

Study of Regulatory Promoter Polymorphism (-938 C>A) of *bcl2* Gene in Patients with Gastric Cancer

Seyedeh Habibeh Mirmajidi¹,
Ali Barzegar²,
Novin Nikbakhsh³

¹ MSc in Cellular and Molecular Biology, College of Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, College of Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received December 26, 2015 ; Accepted July 14, 2016)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer death worldwide. North of Iran is a high risk area for gastric cancer. Bcl2 family is the most important regulator of apoptosis and -938C>A single nucleotide polymorphism of *bcl2* gene promoter has been demonstrated to influence gastric cancer susceptibility. In this research we studied the effect of -938C>A genotype on gastric cancer.

Materials and methods: This analysis was performed in 87 patients with gastric cancer who underwent surgery in Mazandaran and Golestan province along with 104 healthy individuals as controls. DNA extracted from peripheral blood samples was applied in PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) analysis to determine -938C>A genotype. The association of the -938C>A genotype and gastric cancer risk as well as demographic and clinicopathological characteristics were analyzed by logistic regression method.

Results: Frequency of AA, CC and AC genotypes in cases were 13.79, 16.09 and 70.12% and 15.38, 23.08, and 61.54% in control group, respectively. Statistical analysis indicated that the AC genotype was significantly ($P=0.0009$) associated with a decreased risk for gastric cancer by 0.2 fold ($OR=0.276$) compared with the combined genotype of AA+CC. No significant association was found between -938C>A genotype with demographic and clinicopathological characteristics.

Conclusion: The study showed that the presence of AC genotype may decrease the risk of gastric cancer. So, investigating the -938 C>A single nucleotide polymorphism of *bcl2* gene promoter could be an appropriate molecular marker that could be used to determine individual sensitivity to gastric cancer and also for designing cancer prevention programs.

Keywords: *bcl-2*, stomach cancer, SSCP, polymorphism

بررسی چند شکلی جایگاه $C>A$ ۹۳۸ - پرموتور $P2$ ژن $bcl2$ در افراد مبتلا به سرطان معده

سیده حبیبه میرمجیدی^۱

علی برزگر^۲

نوین نیک بخش^۳

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده، چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان بوده و در استان‌های شمالی ایران میزان شیوع بالایی دارد. خانواده $BCL2$ نقش مهمی در تنظیم آپاپتوزیس داشته و تاثیر چند شکلی تک نوکلئوتیدی جایگاه $C>A$ ۹۳۸- ژن $bcl2$ در بروز سرطان معده نشان داده شده است. هدف از این مطالعه بررسی چندشکلی جایگاه $C>A$ ۹۳۸- ژن $bcl2$ در افراد مبتلا به سرطان معده بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۸۷ فرد مبتلا به سرطان معده که بین سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ به بیمارستان‌های استان مازندران و گلستان مراجعه کرده بودند و تحت جراحی معده قرار گرفتند، به همراه ۱۰۴ فرد سالم به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA با روش نمکی انجام و پلی مورفیسم جایگاه $C>A$ ۹۳۸- با روش PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) تعیین شد. ارتباط ژنوتیپ این جایگاه با بروز سرطان معده و هم چنین خصوصیات دموگرافیک و کلینیکوپاتولوژیکی با روش رگرسیون لجستیک بررسی گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های AA، CC و AC در نمونه‌های بیمار به ترتیب ۱۳/۷۹، ۱۶/۰۹ و ۷۰/۱۲ درصد و در افراد سالم ۱۵/۳۸، ۲۳/۰۸ و ۶۱/۵۴ درصد بود. بررسی‌های آماری داده‌ها نشان داد که ژنوتیپ هتروزیگوت AC، به صورت معنی داری ($P=0/0009$) نسبت به مجموع ژنوتیپ‌های AA و CC، به میزان ۰/۲ برابر ($OR=0/276$) باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان معده می‌گردد. هیچ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم این جایگاه و خصوصیات دموگرافیک و کلینیکوپاتولوژیکی مورد بررسی به دست نیامد.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ AC ممکن است در کاهش خطر ابتلا به سرطان معده موثر باشد. در نتیجه بررسی چندشکلی جایگاه $C>A$ ۹۳۸- پرموتور $P2$ ژن $bcl2$ می‌تواند یک مارکر مولکولی مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و هم چنین برای طراحی راه کارهای پیش گیری در افراد مستعد این سرطان باشد.

