

مطالعه همبستگی پلی مورفیسم های rs2010963 و rs833061 ژن VEGF-A و

ابتلا به سرطان کولورکتال در بیماران ایرانی

احسان بخشیان دهکردی^۱، مرتضی هاشم زاده چالستری^{۲*}، بتول سادات حائریان^۳، پریسا محمدی نژاد^۱^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد،شهرکرد، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات فارماکوژنتیک، دانشگاه مالایا، کوالالامپور، مالزی.

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۵

چکیده:

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال (CRC) سومین سرطان شایع در جهان است و علت آن اثرات متقابل عوامل ژنتیکی و محیطی می باشد. آنژیوژنز به فرمی از تشکیل مویرگ های جدید از عروق خونی موجود در بدن اطلاق می شود که در رشد تومور و متاستاز، نقش حیاتی دارد. در این مطالعه به بررسی ۲ پلی مورفیسم از ژن فاکتور رشد عروق اندوتلیال (VEGF) با استعداد ابتلا به سرطان کولورکتال در بیماران ایرانی پرداخته شد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۲۸۰ بیمار آدنوکارسینومای کولون از مراکز پاتولوژی بیمارستان های سینا و طالقانی استان تهران به عنوان مورد و ۳۷۲ فرد سالم به عنوان گروه شاهد از همان مراکز انتخاب شدند. افراد شاهد از نظر جنس و سن با گروه مورد، همسان گردیدند. بیماران با سابقه فامیلی مثبت، از مطالعه خارج شدند. اطلاعات استخراج شده شامل سن، جنس، محل تومور، مرحله بیماری و تمایز بافت سرطانی بودند. در این مطالعه با استفاده از تکنیک Real time PCR ژنوتیپ افراد برای پلی مورفیسم های rs2010963 و rs833061 مشخص گردید.

یافته ها: بیشتر افراد مبتلا به سرطان کولورکتال در جنس مردان بودند (۶۲/۷٪). بیشتر افراد کمتر از ۶۰ سال سن داشتند، بیشتر تومورها در ناحیه کولون قرار داشت (۶۹٪). بیشترین تمایز توموری در دسته تمایز متوسط جای گرفت (۵۴/۸٪) و همچنین از لحاظ مرحله آسیب شناسی نیز مرحله سوم دارای بیشترین میزان با (۷۲/۵٪) بود. در این پژوهش میان ۲ گروه مورد مطالعه از نظر حساسیت به سرطان کولورکتال بر اساس سن در زمان تشخیص ژنوتیپ T/C پلی مورفیسم rs833061 با سن کمتر از ۶۰ سال رابطه معنی دار نشان دادند (P=۰/۰۰۸).

نتیجه گیری: نتایج حاصل نشان می دهد که افراد دارای ژنوتیپ نام برده شده نسبت به سایر افراد دارای حساسیت بالاتری به ابتلا به سرطان کولورکتال هستند و همچنین با توجه به افزایش بروز جهانی بیماری و قابل پیشگیری بودن سرطان کولورکتال، می توان از این ژنوتیپ به عنوان مارکر مولکولی برای تشخیص زود هنگام این بیماری استفاده کرد.

واژه های کلیدی: سرطان کولورکتال، پلی مورفیسم، ژن فاکتور رشد عروق اندوتلیال (VEGF).

مقدمه:

سرطان روده بزرگ (کولورکتال) یکی از رایج ترین سرطان های بدخیم دستگاه گوارش در دنیا و چهارمین سرطان شایع کشورهای در حال توسعه و همچنین بعد از سرطان ریه دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان است (۱). سالانه در دنیا ۱/۵ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می شوند. بیشترین تعداد مبتلایان به این سرطان از استرالیا و نیوزیلند و کمترین آن از آفریقا (به استثنای آفریقای جنوبی) و نواحی جنوبی- مرکزی

برخی شاخص های آنژیوژنیک مانند VEGF-A نه تنها تشکیل عروق خونی جدید بلکه عروق لنفاوی درون تومور را نیز افزایش می دهند، روندی که گسترش و متاستاز سلول های تومور را تسهیل می کند (۷)؛ بنابراین به تازگی درمان های آنتی آنژیوژنیک در جلوگیری از رشد و متاستاز تومورها مورد توجه فراوان قرار گرفته اند (۸). به عنوان مثال یک مولکول سنتتیک که فعالیت VEGF و رسپتور آن را سرکوب می کند، قادر به کاهش رشد تومور ملانوما در مدل های حیوانی است (۹).

ژن VEGF-A انسانی با موقعیت ۶p۱۲/۳ با طول ۱۶۳۰۴ bp دارای ۸ اگزون و ۷ اینترون می باشد (۱۰). این ژن بسیار پلی مورفیک بوده و تاکنون بیش از ۱۵ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) از آن گزارش شده است (۱۱). پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی باعث بروز تغییرات کوچکی در توالی DNA می شوند که می توانند استعداد ابتلا به سرطان را افزایش بدهند (۱۲). از میان پلی مورفیسم های این ژن ۲ پلی مورفیسم rs833061 و rs2010963 دارای اهمیت زیادی در مطالعات سرطانی به خصوص سرطان کولورکتال هستند که پلی مورفیسم rs833061 در ناحیه پروموتور ژن و rs2010963 در ناحیه غیر ترجمه شونده 5'UTR واقع شده اند. در این مطالعه همبستگی پلی مورفیسم های، rs833061، rs2010963 در ژن VEGF و ارتباط بین آن ها با حساسیت ابتلا به سرطان کولورکتال در بیماران ایرانی بررسی شده است (۱۲).

