

Analysis of Glu298Asp eNOS Gene polymorphism in patients with Gastric Cancer in the Guilan population

Arjmand Kolukhi Z¹, Salehi Z^{1*}, Mashayekhi F¹, Najafi B², Mirpoor SH²

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Pediatrics Hematology and Cancer, Department Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Received: 8 Jun 2014, Accepted: 27 Aug 2014

Abstract

Background: Nitric oxide is synthesized in endothelial cells by eNOS and acts as a pleiotropic regulator involved in carcinogenesis. Most gastric cancers develop from stomach epithelial cells; therefore, NO may play a role in their development. Polymorphisms of eNOS have been shown to be associated with cancer susceptibility. In the present study, we investigated the association of the eNOS genotypes with gastric cancer risk in Guilan Population.

Materials and Methods: In this Case-Control study, we analyzed the Glu298Asp polymorphism of eNOS in 87 patients with gastric cancer and 90 healthy controls. The genotyping of eNOS polymorphism was performed using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assays. All statistical analyses were conducted by the MedCalc statistical software.

Results: No association between the eNOS genotypes and gastric cancer risk was found. Among the 87 patients, 45 had Glu/Glu, 38 were Glu/Asp, and 4 were Asp/Asp. In the control group, 44 had Glu/Glu, 40 were Glu/Asp, and 6 were Asp/Asp. We found no significant differences in allele and genotype frequencies between control and patient specimens.

Conclusion: We found that there was No association between this polymorphism and gastric cancer risk. Results suggest that eNOS polymorphism may play a role in inhibition of gastric cancer. However, larger population-based studies are needed for clarifying the role of eNOS polymorphism in gastric cancer.

Keywords: eNOS, Gastric Cancer, Genetic Polymorphism, Nitric Oxide Synthases

*Corresponding Author:

Address: Zivar Salehi (MD, Ph.D.), Professor in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, P.O.Box 1914, Rasht, Iran.

Email: geneticzs@yahoo.co.uk

بررسی پلی مورفیسم Glu298Asp ژن eNOS در بیماران مبتلا به سرطان معده در جمعیت گیلان

زمان ارجمند کلوخی^۱، زیور صالحی^{۲*}، فرهاد مشایخی^۲، بهروز نجفی^۲، سید حسین میرپور^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار، فوق تخصص خون و سرطان، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۵

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکسید در سلول‌های اندوتلیال توسط eNOS سنتز شده و به عنوان یک تنظیم کننده چندکاره در ایجاد سرطان عمل می‌کند. بیشتر سرطان‌های معده از سلول‌های اپی‌تلیال معده گسترش می‌یابد، از این رو ممکن است نیتریک اکسید در پیشرفت آنها دارای یک نقش باشد. نشان داده شده پلی مورفیسم‌های ژن eNOS با استعداد ابتلا به سرطان‌های مختلف در ارتباط می‌باشد. در مطالعه حاضر، ارتباط ژنوتیپ‌های eNOS با خطر سرطان معده در جمعیت گیلان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهد، پلی مورفیسم eNOS Glu298Asp در ۸۷ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۹۰ فرد سالم بررسی شد. تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم eNOS با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- چند شکلی طول قطعه محدود شده انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار MedCalc صورت گرفت.

یافته‌ها: بین ژنوتیپ‌های eNOS و خطر سرطان معده هیچ ارتباطی یافت نشد. از بین ۸۷ بیمار، ۴۵ نفر Glu/Glu، ۳۸ نفر Glu/Asp، و ۴ نفر Asp/Asp بودند. در گروه شاهد، ۴۴ نفر Glu/Glu، ۴۰ نفر Glu/Asp و ۶ نفر Asp/Asp بودند. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فراوانی‌های ژنوتیپی و آلی بین نمونه‌های شاهد و بیمار وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: مشخص شد بین این پلی مورفیسم و خطر سرطان معده هیچ ارتباطی وجود ندارد. نتایج پیشنهاد می‌کند که پلی مورفیسم eNOS ممکن است دارای یک نقش در مهار سرطان معده باشد. اگرچه مطالعات مبتنی بر جمعیت بزرگ‌تر جهت روشن شدن نقش پلی مورفیسم ژن eNOS در سرطان معده مورد نیاز می‌باشد.

