مقاله پژوهشی

فصلنامهٔ بیماری‌های پستان ایران، سال هفتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳

بررسی میزان پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 و پروتئین حاصله در زنان مبتلا به سرطان پستان در شهر یزد

رباب شیخ پور*: گروه پرستاری، دانشکده پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

شکوه تقی‌پور ظهیر: دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، گروه پاتولوژی، یزد، ایران

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است. p53 مهم‌ترین ژن سرکوبگر تومور است و پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ آن به عنوان یک عامل خطرشناخته شده است. موتاسیون ژن p53 در ۴۰-۲۰ درصد از سرطان‌های پستان دیده می‌شود. آسیب وارد بر DNA سبب فسفریلاسیون پروتئین p53 و تجمع آن در هسته سلول می‌شود. لذا هدف انجام این مطالعه، بررسی میزان پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 و بیان پروتئین p53 در زنان مبتلا به سرطان پستان در شهر یزد است.

روش بررسی: در این مطالعه شاهد- موردی، ۱۰۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۴ نمونه کنترل در شهر یزد انتخاب شدند. بعد از استخراج DNA تعیین ژنوتیپ‌های کدون ۷۲ ژن p53 با روش ARMS- PCR و میزان پروتئینp53 در تومورهای پستان با روش ایمینوهیستوشیمی بررسی شد.

یافته‌ها: درگروه بیماران مبتلا به سرطان پستان، توزیع پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ برای ژنوتیپ‌های آرژنین/آرژنین ،پرولین/پرولین و آرژنین/ پرولین به ترتیب ۴۹/۰۴، ۵ ۲۱/۱، ۱ ۲۹/۸ درصد است و در گروه کنترل به ترتیب ۲۱/۱۵، ۲۶/۹۲، ۵۱/۳۹ درصد است. تفاوت آماری معنی‌داری بین توزیع ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین و آرژنین/ پرولین ژن p53 در افراد سرطانی و کنترل دیده شد ($p< 0.05$). همچنین P53 negative در ۷۱/۵۱٪ و p53 positive در ۲۸/۸۵٪ از بیماران مشاهده شد. بنابراین تفاوت آماری معنی‌داری بین p53 positive و p53 negative مشاهده شد($P< 0.01$).

نتیجه‌گیری: نتیجه این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ Arg/Arg یک عامل ژنتیکی مستعدکننده برای ابتلا به سرطان پستان است درحالی‌که ژنوتیپ Arg/Pro نقش حفاظتی در برابر سرطان پستان دارد. همچنین تومورهای بافتی بیماران مبتلا به سرطان پستان میزان متفاوتی از پروتئین p53 را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، پلی‌مورفیسم کدون ۷۲، ژن p53.

* نشانی نویسنده پاسخگو: گروه پرستاری، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، رباب شیخ پور.

نشانی الکترونیک: R.Sheikhpour@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان است (۱ و ۲). علی‌رغم پیشرفت های چشمگیر در درمان، حدود ۲۵٪ بیماران مبتلا به سرطان پستان سالانه جان خود را به علت این بیماری از دست می‌دهند. هر سال یک میلیون مورد جدید از این بیماری تشخیص داده می‌شود (۱ و ۳). شیوع و میزان مرگ و میرسرطان پستان در نژادها و موقعیت‌های جغرافیایی مختلف متفاوت است و مکانیسم‌های مختلفی در شروع و پیشبرد آن نقش دارند. فاکتورهای محیطی متعدد، تغییرات سوماتیک مانند موتاسیون در آنکوژن‌ها، ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و پلی‌مورفیسم ژنتیکی از عوامل به وجود آورنده آن هستند (۷-۴). ژن p53 به عنوان مهم‌ترین ژن سرکوب‌کننده تومورشناخته شده است (۸) و روی کروموزوم شماره ۱۷ قرار دارد (۱۵-۹). ژن p53 یک فسفو پروتئین هسته‌ای ۵۳ کیلودالتونی۳۹۳ آمینواسیدی را کد می‌کند که عملکرد طبیعی آن محافظت از ژنوم در مقابل صدمات وارده است (۱۶). به هنگام آسیب DNA، ژن p53 در چرخه سلولی فعال شده و مانع ورود چرخه به فاز S می‌شود و از ایجاد سرطان جلوگیری می‌کند. مکانیسم عمل آن بدین طریق است که پس از آسیب DNA، پروتئین p53 به DNA متصل می‌شود و باعث تحریک ژن‌های WAF1 می‌شود. این ژن پروتئین P21 را می‌سازد که به پروتئین CDK2 می‌چسبد و اجازه ورود سلول به مرحله بعدی را نمی‌دهد و سیکل سلولی متوقف می‌شود و اجازه می‌دهد که ترمیم انجام شود (۲۰-۱۷)، در صورت عدم ترمیم، p53 با القا مرگ سلولی منجر به آپوپتوزیز سلول می‌شود و از این طریق سلول‌های کارسینوژنیک را حذف می‌نماید تا ژن-های جهش یافته به سلول‌های دختری منتقل نشوند. اگر ژن p53 آسیب ببیند و عملکردش مختل شود، سلولی که DNA آن آسیب دیده به تکثیر خود ادامه می‌دهد و سلول‌های غیرطبیعی بیشتری تولید می‌کند (۲۰ و ۲۱). مطالعات نشان دادند که موتاسیون ژن p53 در ۴۰-۲۰ درصد از سرطان‌های پستان دیده می‌شود. همچنین پروتئین p53 طبیعی دارای نیمه عمر کوتاهی است، در هسته سلول، پروتئین MDM2 به پروتئین p53 متصل می‌شود و کمپلکس MDM2-p53 پس از صدور به سیتوپلاسم توسط پروتئوزوم تجزیه می‌شود. پس از آسیب DNA، پروتئین کیناز سبب فسفریلاسیون پروتئین p53 می‌شود. در نتیجه این فسفریلاسیون، پروتئین MDM2 نمی‌تواند به پروتئین p53 متصل گردد و باعث تجمع این پروتئین در هسته سلول می‌شود (۲۲ و ۲۳) که با روش ایمینوهیستوشیمی قابل ارزیابی است (۲۴).