روش بررسی:

شرط ورود به این مطالعه مورد-شاهدی ابتلا فرد به سرطان کولورکتال از نوع آدنوکارسینوما بود که ۲۸۰ بیمار مبتلا به این بیماری که مورد عمل

آسیا می باشد (۱). میزان بروز و مرگ و میر ناشی از سرطان کولورکتال در آسیا به سرعت رو به افزایش است و در ایران سومین سرطان شایع در زنان و چهارمین در مردان است (۱). بر اساس آخرین اطلاعات مرکز آمار ایران شیوع این سرطان رو به افزایش است و طبق آمار موجود، در حال حاضر چهارمین سرطان شایع در بین مردان (۵٪) و زنان (۵/۵٪) است (۲،۱). بیشترین میزان سرطان های روده بزرگ از نوع آدنوکارسینوما کولورکتال هستند (۹۸٪). سن شیوع این بیماری بیشتر در سنین ۶۰ الی ۷۰ سالگی می باشد (۳). در این بیماری اگرچه عوامل محیطی مانند رژیم غذایی، ورزش، مصرف سیگار و ... نقش موثری در ابتلا به این بیماری دارند، ولی عوامل وراثتی هم جزء عوامل تأثیرگذار در این بیماری محسوب می شوند (۳).

فرایند رگ زایی (آنژیوژنز) نه تنها در القای رشد تومور بلکه در فرایند پیچیده ی گسترش و متاستاز تومورها که شامل دور شدن سلول های سرطانی از محل اولیه ی خودشان و مهاجرت آن ها در طول عروق خونی و لنفاوی و پراکنده شدن آن ها در نقاط دوردست است نیز نقش مهمی دارد؛ به این ترتیب که هر چه عروق بیشتری در بافت تومور تشکیل می شود، سلول های تومور بیشتری از دیواره ی نفوذ پذیر عروق عبور کرده و وارد گردش خون می شوند (۴،۵). بین افزایش تراکم مویرگی و متاستاز و مرگ و میر در افراد مبتلا به سرطان پستان، کولورکتال، ریه و ملانوما، تخمدان و مثانه نیز یک رابطه ی مستقیم بسیار قوی وجود دارد؛ به طوری که با افزایش تراکم مویرگی تعداد سلول های تومور موجود در گردش خون به شدت افزایش می یابد (۶). یکی از فاکتورهای مهم ژنتیکی در سرطان کولورکتال فاکتور رشد عروق اندوتلیال یا ژن VEGF می باشد. افزایش

جراحی کولکتومی قرار گرفته و نمونه های آن ها به بخش پاتولوژی ارسال شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. بلوک های پارافینه بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال از بخش پاتولوژی بیمارستان های طالقانی و سینا استان تهران جمع آوری شد. پس از آن با مطالعه پرونده های این افراد اطلاعات کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران از قبیل سن و جنس، تاریخچه فامیلی سرطان، اندازه تومور و درجه پاتولوژی بیماری جمع آوری شد. جهت استخراج DNA ما از بافت فاقد تومور افراد سرطانی (بافت سالم مجاور تومور) به مقدار ۲۰ تا ۲۵ گرم نمونه برش خورده از بافت پارافینه استفاده کردیم (۱۳).

گروه کنترل در این مطالعه ۳۷۲ نفر بودند که از میان افرادی انتخاب شدند که از نظر سنی با افراد گروه بیماران مطابقت داشتند، این افراد ضایعه سرطانی در ناحیه کولون نداشتند. تاریخچه خانوادگی این بیماران مورد بررسی قرار گرفت و افرادی انتخاب شدند که در خانواده آن ها سابقه ابتلا به سرطان وجود نداشت. پس از گرفتن رضایت نامه از اهدا کنندگان خون، از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جهت انجام آزمایشات مولکولی جمع آوری شد (۱۴). پورپوزال و طرح این پایان نامه در شورای پژوهشی گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در تاریخ ۱۳۹۳/۵/۱ به تصویب رسید.

استخراج DNA ژنومی بیمار از بافت پارافینه نرمال و عاری از تومور (گزارش پاتولوژی) بر اساس دستورالعمل FFPE DNA extraction kit (QIAGEN, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 50, Catalog Number: 56404)

و استخراج DNA ژنومی افراد شاهد از خون محیطی بر اساس دستورالعمل Blood DNA extraction kit (QIAGEN, FlexiGene DNA Kit 250, Catalog Number: 51206) انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد که جذب نوری (OD) ۲۶۰ نانومتر میزان غلظت DNA و ۲۸۰ نانومتر میزان غلظت پروتئین را مشخص می کند. با محاسبه نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ میزان خلوص DNA به دست می آید که در این مطالعه این نسبت ۱/۴ تا ۱/۸۶ به دست آمد (۱۵).

