

## *Investigating the Association between Polymorphism of Fas/CD59 and Gastric Adenocarcinoma*

Bahman Fazli<sup>1</sup>,  
Vahid Hosseini<sup>2</sup>,  
Zahra Hosseini-khah<sup>3</sup>,  
Abulghasem Ajami<sup>1</sup>,  
Alireza Rafiei<sup>1</sup>,  
Ghasem Janbabai<sup>4</sup>,  
Seyyed Omid Emadian Saravi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Immunology, Molecular Cell-Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Molecular Cell-Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Department of Internal Medicine, Molecular Cell-Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 27, 2011 ; Accepted February 27, 2012)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Apoptosis is a physiological mechanism of programmed cell death that dysregulation in this process may lead to carcinogenesis. Functional gene polymorphism in Fas can alter transcriptional activities and thus change the risks of cancer. A to G substitution in Fas -670 promoter region disrupts the binding site of STAT1 transcription factor. This study aimed to assess the association of genetic variants of Fas -A670G polymorphism with the potential risk of gastric cancer.

**Materials and methods:** Genomic DNA was extracted from 159 patients with gastric adenocarcinoma and 170 healthy people as control group. Two groups had similar age, sex and ethnic background. Gastric cancer was diagnosed based on clinical and endoscopic findings, and pathological confirmations. Genotyping was done according to PCR-RFLP method. The association of genotypes or allele with disease was analyzed by logistic regression model and odd ratio was obtained at confidence level of 0.05.

**Results:** Results showed that the mean age of patients was not significantly different with that of control group. ( $62.14 \pm 12$ , and  $58.93 \pm 14.2$ ,  $P= 0.9$ ). Also, allele frequency in the patients and controls was not significantly different (58.6% vs. 61.8%,  $P=0.47$ ). Meanwhile, the genotype frequencies of -A670G polymorphism were significantly different in two groups. The A/G heterozygosity was significantly less frequent in the patients than that of controls (42.4% vs. 51.8%,  $P=0.041$ ). On the other hand, the presence of heterozygous A670G decreased the cancer risk ( $R= 0.5$  and CI; 0.26-0.94).

**Conclusion:** Our findings indicated that A670G polymorphism in Fas promoter region might be associated with the risk of gastric cancer. Therefore, genetic variation in Fas/FasL system may contribute to etiology of gastric cancer due to corruption in apoptotic process.

**Key words:** Gastric cancer, Fas-670 polymorphism, apoptosis, RFLP-PCR

## بررسی ارتباط پلی مرفیسم ژن Fas/CD95 و آدنوکارسینوم معده

بهمن فضلی<sup>۱</sup>  
وحید حسینی<sup>۲</sup>  
زهرا حسینی خواه<sup>۳</sup>  
ابولقاسم عجمی<sup>۱</sup>  
علیرضا رفیعی<sup>۱</sup>  
قاسم جان بابایی<sup>۴</sup>  
سید امید عمادیان ساروی<sup>۵</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** آپوپتوز یک مکانیسم فیزیولوژی مرگ برنامه ریزی شده می باشد و اختلال در تنظیم آن می تواند به فرایند کارسینوژنز یا سرطان منجر شود. بروز پلی مرفیسم های عملکردی در ژن Fas می تواند منجر به تغییر فعالیت عوامل نسخه برداری شده و باعث تغییر خطر بروز سرطان گردد. جاننشینی A→G در موقعیت ۶۷۰- باعث از بین رفتن جایگاه اتصال عامل نسخه برداری STAT1 می شود. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط واریانت های ژنتیکی حاصل از پلی مرفیسم Fas-A670G با استعداد ابتلاء به سرطان معده انجام گردید.

**مواد و روش ها:** DNA ژنومی از ۱۵۹ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم معده و ۱۷۰ نفر شاهد سالم که از نظر سنی، جنس و نژاد با بیماران مطابقت داشتند استخراج شد. تشخیص آدنوکارسینوم معده بر اساس معیارهای بالینی، آندوسکوپی و تأیید پاتولوژی انجام گرفت. تعیین ژنوتیپ حاصل از پلی مرفیسم A670G- در جمعیت مورد مطالعه با روش RFLP-PCR انجام گردید. ارتباط بین ژنوتیپ ها و یا آلل ها با بیماری با استفاده از آزمون رگرسیون لجستیک بررسی شد و میزان نسبت شانس (Odd ratio) با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد.

