ORIGINAL ARTICLE

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

Seyedeh Habibeh Mirmajidi[1],
Ali Barzegar[2],
Novin Nikbakhsh[3]

[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

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (142): 50-59 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۲ آبان سال ۱۳۹۵ (۵۹-۵۰)

بررسی چند شکلی جایگاه C>A ۹۳۸ – پروموتر P۲ 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>A۹۳۸- ژن *bcl2* در بروز سرطان معده نشان داده شده است. هدف از این مطالعه بررسی چندشکلی جایگاه C>A۹۳۸- 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 پلی‌مورفیسم 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 هم‌چنین 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، به‌صورت معنی‌داری (P=۰/۰۰۰۹) نسبت به مجموع ژنوتیپ‌های AA و CC، به میزان ۰/۲ برابر (OR=۰/۲۷۶) باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان معده می‌گردد. هیچ ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم 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>A۹۳۸ – پرموتور P۲ ژن *bcl2* می‌تواند یک مارکر مولکولی مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و هم چنین برای طراحی راه‌کارهای پیش‌گیری 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 درجهان است(۱) که به دلیل پیش‌آگهی ضعیف و میزان بالای مرگ و میر، کاپیتان مرگ نیز نامیده می‌شود(۲).این سرطان بیش‌تر در مردان

مولف مسئول: سیده حبیبه میرمجیدی– ساری: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم E-mail:habibehmirmajidi@gmail.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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 به‌خصوص مازندران وگلستان است(۴). به‌طورکلی 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(۸-۵). 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 وقطعه قطعه شدن DNA است(۱۰،۹). 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*) و 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(۱۲،۱۱). ژن *bcl2* در جایگاه ۲۱/۳ q کروموزوم ۱۸ قرار گرفته و شامل ۳ اگزون و دو پروموتر P۱ و P۲ می‌باشد. پروموتر P۲ به عنوان تنظیم کننده منفی پروموتر 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 پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide -polymorphism (*SNP*)) ناحیه rs17757541 C>G 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 (CC،GG) می‌شود(۱۴). پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی جایگاه 938C>A- ژن *bcl2*، برای اولین بار توسط Park و همکاران معرفی گردید(۱۵). بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی پروموتر دو ژن *bax* و*bcl2* و ارتباط آن ها با مصرف الکل و سیگار در افراد مبتلا به سرطان سر و گردن نشان داد که ژنوتیپ AAدر پروموتر ژن *bax* با افزایش و در پروموتر ژن *bcl2* با کاهش سرطان سر و گردن همراه است(۱۶).

Ning و همکاران وجود SNP را در جایگاه ۹۳۸C>A- پروموتر P۲ ژن *bcl2* در افراد چینی مبتلا به سرطان پستان بررسی کرده و نشان دادند که ژنوتیپ AA باعث افزایش بروز سرطان پستان می‌گردد(۱۳). تاثیر پلی‌مورفیسم جایگاه (rs2279115) 938 C>A- 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 به‌طور معنی‌داری نسبت به افراد دارای ژنوتیپCC کوتاه‌تر می‌باشد(۱۷). هدف از این پژوهش، مطالعه توزیع ژنوتیپی جایگاه ۹۳۸C>A- پروموتر P۲ ژن *bcl2* در افراد مبتلا به سرطان معده و بررسی تاثیر چندشکلی ژنتیکی این جایگاه در بروز سرطان معده بوده است.

مواد و روش ها

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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 آن ها با پلی‌مورفیسم جایگاه مورد مطالعه، بررسی شد. البته این بررسی تنها در مورد افرادی که خصوصیات دموگرافیک و کلینیکوپاتولوژیکی آن ها موجود بود، انجام گردید.

استخراج DNA و تکثیر قطعه

پس ازکسب 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 C>A۹۳۸- پروموتر P۲ ژن bcl2، از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد که قطعه‌ای به طول ۲۵۳ جفت باز را تکثیر می‌نمایند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۲۵۳ جفت بازی پروموتر P۲ ژن bcl2

نام	توالی	طول قطعه تکثیری (bp)	Tm
Bcl2-F	5'- TTATCCAGCAGCTTTTCGG -3'	۲۵۳	۵۲°C
Bcl2-R	5'- GGCGGCAGATGAATTACAA -3'		

