



## بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی E326K ژن SHBG با سرطان پستان در زنان ایرانی

نسترن حقیقی<sup>۱</sup>، زهرا طهماسبی فرد<sup>۲\*</sup>، ناهید نفیسی<sup>۳</sup>

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، رودهن، ایران.

۳- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۰۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۳/۰۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** گلوبولین متصل شونده به هورمون جنسی (SHBG) یک گلیکوپروتئین پلاسمایی است که در چندین سطح عمل هورمون‌های استروئیدی را تنظیم می‌کند. از آنجا که SHBG یکی از تنظیم کننده‌های رشد سلول‌های سرطان پستان می‌باشد بنابراین هدف از این تحقیق، بررسی رابطه بین پلی مورفیسم E326K و میزان ابتلا به سرطان پستان است.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه به صورت موردی - شاهدهی بر روی ۷۹ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان و ۷۹ زن سالم که به بیمارستان شهدای تجریش تهران مراجعه کرده بودند، انجام گرفت. متوسط سن افراد بیمار  $48 \pm 8$  سال و افراد کنترل  $43 \pm 6$  بود. پس از خونگیری و استخراج DNA، ژنوتایپ تمامی نمونه‌ها با روش PCR-RFLP تعیین شد و نتایج به دست آمده با نرم افزار SPSS 19 از لحاظ آماری مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** پس از شمارش ژنوتایپ‌ها، درصد آن‌ها در نمونه‌های سرطانی (AA (56.9%), GG (35.4%), AG/GA (7.6%) و در بین افراد کنترل AA (12.6%), GG (39.2%), AG/GA (10.1%), (77.2%) تعیین شد. همچنین بر اساس تعادل هاردی واینبرگ، فراوانی آلل A در بیماران سرطانی 60.7٪ و فراوانی آلل G 39.2٪ بود و در افراد کنترل نیز فراوانی آلل A حدود 21.5٪ و فراوانی آلل G برابر با 82.3٪ محاسبه شد. از نظر آماری نیز رابطه معنی‌دار بین هموزیگوت‌های دو گروه مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که پلی مورفیسم E326K در اگزون ۸ ژن SHBG با خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط است و احتمالاً می‌تواند یکی از فاکتورهای دخیل در آن باشد.

**کلمات کلیدی:** پلی مورفیسم E326K، سرطان پستان، ژن SHBG

### مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان در زنان سراسر جهان است و در سال ۲۰۱۲ حدود ۱/۷ میلیون فرد جدید مبتلا که شامل یک چهارم از تمام موارد جدید سرطان بود، شناسایی شد (۱)، نقش استروژن در پیشرفت آن به اثبات رسیده و هدف اصلی درمان است (۲). گلوبولین متصل شونده به هورمون جنسی (SHBG) یا گلوبولین متصل شونده به استروئید جنسی (SSBG)<sup>۲</sup>، یک گلیکوپروتئینی است که به هورمون‌های جنسی، آندروژن و استروژن متصل می‌شود. هورمون‌های استروئیدی دیگر از جمله پروژسترون، کورتیزول، و سایر کورتیکواستروئیدها توسط

transcortin به آن متصل می‌شوند. SHBG در تمام مهره داران به جز پرندگان یافت می‌شود (۳). SHBG با اتصال به استروئیدهای جنسی، آن‌ها را در خون حمل کرده و دسترسی سلول‌های هدف به آن‌ها را، تنظیم می‌کند. در حقیقت از طریق مهار گیرنده‌های غشایی استرادیول عمل می‌کنند که باعث القاء تکثیر سلول‌های سرطانی پستان می‌شود (۴).

ژن SHBG بر روی کروموزوم ۱۷ (۵) بر روی بازوی کوتاه بین باندهای 13-12 p17 قرار گرفته است (۶) این ژن 3.8 kb طول داشته و حاوی ۸ اگزون است (۷). SHBG همودایمری است که

<sup>1</sup> Sex hormone-binding globulin (SHBG)

<sup>2</sup> Sex steroid-binding globulin (SSBG)

\*نویسنده مسئول: زهرا طهماسبی فرد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، رودهن، ایران. تلفن: ۰۱۵-۷۶۵۰۵۰۲۱-riau.ac.ir. Email: ztahmasebi@riau.ac.ir

