

تأثیر گوناگونی ژن های گیرنده استروژن در خطر ابتلا به سرطان پستان در ایران

• دکتر سکینه عباسی

PhD ژنتیک انسانی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

PhD ژنتیک پزشکی، پروفسور گروه زیست پزشکی، دانشکده

علوم پزشکی و بهداشت، دانشگاه پوترا مالزی، مالزی

دانشکده پیرا پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

patimah@medic.upm.edu.my

abbasisk@tums.ac.ir

عنوان مکرر: پلی مورفیسم ژن های گیرنده استروژن و سرطان پستان

این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران (گرات #3054 و 6165) تصویب و پشتیبانی مالی شده است.

این مقاله به زبان انگلیسی به آدرس زیر به چاپ رسیده است:

Int J Clin Exp Med 2012;5(4):332-341

www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM1202001

Original Article

Estrogen receptor genes variations and breast cancer risk in Iran

چکیده

در ژن ER- β اثرات تعاملی افزایشی را در ابتلا به سرطان پستان در بیماران با سابقه فامیلی سرطان پستان و متاستاز LN نشان دادند. همچنین، SNP در کدان 392 ژن گیرنده استروژن β نسبت به SNP ها در ژن در کدان های 10، 325، 594 از ژن گیرنده استروژن α ، حدود ده برابر خطر ابتلا به سرطان پستان را در بیماران با سابقه فامیلی سرطان پستان و حدود سه برابر متاستاز LN را در بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش می دهد.

نتیجه گیری: بنابراین SNP ها در ژن گیرنده استروژن α و β اثرات تعاملی در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان فامیلی و با متاستاز LN در میان زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان داشته و در این تاثیر تعاملی نقش SNP کدان 392 از ژن گیرنده استروژن β موثرتر است.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، گیرنده استروژن، متاستاز LN، پلی مورفیسم

زمینه و هدف: شواهد نشان می دهد که در روند بروز و پیشرفت سرطان پستان تغییراتی در مسیر سیگنالینگ ER- α و ER- β رخ می دهد و پلی مورفیسم ژن های مذکور با سرطان پستان و ویژگی های بالینی این بیماری همراه است. مطالعه حاضر، جهت بررسی تاثیر تعاملی افزایشنده گوناگونی توالی های خاصی از ژن های ER- β و ER- α در خطر ابتلا به سرطان پستان و در زنان ایرانی انجام پذیرفت.

روش و بررسی: ژن ها در 150 بیمار مبتلا به تومورهای مهاجم پستان که تازه تشخیص داده شده و در 147 نفر سالم توسط روش SSCP-PCR مطالعه شدند.

یافته ها: سه SNP، rs2077647، rs1801132، rs2228480 در ژن ER- α و یک SNP rs1256054



عنوان مکرر: ژن های گیرنده استروژن و سرطان پستان

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان در میان زنان در سراسر جهان است. نرخ بروز آن عمدتاً در زنان ۵۰ سال به بالا از دهه ۱۹۸۰ افزایش یافته است زیرا با استفاده گسترده از روش غربالگری با ماموگرافی در زنان بدون علامت در مراحل اولیه قابل تشخیص بوده (۱)، به طوری که میزان شیوع آن ۱۲۰ در هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر است (۲). بخشی از این افزایش را می توان به تغییر در الگوهای تولید مثل، مانند تاخیر در باروری و داشتن فرزندان کمتر نسبت داد. اگر چه ایران یکی از پایین ترین نرخ بروز سرطان پستان را دارا است، اما در طول چهار دهه گذشته، افزایش بروز سرطان پستان آن را یکی از شایع ترین بدخیمی ها در میان زنان ایرانی قرار داده است و این در حالی است که سن ابتلا به سرطان پستان در ایران حداقل یک دهه کمتر از همتایان خود در کشورهای توسعه یافته است (۳). میزان مرگ و میر سرطان پستان ۵,۸ به ازای هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر از زنان در تهران در سال ۱۹۹۸ بوده، به طوری که نرخ بروز آن ۲,۵ در هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر است (۴). کشورهای در حال توسعه امیدوارند روزی بتوانند در آستانه از بین بردن سرطان پستان به عنوان یک تهدید بزرگ برای سلامت جامعه قرار گیرند (۵). تشخیص زودرس سرطان پستان به عنوان یک چالش مهم برای بهداشت حرفه ای هنوز باقی است. با توجه به توصیه های سازمان بهداشت جهانی در اجرای برنامه ملی کنترل سرطان، ارزیابی معضلات سرطان پستان (به عنوان مثال، بروز، شیوع و مرگ و میر) اولین گام در این فرآیند است (۶).

امروزه بر این باورند که عمدتاً سرطان پستان در سلول های لومینار مخاطی غده های پستانی به وجود می آید. این سلول ها دارای گیرنده های استروژنی هستند که در روند رشد نرمال غده پستانی به استروژن تخمدانی پاسخ می دهند. اینکه استروژن ها چگونه رشد سلولی را تحریک می کنند به طور کامل شناخته نشده است اما مشخص است که استروژن از طریق گیرنده های استروژنی

در بیان ژن های مداخله کننده در تکثیر سلولی نقش مهمی دارد (۷).

علت سرطان پستان و زمینه ارثی آن فقط در تعداد کمی از زنان مبتلا (کمتر از ۵٪) تشخیص داده می شود که نیمی دارای جهش هایی در ژن های *BRCA1*، *BRCA2*، *TP53*، *PTEN* و یا سایر ژن هایی شناخته شده در سرطان می باشند (۸).