واژه های کلیدی: $bcl2$ ، سرطان معده، SSCP، چند شکلی

مقدمه

سرطان معده بعد از سرطان مری دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است (۱) که به دلیل پیش آگهی ضعیف و میزان بالای مرگ و میر، کاپیتان مرگ نیز نامیده می‌شود (۲). این سرطان بیش تر در مردان

E-mail: habibehmirmajidi@gmail.com

مؤلف مسئول: سیده حبیبه میرمجیدی - ساری: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم

۱. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه علم پایه، دانشکده علوم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۰/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۲۸

و در سنین بالای ۴۰ سال شایع بوده و با افزایش سن، خطر ابتلا به آن افزایش می‌یابد (۳). آمار و ارقام نشان دهنده نرخ بالای بروز سرطان دستگاه گوارش در نواحی شمالی کشور به خصوص مازندران و گلستان است (۴). به طور کلی عوامل مختلفی از قبیل آلودگی باکتریایی، عوامل محیطی (مانند رژیم غذایی و شرایط آب و هوایی)، جنسیت، سن و عوامل ژنتیکی از قبیل جهش‌های اعمال شده در ژن‌های سرکوب گر تومور (Tumor suppressor genes)، ژن‌های مرتبط با آپاپتوزیس و پروتوانکوژن‌ها (Proto-oncogenes) در بروز سرطان موثر می‌باشند (۵-۸). آپاپتوزیس (Apoptosis) که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است، از دو مسیر اصلی شامل مسیر خارجی یا مسیر گیرنده مرگ و مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی صورت می‌گیرد. مشخصات اصلی آپاپتوزیس شامل چروکیده شدن سلول، آسیب به غشاء، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA است (۹، ۱۰). خانواده پروتئینی BCL2 که شامل پروتئین‌های ضد آپاپتوزیس (Anti-apoptotic) از قبیل Bcl2 (B-cell leukemia/lymphoma) و Bcl-xl (B-cell lymphoma-extra large) پروتئین‌های پیش‌برنده آپاپتوزیس (Pro-apoptotic) از قبیل Bax (BCL-2-associated X protein)، Bad (Bcl-2-associated death promoter) و Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) هستند، جزء تنظیم‌کننده‌های اساسی این فرآیند (به خصوص مسیر میتوکندریایی) به شمار می‌روند (۱۱، ۱۲). ژن bcl2 جایگاه ۲۱/۳ q کروموزوم ۱۸ قرار گرفته و شامل ۳ اگزون و دو پروموتور P۱ و P۲ می‌باشد. پروموتور P۲ به عنوان تنظیم‌کننده منفی پروموتور P۱ عمل کرده و باعث کاهش فعالیت آن و در نتیجه کاهش بیان BCL2 می‌شود (۱۳). حضور چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ژن bcl2 و توالی‌های کنترلی آن در مطالعات متعددی عنوان شده است. بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide -polymorphism (SNP)) ناحیه

GCA به G rs17757541 ژن bcl2 در بیماران مبتلا به GCA (Gastric Cardiac Adenocarcinoma) نشان داد که حضور ژنوتیپ هتروزیگوت CG در این ناحیه باعث افزایش خطر ابتلا به GCA در مقایسه با انواع هموزیگوت (GG, CC) می‌شود (۱۴). پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی جایگاه A>C 938- ژن bcl2، برای اولین بار توسط Park و همکاران معرفی گردید (۱۵). بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی پروموتور دو ژن bax و bcl2 و ارتباط آن‌ها با مصرف الکل و سیگار در افراد مبتلا به سرطان سر و گردن نشان داد که ژنوتیپ AA در پروموتور ژن bax با افزایش و در پروموتور ژن bcl2 با کاهش سرطان سر و گردن همراه است (۱۶). Ning و همکاران وجود SNP را در جایگاه A>C ۹۳۸- پروموتور P۲ ژن bcl2 در افراد چینی مبتلا به سرطان پستان بررسی کرده و نشان دادند که ژنوتیپ AA باعث افزایش بروز سرطان پستان می‌گردد (۱۷). تاثیر پلی مورفیسم جایگاه A>C 938 (rs2279115) در بیماران مبتلا به NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) بر بقای بیمارانی که تحت شیمی درمانی قرار گرفتند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که متوسط عمر بیماران دارای ژنوتیپ AA و AC به طور معنی داری نسبت به افراد دارای ژنوتیپ CC کوتاه‌تر می‌باشد (۱۷). هدف از این پژوهش، مطالعه توزیع ژنوتیپی جایگاه A>C ۹۳۸- پروموتور P۲ ژن bcl2 در افراد مبتلا به سرطان معده و بررسی تاثیر چندشکلی ژنتیکی این جایگاه در بروز سرطان معده بوده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی روی ۸۷ بیمار مبتلا به سرطان معده که از شهریور سال ۱۳۹۰ تا شهریور ۱۳۹۲ به بیمارستان‌های بابل، کلینیک، مهرگان، شهید بهشتی و روحانی شهرستان بابل، بیمارستان امام خمینی ساری و بیمارستان صیاد شیرازی گرگان و مراجعه کرده و مورد جراحی معده قرار گرفته بودند، انجام شد. هم‌چنین ۱۰۴

فرد سالم نیز به عنوان کنترل و انجام بررسی‌های آماری مورد بررسی قرار گرفتند. خصوصیات دموگرافیک (جمعیت‌شناختی) و کلینیکوپاتولوژیکی افراد بیمار شامل سن، جنس، سابقه مصرف سیگار و مرحله بیماری (Stage)، از پرونده آن‌ها استخراج و ارتباط آن‌ها با پلی‌مورفیسم جایگاه مورد مطالعه، بررسی شد. البته این بررسی تنها در مورد افرادی که خصوصیات دموگرافیک و کلینیکوپاتولوژیکی آن‌ها موجود بود، انجام گردید.