**یافته ها:** یافته های این تحقیق نشانگر عدم تفاوت معنی دار بین میانگین سنی بیماران و افراد شاهد می باشد ( $12 \pm 62/14$  و  $14/2 \pm 58/93$ ،  $p=0/9$ ). فراوانی آلل A در بیماران سرطان معده  $58/6$  درصد و در گروه سالم  $61/8$  درصد بود و اختلاف معنی داری بین دو گروه از این نظر دیده نشد ( $p=0/47$ ). حال آن که اختلاف معنی داری بین بیماران و افراد شاهد از نظر فراوانی ژنوتیپی دیده شد. به طوری که ژنوتیپ هتروزایگوت AG در گروه بیماران  $42/4$  درصد در مقابل  $51/8$  درصد در افراد کنترل بود که تفاوت معنی داری نشان داد ( $p=0/41$ ). به عبارت دیگر، وجود هتروزایگوتی در A670G باعث کاهش خطر بروز سرطان معده افراد بیمار حامل آن می شود ( $R=0/5$  و دامنه اطمینان،  $0/94-0/26$ ).

**استنتاج:** این تحقیق نشان داد که پلی مرفیسم A670G- در پروموتور ژن Fas با خطر سرطان معده مرتبط می باشد و نشان می دهد بروز تغییرات ژنتیکی در سیستم Fas/FasL می تواند با اختلال در فرآیند آپوپتوز در اتیولوژی سرطان مؤثر واقع شود.

**واژه های کلیدی:** سرطان معده، پلی مرفیسم Fas-670، آپوپتوز، RFLP-PCR

### مقدمه

سرطان یکی از معضلات اساسی نظام سلامت در سراسر جهان محسوب می شود به طوری که سرطان به عنوان سومین علت مرگ و میر در جهان در تمام سنین و به همراه بیماری های قلبی عامل اصلی مرگ در سنین

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۵۱۲-۸۸ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

E-mail: rafiei1710@gmail.com

**مؤلف مسئول:** علیرضا رفیعی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۵. گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۷/۱۳ تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۸

کهن سالی می‌باشد (۱). سرطان‌های دستگاه گوارش مهم‌ترین و حتی شایع‌ترین انواع سرطان در ایران و به ویژه در استان مازندران محسوب می‌شوند. در این میان سرطان معده دومین سرطان شایع در جهان محسوب می‌شود که سالانه بیش از یک میلیون نفر را به کام مرگ می‌کشد (۲). این سرطان به جهت شیوع بالا و مرگ و میر زیاد دارای اهمیت به‌سزایی در استان مازندران می‌باشد (۳). هر چند تلاش‌های زیادی در جهت تشخیص و درمان مؤثر سرطان صورت گرفته است ولی از آنجا که سرطان معده معمولاً در مراحل تقریباً پیشرفته تشخیص داده می‌شود و عملاً به جهت عدم پاسخ مناسب به درمان‌های موجود دارای پیش‌آگهی خوبی نیست لذا تلاش‌های وافر می‌بایست در پیشگیری از سرطان و به‌ویژه سرطان معده انجام شود. در این راستا نیاز به وجود مارکرهای کارآمد برای غربالگری جمعیت‌های در معرض خطر زیاد یکی از اساسی‌ترین نیازهای فوری در جهت تشخیص زودهنگام سرطان و برقراری مراقبت‌های لازم می‌باشد.

بروز سرطان معده مستلزم رخداد وقایع متعدد و پشت سر هم می‌باشد که از مخاط طبیعی معده شروع و به گاستریت سطحی، گاستریت آتروفی، متاپلازی روده‌ای، دیسپلازی و در نهایت به آدنوکارسینوم نوع روده‌ای منتهی می‌شود (۳). گرچه ارتباط عوامل خطر نظیر رژیم غذایی، استعمال دخانیات، مصرف الکل و عفونت‌ها به ویژه عفونت با هلیکوباکتر پیلوری با بروز سرطان معده تا حدودی شناخته شده است ولی هنوز هم اتیولوژی سرطان معده نامشخص می‌باشد (۴،۳). مشاهده این واقعیت که تنها عده معدودی از افرادی مواجهه با این عوامل خطر به سرطان معده مبتلا می‌شوند بیانگر این واقعیت می‌باشد که استعداد ابتلا به سرطان متفاوت می‌باشد.