واژگان کلیدی: eNOS، سرطان معده، پلی مورفیسم ژنتیکی، نیتریک اکسید سنتاز

*نویسنده مسئول: رشت، خیابان نامجو، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: genetics@yahoo.co.uk

مقدمه

سرطان معده یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. هر دو نوع سرطان معده خانوادگی و تک گیر حاصل تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی متعددی هستند که سلول های اپی تلایل عادی معده را به نئوپلاسم های بدخیم تبدیل می کنند (۱). نیتریک اکسید (Nitric oxide-NO) توسط آنزیم های نیتریک اکسید سنتاز (Nitric oxide Synthases-NOS) در انواعی از سلول ها مانند سلول های عصبی، اندوتلیالی، ماکروفاژها و سلول های دیگر سنتز می شود. NOS با اکسیداسیون نیتروژن گوآنیدین و L- آرژنین (L-Arg) باعث سنتز L- سیترویلین (L-citrulline) و NO می شود. بسته به محل منشاء، سه ایزوفرم NOS وجود دارد: اندوتلیالی (eNOS)، عصبی (nNOS)، و القایی (iNOS). نوع اندوتلیالی و عصبی ایزوفرمی هستند که به طور پیوسته بیان شده و وابسته به کلسیم-کالمودولین هستند در حالی که نوع القایی در سطح رونویسی تنظیم شده و توسط لیگاند های التهابی مختلف تحریک می شود (۲، ۳). در سلول های اندوتلیالی یا اپی تلایل، eNOS به طور پیوسته بیان شده و می تواند مقدار نسبتا کمی NO تولید نماید که دارای نقش مهمی در اعمال این سلول ها می باشد (۴)، از این رو ممکن است NO دارای یک نقش در سبب شناسی سرطان معده باشد.

آپاتوزیس نقش مهمی در حفاظت از سلول های میزبان داشته باشد (۵، ۷، ۸).

ژن eNOS، کدکننده نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی، با اندازه ۲۳/۵ کیلو باز و با ۲۷ اگزون بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۷ (7q35-q36) قرار گرفته است (<http://asia.ensembl.org/index.html>). رونوشت mRNA حاصل از این ژن با ۴۰۵۲ نوکلئوتید یک پروتئین ۱۳۵ کیلودالتون با ۱۲۰۳ آمینواسید را رمزدهی می کند (۹). در عروق بافت های توموری مانند سرطان سینه (۱۰)، مثانه (۱۱)، کولورکتال (۱۲)، مغز (۱۳) و پانکراس (۱۴) بیان افزایش یافته eNOS مشهود است، در حالی که بیان eNOS و نقش بالقوه آن در سرطان معده نامشخص است (۱۵). بیان نابجای eNOS در سلول های توموری خاص، مانند آدنوکارسینوما ی کولورکتال مشاهده شده است. با این حال، مکانیسم های دخیل در بیان نابجای eNOS در سلول های سرطانی و سلول های اندوتلیالی مرتبط با تومور تا حد زیادی ناشناخته است (۱۶). شواهد نشان می دهد بیان eNOS می تواند توسط هورمون های مختلف، سایتوکاین ها، عوامل رشد و تغییرات ژنتیکی مثل فعال شدن انکوژن و غیرفعال شدن سرکوبگر تومور، تنظیم گردد. بسیاری از تومورها غالبا بیان نابجای این عوامل و تغییرات ژنتیکی را نشان می دهند (۱۸-۱۶).

بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه GenBank dbSNP database تاکنون بیش از ۹۰۰ پلی مورفیسم در ژن eNOS شناسایی شده است [Apr, 2014] URL: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). یکی از نواحی پلی مورفیک مهم این ژن، پلی مورفیسم Glu298Asp (rs1799983) در اگزون ۸ می باشد که در آن جایگزینی گوآنین با تیمین (G→T) باعث تغییر اسید آمینه گلو تامات به آسپاراتات (Glu→Asp) در کدون ۲۹۸ پروتئین eNOS می شود (۱۹). پروتئین eNOS دارای اسید آمینه آسپاراتات در کدون ۲۹۸، شکسته شده و دو قطعه ۱۰۰ کیلودالتون (در انتهای کربو کسیل) و ۳۵ کیلودالتون (در انتهای آمینی) تولید می شود که نتیجه آن کاهش تولید پروتئین عملکردی

مطالعات قبلی نشان داده اند که NO می تواند به عنوان یک پیشبرنده تومور و هم چنین به عنوان یک سرکوب کننده تومور و متاستاز در سرطان زایی عمل نماید (۲). NO با تحریک آسیب DNA، تغییر بازهای اسید نوکلئیک، غیرفعال کردن پروتئین های دخیل در تعمیر DNA و غیرفعال سازی پروتئین های سرکوب گر تومور باعث پیشبرد سرطان می شود (۵). هم چنین NO با تحریک رگ زایی، افزایش نفوذ پذیری عروق، و دخالت در تنظیم متالوپروتئاز ماتریکس، باعث پیشرفت سرطان و متاستاز می شود (۶). از سوی دیگر NO ممکن است از طریق تنظیم جریان خون، چسبندگی سلول های تومور به اندوتلیوم، و

عکس‌برداری توسط سیستم Gel Documentation (BIO-RAD, USA) صورت گرفت. DNA به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و به عنوان الگو جهت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) استفاده گردید.