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل غلظت 1X بافر PCR، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، 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 ۱/۵درصد ارزیابی و غلظت آن با روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. بررسی چندشکلی جایگاه C>A ۹۳۸- به روش SSCP چندشکلی جایگاه C>A۹۳۸- پروموتر P۲ ژن bcl2، به روش SSCP تعیین گردید. پس از تعیین غلظت قطعات تکثیرشده، غلظت‌های یکسانی از نمونه‌ها با بافربارگذاری (فرمامید ۹۵ درصد، EDTA ۲۰ میلی‌مولار ۸ pH، بروموفنل بلو و زایلن سیانل درصد ۰/۰۵) به نسبت ۱ به ۹ مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه دناتوره و بلافاصله روی یخ قرارداده شد. نمونه‌ها در چاهک‌های ژل آکریل آمید ۱۲ درصد ریخته شده و الکتروفورز با ولتاژ ۲۵۰ میلی ولت به مدت ۱۶ساعت در دمای ۴°C و در بافر TBE انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل آکریل آمید به وسیله نیترات نقره رنگ‌آمیزی(۱۹) و سپس الگوهای باندی بررسی و فراوانی آللی و ژنوتیپی تعیین شدند.

تجزیه و تحلیل آماری و آنالیز توالی‌ها

تعیین فراوانی ژنوتیپی و بررسی برقراری تعادل هاردی ینبرگ با استفاده از نرم افزار POPGENE نسخه ۳/۱ انجام شد. ارتباط بین ژنوتیپ جایگاه C>A 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 لوجستیک (Logistic Regression Model) بررسی شد. آنالیز توالی های 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 هم ردیفی آن‌ها با روش ClustalW انجام شد(۲۰).

یافته ها

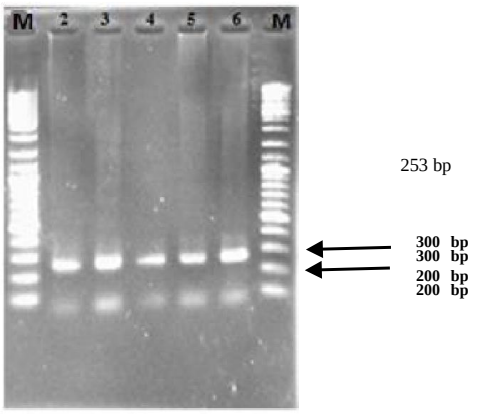
در مطالعه حاضر ۱۹۱ فرد متشکل از ۴۴ زن و ۱۴۷ مرد مورد ارزیابی قرار گرفتندکه شامل ۸۷ فرد مبتلا به سرطان معده و ۱۰۴ نمونه سالم به عنوان کنترل بودند. افراد بیمار شامل ۶۵ (۷۴/۷۲ درصد) مرد و ۲۲ (۲۵/۲۸

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

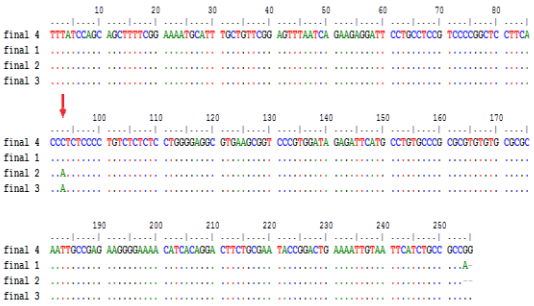
درصد) زن با میانگین سنی ۱۳/۳۲±۵۶/۰۶ سال و نمونه کنترل شامل ۸۲ (۷۸/۸۵درصد) مرد و ۲۲ زن (۲۱/۱۵ درصد) با میانگین سنی ۹/۷۶ ± ۵۰/۷۵ سال بود. نسبت مرد به زن در افراد مبتلا، ۶۳:۲۴ بود. بررسی ارتباط پارامترهایی از قبیل سن (p=۰/۳۹۷۹)، جنسیت (p=۰/۷۹۹۳)، مصرف سیگار (p=۰/۷۴۳) و مرحله بیماری (p=۰/۵۶۴۲) با ژنوتیپ افراد در جایگاه C>A۹۳۸- با روش رگرسیون لجستیک نشان داد که هیچ ارتباط معنی‌داری بین این پارامترها و ژنوتیپ افراد مبتلا به سرطان معده وجود ندارد (جدول شماره ۲).