همچنین پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 به عنوان عاملی که تعیین‌کننده تنوع فنوتیپی افراد است می‌تواند در حساسیت افراد نسبت به سرطان و بروز سرطان نقش داشته باشد (۲۵). اخیرا بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم ژن p53 می‌تواند بر میزان بیان پروتئین p53 تاثیر بگذارد (۲۶ و ۲۷). حداقل ۳۷ پلی‌مورفیسم در این ژن کشف شده است که یکی از متداول‌ترین آنها پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ در اگزون ۴ است که در نتیجه آن ممکن است دو آلل ایجاد شود یکی آرژینین (Arg) با توالیCGC و دیگری پرولین(pro) با توالی CCC (۲۸). با توجه به امکان وجود این دو آلل سه ژنوتیپ مختلف ممکن است ایجاد شود که عبارتند از آرژنین/آرژنین، پرولین/ آرژنین و پرولین/ پرولین. توزیع این ژنوتیپ‌ها تحت تاثیر عوامل نژادی، قومی و جغرافیایی است. دو آلل کدون ۷۲ ویژگی‌های سرطان‌زایی متفاوتی دارند. بنابراین احتمالا بتوان پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ از ژن p53 را به عنوان مارکری جهت استعداد ابتلا به سرطان پستان معرفی کرد. پورفیضی و همکاران در سال ۱۳۹۰ پلی-مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 را در زنان مبتلا به سرطان در آذربایجان شرقی مورد بررسی قرار دادند و در پایان گزارش کردند که ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین در بیماران مبتلا به سرطان پستان بیشتر است (۲۹). Akkiprik و همکاران در مطالعه‌ای که در کشور ترکیه انجام دادند به این نتیجه رسیدند که درصد ژنوتیپ پرولین/پرولین و پرولین/ آرژنین در زنان دارای سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل بیشتراست (۳۰). بنابراین به نظر می‌رسد که می‌توان از پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 به عنوان مارکری جهت تعیین استعداد ابتلا به سرطان پستان نام برد. همچنین مطالعات در مورد میزان بیان پروتئین p53 در بیماران مبتلا به سرطان پستان ضد و نقیض است. Lu در مطالعه خود گزارش کرد که ۶۷/۷٪ از بیماران مبتلا به سرطانp53 positive هستند (۳۱)، درحالی‌که plesan و همکاران، p53 positive را در ۴۴/۴٪ از بیماران مبتلا

به سرطان یافتند (۱۲)، مطالعه دیگری نشان داد که میزان پروتئین p53 در بیماران مبتلا به سرطان ۵۲/۶٪ است (۳۲). لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 و بیان پروتئین حاصله در زنان مبتلا به سرطان پستان در شهر یزد است.

مواد وروش‌ها

روش انتخاب نمونه:

در این مطالعه شاهد- موردی، ۱۰۴ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۴ فرد سالم که سابقه خانوادگی ابتلا به هر گونه سرطان را نداشتند به عنوان کنترل در محدوده سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۸۹ از بیمارستان شهید صدوقی و مرتاض شهر یزد انتخاب شدند. پس از گرفتن رضایت کتبی، از آنها نمونه خون گرفته شد و بلوک‌های بافتی تومور بیماران از بخش پاتولوژی بیمارستان گرفته شد. اطلاعات آسیب‌شناسی مانند گرید، مرحله بیماری و سایز تومور از پرونده بیماران استخراج شد. مطالعه در پژوهشکده تولید مثل یزد(مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد) انجام گرفت و توسط کمیته اخلاق آن مرکز مورد تائید قرار گرفت.

روش استخراج DNA:

بعد از جمع‌آوری نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA، DNA از نمونه‌های فوق با استفاده از کیت استخراج DNA (Qiagen Hilden,Germany) در حضور پروتئیناز K استخراج و خالص‌سازی شود و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد به منظور تعیین کیفیت DNA استخراج شده، ۵ لاندا از DNA استخراج شده در ژل آگاروز ۱٪ در بافر TBE بارگذاری شد و با استفاده از نور ماورا بنفش دستگاه ژل داک(شرکت ژل نگار ایران) مشاهده شد. تعیین غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و اندازه گیری جذب نوری انجام شد.