تکنیک Real time PCR جهت بررسی ژنوتایپ ۲ پلی مورفیسم ژن VEGF بر روی DNA استخراج شده از بافت بیماران و خون افراد سالم استفاده شد. در این روش از LightCycler 1.5 شرکت (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) استفاده شد. توالی پرایمرها و پروب های هیبریداسیون (Metabion GmbH, Germany) در جدول شماره ۱ آورده شده است. در واکنش Rael Time PCR حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر در هر چاهک پلیت مشکل از پروب (۱/۲۵ میکرولیتر)، مسترمیکس (۱۲/۵ میکرولیتر)، DNA (۵ میکرولیتر)، آب دیونیزه (۶/۲۵ میکرولیتر) بود. شرایط واکنش برای انجام PCR در دستگاه Real time PCR شامل ۲ دقیقه دمای ۵۰°C، ۱۰ دقیقه دمای ۹۵°C، ۴۰ چرخه ۱۵ ثانیه دمای ۹۵°C و ۱ دقیقه دمای ۶۰°C بود. پس از اتمام PCR، سیگنال ها توسط نرم افزار دستگاه آنالیز شده و ژنوتیپ هر نمونه تعیین گشت (۱۵).

پس از جمع آوری اطلاعات، داده ها وارد برنامه آماری SPSS گردید و به تحلیل داده ها با استفاده از تست های تی و کای دو و رگرسیون لجستیک اقدام شد. در این تست ها در تمامی موارد سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ فرض شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و پیروپ های هیبریداسیون

SNP	Sequences	
- 460 T/C	Primer FWD	5'-CTCTTTAGCCAGAGCCGGGG-3'
	Primer REV	5'-TGGCCTTCTCCC CGCTCCGAC-3'
	WT T Probe	5'-FAM-ACC CAG ATC GTG CCA G-MGB-NFQ-3'
	Var C Probe	5'-TET-CAC CCA GAT CTT GCC AG-MGB-NFQ-3'
405 C/G	Primer FWD	5'-ACT CCG GCG GAA GCA TTC-3'
	Primer REV	5'-AGC AAG AAA AAT AAA ATG GCG AAT CCA-3'
	WT C Probe	5'-FAM-CAA GAG GGA CCG TGC TG-MGB-NFQ-3'
	Var G Probe	5'-TET-AAG AGG GAC CAT GCT G-MGB-NFQ-3'

یافته ها:

در این مطالعه ۲۸۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال و ۳۷۲ نفر به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند که از این میان ۲۴۶ نفر جنسیت زن و ۴۰۶ نفر آن ها مرد بود. بیشتر افراد مبتلا به سرطان کولورکتال دارای سن کمتر از ۶۰ سال بودند و میانگین سنی بیماران در زمان تشخیص نسبت به گروه شاهد دارای رابطه معنی دار بود ($P=0/001$). فراوانی سرطان کولون در بیماران بیشتر از رکتوم بود (به ترتیب ۶۹٪ و ۳۱٪). حدود ۹/۶٪ از بیماران دارای بافت توموری نامتمايز، ۵۴/۸٪ دارای تمايز توموری متوسط و ۳۵/۶٪ بافت توموری تمايز یافته داشتند. در زمان تشخیص بیماری بر اساس سیستم TNM (Tumor Node Metastasis)، ۴/۵٪ در مرحله اول، ۱۵/۴٪ در مرحله دوم، ۷۲/۵٪ در مرحله سوم و ۷/۷٪ در مرحله چهارم قرار داشتند.

فراوانی الی و ژنوتیپی پلی مورفیسم های rs833061 و rs2010963 بر اساس جنسیت، سن در زمان تشخیص، محل تومور، مرحله آسیب شناسی سرطان و میزان تمايز بافت تومور در ۲۸۰ بیمار و ۳۷۲ شاهد

بررسی شدند. خلاصه نتایج در جداول شماره ۲-۶ آورده شده است.

توزیع ژنوتیپ های ۲ پلی مورفیسم در گروه بیمار و شاهد مطابق معادله هاردی واینبرگ بود (پلی مورفیسم rs833061 در گروه بیمار: $P=0/014$ و در گروه شاهد: $P=0/46$ ، پلی مورفیسم rs2010963 در گروه بیمار: $P=0/062$ و در گروه شاهد: $P=0/98$).

نتایج مندرج در جدول شماره ۲ نشان می دهد که هیچ ارتباط معنی داری بین آلل و ژنوتیپ های پلی مورفیسم های نام برده شده با ابتلا به سرطان کولورکتال بر اساس جنسیت مشاهده نشد؛ بنابراین ۲ پلی مورفیسم rs833061 و rs2010963 نقشی در حساسیت ابتلای مرد یا زن به سرطان کولورکتال ایفا نمی نماید. ژنوتیپ T/C نسبت به ژنوتیپ T/T با زمان تشخیص سرطان در سنین کمتر از ۶۰ سال برای پلی مورفیسم rs833061 رابطه معنی دار نشان داد ($P=0/008$)، ولی آلل و ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs2010963 نقشی در حساسیت ابتلای مرد یا زن به سرطان کولورکتال ایفا نمی نماید (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲: رابطه بین پلی مورفیسم های rs833061 و rs2010963 و حساسیت به سرطان کولورکتال