به هر حال مطالعات در دوقلوها نشان می دهد که حدود ۳۰٪ از سرطان پستان وراثتی است و این نشانگر آن است ژن هایی غیر از آنچه که تاکنون شناخته شده اند در تغییر خطر ابتلا به سرطان پستان عمل می کنند. هر چند این احتمال وجود دارد که ژن های ظاهراً کم اثر به اندازه ژن های موثر درگیر باشند. اما این که کدام نواحی ژنتیکی و کدام عملکردهای بیوشیمیایی و یا کدام مسیرهای انتقال سیگنال در وراثت سرطان پستان و پیشروی آن مهم است، هنوز ناشناخته مانده است (۹).

گرچه فراوانی جهش های ژن گیرنده استروژن آلفا ($ER-\alpha$) انسانی در بافت سرطان پستان کم است ولی گوناگونی آلی ژن های *ERS* با خطر ابتلا به سرطان پستان (۱۷-۱۰) در میان سفید پوستان، با برخی از ویژگی های بالینی در سرطان پستان از جمله وجود سابقه خانوادگی و متاستاز در غدد لنفاوی (*LN*) همراه است (۱۶). مدارک و شواهد جمع آوری شده نشان می دهد که سرطان پستان تحت تاثیر مجموعه ای عوامل بیولوژیکی مجزا و منحصر به فرد مانند بیان ژن های خاص، مارکرها مولکولی و یا پروتئینی، که موجب تغییر در رفتار کلینیکی، پیش آگهی و پاسخ به درمان آن می گردد (۱۸-۲۰). در مطالعه حاضر، ما با این فرض که گوناگونی در توالی های خاصی از ژن گیرنده استروژن بتا ($ER-\beta$) و $ER-\alpha$ با هم به طور افزایشی در تغییر خطر ابتلا به سرطان پستان نقش دارد انجام گرفت. این مطالعه شامل: (الف) توالی یابی مستقیم اگزون انتخاب شده، در میان تمام افراد گروه مورد و شاهد که نمونه *DNA* آنان در زمان این مطالعه در دسترس بوده است (ب) ارزیابی ارتباط گوناگونی ها در ژن های استروژن و تعامل و تاثیر متقابلشان بر یکدیگر در خطر ابتلا به سرطان پستان.

روش بررسی

جامعه مورد مطالعه

تحقیق حاضر یک مطالعه مورد - شاهد است که از فروردین ۱۳۸۶ تا دی ۱۳۸۸ بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان (۱۵۰ نفر) عمدتاً ساکن تهران، که به تازگی در انستیتو کانسر، مجتمع بیمارستان امام خمینی (ره) بیمارستان تشخیص و تایید پاتولوژیکی شده بود صورت گرفت. گروه شاهد (N=۱۴۷) شامل زنان سالم بدون هر سابقه سرطان پستان و یا هر نوع بیماری نئوپلاستیک دیگر و همچنین بدون سابقه سرطان پستان در بستگان درجه یک می باشد. زنانی که

در طول زندگی هیستریکتومی، یائسگی مصنوعی داشته و یا در معرض هر نوع اشعه و شیمی درمانی قرار داشته اند از مطالعه حذف شدند. شایان ذکر است که تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه و قبل از ورود به این تحقیق ملزم به مطالعه و امضای رضایت نامه کتبی آگاهانه گردیدند. اطلاعات جمعیتی و عوامل خطر ابتلا با استفاده از پرسشنامه کوتاه ساختار یا جمع آوری شد، که تمامی گویه های پرسشنامه استاندارد و روایی و پایایی آن نیز تایید شده بود شامل اطلاعات مربوط به سن، وزن، قد، نژاد، مذهب، وضعیت تأهل، تعداد حاملگی و کودکان، سن در تولد اولین فرزند، مدت متوسط دوره شیردهی سابقه خانوادگی سرطان پستان (بستگان درجه یک)، سن شروع قاعدگی، سن در ازدواج، وضعیت یائسگی،

سن یائسگی، گروه های خونی ABO، نژاد، سن شروع بیماری، متاستاز در گره های لنفاوی، مرحله سرطان در زمان آزمایش و بیان ژن ER در بافت سرطان پستان (جدول ۱). 5ml خون محیطی همراه با EDTA بر اساس پروتکل تهیه شده جمع آوری و جهت آزمایش های ژنومیک و تجزیه و تحلیل ژنوتاییپی نگهداری شدند.

جدول ۱. توزیع ویژگی های انتخاب شده

دموگرافیک و عوامل عمده خطر ساز برای سرطان پستان از کل جمعیت مورد مطالعه: گروه کنترل در مقابل سرطان پستان