تکثیر قطعه، تعیین توالی و آنالیز توالی‌ها

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 هم‌چنین 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. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Bio Edit نسخه ۷/۹/۱ مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌های رفت و برگشت با هم مقایسه شده تا خطاهای احتمالی تعیین توالی و نوکلئوتیدهای نامعلوم در توالی (N) تصحیح شوند. نتیجه جستجوی توالی‌های مشابه و میزان شباهت آن‌ها با ابزار BLAST مشخص کرد که توالی‌های به دست آمده به طول ۲۵۳ جفت باز دارای ۱۰۰ درصد یکسانی با ناحیه مورد نظر در پروموتر P۲ ژن *bcl2* هستند. نتایج حاصل از هم ردیفی توالی‌های مربوط به الگوهای مختلف با روش ClustalW، وجود چند شکلی در جایگاه C>A۹۳۸- را تایید نمود (تصویر شماره ۲). از طرف دیگر بررسی توالی‌ها و در ادامه استفاده از آن‌ها به عنوان کنترل در آنالیز SSCP نشان داد که غیر از ناحیه مورد بررسی (C>A۹۳۸-) جهش دیگری در سایر نواحی قطعه ۲۵۳ جفت بازی مورد بررسی وجود ندارد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر قطعه۲۵۳ جفت بازی پروموتر P۲ 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)



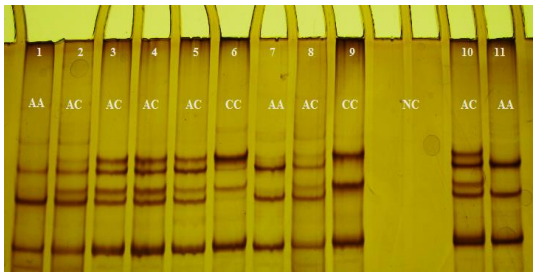
تصویر شماره ۲: هم ردیفی چندتایی(Multiple Alignment) توالی نوکلئوتیدی قطعه ۲۵۳ جفت بازی پروموتر P۲ ژن *bcl2* با روش ClustalW(فلش نشان دهنده جایگاه C>A۹۳۸- پروموتر P۲ ژن *bcl2* است که دارای چند شکلی می‌باشد. نقاط، نشان دهنده حضور نوکلئوتید یکسان در محل مورد نظر است.)

بررسی چند شکلی ناحیه C>A۹۳۸- پروموتر P۲ ژن bcl2

چند شکلی جایگاه C>A۹۳۸- پروموتر P۲ ژن *bcl2* با روش SSCP در ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد بررسی گردید. پس از رنگ‌آمیزی سه الگوی متفاوت ظاهر گردید که مربوط به سه ژنوتیپ AC، CC و AA بودند (تصویر شماره ۳). به منظور تشخیص نوع الگوی این ژنوتیپ‌ها، دو نمونه از هر کدام از این الگوها تعیین توالی شده و سپس در ژل‌های آکریل آمید مربوط به سایر نمونه‌ها، از آن ها به عنوان کنترل استفاده شد. در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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 آکریل آمید مربوط به ۴ رشته DNA بوده و در قسمت پائین‌تر دارای یک قطعه مربوط به DNA دو رشته‌ای بود. بررسی چند شکلی ناحیه A>C۹۳۸- در نمونه‌های بیمار و سالم در این بررسی نشان داد که در مجموع دو الل A و C و سه ژنوتیپ AA و CC و AC در این ناحیه وجود دارد. در بین افراد بیمار، ۱۴ نفر (۱۶/۰۹درصد) ژنوتیپ CC، ۶۱ نفر (۷۰/۱۲ درصد) ژنوتیپ AC و ۱۲ نفر (۱۳/۷۹درصد) 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 اللی ناحیه A>C۹۳۸- 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 معنی‌دار 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>C۹۳۸- پروموتر 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 CC+AA به‌صورت معنی‌داری (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 معنی‌دار نیست.



