

## ارتباط چندشکلی های FOK1 و BSMI گیرنده‌ی ویتامین D با سرطان پستان در زنان شهرستان ارومیه

ساسان تالانه<sup>۱</sup>، فرخ قوام<sup>۲</sup>، ابراهیم مغیثی<sup>۳</sup>، امید اثنی‌عشری<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۸/۰۶

## چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جوامع بوده و یک‌سوم کلیه سرطان‌ها را در زنان به خود اختصاص می‌دهد. ویتامین D و متابولیت‌های آن نه‌تنها برای متابولیسم استخوان‌ها و عملکرد کلسیم ضروری است بلکه کاهش سنتز و تولید این ویتامین باعث بروز و شدت یافتن سرطان‌هایی از جمله پستان و تخمدان و کلون را نیز به دنبال دارد. ما در این تحقیق به بررسی ارتباط آنزیم‌های برشی FOK1 و BSMI با بیماری سرطان سینه می‌پردازیم. **مواد و روش کار:** جامعه‌ی آماری ما در این تحقیق شامل ۱۸۰ زن (۹۰ زن بیمار و ۹۰ زن سالم) می‌باشد، استخراج DNA به کمک روش نمکی انجام گرفت. در مرحله‌ی بعدی پرایمرهای طراحی‌شده با کمک PCR به‌توالی مکمل خود اتصال پیدا کردند و در مرحله‌ی آخر به کمک روش RFLP، آنزیم‌های برشی محل‌های مشخص را بر روی توالی DNA برش داده و در نهایت داده‌ها توسط SPSSV23 و مجذور کای و t-Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **یافته‌ها:** در مقایسه پلی‌مورفیسم‌ها تراکم ژنوتیپ‌ها ی به‌دست‌آمده از هر دو گروه بیمار و شاهد هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P=0/422$ ). هم‌چنین بین این ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری در سن ابتلا ( $P=0/19$ ) و سرعت پیشرفت بیمار ( $P=0/65$ ) مشاهده نشد در هر دو گروه بین متغیرهای سن و شیردهی و سن اولین حاملگی ارتباط معنی‌داری نشان داده شد ( $p<0/05$ ) هم‌چنین بین مصرف قرص ضدبارداری با بروز بیماری ارتباط وجود داشت ( $p>0/005$ ). **بحث و نتیجه‌گیری:** با در نظر نقش گیرنده‌های ویتامین D در تنظیم چرخه‌ی سیکل‌های سلولی و در کل سیستم ایمنی بدن در بیماری سرطان سینه نیاز به بررسی سایر پلی‌مورفیسم‌های این ژن با بیماری سرطان سینه پیشنهاد می‌شود **کلیدواژه‌ها:** سرطان پستان - گیرنده‌های ویتامین D - پلی‌مورفیسم - آنزیم برش دهنده

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره نهم، ص ۷۶۱-۷۵۳، آذر ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی اهر، دانشکده‌ی تحصیلات تکمیلی، گروه زیست‌شناسی، تلفن ۰۹۰۱۸۷۰۸۴۸۷

Email: sasantalaneh@gmail.com

## مقدمه

می‌باشد (۳). ویتامین D برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ در روغن کبد ماهی Cod شناسایی شد (۴) این ویتامین جزء هورمون‌های پرورستروئیدی می‌باشد که به علت داشتن فعالیت‌های مهاری در پیشگیری از وقوع سرطان سینه نقش مهمی بر عهده دارد. جایگاه این ویتامین در بدن در داخل پوست می‌باشد و در اثر تماس با اشعه‌ی ماورای بنفش محیطی در بدن تولید می‌شود. هم‌چنین می‌توان این ویتامین را تحت عنوان مواد غذایی حیوانی مثل ماهی‌ها و یا شیر و حتی مکمل‌های رژیم غذایی به بدن وارد کرد (۵). هر سیکل سلولی شامل ۵ فاز G0, G1, S, G2, M می‌باشد که ترکیبات ویتامین D با تأثیرگذاری مستقیم بر این سیستم‌های

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان می‌باشد که حدود ۲۲۵ از کل انواع سرطان‌ها را به خود اختصاص داده است (۱). عوامل محیطی و ژنتیکی زیادی با این بیماری در ارتباط است به‌طوری‌که نقش عوامل ژنتیکی نسبت به عوامل محیطی بیشتر به چشم می‌آید. به‌عنوان مثال در خانواده‌های که یک یا بیش از یک خویشاوند مبتلا به سرطان پستان داشته باشد به‌ترتیب ۳ و ۱۰ برابر خطر ابتلا به این سرطان در آن خانواده افزایش پیدا می‌کند (۲) هم‌چنین میزان خطر بروز سرطان در زنان تا سن ۸۰ سالگی در صورت نداشتن هیچ خویشاوند مبتلا به سرطان سینه ۷/۸ درصد