بر اساس جنسیت

	rs2010963					rs833061				الل / ژنوتیپ / هاپلوتیپ	
	C/C	G/C	G/G	C	G	C/C	T/C	T/T	C		T
بیمار (%)	۱۴(۱۴/۴)	۲۹(۲۹/۹)	۵۴(۵۵/۷)	۵۷(۲۹/۳)	۱۳۷(۷۰/۶)	۲۷(۲۶/۷)	۴۰(۳۹/۶)	۳۴(۳۳/۷)	۹۴(۴۶/۵)	۱۰۸(۵۳/۵)	نسبت شانس، %۹۵ اطمینان
شاهد (%)	۱۷(۱۲/۹)	۵۹(۴۴/۷)	۵۶(۴۲/۴)	۹۳(۳۵/۲)	۱۷۱(۶۴/۷)	۳۵(۲۴/۱)	۶۴(۴۴/۱)	۴۶(۳۱/۷)	۱۳۴(۴۶/۲)	۱۵۶(۵۳/۷)	
زنان (۲۴۶)	۰/۶۹۹	۰/۰۲۳	-	۰/۲۳۲	-	۰/۹۰۰	۰/۵۸۰	-	۰/۸۲۴	-	P
	۰/۸۵۴(۰/۳۸۴-۱/۹۰۱)	۰/۵۱۰(۰/۲۸۵-۰/۹۱۱)	مرجع	۰/۸۷۶(۰/۵۳۰-۱/۱۶۶)	مرجع	۱/۰۴۴(۰/۵۳۴-۲/۰۳۸)	۰/۸۶۴(۰/۴۶۷-۱/۵۳۱)	مرجع	۱/۰۴۲(۰/۸۲۷-۱/۴۹۴)	مرجع	
بیمار (%)	۲۱(۱۲/۶)	۷۴(۴۴/۳)	۷۲(۴۳/۱)	۱۱۶(۳۴/۷)	۲۱۸(۶۵/۲)	۳۵(۱۹/۹)	۷۶(۴۳/۲)	۶۵(۳۶/۹)	۱۴۶(۴۱/۵)	۲۰۶(۵۸/۵)	نسبت شانس، %۹۵ اطمینان
شاهد (%)	۲۸(۱۳/۲)	۱۰۰(۴۷/۲)	۸۴(۳۹/۶)	۱۵۶(۳۶/۷)	۲۶۸(۶۳/۲)	۴۲(۱۸/۳)	۱۱۴(۴۹/۶)	۷۴(۳۲/۲)	۱۹۸(۴۳/۰۴)	۲۶۲(۵۶/۹)	
مردان (۴۰۶)	۰/۶۸۶	۰/۵۰۸	-	۰/۵۱۰	-	۰/۹۴۹	۰/۷۵۹	-	۰/۵۶۸	-	P
	۰/۸۷۵(۰/۴۵۸-۱/۶۷۲)	۰/۶۳۳(۰/۵۵۹-۱/۳۳۴)	مرجع	۰/۹۰۴(۰/۹۹۶-۱/۲۲۱)	مرجع	۰/۹۴۹(۰/۵۴۳-۱/۶۵۹)	۰/۷۵۹(۰/۴۸۸-۱/۱۸۱)	مرجع	۰/۹۲۱(۰/۶۹۶-۱/۲۲۰)	مرجع	
بیمار (%)	۳۵(۱۳/۳)	۱۰۳(۳۹)	۱۲۶(۴۷/۷)	۱۷۳(۳۲/۸)	۳۵۵(۶۷/۲)	۶۲(۲۲/۴)	۱۱۶(۴۱/۹)	۹۹(۳۵/۷)	۲۴۰(۴۳/۳)	۳۱۴(۵۶/۷)	نسبت شانس، %۹۵ اطمینان
شاهد (%)	۴۵(۱۳/۱)	۱۵۹(۴۶/۲)	۱۴۰(۴۰/۷)	۲۴۹(۳۶/۲)	۴۳۹(۶۳/۸)	۷۷(۲۰/۵)	۱۷۸(۴۷/۵)	۱۲۰(۳۲)	۳۳۲(۴۴/۳)	۴۱۸(۵۵/۷)	
کل (۶۵۲)	۰/۵۷۰	۰/۰۶۲	-	۰/۲۱۴	-	۰/۹۱۱	۰/۱۹۲	-	۰/۷۳۴	-	P
	۰/۸۶۴(۰/۵۳۳-۱/۴۲۹)	۰/۷۲۰(۰/۵۰۹-۱/۰۱۷)	مرجع	۰/۸۵۹(۰/۳۷۶-۱/۰۹۱)	مرجع	۰/۹۷۶(۰/۳۳۷-۱/۴۹۶)	۰/۷۹۰(۰/۵۵۴-۱/۱۶۶)	مرجع	۰/۹۶۲(۰/۸۷۱-۱/۲۰۱)	مرجع	

جدول شماره ۳: رابطه بین پلی مورفیسم های rs2010963 و rs833061 و حساسیت ابتلا به سرطان کولورکتال

بر اساس سن در زمان تشخیص سرطان

الل / ژنوتیپ / هاپلوتیپ	سن در زمان تشخیص ≥ 60 سال			سن در زمان تشخیص < 60 سال			P	نسبت شانس، ۹۵٪ اطمینان	بیمار (%)	شاهد (%)	P	نسبت شانس، ۹۵٪ اطمینان	بیمار (%)	شاهد (%)
	نسبت شانس، ۹۵٪ اطمینان	P	شاهد (%)	نسبت شانس، ۹۵٪ اطمینان	P	شاهد (%)								
rs833061														
T														
C														
T/T														
T/C														
C/C														
rs2010963														
G														
C														
G/G														
G/C														
C/C														

نتایج مندرج در جدول شماره ۴ نشان می دهد، بر اساس محل سرطان ایفا نمی کنند، ولی از نقطه نظر هیچ یک از آلل و ژنوتیپ های ۲ پلی مورفیسم rs833061 و rs2010963 نقشه در ابتلا به سرطان کولورکتال و در بین ۲ پلی مورفیسم فراوانی یکسانی داشت.