آن‌ها از نظر معاینات پزشکی و آزمایش‌های کلینیکی در بیمارستان شهدای تجریش به اثبات رسیده بود) و ۷۹ فرد کنترل که از نظر ابتلا به بیماری‌های مختلف از جمله دیابت، فشار خون، بیماری‌های قلبی عروقی منفی بودند و سابقه هیچ گونه بیماری از جمله سرطان پستان را حتی در بستگان درجه اول نیز نداشتند، انتخاب شدند. بیماران سرطانی بین سنین ۷۰-۳۲ سال با میانگین ۴۹/۶۸ سال و افراد کنترل در همین طیف سنی با میانگین ۴۷/۳۴ سال، انتخاب شدند. از بین افراد بیمار ۲۶ نفر (۳۲/۹۱٪) مبتلا به سرطان مهاجم با منشا سلول‌های شیری، ۴۵ نفر (۵۶/۹۶٪) مبتلا به سرطان مهاجم با منشا مجاری شیری، ۵ نفر (۳۲/۳۲٪) مبتلا به سرطان درجا از منشاء مجاری، ۳ نفر (۳/۷۹٪) مبتلا به سرطان درجا از منشا لوبولی بودند. از این افراد ۳۸ فرد در مرحله متاستاز، ۱۶ فرد در grade III، ۱۳ بیمار در grade II/III، ۱۲ بیمار در grade II قرار داشتند.

**تعیین ژنوتایپ:** حدود ۵ تا ۷ میلی لیتر خون از تمامی افراد (پس از پر کردن فرم رضایت نامه) گرفته شد و پس از مخلوط شدن با EDTA در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$ - قرار داده شدند. سپس DNA موجود در گلبول‌های سفید خون با روش نمک اشباع یا Salting out استخراج گردید (۱۴) و به کمک اسپکتروفتومتر تعیین غلظت شد. برای تکثیر قطعه حاوی پلی مورفیسم D356N از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (۱۵ و ۱۶) (مطابق جدول ۱).

مخلوط واکنش ۲۲ میکرولیتری (۲/۵ میکرولیتر از بافر  $10\times$  (Roche)، ۱/۵ میکرولیتر از  $\text{MgCl}_2$  ۲۵ میلی مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از dNTP ۱۰ میلی مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از پرایمر رفت ۱۰ پیکومول (gene fanavar) (Roche)، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت ۱۰ پیکومول (gene fanavar) (Roche)، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرز (Roche)، ۱۷/۹ میکرولیتر از  $\text{H}_2\text{O}$  و 10ng DNA از نمونه رقیق شده استفاده شد و باقی تا حجم ۲۲ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس با برنامه  $95^{\circ}\text{C}$  برای یک نوبت ۵ دقیقه،  $95^{\circ}\text{C}$  برای ۶۰ ثانیه،  $62^{\circ}\text{C}$  برای ۳۰ ثانیه،  $75^{\circ}\text{C}$  برای ۳۰ ثانیه در  $37^{\circ}\text{C}$  سیکل و  $72^{\circ}\text{C}$  برای ۵ دقیقه در یک سیکل برای تکثیر قطعه ۲۰۹ bp از ژن SHBG، در دستگاه ترموسایکر (Eppendorf Mastercycler gradient, Germany) قرار داده شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل

از دو زنجیره پپتیدی مجرا تشکیل شده است (۸). این پروتئین از ۳۷۳ آمینواسید تشکیل شده و دارای دو باند دی سولفیدی است. دو نوع متفاوت N- گلیکوزیل در آسپارژین و یک O- گلیکوزیل در ترئونین را، در ساختار خود دارد (۹). SHBG عمدتاً توسط کبد تولید می‌شود و به جریان خون آزاد می‌گردد اما محل‌های دیگر نظیر مغز، رحم، بیضه و جفت نیز آن را تولید می‌کنند (۱۰).

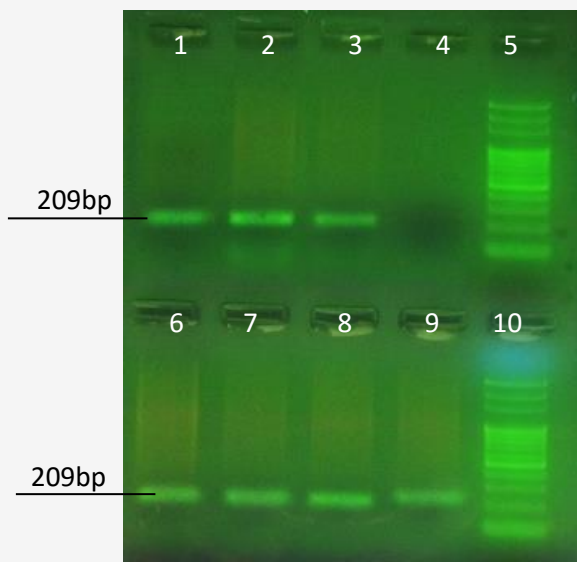
تنوع‌های ژنتیکی، اثرات متفاوتی بر پروتئین دارند. سه پلی مورفیسم در ناحیه کد کننده پروتئین SHBG، گزارش شده که منجر به تغییر توالی آمینو اسیدی آن می‌شود (۴). یکی از تغییرات، موتاسیون نقطه‌ای در اگزون ۸ در محل N- گلیکوزیل است که اسید آسپارتیک موقعیت ۳۲۷ را به آسپارژین تبدیل می‌کند. گزارشات اولیه بر این بود که تغییرات در گلیکوزیلاسیون تاثیری بر خصوصیت اتصال استروئید ندارد اما امروزه مشخص شده که نوع کربوهیدرات‌ها در پروتئین وحشی، بسیار حیاتی برای اتصال صحیح گلیکوپروتئین به گیرنده آن می‌باشد (۱۱).

مطالعات انجام گرفته برای اثبات رابطه بین انواع تنوع‌های ژنتیکی شایع و خطر ابتلا به سرطان با سرعت بالایی در حال افزایش است. زیرا تغییرات ژنی بر سطح پروتئین‌های سرمی تاثیر داشته و می‌تواند در گسترش سرطان نقش داشته باشد (۱۲). یکی از این تغییرات، پلی مورفیسم نوکلئوتید تکی (گوانین به آدنین) در نوکلئوتید ۵۷۹۰ (M31651, GenBank) از اگزون ۸ این ژن است. در نتیجه این پلی مورفیسم اسید آمینه آسپارژین به جای اسید آمینه آسپارتیک در موقعیت ۳۲۷ (*Asp327Asn*) از پلی پپتید SHBG قرار می‌گیرد. این تغییر سبب افزودن زنجیره کربوهیدرات به بخش N-linked شده و محل جدیدی برای N- گلیکوزیلاسیون در انتهای کربوکسیل ایجاد می‌کند. این تغییر در SHBG توانایی آن را برای مهار تکثیر القا شده با استرادیول در سلول‌های سرطان پستان تغییر می‌دهد (۱۳). هدف از این مطالعه، بررسی رابطه بین پلی مورفیسم Asp 327 Asn در اگزون ۸ ژن SHBG با خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیت ایرانی است.

### مواد و روش‌ها

**جمعیت بررسی شده:** برای بررسی از روش case/control استفاده شد. ۷۹ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان، (که بیماری

PCR روی ژل آگاروز ۲٪ برده شد تا قطعه 209bp در آن‌ها آشکار گردد (شکل ۱).



شکل ۱: محصولات PCR لود شده بر روی ژل آگاروز ۲٪، چاهک ۱ تا ۳ نمونه‌های کنترلی، چاهک ۴ کنترل منفی، چاهک ۵ مارکر 100bp چاهک ۶ تا ۹ نمونه‌های سرطانی، چاهک ۱۰ مارکر 100bp

پس از اطمینان از تکثیر شدن قطعه مورد نظر، با آنزیم Hinf I برش ایجاد شد. افرادی با ژنوتایپ GG محصول PCR هضم شده آن‌ها سه باند 75bp, 69bp, 64bp ظاهر می‌کنند. اما افرادی با ژنوتایپ AA تنها دو قطعه به طول‌های 133bp, 75bp را نشان می‌دهند. در صورت هتروزیگوت بودن فرد و داشتن ژنوتایپ AG/GA بایستی قطعات 133bp, 75bp, 69bp, 64bp آشکار شود. در شکل ۲ ژنوتایپ تعدادی از نمونه‌های کنترل و سرطانی تعیین شده است. برای اطمینان از صحت ژنوتایپ‌های تعیین شده، تعدادی از نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب شدند و تعیین توالی گردیدند.