از دیگاه مولکولی پیدایش تومور یک فرآیند چند مرحله‌ای می‌باشد که از اختلال در تنظیم و کنترل روندهای طبیعی آپوپتوز و تکثیر سلولی آغاز می‌گردد (۵،۶). آبشار

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از دو مسیر داخلی و خارجی آغاز می‌شود. مهم‌ترین واقعه در آغاز میسر خارج سلولی آپوپتوز تعامل مولکول‌های Fas و لیگاند آن (FasL) است. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که ابتلاء به عفونت *H. pylori* می‌تواند با افزایش بیان FasL در سطح لنفوسیت‌های T وارد شده به مخاط معده و همچنین افزایش بیان Fas در سطح سلول‌های اپی تلیال معده موجب فعال کردن سیستم Fas و FasL و در نتیجه آپوپتوز گردد (۷). ارتباط تنگاتنگی بین بیان نابجا و اختلال در تنظیم ژن‌های آپوپتوز در بسیاری از انواع بیماری‌های انسان از جمله سرطان دیده شده است. اخیراً کرایکو<sup>۱</sup> و همکاران نشان دادند که بیان گیرنده Fas و لیگاند پروتئینی آن (FasL) در سطح سلول‌های مخاط معده بیماران مبتلا به سرطان معده کاهش معنی‌داری می‌یابد (۸).

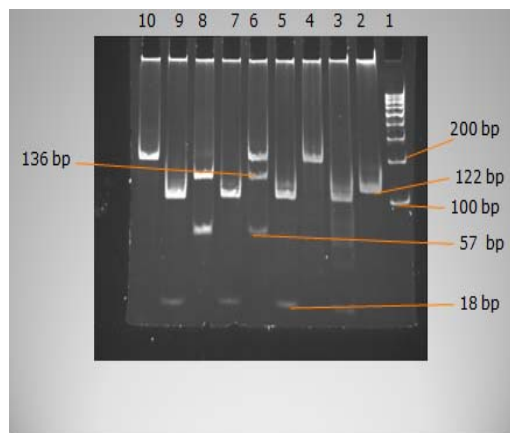
یکی از نشانه‌های بارز بدخیمی توانایی مقاومت به آپوپتوز می‌باشد که اغلب در طی موتاسیون سوماتیک در ژن مولکول‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز رخ می‌دهد (۹). ناحیه پروموتور ژن Fas یک ناحیه پلی‌مرفیک می‌باشد به طوری که پلی مرفیسم A670G یا (rs 1800682) که در اثر جانشینی باز آلی G به A ایجاد می‌شود. به واسطه اختلال در جایگاه اتصال عامل نسخه‌برداری STAT-1، باعث کاهش فعالیت پروموتور و در نتیجه کاهش بیان ژن Fas در سطح سلول‌های اپی تلیال می‌شود (۱۰،۱۱). به علت این که اختلال در روندهای کنترلی آپوپتوز یا مرگ سلولی نقش محوری در ایجاد سرطان دارد این مطالعه با هدف بررسی ارتباط واریانت‌های ژنتیکی حاصل از پلی مرفیسم ژن Fas-A670G با سرطان معده انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی با هدف تعیین ارتباط ژنوتیپ‌های Fas با آدنوکارسینوم معده در سال ۱۳۹۰-۱۳۸۷ انجام گرفت. جمعیت مورد مطالعه شامل ۱۵۹

1. Gryko

پروفایل دمایی، دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد و قطعه ۱۹۳ جفت بازی تولید شد. جهت هضم آنزیمی ۱۰ میکرولیتر محصول PCR با ۰/۲ میکرو لیتر آنزیم ScrFI (۱۰U/μL) در حجم واکنش ۱۵ میکرو لیتر در دمای ۶۵ درجه به مدت ۱۵ ساعت هضم گردید. سپس محصول هضم شده را برای مشاهده بر روی ژل SDS-PAGE ۱/۵ درصد برده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم پروماید توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور آشکارسازی باندها صورت گرفت. به طوری که آلل G دو باند ۵۷ و ۱۳۶ جفت بازی، شکسته می شود در حالی که در آلل A این آنزیم جایگاه شکست ندارد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: قطعات هضم شده ژن Fas-670 بر روی ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد، در این شکل DNA ladder در کنار قطعات هضم شده ژن Fas-670 را نمایش می دهد (ستون ۱). ستون های ۴ و ۱۰ ژنوتیپ AA، ستون ۶ ژنوتیپ AG