جدول شماره ۴: رابطه بین پلی مورفیسم های rs2010963 و rs833061 و حساسیت ابتلا به سرطان کولورکتال

بر اساس محل سرطان

الل / ژنوتیپ / هاپلوتیپ	کولون	رکتوم	P	نسبت شانس، ۹۵٪ اطمینان	P total
rs833061					
T					
C					
T/T					
T/C					
C/C					
rs2010963					
G					
C					
G/G					
G/C					
C/C					

نتایج جدول شماره ۵ نیز نشان می دهد که در مرحله سوم و چهارم آسیب شناسی ایفا نمی نماید، اما بیشتر بیماران ۲ پلی مورفیسم rs2010963 و rs833061 نقشه در حساسیت ابتلای به سرطان کولورکتال در مراحل بیشترین فراوانی را دارا بود.

جدول شماره ۵: رابطه بین پلی مورفیسم های rs833061 و rs2010963 و حساسیت به سرطان کولورکتال

بر اساس مرحله آسیب شناسی سرطان

P total	نسبت شانس، % اطمینان	P	بیماران مرحله سه و چهار (%)	بیماران مرحله یک و دو (%)	الل / ژنوتیپ / هاپلوتیپ	
	مرجع	-	۲۲۵(۵۷/۶)	۵۰(۵۴/۵)	T	rs833061
۰/۶۰۰	۰/۹۲(۰/۷۲-۱/۱۸)	۰/۵۲۶	۱۶۵(۴۲/۳)	۴۲(۴۵/۶)	C	
	مرجع	-	۷۳(۳۷/۴)	۱۴(۳۰/۴)	T/T	
۰/۶۸۹	۰/۳۲۸(۰/۴۴۶-۱/۴۴۶)	۰/۳۲۴	۷۹(۴۰/۵)	۲۲(۴۷/۸)	T/C	
۰/۸۲۵	۰/۳۳۷(۰/۴۱۸-۲/۰۱۸)	۰/۶۷۳	۴۳(۲۲/۱)	۱۰(۲۱/۷)	C/C	
	مرجع	-	۲۵۲(۶۸/۱)	۵۷(۶۱/۹)	G	rs2010963
۰/۵۴۵	۰/۸۲(۰/۶۳-۱/۰۷)	۰/۱۶۱	۱۱۸(۳۱/۸)	۳۵(۳۸/۰۴)	C	
	مرجع	-	۸۹(۴۸/۱)	۱۸(۳۹/۱)	G/G	
۰/۷۱۳	۰/۳۵۴(۰/۴۳۷-۱/۴۳۷)	۰/۳۴۴	۷۴(۴۰)	۲۱(۴۵/۷)	G/C	
۰/۶۳۶	۰/۲۳۶(۰/۷۱۱-۱/۷۱۱)	۰/۳۷۰	۲۲(۱۱/۹)	۷(۱۵/۲)	C/C	

ندارد؛ بنابراین ۲ پلی مورفیسم rs833061 و rs2010963 نقشی در حساسیت به سرطان کولورکتال با توجه به مرحله میزان تمایز بافت تومور ایفا نمی نماید؛ همچنین بیشترین بیماران در مرحله تمایز متوسط جای گرفتند.

طبق داده های جدول شماره ۶، هیچ گونه ارتباط معنی دار بین الل و ژنوتیپ های پلی مورفیسم های rs833061 و rs2010963 با حساسیت به سرطان کولورکتال با توجه به مرحله تمایز بافت تومور وجود

جدول شماره ۶: رابطه بین پلی مورفیسم های rs833061 و rs2010963 و حساسیت به سرطان کولورکتال

بر اساس میزان تمایز بافت تومور

الل / ژنوتیپ / هاپلوتیپ	نامتمایز بیمار (%)	تمایز متوسط بیمار (%)	تمایز یافته بیمار (%)	P	نسبت شانس % اطمینان
T	۲۳(۵۴/۷)	۱۵۳(۵۹/۷)	۹۷(۵۷/۷)	-	مرجع
C	۱۹(۴۵/۲)	۱۰۳(۴۰/۲)	۷۱(۴۲/۲)	۰/۶۲۹	۰/۹۲(۰/۶۷-۱/۲۷)
T/T	۶(۲۸/۶)	۴۸(۳۷/۵)	۳۲(۳۸/۱)	-	مرجع
T/C	۱۱(۵۲/۴)	۵۷(۴۴/۵)	۳۳(۳۹/۳)	۰/۱۰۵	۰/۶۵(۰/۳۹-۱/۰۹)
C/C	۴(۱۹)	۲۳(۱۸)	۱۹(۲۲/۶)	۰/۸۴۷	۰/۹۴(۰/۵۲-۱/۷۰)
G	۲۵(۶۵/۷)	۱۵۷(۶۴/۳)	۱۰۹(۶۸/۹)	-	مرجع
C	۱۳(۳۴/۲)	۸۷(۳۵/۷)	۴۹(۳۱/۰۱)	۰/۱۵۹	۰/۷۷(۰/۵۴-۱/۱۰)
G/G	۸(۴۲/۱)	۵۵(۴۵/۱)	۳۹(۴۹/۴)	-	مرجع
G/C	۹(۴۷/۴)	۴۷(۳۸/۵)	۳۱(۳۹/۲)	۰/۱۶۷	۰/۷۰(۰/۴۳-۱/۱۵)
C/C	۲(۱۰/۵)	۲۰(۱۶/۴)	۹(۱۱/۴)	۰/۳۱۴	۰/۶۷(۰/۳۱-۱/۴۴)