مشخصات	مورد (%)	کنترل (%)
سن (سال):		
40 <=	52(41/3)	98(57/3)
40 >	74(58/7)	73(42/7)
BMI(kg/m ²):		
<=18/5 (کم وزن)	5(3/3)	9(6/1)
18/6-24/9 (نرمال)	57(38)	90(61/2)
25/0- 29/9 (دارای اضافه وزن)	55(36/7)	35(23/8)
>30/0 (چاق)	33(22)	13(8/9)
سن شروع قاعدگی (سال):		
12 <=	60(40)	36(24/5)
12 >	90(60)	111(75/5)
سن یائسگی (سال):		
50 <=	47(79/7)	11(61/1)
50 >	12(20/3)	7(38/9)
سن ابتلا به سرطان پستان (سال):		
40 <	48(32)	-
40 >=	66(44)	-
پس از یائسگی	36(24)	-
سابقه فامیلی سرطان پستان:		
سابقه سرطان پستان در فامیل درجه یک	19(12/7)	-
عدم سابقه سرطان پستان در فامیل درجه یک	131(87/3)	147(100)
سابقه سرطان پستان در فامیل درجه یک:		
مادر	8(42/1)	-
خواهر	6(31/6)	-
دختر	4(21)	-
مادر و خواهر	1(5/3)	-
متاستاز غدد لنفاوی:		
بله	23(15/3)	-
خیر	127(84/7)	-



غربالگری گوناگونی در ژن های ER- α و ER- β به کمک روش تکثیر پلی مورفیسیم ساختمان سه بعدی تک زنجیره (SSCP-PCR)

به منظور شناسایی هر گونه تغییر برای مناطق انتخاب شده در دو ژن ER- α و ER- β ، روش PCR-SSCP انجام شد. در این مرحله مجموعاً از ۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان به عنوان مورد و ۱۴۷ نفر به عنوان گروه شاهد به منظور شناسایی گوناگونی و یا جهش مرتبط با سرطان پستان مورد مطالعه قرار گرفتند. DNA ژنومی از لکوسیت های خون با استفاده از کیت استخراج DNG Plus™ (Cinnagen-Inc)، تهران ایران) مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج شد. DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم) برای ژنوتایپینگ با روش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

اگزون ۱، ۴ و ۸ ژن ER- α به روش PCR تکثیر شد، مبتنی بر مجموعه پرایمرهایی که قبلاً توسط Hsiao و همکاران مورد استفاده قرار گرفته بود (۲۱) شامل:

اگزون ۱# با محصول ۲۵۳ نوکلئوتیدی

F 5'-GGTTTCTGAGCCTTCTGCCCTG-3'
R 5'-AGGCCGGTCTGACCGTAGA-3'

اگزون ۴# با محصول ۳۲۹ نوکلئوتیدی

F 5'-ACCTGTGTTTTTCAGGGATACGA-3'
R 5'-GCTGCGCTTCGCATTCTTAC-3'

اگزون ۸# با محصول ۲۶۵ نوکلئوتیدی

F 5'-CTGTGTCTTCCCACCTACAG-3'
R 5'-GGGTAAAATGCAGCAGGGATT-3'

PCR تا ۳۰ چرخه با مراحل زیر انجام گرفت: دناتوراسیون برای ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، آنلینگ برای ۳۰ ثانیه در ۵۸°C و سنتز DNA در ۴۰ ثانیه در ۷۲°C برای جداسازی الکتروفورزی SSCP بر روی ژل پلی اکریل آمید (۱۲٪ برای اگزون ۸ و ۸٪ برای اگزون ۱ و ۴) (۱:۲۹ آکریل آمید: بیس اکریل آمید) ابتدا در ۲۵۰ ولت به مدت ۲ ساعت و سپس با ۲۵۰ ولت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد انجام شد. اگزون های انتخاب شده ۳ و ۷ در ژن ER- β با استفاده از روش PCR، مجموعه ای از پرایمرهای های الیگونوکلئوتیدی توسط نرم افزار primer3 (V. 0.4.0) به

شرح زیر طراحی شدند:

اگزون ۳# با محصول ۱۵۱ نوکلئوتیدی

F 5'-TTGCTCCCTAGAGAGACTGA-3'
R 5'-CTTCACACGACCAGACTCCA-3'

اگزون ۷# با محصول ۱۵۶ نوکلئوتیدی

F 5'-GATGAGGGGAAATGCGTAGA-3'
R 5'-GGCCCAGCTGTGTGATTACT 3'

PCR برای ۳۰ چرخه با مراحل زیر انجام گرفت: دناتوراسیون برای ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، آنلینگ برای ۳۰ ثانیه در ۵۸°C و سنتز DNA در ۴۰ ثانیه در ۷۲°C برای جداسازی الکتروفورزی SSCP بر روی ژل پلی اکریل آمید (۱۲٪) (۱:۲۹ آکریل آمید: بیس اکریل آمید) در ۲۰۰ ولت به مدت ۲۰ ساعت و در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد انجام شد پس از انجام الکتروفورز، باندهای بر روی ژل با استفاده از نیترات نقره ۰/۱٪ رنگ آمیزی شدند. شناسایی و تایید باند غیر معمول حاصل از PCR-SSCP، پس از استخراج از ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentas # K015، آلمان) صورت گرفت و ابتدا با پرایمر مستقیم (Forward) به کمک Big dye Terminator V3.1 Cycle (Applied Biosystem Kit, Microgen Co., USA) Sequencing kit protocol،

با

(16 capillaries) ABI 3130XL

تعیین توالی شد.

جهت تایید توالی های پلی مورفیک پس از خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت استخراج PCR QIAquick (QIAGEN، ایالات متحده آمریکا) خالص شده و سپس با پرایمر معکوس (Reverse) مجدداً تعیین توالی شدند.