استخراج DNA و تکثیر قطعه

پس از کسب رضایت‌نامه، از هر فرد ۵ میلی‌لیتر خون محیطی اخذ و استخراج DNA از نمونه‌ها با روش نمکی بهینه شده انجام گرفت (۱۸). به منظور بررسی چندشکلی جایگاه $A > C$ ۹۳۸- پروموتور P2 ژن bcl2، از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد که قطعه‌ای به طول ۲۵۳ جفت باز را تکثیر می‌نماید (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر

قطعه ۲۵۳ جفت بازی پروموتور P2 ژن bcl2

نام	توالی	طول قطعه تکثیری (bp)	Tm
Bcl2-F	5'- TTATCCAGCAGCTTTTCGG -3'	۲۵۳	۵۳°C
Bcl2-R	5'- GGCGGCAGATGAATTACAA -3'		

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل غلظت ۱X بافر PCR، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱/۵ میلی‌مولار از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۲/۵U از آنزیم Taq پلی‌مراز انجام شد. چرخه‌های دمایی و زمانی PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه DNA در دمای ۹۵°C به مدت پنج دقیقه، ۳۲ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگرها در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. کیفیت و خلوص قطعه تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد ارزیابی و غلظت آن با روش اسپکتروفتومتری

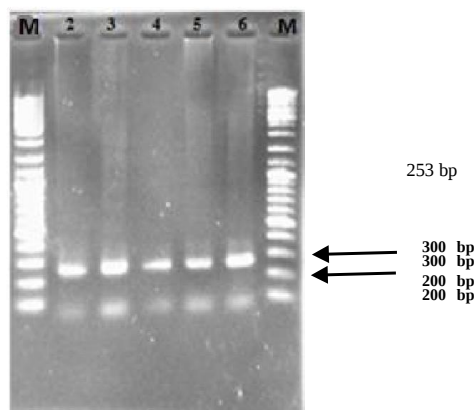
تعیین گردید. بررسی چندشکلی جایگاه $A > C$ ۹۳۸- به روش SSCP چندشکلی جایگاه $A > C$ ۹۳۸- پروموتور P2 ژن bcl2، به روش SSCP تعیین گردید. پس از تعیین غلظت قطعات تکثیرشده، غلظت‌های یکسانی از نمونه‌ها با بافر بارگذاری (فرماید ۹۵ درصد، EDTA ۲۰ میلی‌مولار ۸ pH، بروموفل بلو و زایلین سیانل درصد ۰/۵) به نسبت ۱ به ۹ مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه دناتوره و بلافاصله روی یخ قرارداد شد. نمونه‌ها در چاهک‌های ژل آکریل آمید ۱۲ درصد ریخته شده و الکتروفورز با ولتاژ ۲۵۰ میلی‌ولت به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴۰°C و در بافر TBE انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل آکریل آمید به وسیله نیترا نقره رنگ‌آمیزی (۱۹) و سپس الگوهای بانندی بررسی و فراوانی آللی و ژنوتیپی تعیین شدند.

تجزیه و تحلیل آماری و آنالیز توالی‌ها

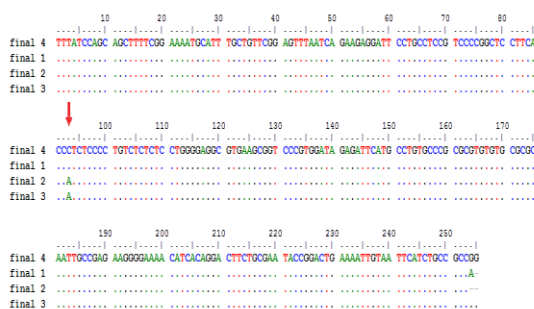
تعیین فراوانی ژنوتیپی و بررسی برقراری تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از نرم افزار POPGEN نسخه ۳/۱ انجام شد. ارتباط بین ژنوتیپ جایگاه $A > C$ ۹۳۸- ژن cl2 در گروه بیمار و سالم و پارامترهایی از قبیل سن، جنسیت، مصرف سیگار، مرحله بیماری و هم‌چنین بروز سرطان معده به وسیله نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ با مدل رگرسیون لجستیک (Logistic Regression Model) بررسی شد. آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی با نرم افزار Bio Edit نسخه ۷/۹/۱ انجام شد. صحت توالی‌های به دست آمده و میزان یکسانی آن با سایر توالی‌ها، با ابزار BLAST تعیین و هم‌ردیفی آن‌ها با روش ClustalW انجام شد (۲۰).