#### تجزیه و تحلیل آماری

برای ارزیابی فراوانی ژنوتیپ ها و آلل های حاصل از پلی مرفیسم A670G از روش مشاهده و شمارش

بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم معده بود که از تیرماه ۸۷ تا اسفند ماه ۸۹ به پلی کلینیک طوبی و یا بیمارستان امام خمینی ساری و درمانگاه شهید رجایی بابلرس مراجعه می کردند. تشخیص آدنوکارسینوم معده براساس برنامه بین المللی طبقه بندی بیماری ها برای سرطان شناسی<sup>۱</sup> و معیارهای لورن<sup>۲</sup> (۱۲) از لحاظ بالینی، آندوسکوپی و تأیید پاتولوژی انجام گرفت. گروه شاهد شامل ۱۷۰ نفر سالم می باشد که از نظر بالینی و یافته های آندوسکوپی فاقد سرطان بودند و از نظر سن، جنس، منطقه جغرافیایی و نژاد با بیماران مطابقت داشتند.

#### استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ Fas:

داده های جمعیت شناختی نمونه های مورد مطالعه، خصوصیات پاتولوژیک و یافته های بالینی بیماران توسط چک لیست جمع آوری شد. سپس با اخذ رضایت آگاهانه از افراد مورد مطالعه مقدار ۱۰-۵ سی سی خون در لوله های حاوی ۵۰mM ماده ضد انعقاد EDTA اخذ گردید. DNA ژنومی با استفاده از روش تغییر یافته salting-out استخراج گشت و میزان DNA هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV سنجیده شد و مقدار هر نمونه در ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر تنظیم گردید. برای بررسی ژنوتیپ های پلی مرفیسم های A/G -670 Fas از (۱۳) روش RFLP-PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی 5'- A TAG CTG GGG CTA TGC GATT -3' و 3'- CAT TTG ACT GGG CTG TCC AT -5' بر اساس برنامه دمایی زیر استفاده شد. برای انجام PCR، ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۲۵ پیکو مول از هر کدام از پرایمرهای مربوطه، ۰/۱۲ میلی مول dNTP، ۲۵ میلی مول MgCl<sub>2</sub>، ۱/۲۵ واحد از آنزیم پلی مرز (فرمتناز، ایتالیا) در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر با هم مخلوط شدند. سپس تکثیر به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز در دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف، آلمان) بر اساس

1. International Classification of Diseases for Oncology IX, code 151  
2. Leuren

مستقیم قطعات تکثیر یافته ژنی استفاده شد. برای ارزیابی داده‌های کمی پس از اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف، داده‌های کمی با استفاده از آزمون T مستقل و داده‌های کیفی با استفاده از تست‌های آماری مربع Chi و یا تست دقیق فیشر ارزیابی شدند. ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و یا آلل‌ها پلی مرفیسم Fas با بیماری و مراحل مختلف آن با استفاده از آزمون رگرسیون لجستیک بررسی شد و میزان نسبت شانس (Odd ratio) با خطای کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد.

## یافته‌ها

الف- ارزیابی یافته‌های اپیدمولوژیک و جمعیت شناختی در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد شاهد

در این مطالعه ۱۵۹ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم معده شامل ۸۴ (۵۲/۸۳ درصد) مرد و ۷۵ (۴۷/۱۷ درصد) زن با میانگین سنی  $62/14 \pm 12/6$  سال و ۱۷۰ نفر شاهد سالم شامل ۹۸ (۵۷/۶۵ درصد) مرد و ۷۲ زن (۴۲/۳۵ درصد) با میانگین سنی  $58/93 \pm 14/2$  سال شرکت داشتند. کم‌ترین و بیشترین سن در بیماران ۲۸ و ۸۶ سال و در افراد شاهد ۲۴ و ۸۷ سال بود. همان‌طور که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین میانگین سن بیماران و افراد شاهد مشاهده نشد ( $p=0/99$ ). همچنین اختلاف قابل توجهی بین گروه بیماران و گروه شاهد از نظر جنسی مشاهده نشد ( $p=0/37$ ). وضعیت تأهل و شغل در بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت به طوری که گرچه بیشترین جمعیت در هر گروه را افراد متأهل تشکیل می‌دادند با این حال فراوانی مجردین و افراد مطلقه در مبتلایان به سرطان معده بیشتر از افراد شاهد بود.