بحث:

سرطان یک مشکل جهانی به شمار می رود. از بین انواع سرطان، کولورکتال به دلیل شیوع بالای آن در کشورهای مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است. وراثت یکی از عوامل مهم در ایجاد این سرطان می باشد؛ بنابراین بررسی این عامل برای پیشگیری و کنترل این بیماری ضروری است. پلی مورفیسم وراثتی از جمله عواملی است که ممکن است بر حساسیت برخی گروه های نژادی به بعضی از بیماری ها و یا پاسخ بیماران به دارو اثر بگذارد (۱۶).

اصطلاح آنژیوژنز در سال ۱۷۸۷ برای نخستین بار توسط دکتر جان هانتز جراح انگلیسی برای توجیه رشد عروق خونی به کار برده شد و مطالعات متعددی در این مورد صورت گرفته است (۱۷)، اما افزایش مقاومت سلول های سرطانی به درمان های معمول مشکلی است که امروزه با آن روبرو هستیم است. به همین جهت دانشمندان و محققان به دنبال راهکارهایی نوین برای درمان سرطان باشند که موجب افزایش میزان حساسیت سلول های سرطانی گردند (۱۸).

با توجه به اهمیت و ویژگی های ذکر شده فاکتور رشد عروق اندوتلیالی در رابطه با رشد و توسعه عروق خونی تومورهای سفت، محققان به دنبال راهی هستند که بتوانند به واسطه مهار این فاکتور روش جدیدی جهت درمان بیماری هایی که با این عامل رابطه نزدیکی دارند، خصوصاً تومورهای سفت پیدا بکنند که می تواند روش امیدوارکننده ای جهت بهبود و درمان بیماری های وابسته به فاکتور رگ زایی محسوب شود. به همین دلیل به کار بردن مدل های متنوع آنژیوژنز در این راستا اهمیت فراوانی دارد که باعث شده است که تحقیقات زیادی در دنیا در این راستا صورت بگیرد (۱۹).

مطالعه حاضر روی ۲ پلی مورفیسم مهم و کاربردی ژن VEGF یعنی پلی مورفیسم های T/C ۴۶۰- و C/G ۴۰۵ صورت گرفته که بر روی این ۲ پلی مورفیسم

مطالعات و بررسی های زیادی در مورد بیماری ها از جمله سرطان کولورکتال انجام گرفته است، اما مطالعات در این مورد هنوز پراکنده است (۲۰). در مطالعه حاضر که بین بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال انجام گرفت رابطه معنی داری مشاهده شد که عبارت بود از افراد دارای ژنوتیپ T/C پلی مورفیسم rs833061 نسبت به ژنوتیپ T/T در رابطه با سن در زمان تشخیص دارای حساسیت بالاتری به ابتلا به سرطان کولورکتال نسبت به افراد فاقد این ژنوتیپ بودند. فراوانی ژنوتیپی هر ۲ پلی مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه ما با مطالعات قبلی صورت گرفته بر روی سرطان کولورکتال نزدیک بود (۲۱)؛ همچنین فراوانی ژنوتیپی جمعیت قفقازی های سالم گزارش شده نیز به جمعیت مورد مطالعه ما نزدیک بود: CC ۲۳٪، CT ۴۹-۵۸٪ و TT ۱۹-۲۸٪ برای پلی مورفیسم C/T ۴۶۰- و GG ۴۴-۵۰٪، GC ۳۷-۵۱٪ و CC ۱۵-۴٪ برای پلی مورفیسم G/C ۴۰۵+ محققین مشخص کردند که ژن VEGF-A در بافت سرطان کولورکتال در بیماران دارای آلل C با پلی مورفیسم C/T ۴۶۰- در مقایسه با بیماران دارای ژنوتیپ TT بیان بیشتری دارد (۲۰). Chae و همکاران گزارش کرده اند که هاپلوتایپ C/۴۰۵G- دارای فعالیت پرموتری بالاتری نسبت به هاپلوتایپ T/۴۰۵C- است (۲۱). George و همکاران وجود ارتباط VEGF-A و متاستاز به غدد لنفاوی در روده بزرگ را گزارش داده اند (۲۲)؛ همچنین Ponder و همکاران گزارش کردند که پلی مورفیسم های کاربردی این ژن که روی تنظیم بیان ژن تأثیر می گذارند، می توانند به تفاوت بین افراد برای استعداد ابتلا به سرطان کمک کند (۲۳). Koukourakis و همکاران گزارش دادند که پلی مورفیسم های ژنتیکی شامل مناطق ۴۶۰- با بیان پروتئین VEGF در سلول های سرطانی و رگ زایی در بافت تومور در ارتباط هستند (۲۴). محققین در اولین مطالعه ژنتیکی خود