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> دکتری تخصصی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، متخصص دستگاه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۴</sup> استادیار، متخصص انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

مسئول اتصال به فرم فعال ویتامین D یعنی  $1,25(OH)_2D_3$  می‌باشد (۱۱) پلی مورفیسیم FOK1 جز یکی از پلی مورفیسیم‌های جایگاه VDR می‌باشد. این ژن متعدد دیگری مثل TRU9I و Bsm1 و Apa1 و Taq1 می‌باشد. زمانی که چندشکلی FOK1 تحت آنزیم‌های محدود الاثر قرار گرفت باعث تغییر در نوکلئوتید T به A در اینترون شماره‌ی ۸ می‌شود (۱۲).

### مواد و روش کار

جامعه آماری مورد نظر در این پژوهش شامل ۱۸۰ زن (۹۰ کنترل و ۹۰ بیمار) بین سنین ۳۶-۴۸ سال می‌باشد که با توجه به معیارهای ورود و خروج از جامعه آماری به دو گروه کنترل و بیمار مبتلا به سرطان سینه تقسیم‌بندی می‌شود و از هر دو گروه شرکت کننده فرم رضایت نامه‌ی کتبی دریافت گردیده است. از هر زن به میزان ۵ میلی لیتر خون گرفته می‌شود که ۳ میلی لیتر خونان به یک لوله حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA جهت استخراج DNA منتقل می‌شود و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

در این مطالعه نمونه‌های DNA ژنومی طبق روش نمکی جدا گردید (برزگر و همکاران). ۳ میلی لیتر از خون با ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده سرد تریتیون با تکان‌های شدید با محلول بافر لیز کننده به‌خوبی مخلوط شد. پس از خاتمه آخرین مرحله محلول رویی دور ریخته شد و توده حاوی گلبول‌های سفید باقیمانده با ۱ میلی لیتر آب مقطر سرد (اتوکلاو شده) شست‌وشو داده شد سپس محتویات لوله به یک پلیت اضافه شده و با پروتئین کیناز K در دمای  $56^{\circ}C$  انکوبه شده NaCl غلیظ جهت نمکی اضافه شد. سانتریفوژ انجام و محلول رویی با اتانول رسوب داده شد و در نهایت با آب مقطر شست‌وشو شدند.

### تکثیر ژن VDR:

به کمک دو پرایمر TGGGATTGAGCAGTGAGGT و VDR-fok1 ACCTCACTGCTCAATCCCA مترادف حاوی و به کمک دو پرایمر CAGGACGCCGCGCTGATT و VDR-Bsm1 AATCAGCGCGGCGTCCTG مترادف حاوی در حجم کل ۸ μlit تکثیر شد.

سلولی مانع از تکثیر بی‌رویه و غیرقابل کنترل و تمایز سلول‌های سرطانی می‌شود (۶). مطالعات نشان می‌دهد که ویتامین D هنگامی که سلول‌ها از فاز G1 به S عبور می‌کنند باعث توقف آن‌ها می‌شود. در حالت کلی برای عبور سلول‌ها از فاز G1 به S باید سیکلین‌های نوع D با CDK4 کمپلکس تشکیل بدهند که این کمپلکس به‌صورت کیناز فعال بوده و به‌صورت کاملاً اختصاصی به پروتئین‌های خانواده‌ی رتینوبلاستوما اتصال پیدا کرده و منجر به فسفریله کردن آن‌ها می‌شوند. هرگونه جهش در این فسفریلاسیون باعث غیرفعال شدن رتینوبلاستوما شده و در نتیجه باعث رها شدن هیستون‌ها و استیلاز و القاء رونویسی از ژن‌های خاصی می‌شود؛ که به دنبال آن سیکلین نوع E به CDK2 متصل شده و باعث افزایش فسفریلاسیون رتینوبلاستوما می‌شود. زمانی که میزان فسفریلاسیون رتینوبلاستوماها در حالت عادی می‌باشد، رتینوبلاستوماها فاکتور خاصی به نام E2F را آزاد می‌کند که این فاکتور ژن‌های مهم برای همانندسازی DNA، تقسیم سلولی میتوز، ژن‌های نگهبان و کنترل‌کننده عبوری از فازهای بعدی چرخه‌ی سلولی را رونویسی و فعال می‌کند (۷).