به منظور ارزیابی تأثیر احتمالی برخی از عوامل خطرهای شناخته شده معمول در بروز سرطان معده و جهت در نظر گرفتن تاثیر احتمالی آن‌ها در هنگام بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مرفیسم A-670G و

سرطان معده، عواملی نظیر سابقه فامیلی، مصرف نوشیدنی‌های داغ، سیگار، مصرف غذاهای آماده، مصرف مواد غذایی شور (نظیر ماهی شور شده) و مصرف ترشیجات بین بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد شاهد مقایسه شد. همان‌طور که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری در سابقه فامیلی سرطان معده ( $p=0/003$ )، استعمال دخانیات ( $p=0/015$ )، استفاده از نوشیدنی‌های داغ ( $p<0/001$ ) وجود دارد در حالی که میزان مصرف ترشیجات ( $p=0/62$ ) و ماهی شور ( $p=0/09$ ) بین بیماران و افراد شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. جالب این که مصرف غذاهای آماده، در افراد شاهد بیشتر بیماران مبتلا به سرطان معده بود ( $p=0/037$ ).

جدول شماره ۱: داده‌های جمعیت شناختی و اپیدمولوژیک بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد شاهد سالم

| سرطان معده     | شاهد         | سطح معنی‌داری |
|----------------|--------------|---------------|
| سن             | ۶۲/۱۴ ± ۱۲/۶ | ۰/۹           |
| جنس (مرد/زن)   | ۷۵ / ۸۴      | ۰/۳۶۷         |
| تاهل           |              |               |
| مجرد           | ۶ (۴/۱)      | ۳ (۱/۹)       |
| متاهل          | ۱۳۶ (۹۳/۸)   | ۱۶۴ (۹۷/۶)    |
| مطلقه          | ۳ (۲/۱)      | ۱ (۱/۰۵)      |
| شغل            |              |               |
| بیکار          | ۴ (۲/۷)      | ۱ (۰/۶)       |
| کارمند         | ۲۲ (۱۵)      | ۳۴ (۲۰/۴)     |
| خانه دار       | ۴۳ (۲۹/۲)    | ۷۲ (۴۳/۱)     |
| سایر           | ۷۸ (۵۳/۱)    | ۶۰ (۳۶)       |
| سیگاری         | ۳۳ (۲۰/۸)    | ۲۲ (۱۳)       |
| نوشیدنی داغ    | ۷۰ (۴۷/۹)    | ۳۷ (۲۲/۴)     |
| ماهی شور       | ۱۵ (۹/۴)     | ۱۴ (۸/۲)      |
| غذاهای آماده   | ۲۹ (۱۸/۲)    | ۳۹ (۲۲/۹)     |
| مصرف ترشیجات   | ۸۸ (۵۵/۳)    | ۹۸ (۵۷/۱)     |
| سابقه خانوادگی | ۳۴ (۲۱/۴)    | ۱۸ (۱۰/۷)     |

ب) تعیین واریان‌های ژنتیکی پلی مرفیسم A 670 G ژن Fas در کانسر معده

توزیع فراوانی آلل و ژنوتیپی پلی مرفیسم A 670 G در ژن Fas در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم در جدول شماره ۲ آمده است. توزیع فراوانی ژنوتیپی حاصل از این پلی مرفیسم در افراد شاهد و بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم معده از قانون هاردی وینبرگ تبعیت

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مرفیسم Fas-A670G در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد شاهد.

| Fas-A670G | سرطان معده- n(%) | شاهد- n(%) | OR   | 95% CI      | سطح معنی داری |
|-----------|------------------|------------|------|-------------|---------------|
| ژنوتیپ    |                  |            |      |             |               |
| AA        | ۵۹ (۳۷/۳)        | ۶۱ (۳۵/۹)  | ۱    |             |               |
| GA        | ۶۷ (۴۲/۴)        | ۸۸ (۵۱/۸)  | ۰/۵  | (۰/۲۶-۰/۹۴) | ۰/۰۴۱         |
| GG        | ۳۲ (۲۰/۳)        | ۲۱ (۱۲/۴)  | ۰/۶۳ | (۰/۳۳-۱/۲۲) | ۰/۰۱۷         |
| آلل       |                  |            |      |             |               |
| 670A      | ۱۵۸ (۵۸/۶)       | ۲۱۰ (۶۱/۸) | ۱    |             |               |
| 670G      | ۱۳۱ (۴۱/۴)       | ۱۳۰ (۳۸/۲) | ۱/۱۲ | (۰/۸۲-۱/۵۳) | ۰/۴۷          |

