

## چند شکلی ژنتیکی GSTM1 در بیماران مبتلا به سرطان کولون در ایران

ماندانا یداللهی<sup>۱</sup>، مصطفی سعادت<sup>۱</sup>، ایرج سعادت<sup>۲</sup>

## چکیده

سابقه و هدف: شناخت اتیولوژی بیماری‌هایی از جمله سرطان‌ها از اولویت‌های پژوهشی محسوب می‌شود. در مورد نقش حذف ژنی در GSTM1 از افزایش شانس ابتلا به چندین سرطان گزارشات متناقضی وجود دارد لذا به منظور تعیین رابطه ژنوتیپ‌های آن با بروز سرطان کولون، این تحقیق در بیمارستان نمازی شیراز و گروه شاهد آنها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق مطالعه‌ای مورد - شاهده‌ای است که چندشکلی ژنتیکی GSTM1 به وسیله تکنیک PCR در ۳۸ بیمار مبتلا به سرطان کولون و ۷۶ فرد سالم (به عنوان گروه شاهد) بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون مربع کای مورد قضاوت قرار گرفتند و میزان مواجهه بودن با ژنوتیپ‌ها و ODD's Ratio آن محاسبه گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ null در گروه شاهد ۳۲/۹ و در مبتلایان به سرطان کولون ۵۰ درصد می‌باشد ( $P < 0/05$ ) و افراد مبتلا بیشتر از ۲ برابر افراد شاهد در مواجهه با ژنوتیپ Null بوده‌اند. در صورتی که دو گروه براساس سن طبقه‌بندی شوند آنگاه در سنین بالاتر از ۵۹ سال، بین ژنوتیپ null و ابتلا به سرطان کولون رابطه آماری معنی‌دار مشاهده می‌گردد ( $P < 0/02$ ).

نتیجه‌گیری: افراد هموزیگوس برای حذف ژنی در GSTM1 به ویژه در سنین بالا، استعداد بیشتری جهت ابتلا به سرطان کولون دارند.

واژگان کلیدی: سرطان کولون، گلوٹاتیون، اس - ترانسفراز، PCR و ایران.

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه خاتم تهران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه شیراز

## مقدمه

سرطان از جمله شایع‌ترین و طاقت‌فرساترین مسایل طب بالینی است. سرطان در نتیجه تجمع جهش در ژن‌هایی است که نقش ظریف و اساسی در تنظیم رشد و تمایز سلول ایفا می‌کنند. ژن‌هایی که با سرطان مرتبط هستند شامل انکوژن‌ها، ژن‌های مهارکننده تومور و ژن‌های درگیر با متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها (Xenobiotics) و فاکتورهای رشد می‌باشند (۱).

گزنوبیوتیک ترکیبی است که برای بدن بیگانه می‌باشد مانند داروها، مواد سرطان‌زای شیمیایی و ترکیبات مختلف که به طریقی وارد محیط زندگی ما شده‌اند. مواد سرطان‌زای شیمیایی یا به صورت مستقیم قادر به ایجاد آسیب در DNA می‌باشند و یا پس از این که تحت تأثیر آنزیم‌هایی نظیر سیتوکروم ۴۵۰ واقع شدند، متحمل تغییراتی شده، فعال گشته و خاصیت سرطان‌زایی پیدا می‌کنند (۲). ترکیبات سرطان‌زای نهایی معمولاً الکتروفیل بوده و به راحتی به گروه‌های نوکلئوفیل در DNA حمله می‌کنند. گلوکوتایون - اس - ترانسفراز آنزیمی است که اتصال میان گلوکوتایون با گزنوبیوتیک‌های الکتروفیل را کاتالیز می‌کند. در اثر این واکنش یک ترکیب الکتروفیل سرطان‌زا به ترکیب غیرفعال تبدیل شده و از بدن دفع می‌گردد (۱).

GSTها آنزیم‌های سیتوزولی هستند و براساس شباهت توالی آمینواسیدی و واکنش متقابل با آنتی‌بادی به چهار گروه  $\alpha$ ،  $\mu$ ،  $\pi$ ،  $\theta$  تقسیم می‌گردد (۳). کلاستر GST دارای پنج ژن می‌باشد که به نام‌های GSTM1، M3، M4، M5 نام‌گذاری می‌گردند. ژن GSTM1 روی کروموزوم 1P13 انسانی نقشه‌برداری شده است (۴). در انسان GSTM1 از نظر ژنتیکی دارای چندشکل می‌باشد و

سه آلل از آن شناخته شده است که به نام‌های GSTM1\*B و GSTM1\*O معروف می‌باشند. تفاوت B و GSTM1\*A در نوکلئوتید شماره ۵۳۴ می‌باشد. به نظر می‌رسد این دو آلل از لحاظ عملکردی کاملاً مشابه هستند. آلل GSTM1\*O نتیجه‌ای از حذف در ژن GSTM1 می‌باشد چنانچه فردی برای آلل دارای حذف به صورت هموزیگوس باشد ژنوتیپ وی Null notype می‌باشد (۵). افرادی با این ژنوتیپ در سلول‌هایشان GST  $\mu$  دارای فعالیت آنزیمی نمی‌باشد (۵).

