

Association between polymorphism of interleukin 17 (IL-17F) and increased susceptibility to gastric cancer

Aboozar Ghorbani¹,
Vahid Hosseini²,
Abulghasem Ajami¹,
Alireza Rafiei¹,
Zahra Hosseini-khah³,
Ghasem Janbabai⁴

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

² Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Molecular Cell-Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

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

(Received Sat 18, 2012 ; Accepted July 2 , 2012)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is one of the most common gastrointestinal cancers in the world. Gastric cancer is the most common cancer in north of Iran. Interleukin-17F (IL-17F) is a pro-inflammatory cytokine expressed by a novel subset of CD4+ Th cells (Th-17), and it causes the occurrence and strengthening the inflammatory response. This study aimed to assess the association between IL-17F- A7488G polymorphism and potential susceptibility to gastric cancer.

Materials and methods: A case-control study consisting of 161 gastric cancer patients with mean age 62.14 ± 12.6 and 171 healthy controls with mean age 58.93 ± 14.2 was conducted. Genomic DNA was extracted and genotypes of - A7488G polymorphism were assessed through polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Results: The frequency of G allele was higher in gastric cancer patients (12.1%) compared with the control group (9.15%), but these differences were not significant ($P=0.22$). In addition, the distribution of GG genotype was not significantly differed between the patients and the controls (4.3% vs. 1.8%, $P=0.182$). Furthermore, logistic regression analysis revealed no significant association between the presence of 7488G allele and clinical stages ($P=0.28$), tumor grade ($P=0.36$) and H. pylori infection ($P=0.89$).

Conclusion: These results suggest that IL-17F A7488G polymorphism in the promoter of IL-17F gene is not directly assumed as a genetic risk factor in the predisposition to gastric cancer.

Keywords: Gastric cancer, gene polymorphism, IL-17F, Th-17

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(91): 11-20 (Persian).

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن اینترلوکین-۱۷ (IL-17F) با افزایش استعداد ابتلاء به سرطان معده

ابوذر قربانی^۱
وحید حسینی^۲
ابوالقاسم عجمی^۱
علیرضا رفیعی^۱
زهره حسینی خواه^۳
قاسم جان بابایی^۴

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده یکی از شایع ترین سرطان های دستگاه گوارشی در دنیا می باشد که در ایران نیز از شیوع بسیار بالایی برخوردار است. اینترلوکین ۱۷-IL-17) یک سایتوکاین پیش التهابی می باشد است که توسط سلول های Th-17 ترشح می شود و از طریق القای فاکتورهای مختلف باعث ایجاد و تقویت التهاب می شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم IL-17 در بیماران مبتلا به سرطان معده و مقایسه آن با گروه شاهد می باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۳۳۲ نفر انجام گردید که شامل ۱۶۱ بیمار مبتلا به سرطان معده با میانگین سنی $62/14 \pm 12/6$ سال (۸۹ مرد و ۷۲ زن) و ۱۷۱ فرد سالم با میانگین سنی $58/93 \pm 14/2$ سال (۷۴ مرد و ۸۷ زن) بودند. DNA ژنومی با استفاده از روش تغییر یافته رسوب پروتئین با کمک غلظت بالای نمک استخراج شد و ژنوتیپ های حاصل از پلی مورفیسم IL-17F (rs 7488T/C) در ژن IL-17F با روش RFLP-PCR مورد بررسی گرفت و نتایج بین گروه بیمار و شاهد مقایسه گردید.

یافته ها: فراوانی آلل G در بیماران مبتلا به سرطان معده بیشتر (۱۲/۱ درصد) از فراوانی آن در گروه سالم (۹/۱۵ درصد) بود ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نشد ($p=0/22$). همچنین فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG در بیماران مبتلا به سرطان معده به مراتب از افراد سالم بیشتر بود (۴/۳ درصد در مقابل ۱/۸ درصد) با این وجود این تفاوت هم از نظر آماری قابل توجه نبود ($p=0/182$). ارتباط معنی داری بین حضور آلل 7488G با مراحل بالینی تومور ($p=0/28$)، درجه بدخیمی تومور ($p=0/36$) و عفونت هلیکوباکتر پیلوری ($p=0/89$) دیده نشد.

استنتاج: عدم وجود ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم A7488G در پروموتور ژن IL-17F و سرطان معده بیان می نماید که آلل G نمی تواند به تنهایی به عنوان یک فاکتور خطر ژنتیکی در تعیین استعداد ابتلاء به سرطان معده نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، پلی مورفیسم ژن، اینترلوکین ۱۷-F، Th17

مقدمه

سرطان های دستگاه گوارش، بیش از یک سوم سرطان های شایع و تقریباً نیمی از سرطان هایی که منجر به مرگ می شوند را تشکیل می دهند. از میان سرطان های لوله گوارش می توان به سرطان کولورکتال و سرطان

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۵۱۲-۸۹ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مؤلف مسئول: علیرضا رفیعی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی E-mail: rafiei1710@gmail.com

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱۱/۲۱ تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۱۲

معهده اشاره کرد که شایع ترین آن‌ها هستند و به ترتیب سومین و چهارمین بدخیمی‌های رایج در دنیا با شیوع سالیانه تقریباً یک میلیون ونهصد و سی و چهار هزار نفر مورد جدید را شامل می‌شوند (Jemal A 2005). سرطان معده به جهت شیوع بالا و مرگ و میر زیاد از اهمیت به‌سزایی در استان مازندران برخوردار است. هرچند 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 که عملاً به جهت عدم پاسخ مناسب به درمان‌های موجود از پیش‌آگاهی خوبی برخوردار نیست لذا تلاش‌های وافری می‌بایست در پیشگیری از این سرطان‌ها و به‌ویژه سرطان معده انجام شود (Lichtenstein P 2000).