۲۰/۳ درصد در مقابل ۱۲/۴ درصد) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ( $p=۰/۱۷$ ). همچنین مقایسه فراوانی آلل 670G در دو گروه نشان داد که گرچه فراوانی آلل G در بیماران مبتلا به سرطان معده (۴۱/۴ درصد) اندکی از افراد شاهد (۳۸/۲ درصد) بیشتر است ولی این تفاوت از نظر آماری فاقد ارزش بود ( $p=۰/۴۷$ ). همچنین آنالیز رگرسیون لجستیک دو متغیره نشان داد این اختلاف از نظر آماری معنی دار نمی باشد ( $OR=۱/۱۲$ ، با ۹۵ درصد سطح اطمینان و فاصله اطمینان ۰/۸۲-۱/۵۳).

## بحث

مهم ترین یافته این مطالعه ارتباط پلی مرفیسم ژن Fas با آدنوکارسینوم معده می باشد. مطابق نتایج ما هر چند در فراوانی آلل های A و G و ژنوتیپ های هموزیگوت، AA و GG در دو گروه بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد کنترل تفاوت معنی داری دیده نشد ولی فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت AG در گروه بیماران به طور معنی داری تفاوت داشت. این نتیجه نشان داد که پلی مرفیسم ژن Fas -670 A/G می تواند با خطر سرطان معده ارتباط داشته باشد به طوری که ژنوتیپ AG در این ژن ممکن است فرد را در برابر ایجاد و پیشرفت سرطان معده محافظت نماید. شناس ابتلاء به سرطان معده را به نصف تقلیل نماید. در پاتوژنز سرطان معده مجموعه پیچیده ای از تغییرات مولکولی رخ می دهد (۴). به همین دلیل علی رغم مطالعات متعدد در این زمینه، هنوز نیز سوالات اساسی بدون جواب باقی مانده اند (۱۴). شناسایی این تغییرات مولکولی می تواند در اتخاذ تدابیر مناسب درمانی و تشخیصی کمک نماید و در هدایت روش های درمانی به سمت درمان های هوشمند مؤثر واقع شود (۱۵). گرچه مطالعات قبلی نشان دادند که سرطان معده با افزایش بیان مولکول FasL و کاهش بروز Fas موجب فرار تومور از اثرات کشنده سیستم ایمنی می شوند (۱۶). ولی مطالعاتی که به بررسی نقش تغییرات

می کرد. سطح معنی داری برای افراد شاهد ( $p=۰/۲۱$ ) و برای بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم معده ( $p=۰/۱۱۲$ ) بود. همان طوری که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است توزیع فراوانی ژنوتیپ های حاصل از پلی مرفیسم A670G در بیماران مبتلا به سرطان معده با افراد شاهد تفاوت معنی داری نشان داد. به طوری که فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت GA در بیماران مبتلا به سرطان معده به طور معنی داری از افراد کنترل کمتر بود (۴۲/۴ درصد در مقابل ۵۱/۸ درصد،  $p=۰/۵$ ) که نشان دهنده نقش محافظت کننده این پلی مرفیسم در برابر سرطان معده می باشد. در حالی که گرچه فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت AA در مقابل GG با کاهش خطر سرطان همراه بود ولی این اختلاف در بین دو گروه چشمگیر نبود ( $p=۰/۱۷$ ). برای بررسی ارزش محافظت کننده این پلی مرفیسم، آنالیز رگرسیون لجستیک چند متغیره با تثبیت نمودن اثر متغیر مداخله گر یا عوامل همراه نظیر سن، جنس و ابتلاء به هلیکوباکتر پیلوری انجام شد و نتایج نشان داد ژنوتیپ هتروزیگوت GA توان کاهش ابتلاء به سرطان را تا ۵۰ درصد دارد. به طوری که این احتمال با سطح اطمینان ۹۵ درصد در جامعه به ۰/۲۶-۰/۹۴ برابر می شود. فراوانی آلل A در بیماران مبتلا به سرطان معده ۵۸/۶ درصد و در گروه سالم ۶۱/۸ درصد بود. ولی اختلاف معنی داری بین دو گروه از این نظر دیده نشد ( $p=۰/۴۷$ ). گرچه فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت GG در بیماران مبتلا به سرطان معده بیشتر از افراد شاهد بود

ژنی در نحوه بروز Fas و ساختار مولکولی آنها پردازند بسیار کم می باشد.