یافته‌ها

در مطالعه حاضر ۱۹۱ فرد متشکل از ۴۴ زن و ۱۴۷ مرد مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل ۸۷ فرد مبتلا به سرطان معده و ۱۰۴ نمونه سالم به عنوان کنترل بودند. افراد بیمار شامل ۶۵ (۷۴/۷۲ درصد) مرد و ۲۲ (۲۵/۲۸ درصد)



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر قطعه ۲۵۳ جفت بازی پروموتور P2 ژن bcl2 در ژل آگاروز ۱/۵ درصد (چاهک های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶: قطعه ۲۵۳ جفت بازی تکثیر شده در تعدادی از نمونه های بیمار. چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس)



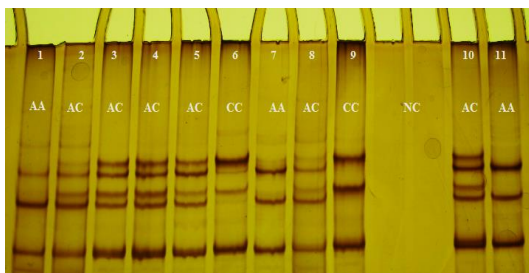
تصویر شماره ۲: هم ردیفی چندتایی (Multiple Alignment) توالی نوکلئوتیدی قطعه ۲۵۳ جفت بازی پروموتور P2 ژن bcl2 با روش ClustalW (فلش نشان دهنده جایگاه A>C۹۳۸- پروموتور P2 ژن bcl2 است که دارای چند شکلی می باشد. نقاط، نشان دهنده حضور نوکلئوتید یکسان در محل مورد نظر است.)

بررسی چند شکلی ناحیه A>C۹۳۸- پروموتور P2 ژن bcl2 چند شکلی جایگاه A>C۹۳۸- پروموتور P2 ژن bcl2 با روش SSCP در ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد بررسی گردید. پس از رنگ آمیزی سه الگوی متفاوت ظاهر گردید که مربوط به سه ژنوتیپ AC، CC و AA بودند (تصویر شماره ۳). به منظور تشخیص نوع الگوی این ژنوتیپ ها، دو نمونه از هر کدام از این الگوها تعیین توالی شده و سپس در ژل های آکریل آمید مربوط به سایر نمونه ها، از آن ها به عنوان کنترل استفاده شد. در

درصد) زن با میانگین سنی $56/06 \pm 13/32$ سال و نمونه کنترل شامل ۸۲ (۷۸/۸۵ درصد) مرد و ۲۲ زن (۲۱/۱۵ درصد) با میانگین سنی $50/75 \pm 9/76$ سال بود. نسبت مرد به زن در افراد مبتلا، ۶۳:۲۴ بود. بررسی ارتباط پارامترهایی از قبیل سن ($p=0/3979$)، جنسیت ($p=0/7993$)، مصرف سیگار ($p=0/743$) و مرحله بیماری ($p=0/5642$) با ژنوتیپ افراد در جایگاه A>C۹۳۸- با روش رگرسیون لجستیک نشان داد که هیچ ارتباط معنی داری بین این پارامترها و ژنوتیپ افراد مبتلا به سرطان معده وجود ندارد (جدول شماره ۲).

تکثیر قطعه، تعیین توالی و آنالیز توالی ها

پس از الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر در ژل آگارز، قطعه ای به طول حدود ۲۵۳ جفت باز تکثیر گردید (تصویر شماره ۱). به منظور اطمینان از صحت تکثیر ناحیه مورد نظر و هم چنین تعیین ژنوتیپ قطعات دارای الگوهای مختلف در ژل اکریل آمید، ۲ نمونه از هر الگو با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت توسط شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer, South Korea) تعیین توالی گردید. توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Bio Edit نسخه ۷/۹/۱ مورد بررسی قرار گرفت. توالی های رفت و برگشت با هم مقایسه شده تا خطاهای احتمالی تعیین توالی و نوکلئوتیدهای نامعلوم در توالی (N) تصحیح شوند. نتیجه جستجوی توالی های مشابه و میزان شباهت آن ها با ابزار BLAST مشخص کرد که توالی های به دست آمده به طول ۲۵۳ جفت باز دارای ۱۰۰ درصد یکسانی با ناحیه مورد نظر در پروموتور P2 ژن bcl2 هستند. نتایج حاصل از هم ردیفی توالی های مربوط به الگوهای مختلف با روش ClustalW، وجود چند شکلی در جایگاه A>C۹۳۸- را تایید نمود (تصویر شماره ۲). از طرف دیگر بررسی توالی ها و در ادامه استفاده از آن ها به عنوان کنترل در آنالیز SSCP نشان داد که غیر از ناحیه مورد بررسی (A>C۹۳۸-) جهش دیگری در سایر نواحی قطعه ۲۵۳ جفت بازی مورد بررسی وجود ندارد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۳: الگوی SSCP قطعه ۲۵۳ جفت بازی پروموتور P۲ ژن *bcl2* در ژل آکرلیل آمید ۱۲ درصد (چاهک‌های ۱، ۷ و ۱۱: نمونه‌های دارای ژنوتیپ AA؛ چاهک‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۸ و ۱۰: نمونه‌های دارای ژنوتیپ AC؛ چاهک ۶ و ۹: نمونه‌های دارای ژنوتیپ CC؛ چاهک‌های خالی: کنترل منفی)

