مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸

بررسی ارتباط سرطان سینه و پلی‌مورفیسم A/T 251 از ژن IL-8 درجمعیت زنان ایرانی با روش Tetra arms-PCR

الهام سیاسی Ph.D.*، مرضیه غلامی M.Sc.، فاطمه اشرفی Ph.D.

- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول:emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۷

چکیده

هدف: در این مطالعه به ارتباط سرطان سینه و پلی‌مورفیسم A/T 251 از ژن اینترلوکین ۸، به‌عنوان مارکر ژنتیکی در جمعیت زنان ایرانی با روش Tetra arms-PCR پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه شاهد-موردی، ۵۰ زن مبتلا به سرطان سینه و ۵۰ زن سالم به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. بعد از استخراج DNA، تعیین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن IL-8 به‌روش Tetra arms-PCR انجام شد.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AT و TT در گروه کنترل به‌ترتیب صفر درصد، ۸۸ درصد و ۱۲ درصد و در گروه بیمار به‌ترتیب ۱۲ درصد، ۵۴ درصد و ۳۴ درصد بود. نتایج تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های AA، AT و TT در گروه کنترل و بیمار نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

نتیجه گیری: در تحقیق حاضر بین فراوانی آلل‌های A و T در گروه بیمار و کنترل، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، بنابراین می‌تواند بیانگر این باشد که بین پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن IL-8 و سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی مورد مطالعه، ارتباطی وجود ندارد.

واژگان کلیدی: پلی‌مورفیسم A/T 251، ژن IL-8، تکنیک Tetra arms-PCR، سرطان سینه

مقدمه

سرطان سینه در زنان یک مشکل اصلی بهداشت عمومی در سراسر جهان است. این بیماری دومین سرطان شایع در انسان (زن و مرد) و اولین سرطان شایع در زنان ایران و جهان است. سرطان پستان ۲۳ درصد از تمام موارد سرطان جدید و ۱۴ درصد از تمام موارد مرگ ناشی از سرطان را در سال ۲۰۱۲ به‌خود اختصاص داده است (۱). فاکتورهای خطر سرطان سینه عبارتند از: سابقه فامیلی سرطان سینه، وضعیت ژنتیکی، سابقه شخصی سرطان سینه، شکل‌گیری سلول‌های غیر عادی در لوبول‌ها یا غدد تولید کننده شیر در بافت سینه، حجم سینه، میزان هورمون‌های اندوژن، سیکل‌های قائدگی، حاملگی، شیر دادن به نوزاد، تراکم استخوان، فاکتورهای وابسته به شیوه زندگی مانند استفاده از هورمون پس از یائسگی، چاقی و اضافه وزن، فعالیت بدنی، رژیم غذایی، مصرف الکل و تنباکو، مصرف قرص‌های ضد بارداری و سایر فاکتورهای خطرمانند تشعشعات، استفاده از داروهای خاص، آلودگی‌های محیطی و شغلی و فاکتورهای ژنتیکی مرتبط با سرطان سینه (۲ و ۳). سرطان سینه یک بیماری به‌شدت ناهمگن است که در اثر تاثیر متقابل عامل های خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیشرونده تغییرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک در سلول‌های سرطان سینه منجر می‌شود. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عامل‌های خطر ویژه (مانند سن، چاقی و مصرف الکل) تاکید دارد، وجود سابقه خانوادگی سرطان سینه، قوی‌ترین عامل خطر برای این بیماری به شمار می‌آید (۴). اخیرا نقش سایتوکان‌ها در سرطان مطرح شده است. سایتوکاین‌ها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که توسط سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی و سایر سلول‌ها ترشح شده و بسیاری از اعمال این سلول‌ها و سلول‌های دیگر را میانجی‌گری می‌کنند (۵). اخیرا گزارش شده است که در محل تومور میزان ترشح درونی بعضی سایتوکاین‌ها در تعامل با سلول‌های توموری کاهش می‌یابد و منجر به تضعیف سیستم ایمنی می‌شود و این مسئله منجر به گسترش تومور، متاستاز و بدخیم شدن تومور می‌شود (۵). اهمیت مسیرهای سیگنالی گیرنده‌های اینترلوکین ۸ و خود این کموکاین در ترویج پیشرفت سرطان‌های بدخیم مشخص شده است (۶ و ۷). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که ژن اینترلوکین ۸ (*IL-8) gene*) *Interlukin-8*) بیان بالایی در سلول‌های توموری دارند که اغلب در پاسخ به شیمی درمانی و یا فشارهای محیطی مانند هیپوکسی القا می‌شوند.

افزایش بیشتر بیان ژن *IL-8* در سلول‌های توموری اهمیت بالایی در بقای این نوع تومورها از طریق نقش گیرنده‌های ژن‌های *CXCR2,CXCR1 (Subfamily of chemokines receptors 1, 2 genes)* در سلول‌های سرطانی، سلول‌های اندوتلیال و نوتروفیل‌ها و تومورهای مرتبط با ماکروفاژها دارند (۸). اهمیت اینترلوکین ۸ در ارتباط با مدولاسیون بین انواع مختلف سلول‌های موجود در تومور و میکرو محیط‌ها است (۶). در رابطه با اثر اینترلوکین ۸ و سرطان سینه مطالعات نشان داده اند که بین پتانسیل متاستیک سلول‌های سرطان سینه و میزان بیان ژن *IL-8* ارتباط معنی‌داری وجود دارد. بر اساس این مطالعات، مشخص شده است که خطوط سلولی با متاستاز بالا بیان ژن*IL-8* بیشتری نسبت به سلول‌هایی با متاستاز پایین دارند. این امر می‌تواند ناشی از تغییرات اپی ژنتیک مانند الگوی متیلاسیون نابه‌جا در ژن *IL-8* باشد که ممکن است مسئول این میزان تفاوت در سلول‌های متاستاتیک با سایر سلول‌ها باشد (۹). مطالعات اخیر نشان داده است که بین پلی‌مورفیسم در ژن‌های *IL-8* و *CXCR2* با افزایش ریسک ابتلا به سرطان سینه در جمعیت‌های مختلف از جمله در جمعیت زنان چینی ارتباط وجود دارد (۱۰ و ۱۱ و ۱۲ و ۱۳). بر حسب مطالعات بالینی، سطح سرمی این اینترلوکین در سرم بیماران مبتلا به سرطان سینه نسبت به افراد سالم بیشتر بوده است. به‌خصوص بیمارانی که در