آنالیز آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و آزمون کای اسکوئر (χ^2) تجزیه و تحلیل شدند و نسبت شانس (OR) نیز محاسبه گردید. سطح معنی داری آزمون ها کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

نتایج

نوکلئوتیدی (SNP) در ژن ER- α فراوانی بیشتری را (۶۱/۹٪) در مقایسه با ژنوتیپ نرمال نشان دادند (۲۵/۸٪) ($P=0.001$). با این حال، همراهی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن ER- β در کدان ۳۹۲ rs1256054 (CTC \rightarrow CTG)، تأثیر تعاملی در بروز سرطان پستان (۵۴/۵٪) نشان نمی دهد (جدول ۲).

وقتی سن شروع قاعدگی در ۱۲ سالگی و زیر ۱۲ سالگی و در بالای ۱۲ سالگی به عنوان یکی از عوامل موثر در خطر ابتلا به سرطان پستان، در ژن های مختلف به طور جداگانه و با هم در نظر گرفته می شود، بیماران مبتلا با هر سه پلی مورفیسم تک

جدول ۲. مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف ژن گیرنده استروژن α -ژن (کدون های ۱۰، ۳۲۵، ۵۹۴) با توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف ژن گیرنده استروژن β (کدون ۳۹۲) برای سن شروع قاعدگی در جمعیت مورد مطالعه

نتیجه تست χ^2	مجموع فراوانی	سن شروع قاعدگی		کدون ها
		12 > فراوانی (درصد)	12 </= فراوانی (درصد)	
				۳۲۹
				۳۲۵، ۱۰، ۵۹۴
P= ۰/۰۰۱	۹۳	۶۹(۷۴/۲)	۲۴(۲۵/۸)	ژنوتیپ نرمال
	۴	-	۴(۱۰۰)	ژنوتیپ پلی مورفیسم
	۹۷	۶۹(۷۱/۱)	۲۸(۲۸/۹)	مجموع
P= ۰/۶۵۹	۴۲	۱۶(۳۸/۱)	۲۶(۶۱/۹)	ژنوتیپ نرمال
	۱۱	۵۰(۴۵/۵)	۶(۵۴/۵)	ژنوتیپ پلی مورفیسم
	۵۳	۲۱(۳۹/۶)	۳۲(۶۰/۴)	مجموع
	۱۳۵	۸۵(۶۲/۹)	۵۰(۳۷/۱)	ژنوتیپ نرمال
	۱۵	۵(۳۳/۳)	۱۰(۶۶/۷)	پلی مورفیسم
	۱۵۰	۹۰(۶۰)	۶۰(۴۰)	مجموع

^a codon 10(TCT/TCT), codon 352 (CCG/CCG) and codon 594 (ACG/ACG), genotype; ^b heterozygote genotype codon 10(TCT \rightarrow TCC), codon 352 (CCG \rightarrow CCC) and codon 594 (ACG \rightarrow ACA) and homozygote genotype codon 10 (TCC \rightarrow TCC), codon 352 (CCGC \rightarrow CCC) and codon 594 (ACA \rightarrow ACA)

۳۹۲ rs2228480(ACA / ACG) در ER- α ، با کدان هموزیگوت پلی مورفیسم ها با هم، فراوانی بسیار قابل توجهی (۷۲/۷٪) را در مقایسه با ژنوتیپ هتروزیگوت و یا

هنگامی که همه کدان ها را برای سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول با هم در نظر گرفتیم، یعنی پلی مورفیسم همه چهار کدان {سه کدان ۱۰ (TCC/TCT) rs2077647، کدان ۳۵۲ rs1801132(CCC / CCG) کدان ۵۹۴



هموزیگوت سه کدان ژن ER- α به همراه ژنوتیپ طبیعی فوق برای آن دسته از بیماران بدون سابقه فامیلی سرطان کدان ۳۹۲ (۷/۱٪) ($P=0/001$) نشان می دهد. اما نتایج پستان به دست نیامد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف ژن گیرنده استروژن α -ژن (کدون های ۱۰، ۳۲۵، ۵۹۴) با توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف ژن گیرنده استروژن β (کدون ۳۹۲) برای سابقه سرطان پستان در فامیل درجه یک در گروه مورد مطالعه

نتیجه تست χ^2	مجموع فراوانی	ندارد فراوانی (درصد)	دارد فراوانی (درصد)	سابقه سرطان پستان در فامیل درجه یک	
				کدون ها	کدون ها
				۳۲۹	۵۹۴ و ۳۲۵ و ۱۰
$P=0/001$	۹۳	۸۹(۹۵/۷)	۴(۴/۳)	ژنوتیپ نرمال	ژنوتیپ a نرمال
	۴	-	۴(۱۰۰)	ژنوتیپ پلی مورفیسم	
	۹۷	۸۹(۹۱/۸)	۸(۸/۲)	مجموع	
$P=0/001$	۴۲	۳۹(۹۲/۹)	۳(۷/۱)	ژنوتیپ نرمال	ژنوتیپ b پلی مورفیسم
	۱۱	۳(۲۷/۳)	۸(۷۲/۷)	ژنوتیپ پلی مورفیسم	
	۵۳	۴۲(۷۹/۲)	۱۱(۲۰/۸)	مجموع	
	۱۳۵	۱۲۸(۹۴/۸)	۷(۵/۲)	ژنوتیپ نرمال	مجموع
	۱۵	۳(۲۰)	۱۲(۸۰)	پلی مورفیسم	
	۱۵۰	۱۳۱(۸۷/۳)	۱۹(۱۲/۷)	مجموع	

^acodon 10(TCT/TCT), codon 352 (CCG/CCG) and codon 594 (ACG/ACG), genotype; ^b heterozygote genotype codon 10(TCT→TCC), codon 352 (CCG→CCC) and codon 594 (ACG→ACA) and homozygote genotype codon 10 (TCC→TCC), codon 352 (CCGC→CCC) and codon 594 (ACA→ACA)

نرمال (CTC / CTC) فراوانی ۷/۱٪ است، در مقایسه، زمانی که کدان ۳۹۲ در ژن ER- β گوناگونی ژنتیکی نوع ژنوتیپ (CTG / CTG و CTC / CTG) را نشان می دهد فراوانی به طور قابل توجهی بالاتر است ۶۳/۳٪ (نه برابر)، و این فراوانی شش برابر بیش از زمانی است که همه کدان های ژنوتیپ نرمال (۱۱/۸٪) دارند (جدول ۴).

برای سرطان پستان با متاستاز LN، زمانی که هر سه کدان در ژن ER- α با گوناگونی ژنتیکی، هتروزیگوت {کدان ۱۰ (TCT / TCC)، کدان ۳۵۲ (CCG / CCC)} و کدان ۵۹۴ { (ACG / ACA)} یا هموزیگوت {کدان ۱۰ (TCC / TCC)، کدان ۳۵۲ (CCC / CCC) و کدان ۵۹۴ { (ACA / ACA)} و کدان ۳۹۲ با ژنوتیپ

جدول ۴. مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف ژن گیرنده استروژن α -ژن (کدون های ۱۰، ۳۲۵، ۵۹۴) با توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف ژن گیرنده استروژن β (کدون ۳۹۲) برای متاستاز غدد لنفاوی در گروه مورد مطالعه

نتیجه تست χ^2	مجموع فراوانی	ندارد فراوانی (درصد)	دارد فراوانی (درصد)	متاستاز غدد لنفاوی کدون ها	
				۳۲۹	۵۹۴ و ۳۲۵ و ۱۰
P=۰/۰۷	۹۳	۸۲(۸۸/۲)	۱۱(۱۱/۸)	ژنوتیپ نرمال	ژنوتیپ a نرمال
	۴	۲(۵۰)	۲(۵۰)	ژنوتیپ پلی مورفیسیم	
	۹۷	۸۴(۸۶/۶)	۱۳(۱۳/۴)	مجموع	
P=۰/۰۰۱	۴۲	۳۹(۹۲/۹)	۳(۷/۱)	ژنوتیپ نرمال	ژنوتیپ b پلی مورفیسیم
	۱۱	۴(۳۶/۴)	۷(۶۳/۶)	ژنوتیپ پلی مورفیسیم	
	۵۳	۴۳(۸۱/۱)	۱۰(۱۸/۹)	مجموع	
	۱۳۵	۱۲۱(۸۹/۶)	۱۴(۱۰/۴)	ژنوتیپ نرمال	مجموع
	۱۵	۶(۴۰)	۹(۶۰)	پلی مورفیسیم	
	۱۵۰	۱۲۷(۸۴/۷)	۲۳(۱۵/۳)	مجموع	

^a codon 10(TCT/TCT), codon 352 (CCG/CCG) and codon 594 (ACG/ACG), genotype; ^b heterozygote genotype codon 10(TCT→TCC), codon 352 (CCG→CCC) and codon 594 (ACG→ACA) and homozygote genotype codon 10 (TCC→TCC), codon 352 (CCGC→CCC) and codon 594 (ACA→ACA)

برای سن شروع قاعدگی (۱۲ سالگی و زیر ۱۲ سالگی یا بالای ۱۲ سالگی)، بیماران با ژنوتیپ ترکیبی از سه نشانگر SNP (ترکیب های ۲، ۳ و ۴)، با $OR > 1$ را نشان می دهد که دقت پیش بینی ابتلا به سرطان پستان را در افرادی با سن شروع قاعدگی ۱۲ سال یا کمتر از ۱۲ سال، به ویژه برای ترکیبی از ۲ (OR: ۰/۱۱۶، CI ۰/۰۱۳-۱۰/۰۵۸، $OR > 1$) پایین است. در حالی که این نتایج نشان می دهد که ترکیبی از سه نشانگر SNP می تواند دقت پیش بینی ابتلا به سرطان پستان را در افراد با سن شروع قاعدگی بالای ۱۲ سال

خطر تخمینی چهار ترکیب ژنوتیپی متفاوت از سه نشانگر SNP در ژن ER- α برای چند عامل موثر در بیماران مبتلا به سرطان پستان در جدول ۷ مقایسه شده است، به طوری که، بیماران با ژنوتیپ ترکیبی از سه نشانگر SNP (ترکیب های ۲، ۳ و ۴)، با $OR > 1$ را نشان می دهد به ویژه برای ترکیب ژنوتیپی ۲ (OR: ۰/۱۷، CI ۰/۰۴۸۱ - ۰/۶) نتایج ما نشان داد که ترکیب ژنوتیپی از سه نشانگر SNP ممکن است دقت پیش بینی بروز سرطان پستان در طول عمر را کاهش دهد (جدول ۵).



را افزایش دهد. برای سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول، بیماران با ژنوتیپ ترکیبی از سه نشانگر SNP (۲، ۳ و ۴)، نشان داد یا OR < ۱ است، به ویژه برای ترکیبی از ۳ (OR: ۱/۵، CI: ۱/۱۴۹-۱/۹۵۹). نتایج ما نشان می‌دهد که ترکیبی از سه نشانگر SNP ممکن است دقت پیش بینی در بروز متاستاز LN را در سرطان پستان افزایش دهد. برای سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول، بیماران با ژنوتیپ ترکیبی از سه نشانگر SNP (۲، ۳ و ۴)، نشان داد یا OR < ۱ است، به ویژه برای ترکیبی از ۲ (OR: ۲/۷۲۰، CI: ۰/۴۱۱-۱۷/۹۶۶). نتایج ما نشان می‌دهد که ترکیبی از سه نشانگر SNP ممکن است دقت پیش بینی ابتلا به سرطان پستان در بستگان درجه یک را افزایش

جدول ۵. مقایسه خطر تخمین زده شده عوامل انتخابی با ژنوتیپ های ژن گیرنده استروژن- α

OR* (95%CI)	P value	خیر n=147	بلی n=150	سرطان پستان
۱/۰ (مرجع)	۰/۰۰۱	۶(٪۸۵/۷)	۱(٪۱۴/۳)	۱
۰/۱۱۶(۰/۰۱۳-۱/۰۵۸)		۱۶(٪۴۱)	۲۳(٪۵۹)	۲
۰/۱۳۳(۰/۰۱۴-۱/۲۶۴)		۱۲(٪۴۴/۴)	۱۵(٪۵۵/۶)	۳
۰/۴۴۴(۰/۰۵-۳/۹۱۴)		۵۶(٪۷۲/۷)	۲۱(٪۲۷/۳)	۴
		ندارد n=131	دارد n=19	سابقه سرطان پستان در فامیل درجه یک:
۱/۰ (مرجع)	۰/۰۰۱	۵(٪۷۱/۴)	۲(٪۲۸/۶)	۱
۲/۷۲۰(۰/۴۱۱-۱۷/۹۶۶)		۳۴(٪۸۷/۲)	۵(٪۱۲/۸)	۲
۰/۶۸(۰/۱۱۱-۴/۱۸۲)		۱۷(٪۶۳)	۱۰(٪۳۷)	۳
۱۵/۰(۱/۷۲۳-۱۲۹/۹۲۸)		۷۵(٪۹۷/۴)	۲(٪۲/۶)	۴
		خیر n=127	بلی n=23	متاستاز غدد لنفاوی:
۱/۰ (مرجع)	۰/۰۳۳	۷(٪۱۰۰)	-	۱
۱/۱۴۷(۱/۰۱۷-۱/۲۹۴)		۳۴(٪۸۷/۲)	۵(٪۱۲/۸)	۲
۱/۵(۱/۱۴۹-۱/۹۵۹)		۱۸(٪۶۶/۷)	۹(٪۳۳/۳)	۳
۱/۱۳۲(۱/۰۴۴-۱/۲۲۸)		۶۸(٪۸۸/۳)	۹(٪۱۱/۷)	۴

Codon 10: Codon 325: Codon 594.

1) TCT/TCT:CCG/CCG:ACG/ACG;

2)TCT/TCC:CCG/CCC:ACG/ACA,TCC/TCC:CCC/CCC:ACG/ACG,TCC/TCC:CCG/CCG:ACA/ACA,TCT/TCT:CCC/CCC:

ACA/ACA,CCG/

CCG:ACG/ACG:

ACA/ACA,TCT/TCT:CCC/CCC:ACG/ACG,TCC/TCC:CCG/CCG:ACG/ACG,TCT/TCT:CCG/CCC:ACA/ACA,TCT/TCC:CCG/

CCG:ACA/ACA/TCC/TCC:

CCG/CCG:ACG/ACG,TCT/TCT:CCC/CCC:ACG/ACA,TCT/TCC:CCC/CCC:ACG/ACG,TCC/TCC:CCG/CCC:ACG/

ACG;

3)TCC/TCC:CCC/CCC:ACA/ACA,TCT/TCC:CCG/CCC:ACA/ACA,TCT/TCC:CCC/CCC:ACG/ACA,TCC/TCC:CCG/CCC:ACG/ACA,TCT/

TCC:CCC/CCC:ACA/ACA,/TCC/TCC:CCG/CCC:ACA/ACA,TCC/TCC:CCC/CCC:ACG/ACA;

4)TCT/TCT:CCG/CCG:ACG/ACA,TCT/TCC:CCG/CCG:ACG/ACG,TCT/TCT:CCG/CCC:ACG/ACG,TCT/TCC:CCG/CCC:ACG/ACG,TCT/

TCC:CCG/CCG:ACG/ACA,TCT/TCT:CCG/CCC:ACG/ACA

* Odd ratio



بحث

می تواند دقت پیش بینی متاستاز LN را افزایش دهد، که این با نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده توسط Hsiao و همکاران و همچنین Ho و همکاران در جمعیت تایوان منطبق است (۲۱،۲۳). این یافته ها با هم نشان می دهد که SNP در کدان های ۱۰، ۳۲۵، ۵۹۴، ژن گیرنده استروژن β نسبت به α در ابتلا به سرطان پستان در آن دسته از بیماران با سابقه فامیلی سرطان پستان دارند و یا دارای متاستاز LN دارای تاثیر بیشتری است. اخیرا در چین موتاسیون های ژن گیرنده استروژن α مورد مطالعه قرار گرفته است و نشان داده اند که پلی مورفسم rs2228480 در کدان ۵۹۴ در این ژن به طور معناداری به تنهایی با خطر ابتلا به سرطان پستان در ارتباط است (OR= 84/0، P=0.025، 95%CI: 0.72 to 0.98) اما نقش تاملی آن با دیگر پلی مورفسم های مورد مطالعه، بررسی نشده است (۳۰-۳۱).