استروئیدی‌های خانواده‌ی ویتامین D مثل کلسی‌تریول در بسیاری از انواع بازدارنده‌های کینازی وابسته به سایکلین مثل پروتئین P21 و P27 در سلول‌های سرطان سینه فعالیت ضد تکثیری دارند که‌ای پروتئین‌ها توسط فرم فعال ویتامین D یعنی  $1,25(OH)_2D_3$  و mRNA می‌گردد. فعالیت P21 بدین صورت است که این پروتئین حاوی یک VDRE که رونویسی و فعال شدن آن به‌وسیله‌ی اتصال مستقیم به VDR صورت می‌پذیرد (۸) ژن VDR در سال ۱۹۶۹ کشف شد و در بدن در بیش از ۳۰ ارگانسیم مورد شناسایی و بررسی قرار گرفته است (۹). ژن VDR بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱۲ قرار گرفته است- (12q12) (۱۰). این ژن متشکل از ۳ پروموتور که ۳ اگزون بخش انتهایی ۵ به فرم غیر کننده‌اند و ۸ پروتئین کد کننده در اگزون شماره‌ی ۲ تا ۹ در بخش انتهایی ۳ واقع شده است که در این بین اگزون ۲ تا ۴ کدگذاری شده توسط اتصال DNA به دامنه‌ی پپتید، مسئول ارتباط با VDRE در ژن هدف می‌باشد و اگزون ۶ تا ۹ کدگذاری شده

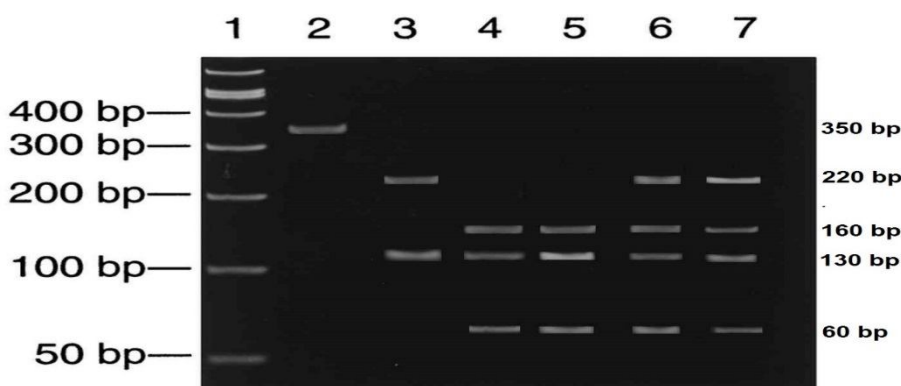
### جدول (۱): توالی‌های پرایمر

پرایمرهای محل برشی	
BSMI	F: TGGGATTGAGCAGTGAGGT
Intron 8	R: ACCTCACTGCTCAATCCCA
FOK1	F: CAGGACGCCGCGCTGATT
Exone2	R: AATCAGCGCGGCGTCCTG

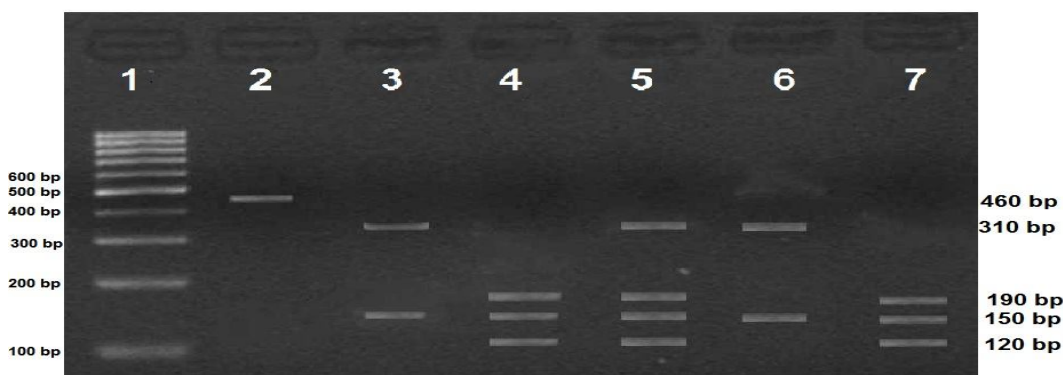
D و تن سنجی در دو گروه (بیمار و کنترل) انجام گرفت. برای تعیین نسبت شانس از آزمون *relativerisk* استفاده گردید و مقدار P آزمون کم تر از ۰/۰۵، معنی دار در نظر گرفته شد.

در اثر آنزیم برشی FOK1 محصول PCR در قطعه‌ی ۳۵۰ bp شامل ۲۲۰ و ۱۳۰ برای هموزیگوت غالب (TT) و ۱۶۰ و ۶۰ bp برای هموزیگوت های مغلوب (cc) و ۴۲۲۰ و ۱۶۰ و ۱۳۰ و ۶۰ bp برای هتوزیگوت ها (Tc) (شکل ۱) و برای آنزیم برشی BSMI در قطعه‌ی ۴۶۰ bp شامل ۳۱۰ و ۱۵۰ bp هموزیگوت غالب (GG) و ۱۹۰ و ۱۵۰ و ۱۲۰ bp برای هموزیگوت های مغلوب (AA) و ۳۱۰ و ۱۹۰ و ۱۵۰ و ۱۲۰ bp برای هتوزیگوت ها (AG) در شکل شماره‌ی ۲ نشان داده شده است.