ژن‌ها تنظیم کننده آپوپتوز عامل تأثیرگذار مهم در ایجاد سرطان می باشد. واکنش Fas/FasL به عنوان مسیر عمده‌ای در تنظیم مثبت آپوپتوز در سلول‌های و بافت‌ها محسوب می شود. مطالعات در انواع مختلف تومورها نشان داده است که تعدیل سیستم ایمنی میزبان به واسطه بیان Fas و یا FasL تأثیر به‌سزایی بر بقای بیمار دارد (۱۷). ملکول Fas از ملکول‌های کلیدی در شروع آپوپتوز محسوب می شود. ژن Fas روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ واقع شده است و پروتئینی به طول ۳۲۵ اسید آمینه از دسته پروتئین‌های غشایی نوع یک را رمزدهی می کند (۱۸). یکی از شگردهای سلول‌های سرطانی در فرار از چنگ نظارتی سیستم ایمنی مقاومت به آپوپتوز می باشد (۹). بروز موتاسیون در ساختار اولیه Fas یکی از مکانیسم‌های احتمالی در اختلال فرآیند آپوپتوز ناشی از Fas در سلول‌های توموری محسوب می شود، به طوری مطالعات تجربی بیانگر وقوع موتاسیون در ژن Fas در اغلب بدخیمی‌های انسانی نظیر سرطان ریه، ملانوم بدخیم و سرطان معده می باشد (۱۶).

پلی مرفیسم A670G- در ژن Fas با تخریب جایگاه اتصال عامل نسخه‌برداری STAT1 موجب کاهش فعالیت پروموتور و کاهش بیان Fas می شود. وجود ارتباط معنی‌داری بین پلی مرفیسم ۶۷۰- در ژن Fas با سرطان معده در این مطالعه بیانگر کاهش خطر بروز سرطان در افراد هتروزیگوت AG می باشد (۱۰) و با نتایج مطالعه محققین چینی متفاوت می باشد که نتوانستند ارتباط معنی‌داری بین این پلی مرفیسم و سرطان معده را نشان دهند (۱۹). این امر می تواند ناشی از تأثیر نژاد و همین‌طور مواجهه با عوامل محیطی متفاوت باشد که نقش آن‌ها در روند سرطان‌زایی به اثبات رسیده است. کاهش خطر سرطان در بیماران مبتلا به سرطان معده دارای ژنوتیپ AG با نتیجه مطالعه تامسون و همکاران هم راستا می باشد که نشان داد مصرف چای سبز

می تواند منجر به کاهش خطر بروز سرطان معده در مصرف کنندگان این نوع چای گردد (۲۰).

مطالعه در مورد ارتباط پلی مرفیسم‌های ژنی در Fas و خطر بروز سرطان معده بسیار اندک بوده و محدود به آسیای شرقی است. این مطالعات نتایج متناقضی به همراه داشتند به طوری که در دو مطالعه در چین ارتباطی بین وقوع این پلی مرفیسم‌های ژنی در ژن Fas و خطر بروز سرطان معده یافت نشد (۲۱، ۱۹) ولی در مطالعه دیگر در چین، وقوع پلی مرفیسم در ژن Fas و FasL را به‌عنوان عامل خطر برای ابتلا به سرطان معده دانستند (۱۴). همچنین Hsu و همکاران آلل ۱۳۷۷A را در ژن Fas به عنوان عامل حفاظت‌دهنده در ایجاد و پیشرفت متاستاز نوع روده‌ای در ناحیه آنتروم معده معرفی کردند (۲۲). از آن‌جا که قدرت ارتباط بستگی زیادی به جمعیت مورد مطالعه دارد انجام مطالعه با جمعیت بیشتر در نژادهای دیگر به منظور تأیید این نتایج لازم می باشد تا با اطمینان بیشتر به توان به نقش تغییرات ژنی در سیستم Fas/FasL در پاتوزن سرطان معده تاکید کرد.