متاسفانه تا کنون مطالعات اندکی در زمینه اثر تاملی پلی مورفسم ها در ژن های گیرنده استروژن α و β صورت گرفته است و برای دست یافتن به نتایج کاربردی نیاز به تکرار مطالعه حاضر در جمعیت های مختلف با نمونه های بیش است.

نتیجه گیری

این اولین مطالعه تاثیر مشترک پلی مورفسم ها در این دو ژن بر روی خطر ابتلا به سرطان پستان می باشد. در مطالعه حاضر، ما متوجه شدیم که چهار پلی مورفسم ساکت تک نوکلئوتیدی در ژن های گیرنده استروژن α و β با جنبه های مختلف سرطان پستان در ایران در ارتباط است و دارای اثرات تعامل در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان با متاستاز LN و سرطان پستان فامیلی دارد. علاوه بر این، به نظر می رسد که گوناگونی در ژن β -ER در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان موثر تر است. اطلاعات ما نشان می دهد که مطالعه پلی مورفسم در ژن گیرنده استروژن ها می تواند به عنوان یک عامل تصمیم گیرنده قبل از جراحی و یک نشانگر جایگزین در پیش بینی متاستاز غدد لنفاوی در سرطان پستان می شود. علاوه بر این، تعمیم این نتایج نیاز به ارزیابی گسترده تری در استعداد ابتلا به

شواهد متعددی وجود دارد که نشان می دهد ER در ایجاد تومور غده پستانی دخیل است و در نتیجه ER ژنی است که بر استعداد ابتلا به سرطان پستان تاثیر می گذارد. پیش از این، مطالعات متعددی تاثیر مثبت پلی مورفسم ژن های α -ER و β -ER در بروز سرطان پستان را نشان داده است (۲۸-۲۲). گرچه تعداد اندکی نیز ارتباطی بین تغییرات ژنتیکی شایع در ژن α -ER با خطر ابتلا به سرطان پستان (۲۹) را گزارش نکرده اند. تفاوت های غیر قابل توضیح بین جوامع آسیایی (از جمله ایران) و غربی در نشانه های دموگرافیکی و الگوی ابتلا به سرطان پستان این سوال را مطرح می کند آیا عوامل ژنتیکی ناشناخته ای در ژنوم ایرانی ها درگیر است؟ این سوال ما را بر آن داشت که پلی مورفسم ژن های α -ER و β -ER را با روش PCR-SSCP مورد بررسی قرار دهیم. مطالعه حاضر نشان داد که هنگامی که بیمار دو پلی مورفسم همزمان دارد؛ اثرات تعاملی در سن شروع قاعدگی در زیر ۱۲- سالگی به عنوان یک عامل خطر ابتلا به سرطان پستان اثبات می کند. بیماران مبتلا به افراد با سن شروع قاعدگی زیر ۱۲- سالگی نشان داده است که فراوانی پلی مورفسم ۵۳٪ در کدان ۳۵۲ و ۴۷٪ در کدان ۵۹۴، اما بیمارانی که هر دو پلی مورفسم را (کدان های ۳۲۵ و ۵۹۴) با هم دارند، این فراوانی به طور قابل توجهی تا ۵۹٪ ($\chi^2=15/491$ ، $P=0/001$) افزایش می یابد. این افزایش در بیماران مبتلا با هر سه پلی مورفسم در ژن α -ER بسیار بیشتر است (۶۰٪/۴ ($\chi^2=14/180$ ، $P=0/001$). با این حال، افزوده شدن پلی مورفسم ژن β -ER در کدان ۳۹۲ اثر تعاملی در سن شروع قاعدگی را نشان نمی دهد (۵۵/۵۴٪). یافته های ما نشان می دهد که، SNP در کدان ۳۹۲ ژن گیرنده استروژن β از کسانی که SNP در کدان های ۱۰، ۳۲۵، ۵۹۴، ژن گیرنده استروژن α دارند، در آن دسته از بیماران با سابقه سرطان پستان در فامیل درجه یک در ابتلا به سرطان پستان موثرتر است. همچنین، در بیماران مبتلا به سرطان پستان با LN متاستاز SNP در کدان ۳۹۲ ژن گیرنده استروژن β از بیمارانی که SNP را در کدان های ۱۰، ۳۲۵، ۵۹۴، ژن گیرنده استروژن α دارند بسیار موثرتر است (۲۱). نتایج ما نشان می دهد که ترکیبی از سه نشانگر SNP



سرطان پستان در دیگر مناطق پلی مورفیسم ژن های گیرنده تک نوکلئوتیدی؛ SSCP = ساختار سه بعدی پلی مورفیسم استروژن می باشد. تک رشته.

اختصارات

تقدیر و تشکر

BMI = شاخص توده بدن ; confidence interval=CI
ESR=گیرنده استروژن؛ LN=گره های لنفاوی
PCR Odd Ratio =OR؛ واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR
RH = سیستم گروه خونی رزوس؛ SNP = پلی مورفیسم می نمایم.