سیکل PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۴ سانتی‌گراد پایه و ۳۵ سیکل به شرح ۹۴ سانتی پایه به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی پایه در مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه می‌باشد. در انتها نیز لوله‌ها به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه نگهداری می‌شود. محصول حاصل شده حاوی ۸۴۶ زوج باز می‌باشد و سپس از تکثیر ۳ میکرو لیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شد و پس از تکثیر DNA محصول به صورت جداگانه در مدت ۱۸ ساعت با یک واحد از آنزیم‌های BsmI و در مدت ۱۶ ساعت با آنزیم FokI در دمای ۳۷ درجه سانتی پایه تیمار شد. داده‌ها پس از ورود به نرم‌افزار SPSS V.23 با استفاده از آزمون‌های مجذور کای و T-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمون مجذور کای برای مقایسه آلل‌ها و آزمون T-test برای مقایسه متغیرهای سن، ویتامین



**شکل (۱):** آنالیز RFLP ژن FOK1- ردیف ۱ مارکر (۱۰۰ bp)، ردیف ۲ محصول PCR (۳۵۰ جفت باز)، ردیف‌های ۳ ژنوتیپ هموزیگوت غالب (TT) (۲۲۰ و ۱۳۰ جفت باز)، ردیف‌های ۴ و ۵ ژنوتیپ‌های هموزیگوت مغلوب (cc) (۱۶۰ و ۱۲۰ و ۶۰ جفت باز)، ردیف ۶ و ۷ ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ها (Tc) (۲۲۰ و ۱۶۰ و ۱۳۰ و ۶۰ جفت باز)



**شکل (۲):** آنالیز RFLP ژن BSMI- ردیف ۱ مارکر (۱۰۰ bp)، ردیف ۲ محصول PCR (۴۶۰ جفت باز)، ردیف‌های ۳ و ۶ ژنوتیپ هموزیگوت غالب (GG) (۳۱۰ و ۱۵۰ جفت باز)، ردیف‌های ۴ و ۷ ژنوتیپ‌های هموزیگوت مغلوب (AA) (۱۲۰ و ۱۵۰ و ۱۹۰ جفت باز)، ردیف ۵ ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ها (AG) (۳۱۰ و ۱۹۰ و ۱۵۰ و ۱۲۰ جفت باز)

## یافته‌ها

در این پژوهش پلی مورفیسم ژن VDR پس از اینکه ژن VDR با پرایمرهای اختصاصی و هضم با آنزیم‌های محدودکننده‌ی FOK1 و BSMI در بیماران مبتلابه سرطان سینه و گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۸۰ فرد مبتلا و ۸۰ فرد گروه شاهد در پراکنش آلل B گروه بیمار=44/9 و گروه شاهد ۰/۱۴۵ و آلل b

گروه بیمار = 63/1 و گروه شاهد 36/9 برای هر دو آنزیم برشی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P=0/61). همچنین در مقایسه پلی‌مورفیسم‌ها تراکم ژنوتیپ‌ها ی به‌دست‌آمده از هر دو گروه بیمار و شاهد هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P=0/42). همچنین مابین این ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری در سن ابتلا (P=0/19) و پیشرفت بیمار (P=0/65) مشاهده نشد.

جدول (۲): فراوانی ژنوتیپ BSMI مقدار chi-square و odd ratio و p آزمون

ژنوتیپ	مقدار	فراوانی	فراوانی مورد انتظار	کای مربع	فراوانی الی
AA	۱۳	۰/۰۷	۰/۰۲	۲۵/۶۷	A = ۰/۱۵
AG	۲۹	۰/۱۶	۰/۲۵		
GG	۱۳۸	۰/۷۶	۰/۷۱		G = ۰/۸۵

جدول (۳): فراوانی ژنوتیپ گروه‌های بیمار و کنترل آنزیم BSMI و مقدار chi-square و odd ratio و p آزمون

ژنوتیپ	مقدار	فراوانی	فراوانی مورد انتظار	کای مربع	فراوانی الی
AA	۱۳	۰/۱۴	۰/۰۶		A = ۰/۲۴۵
AG	۱۹	۰/۲۱	۰/۳۷	۱۷/۱۹	G = ۰/۷۵۵
GG	۵۸	۰/۶۴	۰/۵۶		
AA	۱۱	۰/۱۲	۰/۰۴		A = ۰/۲۱
AG	۱۷	۰/۱۸	۰/۳۳	۱۷/۷۰	G = ۰/۷۹
GG	۶۲	۰/۶۸	۰/۶۱		

با توجه به عدد کای مربع به‌دست آمده در اثر آنزیم برشی BSMI، جمعیت گروه کنترل دارای عدد کای مربع ۱۷/۱۹ و عدد

کای گروه بیمار دارای ۱۷/۷۰ می‌باشد که گروه کنترل و بیمتر در تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد.