جهت بررسی پلی‌مورفیسم Glu298Asp ژن eNOS از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. بدین منظور با جستجو در سایت NCBI ژن رفرنس eNOS استخراج شد. سکانس این ژن در نرم‌افزار (Molecular Oligo, Molecular Biology Insights, USA version 7.54) قرار گرفت و یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی گردید. در مرحله بعد جهت تعیین اختصاصیت پرایمر، توالی آنها در NCBI Primer BLAST بررسی شد. توالی پرایمرها به صورت 5'- GCC TCG GTG AGA TAA AGG AT -3' و 5'- CTT GCA GGC CCT TCT TGA GAG -3' و به ترتیب برای پرایمر رفت و برگشت بود. قطعه DNA ۳۸۲ جفت بازی مورد نظر در ژن eNOS طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دستگاه نرمال سایکلر (Bio-Rad, USA) تکثیر شد. مخلوط هر واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳۰ نانوگرم DNA الگو، 1x Taq DNA Buffer، ۰/۲ میلی polymerase، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مول dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای طراحی شده و ۱/۵ واحد Taq DNA polymerase با غلظت $5U \mu l^{-1}$ (Bioflux, Japan) مورد استفاده قرار گرفت. مراحل PCR به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و پس از آن ۳۵ چرخه به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از تکثیر، جهت بررسی و مشاهده محصولات PCR، الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) صورت گرفت.

تعیین ژنوتیپ: قطعه DNA ۳۸۲ جفت بازی تکثیر شده ژن eNOS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به

eNOS در افراد هموزیگوت و هتروزیگوت برای آلل T می‌شود (۲۰). این موضوع ممکن است عملکرد پروتئین eNOS را تحت تاثیر قرار داده و ارتباط این پلی مورفیسم را با سرطان توضیح دهد. با توجه به شیوع بالای سرطان معده در ایران و به خصوص استان‌های شمالی و نیز نقش این پلی‌مورفیسم در بیماری‌ها و سرطان‌های مختلف، در مطالعه مورد- شاهد حاضر ارتباط پلی‌مورفیسم Glu298Asp ژن eNOS و خطر سرطان معده در جمعیت استان گیلان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری در پژوهش مورد- شاهد حاضر، شامل ۱۷۷ نفر و مشتمل بر دو گروه بود. گروه اول شامل ۸۷ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان رازی رشت بود که سرطان معده در آنها توسط پزشک و براساس نتیجه اندوسکوپی و پاتولوژی نمونه بیوپسی شده از بافت معده تشخیص داده شد. گروه دوم شامل ۹۰ فرد سالم در محدوده سنی افراد بیمار و به عنوان گروه شاهد توسط پزشک انتخاب شد. تمامی افراد مورد مطالعه بومی استان گیلان بوده و افراد غیربومی و مهاجر و افرادی که در زمان نمونه‌گیری دارای بیماری خاص بودند و همچنین افرادی که در خانواده دارای بیماری خاص ژنتیکی بودند از مطالعه خارج و جایگزین شدند. از افراد مورد مطالعه مقدار ۲ میلی‌لیتر خون تهیه شد و با استفاده از تیوب‌های حاوی EDTA (ونوجکت‌های EDTA Coated، بلژیک) به آزمایشگاه ژنتیک منتقل گردید.

استخراج DNA از لوکوسیت‌های خون با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Gpp solution, Gen Pajooohan, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به منظور ارزیابی میزان خلوص و غلظت DNA به دست آمده، اندازه‌گیری جذب اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد. هم‌چنین به منظور ارزیابی صحت استخراج DNA و بررسی شکستگی‌های احتمالی قطعات DNA ژنومی، آزمایش الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و