روش ARMS-PCR:

تعیین پلی‌مورفیسم بیمار با استفاده از روش ARMS-PCR انجام گرفت. طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار الیگو انجام گرفت. دو جفت پرایمر (پرولین با اندازه ۱۷۷جفت باز و آرژنین با اندازه ۱۴۱ جفت باز) که از شرکت فزاپژوه تهران خریداری شده بود برای تعیین پلی‌مورفیسم کدون۷۲ ژن p53 به کار برده شد. واکنش ARMS-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (۱میکرولیتر از پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر از پرایمر Reverse، ۱۲/۵میکرولیتر Master Mix Red Taq DNA Polymerase (شامل بافر، مخلوط DNTP، کلرید منیزیوم) شرکت Ampliqon دانمارک، ۵ میکرولیتر DNA و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر انجام شد.

توالی پرایمر های اختصاصی برای تکثیر پرولین با اندازه ۱۷۷ جفت باز

F: 5'- GCCAGAGGCTGCTCCCCC
R: 5'- CGTGCAAGTCACAGACTT

توالی پرایمر های اختصاصی برای تکثیر آرژنین با اندازه ۱۴۱ جفت باز

F: 5'- TCCCCCTTGCCGTCCCAA
R: 5'-CTGGTGCAGGGGCCACGC

تنظیم دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر توالی پلی‌موفیسم کدون ۷۲ ژن p53 به ترتیب ذیل انجام گرفت.

مرحله اول: دناتوراسیون ابتدایی با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه.

مرحله دوم: شامل ۳۵ سیکل است و از ۳ بخش تشکیل شده است.

۱- دناتوراسیون با دمای دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت زمان ۳۰ ثانیه.

۲- جفت شدن پرایمر یا annealing با دمای ۵۵ درجه برای مدت زمان ۳۰ ثانیه برای پرولین و۶۰ درجه سانتیگراد برای آرژنین.

۳- Extention با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت زمان ۴۵ ثانیه.

مرحله سوم: تکثیر نهایی قطعه مورد نظر با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت زمان ۱ دقیقه.

سپس در مرحله بعد ۵ میکرولیتر محصول PCR با استفاده از ژل ۲٪ آگاروز (۲ گرم در ۱۰۰ سی‌سی TBE) در الکتروفورزجداسازی شد و سپس باندها با استفاده از نور (Gel Digidoc II; Qiagen, Valencia, CA; UV Iran شرکت ژل نگار تهران- ایران مشاهده شدند.

روش ایمینوهیستوشیمی:

برای بررسی میزان پروتئین p53 در تومورهای بافتی پستان از روش ایمینوهیستوشیمی استفاده شد. روش انجام کار به این طریق بود که در بیمارستان تومورهای سرطانی پستان بعد از جراحی در فرمالین نگه داری شدند، سپس نمونه‌ها برای انجام عمل فیکساتیو برای چندین ساعت در دستگاه Tissue processor قرار گرفتند. بعد از فرایند فیکساتیو، عمل بلوک‌گیری انجام شد و مطالعه بر روی بلوک‌های پارافینه شده انجام شد. و نمونه‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر برش زده شدند، بعد از قرارگیری نمونه بر روی لام پلی الایزین دار، عملیات پارافین‌زدایی انجام شد و سپس عمل آب‌گیری از نمونه با گرادیانتی از غلظت الکل‌ها بر روی نمونه انجام شد. در ادامه، برای بازیابی آنتی‌ژن، لام‌ها برای مدت زمان ۱۵ دقیقه در محلول سیترات بافر در دمای ۹۸درجه سانتیگراد قرار گرفتند، بعد از شستشو و مهار پراکسیداز اندوژنوس با محلول ۳٪ پراکسید هیدروژن در متانول و مهارواکنش زمینه، از آنتی‌بادی اولیه آنتیp53 (Leica, DO7 England) و سپس بعد از سه بار شستشو از آنتی بادی ثانویه,Sheep anti mouse-Ig (HRP) (Ebnesina, Tehran) استفاده شد. بعد از شستشو و انکوباسیون با محلول سوبسترای پراکسیداز(DAB)، عمل آب‌گیری، شفاف‌سازی و چسباندن لامل انجام می‌شود و لام‌ها زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی 100x مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از یک نمونه به عنوان کنترل منفی استفاده شد که در آن به جای آنتی‌بادی اولیه از سرم استفاده شد.

Scoring:

رنگ‌آمیزی بین صفر تا ۵ درصد: No staining

رنگ‌آمیزی بین ۵ تا ۲۵ درصد : Weak staining

رنگ‌آمیزی زیر ۲۵ درصد: p53 negative

رنگ‌آمیزی بین ۲۵ تا ۵۰ درصد :Moderate staining

رنگ‌آمیزی بالای ۵۰ درصد: Strong staining

رنگ‌آمیزی بالای ۲۵ درصد: p53 positive

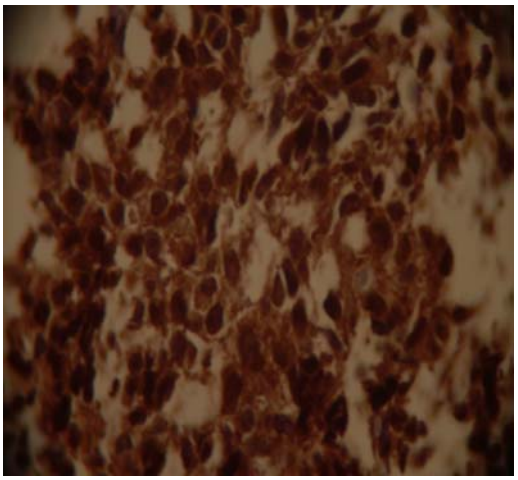
تجزیه وتحلیل داده‌ها

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 انجام گرفت و آزمون Chi-Square test(χ^2 test) برای مقایسه ژنوتیپ‌ها بین افراد کنترل و سرطانی و مقایسه p53 positive و p53 negative به کار برده شد. نسبت شانسOdd Ratio (احتمال رویداد بیماری سرطان پستان به عدم رویداد این بیماری) و سطح اطمینان ۹۵٪ برای تعیین رابطه بین متغیر مستقل و وابسته به کار برده شد.

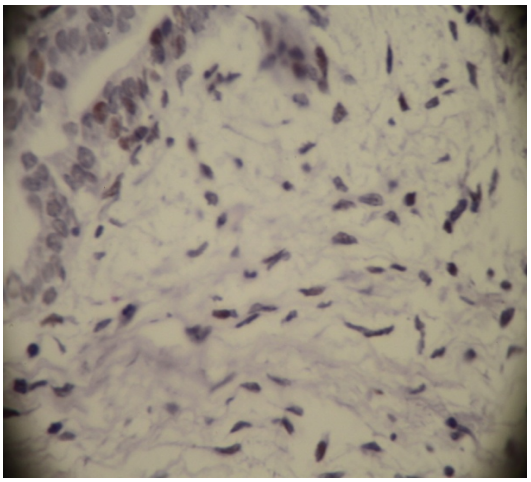
یافته‌ها

میانگین سن بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل به ترتیب ۹/۵±۴۴ و ۸/۸±۴۵/۶ است. اندازه متوسط تومور Cm ۱/۵۶±۳/۳۷ است و نمونه‌های توموری از نوع کارسینومای مهاجم مجرایی انتخاب شدند. تعیین گرید (grade) و مرحله (Stage) بیماران توسط پاتولوژیست انجام گرفت. گرید بیماران مبتلا به سرطان به ۳ گروه تقسیم شد. گرید۱ (۱۷/۳٪)، گرید۲ (۵۹/۶۱٪) و گرید۳ (۲۳/۰۷٪). همچنین بیماران سرطانی از نظر مرحله به ۵ گروه تقسیم شدند (0: ۵/۷۶٪، IIA ۴۶/۱٪، IB: ۳/۸٪، IIB: ۲۸/۸۴٪، III: ۱۵/۳۸٪). برای ارزیابی میزان پروتئین p53 در تومورهای بافتی پستان، لام‌های رنگ-آمیزی شده با آنتی‌بادی با استفاده میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی 100x مورد بررسی قرار گرفتند و به ۴ گروه تقسیم شدند. الف: رنگ‌آمیزی ضعیف، ب: رنگ‌آمیزی شدید، ج: رنگ‌آمیزی متوسط، د: بدون رنگ‌آمیزی. شکل ۱ رنگ‌آمیزی پروتئین p53 را در تومورهای بافتی پستان افراد مبتلا به سرطان پستان نشان می‌دهد.

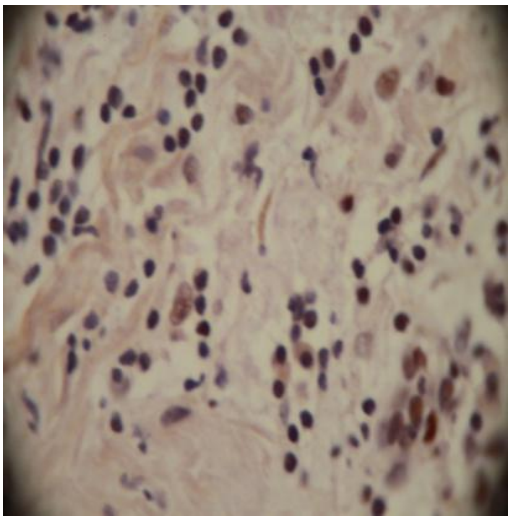
جدول ۱ تعداد و درصد بیماران سرطانی را بر حسب میزان رنگ‌آمیزی پروتئین نشان می‌دهد.



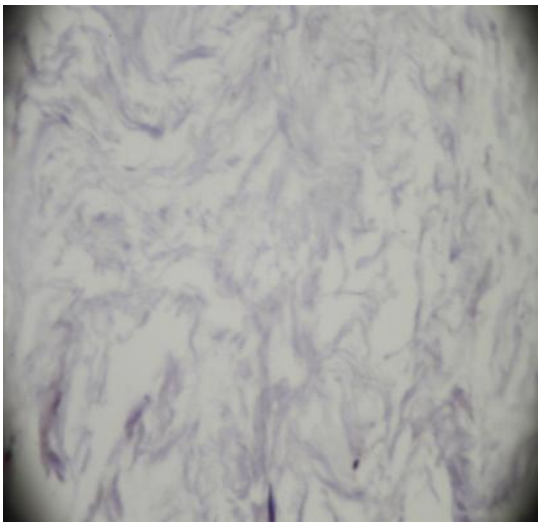
الف) رنگ‌آمیزی ضعیف



ب) رنگ‌آمیزی شدید



ج) رنگ‌آمیزی متوسط



د) بدون رنگ‌آمیزی

جدول ۱: تعداد و درصد رنگ‌آمیزی پروتئین p53 در تومورهای بافتی افراد مبتلا به سرطان پستان

رنگ‌آمیزی پروتئین p53	(p53 Negative or Positive)	تعداد(درصد)	Test square- Chi P-value
بدون رنگ‌آمیزی	Negative	۴۶(۴۴/۲۳)	0.001
رنگ‌آمیزی ضعیف	Negative	۲۸(۲۶/۹۲)	
رنگ‌آمیزی متوسط	Positive	۱۶ (۱۵/۳۸)	
رنگ‌آمیزی شدید	Positive	۱۴(۱۳/۴۷)	

نتایج این جدول نشان می‌دهد که ۴۶ (۴۴/۲۳٪) تومور بافتی پستان بدون رنگ آمیزی، ۲۸ تومور (۲۶/۹۲٪) رنگ‌آمیزی ضعیف، ۱۶ تومور (۱۵/۳۸٪) رنگ‌آمیزی متوسط و ۱۴ تومور (۱۳/۴۷٪) رنگ‌آمیزی شدید داشتند. رنگ‌آمیزی ضعیف و بدون رنگ‌آمیزی به عنوان p53 منفی در نظر گرفته شدند و رنگ‌آمیزی متوسط و شدید به عنوان رنگ‌آمیزی مثبت در نظر گرفته شدند. بنابراین از لحاظ میزان پروتئین p53 در نمونه‌های تومور بیماران مبتلا به سرطان پستان، ۷۴ بیمار (۷۱/۱۵٪) p53 منفی (رنگ‌آمیزی کمتر از ۲۵٪) و ۳۰ بیمار (۲۸/۸۵٪) p53 مثبت (رنگ‌آمیزی بیش از ۲۵٪) هستند و تفاوت آماری معنی‌داری بین میزان p53 positive و p53 negative مشاهده شد ($P<0.01$).

در این مطالعه، برای مشخص نمودن پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آلل پرولین و آرژنین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت و آلل پرولین با اندازه ۱۷۷ جفت باز وآلل آرژنین با ۱۴۱ جفت باز به‌طور اختصاصی مشخص شد. شکل ۲ آلل آرژنین وپرولین را در ژل اگاروز نشان می‌دهد.

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد فراوانی ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین در بیماران مبتلا به سرطان ۴۹/۰۳٪ و در افراد سالم ۲۱/۱٪ است و تفاوت معنی‌دار آماری از نظر ژنوتیپی در دو گروه دیده شد (P =0.001, CI = 0.63-0.8, OR= 3.7)، با توجه به نتایج این مطالعه، شانس ابتلا به سرطان پستان در افراد با ژنوتیپ Arg/Arg، 3.7 برابر افراد سالم است.

فراوانی ژنوتیپ پرولین/ پرولین در بیماران مبتلابه سرطان ۲۱/۱٪ و در افراد سالم ۲۶/۹٪ است و تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه دیده نشد (CI=0.81- 0.72 P=0.2, 0.98, OR=). فراوانی افراد هتروزیگوت آرژنین/ پرولین در افراد سرطانی ۲۹/۸٪ در افراد سالم ۵۱/۹٪ است و تفاوت معنی‌داری از نظر ژنوتیپی در دوگروه دیده شد.

(P=0.013, CI =0.71-0.87, OR=0.38). میزان شانس ابتلا، در افراد با ژنوتیپ Arg/pro ۰/۳۸ افراد سالم است. جدول ۲ توزیع فراوانی ژنوتیپی کدون ۷۲ ژن p53 افراد سرطانی و کنترل را نشان می دهد.

شکل ۲: آلل پرولین و آرژنین بر روی ژل الکتروفورز - سمت چپ: مارکر bp ۱۰۰، لاین ۴،۲: آرژنین، لاین ۵: پرولین

جدول۲: توزیع فراوانی ژنوتیپ بیماران سرطانی و کنترل

ژنوتیپ	بیماران سرطانی	کنترل	Chi-Square Test	(OR) (CI 95%)
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	P-value	
Arg/Arg	۵۱ (۴۹/۰۴٪)	۲۲ (۲۱/۱۵٪)	P<0.01	۳/۷(۰/۶۳-۰/۸)
Pro/Pro	۲۲ (۲۱/۱۵٪)	۲۸ (۲۶/۹۲٪)	P>0.05	۰/۷۲(۰/۸۱-۰/۹۸)
Arg/Pro	۳۱ (۲۹/۸۱٪)	۵۴ (۵۱/۹۳٪)	P<0.05	۰/۳۸(۰/۷۱-۰/۸۷)

بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در زنان است. تغییرات مولکولی از جمله پلی‌مورفیسم ژنی با رشد و توسعه این بیماری ارتباط دارد (۳۳ و ۳۴). وجود یک Single Nucleotide polymorphism (SNP) در اگزون ۴ ژن P53 باعث حضور آرژنین یا پرولین در کدون ۷۲ می‌شود (۲۷ و ۳۴). این پلی‌مورفیسم ژنتیکی (عامل تفاوت افراد در صفات منحصر به فرد) می‌تواند بیان‌کننده تفاوت افراد در میزان بروز سرطان باشد. نتایج به دست آمده از مطالعات بسیاری از محققان در رابطه با نقش پلی‌مورفیسم آرژنین و پرولین در استعداد ابتلا به سرطان نتایج ضد و نقیضی است. Toyama و Huang در دو مطالعه جداگانه که در کشور ژاپن انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که شانس ابتلا به سرطان پستان در افراد با ژنوتیپ پرولین/ پرولین بیشتر از آرژنین/ آرژنین است(۳۴ و ۳۵) ولی Alawad در مطالعه دیگری که بر روی زنان عرب انجام داد به این نتیجه رسید که شانس ابتلا به سرطان پستان در زنان با ژنوتیپ پرولین/ پرولین کمتر است (۳۶). Buyru و همکاران در مطالعه‌ای که در کشور ترکیه انجام دادند به این نتیجه رسیدند که شانس ابتلا به سرطان پستان در افراد با ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین بیشتر است (۳۷). Akkiprik و همکاران در مطالعه‌ای که در کشور ترکیه انجام دادند این نتیجه را گزارش کردند که درصد ژنوتیپ پرولین/ پرولین وپرولین/ آرژنین در زنان دارای سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل بیشتراست (۳۰). در مطالعه دیگری Hou و همکاران گزارش کردند که تغییرات ژنوتیپی کدون ۷۲ ژن p53 ارتباطی به سرطان پستان ندارد (۳۸). دیهیمی در مطالعه دیگری در شهر اصفهان به بررسی پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 در نمونه‌های سرطانی و کنترل پرداخت و مشاهده کرد که بین تغییرات پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 در گروه کنترل و سالم تفاوتی وجود ندارد (۳۹). فغانی و همکاران، مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به سرطان در اصفهان انجام دادند و گزارش کردند که ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین می‌تواند به‌عنوان یک ریسک فاکتور برای سرطان باشد (۲۱). پورفیضی در سال ۱۳۹۰ پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 را در زنان مبتلا به سرطان در آذربایجان شرقی مورد بررسی قرار دادند و در پایان گزارش کردند که ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین در بیماران مبتلا به سرطان پستان بیشتر است (۲۹) که با مطالعه ما همخوانی دارد. بنابراین به نظر می‌رسد ارتباط بین پلی‌مورفیسم کدون۷۲ ژن p53 و سرطان پستان تحت تاثیر عواملی چون تفاوت در تعداد نمونه، تفاوت‌های نژادی، تغییرات جغرافیایی، وضعیت موتاسیونی ژن p53 در تومورها و تفاوت در حساسیت ژنتیکی نسبت به عوامل محیطی است (۲۷).

مطالعه دیگری نشان داد که پلی‌مورفیسم این ژن در نژادهای مختلف حتی در مناطق مختلف یک کشور هم یکسان نیست و گزارش کرد که هردو نوع آلل آرژنین و پرولین از نظر مورفولوژی طبیعی هستند و از نظر توانایی برای اتصال به توالی خاص از DNA تفاوتی ندارند. اما دو ژنوتیپ p53 تفاوت‌هایی از نظر توانایی اتصال به ترکیباتی از ماشین رونویسی، فعال کردن نسخه‌برداری و القا آپوپتوزیز دارند (۲۶). مطالعات بسیاری از محققان نشان دادکه ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین با رشد سریع‌تر تومور و خصوصیت مهاجمی‌تر بودن آن ارتباط دارد (۲۱) و نیز توانایی موثرتری از آلل پرولین در القا آپوپتوزیز دارد (۲۱ و ۲۶). همچنین مطالعات نشان دادند جهش در ژن p53 سبب ایجاد پروتئین موتانت یافته‌ای می‌شود که پایداری بیشتری نسبت به پروتئین طبیعی دارد و با تکنیک ایمینوهیستوشیمی قابل ارزیابی است (۳۰ و ۳۱). در این مطالعه از DO7 برای رنگ‌آمیزی پروتئین p53 استفاده شد و نتایج رنگ‌آمیزی نشان داد که ۲۸/۸٪ از بیماران p53 postive و ۷۱/۱٪ از بیماران p53 Negative هستند. بنابراین در این مطالعه تعداد بیماران با p53 negative بیشتر از p53 positive است. در حالی‌که plesan و همکاران، p53 positive را در ۴۴/۴٪ از بیماران مبتلا به سرطان یافتند (۱۲). در مطالعه Lu و همکاران ۶۷/۷٪ از بیماران p53 positive بودند (۳۱)، عمادیان و همکاران هم p53 positive را در ۵۲/۶٪ از بیماران یافتند (۳۲). بنابراین مطالعات انجام گرفته توسط محققان بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان حاکی از متفاوت بودن میزان پروتئین p53 در تومورهای بافتی پستان است. به نظر می‌رسد یکی از دلائل مربوطه، تفاوت-های ژنتیکی باشد (۳۰). همچنین عامل دیگری مانند آستانه مثبت (threshold of p53 positive) می‌تواند دلیل این تفاوت‌ها باشد (۳۱). Breen و همکاران گزارش کردند که افزایش میزان پروتئین p53 همراه با پیش‌آگهی ضعیف بیماران است. همچنین آنها گزارش کردند که بیان

زیاد پروتئین p53 سبب افزایش مقاومت سلول‌ها به انواعی از داروها در درمان سرطان پستان می‌شود (۱۳). مطالعات دیگر افزایش بیان پروتئین p53 را با بدخیم بودن وضعیت بیماری مرتبط دانستند (۳۱).

Kandioler-Eckersberger و همکاران طی مطالعه‌ای که بر روی زنان مبتلا به سرطان پستان انجام دادند گزارش کردند که جهش در ژن p53 و بیان بیش از حد پروتئین p53 با پاسخ به شیمی‌درمانی همراه است (۴۰). اگرچه اثر دقیق تغییرات کدون ۷۲ ژن p53 بر عملکرد پروتئین p53 کاملا مشخص نیست اما Lee گزارش کرد که جهش در کدون ۷۲ ژن p53 می‌تواند سبب تغییر بیان پروتئین p53 شود (۴۱).

نتیجه‌گیری

نتیجه این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ Arg/Arg یک عامل ژنتیکی مستعدکننده برای ابتلا به سرطان پستان است درحالی‌که ژنوتیپ Arg/Pro نقش حفاظتی در برابر سرطان پستان دارد. همچنین تومورهای بافتی بیماران مبتلا به سرطان پستان میزان متفاوتی از پروتئین p53 را نشان دادند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، ارتباط پروتئین p53 با مارکرهایی مانند Ki67, Her-2 و استروئید رسپتورها در تومورهای بافتی پستان مورد بررسی قرار گیرد.

References

1. Wang YA, Johnson SK, Brown BL, Carragher LM, Sakkaf KL, Royds JA. Dobson P.R.M. Enhanced anti-cancer effect of a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor and doxorubicin on human breast epithelial cell lines with different p53 and oestrogen receptor status. Int. J. Cancer 2008; 123: 1536–44.
2. Warson M, Chaunhan P, Singh LC. Association of DNA repair and cell cycle gene variation with breast cancer risk in nirdest Indian population.a multiple interation analysis. Tumor Biol 2014.
3. Richie R.C, Swanson J. O. Breast Cancer: A Review of the Literature. J Insur Med 2003; 35:85–101.
4. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M, Furuwatari C, Yagi A, Yamagami O. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Breast J 2007; 13(4):383-91.
5. Sheikhpour R, Mohiti Ardekani J. The effect of progesterone on p53 protein in T47D cell line. J Urmia Uni Med Sci. 2014; 25(10): 954-960
6. Vojtesek B, Lane D.P. Regulation of p53 protein expression in human breast cancer cell lines. J Cell Sci 1993;105: 607-12.
7. Lakhani SR, Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, Douglas F. The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and p53 in Patients with Mutations in BRCA1 and BRCA2. J Clin Oncol 2002; 20 (9): 2310-8.
8. Jing Hou, Yuan Jiang, Wenru Tang, Shuting Jia. p53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis. Exp therapeu Med 2013; 5(6): 1397-402.
9. Peterson LF, Mitrikeska E, Giannola D, LuiY, Sun H, Bixby D, Malek SN, DonatoNJ, Wang S, Talpaz M. p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. Leukemia 2011; 1–9.
10. Bergh J. Clinical studies of p53 in treatment and benefit of breast cancer patients. EndocrRelatCanc 1999; 6: 51-9.
11. Jean F, Simpson L, David L. The p53 Tumor Suppressor Gene in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. Am J Pathol 2000; 156(1): 5-6.
12. Plesan D, Valentina Georgescu, Patrana N, Plesan C, Stoica D. Immunohistochemical study of p53 and Ki67 in a group of patients with mammary carcinoma. Rom J MorpholEmbryol 2010; 51(3):459–65.

13. Breen L, Reen, Heenan M, Amberger-Murphy V, Clynes M. Investigation of the Role of p53 in Chemotherapy Resistance of Lung Cancer Cell Lines. Anticancer Res 2007; 27: 1361-4.

14. Goldschneider D, Horvilleur E, Fran L, Plassa C, Guillaud- Bataille M, Million K, Wittmer-Dupret E, Danglot G, The´ H, Be´nard J, May E, Douc -Rasy S. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. Nucleic Acids Res 2006; 34 (19): 5603–12.

15. Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. Eur J Canc 2003; 39: 447–53.

16. Dahabreh I. J, Schmid C. H, Lau J, Varvarigou V, Murray S. Genotype Misclassification in Genetic Association Studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) Polymorphism: A Systematic Review of Studies of Breast, Lung, Colorectal, Ovarian and Endometrial Cancer. Am J Epidemiol 2013; 31(5):100.

17. Cerrato JA, Yung WK, Liu TJ. Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53–induced apoptosis. NeuroOncol 2001; 3(2):113-22.

18. Ageenko A.I, Erkhov V.S, Cherniaev L.V, Volkova L. A possible role of phosphoprotein p53 in the mechanism of autostimulation of tumor cell proliferation. EkspOnkol 1989; 12(1):35-7.