جدول (۴): فراوانی ژنوتیپ FOK1 و مقدار chi-square و odd ratio و p آزمون

ژنوتیپ	مقدار	فراوانی	فراوانی مورد انتظار	کای مربع	فراوانی الی
CC	۱۷	۰/۰۹	۰/۰۲		C = ۰/۱۵
TC	۲۲	۰/۱۲	۰/۲۶	۵۱/۴۷	
TT	۱۴۱	۰/۷۸	۰/۷۱		T = ۰/۸۵

**جدول (۵): فراوانی ژنوتیپ گروه‌های بیمار و کنترل آنزیم FOK1 و مقدار chi-square و odd ratio و p آزمون**

ژنوتیپ	مقدار	فراوانی	فراوانی مورد انتظار	کای مربع	فراوانی الی
CC	۱۴	۰/۱۵	۰/۰۸	۱۲/۳۶	C = ۰/۲۷۵
TC	۲۳	۰/۲۵	۰/۴۰		
TT	۵۳	۰/۵۸	۰/۵۱		
CC	۱۳	۰/۱۴	۰/۰۴	۳۲/۶۸	C = ۰/۲۰۵
TC	۱۲	۰/۱۳	۰/۳۳		
TT	۶۵	۰/۷۲	۰/۶۲		

**جدول (۶): ارزش P متغیرهای مختلف**

عنوان متغیر	ضریب همبستگی اسپیرمن	ارزش P
سن	۰/۴۴	۰/۰۰
BMI	۰/۰۹۰	۰/۲۵۶
یانسگی	۰/۶۴	۰/۰۰
تعداد حاملگی	۰/۰۵۳	۰/۵
کل شیردهی	۰/۱۶۶	۰/۳۵
شیردهی برای هر فرد	۰/۰۳۶	۰/۶۶۸
سن در اولین حاملگی	۰/۱۸۳	۰/۰۲۱
مصرف قرص ضدبارداری	۰/۱۴۱	۰/۰۷۰

قرار گرفت. بعد از انجام PCR، محصولات حاصل بر روی ژل آگارز مورد بررسی و بعد از اطمینان از تکثیر صحیح قطعه مورد نظر، محصولات مورد هضم قرار گرفت بعد از طی مراحل هضم، برای آشکارسازی قطعات هضم شده از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی Safe Stain استفاده شد. نتایج سه ژنوتیپ CC با اندازه ۶۰ و ۱۳۰ و ۱۶۰ جفت باز، TC با اندازه ۲۲۰ و ۱۶۰ و ۱۳۰ جفت باز و ژنوتیپ TT با ۳۵۰ و ۱۳۰ جفت باز مشاهده شد بررسی فراوانی‌های مشاهده شده نشان داد که ژنوتیپ CC با فراوانی ۰/۰۹ درصد و آلل C با ۰/۱۵ درصد کمترین و ژنوتیپ TT با فراوانی ۰/۷۸ درصد و آلل T با فراوانی ۰/۸۵ درصد بیشترین فراوانی را داشتند مقایسه فراوانی‌های مشاهده شده و مورد انتظار نشان داد که جمعیت در تعادل هاردی-واینبرگ نمی‌باشد. که این امر ممکن است به دلیل کوچک بودن جمعیت مورد بررسی باشد.

مطالعه‌ی انجام شده توسط You-ling Gong و همکاران در سال ۲۰۰۵ فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT، TT را به ترتیب ۰/۷۳۹ و ۰/۱۴۰ و ۰/۱۲۱ گزارش نمودند که با فراوانی‌های به دست آمده در این بررسی یعنی ۰/۷۸ و ۰/۱۲ و ۰/۰۹ به ترتیب برای ژنوتیپ‌های TT، CT، CC بسیار متفاوت است. در بررسی حاضر ژنوتیپ

با توجه به عدد کای مربع به دست آمده در اثر آنزیم برشی FOK1، جمعیت گروه کنترل دارای عدد کای مربع ۱۲/۳۶ و عدد کای مربع گروه بیمار دارای ۳۲/۶۵ می‌باشد که گروه کنترل در تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد ولی گروه بیمار در تعادل نمی‌باشد که این خود یکی از دلایل بروز جهش در جمعیت می‌باشد

### بحث و نتیجه‌گیری

ژن VDR شامل ۹ اگزون با پلی مورفیسم‌های متعدد می‌باشد که Fok1 در اگزون ۲ و Bsm1 و Apa1 در اینترون ۸ و 1 و Taq1 در اگزون ۹ می‌باشد. (۱۲) در پلی مورفیسم Fok1 یک جابه‌جایی تیمین به سیتوزین باعث تبدیل کد ATG به ACG در اولین محل از دو محل احتمالی ترجمه می‌باشد که سبب ایجاد پروتیین VDR می‌شود که طولان به تعداد ۳ اسید آمینه از دیگری کوتاه‌تر است (۱۳) در افراد با توالی ACG ترجمه از دومین منطقه ATG شروع می‌شود و به همین دلیل ۳ اسید آمینه‌ی انتهایی NH2 از پروتیین کامل VDR ترجمه نمی‌شود.