از آن‌جا که ابتلاء به عفونت‌ها از جمله عفونت با هلیکوباکتر پیلوری نقش مهمی در بروز التهاب مزمن در مخاط معده دارد (Suerbaum S 2002) و التهاب مزمن شرایط را برای بروز زخم پپتیک و ادنوکارسینوم معده فراهم می‌نماید. با این حال، وجود تفاوت قابل ملاحظه در میزان التهاب در معده افراد مختلف آلوده به *H. pylori* (Prinz C 2001)، نشان می‌دهد که غیر از عوامل مربوط به پاتوژن، فاکتورهای دیگری از جمله فاکتورهای ژنتیکی و ایمونولوژیکی مربوط به میزبان نیز در این راستا نقش دارند. بنابراین سازوکارهایی که در ایجاد التهاب در مخاط معده نقش دارند، می‌توانند به‌عنوان محور اصلی مطالعاتی پاتوژن سرطان معده قرار گیرند. در این میان Th-17 که دودمان جدیدی از لنفوسیت‌های T CD4⁺ می‌باشد که مرز بین پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی محسوب می‌شود با تولید سیتوکاین‌های پیش التهابی از قبیل IL-22, IL-17A, IL-17F و IL-26 نقش کلیدی در ایجاد التهاب داشته و در پاتوژن بسیاری از بیماری‌های خود ایمن (Chabaud M 1998) و بیماری‌های التهابی روده‌ای و بدخیمی‌ها (Ye ZJ 2010) (Chen D 2012) مؤثرند. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های Th-17 باعث تقویت پاسخ‌های

ایمنی ضد تومور می‌شوند (Benchetrit F 2002) در حالی که سایر گزارشات بیانگر ارتباط Th-17 و به‌ویژه IL-17 با فرایند رگ‌زایی در تومورها و تعداد عروق خونی در بافت‌های سرطانی می‌باشند (Kato T 2001). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که التهاب مزمن می‌تواند سنگ بنای پیدایش سرطان باشد. سلول‌های Th17 به‌واسطه نقشی که در پیدایش التهاب به‌ویژه التهاب مزمن دارند، می‌توانند با پیدایش و پیشرفت سرطان ارتباط داشته باشند (Horlock C 2009). ارتباط IL-17 با پیشرفت سرطان پروستات (Steiner GE 2003)، کارسینوم پوست (Wang L 2010) و سرطان معده (Zhang B 2008) مشخص شده است. IL-17F موجب تولید بسیاری از سیتوکاین‌های التهابی نظیر IL-6 و GM-CSF و کموکاین‌های CxCL1 و CxCL2 و CxCL5 شده و تشکیل گرانولوم را تشدید نموده و در فراخوان نوتریفیل‌ها نقش به‌سزایی دارد (Weaver CT 2007).

مطالعات متعددی ارتباط بین پلی مرفیسم در ژن سیتوکاین‌ها و سرطان معده را بررسی کرده‌اند ولی اندک مطالعاتی در جهان به بررسی نقش پلی مرفیسم در ژن IL-17F در ارتباط با سرطان معده پرداخته‌اند. ژن IL-17F بر روی کروموزوم ۶ قرار گرفته و دارای ۳ اگزون می‌باشد. بروز پلی مرفیسم در ژن کد کننده IL-17F با بروز و شدت بیماری‌های خود ایمنی نظیر آرتريت روماتوئید (Nordang GB 2009)، بیماری التهابی روده (Chen B 2009)، سرطان معده ارتباط دارد (Tahara T 2009; Tahara T 2010). جایگزینی گوانین به آدنین در موقعیت A7488G پروموتور ژن IL-17F که باعث ایجاد پلی مرفیسم عملکردی rs 763780 می‌شود قابلیت تغییر فعالیت ژن را دارد به‌طوری که در افراد دارای آلل 197A میزان تولید IL-17 بسیار بیشتر از ناقلین 197G است (Espinoza JL 2011). هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش اشکال پلی مرفیک ژن IL-17F در استعداد ابتلا به سرطان معده می‌باشد. به همین منظور وضعیت پلی مرفیسم A7488G در ژن