جدول ۱ فراوانی خصوصیات انتخاب شده در بیماران مبتلا به سرطان معده و گروه شاهد

شاهد (n=۹۰) تعداد(درصد)	بیماران (n=۸۷) تعداد(درصد)	خصوصیات
۲۸ (۳۱/۱)	۲۶ (۳۰)	سن (سال)
۲۸ (۳۱/۱)	۲۴ (۲۷/۵)	< ۶۰
۳۴ (۳۷/۸)	۳۷ (۴۲/۵)	۶۰-۷۰
		> ۷۰
۶۲ (۶۸/۹)	۶۲ (۷۱/۳)	جنس
۲۸ (۳۱/۱)	۲۵ (۲۸/۷)	مرد
		زن
	۸۱ (۹۳/۱)	هیستولوژی
	۲ (۲/۳)	آدنوکارسینوما
	۴ (۴/۶)	لنفوم
		سایر
	۳۵ (۴۰/۳)	محل تومور
	۲۵ (۲۸/۷)	کاردیا
	۲۷ (۳۱)	آنتر
		تنه
	۴ (۴/۶)	مرحله پاتولوژیک
	۱۵ (۱۷/۲)	I
	۲۳ (۲۶/۴)	II
	۴۱ (۴۷/۲)	III
	۴ (۴/۶)	IV
		نامشخص

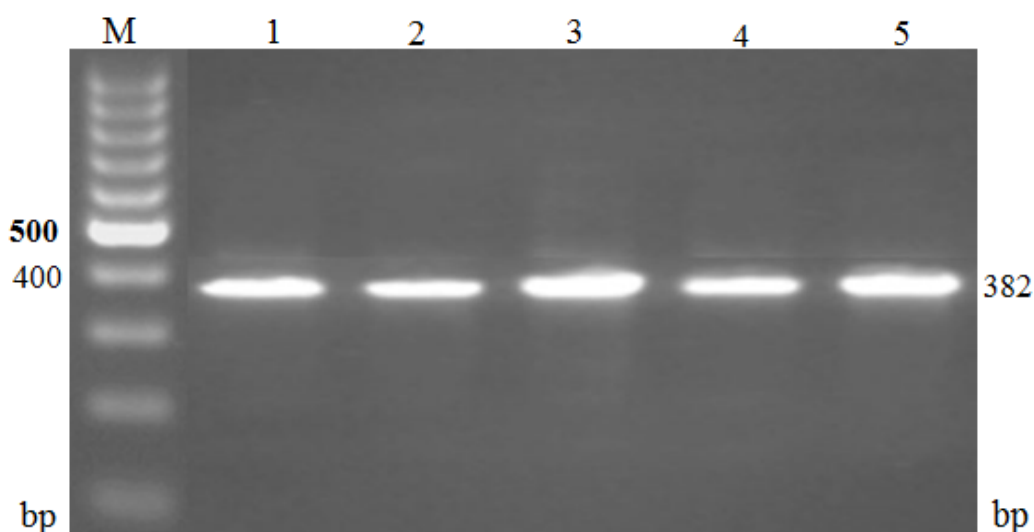
پس از تکثیر قطعه DNA ۳۸۲ جفت بازی ژن eNOS به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصولات بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد (شکل ۱). در مرحله بعد ژنوتیپ پلی مورفیسیم Glu298Asp در افراد بیمار و گروه شاهد با روش RFLP تعیین گردید. این آنالیز در جایگاه پلی مورفیک *MboI* در موقعیت ۸۹۴ آلل‌های eNOS (آلل G مطابق با Glu و آلل T مطابق با Asp) صورت گرفت. محصولات PCR پس از هضم توسط اندونوکلاز *MboI* بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. در صورت عدم حضور جایگاه پلی مورفیک *MboI* در ژن eNOS، پس از هضم یک قطعه ۳۸۲ جفت بازی (آلل G) و در صورت حضور جایگاه *MboI* قطعات ۲۴۰ و ۱۴۲ جفت بازی (آلل T) تولید می‌شود (شکل ۲).

مدت ۱۶ ساعت با آنزیم اندونوکلاز *MboI* (Thermo scientific, Fermentase Inc, Hanover, MD, USA) مجاور گردید. تعیین ژنوتیپ با الکتروفورز قطعات حاصل از هضم روی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی آنها با اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