سرطان‌های ریه (۷ و ۶)، معده (۵)، کولون (۸ و ۹)، مثانه و حنجره (۱۰)، پستان (۱۱) و لوسمی لنفوسیتییک حاد (۱۲) می‌شود. در حالی که در برخی تحقیقات هیچ ارتباطی بین حذف در ژن GSTM1 و ابتلا به سرطان مشاهده نشده است (۱۳-۱۵). باتوجه به این که گزارشات منتشر شده پیرامون ارتباط حذف در ژن GSTM1 و سرطان کولون ضد و نقیض می‌باشد (۱۴، ۱۳) هدف این تحقیق تعیین رابطه میان حذف هموزیگوس در ژن GSTM1 و احتمال افزایش خطر ابتلا به سرطان کولون باتوجه به عواملی همچون سن، جنسیت و سابقه بدخیمی در خویشاوندان درجه اول روی مراجعین به بیمارستان نمازی شیراز و گروه شاهد آنها انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

تحقیق به روش مورد - شاهدهی انجام گرفت. از ۳۸ بیمار مبتلا به سرطان کولون (گروه مورد) و ۷۶ فرد سالم (گروه شاهد) نمونه خونی تهیه شد. افراد بیمار از بیمارستان نمازی شیراز، بخش‌های شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی و نمونه‌های خونی افراد سالم از شهر شیراز و توابع جمع‌آوری گردید. گروه‌های مورد و شاهد به لحاظ سن، جنس و

خصوصیات فردی نمونه‌ها و یافته‌های آزمایشگاهی آنها در یک فرم اطلاعاتی ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: به منظور مقایسه فراوانی افراد هموزیگوت برای آلل GSTM1\*O در گروه‌های مورد مطالعه و بررسی نقش عواملی همچون جنسیت، سن و سابقه بدخیمی در خویشاوندان درجه اول از آزمون X<sup>2</sup> استفاده شد. و نقش نوع ژنوتیپ GSTM1 و نیز سابقه بیماری و سن بالای ۵۹ سال با بروز سرطان کولون تعیین و ODD's RATIO آن محاسبه گردید.

#### یافته‌ها

ناحیه تکثیر شده بین اگزون ۵ و ۶ که شامل اینترون ۵ نیز می‌باشد در ژل الکتروفورز به صورت یک تک باند (Single band) حدود ۱۰۵۰ جفت باز مشاهده می‌شود. افرادی که دارای ۲ آلل GSTM1\*O هستند (Null genotype) فاقد این باند می‌باشند. جهت به دست آوردن اندازه باند تقویت شده، از شاخص DNA که توسط آنزیم Hind III هضم شده بود استفاده گردید. خصوصیات سن و جنس نمونه‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ ارایه گردید و نشان می‌دهد که دو گروه با هم مشابه بوده و اختلاف آنها به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

جدول ۱- خصوصیات سن و جنس نمونه‌ها برحسب گروه‌های مورد مطالعه

خصوصیات	شاهد	سرطان کولون
تعداد کل	۷۶	۳۸
دامنه سنی گروه	۳۶-۹۵	۳۷-۸۱
تعداد زنان (درصد زنان)	۳۲ (۴۲٫۱)	۱۶ (۴۲٫۱)
دامنه سنی زنان	۳۶-۹۹	۳۷-۷۸
سن زنان	۵۵٫۱ ± ۱۱٫۵	۵۸٫۸ ± ۱۳٫۳
تعداد مردان (درصد مردان)	۴۴ (۵۷٫۹)	۲۲ (۵۷٫۹)
دامنه سنی مردان	۳۸-۹۵	۴۱-۸۱
سن مردان	۵۷٫۷ ± ۱۲٫۸	۶۰ ± ۱۱

وضعیت اقتصادی و اجتماعی به لحاظ مراجعه به یک بیمارستان مشابه بودند و مسلمان بودن، یارانی بودن و عدم رابطه خویشاوندی مشابه‌سازی شدند.

از هر فرد حدود ۱/۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد و به تیوب‌های حاوی ضدانعقاد EDTA منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰°C - نگهداری شدند.