IL-17F در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم بررسی شد. شناسایی فنوتیپ و ژنوتیپ بیماران مبتلا به سرطان علاوه بر کمک شایان در مشخص شدن فیزیوپاتولوژی بیماری، می‌تواند در شناسایی و غربالگری افراد دارای استعداد ابتلا ژنتیکی و حیثاً استفاده از راه کارهای پیش‌گیرانه و درمانی مناسب کمک نماید.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه مورد-شاهدی با توجه به سطح اطمینان ۹۵ درصد ($\alpha=5\%$) و توان آزمون ۹۰ درصد ($\beta=10\%$) و با توجه به ۷۲/۹ درصد $P=25/1$ درصد $P=161$ نفر در هر گروه برآورد گردید. به‌طوری که از مجموع ۳۳۲ نفر مورد مطالعه، ۱۶۱ بیمار مبتلا به سرطان معده بودند که از تیر ماه ۱۳۸۸ لغایت بهمن ماه ۱۳۹۰ به پلی کلینیک طبوبی و بخش‌ها گوارش و انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری جهت آندوسکوپی و شیمی درمانی مراجعه کرده بودند. تشخیص سرطان معده بر اساس یافته‌های بالینی، آندوسکوپی و تأیید پاتولوژی بر طبق پروتکل بین‌المللی International Classification of Diseases for Oncology IX, code 151 و معیارهای Lauren P (1965) انجام گردید. بیماران مورد بررسی بر اساس شواهد بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی فاقد بیماری‌های التهابی به‌ویژه کولیت اولسرو و بیماری التهابی روده بودند. ۱۷۱ نفر داوطلب سالم غیر خویشاوند با افراد مبتلا به سرطان معده که از نظر مشخصات سنی، جنس و منطقه جغرافیایی و نژاد با گروه بیمار مورد تحقیق مطابقت داشتند نیز به‌عنوان شاهد انتخاب شدند. این افراد از میان از اهداء کنندگان خون و یا از افرادی انتخاب شدند که جهت پایش سلامت خود مورد آندوسکوپی قرار می‌گرفتند و نتیجه آندوسکوپی آن‌ها نرمال بود. افراد شاهد بر اساس شواهد بالینی فاقد سابقه بیماری‌های خود ایمن یا التهابی

نظیر ارتريت روماتوئید؛ لوپوس اریتماتوس سیستمیک، دیابت ملیتوس و بیماری التهابی روده و یا بیماری‌های عفونی مزمن بودند. همچنین چنانچه در بستگان درجه یک این افراد سابقه سرطان معده وجود داشت نیز از ورود به مطالعه حذف می‌شدند. ویژگی‌های دموگرافیک و خصوصیات بالینی و پاتولوژی بیماران در چک لیست ثبت گردید. پروتکل انجام این مطالعه به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران رسید. از افراد تحت مطالعه بعد از اخذ رضایت آگاهانه حدود ۱۰-۵ میلی‌لیتر خون وریدی توسط سرنگ خلا دار استریل اخذ گردید و با لوله‌های حاوی ۵۰ میلی مولار EDTA جهت استخراج DNA ژنومی و لوله‌های حاوی خون لخته جهت جداسازی سرم منتقل شد و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA به روش تغییر یافته Salting out

بدین منظور حدود ۴ میلی‌لیتر خون حاوی EDTA را به لوله‌های فالتون ۱۵ میلی لیتری منتقل گردید و با بافر لیزکننده I به حجم ۱۵ میلی‌لیتر رسید. سپس به منظور مخلوط کردن، محتویات لوله را چند بار سر و ته کرده و ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد. و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و مجدداً لوله را تا ۱۵ میلی‌لیتر با بافر I پر شد و مراحل فوق‌الذکر سه بار تکرار گردید در مرحله بعد بر روی رسوب حاصله ۲ میلی‌لیتر بافر II ریخته و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۴۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و در طی این مدت چند بار لوله‌ها شیک شده تا رسوب کاملاً حل شود. نیم میلی‌لیتر محلول سدیم پر کلرات ۵ مولار به لوله‌ها افزوده و دو تا سه دقیقه مخلوط گردید، به هر لوله دو میلی‌لیتر کلرو فرم سرد، در زیر هود افزوده شد. لوله‌ها به‌مدت ۵ تا ۷ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی DNA می‌باشد به لوله‌های حاوی ۳ میلی‌لیتر اتانل سرد

۹۹ درجه اضافه شد اکلاف DNA مشخص و رسوب کند. در پایان DNA را با پی پت پاستور خارج کرده تا در هوای آزاد اتانل آن تبخیر شود و سپس DNA در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل حل شد.

تکثیر ناحیه ژنی IL-17F

تکثیر بخشی از ژن IL-17F که حاوی پلی مرفیسم A7488G می باشد با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی به کمک واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) تکثیر یافت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر و با استفاده از مخلوطی از ۱۰۰ ng DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرو مول از هر یک از بازهای آلی (dNTP)، ۱ میکرومول از هر یک از پرایمرها، ۲ mM از محلول MgCl₂، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و بفر PCR انجام گردید. پروفایل دمایی PCR شامل، دناتوراسیون اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۵ °C، و سپس در ۳۵ سیکل با شرایط دمایی زیر ادامه می یابد: دمای دناتوراسیون ۹۵ °C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰ °C به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۴ دقیقه.