به منظور بررسی ارتباط اثر آنزیم Fok1 با بروز بیماری قطعه‌ی ۳۵۰ جفت بازی از اگزون شماره‌ی ۲ با روش RFLP مورد بررسی

کاهش خطر در سرطان کولورکتال به‌ویژه برای آدنوم و دیسپلازی می‌شود هم‌چنین در پی این مطالعه به ارتباط احتمال بین ژنوتیپ BSMI جنس و مصرف مشروبات الکلی دست یافته‌اند (۱۶) با توجه به مطالعاتی که در ارتباط با چندشکلی BSMI و ژن گیرنده‌ی VDR با میزان ابتلا به سرطان سینه انجام گرفت نشان‌دهنده‌ی وجود ارتباط معنی‌داری را دارد. در این مطالعه به ارتباط بین چندشکلی Fok1 و Bsmi با خطر ابتلا به سرطان سینه پرداختیم و نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین BSMI و سرطان سینه وجود ندارد.

مطالعاتی که در ایران انجام شده، بیانگر آن است که حداقل ۷۰ درصد از زنان بالای ۵۰ سال کاهش مبتلابه سرطان پستان هستند که شیوع آن با سن مرتبط است و به‌صورت خطی با افزایش سن، درصد ابتلا به نیز افزایش می‌یابد در مطالعه موردی-شاهدی حاضر هیچ ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم ژن رسپتور ویتامین D (Taq1 و Apa1) دیده نشد (۱۷).

با توجه به مطالعات وسیع انجام‌شده مرتبط با موضوع، در جوامع مختلف گزارشات ضدونقیضی از ارتباط پلی مورفیسم‌های Taq1 و Apa1 ژن رسپتور ویتامین D موجود است دلیل این امر را می‌توان در تعدد ریسک فاکتورهای مؤثر در بروز بیماری سران پستان دانست. این گزارشات حتی در جمعیت افراد مقیم یک کشور نیز متفاوت بوده است.

یافته‌های ماکیشیما و همکارانش در مورد ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده ویتامین D در بیماران سرطان روده در استانبول ترکیه، از معدود دست آوردهایی است که ارتباط مستقیم ژنوتیپ‌های هموزیگوت جایگاه Taq1 با خطر ابتلا به سرطان پستان را نشان می‌دهد در بیماران موردبررسی این محققان، ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب بیشتر از افراد شاهد بود درحالی‌که در مطالعات اینگلز در سال ۱۹۹۷ و پیترز در سال ۲۰۰۱ هیچ داده‌های مبنی بر ارتباط پلی مورفیسم جایگاه Taq1 و سرطان پستان به دست نیامد یافته‌های مطالعه حاضر نیز مطابق این دو بررسی است با نتایج ایشییر مخالف می‌باشد، به عبارتی تغییر ژنی جایگاه Taq1 را با افزایش خطر سرطان پستان مرتبط نمی‌داند (۱۸).

Zamuda و همکاران در سال ۲۰۰۰ به بررسی پلی مورفیسم Apa1 ژن ویتامین D پرداختند و گزارش کردند که فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب در پلی مورفیسم Apa1 در زنان مبتلابه سرطان پستان طور معنی‌داری بیش‌تر بوده است.

McClung و همکاران نیز فراوانی ترکیب آلی هموزیگوت مغلوب در مقایسه با ترکیبات آلی دیگر را در زنان مبتلابه سرطان پستان به‌مراتب بالاتر گزارش کردند (۱۹).

هموزیگوت TT بیشتری فراوانی را دارد. در هر دو تحقیق انجام‌شده ژنوتیپ TT بیشترین فراوانی را دارد. در هر دو تحقیق ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب کمترین فراوانی را دارد. در مقایسه فراوانی آلی هم چه از نظر مقدار و چه از نظر بالاترین فراوانی تطابق وجود ندارد. هم در تحقیق ما و هم در تحقیق You-ling Gong ال T فراوانی بیشتری دارد. هم‌چنین نسبت فراوانی  $\frac{T}{C}$  در تحقیق حاضر ۷/۱۸ و در تحقیق You-ling Gong ۶/۹۷ می‌باشد که با یکدیگر تطابق ندارد تفاوت‌های اندازه نمونه (۱۸۰ در مقابل ۲۰۰) و تفاوت نژادی می‌تواند دلیل عمده‌ای تفاوت‌ها باشد (۱۵).