جدول شماره ۲: خصوصیات دموگرافیک و کلینیکی بیماران مبتلا به سرطان معده و بررسی ارتباط آن‌ها با ژنوتیپ جایگاه *bcl2* $A > AC > 93$ ژن

خصوصیات دموگرافیک و کلیتیهاتولوژیکی		ژنوتیب	تعداد		Adjusted*
نوع	تفکیک	کل	AA	CC	AC
سطح معنی داری	OR				
سن					
≤ ۵۰	۶۶	۱۰	۸	۴۸	۱/۰۰
> ۵۰	۱۹	۲	۴	۱۳	۰/۳۹۷۶
جنسیت					
مرد	۶۳	۱۰	۱۲	۴۱	۱/۰۰
زن	۲۴	۲	۲	۲۰	۰/۷۹۹۳
عادات‌های رفتاری					
سیگاری	۳۱	۵	۶	۲۰	۱/۰۰
غیرسیگاری	۳۸	۶	۷	۲۵	۰/۷۴۳۰
***مرحله					
I, II	۲۰	۵	۶	۹	۱/۰۰
III	۳۸	۷	۵	۲۶	۰/۵۶۴۲

*Logistic regression model adjusted for diagnostic age. OR: odd ratio

**Stage.

جدول شماره ۳: بررسی توزیع ژنوتیپی جایگاه *bcl2* $C > A > 93$ - پروموتور P۲ ژن *bcl2* در افراد سالم و بیمار

ژنوتیپ	افراد بیمار تعداد (درصد)	افراد سالم تعداد (درصد)	Adjusted* سطح معنی داری	OR
AA	۱۲ (۱۳/۷۹)	۱۶ (۱۵/۳۸)	۱/۰۰	
AC	۶۱ (۷۰/۱۲)	۶۴ (۶۱/۵۴)	۰/۶۷۷	
CC	۱۴ (۱۶/۰۹)	۲۴ (۲۳/۰۸)	۰/۷۱۸۸	۱/۲۷
AC+CC	۷۵ (۸۶/۲۱)	۸۸ (۸۴/۶۲)	۱/۰۰	
AA	۱۲ (۱۳/۷۹)	۱۶ (۱۵/۳۸)	۰/۶۹۲	
AC+AA	۷۳ (۸۳/۹۱)	۸۰ (۷۶/۹۲)	۱/۰۰	
CC	۱۴ (۱۶/۰۹)	۲۴ (۲۳/۰۸)	۰/۷۴۳	
AA+CC	۲۶ (۲۹/۸۸)	۴۰ (۳۸/۴۶)	۱/۰۰	
AC	۶۱ (۷۰/۱۲)	۶۴ (۶۱/۵۴)	۰/۲۷۶	
تعداد کل	۸۷	۱۰۴	۰/۰۰۰۹	

*Logistic regression model adjusted for diagnostic age. OR: odd ratio

این الگوها، ژنوتیپ‌های هموزیگوت AA و CC دارای دو قطعه مربوط به هر کدام از دو رشته DNA در ابتدای ژل و یک قطعه مربوط به DNA دو رشته‌ای در ناحیه پائین تر بودند. ژنوتیپ AC دارای ۴ قطعه در قسمت ابتدای ژل آکرلیل آمید مربوط به ۴ رشته DNA بوده و در قسمت پائین تر دارای یک قطعه مربوط به DNA دو رشته‌ای بود. بررسی چند شکلی ناحیه $A > AC > 93$ در نمونه‌های بیمار و سالم در این بررسی نشان داد که در مجموع دو آلل A و C و سه ژنوتیپ AA و CC و AC در این ناحیه وجود دارد. در بین افراد بیمار، ۱۴ نفر (۱۶/۰۹ درصد) ژنوتیپ CC، ۶۱ نفر (۷۰/۱۲ درصد) ژنوتیپ AC و ۱۲ نفر (۱۳/۷۹ درصد) ژنوتیپ AA را نشان دادند (جدول شماره ۳). بدین ترتیب اکثر بیماران دارای ژنوتیپ AC بودند. در نمونه‌های سالم ۲۴ نفر (۲۳/۰۸ درصد) ژنوتیپ CC، ۶۴ نفر (۶۱/۵۴ درصد) ژنوتیپ AC و ۱۶ نفر (۱۵/۳۸ درصد) ژنوتیپ AA داشتند. آزمون مربع کای (chi-square test) انجام شده برای بررسی این که آیا فراوانی ژنوتیپی و آلی ناحیه $A > AC > 93$ - نمونه‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ تبعیت می‌کند، نشان داد که میزان X^2 برای نمونه بیمار $p = ۰/۰۰۰۲۱۱$ بود که در سطح یک درصد معنی دار می‌باشد و در تعادل هاردی واینبرگ قرار نمی‌گیرد. برای نمونه کنترل $p = ۰/۰۹۹۵$ بود که در تعادل هاردی واینبرگ قرار می‌گیرد. توزیع ژنوتیپی ناحیه $A > AC > 93$ - پروموتور P۲ ژن *bcl2* بین نمونه‌های بیمار و کنترل و ارتباط نوع ژنوتیپ و بروز سرطان معده با مدل رگرسیون لجستیک بررسی شد (جدول شماره ۲). نتایج نشان داد که ژنوتیپ AC در مقایسه با مجموع ژنوتیپ $AA + CC$ به صورت معنی داری ($p = ۰/۰۰۰۹$) باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان معده به میزان ۰/۲۷۶ برابر ($OR = ۰/۲۷۶$) می‌گردد. بررسی توزیع سایر ژنوتیپ‌ها بین نمونه‌های بیمار و کنترل نشان داد که ارتباط ژنوتیپ AA در مقایسه با مجموع ژنوتیپ $AC + CC$ ($p = ۰/۳۳۶۷$) و ژنوتیپ CC در مقایسه با مجموع ژنوتیپ $AC + AA$ ($p = ۰/۴۳۳$) در بروز بیماری معنی دار نیست.