تعیین ژنوتیپ IL-17F

برای تعیین ژنوتیپ های حاصل از پلی مرفیسم A7488G در ژن IL-17F از روش RFLP استفاده شد. برای این منظور بخش تکثیر یافته ژن IL-17F تحت تأثیر روش هضم آنزیمی با آنزیم های محدود الاثر *NlaIII* (فرمنتاز، آلمان) به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. سپس محصول هضم شده بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز برده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور آشکارسازی باندها صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

برای ارزیابی داده های کمی پس از اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون

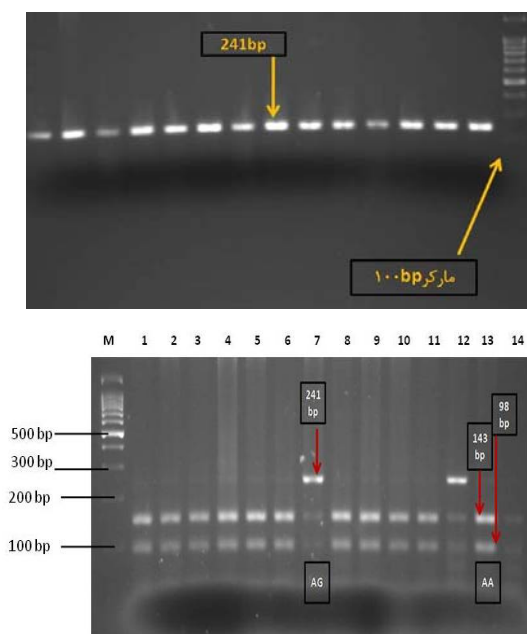
کولموگراف-اسمیرنوف، داده های کمی با استفاده از آزمون Student t Test مستقل و داده های کیفی با استفاده از تست های آماری مربع Chi و یا Fisher Exact test ارزیابی شدند. ارتباط بین ژنوتیپ ها و یا آلل ها پلی مرفیسم ژن ها با بیماری و مراحل مختلف آن با استفاده از آزمون رگرسیون لوژیستیک بررسی شد و میزان نسبت شانس Odd ratio با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد.

یافته ها

الف- ارزیابی یافته های دموگرافی و بالینی و پاتولوژیک بیماران مبتلا به کانسر معده

در این مطالعه ۱۶۱ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم معده شرکت داشتند که از این تعداد ۸۹ (۵۵/۲۴ درصد) مرد و ۷۲ (۴۴/۷۳ درصد) زن با میانگین سنی ۶۲/۱۴±۱۲/۶ سال بودند به طوری حداقل ۲۸ و حداکثر ۸۶ سال داشتند. از ۱۷۱ نفر شاهد سالم ۸۴ (۴۹/۱۲ درصد) مرد و ۸۷ (۵۰/۹ درصد) زن با میانگین سنی ۵۸/۹۳±۱۴/۲ سال وارد مطالعه شدند. همان طور که جدول شماره ۱ نشان می دهد اختلاف معنی داری 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 ($p=0/16$). وضعیت تأهل و شغل در بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود داشت به طوری که گرچه بیشترین جمعیت در هر گروه را افراد متأهل تشکیل می دادند با این حال فراوانی مجردین و افراد مطلقه در مبتلایان به سرطان معده بیشتر از افراد شاهد بود. همچنین اختلاف معنی داری بین دو گروه تحت مطالعه از لحاظ ویژگی های اجتماعی-اقتصادی وجود داشت به طوری که اشتغال در بیماران با سرطان معده کمتر از افراد شاهد بود ($p=0/001$) و میزان تحصیلات افراد بیمار کمتر از افراد شاهد بود ($p=0/003$).

کارایی نداشته و بنابراین تنها همان قطعه ۲۶۲ جفت بازی آشکار خواهد شد.



تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفوریتیک محصول PCR بخش تکثیر یافته‌ای از ژن IL-17F بطول 241 جفت باز (شکل بالا) که حاوی ناحیه پلی مرفیک A7488G و قطعات حاصل از هضم آنزیمی در روش RFLP-PCR (شکل پایین) را نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود ژنوتیپ AA باعث ایجاد دو باند ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی و ژنوتیپ AG باعث ایجاد سه قطعه ۲۴۱، ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی و ژنوتیپ GG تنها بواسطه حضور قطعه ۲۴۱ جفت بازی مشخص می‌شود.