ایران بود و علی رغم مطالعات متعددی که بر روی این ژن و پلی مورفیسم های آن در دنیا صورت گرفته، در مطالعه حاضر به جز ژنوتیپ TC پلی مورفیسم rs833061 که دارای رابطه معنی داری با حساسیت ابتلا به سرطان کولورکتال و سن در زمان تشخیص داشت ($P=0/008$). هیچ ارتباط معنی دار دیگری بین آلل ها و ژنوتیپ های این ۲ پلی مورفیسم با ابتلا به سرطان کولورکتال دیده نشد، نتایج به دست آمده نیازمند این هستند که توسط مطالعات مستقل دیگری مورد تأیید واقع شوند و همچنین مطالعات گسترده ای برای بررسی دقیق ارتباط پلی مورفیسم های ژن VEGF با ابتلا به سرطان کولورکتال لازم و ضروری است که در صورت تأیید این ارتباط می توان از این پلی مورفیسم ها به عنوان مارکرهای مولکولی برای تشخیص زود هنگام این بیماری استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از زحمات کلیه افرادی که در این مطالعه به ما یاری رساندند، خصوصاً پرسنل زحمت کش بخش پاتولوژی بیمارستان های سینا و طالقانی و سرکار خانم فاطمه دریس کارشناس ارشد آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که زحمت آنالیز داده ها را به دوش کشیدند و همچنین اعضای محترم دفتر مجله علوم پزشکی شهرکرد، کمال تشکر و قدردانی را نمایند.

دریافتند رابطه بین پلی مورفیسم های $T>C$ ۴۶۰- و $G>C$ ۴۰۵+ با میزان حساسیت ابتلا به سرطان کولورکتال در جمعیت بریتانیا کاهش یافته است (۲۵). در مطالعه ای دیگر Des و همکاران بیان ژن VEGF با پیش بینی بیماری و متاستاز در سرطان کولورکتال گزارش دادند (۲۶). مطالعات متعدد نشان داده اند که پلی مورفیسم در ناحیه پروموتور و همچنین در مناطق ۵- و ۳- ترجمه نشده ژن VEGF با تولید پروتئین VEGF در بروز سرطان کولورکتال مرتبط است (۲۷). به تازگی، تعدادی از مطالعات اپیدمیولوژیک مولکولی به بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن VEGF و حساسیت ابتلا به CRC منجر شده است (۲۸).

از آن جایی که این ژن و خانواده آن نقش مهم و حیاتی در رگ زایی خصوصاً تومورها ایفا می کنند، چندین پلی مورفیسم عملکردی دیگری در این ژن گزارش شده اند که با بیان ژن VEGF و یا افزایش ریسک تومورهای جامد در ارتباط هستند که نشان دهنده پتانسیل این پلی مورفیسم ها به عنوان مارکرهای زیستی برای پیش بینی این بیماری می باشند (۲۹، ۳۰).

نتیجه گیری:

مطالعه حاضر، اولین مطالعه صورت گرفته بر روی رابطه آلل و ژنوتیپ ۲ پلی مورفیسم (rs833061 و rs2010963) ژن VEGF با ابتلا به سرطان کولورکتال در

منابع:

1. Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res.* 2005; 577(1-2): 275-83.
2. Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis.* 2000; 21(11): 1977-81.
3. Kummur V, Fausto A. *Pathology basis of disease.* 7th ed. USA: Saunders; 2007: 862-86.
4. Li WW, Tsakayannis D, Li VW. Angiogenesis: A control point for normal and delayed wound healing. *Contemp Surg.* 2003; 1(2): 5-11.
5. Kondo S, Mukudai Y, Soga D, Nishida T, Takigawa M, Shiota T. Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low-metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Anticancer Res.* 2014; 34(2): 671-7.

6. Aberg UW, Saarinen N, Abrahamsson A, Nurmi T, Engblom S, Dabrosin C. Tamoxifen and flaxseed alter angiogenesis regulators in normal human breast tissue in vivo. *PloS one*. 2011; 6(9): e25720.
7. Hillmeister P, Gatzke N, Dulsner A, Bader M, Schadock I, Hoefler I, et al. Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res*. 2011; 109(5): 524-33.
8. Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2001; 86(1): 289-97.
9. Noonan DM, Benelli R, Albini A. Angiogenesis and cancer prevention: A vision. *Recent Results Cancer Res*. 2007; 174: 219-24.
10. Kruger EA, Duray PH, Price DK, Pluda JM, Figg WD. Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Semin Oncol*. 2001; 28(6): 570-6.
11. Mansouri K, Mostafaei A, Mirshahi M, Mohammadi Motlagh H, Maleki A, Keshavarz M. Human coagulated plasma as a natural and low cost matrix for in vitro angiogenesis. *Iran Biomed J*. 2009; 13(3): 179-83.
12. Mansouri K, Mirshahi M, Pourfathelah A, Hasan Z. Development of an experimental model of angiogenesis in 3-dimensional fibrin matrix for screening of angiogenesis agents. *Behbood J*. 2005; 9(3): 27-35.
13. Montazer Haghighi M, Najarsadeghi R, Mohebbi SR, Khatami F, Mighimi B, Ghiasi S, et al. Association of MTHFR gene polymorphism (C677T) and sporadic colorectal cancer. *Pajouhesh dar Pezeshki (Journal of Research in Medical Sciences)*: 2008; 3: 193-9.
14. Fazeli MS, Adel MG, Lebaschi AH. Colorectal carcinoma: A retrospective, descriptive study of age, gender, subsite, stage, and differentiation in Iran from 1995 to 2001 as observed in Tehran University. *Dis Colon Rectum*. 2007; 50(7): 990-5.
15. Dietmaier W, Hofstadter F. Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab Invest*. 2001; 81(10): 1453-6.
16. Wang BS, Liu Z, Xu WX, Sun SL. CYP3A5*3 polymorphism and cancer risk: A meta-analysis and meta-regression. *Tumour Biol*. 2013; 34(4): 2357-66.
17. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*. 2007; 21(1): 44-52.
18. Kummalue T. Molecular mechanism of herbs in human lung cancer cells. *J Med Assoc Thai*. 2005; 88(11): 1725-34.
19. Ebos JM, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: Impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8(4): 210-21.
20. Hansen TF, Spindler KL, Lorentzen KA, Olsen DA, Andersen RF, Lindebjerg J, et al. The importance of -460 C/T and +405 G/C single nucleotide polymorphisms to the function of vascular endothelial growth factor A in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136(5): 751-8.
21. Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Cho YY, Ahn BM, Moon JH, et al. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. *J Korean Med Sci*. 2008; 23(3): 421-7.
22. Karnezis T, Shayan R, Caesar C, Roufail S, Harris NC, Ardipradja K, et al. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell*. 2012; 21(2): 181-95.
23. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: Two sides of the same coin? *Cancer Cell*. 2012; 22(1): 9-20.
24. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004; 46(3): 293-8.

25. Qi M, Huang X, Zhou L, Zhang J. Four polymorphisms of VEGF (+405C>G, -460T>C, -2578C>A, and -1154G>A) in susceptibility to psoriasis: a meta-analysis. *DNA Cell Biol.* 2014; 33(4): 234-44.
26. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer.* 2006; 94(12): 1823-32.
27. Bae SJ, Kim JW, Kang H, Hwang SG, Oh D, Kim NK. Gender-specific association between polymorphism of vascular endothelial growth factor (VEGF 936 C>T) gene and colon cancer in Korea. *Anticancer Res.* 2008; 28(2B): 1271-6.
28. Liu L, Liu L, Zeng F, Wang K, Huang J, Xin L, Zhu P-Q: Meta-analysis of the association between VEGF-634 G> C and risk of malignancy based on 23 caseâ “control studies. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011, 137(6): 1027-1036.
29. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(12): 3369-72.
30. Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, Giannopoulos G, Papaconstantinou I, Theodoropoulos G, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in gastric cancer development, prognosis, and survival. *J Surg Oncol.* 2006; 94(7): 624-30.

Correlation study of rs833061, rs2010963 polymorphisms in VEGF-A gene in Iranian colorectal cancer patients

Bakhshian Dehkordi E¹, Hashemadep Chaleshtori M^{2*}, Haerian BS³, Mohammadinejad P¹
¹Biology Dept., Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran; ²Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran;
³Pharmacogenetics Dept., Malaya University, Kuala Lumpur, Malaysia.

Received: 13/Apr/2016 Accepted: 19/Jun/2016

Background and aims: Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and is caused by the interaction of genetic and environmental factors. Angiogenesis is the formation of new blood vessels in the body that plays a critical role in tumor growth and metastasis. In this study, it was aimed to examine 2 Gene Polymorphism of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and susceptibility to colorectal cancer in Iranian patients.

Methods: In this case-control study, 280 patients with colon adenocarcinoma selected of the pathology centers in Tehran (Sina and Taleghani) hospital as cases and 372 healthy subjects as controls were selected from the same centers. Control subjects were matched according to sex and age. Patients with positive family history of cancer were excluded. Data collected included age, sex, tumor location, stage of disease and cancer tissue. In this study, it was used Real time PCR techniques to genotype rs833061 and rs2010963 polymorphisms.

Results: Colorectal cancer in men was more than women (62.7%). Age of most people was under 60 years. Most tumors were located in the colon (69). From the point of tumor tissue differentiation, most of them were placed in the moderate level (54.8%) and pathology stage most of them were in stage III (72.5%). In the current study, between the two groups in terms of susceptibility to colorectal cancer, it was a significant relationship based on onset age T/C genotype of rs833061 polymorphism with age<60 (P=0.008).

Conclusion: The results of this study show that people who have been named genotype are more sensitive than others to the risk of colorectal cancer, and also due to the increasing prevalence of colorectal cancer diseases in the worldwide and possibility of prevention, it can be used this genotype as molecular markers for early detection of the disease.

Keywords: Colorectal cancer, Polymorphisms, Vascular Endothelial Growth Factor gene (VEGF).

Cite this article as: Bakhshian Dehkordi E, Hashemadep Chaleshtori M, Haerian BS, Mohammadinejad P. Correlation study of rs833061, rs2010963 polymorphisms in VEGF-A gene in Iranian colorectal cancer patients. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(5): 128-139.

***Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. Tel: 00989383330709, E-mail: mchalesh@yahoo.com