بحث

سرطان معده دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها در جهان بوده و میزان ابتلا به آن در استان‌های شمالی ایران بسیار زیاد است (۴). پروتئین BCL2 از طریق برهم کنش با پروتئین Bak باعث مهار آپاپتوزیس و هم چنین توقف چرخه سلولی می‌گردد. بدین ترتیب BCL2 نقش دوگانه‌ای دارد به طوری که از یک طرف به عنوان آنکوژن عمل می‌کند و از طرف دیگر باعث مهار آپاپتوزیس می‌گردد. انجام هر کدام از این دو عملکرد به نوع بافت بستگی دارد. به عنوان مثال، افزایش بیان BCL2 باعث پیشرفت CLL (B-cell chronic lymphocytic leukemia) و سرطان پروستات می‌گردد در حالی که در سرطان‌های کولورکتال و کارسینومای پستان باعث افزایش بقای افراد مبتلا می‌شود (۱۳). پروموتور P۲ ژن bcl2 به عنوان تنظیم کننده منفی پروموتور P۱ عمل کرده و باعث کاهش فعالیت آن و در نتیجه کاهش بیان BCL2 می‌شود (۱۲).

Park و همکاران با مطالعه ۲۴ نمونه DNA جمعیت کره‌ای، یک جهش تک نوکلئوتیدی را در جایگاه C>A ۹۳۸- پروموتور P۲ شناسایی کردند (۱۵). در این مطالعه برای اولین بار چندشکلی ناحیه C>A ۹۳۸- پروموتور P۲ ژن bcl2 در افراد مبتلا به سرطان معده در استان مازندران و گلستان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۸۷ فرد مبتلا به سرطان معده به همراه ۱۰۴ فرد سال به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. در نمونه‌های بررسی شده، نسبت مرد به زن در افراد مبتلا ۶۳:۲۴ بود. مردان به واسطه طبیعت کاری خویش بیش تر در معرض مواد سرطان‌زا، مواد شیمیایی، اشعه ایکس و غیره قرار داشته و هم چنین بیش تر از زنان الکلی، سیگار و دخانیات مصرف می‌کنند (۲۱، ۲۲). نمونه‌های سالم شامل ۸۲ (۷۸/۸۵ درصد) مرد و ۲۲ (۲۱/۱۵ درصد) زن با میانگین سنی 50.75 ± 9.76 سال بودند. آزمون t انجام شده روی میانگین سنی افراد سالم