توزیع فراوانی آلل و ژنوتیپی پلی مرفیسم A7488G در ژن IL-17F در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سالم در جدول شماره ۲ آمده است. به‌علت این‌که امکان بررسی نتیجه این پلی مرفیسم در ۷ فرد سالم فراهم نشد عملاً آنالیز آماری تعیین فراوانی ژنوتیپی در مورد ۱۶۴ نفر انجام گردید. توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مرفیسم در افراد شاهد از قانون هاردی وینبرگ تبعیت می‌کرد ($p=0/126$). همان‌طوری‌که در جدول شماره ۲ دیده می‌شود فراوانی آلل G که با افزایش تولید IL-17F همراه است، در بیماران مبتلا به سرطان معده بیشتر (۱۲/۱ درصد) از فراوانی آن در گروه سالم (۹/۱۵ درصد) بود درحالی‌که فراوانی آلل طبیعی A در

سرطان معده در بیماران مورد بررسی از نوع روده‌ای بود و ۷۱/۷ درصد بیماران در مرحله سوم و چهارم بیماری خود قرار داشتند. همچنین بررسی‌های پاتولوژی نشان داد اکثر بیماران مورد مطالعه در مراحل پیشرفته بیماری قرار داشتند و تنها در کمتر از ۱۰ درصد بیماران، تشخیص در مراحل اولیه بیماری انجام شده است. از طرف دیگر طبقه‌بندی بیماران بر اساس درجه بدخیمی نشان داد که درجه تمایز سلول‌ها در بیشتر از دو سوم بیماران نسبتاً تا کاملاً تمایز نیافته بود.

جدول شماره ۱: خصوصیات دموگرافیک در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد شاهد سالم

متغیر	شاهد (n=171)	سرطان معده (n=161)	سطح معنی داری
سن (سال)	58/93±14/2	62/14±12/6	0/99
جنس (زن: مرد)	84 : 87	89 : 72	0/16
وضعیت تاهل			
مجرد	3 (1/9)	7 (4/1)	
متاهل	166 (97/6)	149 (93/8)	0/002
متلقه	1 (0/5)	3 (2/1)	
شغل			
بی کار	1 (0/6)	4 (2/7)	
کارمند	35 (20/4)	24 (15)	0/001
خانه دار	74 (43/1)	46 (29/2)	
سایر	60 (36)	85 (53/1)	
تحصیلات در حد دیپلم و بالاتر	85 (49/7)	53 (32/9)	0/003

ب) تعیین ژنوتیپ حاصل از پلی مرفیسم A7488G در بیماران مبتلا به سرطان معده

تغییر باز آلی گوانین به جای آدنین در موقعیت A7488G پروموتور ژن IL-17F که موجب جایگزینی اسید آمینه آرژنین به جای هیستیدین در موقعیت ۱۶۱ پروتئین (H161R) می‌گردد موجب ایجاد سه ژنوتیپ GG، GA و AA می‌شود. این ژنوتیپ‌ها همان‌طور که در قسمت پایین تصویر شماره ۱ دیده می‌شود براساس تعداد و اندازه قطعه حاصل از برش توسط آنزیم محدودالثر مشخص می‌شوند به‌طوری‌که ژنوتیپ هموزیگوت AA دو قطعه ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی، ژنوتیپ هتروزیگوت GA سه قطعه ۲۴۱، ۱۴۳ و ۹۸ و ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG آنزیم محدودالثر

افراد شاهد بیشتر از بیماران مبتلا به سرطان معده بود (۹۰/۸۵ درصد در مقابل ۸۷/۹ درصد) ولی این اختلافات از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/22$). بررسی چگونگی توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مرفیسم در ژن IL-17F نشان داد ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG در بیماران مبتلا به سرطان معده به مرتب از افراد سالم بیشتر می باشد (۴/۳ درصد در مقابل ۱/۸ درصد) با این وجود این تفاوت از نظر آماری قابل توجه نبود ($p=0/182$). همان طور که جدول شماره ۲ نشان می دهد گرچه فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی AA در افراد سالم بیشتر از بیماران مبتلا به سرطان معده می باشد (۸۵/۵ درصد در مقابل ۸۰/۱ درصد) ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/4$).

با توجه به این که فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مورد مطالعه کم می باشد برای آن که بتوان تأثیر حضور آن را ارزیابی نمود کل جمعیت حامل یک نسخه و یا دونسخه از آلل موتان G با هم ترکیب گردید و به صورت مدل غالب آلل موتان G (شامل ژنوتیپ‌های GG+AG) ارائه شد. سپس جمعیت مورد مطالعه براساس حضور (ژنوتیپ‌های GG+AG) یا عدم حضور (ژنوتیپ GG) آلل G مورد مقایسه قرار گرفتند. همان طور که در جدول شماره ۲ دیده می شود گرچه حضور آلل G در بیماران بیشتر از افراد شاهد دیده شد (۲۰ درصد در برابر ۱۶/۵ درصد) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/42$).

ارزیابی ارتباط پلی مرفیسم IL-17F با پیشرفت سرطان معده

به منظور ارزیابی تأثیر آلل 7488G در پیشرفت سرطان معده و درجه بدخیمی آن، ارتباط مراحل تومور با حضور آلل 7488G (ژنوتیپ AG+GG) یا فقدان این آلل (ژنوتیپ AA) بررسی شد. از آن جا که فراوانی آلل موتان G کم می باشد به جای بررسی تأثیر آلل G، مدل غالب این آلل یعنی ژنوتیپ‌های حاوی این آلل

(AG+GG) با اندیس‌های مرتبط با سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. به همین دلیل برای ارزیابی نقش پلی مرفیسم A7488G از ژن IL-17F در میزان تمایز تومور، ارتباط حضور یا فقدان این آلل با درجات تمایزی تومور بررسی شد. همان طور که جدول شماره ۳ نشان می دهد ارتباط معنی داری بین حضور آلل 7488G با مراحل بالینی تومور ($p=0/28$)، درجه بدخیم ($p=0/36$) و عفونت هلیکوباکتریلوری ($p=0/89$) دیده نشد. به طوری که وجود یا عدم حضور آلل موتان G که باعث جایگزینی آرژنین در موقعیت ۱۶۱ سیتوکاین IL-17F می شود، موجب افزایش یا کاهش معنی دار شانس ابتلا به سرطان معده نمی شود.

جدول شماره ۲: ارتباط فراوانی آللی و توزیع ژنوتیپی حاصل از پلی مرفیسم A7488G (rs763780) از ژن IL-17F با سرطان معده

پلی مرفیسم A7488G (n=164)	شاهد (n=161)	سرطان معده (n=161)	OR	سطح اطمینان ۹۵ درصد	سطح معنی داری
ژنوتیپ					
AA	۱۳۷ (۸۵/۵)	۱۲۹ (۸۰/۱)	۱		
GA	۲۴ (۱۴/۶)	۲۵ (۱۵/۵)	۱/۱	۰/۶-۲/۰۳	۰/۷۴
GG	۳ (۱/۸)	۷ (۴/۳)	۲/۵	۰/۶۳-۹/۷۹	۰/۱۸۲
آلل A	۲۹۸ (۹۰/۸۵)	۲۸۳ (۸۷/۹)	۱		
آلل G	۳۰ (۹/۱۵)	۳۹ (۱۲/۱)	۱/۴	۰/۸۳-۲/۲۶	۰/۲۲
ناقل آلل G	۲۷ (۱۶/۴۶)	۳۲ (۱۹/۹)	۱/۵	۰/۷۱-۲/۲۲	۰/۴۲
(GG+AG vs. AA)					

توزیع ژنوتیپی و فراوانی آللی بصورت فراوانی مطلق و نسبی (اعداد داخل پرانتز) نشان داده شده است. اولین آلل یا ژنوتیپ طبیعی بعنوان رفرانس در نظر گرفته شده است.

جدول شماره ۳: ارتباط پیشرفت و درجه بدخیمی تومور معده با ژنوتیپ حاصل از پلی مرفیسم A7488G از ژن IL-17F

مرحله تومور TNM*	ژنوتیپ AG+GG (n=129)	ژنوتیپ AA (n=32)	OR	95% CI	سطح معنی داری
I+II	۹ (۴۷/۴)	۱۹ (۳۲/۸)	۰/۵۴	۰/۱۹-۱/۵۵	۰/۲۸
III+IV	۱۰ (۵۲/۶)	۳۹ (۶۷/۲)			
تمایز تومور**					
بخوبی تمایز یافته	۲ (۱۱/۸)	۲۰ (۲۳/۵)			
تمایز متوسط	۱۰ (۵۸/۸)	۴۸ (۵۶/۵)	۲/۰۸	۰/۴۲-۱۰/۳۷	۰/۳۶
تمایز نامناسب	۵ (۲۹/۴)	۱۷ (۲۰)	۲/۹۴	۰/۵۰-۱۷/۱۴	۰/۲۲
عفونت هلیکوباکتریلوری					
دارد	۲۰ (۶۲/۵)	۷۸ (۶۰/۵)	۰/۹۲	۰/۴۱-۲/۰۴	۰/۸۹
ندارد	۱۲ (۳۷/۵)	۵۱ (۳۹/۵)			

طبقه بندی تومور براساس مینای TNM انجام گردید.

*داده حاصل ۷۷ بیمار مبتلا به سرطان معده می باشد

**داده ها حاصل ۱۰۷ بیمار مبتلا به سرطان معده می باشد

بحث

اخیراً اثبات شده است که کاهش بیان IL-17 در تومور می تواند نشان دهنده پیش آگهی نامناسب سرطان معده باشد (Chen JG 2011). گرچه در مطالعات متعدد عملکرد IL-17A در بروز و پیشرفت تومورهای مختلف گزارش شده است و بر نقش پاتوژنیک آن در سرطان های دستگاه گوارش از جمله سرطان کولون تأکید گردیده ولی نقش IL-17F در تومورزایی به خوبی مشخص نشده است. به طوری که حتی برخی از مطالعات نقش حفاظتی برای IL-17F در سرطان کولون گزارش نموده اند که بر خلاف نقش IL-17A می باشد (Tong Z 2012). به همین خاطر این مطالعه انجام گردید تا مشخص شود آیا بروز تغییرات ژنی در IL-17F می تواند با استعداد ابتلا به سرطان معده در ارتباط باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ هموزیگوت GG در موقعیت ۷۴۸۸ ژن IL-17F به میزان ۳ درصد در افراد شاهد و ۴/۳ درصد بیماران مبتلا به سرطان معده شیوع داشته که عملاً اختلاف معنی داری را از نظر آماری به وجود نیاورد. این فراوانی با فراوانی گزارش شده در سفید پوستان اروپایی (۴/۵ درصد) بسیار نزدیک می باشد حال آن که فراوانی ژنوتیپ موتان 7488 G/G در جمعیت ژاپن بیشتر می باشد (۱۱/۴ درصد) (Shibata T 2009). همچنین فراوانی آلل موتان G در افراد شاهد ۹/۱۵ درصد و در مبتلایان به سرطان معده ۱۲/۱ درصد به دست آمد که این اختلاف باز هم از نظر آماری معنی دار نبود. به عبارت دیگر ارتباط بین ژنوتیپ های حاصل از این پلی مرفیسم و سرطان معده به دست نیامد. این یافته ها با نتایج مطالعه Shibata و همکاران در ژاپن همسو می باشند که نشان دادند فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مبتلا به سرطان معده و افراد غیر مبتلا ۴ درصد می باشد (Shibata T 2009). در حالی که ارتباط پلی مرفیسم 7488G از ژن IL-17F با بیماری کولیت اولسرو در جمعیت ژاپن (Arisawa T 2008) و با آتریت

روماتوئید در سفید پوستان اروپایی (Nordang GB 2009) گزارش شده است. از آن جا که نقش IL-17 و سلول های Th17 در بروز پاسخ های التهابی معده مرتبط با عفونت H. pylori شده است (Luzza F and 2000. 2000) به طوری که مقدار پروتئین IL-17 در مخاط معده بیماران مبتلا به H. pylori از افراد فاقد این باکتری بیشتر بوده و در نواحی زخم معده نیز غلظت IL-17 از نواحی سالم بیشتر می باشد (Mizuno T and 2005;11: 2005)، بنابراین IL-17 نقش به سزایی در التهابات معده ناشی از وجود هلیکوباکتر پیلوری و به دنبال آن بیماری های معده از جمله کارسینوم معده خواهد داشت. به همین دلیل تصور می شود که پلی مرفیسم عملکردی در ژن IL-17 استعداد ابتلا به سرطان معده را افزایش دهد. با توجه به یافته های این مطالعه که بیانگر عدم وجود ارتباط معنی دار بین بروز واریانت های ژنتیکی IL-17F در موقعیت A7488G و سرطان معده معده می باشد می توان نتیجه گرفت که ممکن است سایر همولوگ ها سیتوکاینی IL-17F از جمله IL-17A در این میان نقش داشته باشند.

در خانواده IL-17 پنج سیتوکاین وجود دارد که بیشترین تشابه ساختاری بین IL-17A و IL-17F وجود دارد. این دو سیتوکاین عملکرد مشترکی در القای تولید کموکاین هایی دارند که نقش به سزایی در فراخوان و فعال کردن نوتروفیل ها ایفا می کنند. مطالعاتی بسیار کمی وجود دارد که به بررسی تأثیر پلی مرفیسم IL-17F در بروز اختلالاتی انسانی پرداخته اند. کاواگوچی نشان داد که بیان و یا عملکرد IL-17F در افراد حامل آلل موتان 7488G ساپرس می شود (Kawaguchi M2004). این محققین همچنین نشان دادند که حضور واریانت موتان A7488G که باعث جایگزینی آرژنین در موقعیت ۱۶۱ به جای هیستیدین می شود موجب جلوگیری از تأثیر IL-17F طبیعی در تحریک بیان سیتوکاین های التهابی نظیر IL-8 و IL-6 در مطالعات تجربی می گردد (Kawaguchi M 2006).

در مجموع عدم وجود ارتباط معنی داری بین پلی مرفیسم IL-17F و سرطان معده بیان می نماید که آلل G نمی تواند به تنهایی به عنوان یک فاکتور خطر ژنتیکی در پیش گویی استعداد ابتلا به سرطان معده نقش داشته باشد. بنابراین با توجه به نقش ثابت شده IL-17 در روند کارسینوژنز سرطان معده، بررسی ارتباط سایر مولکول های خانواده IL-17 می تواند در تعیین ژنوتیپ و هاپلوتیپ مستعد کننده مفید باشد تا بتواند در تشخیص سریع و غربالگری افراد مستعد به سرطان معده کمک کند.

سپاسگزاری

محققین لازم می دانند از زحمات و همکاری های پرسنل محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی ساری و همین طور بخش انکولوژی بیمارستان امیرکلاهی بابل و پلی کلینیک طبوبی و همچنین کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که امکان انجام این مطالعه را فراهم آوردند تشکر نمایند.

براساس طبقه بندی Lauren سرطان معده به دو دسته تقسیم می گردد: نوع روده ای که ساختارهای غده ای شبیه غدد روده در معده ایجاد می شود و ارتباط تنگاتنگی با التهاب مزمن و به ویژه با گاستریت آتروفیک و به دنبال آن متاپلازی روده ای دارد و نوع منتشر که فاقد ساختار غده ای بوده و در مجاورت لبه های مخاط ملتهب معده پدید می آید. بنابراین التهاب شدید مخاط معده به همراه سایر ویژگی های میزبان می تواند مستقیماً باعث به راه انداختن وقایع موتاژن گردد و شرایط را برای رخداد نوع منتشر نیز فراهم سازد. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین حضور آلل موتان G از ژن IL-17F با ویژگی های بالینی سرطان معده از جمله اندازه تومور و متاستاز به مخاط معده و همچنین درجه تمایز تومور مشاهده نشد. این امر شاید به واسطه تأثیر ضد التهابی واریانت ژنی IL-17F-7488G باشد که باعث می شود پروتئین حاصل فاقد خواص پیش التهابی نظیر پروتئین طبیعی IL-17F باشد به طوری که گزارش شده است که این واریانت ژنی دارای اثرات مهار متاستاز و همچنین کاهش تحریک تولید متالوپروتئینازها می باشد (Kolls JK 2004).

