جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۱ مرداد سال ۱۳۹۱ (۲۰-۱۱)

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]
زهرا حسینی خواه [۳]
قاسم جان بابایی [۴]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌های دستگاه گوارشی در دنیا می‌باشد که در ایران نیز از شیوع بسیار بالایی برخوردار است. اینترلوکین -۱۷ (IL-17) یک سایتوکاین پیش التهابی می‌باشد است که توسط سلول‌های Th-17 ترشح می‌شود و از طریق القای فاکتورهای مختلف باعث ایجاد و تقویت التهاب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم IL-17 در بیماران مبتلا به سرطان معده و مقایسه آن با گروه شاهد می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی بر روی ۳۳۲ نفر انجام گردید که شامل ۱۶۱ بیمار مبتلا به سرطان معده با میانگین سنی ۱۲/۶ ± ۶۲/۱۴ سال (۸۹ مرد و ۷۲ زن) و ۱۷۱ فردسالم با میانگین سنی ۱۴/۲ ± ۵۸/۹۳ 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 ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مرفیسم 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.

یافته‌ها: 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 معنی‌دار نشد (p= ۰/۲۲). 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 =۰/۱۸۲). ارتباط معنی‌داری بین حضور آلل 7488G با مراحل بالینی تومور (p=۰/۲۸)، درجه بدخیمی تومور (p=۰/۳۶) و عفونت هلیکوباکتر پیلوری (p=۰/۸۹) دیده نشد.

استنتاج: عدم وجود ارتباط معنی‌داری بین پلی مرفیسم A7488G در پروموتور ژن IL-17F و سرطان معده بیان می‌نماید که آلل G نمی‌تواند 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 17-F، Th17

مقدمه

سرطان‌های دستگاه گوارش، بیش از یک سوم سرطان‌های شایع و تقریباً نیمی از سرطان‌هایی که منجر به مرگ می‌شوند را تشکیل می‌دهند. از میان سرطان‌های لوله گوارش می‌توان 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.

مولف 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 : ۹۰/۱/۲۱ تاریخ تصویب : ۹۱/۴/۱۲

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

معده اشاره کرد که شایع‌ترین آن‌ها هستند و به ترتیب سومین و چهارمین بدخیمی‌های رایج در دنیا با شیوع سالیانه تقریباً یک میلیون ونهصد و سی وچهار 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 پاتوژنز 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 پاتوژنز 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 C2009). 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 نوترفیل‌ها 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 پلی‌مرفیسم 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 پلی‌مرفیسم در ژن کد کننده IL-17F با بروز و شدت بیماری‌های خود ایمنی نظیر آرتریت 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 پلی‌مرفیک ژن IL-17F در استعداد ابتلا به سرطان معده می‌باشد. به همین‌منظور وضعیت پلی‌مرفیسم A7488G در ژن

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 احیاناً 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 (α=٪۵) و توان آزمون ۹۰ درصد (۱۰ درصد =β) و با توجه به ۷۲/۹ درصد =P و ۲۵/۱ درصد =P، ۱۶۱ 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 طوبی 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 Leuren (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 ارتریت 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 فالکون 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 پی‌پت 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 می‌باشد با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) تکثیر یافت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مخلوطی از ۱۰۰ng DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرو مول از هر یک از بازهای آلی (dNTP)، ۱ میکرومول از هر یک از پرایمرها، ۲mM از محلول MgCl2، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و بافر 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 می‌یابد: 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 به‌مدت ۴ دقیقه.

تعیین ژنوتیپ IL-17F

برای تعیین ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مرفیسم 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 آنزیم‌های محدودالاثر *NlaIII* (فرمنتاز، آلمان) به مدت 12 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 داده‌های کمی پس از اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده ازآزمون کولموگراف- اسمیرنوف، داده‌های کمی با استفاده از آزمون Student t Test مستقل و داده‌های کیفی با استفاده از تست‌های آماری مربع Chi و یا Fisher Exact test ارزیابی شدند. ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و یا آلل‌ها پلی‌مرفیسم ژن‌ها با بیماری و مراحل مختلف آن با استفاده از آزمون رگرسیون لوژستیک بررسی شد و میزان نسبت شانس Odd ratio با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ به‌دست آمد.

یافته‌ها

الف- ارزیابی یافته‌های 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 ۱۲/۶±۶۲/۱۴ سال بودند به‌طوری 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 ۱۴/۲±۵۸/۹۳ سال وارد مطالعه شدند. همان‌طور که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین میانگین سن بیماران و افراد شاهد مشاهده نشد (p=۰/۹۹). همچنین اختلاف قابل توجهی بین گروه بیماران و گروه شاهد از نظر جنسی مشاهده نشد (p=۰/۱۶). وضعیت تأهل و شغل در بین دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود داشت به‌طوری که گرچه بیشترین جمعیت در هر گروه را افراد متاهل تشکیل می‌دادند با این حال فراوانی مجردین و افراد مطلقه در مبتلایان به سرطان معده بیشتر از افراد شاهد بود. همچنین اختلاف معنی‌داری بین دو گروه تحت مطالعه از لحاظ ویژگی‌های اجتماعی- اقتصادی وجود داشت به‌طوری که اشتغال در بیماران با سرطان معده کمتر از افراد شاهد بود (p=۰/۰۰۱) و میزان تحصیلات افراد بیمار کمتر از افراد شاهد بود (p=۰/۰۰۳).

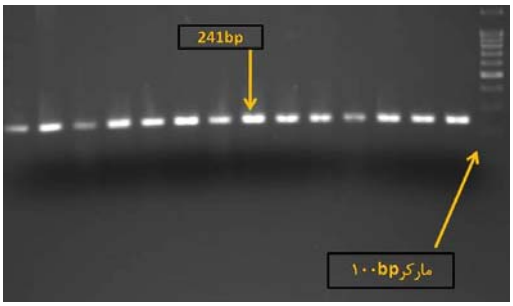
سرطان معده در بیماران مورد بررسی از نوع روده‌ای بود و ۷۱/۷ درصد بیماران در مرحله سوم و چهارم بیماری خود قرار داشتند. همچنین بررسی‌های پاتولوژی نشان داد اکثر بیماران مورد مطالعه در مراحل پیشرفته بیماری قرار داشتند و تنها در کمتر از ۱۰ درصد بیماران، تشخیص در مراحل اولیه بیماری انجام شده است. از طرف دیگر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

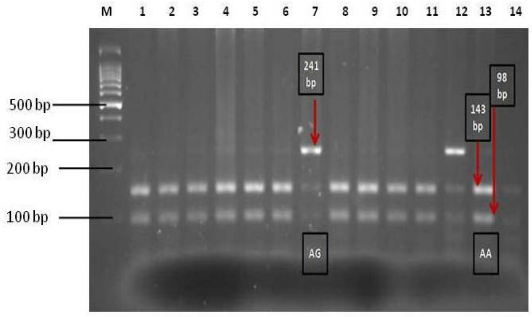
جدول شماره ۱: خصوصیات دموگرافیک در بیماران مبتلا به سرطان معده و افرادشاهد سالم

متغیر	شاهد (n=۱۷۱)	سرطان معده (n=۱۶۱)	سطح معنی داری
سن (سال)	۵۸/۹۳±۱۴/۲	۶۲/۱۴±۱۲/۶	۰/۹۹
جنس (زن: مرد)	۸۷: ۸۴	۷۲ : ۸۹	۰/۱۶
وضعیت تاهل			
مجرد	۳ (۱/۹)	۷ (۴/۱)	
متاهل	۱۶۶ (۹۷/۶)	۱۴۹ (۹۳/۸)	۰/۰۰۲
متلقه	۱ (۰/۵)	۳ (۲/۱)	
شغل			
بی کار	۱ (۰/۶)	۴ (۲/۷)	
کارمند	۳۵ (۲۰/۴)	۲۴ (۱۵)	۰/۰۰۱
خانه دار	۷۴ (۴۳/۱)	۴۶ (۲۹/۲)	
سایر	۶۰ (۳۶)	۸۵ (۵۳/۱)	
تحصیلات در حد دیپلم و بالاتر	۸۵ (۴۹/۷)	۵۳ (۳۲/۹)	۰/۰۰۳

ب) تعیین ژنوتیپ حاصل از پلی‌مرفیسم 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 آرژینین به‌جای هیستیدین در موقعیت ۱۶۱ پروتیئن (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 محدودالاثر مشخص می‌شوند به‌طوری که ژنوتیپ هموزیگوت AA دو قطعه ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی، ژنوتیپ هتروزیگوت GA سه قطعه ۲۴۱، ۱۴۳ و ۹۸ در ژنوتیپ هوموزیگوت موتان GG آنزیم محدودالاثر کارایی نداشته و بنابراین تنها همان قطعه ۲۶۲ جفت بازی آشکار خواهد شد.





تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفروتیک 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 می دهد. همان طور که دیده می شود ژنوتیپ AA باعث ایجاد دو باند ۱۴۳ و ۹۸ جفت بازی و ژنوتیپ AG بعث 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 پلی‌مرفیسم 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 پلی‌مرفیسم در ۷ فرد سالم فراهم نشد عملاً آنالیز آماری تعیین فراوانی ژنوتیپی در مورد ۱۶۴ نفر انجام گردید. توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مرفیسم در افراد شاهد از قانون هاردی وینبرگ تبعیت می‌کرد (p=۰/۱۲۶). 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 درحالی که فراوانی آلل طبیعی A در

افراد شاهد بیشتر از بیماران مبتلا به سرطان معده بود (۹۰/۸۵ درصد در مقابل ۸۷/۹ درصد) ولی این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار نبود(p= ۰/۲۲). بررسی چگونگی توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مرفیسم در ژن IL-17F نشان داد ژنوتیپ هموزیگوت موتان GG در بیماران مبتلا به سرطان معده به مرتب از افراد سالم بیشتر می‌باشد (۴/۳ درصد در مقابل ۱/۸ درصد) با این وجود این تفاوت از نظر آماری قابل توجه نبود (p=۰/۱۸۲). همان‌طور که جدول شماره ۲ نشان می‌دهد 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 معنی‌دار نبود (p=۰/۴).

با توجه به این‌که فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مورد مطالعه کم می‌باشد برای آن‌که 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. همان‌طور که در جدول شماره ۲ دیده می‌شود 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 معنی‌دار نبود (p=۰/۴۲).

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

به منظور ارزیابی تاثیر 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 آن‌جا که فراوانی آلل موتان G کم می‌باشد به‌جای 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 پلی‌مرفیسم A7488G از ژن IL-17F در میزان تمایز تومور، ارتباط حضور یا فقدان این آلل با درجات تمایزی تومور بررسی شد. همان‌طور که جدول شماره ۳ نشان می‌دهد ارتباط معنی‌داری بین حضور آلل7488G با مراحل بالینی تومور (p=۰/۲۸)، درجه بدخیم (p=۰/۳۶) و عفونت هلیکوباکترپیلوری (p=۰/۸۹) دیده نشد. به‌طوری که وجود یا عدم حضور آلل موتان G که باعث جایگزینی آرژنین در موقعیت ۱۶۱ سیتوکاین IL-17F می‌شود، موجب افزایش یا کاهش معنی‌دار شانس ابتلا به سرطان معده نمی‌شود.

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

پلی مرفیسمA7488G	شاهد (n=۱۶۴)	سرطان معده n(=۱۶۱)	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 (GG+AG vs. AA)	۲۷ (۱۶/۴۶)	۳۲ (۱۹/۹)	۱/۵	۰/۷۱–۲/۲۲	۰/۴۲

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 A7488Gاز ژن IL-17F

	ژنوتیپ AG+GG (n=۱۲۹)	ژنوتیپ AA (n=۳۲)	OR	95% CI	سطح معنی داری
مرحله تومور *					
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 هلیکوباکتر پیلوری					
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 مبنای 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 می‌تواند نشان دهنده پیش‌آگهی 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 سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله سرطان کولون تأکید گردیده ولی نقش IL-17F در تومورزایی به‌خوبی مشخص نشده است. به‌طوری که حتی برخی از مطالعات نقش حفاظتی برای IL-17F در سرطان کولون گزارش نموه‌اند که بر خلاف نقش IL-17A می‌باشد (Tong Z 2012). به همین خاطر این مطالعه انجام گردید تا مشخص شود آیا بروز تغییرات ژنی در IL-17F می‌تواند 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 معنی‌داری را از نظر آماری به‌وجود نیاورد. این فراوانی با فراوانی گزارش شده در سفید پوستان اروپایی (۴/۵ درصد) بسیار نزدیک می‌باشد حال آن‌که فراوانی ژنوتیپ موتان G/G 7488 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 به‌دست آمد که این اختلاف باز هم از نظر آماری معنی‌دار نبود. به عبارت دیگر ارتباط بین ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مرفیسم و سرطان معده به‌دست نیامد. این یافته‌ها با نتایج مطلعه Shibata و همکاران در ژاپن همسو می‌باشند که نشان دادند فراوانی ژنوتیپ موتان GG در جمعیت مبتلا به سرطان معده و افراد غیر مبتلا ۴ درصد می‌باشد (Shibata T 2009). درحالی که ارتباط پلی‌مرفیسم 7488G از ژن IL-17F با بیماری کولیت اولسرو در جمعیت ژاپن (Arisawa T 2008) و با آرتریت روماتوئید در سفید پوستان اروپایی (Nordang GB 2009) گزارش شده است. از آن‌جا که نقش IL-17 و سلول‌های Th17 در بروز پاسخ‌های التهابی معده مرتبط با عفونت H. pylori شده است (Luzza F and 2000. 2000) به‌طوری که مقدار پروتیئن 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 می‌باشد (Mizuno T and 2005;11: 2005)، بنابراین IL-17 نقش به سزایی در التهابات معده ناشی از وجود هلیکوباکتر پیلوری و به دنبال آن بیماری‌های معده از جمله کارسینوم معده خواهد داشت. به همین دلیل تصور می‌شود که پلی‌مرفیسم عملکردی در ژن IL-17 استعداد ابتلا به سرطان معده را افزایش دهد. با توجه به یافته‌های این مطالعه که بیانگر عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین بروز واریانت‌های ژنتیکی IL-17F در موقعیت A7488G و سرطان معده معده می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است سایر همولوگ‌ها 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 کموکاین‌هایی دارند که نقش به سزایی در فراخوان و فعال کردن نوتروفیل‌ها ایفا می‌کنند. مطالعاتی بسیار کمی وجود داند که به بررسی تأثیر پلی‌مرفیسم IL-17F در بروز اختلالاتی انسانی پرداخته‌اند. کاواگوچی نشان داد که بیان و یا عملکرد IL-17F در افراد حامل آلل موتان 7488G ساپرس می‌شود (Kawaguchi M2004). این محققین همچنین نشان داند که حضور واریانت موتان A7488G که باعث جایگزینی آرزنین در موقعیت ۱۶۱ به‌جای هیستیدین می‌شود موجب جلوگیری از تأثیر IL-17F طبیعی در تحریک بیان سیتوکاین‌های التهابی نظیر IL-8 و IL-6 در مطالعات تجربی می گردد (Kawaguchi M 2006).

براساس طبقه‌بندی Lauren سرطان معده به دو دسته تقسیم می‌گردد: نوع روده‌ای که ساختارهای غده‌ای شبیه غدد روده در معده ایجاد می‌شود و ارتباط تنگاتنگی با التهاب مزمن و به‌ویژه با گاستریت آتروفیک و به دنبال آن متاپلازی روده‌ای دارد و نوع منتشر که فاقد ساختار غده‌ای بوده و در مجاورت لبه‌های مخاط ملتهب معده پدید می‌آید. بنابراین التهاب شدید مخاط معده به همراه سایر ویژگی‌های میزبان می‌تواند مستقیماً باعث به راه انداختن وقایع موتاژنز گردد و شرایط را برای رخداد نوع منتشر نیز فراهم سازد. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین حضور آلل موتان G از ژن IL-17F با ویژگی‌های بالینی سرطان معده از جمله اندازه تومورو متاستاز به مخاط معده و همچنین درجه تمایز تومور مشاهده نشد. این امر شاید به‌واسطه تأثیر ضد التهابی واریانت ژنی IL-17F-7488G باشد که باعث می‌شود پروتیئن حاصل فاقد خواص پیش‌التهابی نظیر پروتیئن طبیعی IL-17F باشد به‌طوری که گزارش شده است که این واریانت ژنی دارای اثرات مهار متاستاز و همچنین کاهش تحریک تولید متالوپروتیئنازها می‌باشد (Kolls JK 2004).

در مجموع عدم وجود ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مرفیسم IL-17F و سرطان معده بیان می‌نماید که آلل G نمی‌تواند به تنهایی به عنوان یک فاکتور خطر ژنتیکی در پیش‌گویی 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 مولکول‌های خانواده IL-17 می‌تواند در تعیین ژنوتیپ و هاپلوتیپ مستعدکننده مفید باشد تا بتواند در تشخیص سریع و غربالگری افراد مستعد به سرطان معده کمک کند.

سپاسگزاری

محققین لازم می‌دانند از زحمات و همکاری‌های پرسنل محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی ساری و همین‌طور بخش انکولوژی بیمارستان امیرکلای بابل و پلی‌کلینیک طوبی و همچنین کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که امکان انجام این مطالعه را فراهم آوردند تشکر نمایند.

References

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 Chinesepopulation." 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. Luzza 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 pyloriinfected 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.