19. Kerns BJ, Jordan PA, Moore MH, Humphrey PA, Berchuck A, Kohler ME, Bast RC, Dirkiglehart R, Marks JR. p53 Overexpression in Formalin- fixed, Paraffin- embedded Tissue Detected by Immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 1992; 40(7):1047-51.

20. Gu J, Spitz M.R, Zhao H, Lin J, Grossman H.B, Dinney C. P, Wu X. Roles of tumor suppressor and telomere maintenance genes in cancer and aging an epidemiological study. Carcinogenesis 2005; 26 (10): 1741-7.

21. Faghani M, Nikbahkt M, Salehi M, Rabbani M, Talebi A, Soleimani B, Faghihi M. Genetic predisposing of p53 codon 72 on developing of breast cancer on postmenopausal women in sfahan. J gilan Univ Med Sci 2009; 17(67):94-100.

22. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of p53 protein expression in breast cancer; An immunohistochemical analysis of frozen section in 514 Japanese women. Breast Canc 2001; 8(3): 194-202.

23. Gaiger de oliveria M, Lauxen I, Cecilia Moraeschaves A. Immunohistochemical analysis of the pattern of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesion. Med Oral patol oral cirbucal 2008; 13(5):275-80.

24. Pang B, Sun Sh, Gao L Zhu R. A single nucleotide polymorphism in PIK3CA gene is inversely associated with p53 protein expression in breast cancer. Med Oncol 2014; 31: 30.

25. Mar Axelrod DE, Shah K, Yang O, Haffty BG. Prognosis for Survival of Young Women with Breast Cancer by Quantitative p53 Immunohistochemistry. Canc Clin Oncol 2012: 1(1): 52-65.

26. Doosti A, Zamani M, Ghasemi Dehkordi P, Davoudi N. Association of the p53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in South West of Iran . Cientif ic Research and Essays 2011; 6(15):3148-52.

27. Dastjerdi MN. TP53 codon 72 polymorphism and p53 overexpression in colorectal cancer specimens in Isfahan. Acta Med Iran 2011; 49(2): 7-11.

28. Petrolini De Oliveira L, López L, et al. Association of the p53 codon 72 polymorphism with clinicopathological characteristics of colorectal cancer through mRNA analysis. Oncology Report 2014; 31(3): 1396-406.

29. Hossein Pour Feizi M.A, Ravanbakhsh Gavgani R. Pourahmad R, Pouladi N, Azarfam P, Montazeri V. Association of p53 Arg/Pro Polymorphism at Codon 72 with Risk of Breast Cancer in East Azerbaijani Women. J Babol Univ Med Sci 2011; 14(2): 30-8.

30. Akkiprik M, Sonmez O, Gulluoglu BM, Caglar HB, Kaya H, Demirkalem P, Abacioglu U, Sengoz M, Sav A, Ozer A. Analysis of p53 gene polymorphisms and

protein over- expression in patients with breast cancer. Pathol Oncol Res 2009; 15(3):359-68.

31. Lu M.L, Wikman F, Orntoft T.F, et al. Impact of Alterations Affecting the p53 Pathway in Bladder Cancer on Clinical Outcome, Assessed by Conventional and Array-based Methods. Clin Canc Res 2002; 8: 171-9.

32. Emadian O, Naghshvar F, Torabizade J, et al. Determining the expression of p53 and HER2 with the related factors in prognosis of gastric carcinoma by Immunohistochemistry. J Mazandaran Univ Med Sci 2011; 21(86): 9-16.

33. Rybárová S, Vecanová J, Hodorová I, Mihalik J, Čižmáriková M, Mojžiš J, Solár P. Association between polymorphisms of XRCC1, p53 and MDR1 genes, the expression of their protein products and prognostic significance in human breast cancer. Med Sci Monit 2011; 17(12): 354-63.

34. Toyama T, Zhang Z, Nishio M, Hamaguchi M, Kondo N, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. Breast Cancer Res 2007; 9(3): 34.

35. Huang XE, Hamajima N, Katsuda N, Matsuo K, Hirose K, et al. Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer. Breast Cancer 2003;10(4):307-11.

36. Alawadi S, Ghabreau L, Alsaleh M, Abdulaziz Z, Rafeek M, Akil N, Alkhalaf M. P53 gene polymorphisms and breast cancer risk in Arab women. Med Oncol 2011; 28(3):709-15.

37. Buyru N, Tigli H, Dalay N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. Oncol Rep 2003; 10(3):711-4.

38. Hou J, Jiang Y, Tang W, Jia S. p53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis. ExpTher Med 2013; 5(5):1397-402.

39. Deyhimi P, Nikbakht Dastjerdi M, Morsali F, Kazemi Sh. Investigation of p53 codon72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma (SCC) specimens and normal population by PCR. J Tehran Univ Med Sci 2008; 21(1): 59-65.

40. Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlböck M, Gnant M, Steger G, Jakesz R. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. Clin Cancer Res 2000; 6(1):50-6.

41. Lee J, Tung Shun Ch, Tsang Wu M, Yen Chen Y. The associations of p53 overexpression with p53 codon 72 genetic polymorphism in esophageal cancer. Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2006; 594: 181-8.