به‌منظور بررسی ارتباط تأثیر آنزیم BSMI با بروز بیماری قطعه‌ی ۴۶۰ جفت بازی از اینترون شماره ۸ با روش RFLP موردبررسی قرار گرفت. بعد از انجام PCR، محصولات حاصل بر روی ژل آگارز موردبررسی و بعد از اطمینان از تکثیر صحیح قطعه موردنظر، محصولات مورد هضم قرار گرفت بعد از طی مراحل هضم، برای آشکارسازی قطعات هضم شده از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی Safe Stain استفاده شد. نتایج سه ژنوتیپ GG با اندازه ۳۱۰ و ۱۵۰ و ۱۲۰ جفت باز و ژنوتیپ AA با اندازه ۱۲۰ و ۱۵۰ و ۱۹۰ جفت باز مشاهده شد. بررسی فراوانی‌های مشاهده‌شده نشان داد که ژنوتیپ GG با فراوانی ۰/۷۶ درصد و آل G با ۰/۸۵ درصد بیشترین و ژنوتیپ AA با فراوانی ۰/۰۷ درصد و آل A با فراوانی ۰/۱۵ درصد کمترین فراوانی را داشتند مقایسه فراوانی‌های مشاهده‌شده و مورد انتظار نشان داد که جمعیت در تعادل هاردی-واینبرگ نمی‌باشد. که این امر ممکن است به دلیل کوچک بودن جمعیت موردبررسی باشد.

مطالعه‌ی انجام‌شده توسط You-ling Gong و همکاران در سال ۲۰۰۵ فراوانی ژنوتیپ‌های AA.AG.GG را به ترتیب ۰/۷۷ و ۱۰۹/۰ و ۱۱۹/۰ گزارش نمودند که با فراوانی‌های به‌دست‌آمده در این بررسی یعنی ۰/۰۷ و ۰/۱۶ و ۰/۷۶ به ترتیب برای ژنوتیپ‌های AA.AG.GG بسیار متفاوت است. در بررسی حاضر ژنوتیپ هموزیگوت GG بیشتری فراوانی را دارد. در هر دو تحقیق انجام‌شده ژنوتیپ GG بیشترین فراوانی را دارد. اما در هر دو تحقیق ژنوتیپ هتروزیگوت کمترین فراوانی را دارد. در مقایسه فراوانی آلی هم چه از نظر مقدار و چه از نظر بالاترین فراوانی تطابق وجود ندارد. هم در تحقیق ما و هم در تحقیق You-ling Gong ال G فراوانی بیشتری دارد. هم‌چنین نسبت فراوانی  $\frac{G}{A}$  در تحقیق حاضر ۶/۸۷ و در تحقیق You-ling Gong ۴/۸۲ می‌باشد که با یکدیگر تطابق ندارد. تفاوت‌های اندازه نمونه (۱۸۰ در مقابل ۲۰۰) و تفاوت نژادی می‌تواند دلیل آن باشد. در پی مطالعه که you-ling gony و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی چندشکلی FOK1 انجام دادند به این نتیجه رسیدند که جهش در ال U از چندشکلی FOK1 باعث

سینه نیاز به بررسی سایر پلی مورفیسیم‌های این ژن با بیماری سرطان سینه پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و تمامی کارکنان بیمارستان امید ارومیه و بیمارستان آذربایجان ارومیه نهایت تقدیر و تشکر را دارم.

Mitra و همکارانش نیز در مطالعه خود ارتباط بین پلی مورفیسیم‌های ژن گیرنده ویتامین D (Apa1 و Taq1) را با میزان ابتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار دادند در خصوص ژن Fok1 نتایج نشان داد که افراد هموزیگوت میزان ابتلای بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها داشتند. (۲۰).

### نتیجه‌گیری

با در نظر نقش گیرنده‌های ویتامین D در تنظیم چرخه‌ی سیکل‌های سلولی و در کل سیستم ایمنی بدن در بیماری سرطان