مرحله پیشرفت بیماری بودند. به‌نظر می‌رسد، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های سایتوکاینی مهم بوده و در میزان بیان این ژن‌ها و فعالیت سلول‌ها اثر می‌گذارند. پلی‌مورفیسمی که در منطقه ۲۵۱ پروموتور ژن *IL-8* قرار گرفته است نقش مهمی در تولید *اینترلوکین ۸* یا بیان پروتئین آن، هم در محیط درون ارگانیسم زنده و هم در محیط آزمایشگاهی دارد. در مطالعات گذشته مشخص شده است که پلی‌مورفیسم A/T 251 از ژن *IL-8* در جمعیت‌های گوناگون با خطر ابتلا به تومور سرطان‌های مختلف در ارتباط است (۱۰ و ۱۱ و ۱۴ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷). به‌منظور بررسی اختصاصی‌تر ارتباط این پلی‌مورفیسم با سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی و با توجه به اهمیت شیوع سرطان سینه و راه‌های تشخیص و پیش اگهی آن، در این تحقیق به‌بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم A/T 251 از ژن *IL-8* (به‌عنوان یک مارکر ژنتیکی) با سرطان سینه، و به‌جای روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment length Polymorphism) که روش رایج و هزینه‌بر در تشخیص پلی‌مورفیسم‌ها می‌باشد از تکنیک اقتصادی‌تر PCR Tetra arms، پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و جامعه آماری: در این مطالعه به‌صورت موردی- شاهدی از دو گروه بیمار و کنترل، با اخذ رضایت نامه کتبی نمونه‌گیری انجام شد. تعداد ۵۰ خانم مبتلا به سرطان سینه که به‌وسیله معاینه پزشک متخصص زنان و زایمان و انجام سونوگرافی و ماموگرافی بیمار تشخیص داده شدند، انتخاب شدند و گروه کنترل ۵۰ نفر از زنان سالم با سن مشابه افراد گروه بیمار بودند. حجم نمونه بر اساس فرمول محاسبه حجم نمونه فرمول کوکران محاسبه شد.در این محاسبه با سطح خطای ۵ درصد، ۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه گروه کنترل، تخمین زده شد.

$$n = \frac{\frac{z^2pq}{d^2}}{1+\frac{1}{N}\left(\frac{z^2pq}{d^2}-1\right)}$$

روش نمونه‌گیری: میزان ۵ سی سی از خون افراد گروه بیمار و افراد کنترل سالم در لوله‌های Venoject آماده با حجم ۵ میلی‌لیتر (کمپانی graner/UK)، که حاوی مقدارمشخص ۱ میلی‌لیتر از ضدانعقاد سیترات سدیم (به‌دلیل ترکیب با کلسیم خون و داشتن اثر ضد انعقادی بر خون و همچنین کم‌ترین اثر روی فاکتورهای بیوشیمیایی خون استفاده شد) و با درپوش‌های بود، جمع‌آوری شد. پس از انجام نمونه‌گیری و تا زمان رسیدن به آزمایشگاه نمونه‌های گرفته شده در جعبه حاوی یخ‌های پک شده نگه‌داری شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های خون: پس از انتقال خون حاوی سیترات سدیم به آزمایشگاه، ژنوم هر یک از نمونه‌ها با استفاده از روش استخراج DNA با استفاده از کیت Cinnapure جداسازی شد. قابل ذکر است که پس از استخراج DNA نمونه‌های مذکور در دمای ۴۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند .

کیفیت و کمیت سنجی DNA استخراج شده

الکتروفورز بر روی آگارز ۲ درصد: برای اطمینان از کیفیت سنجی DNA خالص شده، ۳ میکرولیتر از DNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. (به‌دلیل اینکه باند محصول استخراج DNA با توجه به طول ژنوم در زمان کافی با ولتاژ مناسب در روی ژل مشخص گردد از ژل ۲ درصد استفاده شد).

تعیین غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ: پس از استخراج DNA به‌منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA و آگاهی از غلظت و درجه خلوص آن، از دستگاه نانو دراپ استفاده شد. ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده در دستگاه قرار داده شد و جذب نوری آن در طول موج‌های مختلف خوانده شد.

واکنش Tetra Arms PCR: برای انجام واکنش Tetra Arms PCR از پرایمرهای اختصاصی شامل ۱ جفت پرایمر خارجی و ۲ پرایمر داخلی برای هر یک از الل‌های غالب و مغلوب پلی‌مورفیسم A/T 251 ژن IL-8، که در جدول ۱ آورده شده است، استفاده شد. همچنین مواد مورد نیاز برای واکنش PCR و برنامه دستگاه به‌ترتیب در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱: توالی و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCRTetra arms (۱۸)

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصول PCR (bp)
Forward inner primer (T allele)	TGTAATCCCAGCAGTTTGGGAGGT	۱۶۹
Reverse inner primer (A allele)	CTCATCTTTTCATTATGTCAGAG	۲۲۸
Forward outer primer (5’–3’)	CATGATAGCATCTGTAATTAACTG	۳۴۹
Reverse outer primer (5’–3’)	CACAATTTGGTGAATTATCAAA	۳۴۹

جدول ۲: مواد مورد نیاز جهت انجام PCR (حجم ۲۰ میکرولیتر)

محتویات واکنش	حجم (میکرولیتر)	غلظت
Master Mix PCR 1X	۱۰	۱/۵ میلی‌مول/ MgCl2
Forward Primer	۱	۱۰ پیکومول
Reverse Primer	۱	۱۰ پیکومول
Sterile water	۵	-
DNA	۳	۲۰۰ نانوگرم

جدول ۳: برنامه دمایی دستگاه PCR

مراحل	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
واسرشتگی اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵
واسرشتگی	۳۰ ثانیه	۹۵
اتصال	۴۰ ثانیه	۵۷
گسترش	۶۰ ثانیه	۷۲
گسترش نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

- تعداد چرخه ها ۳۵ سیکل بود.

ارزیابی محصول PCR: برای ارزیابی محصول PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR، همزمان با شناساگر زیستی (bp 50) برروی ژل آگاروز ۲ درصد (با توجه به‌طول باند محصولات PCR و رویت مناسب باندها روی ژل) الکتروفورز شد. برای رنگ‌آمیزی، به‌جای استفاده از رنگ اتیدیوم بروماید و جلوگیری از اثرات سمی و زیان آور آن، از رنگ DNA safe شرکت سینا کلون استفاده شد (۱ میکرولیتر به‌ازای هر ۵ میکرولیتر نمونه). سپس جهت مشاهده باندها ژل در دستگاه UV-Doc قرار داده شد و عکس‌برداری شد. قابل ذکر است باندهای مربوط به تکثیر Outer، bp ۳۴۹ و دو آلل T و A به‌ترتیب با bp ۱۶۹ و bp ۲۲۸ مورد نظر بودند. همچنین برای هر سری از نمونه‌ها یک کنترل مثبت که از قبل با انجام سکانس تایید شده بود و از یک نمونه کنترل منفی، همراه یک مارکر bp 50 استفاده شد.

تایید صحت نتایج ژنوتایپینگ: برای صحت عملکرد روش و به‌منظور تعیین سکانس و تایید محصول PCR چندین نمونه از هموزیگوت‌های غالب و هموزیگوت‌های مغلوب و هتروزیگوت‌ها انتخاب شدند و به‌وسیله کیت سینا کلون خالص‌سازی شدند. سپس با ارسال به شرکت تکاپوزیست تعیین توالی شدند و در نهایت بلاست انجام گرفت.

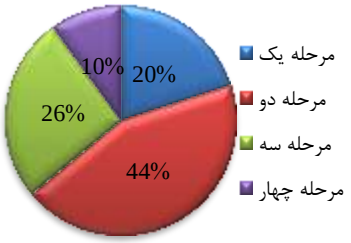
آنالیز آماری

به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها از نسخه ۲۰ نرم آفزار SPSS و آزمون های ضریب همبستگی، T- test مستقل، آنوا و مجذور کای استفاده شد. p value کمتر از ۰/۰۵ در نتایج، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نمونه گیری و اطلاعات بیماران

برای انجام این پژوهش حدود ۵۰ نمونه خون بیمار و ۵۰ نمونه خون افراد سالم جمع‌آوری شد و استخراج DNA از نمونه‌ها انجام شد. رده سنی افراد بین ۳۰ تا ۶۰ سال بود. میانگین سنی برای گروه بیمار ۴۴/۱۶ و برای گروه نرمال ۴۰/۲۳ محاسبه شد که در دو گروه تقریبا یکسان بود. طبق نتایج حاصل ۴۴ درصد افراد در مرحله دو بیماری و تنها ۱۰ درصد آن‌ها در مرحله حاد بیماری (مرحله چهار) قرار داشتند (نمودار ۱).



نمودار ۱: مرحله بیماری بر حسب درصد برای ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه

نتایج استخراج DNA

نتایج جذب نوری DNA توسط دستگاه نانودراپ

نتایج جذب نوری DNAهای استخراج شده، توسط دستگاه نانودراپ خوانده شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱.۸ تا ۲ را داشتند، برای ادامه کار مناسب تشخیص داده شدند.

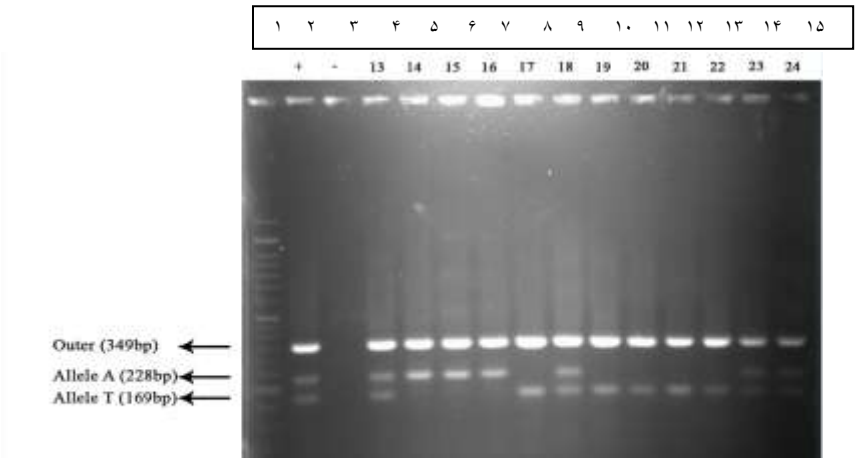
نتایج الکتروفورز DNA استخراجی بر ژل آگارز

به‌منظور اطمینان از صحت DNA استخراج شده و کیفیت آن پس از استخراج DNA حاصل بر ژل ۲ درصد آگارز الکتروفورز شد (شکل ۱).

شکل ۱: DNA استخراج شده بر ژل ۲٪ آگارز، خانه ۱: مارکر مولکولی bp ۱۰۰ ، خانه ۲ و ۳: دو نمونه DNA .

نتایج ژنوتیپ با روش Tetra-Arms PCR

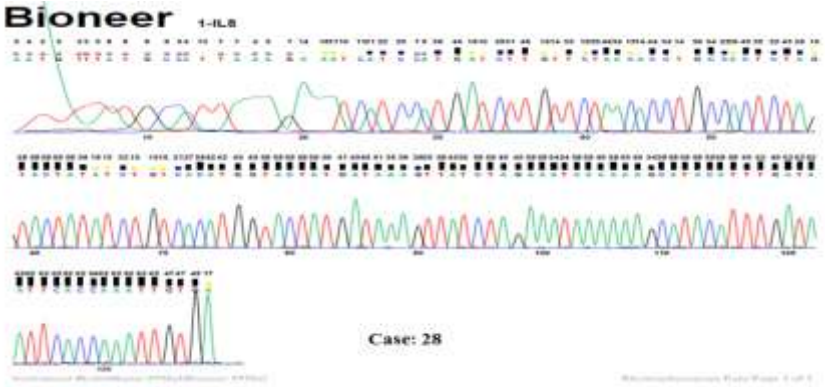
ژنوتایپ پلی‌مورفیسم 251T/A از ژن IL-8، ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه و ۵۰ نمونه سالم توسط تکنیک Tetra Primer Arms PCR انجام و سپس ژنوتایپ افراد بر اساس الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز مشخص شد. افراد هتروزیگوت با قطعات به طول bp ۱۶۹ و bp ۲۲۸ به‌همراه باند کنترل bp ۴۳۹ مشخص شدند. در صورتی که افراد هموزیگوت موتان با الل A قطعه bp ۲۲۸ و افراد هموزیگوت وحشی با الل T قطعه bp ۱۶۹ ، را روی ژل الکتروفورز ۲ درصد نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۲: محصول Tetra Primer Arms PCR پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن *IL-8*، برروی ژل ۲ درصدآگارز. خانه ۱: مارکر مولکولی bp ۱۰۰، خانه۲: نمونه کنترل مثبت و خانه ۳: نمونه کنترل منفی، خانه های ۴، ۹، ۱۴ و ۱۵: نمونه‌های افراد هتروزیگوت (AT) (bp ۳۴۹، bp ۲۲۸، bp ۱۶۹)، خانه‌های ۵، ۶ و ۷: نمونه های افراد هموزیگوت (AA) (bp ۳۴۹، bp ۲۲۸)، خانه‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳: نمونه‌های افراد هموزیگوت (TT) (bp ۳۴۹، bp ۱۶۹).

تعیین توالی یابی به جهت تایید محصول حاصل از Tetra-Arms PCR

در مطالعه حاضر به‌منظور تایید محصول PCR از هر یک از حالت‌های هموزیگوت غالب و مغلوب و هتروزیگوت به‌همراه پرایمرها، جهت سکانس به شرکت تکاپو زیست ارسال شد. سپس نتایج توسط نرم افزار Mega آنالیز و بلاست شد تا حالت‌های هموزیگوت غالب و مغلوب و هتروزیگوت تایید شوند. در شکل ۳ و ۴ و ۵ نتایج سکانس سه نمونه از بیماران آورده شده است. شکل ۳ (هتروزیگوت AT)، شکل۴ (هموزیگوت غالب TT) و شکل ۵ (هموزیگوت مغلوب AA) می‌باشد که با بلاست مورد تایید قرار گرفت.



AATGTTTATGCCATTAAAGAAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTATATCTGTCACATGGTACTATG
ATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAATTCACCAAATTGTGA

Homo sapiens gene for LUCT/interleukin-8, complete cds
Sequence ID: D14283.1 Length: 3296 Number of Matches: 1
Range 1: 1022 to 1155

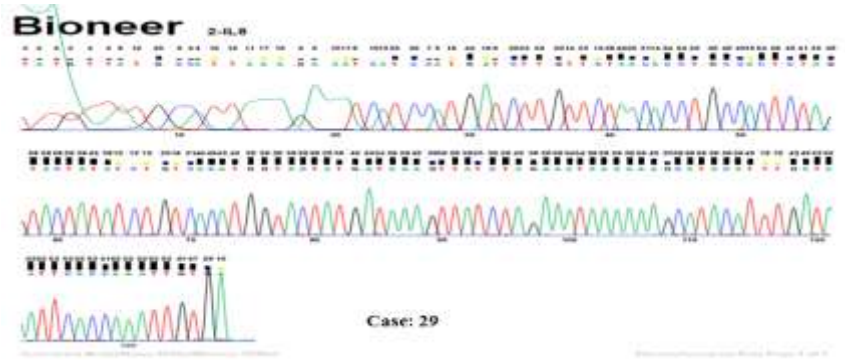
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
235 bits(127)	9e-60	132/134(99%)	2/134(1%)	Plus/Plus

```
Query  6     TTATGCCATT-AAAG-AAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTA  63
             |||||||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1022  TTATGCCATTAAAAGAAAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTA  1081

Query  64    TATCTGTCACATGGTACTATGATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAA  123
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1082  TATCTGTCACATGGTACTATGATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAA  1141

Query  124   TTCACCAAATTGTG  137
             ||||||||||||||
Sbjct  1142  TTCACCAAATTGTG  1155
```

شکل ۳: نمونه فرد هتروزیگوتAT



TATGTTATGCCATTAAAGAAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTATATCTGTCACATGGTACTATGA
TAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAATTCACCAAATTGTGA

Homo sapiens gene for LUCT/interleukin-8, complete cds
Sequence ID: D14283.1 Length: 3296 Number of Matches: 1
Range 1: 1022 to 1155

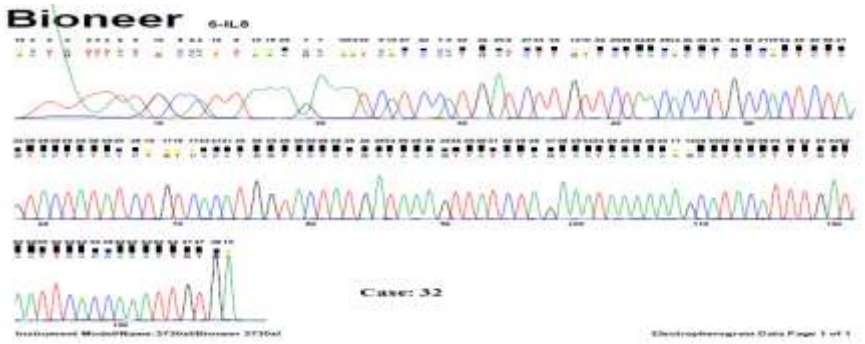
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
235 bits(127)	9e-60	132/134(99%)	2/134(1%)	Plus/Plus

```
Query  6     TTATGCCATT-AAAG-AAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTA  63
             ||||||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1022  TTATGCCATTAAAAGAAAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTA  1081

Query  64    TATCTGTCACATGGTACTATGATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAA  123
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1082  TATCTGTCACATGGTACTATGATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAA  1141

Query  124   TTCACCAAATTGTG  137
             ||||||||||||||
Sbjct  1142  TTCACCAAATTGTG  1155
```

شکل ۴: نمونه فرد هموزیگوت غالبTT



AATGTTTATGCCATTAAAGAAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTATATCTGTCACATGGTACTATG
ATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAATTCACCAAATTGTGA
Homo sapiens gene for LUCT/interleukin-8, complete cds
Sequence ID: D14283.1 Length: 3296 Number of Matches: 1
Range 1: 1022 to 1155

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
235 bits(127)	9e-60	132/134(99%)	2/134(1%)	Plus/Plus

```
Query  6     TTATGCCATT-AAAG-AAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTA  63
             ||||||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1022  TTATGCCATTAAAAGAAAATCATCCATGATCTTGTTCTAACACCTGCCACTCTAGTACTA  1081

Query  64    TATCTGTCACATGGTACTATGATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAA  123
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1082  TATCTGTCACATGGTACTATGATAAAGTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACATTTGATAA  1141

Query  124   TTCACCAAATTGTG  137
             ||||||||||||||
Sbjct  1142  TTCACCAAATTGTG  1155
```

شکل ۵: نمونه فرد هموزیگوت مغلوب AA

نتایج آماری

تعداد گروه بیماران و افراد سالم و فراوانی الل‌ها در این دو گروه در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد فراوانی الل A و الل T در گروه بیمار به‌ترتیب ۳۹ و ۶۱ درصد و در گروه کنترل به‌ترتیب ۴۴ و ۵۶ درصد بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین فراوانی الل‌های A و T در گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

جدول ۴: مقایسه ژنوتایپ و فراوانی الل های پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن *IL-8* درگروه بیمار و کنترل

ژنوتایپ	گروه سالم تعداد=۵۰	گروه بیمار تعداد=۵۰	الل	فراوانی الل ها در گروه سالم	فراوانی الل ها در گروه بیمار	P-value بین الل Tو A
TT	(٪۱۲) ۶	(٪۳۴) ۱۷	T	۲۸ ٪۵۶	۳۰ ٪۶۱	
TA	(٪۸۸) ۴۴	(٪۵۴) ۲۷				۰/۶۸
AA	(٪۰) ۰	(٪۱۲) ۶	A	۲۲ ٪۴۴	۲۰ ٪۳۹	

بحث

سرطان سینه شایع ترین سرطان در زنان است. علیرغم پیشرفت‌های چشمگیر در درمان، حدود ۲۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان سینه سالانه جان خود را به‌علت این بیماری از دست می‌دهند (۱۹). چنان‌که این سرطان عامل ۲۱/۴ درصد از کل بدخیمی‌ها و شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی است و فاکتورهای محیطی متعدد، تغییرات سوماتیک مانند موتاسیون در آنکوژن‌ها، ژن‌های سرکوب کننده تومور و پلی مورفیسم‌های ژنتیکی از عوامل به‌وجود آورنده آن هستند (۲۰ و ۲۱). نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از آن است که پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی با ایجاد تغییراتی که در توالی DNA ایجاد می‌کنند، می‌تواند استعداد ابتلا به سرطان را افزایش دهند. تعداد محدودی از مطالعات اپیدمیولوژیک به ارزیابی ارتباط بین پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن *IL-8* و ریسک سرطان سینه پرداخته‌اند (۱۰ و ۱۲ و ۱۳). این پلی‌مورفیسم که در منطقه ۲۵۱ پروموتور ژن *IL-8* قرار گرفته است نقش مهمی در تولید اینترلوکین ۸ دارد و مشخص شده است که این پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های گوناگون با ایجاد تومور و متاستاز در سرطان‌های مختلف مرتبط است (۱۰ و ۱۱ و ۱۴ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷). بنابراین این مطالعه با هدف بررسی پلی‌مورفیسم A/T 251 ژن *IL-8* در جامعه زنان ایرانی مبتلا به سرطان سینه انجام شد. همچنین به‌جای روش‌های پر هزینه بر در تشخیص پلی‌مورفیسم‌ها در این تحقیق از تکنیک Tetra arms PCR استفاده شده است.نتایج مطالعه حاضر نشان داد در گروه کنترل توزیع ژنوتیپ پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن *IL-8* برای ژنوتیپ های AA، AT و TT به‌ترتیب صفر درصد، ۸۸ درصد و ۱۲ درصد بود. همچنین توزیع ژنوتیپ در گروه بیمار به‌ترتیب ۱۲ درصد، ۵۴ درصد و ۳۴ درصد بود. همچنین بیشتر افراد مورد بررسی، در مرحله ۳ و ۴ بیماری دارای ژنوتیپ TA و AA بودند. به‌عبارتی دیگر با حضور ژنوتیپ های هتروزیگوت و هموزیگوت مغلوب این پلی‌مورفیسم در ژن *IL-8* می‌توان، عوامل تعیین پیش آگهی سیر بیماری و عاقبت بالینی سرطان سینه را پیش‌گویی نمود.

با توجه به شیوع سرطان سینه در زنان و تهدید بیماران، شناسایی پلی‌مورفیسم ژن *IL-8* هم به‌عنوان یک مارکر ژنتیکی و هم در تشخیص این بیماری و مهار آن، با جلوگیری از پیشرفت سرطان سینه می‌تواند موثر باشد. بر اساس نتایج مطالعات اخیر که در جمعیت زنان چینی انجام شده است مشخص شده است که بین پلی‌مورفیسم A/T 251 ژن *IL-8* با ابتلا به سرطان سینه ارتباط وجود دارد (۱۲ و ۱۳). مطالعات صورت گرفته در

سال‌های اخیر نقش اینترلوکین‌ها را در سرطان سینه ثابت کرده‌اند که سطوح بالای سایتوکاین‌های التهابی در سرم و بافت‌های توموری سرطان سینه مشاهده شده است. بالا بودن برخی از این سایتوکاین‌ها در سرم بیماران مبتلا به سرطان با پیشرفت مرحله بیماری و تهاجم سلول‌های سرطانی و ایجاد متاستاز مرتبط است (۹ و ۱۲ و ۱۳و ۲۲). مطالعات نشان داده‌اند که پیشرفت و توسعه چندین گونه از سرطان سینه با وضعیت التهاب و تولید نامنظم و نامناسب کموکاین‌ها به‌ویژه اینترلوکین ۸ همراه است که به‌نظر می‌رسد یکی از مراحل حیاتی در ایجاد متاستاز در سلول‌های سرطانی باشد (۲۳). تحقیقات قبلی حاکی از این است که اینترلوکین ۸ نه تنها یک عامل در فعال کردن مسیرهای تکثیری سلول‌های سرطانی است بلکه مسیرهای آپوپتیک را نیز کنترل می کند. به این علت کاهش بیان ژن *IL-8* به وسیله سلول های توموری، می تواند سبب تحریک گیرنده‌های کموکاینی و در نتیجه تخریب عملکرد نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در سرکوب التهابات گردد (۲۴). همچنین تغییر بیان ژن *IL-8* به‌واسطه وجود این پلی‌مورفیسم که در ناحیه پروموتری ژن قرار دارد سبب آنژیوژنز و در نتیجه ایجاد متاستاز و بدخیمی‌های توموری خصوصا در سلول‌های سینه شده که می‌تواند به‌طور مستقیم با ایجاد سرطان سینه مرتبط باشد (۱۳). اینترلوکین ۸ یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های تنظیم کننده است که دارای عملکرد مرکزی در شروع و تنظیم پاسخ‌های ایمنی سلولی است. اینترلوکین ۸ در ماکروفاژها و فیبروبلاست‌های مشتق شده از سلول‌های بینابینی بیان می‌شود و به‌عنوان یک میانجی مشتق شده از ماکروفاژ آنژیوژنز شناخته شده است. این سایتوکاین یک فاکتور کموتاکتیک بوده که می‌تواند سلول‌های سفید خون را فعال کند (۲۵). همچنین در طیف مختلفی از بیماری‌ها مانند پسوریازیس، آرتریت روماتوئید، فیبروز ریویو برخی نئوپلاسم‌ها نقش این اینترلوکین ثابت شده است. مطالعات متعددی نشان داده اند که اینترلوکین ۸ یک عامل ترویج دهنده آنژیوژنز (رگ‌زایی) است و به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم عامل تکثیر سلول‌های توموری و شکل‌گیری رگ‌های خونی جدید از طریق گیرنده سطحی عروق توموری سلول‌های اندوتلیال هستند و در نتیجه می‌توانند در رشد تومور و متاستاز موثر باشند (۱۲ و ۱۳ و ۲۶). زانگ و همکاران **(۱۲)** در یک مطالعه پژوهشی مشخص نمودند اینترلوکین ۸ به‌عنوان یکی از اعضای خانواده کموکاین ها می‌تواند در تنظیم التهابات و پروسه‌های سیستم ایمنی نقش اساسی داشته باشد. انان با روش PCR-RFLP پلی‌مورفیسم‌هایی از ژن اینترلوکین ۸ از جمله پلی‌مورفیسم T/A 251 را بررسی نمودند. نتایج آنان نشان داد بین این پلی‌مورفیسم و ایجاد سرطان سینه در جمعیت زنان چینی ارتباط معنی‌داری وجود دارد. همچنین هی و همکارانش (۱۳) در خصوص پلی‌مورفیسم‌های ژن اینترلوکین ۸ و ارتباط آن‌ها با ایجاد سرطان سینه در جمعیت زنان چینی مطالعه‌ایی را انجام دادند. تحقیق انان مشخص نمود که چندین پلی‌مورفیسم از جمله پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن *IL-8* در افزایش ریسک ابتلا به سرطان سینه در بین زنان چینی موثر است. اسنوز و همکاران (۲۷) در یک مطالعه مورد– شاهدی به بررسی تنوع ژنتیکی در ژن *IL-8* همراه با افزایش خطر و پیش آگهی ضعیف سرطان سینه پرداختند. آن‌ها در این مطالعه ۳۰۸ بیمار غیر مرتبط با سرطان سینه و ۲۳۶ فرد سالم را با روش AS پلیمراز بررسی کردند. نتیجه مطالعه نشان داد که پلی‌مورفیسم در پروموتر ژن *IL-8* به‌عنوان فاکتور ریسک یا خطر برای سرطان سینه می‌باشد. انواع مختلف سایتوکاین‌ها نقش‌های گوناگونی را در شروع یا تکثیر سرطان ایفا می‌کنند و می‌توانند از یک‌طرف زمینه را برای بروز و حتی تکثیر و متاستاز سرطان فراهم کنند و از طرف دیگر از طریق آثار ضدالتهابی و ضدتوموری، ازپیشرفت و توسعه سرطان جلوگیری کنند (۲۸). سنوزی و همکاران (۸)در یک مطالعه مورد – شاهدی به بررسی اثر ترکیبی پلی‌مورفیسم ژن *IL-8* و *CXCR2* در استعداد ابتلا به سرطان سینه وپرخاشگری (تهاجم) پرداختند در آن مطالعه ۴۰۹ بیمار تونسی غیر مرتبط با سرطان سینه و ۳۰۱ فرد سالم را با روش AS پلیمراز مورد بررسی قرار دادند. نتیجه این مطالعه نشان داد که پلی‌مورفیسم در ژن *IL-8*و *CXCR2* با افزایش سرطان سینه، و همچنین پیشرفت بیماری همراه است. مطالعات متعددی نشان دادند که بین پلی‌مورفیسم ژن *IL-8* و بیماری‌های انسانی رابطه وجود دارد و همه آن‌ها بر نقش پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن *IL-8* که بر بالادست سایت آغاز رونویسی قرار دارد، متمرکز شده‌اند. همچنین در این مقالات مطرح شده است که وجود این پلی‌مورفیسم علاوه

بر اینکه نقش مهمی در پیشرفت بیماری سرطان سینه ایفا می‌کند می‌تواند در پیش آگهی سرطان کولورکتال، سرطان پروستات و معده نیز نقش داشته باشد (۲۹). هوانگ و همکاران (۲۸)، گزارش نمودند پلی‌مورفیسم فوق با ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت مغلوب در افراد مبتلا به سرطان سینه و در مرحله حاد این بیماری ارتباط دارد. بنابراین مروری بر مطالعات انجام شده در خصوص پلی‌مورفیسم T/A 251 از ژن *IL-8* که می‌تواند درایجاد بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه در جمعیت زنان آسیایی موثر باشد، لزوم مطالعه حاضر را که بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم مذکور با سرطان سینه در جمعیت زنان ایرانی، به‌عنوان جمعیتی از زنان اسیایی، مشخص می‌نماید و همچنین لزوم استفاده از روش Tetra arms PCR در مقایسه با روش PCR-RFLP، که روش دقیق و مقرون به‌صرفه‌تری می‌باشد را توجیه می‌نماید.

نتیجه‌گیری

سرطان سینه به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین سرطان‌ها و علت اصلی مرگ و میر در بین زنان سراسر جهان و زنان ایرانی محسوب می‌گردد. فاکتورهای متعددی از جمله انواع فاکتورهای محیطی، وزن بدن، فاکتورهای مرتبط با سبک زندگی هم‌چون مصرف الکل، عدم فعالیت فیزیکی و مصرف سیگار و نیز مهم‌ترین مورد فاکتورهای ژنتیکی افراد در ایجاد تومورهای سرطان سینه نقش مهمی دارند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد سایتوکاین‌های متعددی از جمله *IL-8* نقش مهمی در ایجاد التهاب و رگ‌زایی در نسوج و در نتیجه ایجاد و تشدید سرطان‌ها ایفا می‌کند. این مطالعات بر نقش پلی‌مورفیسم‌های ژن *IL-8* و ارتباط آن با انواع سرطان در جمعیت‌های مختلف پرداخته‌اند. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی پلی‌مورفیسم 251 A/T ژن *IL-8* در جامعه زنان ایرانی مبتلا به سرطان سینه انجام شد و نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد بیشتر افراد مورد بررسی، در مرحله ۳ و ۴ بیماری، دارای ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزیگوت مغلوب این پلی‌مورفیسم در ژن *IL-8* بودند و این امر می‌تواند، توجیه کننده این باشد که پلی‌مورفیسم مذکور نقش مهمی در پیش آگهی و حتی تشخیص در بیماری سرطان پستان داراست و توصیه می‌شود در مطالعات بعدی تعداد افراد بیشتری از جمعیت‌های مختلف زنان ایرانی مورد مطالعه قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولین محترم در دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مسئولان محترم آزمایشگاه پاسارگارد به‌خصوص آقای دکتر امینی که در انجام کارهای آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری و تشکر می‌شود.

منابع

1. Kamdar BB, Tergas AI, Mateen FJ, Bhayani NH, et al. Night-shift work and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Breast cancer research and treatment.2013; 138(1): 291-301.
2. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, et al. Various types and management of breast cancer: An overview. Journal of advanced pharmaceutical technology and research. 2010; 1(2): 109-26.
3. Perou CM, Borresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011; 3(2): a003293.
4. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. Oncogene. 2006; 25(43): 5898-5905. Oncogene. 2006; 25(43): 5898-5905.Oncogene. 2006; 25(43): 5898-5905. Oncogene. 2006; 25(43): 5898-5905.
5. Vacchelli E, Aranda F, Bloy N, Buqu A, et al. Trial watch: immunostimulatory

cytokines in cancer therapy. Oncoimmunology. 2014; 3(6): 290-94.
6. Singh JK, Simões BM, Howell SJ, Farnie G, et al. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. Breast Cancer Research. 2013; 15(4); 210.
7. Chia CY, Kumari U, Casey P. Breast cancer cell invasion mediated by Gα12 signaling involves expression of interleukins-6 and−8, and matrix metalloproteinase-2. Journal of molecular signaling. 2014; 9(1): 6.
8. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M , et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness .Biomedicine Cancer. 2010; (10): 283.
9. Lin1 Y. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. Publication of the international union Against Cancer (uicc). International Journal of Cancer. 2004; (109): 507–515 .
10. Huang Q, Wang C, Qiu LJ, Shao F, et al. IL-8-251A>T polymorphism is associated with breast cancer risk:a meta-analysis. Journal of Cancer Research Clinical Oncology. 2011; 137(3): 1147–1150.
11. Taheri M, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Fazaeli A, et al. Association of 607 C/A Polymorphism of IL-18 Gene (rs1946518) with Breast Cancer Risk in Zahedan, Southeast Iran. Prague Medical Report. 2012; 113(3): 217-222.
12. Zhang J, Han X, Sun Sh. IL-8 -251A/T and +781C/T polymorphisms were associated with risk of breast cancer in a Chinese population. International Journal of Clinical Express Pathology. 2017; 10(7): 7443-7450.
13. He Y, SunSh, Liu Y,Tian K. Association of IL-8 genetic polymorphisms and breast cancer risk in a Chinese population. Biomedical Research. 2017; 28 (18): 7892-7898.
14. Xiuyu C, Weihan H, BeiZh, Ni D, et al. Genotyping of IL-8-251 T > A yields prognostic information in patients with gastric carcinoma. Biomarkers.2013; 18(7): 559-564.
15. Chen Y, Yang Y, Liu S, Zhu S, et al. Association between interleukin 8− 251 A/T and+ 781 C/T polymorphisms and osteosarcoma risk in Chinese population: a case–control study. Tumor Biology. 2016; 37(5): 6191-6196.
16. Wang Z, Gao ZM, Huang HB, Sun LS, et al. Association of IL-8 gene promoter -251 A/T and IL-18 gene promoter-137 G/C polymorphisms with head and neck cancer risk: a comprehensive meta-analysis. Dovepress. 2018; 10: 2589-2604.
17. Jessica C, Alwadris TT, Prasetyo SR, Puspitawati R, et al. Association of interleukin 8 -251 A/T gene polymorphism with periodontitis in Indonesia. Journal of Physics. 2018; 1025: 1-5.
18. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, et al. Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease. Journal of HumanGenethology. 2006; 51(3): 196-203.
19. Richie RC, Swanson JO. Breast Cancer: A Review of the Literature. Journal of Insurance Medicine. 2003; 35(2): 85-101.
20. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen A J. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian pacific journal of cancer prevention. 2004; 5(1): 24-27.
21. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, et al. Breast

cancer in Iran: an epidemiological review. Breast Journal. 2007; 13(4): 383-91.
22. De Andres PJ, Illera JC, Caceres S, Diez L, et al. Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2013; 152(3-4): 245-51.
23. Vogel CF, Li W, Wu D, Miller JK, et al. Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF-κB subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2014; 512(1): 78-86.
24. Agha-Alinejad H, Haftchenari SH, MatinHomaei H. Effect of a Period of Endurance Training on Serum Il-8 Concentration and Tumor Volume in Breast Cancer Bearing Mice. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2014; 16(1): 26-32.
25. Strieter RM, Kunkel SL, Elner VM, Martonyi CL, et al. Interleukin-8.A corneal factor that induces neovascularization. American Journal of Pathology.1992; 141(6): 1279-1284.
26. Wu S, Lu S, Tao H, Zhang L, et al .Correlation of Polymorphism of IL-8 and MMP-7 with Occurrenceand Lymph Node Metastasis of Early Stage Cervical Cancer. Journal of Huazhong University of Science Technology. 2011; 31(1): 114-119.
27. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ahmed SB, et al. Genetic Variation in IL-8 Associated with Increased Risk and Poor Prognosis of Breast Carcinoma. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Human Immunology. 2006; 9(67): 13-21.
28. Huang J, Li X, Hilf R, Bambara RA, et al. Molecular basis of therapeutic strategies for breast cancer. Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders. 2005; 5(4): 379-396.
29. Vairaktaris E, Serefoglou Z, Yapijakis C. High gene expression of matrix metalloproteinase-7 is associated with early stages of oral cancer. Anticancer Research. 2007; 27(4B): 2493-2498.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2019; 10(1)

Study of relation on breast cancer and A/T 251 polymorphism of *IL-8* gene in Iranian female populations by Tetra Arms PCR

Siasi E, Ph.D.*, gholami M, M.Sc., Ashrafi F, Ph.D.

- Department of Genetics, Faculity of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: emi_biotech2006@yahoo.ca

Received: 5 Sep. 2018 Accepted: 7 May. 2019

Abstract

Aim: In this study, relationship between breast cancer and 251A/T polymorphism of *IL-8* gene, as the genetic marker, was investigated in the Iranian females population by Tetra arms-PCR.

Materials and methods: In this case-control study, 50 women with breast cancer and 50 healthy women as control group were selected. After extraction of DNA, determination of *IL-8* gene 251 A / T polymorphism genotypes was performed by Tetra arms-PCR.

Results: In the control group, frequency of AA, AT, and TT genotypes were 0%, 88% and 12%, respectively and them for case group were 12%, 54% and 34%, respectively. Result showed no significant difference between AA, AT and TT genotypes in the control and case groups ($P \leq 0.05$).

Conclusions: In current research, there was no significant difference between A and T alleles in the control and case groups. Therefore, it indicated that there was not association between *IL-8* gene 251 A/T polymorphism and breast cancer in the studied Iranian females population.

Keywords: Breast cancer, *IL-8* gene 251 A / T polymorphism, Tetra arms-PCR technique