References

1. Arisawa T, T. T., Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, (2008). "The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis." *J Clin Immunol* 28: 44-49.
2. Benchetrit F, C. A., Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. (2002). "Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism.." *Blood* 99(6): 2114-2121.
3. Chabaud M, F. F., Taupin JL, Miossec, (1998). "Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines." *J Immunol* 161: 409-414.
4. Chen B, Z. Z., Hou J, Chen M, Gao X, Hu P, (2009). "Association of interleukin-17F 7488 single nucleotide polymorphism and inflammatory bowel disease in the Chinese population." *Scand J Gastroenterol* 44: 720-726.
5. Chen D, H. Q., Mao C, Jiao Z, Wang S, Yu L, Xu Y, Dai D, Yin L, Xu H, (2012). "Increased IL-17-producing CD4(+) T cells in patients with esophageal cancer." *Cell Immunol* 272(2): 166-174.

6. Chen JG, X. J., Liang XT, Pan K, et al. (2011). "Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients." *Int J Biol Sci* 7: 53- 60.
7. Espinoza JL, T. A., Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. (2011). "A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation." *PLoS One*. 6(10): e26229.
8. Horlock C, S. B., Dyson PJ, Morishita M, Coombes RC, Savage P, Stebbing J. (2009). "The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer." *Br J Cancer* 100(7): 1061-1067.
9. Jemal A, M. T., Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. (2005). "Cancer statistics, 2005." *CA Cancer J Clin* 55 (1): 10-30.
10. Kato T, F. H., Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, Kamada M, Aono T. (2001). "Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer." *Biochem Biophys Res Commun*. 282(3): 735-738.
11. Kawaguchi M, A. M., Oda N, Kokubu F, Huang SK, (2004). "IL-17 cytokine family." *J Allergy Clin Immunol* 114: 1265-1274.
12. Kawaguchi M, T. D., Hizawa N, (2006). "IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity." *J Allergy Clin Immunol* 117: 795-801.
13. Kolls JK, L. A. (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." *Immunity* 21: 467-476.
14. Lauren P (1965). "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*. 64: 31-49.
15. Lichtenstein P, H. N., Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." *N Engl J Med* 343(2): 78-85, PMID: 10891514.
16. Luzzza F, P. T., Monteleone G, et al, and 2000. (2000). "Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa." *J Immunol* 165: 5332-5337.
17. Mizuno T, A. T., Nobata K, et al, and 2005;11: (2005). "Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization." *World J Gastroenterol* 11: 6305-6311
18. Nordang GB, V. M., Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Forre OT, Helgetveit K, et al (2009). "Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand." *Rheumatol Oxf* 48: 397-370.
19. Nordang GB, V. M., Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre ØT, Helgetveit K, Kvien TK, Lie BA. (2009). "Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand." *Rheumatology (Oxford)* 48(4): 367-370.
20. Prinz C, S. M., Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rösch T, Schepp W, Gerhard M. (2001). "Key importance of

- the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation." *Cancer Res* 61(5): 1903-1909, PMID: 11280745.
21. Shibata T, T. T., Hirata I, Arisawa T. (2009). "Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis." *Hum Immunol.* 70 (7): 547-551.
22. Steiner GE, N. M., Paikl D, Stix U, et al. (2003). "Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate " *Prostate* 56: 171-182.
23. Suerbaum S, M. P. (2002). "*Helicobacter pylori* infection." *N Engl J Med* 347: 1175-1186.
24. Tahara T, S. T., Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. (2009). "Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa." *Int J Mol Med.* 24(4): 563-569.
25. Tahara T, S. T., Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. (2010). "Association between IL-17A, -17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer." *Int J Mol Med.* 25(3): 471-477.
26. Tong Z, Y. X., Yan H, Liu W, Niu X, Shi Y, Fang W, Xiong B, Wan Y, Dong C. (2012). "A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis." *PLoS One.* 7(4): e34959.
27. Wang L, Y. T., Zhang W, Pardoll DM, Yu H, (2010). "IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer." *Cancer Res* 70: 10112-10120.
28. Weaver CT, H. R., Mangan PR, Harrington LE, (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." *Annu Rev Immunol* 25: 821-852.
29. Ye ZJ, Z. Q., Gu YY, Qin SM, Ma WL, Xin JB, Tao XN, Shi HZ, (2010). "Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion." *J Immunol* 185(10): 6348-6354.
30. Zhang B, R. G., Wei H, Zhang M, Bi J, et al, (2008). "The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer." *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 533-537.