آگاروز ۱/۵٪ حاوی سایبر گرین در کنار سایز مارکر 100bp (Roche) با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه الکتروفورز شدند تا باندهای مورد نظر مشاهده شوند.

محصولات PCR که باند 209bp را نشان می‌دادند با آنزیم محدود کننده Hinf I به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در دمای 37C انکوبه شدند. سپس نتایج هضم آنزیمی بر روی ژل ۴٪ آگاروز با رنگ آمیزی سایبر گرین مشاهده شد. آنزیم قادر به شناسایی دو محل بر روی قطعه تکثیر شده بود. یکی از محل‌ها پس از ۷۵ نوکلئوتید از سر ۵' رشته قرار داشت و محل برش دوم پس از نوکلئوتید ۱۴۴ بود. محل برش اول در تمامی نمونه‌ها بریده شده بود ولی محل دوم جایگاه قرارگیری پلی مورفیسم ژنی مورد نظر بود. به همین دلیل در صورتی که در محل مورد نظر نوکلئوتید G وجود داشت سه باند 75bp, 69bp, 64bp (ژنوتایپ GG) بر روی ژل ظاهر می‌شد اما اگر در محل مورد نظر تغییر نوکلئوتید صورت گرفته باشد تنها دو باند 133bp, 75bp (ژنوتایپ AA) ظاهر شده و اگر فرد هتروزیگوت باشد باندهای 133bp, 75bp, 69bp, 64bp ظاهر می‌شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری:** فراوانی ژنوتایپ‌ها با شمارش و محاسبه درصد آن‌ها در دو گروه افراد سرطانی و کنترل تعیین شد. سپس فرکانس الل‌ها در هر دو گروه بر اساس تعادل هاردی واینبرگ به دست آمد و با استفاده از آزمون Chi-square ژنوتایپ‌ها در دو گروه مورد مقایسه قرار گرفتند.

### نتایج

پس از خون‌گیری و استخراج DNA به روش Salting out، کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل بررسی شد و با دستگاه اسپکتروفتومتر نیز تعیین غلظت شدند. پس از اطمینان از مناسب بودن DNAهای استخراج شده، با پرایمرهای اختصاصی (توالی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است)، قطعه مورد نظر تکثیر شد. برای اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، بخشی از محصولات

جدول ۱: توالی پرایمرهای انتخاب شده برای انجام PCR و آنزیم شناسایی کننده پلی مورفیسم

Primer	Sequence 5'→3'	Enzyme	PCR Product size
Forward	5'- AGAAGAAGATATGGGGGCAGTG 3'	Hinf I	209bp
Reverse	5'- GGGCCTGGTCCACATCC -3'		

همچنین بر اساس تعادل هاردی واینبرگ، فراوانی ال A در بیماران سرطانی 60.7٪ و فراوانی ال G 39.2٪ بود و در افراد کنترل نیز فراوانی ال A حدود 21.5٪ و فراوانی ال G برابر با 82.3٪ محاسبه شد. از نظر آماری نیز رابطه معنی دار بین دو گروه مشاهده شد ( $P\text{-Value} < 0.05$ ). از سوی دیگر بین ژنوتایپ AA و میزان پیشرفت سرطان رابطه معنی داری وجود داشت ( $P\text{-value} = 0.02$ ) اما با نوع سرطان رابطه معنی داری را نشان نمی داد ( $P\text{-value} = 0.07$ ).

نتایج کلی به دست آمده از توزیع ال‌ها و ژنوتایپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل در جدول ۲ و ۳ خلاصه شده است.

جدول ۲: توزیع فراوانی ژنوتایپ‌های مختلف در بیماران و افراد کنترل

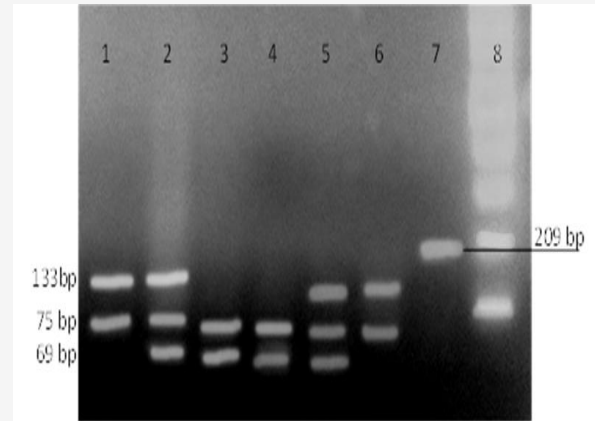
ژنوتایپ‌ها	AA	GG	AG
سرطانی N= ۷۹	۴۵ (% ۵۶/۹)	۲۸ (% ۳۵/۴)	۶ (% ۷/۶)
کنترل N= ۷۹	۱۰ (% ۱۲/۶)	۶۱ (% ۷۷/۲)	۸ (% ۱۰/۱)
مجموع N= ۱۵۸	۵۵ (% ۳۴/۸)	۸۹ (% ۵۶/۳)	۱۴ (% ۸/۸)

جدول ۳: توزیع فراوانی ال‌ها در بیماران و افراد کنترل

فرکانس ال (%)	A	G
سرطانی N= ۷۹	۶۰/۷	۳۹/۳
کنترل N= ۷۹	۲۱/۵	۷۸/۳
مجموع N= ۱۵۸	۳۹/۲	۶۰/۷

### بحث و نتیجه‌گیری

سرطان پستان وابسته به استروژن، به وسیله استرادیول القاء شده و گسترش آن کنترل می‌شود و بعد اتصال به گیرنده‌ی هسته‌ای ER تکثیر سلولی روی می‌دهد. سرطان پستان وابسته به



شکل ۲: نشان دهنده بخشی از محصولات هضم شده توسط آنزیم Hinf I: چاهک ۱ نمونه سرطانی با ژنوتایپ AA، چاهک ۲ نمونه سرطانی با ژنوتایپ AG/GA، چاهک ۳ نمونه سرطانی با ژنوتایپ GG، چاهک ۴ نمونه سرطانی با ژنوتایپ GG، چاهک ۵ نمونه کنترل با ژنوتایپ AG/GA، چاهک ۶ نمونه سرطانی با ژنوتایپ AA، چاهک ۷ نمونه سرطانی هضم نشده (محصول PCR اولیه)

نتایج نشان می‌داد که ژنوتایپ هموزیگوت AA ۴۵ نفر (۵۶/۹٪) از افراد سرطانی و ۱۰ نفر (۱۲/۶٪) از افراد کنترل را شامل می‌شد ( $P\text{-Value} = 0$ ). در مورد ژنوتایپ هموزیگوت GG، ۲۸ نفر (۳۵/۴٪) از افراد سرطانی و ۶۱ نفر (۷۷/۲٪) از افراد کنترل را تشکیل می‌داد ( $P\text{-Value} = 0$ ). در مورد ژنوتایپ هتروزیگوت AG/GA نیز ۶ نفر (۷/۶٪) از افراد سرطانی و ۸ نفر (۱۰/۱٪) از افراد کنترل نشان می‌دادند ( $P\text{-value} = 0.5$ ). از لحاظ آماری  $P\text{-Value} < 0.05$  سطح معنی دار بودن را نشان می‌دهد که در مورد دو ژنوتایپ هموزیگوت AA، GG صدق می‌کند ولی ژنوتایپ هتروزیگوت در دو جامعه رابطه معنی داری را نشان نمی‌دهد. برای اطمینان نسبت شانس (OR) نیز در مورد ژنوتایپ‌ها محاسبه شد. نسبت شانس ۱ عدم تاثیر را نشان می‌دهد و بالاتر از یک بیشترین تاثیر و عدد کمتر از یک کمترین تاثیر را نشان می‌دهد. برای ژنوتایپ AA (OR 9.13 (CI 95% 4.11-20.3) و برای ژنوتایپ GG Odds ratio= 0.16 (CI 95% 0.08-0.32) و برای هتروزیگوت AG/GA Odds ratio= 9.13 (CI 95% 0.24-2.21) محاسبه شد. همان طور که Odds ratio نشان می‌دهد بیشترین تاثیر در مورد ژنوتایپ هموزیگوت AA مشاهده شد و ژنوتایپ GG تاثیر کمی را نشان می‌داد.