و بیمار تفاوت معنی‌داری را بین آن‌ها نشان نداد ($p > 0.05$). میانگین سنی اکثر افراد مبتلا و به عبارتی سن تشخیص بیماری بالاتر از سایر جمعیت‌ها بود (۲۳، ۲۴). بدین ترتیب استفاده از روش‌های دقیق تر و مراجعات پزشکی منظم برای کاهش میزان ابتلا در نواحی شمالی کشور ضروری است (۲۵). از نظر مرحله پیشرفت بیماری، ۴۴/۸۲ درصد افراد مبتلا در مرحله III، ۳۶/۲۰ درصد در مرحله II و ۱۸/۹۶ درصد در مرحله I قرار داشتند. در بررسی‌های انجام شده در مناطق دیگر ایران نیز اکثر افراد مبتلا به سرطان در مرحله III بیماری قرار داشتند (۲۶، ۲۷). به منظور بررسی پلی مورفیسم ناحیه A>C ۹۳۸- پروموتور P۲ ژن bcl2 در افراد بیمار و سالم، یک قطعه ۲۵۳ جفت بازی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شده و چند شکلی این ناحیه با روش SSCP مورد بررسی قرار گرفت. آزمون مربع کای (X^2) نشان داد که نمونه‌های بیمار در تعادل هاردی-واینبرگ نیستند ($p = 0.000211$) در حالی که نمونه‌های سالم در تعادل قرار می‌گیرند ($p = 0.0995$). هم چنین تاثیر ژنوتیپ‌های AA و CC در بروز سرطان معده به ترتیب نسبت به ترکیب AC+CC و AC+AA (میزان p به ترتیب ۰/۵۶۲ و ۰/۸۸۰ می‌باشد) معنی دار نبود. اما تاثیر ژنوتیپ AC نسبت به مجموع ژنوتیپ‌های AA و CC به شدت معنی دار بوده ($p = 0.0009$) و این ژنوتیپ به میزان ۰/۲ برابر ($OR = 0.276$)، باعث کاهش بروز سرطان معده می‌گردد. پلی مورفیسم ناحیه A>C ۹۳۸- پروموتور P۲ ژن bcl2 افراد مبتلا به سرطان معده سایر نقاط دنیا بررسی نشده است. با این وجود این پلی مورفیسم در سرطان‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان نمونه، پلی مورفیسم ژنتیکی ناحیه A>C ۹۳۸- پروموتور P۲ ژن bcl2 در افراد مبتلا به سرطان پستان در کشور چین با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفته و سه نوع ژنوتیپ AA، CC و AC به ترتیب با فراوانی ۱۶/۷، ۳۶/۸ و ۴۶/۵ مشاهده شد (۱۲). بدین ترتیب مشابه مطالعه حاضر، ژنوتیپ AC بیش ترین

فراوانی را دارد. اما بررسی آماری نشان داد که ژنوتیپ AA نسبت به مجموع AC+CC باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان به میزان ۲/۳۷ برابر می گردد. هم چنین مشابه اطلاعات به دست آمده در این مطالعه، بررسی ارتباط ژنوتیپ های AA، CC و AC با پارامترهایی از قبیل سن تشخیص بیماری، سائز تومور و مرحله بیماری نشان داد که هیچ ارتباط معنی داری بین آن ها وجود ندارد (۱۳). ارتباط پلی مورفیسم جایگاه های $AG>A-24$ در ژن bax و $AC>A-93$ در ژن $bcl2$ و ارتباط آن ها با مصرف الکل و سیگار در افراد مبتلا به کارسینومای سر و گردن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژنوتیپ AA ژن bax باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان می گردد، در حالی که در ژن $bcl2$ ژنوتیپ AA باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان سر و گردن می شود. هم چنین مصرف سیگار و الکل جزء خطرات اولیه برای گسترش سرطان سر و گردن بوده و ارتباط معنی داری با یکدیگر داشتند (۱۶). لینارت و همکاران، پلی مورفیسم ناحیه $AC>A-93$ پروموتور P2 ژن $bcl2$ را به منظور ارزیابی تاثیر بالقوه نشان گر ژنتیکی برای پاسخ به شیمی درمانی و پیش بینی نتایج آن در بیماران SCLC (Small cell lung cancer) و این که آیا این نشان گر می تواند در بهینه سازی درمان سرطان ریه مفید باشد، مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بیمارانی که ژنوتیپ $ACC-93$ را حمل می کنند نسبت به افراد حامل

ژنوتیپ $AA-93$ به طور قابل توجهی زمان پیشرفت (Time to progression) بیماری در آن ها با وضعیت بدتری روبرو بوده و این مارکر ژنتیکی به طور ویژه ممکن است روی راهبردهای درمان موثر باشد (۲۸). در مطالعه دیگر بررسی SNP ناحیه $AC>A-93$ پروموتور P2 ژن $bcl2$ و بیان آن در ارتباط با بقای بیماران مبتلا به OSCC (Oropharyngeal squamous cell carcinoma) انجام گرفت. نتایج نشان داد که ژنوتیپ $ACC-93$ به عنوان یک شاخص پیش آگهی جدید در بیماران مبتلا به OSCC بوده و می تواند در شناسایی گروهی از بیماران که در معرض خطر عود بیماری و مرگ قرار دارند، مفید باشد (۲۹). بدین ترتیب ژنوتیپ های مختلف جایگاه $AC>A-93$ پروموتور P2 ژن $bcl2$ ، تاثیر متفاوتی در افزایش یا کاهش بروز انواع سرطان در جمعیت های مختلف دارند. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که حضور ژنوتیپ AC در جایگاه $C>A-93$ پروموتور P2 ژن $bcl2$ ، ممکن است باعث کاهش بروز سرطان معده گردد. در نتیجه بررسی چندشکلی این جایگاه می تواند یک مارکر مولکولی مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و هم چنین برای طراحی راه کارهای پیش گیری در افراد مستعد این سرطان باشد. مطالعه حاضر اولین گزارش از تاثیر پلی مورفیسم ناحیه $AC>A-93$ بر بروز سرطان معده می باشد.