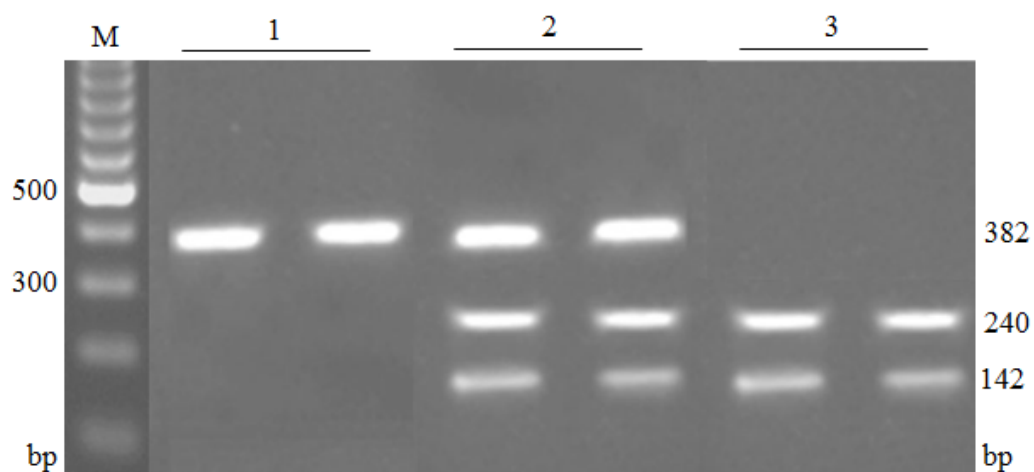
در پایان داده‌های به دست آمده در نرم‌افزار (Version 12.1, Mariakerke, Belgium) MedCalc وارد و آنالیزهای آماری بر روی آنها انجام گردید. ارزش P با استفاده از آزمون کای اسکور تخمین زده شد و سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این تحقیق مجموعاً ۱۷۷ نفر، شامل ۸۷ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۹۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. از ۸۷ بیمار مطالعه شده ۶۲ نفر مرد و ۲۵ نفر زن بودند. میانگین سنی مردان و زنان به ترتیب ۶۳/۲ و ۶۵/۸ سال بود و بیشترین افراد مورد مطالعه در گروه سنی بالای ۷۰ سال قرار داشتند. افراد بیمار و شاهد از نظر سن و جنس اختلاف معنی داری نشان نمی‌دهند. در افراد مورد بررسی آدنوکارسینوم شایع‌ترین نوع سرطان بود. از نظر محل آناتومیکی تومور، ۳۵ نفر در کاردیا، ۲۷ نفر در تنه و ۲۵ نفر در آنتر شناسایی گردید. از نظر مرحله پاتولوژیکی تومور، بیشتر افراد در مرحله III و IV بودند. خصوصیات اصلی افراد مبتلا به سرطان معده در جدول ۱ خلاصه شده است.



شکل ۱. تکثیر قطعه DNA ۳۸۲ جفت بازی ژن eNOS به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR). M: مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون های ۱-۵: محصولات بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده‌اند.



شکل ۲. چند شکلی طول قطعه محدود شده ژن eNOS. این آنالیز در جایگاه پلی‌مورفیک *MboI* در موقعیت ۸۹۴ این آلل‌ها انجام شد. محصولات PCR با اندونوکلاز *MboI* شکسته شده و الکتروفورز گردید. در صورت فقدان جایگاه پلی‌مورفیک *MboI* پس از هضم یک محصول ۳۸۲ جفت بازی تولید می‌شود (آلل G)، در حالیکه حضور جایگاه *MboI* باعث تولید دو قطعه ۲۴۰ و ۱۴۲ جفت بازی می‌شود (آلل T). M: مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۱: هموزیگوت Glu/Glu، ستون ۲: هتروزیگوت Glu/Asp، ستون ۳: هموزیگوت Asp/Asp.

Glu298Asp در دو گروه بیمار و شاهد در جدول ۲ خلاصه شده است. فراوان‌ترین ژنوتیپ در هر دو گروه بیمار و شاهد ژنوتیپ Glu/Glu می‌باشد (به ترتیب ۵۱/۷ درصد و ۴۸/۹ درصد). در دو گروه مورد بررسی، فراوان‌ترین آلل G بود. فراوانی ژنوتیپ Glu/Glu و فراوانی آلل G در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد بیشتر می‌باشد اما این اختلاف معنی‌دار نیست. فراوانی آللی نیز از نظر آماری

در مجموع از ۸۷ بیمار مبتلا به سرطان معده، ۴۵ نفر (۵۱/۷ درصد) دارای ژنوتیپ Glu/Glu، ۳۸ نفر (۴۳/۷ درصد) Glu/Asp و ۴ نفر (۴/۶ درصد) Asp/Asp بودند. فراوانی ژنوتیپی در بین گروه شاهد نیز برای ۳ ژنوتیپ Glu/Glu، Glu/Asp و Asp/Asp به ترتیب ۴۴ نفر (۴۸/۹ درصد)، ۴۰ نفر (۴۴/۴ درصد) و ۶ نفر (۶/۷ درصد) بود. توزیع فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفسم

دارای اختلاف معنی دار در دو گروه مورد مطالعه نیست. بنابراین به نظر می رسد که پلی مورفیسم Glu298Asp ژن eNOS با بیماری سرطان معده در جمعیت مورد مطالعه مرتبط نباشد.

جدول ۲. فراوانی های ژنوتیپی و آلی بین گروه شاهد و بیمار و آنالیز ارتباط آنها با سرطان معده

ژنوتیپها	بیماران (n= ۸۷) تعداد(درصد)	شاهد (n= ۹۰) تعداد(درصد)	p	OR (95% CI)
تعداد کل آللها	۱۷۴	۱۸۰		
Glu/Glu	۴۵ (۵۱/۷)	۴۴ (۴۸/۹)		۱/۰۰ (Ref)
Glu/Asp	۳۸ (۴۳/۷)	۴۰ (۴۴/۴)	۰/۸۱۲	۰/۹۳ (۰/۵۱ - ۱/۷۱)
Asp/Asp	۴ (۴/۶)	۶ (۶/۷)	۰/۵۲۹	۰/۶۵ (۰/۱۷ - ۲/۴۷)
غالب				
(Glu/Glu vs. Glu/Asp + Asp/Asp)			۰/۷۰۶	۰/۸۹ (۰/۴۹ - ۱/۶۱)
مغلوب				
(Asp/Asp vs. Glu/Glu + Glu/Asp)			۰/۵۵۳	۰/۶۷ (۰/۱۸ - ۲/۴۸)
Glu/Asp + Asp/Asp	۴۲ (۴۸/۳)	۴۶ (۵۱/۱)		
فراوانی آلل مغلوب	۰/۲۶	۰/۲۹		
فراوانی آلل غالب	۰/۷۴	۰/۷۱		

OR, odds ratios; 95% CI, 95% confidence interval

بحث

در مطالعه مورد- شاهد حاضر، ارتباط بین پلی مورفیسم عملکردی Glu298Asp ژن eNOS با خطر سرطان معده در جمعیت استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد در جمعیت مورد مطالعه، هیچ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم Glu298Asp و خطر سرطان معده وجود ندارد. براساس یافته های موجود، این مطالعه اولین پژوهش در زمینه بررسی ارتباط پلی مورفیسم Glu298Asp و استعداد ابتلا به سرطان معده در جمعیت ایرانی می باشد.

سرطان معده یکی از شایع ترین سرطانها در سراسر جهان است و مرگ و میر ناشی از سرطان معده پس از سرطان ریه در رده دوم قرار دارد. سرطان معده یک اختلال چند عاملی است که در آن فعل و انفعالات ژنتیکی و محیطی نقش مهمی در توسعه و پیشرفت آن دارند. انتظار می رود شناسایی این عوامل خطر ژنتیکی، درک ما از وقایع مولکولی اساسی دخیل در تومورزایی سرطان معده را

افزایش دهد. مطالعات انجام شده در طی سالهای اخیر نشان می دهد ژن های متعدد و عوامل محیطی مختلفی مسئول ایجاد سرطان معده هستند (۱). ژن کدکننده eNOS، که تشکیل NO را از L- آرژینین کاتالیز می کند، یکی از ژن های کاندید شرکت کننده در سرطان زایی معده می باشد. NO دارای نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی می باشد. اگر چه نقش فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی NO در فرآیندهای مختلف از جمله: نفوذپذیری و گشادکنندگی عروق، گردش خون، رگ زایی، تجمع پلاکتی، برهم کنش اندوتلیال- لوکوسیت، انتقال نوروترانسمیترها و توسعه سیستم عصبی، شل شدن عضلات صاف و دفاع ایمنی بدن به خوبی روشن شده است، گزارش های متفاوتی در مورد نقش NO در بروز سرطان وجود دارد (۲، ۳). به علت اهمیت فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی NO، پتانسیل ژن eNOS در پاتوژنز بیماری های مختلف انسانی با استفاده از واریانت های پلی مورفیک به عنوان نشانگرهای بیماری

بررسی شده است (۲۱). از این رو بررسی پلی مورفیسم های ژن eNOS با میزان توسعه سرطان معده ممکن است برای شناسایی افراد در خطر بالا برای سرطان معده مفید باشد. با این حال تعداد مطالعات مربوط به نقش NO/eNOS در سرطان محدود بوده و نتایج متفاوتی گزارش شده است.

در برخی از بافت های توموری، NO باعث افزایش رگ زایی تومور و تحریک اتساع عروق شده و در نتیجه باعث افزایش سرعت رشد تومور می شود. در تومورهای دیگر مثل سرطان معده و کولون، کاهش مقدار پروتئین NOS با روش ایمونوهیستوشیمی نشان داده شده و یک رابطه احتمالی بین فقدان NO و ایجاد سرطان وجود دارد (۲۲). بنابراین به نظر می رسد که NO می تواند هم به عنوان یک فاکتور پیشبرنده تومور و هم به عنوان یک فاکتور ضد تومورزا عمل کند (۲).