#### استخراج DNA و انجام PCR

DNA نمونه‌های خونی به روش استاندارد آقای نیوتن استخراج گردید (۱۶). تیوب‌های حاوی DNA نیز تا زمان انجام واکنش PCR در دمای ۲۰°C - نگهداری گردید. جهت انجام PCR و تشخیص حذف در ژن GSTM1 نیاز به یک جفت پرایمر به توالی زیر بود:

5' AGACAGAAGAGGAGAAGATTC3  
5' TCCAAGTACTTTGGTTCAGT3

این پرایمرها می‌توانند ناحیه بین اگزون ۵ و ۶ شامل اینترون ۵ را از ژن GSTM1 تقویت نمایند (۱۲،۵). واکنش PCR در ۵۰ محلول واکنش در تیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری حاوی مواد زیر با غلظت نهایی Taq DNA، ۲۰۰ μm dNTP، ۱ μm primer، ۱ μm IDNA، ۱/۵mM MgCl<sub>2</sub>، ۰/۱/μ polymerase و X Buffer برای ۳۵ سیکل انجام پذیرفت. در هر سیکل نمونه‌ها ۷۲°C قرار داده شدند. در اولین سیکل نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۴°C قرار داده شدند و بعد از اتمام ۳۵ سیکل نیز نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C قرار گرفتند. پس از اتمام PCR، محصولات بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد به مدت ۳ ساعت الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ‌آمیزی به وسیله اتیدیوم برومید ژل زیر نور ماورای بنفش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

سابقه فامیلی بدخیمی ندارند شانس بیشتری برای ابتلا به سرطان کولون دارند. حذف ژن GSTM1 با ابتلا به سرطان کولون در افراد دارای سابقه فامیلی بدخیمی و افراد بدون سابقه فامیلی بدخیمی ارتباط آماری نشان نمی‌دهد.

### بحث

در این تحقیق ۳۳ درصد افراد گروه شاهد دارای ژنوتیپ Null بودند بنابراین فراوانی مشاهده شده در ایران (شهر شیراز و توابع) مشابه فراوانی‌های دیگر گزارش شده است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که فراوانی ژنوتیپ Null در ابتلا به سرطان کولون در سنین کهولت (بالای ۵۹ سال) اهمیت بسزایی دارد. هم‌چنین، سابقه بدخیمی در بستگان درجه اول بیماران سرطانی به طور چشم‌گیری نسبت به همان سابقه در گروه شاهد افزایش نشان می‌دهد. این امر نشان‌دهنده استعداد ژنتیکی در ابتلا به این گونه سرطان‌ها می‌باشد.

عدم مشاهده ارتباط آماری معنی‌دار در بررسی افراد دارای سابقه فامیلی و مبتلا به سرطان کولون نسبت به ژن GSTM1 به معنای رد نقش این ژن نبوده و حاکی از آن است که سرطان‌زایی فرآیندی پیچیده بوده و ژن‌های متعددی در ایجاد آن ایفای نقش می‌نمایند. مثلاً به غیر از چندشکلی در آنزیم‌های فاز I، چندشکلی ژنتیکی در آنزیم‌های فاز II مانند سیتوکروم‌ها نیز می‌تواند با افزایش ریسک ابتلا به سرطان ارتباط داشته باشد (۲).

در بخش زیست‌شناسی دانشگاه شیراز تحقیقات در خصوص نقش دیگر ژن‌های درگیر در بروز بدخیمی‌ها و ارتباط احتمالی آنها به سرطان کولون امروزه عوامل محیطی، ژنتیکی و همچنین اثرات متقابل این دو دسته را در بروز سرطان بسیار مهم می‌دانند (۲). GSTها ژن‌های محافظتی

در جدول شماره ۲ فراوانی ژنوتیپ‌های null و non null دو گروه نشان داده شده و مشاهده می‌شود که مبتلایان به سرطان کولون ۲ مرتبه بیشتر از گروه شاهد در مواجهه با ژنوتیپ Null بوده‌اند ( $P < 0/08$ ) ضمناً این نسبت در زنان ۲/۱ و در مردان ۲ بوده است.

جدول ۲- توزیع افراد مورد بررسی برحسب ژنوتیپ GSTM1 و به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

سرطان کولون	شاهد	گروه‌ها ژنوتیپ GSTM1
۱۹ (۵۰)	۵۱ (۷۷/۱)	NON NULL
۱۹ (۵۰)	۲۵ (۳۲/۹)	NULL
۳۸	۷۶	جمع

وضعیت ژنوتیپ‌های GSTM1 در افراد گروه‌های مورد و شاهد بالای ۵۹ سال در جدول شماره ۳ ارایه گردید و نشان می‌دهد که در افراد سنین بالای ۵۹ سال و مبتلا به سرطان کولون ۴/۳ برابر بیشتر از گروه شاهد در مواجهه با ژنوتیپ Null بوده‌اند ( $P < 0/02$ ).

جدول ۳- توزیع افراد بیشتر از ۵۹ سال برحسب ژنوتیپ GSMT1 و به تفکیک گروه‌ها

مبتلا به سرطان کولون	شاهد	گروه‌ها ژنوتیپ‌های GSTM1
۹ (۴۰/۹)	۲۱ (۷۵)	NON NULL
۱۳ (۵۹/۱)	۷ (۲۵)	NULL
۲۲	۲۸	جمع

مقایسه ژنوتیپ GSTM1 و سابقه بدخیمی در خویشاوندان درجه اول دو گروه به تفکیک جنسیت نشان داد که صرفنظر از ژنوتیپ GSTM1، سابقه فامیلی با ابتلا به سرطان کولون رابطه آماری معنی‌دار دارد ( $p < 0/05$ ) یعنی افرادی که دارای سابقه فامیلی بدخیمی می‌باشند نسبت به افرادی که

## تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر شاپور امیدواری و پرسنل محترم بخش‌های جراحی و شیمی، درمانی بیمارستان نمازی شیراز که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری می‌گردد. این تحقیق با حمایت‌های مالی و معنوی شیراز (پروژه تحقیقاتی ۷۸-SC-1179-654) و دانشگاه خاتم انجام پذیرفته است.

سرطان‌زاهای شیمیایی هستند و این ترکیبات را به سرعت سم‌زدایی می‌کنند (۱۷). چنانچه حذف به صورت هموزیگوت در ژن GSTM1 رخ دهد آلل GSTM1\*O حاصل می‌شود که اصطلاحاً این افراد را Null genotype می‌گویند. در مطالعات پیش‌بینی ۳۸ تا ۶۵ درصد از جمعیت‌های مطالعه شده فاقد فعالیت این آنزیم می‌باشند (۱۵-۱۲.۷-۵.۳).

## References:

- 1- Murray RK. Harper's Biochemistry. 8th ed. 1996: 757-60.
- 2- Kawajiri K, Jujii-Kuriyama Y. P450 and human cancer. Jpn J Cancer Res 1991; 82: 1325-35..
- 3- Pemble S, Schroeder KR, Spener SP, et al. Human glutathione s-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. Biochem J 1994; 300: 271-76.
- 4- Pearson WR., Vorachek WR., Xu SJ, et al. Identification of class mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1P13. Am J Hum Genet 1993; 53: 220-3.
- 5- Harada S, Misawa S, Takako N, et al. Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. Hum Gene 1992; 90: 62-64.
- 6- Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vianio H. The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. Carcinogenesis 1999; 14: 1479-81.
- 7- Nazar-Stewart V, Mortulsky AG, Eaton DL, et al. The glutathione S-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. Cancer Res 1993; 53: 231-9.
- 8- Gowronska-Saklarz B, Zuinski Kladny J, Kurzawski G, et al. Polymorphism of GSTM1 gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. Exp Toxicol Pathol 1999; 51: 321-5.

- 9- Slattery M, Petter JD, Ma KN, et al. Family history of colorectal cancer, NAT2, GSTM1 and risk of coln cancer. *Cancer Causes Control* 2000; 11: 108.
- 10- Lafuente A, Pujol F, Carretero P, et al. Human glutathione s-transferase mu deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett* 1993; 63: 49-54.
- 11- Maugard CM, Charrier J, Bignan YJ. Allelic deletion at glutathione S-transferase M1 locus and its association with breast cancer susceptibility. *Chemico Biol Interactions* 1998; 111-112: 365-75.
- 12- Saadat I, Saadat M. The glutathione S-transferase mu polymorphism and susceptibility to acute lymphocytic leukemia. *Cancer Lett* 2000; 158: 43-45.
- 13- Brockmoller J, Ker R, Darkoulis N, et al. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class  $\mu$  isoenzymes and in lung cancer patient and controls. *Cancer Res* 1993; 53: 1004-10.
- 14- Gertiy DM, Stampfer M, Haiman C, et al. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 1001-5.
- 15- Saadat I, Omidvari S, Saadat M. Genetic polymorphism of the Glutathione S-transferase M1(GSTM1) and Development of Breast cancer. *Iranian Biomed J* 2001; 5: 21-25.
- 16- Newton CR. Mutational analysis: Known mutations. In: McPherson MJ, Hames D, Taylor GR, eds. *PCR; A practical approach*. IRL Press Oxford. 1995; pp: 219-22.
- 17- Seidegard J, Guthenberg C, Pero RW, Mannervik B. The transtilbene oxide-active glutathione transferase in human mononuclear leukocytes is identical with the hepatic glutathione transferase  $\mu$ . *Biochem J* 1987; 246: 783-5.