### References:

1. Cancer IA for R on, others. Cancer in Africa: epidemiology and prevention. IARC scientific Publications 2003;(153):1.
2. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. Cancer Chemother Pharmacol 2006;57(2):234-40.
3. Nuussbaum RL, Huntington FW, Cornelius FB. Genetic in medicin. WB Saunders press; 2001.P. 325-9.
4. Bretherton-Watt D, Given-Wilson R, Mansi JL, Thomas V, Carter N, Colston KW. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with breast cancer risk in a UK Caucasian population. Br J Cancer 2001;85(2):171-5.
5. Hou M-F, Tien Y-C, Lin G-T, Chen C-J, Liu C-S, Lin S-Y, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with sporadic breast cancer in Taiwanese patients. Breast Cancer Res Treat 2002;74(1):1-7.
6. Cui Y, Rohan TE. Vitamin D, calcium, and breast cancer risk: a review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(8):1427-37.
7. Bidgoli SA, Ahmadi R, Zavarhei MD. Role of hormonal and environmental factors on early incidence of breast cancer in Iran. Sci Total Environ 2010;408(19):4056-61.
8. Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, et al. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. Eur J Cancer 2005;41(8):1164-9.
9. Nuussbaum RL, Huntington FW, Cornelius FB. Genetic in medicin. WB Saunders press; 2001.P. 325-9.
10. O'Kelly J, Uskokovic M, Lemp N, Vadgama J, Koeffler HP. Novel Gemini-vitamin D3 analog inhibits tumor cell growth and modulates the Akt/mTOR signaling pathway. J Steroid Biochem Mol Biol 2006;100(4-5):107-16.
11. Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, et al. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. Eur J Cancer 2005;41(8):1164-9.
12. Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, et al. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. Eur J Cancer 2005;41(8):1164-9.
13. Gong Y-L, Xie D-W, Deng Z-L, Bostick RM, Miao X-J, Zhang J-H, et al. Vitamin D receptor gene Tru9I polymorphism and risk for incidental sporadic colorectal adenomas. World J Gastroenterol 2005;11(31):4794-9.

14. Li W, Ray RM, Lampe JW, Lin M-G, Gao DL, Wu C, et al. Dietary and other risk factors in women having fibrocystic breast conditions with and without concurrent breast cancer: a nested case-control study in Shanghai, China. *Int J Cancer* 2005;115(6):981-93.
15. Mitra S, Desai M, IkramKhatkhatay M. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Maturitas* 2006; 55(1): 27-35. (persian)
16. Qiu J, Yang R, Rao Y, Du Y, Kalembo FW. Risk factors for breast cancer and expression of insulin-like growth factor-2 (IGF-2) in women with breast cancer in Wuhan City, China. *PLoS ONE* 2012;7(5):e36497.
17. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002;296(5571):1313-6.
18. Gong Y-L, Xie D-W, Deng Z-L, Bostick RM, Miao X-J, Zhang J-H, et al. Vitamin D receptor gene Tru9I polymorphism and risk for incidental sporadic colorectal adenomas. *World J Gastroenterol* 2005;11(31):4794-9.
19. Sakulpipatsin W, Verasertniyom O, Nantiruj K, Totemchokchyakarn K, Lertsrisatit P, Janwityanujit S. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R48.
20. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev* 2000; 22(2): 203-217.
21. Mitra S, Desai M, IkramKhatkhatay M. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Maturitas* 2006; 55(1): 27-35.



## THE RELATIONSHIP OF FOK1 AND BSMI POLYMORPHISMS WITH VITAMIN D ON WOMEN'S BREAST CANCER IN URMIA

Sasan Talaneh<sup>1\*</sup>, Farokh Ghavam<sup>2</sup>, Ebrahim Mogheysi<sup>3</sup>, Omid Esnaashari<sup>4</sup>

Received: 27 Aug, 2016; Accepted: 27 Oct, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Breast cancer is one of the most common cancers worldwide and accounts for one third of all cancers in women. Vitamin D and its metabolites have a critical role in bone metabolism and any decrease in synthesis and production of this vitamin causes cancers, including breast and ovarian and colon. In this study, we examined the relationship between FOK1 and BSMI restriction enzymes dealing with breast cancer.

**Materials & Methods:** This study was conducted on 180 women (90 female patients and 90 healthy women). DNA was extracted using salting out method. In the next stage the designed primers were connected to complementary sequences using PCR and in the last stage, restriction enzymes specific places on the DNA sequences were cut using RFLP. Finally the data were analyzed using SPSSV23, chi-square and t-Test.

**Results:** There was no significant difference considering the density of the obtained genotype polymorphisms in both patients and controls ( $P = 0.422$ ). There was a significant difference between the genotypes considering age ( $P=0.19$ ) and slow the disease progression ( $P = 0.65$ ). In both groups, there was significant association between the variables of age, breastfeeding and age at first pregnancy ( $p < 0.05$ ). There also was association between the use of oral contraceptives with occurrences of the disease ( $p > 0.005$ ).

**Conclusion:** In view of the role of vitamin D receptors in cell cycle control cycles and the whole immune system in breast cancer need to consider other gene polymorphisms with breast cancer is suggested

**Keywords:** Breast Cancer, Vitamin D, Receiver's restriction enzyme, Polymorphism

**Address:** Department of Biology, Faculty of Graduate Studies, Islamic Azad University of Ahar, Ahar, Iran

**Tel:** +989018708487

**Email:** sasantalaneh@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(9): 761 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> MSc, Biology Department, Islamic Azad University of Ahar, Ahar, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> PhD, Laboratory Medicine Department, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Gastroenterology Department, University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Oncology Department, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran