سپس از آن‌ها نمونه گیری شد.

برای استخراج DNA از کیت ATP (آرش طب پیشرو پارس، ایران) استفاده شد که اساس آن روش Salting out است. سپس با طراحی پرایمرهای مناسب قسمتی از اینترون 5 ژن SIRT3 که حاوی VNTR مورد نظر بود با تکنیک PCR تکثیر شد. توالی پرایمر رفت

3-4 با (17% درصد) و کمترین فراوانی ژنوتیپهای 2-2 (0/8% درصد) و 4-6 با (0/8% درصد) می باشد. هم چنین بیشترین فراوانی ژنوتیپی در افراد سالم ژنوتیپهای 1-1 (16% درصد) و 1-3 (15% درصد) و کمترین فراوانی ژنوتیپهای 4-6 (0/8% درصد) و 5-5 (0/8% درصد) می باشد (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم VNTR اینترون

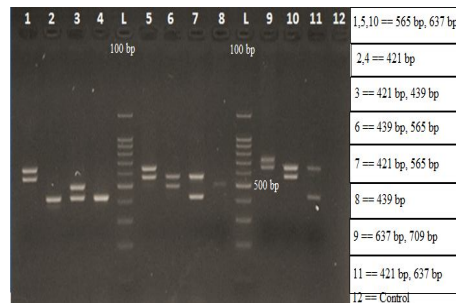
ژنوتیپ	گروه کنترل (درصد)	گروه بیمار (درصد)
1-1	(16/4) 19	(17/2) 20
2-2	(6) 7	(0/9) 1
3-3	(10/3) 12	(11/2) 13
4-4	(6) 7	(5/2) 6
2-1	(8/6) 10	(6/9) 8
3-1	(15/5) 18	(14/7) 17
4-1	(6) 7	(11/2) 13
3-2	(10/3) 12	(12/9) 15
4-2	(5/2) 6	(1/7) 2
4-3	(13/8) 16	(17/2) 20
6-4	(0/9) 1	(0/9) 1
5-1	(0/9) 1	0
کل جمعیت	116	116

توزیع ژنوتیپی در جمعیت بیمار ($P=0/048$) و سالم ($P=0/013$) از تعادل هاردی واینبرگ تبعیت می کند و با توجه به آنالیزهای متعددی که انجام شد، نشان داده شد که ژنوتیپهای 1-4 و 3-4 نسبت به ژنوتیپ 2-2 خطر ابتلا به سرطان معده را به طور معنی داری به ترتیب 13 (OR = 13/00، CI = 1/31 - 128/10) و 8/75 (OR = 8/75، CI = 0/97 - 78/65) برابر افزایش می دهند (جدول شماره 2). قابل ذکر است که ژنوتیپ 3-4 به طور مرزی معنی دار شده است.

جدول شماره 2: ارتباط پلی مورفیسم VNTR اینترون 5 ژن

ژنوتیپ	فراوانی هر گروه کنترل	فراوانی هر گروه بیمار	P	OR (95% CI)
2-2	7	1	-	1
1-1	19	20	0/074	7/36 (0/82-65/66)
3-3	12	13	0/076	7/58 (0/80-71/04)
4-4	7	6	0/137	6/00 (0/56-63/67)
2-1	10	8	0/141	5/60 (0/56-55/42)
3-1	18	17	0/092	6/61 (0/73-59/25)
4-1	7	13	0/028	13/0 (1/31-121/0)
3-2	12	15	0/056	8/75 (0/94-81/25)
4-2	6	2	0/529	2/33 (0/16-32/58)
4-3	16	20	0/053	8/75 (0/97-78/65)
6-4	1	1	0/272	7/00 (21-226/00)
5-1	1	0	1	0/00

پس از انجام PCR و الکتروفورز حضور باند 421 bp نمایان گر آلل با 1، باند 493 bp آلل با 2، باند 565 bp آلل با 3، باند 637 bp آلل با 4، باند 709 bp آلل با 5 و باند 781 bp آلل با 6 تکرار می باشد (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز

2/5 درصد. چاهک های 1، 5، 10، 565 bp و 637 bp به ترتیب نشان دهنده آلل های 3 و 4 (ژنوتیپ 4/3) چاهک های 2 و 4، تک باند 421 bp نشان دهنده آلل 1 تکرار (ژنوتیپ 1/1) - چاهک 3، دو باند 493 bp و 421 bp به ترتیب نشان دهنده آلل های 1 و 2 تکرار (ژنوتیپ 2/1) - چاهک 6، دو باند 493 bp و 565 bp به ترتیب نشان دهنده آلل های 2 و 3 تکرار (ژنوتیپ 3/2) - چاهک 7، دو باند 421 bp و 565 bp به ترتیب نشان دهنده آلل های 1 و 3 تکرار (ژنوتیپ 3/1) - چاهک 8، دو تک باند 493 bp نشان دهنده آلل 2 تکرار (ژنوتیپ 2/2) - چاهک 9، دو باند 637 bp و 709 bp به ترتیب نشان دهنده آلل های 4 و 5 تکرار (ژنوتیپ 5/4) - چاهک 11، دو باند 421 bp و 637 bp به ترتیب نشان دهنده آلل های 1 و 4 تکرار (ژنوتیپ 4/1) - چاهک 12، کنترل منفی است. L نشان دهنده مارکر 100 bp است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی آلل های 1 تا 4 تکرار شایع و دو آلل 5 و 6 تکرار نادر است. هم چنین در این مطالعه در بعضی افراد قطعاتی تکثیر شد که طول باند آن ها به ترتیب 853 bp و 925 bp بود که به نظر می رسد آن ها نمایان گر آلل های با 8 و 9 تکرار باشند.

بیشترین فراوانی ژنوتیپی در بیماران مبتلا به سرطان معده به ترتیب ژنوتیپ های 1-1 (17% درصد) و

بحث

مطالعه نشان داد که فراوانی آلل‌های 1 تا 4 تکرار شایع و دو آلل 5 و 6 تکرار نادر است که با مطالعه قبلی (17) هم راستا می‌باشد.

آنالیز نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتیپ 4-1، با بیماری سرطان معده از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری دارد $P=0/028$

و Belizzi همکاران نشان دادند که با افزایش تعداد تکرارها در VNTR اینترون 5 ژن SIRT3، بیان این ژن افزایش می‌یابد. قابل ذکر است که این افزایش بیان زمانی صورت می‌گیرد که حداقل دو تکرار بین آلل‌ها تفاوت وجود داشته باشد (17). بنابراین با توجه به این مطلب، منطقی به نظر می‌رسد که افرادی که دارای ژنوتیپ 4-1 و 3-4 می‌باشند نسبت به افرادی که دارای ژنوتیپ 2-2 هستند خطر ابتلا به سرطان معده در آن‌ها افزایش یابد چرا که احتمالاً بیان ژن SIRT3 در آن‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه احتمال داستیله شدن P53 بیش‌تر و هم‌چنین مهار آپوپتوز نیز بیش‌تر می‌گردد (18). در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سطح بیان SIRT3 از طریق تأثیر روی فرآیند آپوپتوز می‌تواند در سرطان‌زایی نقش داشته باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد و نویسندگان مقاله از پرسنل بخش شیمی درمانی بیمارستان امید اصفهان و تمامی افراد شرکت‌کننده در این مطالعه بابت همکاری در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Saghier A, Kabanja J, Afreen S, Sagar M. Gastric Cancer: Environmental Risk Factors, Treatment and Prevention. *J Carcinogene Mutagene*. 2013; S14.
2. Inove M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. *Postgrad Med J*. 2005; 81 (957): 419-424.
3. Zendeheel K, Marzban M, Nahvijou A, Jafari N. Six-fold Difference in the