تصویر شماره ۳: الگوی SSCP قطعه ۲۵۳ جفت بازی پروموتر P۲ ژن *bcl2* در ژل آکریل آمید ۱۲درصد(چاهک‌های ۱، ۷ و ۱۱: نمونه‌های دارای ژنوتیپ AA؛ چاهک‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۸ و ۱۰: نمونه‌های دارای ژنوتیپ AC؛ چاهک ۶ و۹: نمونه‌های دارای ژنوتیپCC؛ چاهک‌های خالی: کنترل منفی)

جدول شماره ۲: خصوصیات دموگرافیک و کلینیکوپاتولوژیکی افراد مبتلا به سرطان معده و بررسی ارتباط آن ها با ژنوتیپ جایگاه A>C۹۳۸- ژن *bcl2*

خصوصیات دموگرافیک و کلینوپاتولوژیکی		تعداد	ژنوتیپ			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	۲/۲۲۵
جنسیت							
	مرد	۶۳	۱۰	۱۲	۴۱		۱/۰۰
	زن	۲۴	۲	۲	۲۰	۰/۷۹۹۳	۱۲/۳۴۱
عادت‌های رفتاری							
	سیگاری	۳۱	۵	۶	۲۰		۱/۰۰
	غیرسیگاری	۳۸	۶	۷	۲۵	۰/۷۴۳۰	۰/۸۳۶
**مرحله							
	I, II	۲۰	۵	۶	۹		۱/۰۰
	III	۳۸	۷	۵	۲۶	۰/۵۶۴۲	۱/۳۹۷

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

جدول شماره ۳: بررسی توزیع ژنوتیپی جایگاه A>C ۹۳۸- پروموتر P۲ ژن *bcl2* در افراد سالم و بیمار

ژنوتیپ	افراد بیمار	افراد سالم	Adjusted*	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	سطح معنی داری	OR
AA	(۱۳/۷۹) ۱۲	(۱۵/۳۸) ۱۶		۱/۰۰
AC	(۷۰/۱۲) ۶۱	(۶۱/۵۴) ۶۴	۰/۲۷۶۷	۰/۶۷۷
CC	(۱۶/۰۹) ۱۴	(۲۳/۰۸) ۲۴	۰/۷۱۸۸	۱/۲۷
AC+CC	(۸۶/۲۱) ۷۵	۸۸(۸۴/۶۲)		۱/۰۰
AA	(۱۳/۷۹) ۱۲	(۱۵/۳۸) ۱۶	۰/۳۳۶۷	۰/۶۹۲
AC+AA	(۸۳/۹۱) ۷۳	(۷۶/۹۲) ۸۰		۱/۰۰
CC	(۱۶/۰۹) ۱۴	(۲۳/۰۸) ۲۴	۰/۴۳۳	۰/۷۴۳
AA+CC	(۲۹/۸۸) ۲۶	(۳۸/۴۶) ۴۰		۱/۰۰
AC	(۷۰/۱۲) ۶۱	(۶۱/۵۴) ۶۴	۰/۰۰۰۹	۰/۲۷۶
تعداد کل	۸۷	۱۰۴		