References

- Holbrook JD, Parker J, Gallagher KT, Halsey WS, Hughes AM, Weigman VJ, et al. Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutation relevant to personalized medicine. J Transl Med 2011; 9:119.
- Siewert JR, Maruyama K. What's new in gastric cancer? World Journal of Surgery 1995; 19(4): 483.
- Bernini M, Barbis S, Roviello F, Scarpa A, Moore P, Pedrazzani C, et al. Family history of gastric cancer. A correlation between epidemiologic findings and clinical data. Gastric Cancer 2006; 9(1): 9-13.
- Malekzadeh R, Riahi A, Sajadi AS. Stomach cancer in Iran. Govaresh 2008; 2(13): 107-122.
- Milne AN, Carneiro F, Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. Hum Genet 2009; 126(5): 615-628.

6. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998; 392(6674): 402-405.
7. Cho YG, Kim CJ, Park CH, Yang YM, Kim SY, Nam SW, et al. Genetic alterations of the KLF6 gene in gastric cancer. *Oncogene* 2005; 24(28): 4588-4590.
8. Kim JP, Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10783 patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005; 1: 125-133.
9. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kikuno N, Suehiro Y, Tabatabai L, et al. The bcl2-938CC genotype has poor prognosis and lower survival in renal cancer. *J Urology* 2009; 182(2): 721-727.
10. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(9): 647-656.
11. Young RL, Korsmeyer SJ. A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol* 1993; 13(6): 3686-3697.
12. Ning Z, Xiaoyan L, Kai T, Liyu J, Tingting M, Shi Y, et al. BCL-2 (-938C>A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *BMC Med Genet*. 2011; 12: 48-55
13. Li Q1, Yin J, Wang X, Shi Yj, Zheng L, Tang WF, et al. B-cell Lymphoma 2 rs17757541 C>G polymorphism was associated with an increased risk of gastric cardiac adenocarcinoma in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(7): 4301-4306.
14. Park BL, Kim LH, Cheong HS, Cho HY, Kim EM, Shin YS, et al. Identification of variants in cyclin D1 (CCND1) and B-Cell CLL/ lymphoma 2 (*BCL2*). *J Hum Genet* 2004; 49(8): 449-454.
15. Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W, et al. Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and *BCL2* genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 2007; 28(9): 2008-2012.
16. Masago K1, Togashi Y, Fujita S, et al. Effect of the *BCL2* gene polymorphism on survival in advanced-stage non-small cell lung cancer patients who received chemotherapy. *Oncology* 2013; 84(4): 214-218.
17. Lenasi T, Kokalj-vokak N, Narat M, Baldi A, Dovc P. Functional study of the equine beta-casein and kappa-casein gene promoters. *J Dairy Res* 2009; 72: 34-43.
18. Ranjbari M, Hashemi A, Mardani K, Darvishzadeh R. Allelic polymorphism of Makoei sheep calpastatin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *J Agric Sci Technol* 2012; 14(3): 533-538.
19. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215(3): 403-410.
20. Zali MR, Nouri B, Akhondi S, Asadzadeh H, Ansari Sh, Zali MR. Indices associated with gastric cancer in Tehran and seven provinces of the country from 2000 to 2002. *Medical Sci Journal of Islamic Azad Univ Tehran Med Brance* 2006; 15(1): 15-18.
21. Haghighi P, Nasr K. Gastrointestinal cancer in Iran. *Iran J Chronic Dis* 1971; 24(10): 625-633.
22. Fuchs CS, Mayer RM. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 333(1): 32-41.
23. Dupont JB, Lee JR, Burton GR, Cohn JR. Adenocarcinoma of the stomach: Review of 1,497 cases. *Cancer* 1978; 41(3): 941-947.

24. Lazar D, Taban S, Sporea I, Dema A, Cornianu M, Lazăr E, et al. Gastric cancer: correlation between clinicopathological factors and survival of patients (III). Rom J Morphol Embryol 2009; 50(2): 185-194.
25. Knoefel LF, Werle-Schneider G, Dally H, Edler L, Bartsch H, Tuengerthal S, et al. Polymorphisms in the apoptotic pathway gene BCL-2 and survival in small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2011; 6(1): 183-189.
26. Biglarian A, Khodabakhshi R, Gohary MR, Hajizadeh E. Analysis of survival of patients with gastric cancer and its related factors. Kosar Med J 2008; 12(4): 345-355.
27. Stefani E, Boffetta P, Carzoglio J, Mendilaharsu S, Deneo-Pellegrini H. Tobacco smoking and alcohol drinking as risk factors for stomach cancer: A case-control study in Uruguay. Cancer Cause Control 2009; 19(3): 321-329.
28. Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelava A, Nüchel H, et al. The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. Ann Oncol 2009; 20(6): 1094-1099.
29. Mirmajidi SH, Ataee R, Barzegar A, Nikbakhsh N, Shaterpour M. Low Expression of the *bcl2* Gene in Gastric Adenocarcinomas in Mazandaran Province of Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2015; 16(14): 6067-6071.