References

- 1- Breast cancer facts and figures. Atlanta: American Cancer Society. Last accessed August, 2013.
- 2- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Cancer in Iran: An Epidemiological Review. *Breast J* 2007; 13: 383-391.
- 3- Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahan AJ. Breast cancer in Iran: results of a multicenter study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 24-27.
- 4- Naghavi M. Mortality views in 18 Provinces of Iran. Ministry of Health, Deputy to Health Directory, Research and development office. 2003. 75 (Persian).
- 5- Cady B. Breast cancer in the third millennium. *Breast J* 2000. 6; 280-287.
- 6- WHO Model for Cancer Control, <http://www.ispt.ro/supercourse/lecture/lec0701/020.htm>. Accessed. 2006.
- 7- Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 2002; 4:197-201.
- 8- Newman B, Mu H, Butler LM, Millikan RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population based series of American women. *JAMA* 1998; 279: 915-921.
- 9- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.
- 10- Roodi N, Bailey LR, Kao WY, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, et al. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 446-451.
- 11- Abbasi S, Azimi C, Othman F, Dalooi MRN, Ashtiani Z, Mojarad M, et al. Estrogen Receptor- α Gene Codon 10 (T392C) Polymorphism in Iranian women with Breast Cancer: a case control study. *Trends Mol Sciences* 2009; 1: 1-10.
- 12- Abbasi S, Azimi C. Genetic Polymorphisms in the Estrogen Receptor- α Gene Codon 325 (CCC/CCG) and risk of Breast Cancer Among Iranian women: a case control study. *Med J Islamic Republic of Iran* 2009; 23: 75-82.
- 13- Abbasi S, Ismail P, Othman F, Rosli R, Azimi C. Estrogen Receptor- α Gene Codon 594 (G3242A) Polymorphism among Iranian women with Breast Cancer: a case control study. *Asian J Scien Res* 2009; 2:51-60.
- 14- Abbasi S, Azimi C, Othman F, Einollahi N, Dashti N, Nabatchian F, et al. Risk Factors for Breast Cancer in Iranian Women: A Case Control Study. *Int J Cancer Res* 2009; 5; 1-11.
- 15- Abbasi S. Estrogen Receptor- Beta Gene Polymorphism in Women with Breast Cancer At the imam Khomeini Hospital complex, Iran. *MBC Med Genetics* 2010; 11: 109.
- 16- Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, Pereira D, Carrilho S, Palmeira C, et al. Analysis of estrogen receptor polymorphism



in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Breast J* 2002; 8: 226-229.

17- Iwasaki M, Hamada GS, Nishimoto IN, Netto MM, Motola J Jr, Laginha FM, et al. Isoflavine, polymorphisms in estrogen receptor genes and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians and non- Japanese Brazilians. *Official J Japan cancer Assoc* 2009; 100: 927- 933.

18- Surekha D, Sailaja K, Nageswara Rao D, Raghunadharao D, Vishnupriya S. Oestrogen receptor beta (ER-β) polymorphism and its influence on breast cancer risk. *G Gent* 2009; 88: 261-266.

19- Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Esquifino AI, Cardinali DP, et al. Melatonin, environmental light, and breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2008; 108: 339-350.

20- Kallel I, Rebai M, Rebai A. Mutations and polymorphisms of estrogens receptors genes and diseases susceptibility. *J Recept Signal Transduct Res* 2012; 32(6): 304-13

21- Hsiao WC, Young KC, Lin SL, Lin PW. Estrogen receptor-α polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R180-R186.

22- Chattopadhyay S, Siddiqui S, Akhtar MS, Najm MZ, Deo SV, Shukla NK, et al. Genetic polymorphisms of ESR1, ESR2, CYP17A1, and CYP19A1 and the risk of breast cancer: a case control study from North India. *Tumour Biol* 2014; 35(5): 4517-27.

23- Oh DS, Troester MA, Usary J, Hu Z, He X, Fan Cet al. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor positive breast cancers. *J Clin Oncol* 2006. 24; 1656-1664.

24- Azimi C, Abbasi S. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor - Gene codon325(CCC/CCG) and risk of breast cancer among Iranian women: a case control study. *Med J IRI* 2009. 23(2); 75-82

25- Kang HJ, Kim SW, Kim HJ, Ahn SJ, Bae JY, Park SK, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor-alpha gene and breast cancer risk. *Cancer Lett* 2002. 178; 175-180.

26- Ramalhinho AC, Marques J, Fonseca-Moutinho J, Breitenfeld L. Genetic polymorphisms of estrogen receptor alpha -397 PvuII (T>C) and -351 XbaI (A>G) in a portuguese population: prevalence and relation with breast cancer susceptibility. *Mol Biol Rep* 2013. 40(8); 5093-103

27- Yu KD, Rao NY, Chen AX, Fan L, Yang C, Shao ZM. A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2011. 126; 37- 45.

28- Sakoda LC, Blackston CR, Doherty JA, Ray RM, Lin MG, Gao DL, et al. Selected estrogen receptor 1 and androgen receptor gene polymorphisms in relation to risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions among Chinese women. *Cancer Epidemiol* 2011. 35; 48-55.

29- Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes. beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci* 2013;18: 1358-1372.

30- Wang Y, He Y, Qin Z, Jiang Y, Jin G, Ma H, Dai J, Chen J, Hu Z, Guan X, and Shen H. Evaluation of functional genetic variants at 6q25.1 and risk of breast cancer in a Chinese population. *Breast Cancer Res*. 2014; 16(4): 422.

31- O'Mara TA, Glubb DM, Painter JN, Cheng T, Dennis J; Australian National Endometrial Cancer Study Group (ANECs) et al. Comprehensive genetic assessment of the ESR1 locus identifies a risk region for endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(5):851-61.