سیرتوئین‌ها آنزیم‌های هیستون داستیلاز وابسته به NAD می‌باشند که اولین بار در مخمرها شناسایی شدند و در انسان به هفت نوع تقسیم می‌شوند و از نظر جایگاه درون سلولی SIRT1، SIRT6، SIRT7 در داخل هسته و بقیه در سیتوپلاسم و میتوکندری قرار دارند. یکی از انواع آن‌ها که در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان معده نقش دارد، SIRT3 است که ژن کدکننده آن یک آنزیم هیستون داستیلاز 44 کیلو دالتونی کد می‌کند و به میتوکندری انتقال می‌یابد. بیان این آنزیم در بافت‌های نرمال پستانداران که فعالیت متابولیکی زیادی دارند، به وفور دیده می‌شود (9). این آنزیم از طریق مسیرهای مختلف مثل متابولیسم انرژی حفظ ژنوم می‌تواند در فرآیند سرطان‌زایی نقش داشته باشد (11). در اینترون 5 ژن SIRT3 یک چندشکلی VNTR گزارش شده است که حاوی توالی تنظیمی رونویسی می‌باشد (17). با توجه به نقش تعداد تکرارها در بیان ژن SIRT3، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم VNTR اینترون 5 ژن SIRT3 با خطر ابتلا به سرطان معده پرداخته شد.

در ارتباط با بررسی تعداد تکرارهای VNTR اینترون 5 ژن SIRT3 تاکنون فقط یک مطالعه وجود دارد که Belizzi و همکاران در ارتباط با فرآیند پیری انجام داده‌اند (17). در مطالعه حاضر علاوه بر آلل‌هایی که در مطالعه مورد اشاره گزارش شده است، قطعاتی تکثیر شد که طول باند آن‌ها به ترتیب 853 bp و 925 bp بود که به نظر می‌رسد نمایان‌گر آلل‌های با 8 و 9 تکرار باشند که تاکنون گزارش نشده است. نتایج این

- Stomach Cancer Mortality Rate between Northern and Southern Iran. *Arch Iran Med.* 2012; 15(12): 741-746.(Persian)
4. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Somatic genome variations in health and disease. *Curr Genomics.* 2010;11(6):387-396.
 5. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(10):843-854.
 6. Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell DA. Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207(suppl 2): 84-90.
 7. Kim BC, Kim WY, Park D, Chung WH, Shin KS, Bhak J. SNP@Promoter: a database of human SNPs (single nucleotide polymorphisms) within the putative promoter regions. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9(1): S2.
 8. Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR, Peters U. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA.* 2008; 299(20):2423-2436.
 9. Yang B, Fu X, Shao L, Ding Y, Zeng D. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastric cancer. *Biochemical and biophysical research communications.* 2013;443(1):156-160.
 10. Schwer B, Eckersdorff M, Li Y, Silva JC, Fermin D, Kurtev MV, et al. Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation. *Aging Cell.* 2009;8(5):604-606.
 11. Li X, Kazgan N. Mammalian sirtuins and energy metabolism. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):575-578.
 12. Wu YT, Wu SB, Wei YH. Roles of Sirtuins in the Regulation of Antioxidant Defense and Bioenergetic Function of Mitochondria under Oxidative Stress. *Free Radical Res.* 2014 ; 48(9):10701-1034.
 13. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park S-H, Jiang H, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell.* 2010;40(6):893-904.
 14. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. Sirtuin-3 (SIRT3) and the Hallmarks of Cancer. *Genes Cancer.* 2013;4(3-4):164-171.
 15. Zhang CZ, Liu L, Cai M, Pan Y, Fu J, Cao Y, et al. Low SIRT3 expression correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(12):e51703.
 16. Yan SM1, Han X, Han PJ, Chen HM, Huang LY, Li Y. SIRT3 is a novel prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncology.* 2014; 31(8):103.
 17. Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De Rango F, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics.* 2005;85(2):258-263.

18. Onyango P, Celic I, McCaffery JM, Boeke JD, Feinberg AP. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(21): 13653-13658.