در مجموع، این تحقیق نشان داد که پلی مرفیسم A670G- در پروموتور ژن Fas با خطر سرطان معده مرتبط می باشد و نشان می دهد بروز تغییرات ژنتیکی در سیستم Fas/FasL می تواند با اختلال در فرآیند آپوپتوز در اتیولوژی سرطان مؤثر واقع شود.

## سپاسگزاری

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد بهمن فضلی می باشد. محققین لازم می دانند از زحمات و همکاری‌های پرسنل محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی ساری، بخش انکولوژی درمانگاه شهید رجائی بابلسر، پلی کلینیک طوبی و همچنین کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که امکان انجام این مطالعه را فراهم آوردند تشکر نمایند.

## References

- Liu Y, Wen QJ, Yin Y, Lu XT, Pu SH, Tian HP, Lou YF, Tang YN, Jiang X, Lu GS, Zhang J. FASLG polymorphism is associated with cancer risk. *Eur J Cancer* 2009; 45(14): 2574-2578.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49(1): 33-64.
- Bergman MP, D'Elios MM. Cytotoxic T cells in H.pylori-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 104918.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343(2): 78-85.
- Wu J, Siddiqui J, Nihal M, Vonderheid EC, Wood GS. Structural alterations of the FAS gene in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Arch Biochem Biophys* 2011; 508(2): 185-191.
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411(6835): 342-348.
- Wang J, Fan X, Lindholm C, Bennett M, O'Connell J, Shanahan F, et al. Helicobacter pylori modulates lymphoepithelial cell interactions leading to epithelial cell damage through Fas/Fas ligand interactions. *Infect Immun* 2000; 68(7): 4303-4311.
- Gryko M G-UK, Prczynicz A, Cepowicz D, Kukliński A, Czyżewska J, Kemon A, et al. Correlation between Fas and FasL proteins expression in normal gastric mucosa and gastric cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49(1): 142-147.
- Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, Gazdar AF. Apoptosis and lung cancer: a review. *J Cell Biochem* 2003; 88(5): 885-898.
- Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL, et al. Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2003; 63(15): 4327-4330.
- Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997; 34(8-9): 577-582.
- Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and So-Called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
- Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P, Lin D. Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(13): 1030-1036.
- Liu L, Wu C, Wang Y, Zhong R, Wang F, Zhang X, et al. Association of candidate genetic variations with gastric cardia adenocarcinoma in Chinese population: a multiple interaction analysis. *Carcinogenesis* 2011; 32(3): 336-342.
- Bremer E, de Bruyn M, Wajant H, Helfrich W. Targeted cancer immunotherapy using ligands of the tumor necrosis factor super-family. *Curr Drug Targets* 2009; 10(2): 94-103.
- Park WS, Oh RR, Kim YS, Park JY, Lee SH, Shin MS, et al. Somatic mutations in the death domain of the Fas (Apo-1/CD95) gene in gastric cancer. *J Pathol* 2001; 193(2): 162-168.



17. Ohno S, Tachibana M, Shibakita M, Dhar DK, Yoshimura H, Kinugasa S, et al. Prognostic significance of Fas and Fas ligand system-associated apoptosis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(10): 750-757.
18. Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics*. 1992; 14(3): 821-822.
19. Wang M, Wu D, Tan M, Gong W, Xue H, Shen H, et al. FAS and FAS ligand polymorphisms in the promoter regions and risk of gastric cancer in Southern China. *Biochem Genet* 2009; 47(7-8): 559-568.
20. Thomson CA, LeWinn K, Newton TR, Alberts DS, Martinez ME. Nutrition and diet in the development of gastrointestinal cancer. *Curr Oncol Rep* 2003; 5(3): 192-202.
21. Zhou RM, Wang N, Chen ZF, Duan YN, Sun DL, Li Y. Polymorphisms in promoter region of FAS and FASL gene and risk of cardia gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(3): 555-561.
22. Hsu PI, Lu PJ, Wang EM, Ger LP, Lo GH, Tsay FW, et al. Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL and risk of premalignant gastric lesions. *Anticancer Res* 2008; 28(1A): 97-103.