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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 به‌عنوان آنکوژن عمل می‌کند و از طرف دیگر باعث مهار آپاپتوزیس می‌گردد. انجام هر کدام از این دو عملکرد به نوع بافت بستگی دارد. به‌عنوان 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). پروموتر P۲ ژن *bcl2* به‌عنوان تنظیم کننده منفی پروموتر 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>A۹۳۸- پروموتر P۲ شناسایی کردند(۱۵). در این مطالعه برای اولین بار چندشکلی ناحیه C>A ۹۳۸- پروموتر 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 بیش‌تر در معرض مواد سرطان‌زا، مواد شیمیایی، اشعه ایکس و غیره قرار داشته و هم‌چنین بیش‌تر از زنان الکل، سیگار و دخانیات مصرف می‌کنند(۲۲،۲۱). نمونه‌های سالم شامل ۸۲ (۷۸/۸۵ درصد) مرد و ۲۲ (۲۱/۱۵ درصد) زن با میانگین سنی ۹/۷۶±۵۰/۷۵ سال بودند. آزمون t انجام شده روی میانگین سنی افراد سالم و بیمار تفاوت معنی‌داری را بین آن‌ها نشان نداد (p>۰/۰۵). میانگین سنی اکثر افراد مبتلا و به عبارتی سن تشخیص بیماری بالاتر از سایر جمعیت‌ها بود(۲۴،۲۳). بدین ترتیب استفاده از روش‌های دقیق‌تر 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(۲۷،۲۶). به‌منظور بررسی پلی‌مورفیسم ناحیه C>A۹۳۸- پروموتر 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= ۰/۰۰۰۲۱۱) در حالی که نمونه‌های سالم در تعادل قرار می‌گیرند (p=۰/۰۹۹۵). هم‌چنین 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 ۰/۸۸۰می‌باشد) معنی‌دار نبود. اما تاثیر ژنوتیپ AC نسبت به مجموع ژنوتیپ‌های AA و CC به شدت معنی‌دار بوده (p=۰/۰۰۰۹) و این ژنوتیپ به میزان ۰/۲ برابر (OR=۰/۲۷۶)، باعث کاهش بروز سرطان معده می‌گردد. پلی‌مورفیسم ناحیه C>A۹۳۸- پروموتر P۲ ژن *bcl2* افراد مبتلا به سرطان معده سایر نقاط دنیا بررسی نشده است. با این وجود این پلی‌مورفیسم در سرطان‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان نمونه، پلی‌مورفیسم ژنتیکی ناحیه C>A۹۳۸- پروموتر 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 بیش‌ترین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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 می‌گردد. هم‌چنین مشابه اطلاعات به دست آمده در این مطالعه، بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های AA، CC وAC با پارامترهایی از قبیل سن تشخیص بیماری، سایز تومور و مرحله بیماری نشان داد که هیچ ارتباط معنی‌داری بین آن ها وجود ندارد(۱۳). ارتباط پلی‌مورفیسم جایگاه‌های A>G۲۴۸- در ژن *bax* و A>C۹۳۸- در ژن *bcl2* و ارتباط آن‌ها 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 می‌گردد، در حالی که در ژن *bcl2*، ژنوتیپ AA باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان سر و گردن می‌شود. هم‌چنین مصرف سیگار و الکل جزء خطرات اولیه برای گسترش سرطان سر و گردن بوده و ارتباط معنی‌داری با یکدیگر داشتند(۱۶). لینارت و همکاران، پلی‌مورفیسم ناحیه A>C۹۳۸- پروموتر P۲ ژن *bcl2* را به‌منظور ارزیابی تاثیر بالقوه نشان‌گر ژنتیکی برای پاسخ به شیمی درمانی و پیش‌بینی نتایج آن در بیماران SCLC (Small cell lung cancer) و این‌که آیا این نشان گر می‌تواند در بهینه‌سازی درمان سرطان ریه مفید باشد، مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بیمارانی که ژنوتیپ CC۹۳۸- را حمل می‌کنند نسبت به افراد حامل ژنوتیپ AA۹۳۸- به‌طور قابل توجهی زمان پیشرفت (Time to progression) بیماری در آن‌ها با وضعیت بدتری روبرو بوده و این مارکر ژنتیکی به‌طور ویژه ممکن است روی راهبردهای درمان موثر باشد(۲۸). در مطالعه دیگر بررسی SNP ناحیه A>C۹۳۸- پروموتر P۲ ژن *bcl2* و بیان آن در ارتباط با بقای بیماران مبتلا به OSCC (Oropharyngeal squamous cell carcinoma) انجام گرفت. نتایج نشان داد که ژنوتیپ CC۹۳۸- به‌عنوان یک شاخص پیش‌آگهی جدید در بیماران مبتلا به OSCC بوده و می‌تواند در شناسایی گروهی از بیماران که در معرض خطر عود بیماری و مرگ قرار دارند، مفید باشد(۲۹). بدین‌ترتیب ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه A>C۹۳۸- پروموتر P۲ ژن *bcl2*، تاثیر متفاوتی در افزایش یا کاهش بروز انواع سرطان در جمعیت‌های مختلف دارند. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که حضور ژنوتیپ AC در جایگاه A>C ۹۳۸ – پرموتور P۲ ژن *bcl2*، ممکن است باعث کاهش بروز سرطان معده گردد. در نتیجه بررسی چندشکلی این جایگاه می‌تواند یک مارکر مولکولی مفید در تعیین حساسیت فردی به سرطان معده و هم چنین برای طراحی راه‌کارهای پیش گیری در افراد مستعد این سرطان باشد. مطالعه حاضر اولین گزارش از تاثیر پلی‌مورفیسم ناحیه A>C۹۳۸- بر بروز سرطان معده می‌باشد.

References

1. 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.
2. Siewert JR, Maruyama K. What's new in gastric cancer? World Journal of Surgery 1995; 19(4): 483.
3. Bernini M, Barbid 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.
4. Malekzadeh R, Riahi A, Sajadi AS. Stomach cancer in Iran. Govaresh 2008; 2(13): 107-122.
5. Milne AN, Carneiro F, Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. Hum Genet 2009; 126(5): 615-628.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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, Nückel 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]