وانگ و همکاران نشان دادند که بیان eNOS در تومورهای اولیه و غدد لنفاوی متاستاتیک به طور قابل توجهی بیشتر از مخاط نرمال معده است و بیان eNOS با فنوتیپ رگ زایی سرطان معده و پیش آگهی ضعیف مرتبط است (۲۳). در مقابل، در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که بیان eNOS در سلول های سرطان معده نسبت به نمونه های طبیعی مخاط معده کاهش یافته است (۲۲). هم چنین گزارش شده واکنش ایمنی در سلول های اپی تلیال تومور معده تا حد زیادی کم شده است (۱۵). لو و همکاران گزارش نمودند تحریک افزایش بیان ژن eNOS در سلول های MCF-7 می تواند باعث افزایش سطح NO، تحریک آپوپتوزیس و کاهش جابجایی و تهاجم سلول سرطانی شود (۲۴).

واریانت Glu298Asp در اگزون ۸ ژن eNOS باعث جایگزینی یک آمینو اسید (Glu298→Asp) شده و قابلیت برش آن را تغییر می دهد و در نتیجه تولید NO کاهش می یابد (۱۹)، اما در مطالعه حاضر هیچ ارتباطی بین این پلی مورفیسم و سرطان معده یافت نشد. مشابه با نتایج مطالعه حاضر، نتایج حاصل از بررسی پلی مورفیسم Glu298Asp بر روی بیماران مبتلا به سرطان پروستات نشان داد که بین این پلی مورفیسم و خطر ابتلا به سرطان

پروستات هیچ ارتباط معنی داری وجود ندارد (۲۵). در مقابل، نتایج یک پژوهش صورت گرفته در کره جنوبی توسط جانگ و همکاران نشان داد که ژنوتیپ های Glu/Asp و Asp/Asp + Glu/Asp در مقایسه با ژنوتیپ Glu/Glu باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان کولورکتال می شوند اگرچه چنین خطری برای سایر ژنوتیپ ها وجود ندارد (۲۶). هم چنین نتایج حاصل از یک تحقیق جامع (meta-analysis) شامل ۱۱ مطالعه موردی در ایالات متحده نشان داد که ژنوتیپ Asp/Asp و مدل مغلوب (Glu/Glu +) خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می دهد (۲۷).

مطالعات صورت گرفته نشان می دهد که NO می تواند هم به عنوان یک پیشبرنده تومور و هم به عنوان یک مهارکننده پیشرفت و متاستاز تومور عمل نماید (۲)، اما در مطالعه حاضر، فقط نقش مهارکنندگی پلی مورفیسم Glu298Asp ژن eNOS مشاهده گردید. در حال حاضر یک توضیح روشن برای اختلاف میان نتایج فوق وجود ندارد. دلایل احتمالی تفاوت در یافته های مطالعه حاضر با سایر مطالعات ممکن است تا حدودی با اختلافات قومی و نژادی، وضعیت بیماری، اندام درگیر در بیماری، اندازه نمونه و هم چنین پیچیدگی بیان ژن و یا تنظیم بیان ژن در سطوح مختلف توضیح داده شود. هم چنین این موضوع نیز قابل ذکر است که در مطالعات مربوط به پلی مورفیسم، مطالعه جمعیت های مناطق مختلف و هم چنین استفاده از نمونه جمعیتی بزرگ تر (که یکی از محدودیت های این مطالعه نیز می باشد) قابل اعتمادتر بوده و می تواند هر چه بیشتر منطبق بر جامعه مورد مطالعه باشد.

نتیجه گیری

به طور کلی این بررسی نشان می دهد که اگرچه فراوانی ژنوتیپ Glu/Glu در افراد بیمار نسبت به افراد سالم بیشتر بوده و متعاقب آن احتمالاً میزان بیان نیتریک اکسید سنتز اندوتلیالی نیز بیشتر خواهد شد، اما این اختلاف معنی دار نیست و لذا به نظر می رسد که پلی مورفیسم Glu298Asp eNOS یک فاکتور خطر ژنتیکی برای ابتلا

5. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *The lancet oncology*. 2001;2(3):149-56.
6. Ziche M, Morbidelli L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *European cytokine network*. 2009;20(4):164-70.
7. Choi B-M, Pae H-O, Jang SI, Kim Y-M, Chung H-T. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2002;35(1):116-26.
8. Kong L, Dunn GD, Keefert LK, Korthuis RJ. Nitric oxide reduces tumor cell adhesion to isolated rat postcapillary venules. *Clinical & experimental metastasis*. 1996;14(4):335-43.
9. Kavya R, Saluja R, Singh S, Dikshit M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide*. 2006;15(4):280-94.
10. Martin JH, Begum S, Alalami O, Harrison A, Scott KW. Endothelial nitric oxide synthase: correlation with histologic grade, lymph node status and estrogen receptor expression in human breast cancer. *Tumor biology*. 2000;21(2):90-7.
11. Klotz T, Bloch W, Jacobs G, Niggemann S, Engelmann U, Addicks K. Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer. *Urology*. 1999;54(3):416-9.
12. Takahashi M, Fukuda K, Ohata T, Sugimura T, Wakabayashi K. Increased expression of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases in rat colon tumors induced by azoxymethane. *Cancer research*. 1997;57(7):1233-7.
13. Iwata S, Nakagawa K, Harada H, Oka Y, Kumon Y, Sakaki S. Endothelial nitric oxide synthase expression in tumor vasculature is correlated with malignancy in human supratentorial astrocytic tumors. *Neurosurgery*. 1999;45(1):24-5.
14. Nussler A, Gansauge S, Gansauge F, Fischer U, Butzer U, Kremsner P, et al. Overexpression of endothelium-derived nitric oxide synthase isoform 3 in the vasculature of human pancreatic tumor biopsies. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 1998;383(6):474-80.
15. Koh E, Noh SH, Lee YD, Lee HY, Han J-W, Lee HW, et al. Differential expression of

به سرطان معده نمی‌باشد. اگرچه مطالعات بیشتر روی جمعیت‌های بزرگ‌تر جهت بررسی دقیق‌تر این پلی مورفسم مورد نیاز است. با توجه به این که سرطان معده یک بیماری چند فاکتوری است لذا پیشنهاد می‌شود که در بررسی‌های آتی به نقش و همراهی سایر عوامل دخیل در این سرطان از جمله آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری نیز توجه گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی افراد شرکت کننده در این تحقیق نهایت تشکر را داشته و مراتب قدردانی خود را از دانشگاه گیلان که با حمایت علمی خود شرایط مناسب جهت انجام این تحقیق را فراهم ساخت، اعلام می‌نمایند. هم‌چنین بر خود لازم می‌دانند از همکاری مرکز تحقیقات سرطان، بخش هماتولوژی و آزمایشگاه بیمارستان رازی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان که زمینه لازم جهت جمع‌آوری نمونه و اطلاعات مورد نیاز این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی نمایند. این مقاله نتیجه پایان نامه دانشجویی زمان ارجمند کلوخی دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک ملکولی دانشگاه گیلان با عنوان "بررسی پلی مورفسم Glu298Asp ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در بیماران مبتلا به سرطان معده" می‌باشد.

منابع

1. Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oue N. Molecular pathology of gastric cancer: research and practice. *Pathology-Research and Practice*. 2011;207(10):608-12.
2. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(7):521-34.
3. Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PE, Schmidt HH, Moens AL. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 50(7):765-76.
4. Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*. 2010;92(9):1186-98.

- nitric oxide synthase in human stomach cancer. *Cancer letters*. 1999;146(2):173-80.
16. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2003;284(1):R1-R12.
17. Wu KK. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;962(1):122-30.
18. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1998;17(1):7-23.
19. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2006;164(10):921-35.
20. Tesaro M, Thompson W, Rogliani P, Qi L, Chaudhary P, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(6):2832-5.
21. Lamblin N, Cuilleret FJ, Helbecque N, Dallongeville J, Lablanche J-M, Amouyel P, et al. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is associated with collateral development in patients with chronic coronary occlusions. *BMC cardiovascular disorders*. 2005;5(1):27-8.
22. Wang Y-Z, Cao Y-Q, Wu J-N, Chen M, Cha X-Y. Expression of nitric oxide synthase in human gastric carcinoma and its relation to p53, PCNA. *World J Gastroenterol*. 2005;11(1):46-50.
23. Wang L, Shi GG, Yao JC, Gong W, Wei D, Wu T-T, et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2005;8(1):18-28.
24. Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. Nitric oxide regulation of maspin expression in normal mammary epithelial and breast cancer cells. *The American journal of pathology*. 2003; 162(5): 1411-7.
25. Branković A, Brajušković G, Nikolić Z, Vukotić V, Cerović S, Savić-Pavićević D, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population. *International journal of experimental pathology*. 2013;94(6):355-61.
26. Jang MJ, Jeon YJ, Kim JW, Chong SY, Hong SP, Oh D, et al. Association of eNOS polymorphisms (-786T> C, 4a4b, 894G> T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population. *Gene*. 2013; 512(2):275-81.
27. Hao Y, Montiel R, Huang Y. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 894 G> T polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124(3):809-13.