و همکاران، ال Asn327 با کاهش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط دانسته شد (۱۳) همچنین فرکانس بالایی از این پلی مورفیسم در بیماران یائسه مبتلا به سرطان پستان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (۲۲).

همان گونه که در آنالیز آماری نتایج هم ذکر شد میزان P-Value محاسبه شده برای ژنوتایپ هموزیگوت AA کمتر از 0.05 بود در نتیجه فرضیه صفر مبنی بر نداشتن رابطه بین دو گروه رد می شود و با اطمینان ۹۵٪ می توان گفت که در مورد این ژنوتایپ رابطه قویتر است. از طرف دیگر Odds ratio نیز همین را نشان می دهد که عدد 9.13 نشان دهنده رابطه قوی بین این پلی مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان پستان می باشد. این ژنوتایپ در افراد سرطانی با پیشرفت بیماری نیز مرتبط است و شیوع بالایی در مراحل پیشرفته سرطان پستان نشان می دهد. در مورد ژنوتایپ GG میزان P-Value زیر 0.05 بود و رابطه معنی دار را نشان می داد اما نسبت شانس ابتلا حدود ۰/۱۶ محاسبه شد که نشان دهنده تاثیر کم آن در ایجاد سرطان پستان است. میزان P-Value در مورد ژنوتایپ GA/AG بیش از 0.05 بود و رابطه معنی دار آماری را نیز نشان نمی داد. نسبت شانس در مورد این ژنوتایپ در دو گروه محاسبه شد که نشان دهنده تاثیر کم آن در خطر ابتلا به سرطان پستان بود.

نتایج ما نشان می دهد که این پلی مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط است. اما از آنجا که سرطان پستان بیماری پیچیده ای است و عوامل مختلفی در کنار یکدیگر باعث بروز آن می شوند پس نمی توان به طور یقین یک فاکتور مشخصی را برای بروز آن در نظر گرفت. هر چند شناسایی عوامل به وجود آورنده به پیش آگهی دادن و تشخیص زود هنگام بیماری کمک خواهد کرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد. بدین وسیله از زحمات کلیه پرسنل و دستیاران بخش جراحی بیمارستان شهدای تجریش که در تهیه نمونه ها همکاری زیادی داشتند تشکر و قدردانی می شود.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

استروژن، با بیان ER مشخص شده و به وسیله گیرنده ی پروژسترون PR القاء می شود. به همین دلیل تومورهایی که هر دو ER و PR را بیان می کنند پیش آگهی خوبی داشته و به خوبی به داروهای مهار کننده استروژن پاسخ می دهند (۱۱). گلوبولین متصل شونده به هورمون جنسی (SHBG)، یک گلیکوپروتئین پلاسمایی است که در پاتو فیزیولوژی سرطان پستان و خطر بروز آن نقش مهمی دارد. زیرا میزان دسترسی به استروژن موجود در گردش خون را تنظیم می کند (۱۷ و ۱۸) همچنین می تواند با مسیرهای تاثیر استرادیول بر سلول های سرطان پستان تداخل داشته، در نتیجه رشد و تکثیر سلول های سرطانی پستان را کاهش دهد (۱۹). پلی مورفیسم شایع تک نوکلئوتیدی در ژن SHBG با جایگزینی اسید آمینه (Asp327Asn)، که با ایجاد یک سایت N- گلیکوزیلاسیون های اضافی همراه است باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان یائسه می شود (۱۷).

در تحقیق Forsti و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی زنان لهستانی رابطه معنی داری بین این پلی مورفیسم (D327N) و خطر ابتلا به سرطان پستان یافت نشد آن ها مطالعه خود را بر روی ۴۲۳ فرد دارای سرطان های تک گیر و خانوادگی انجام دادند (۴). اما در تحقیق Piccioni و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی زنان جمهوری چک که دارای سرطان پستان بودند انجام دادند آن ها دو پلی مورفیسم 8(TAAAA) و D327N را به شدت مرتبط با ایجاد سرطان پستان حساس به استروژن یافتند (۲۰). در تحقیق Yong Cui و همکاران بر روی ۱۱۰۶ فرد بیمار و ۱۱۸۰ فرد کنترل در چین تحقیق کردند نتایج آن ها نیز نشان می داد که ال Asn در ژن SHBG با خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان یائسه به دلیل افزایش سطح SHBG مرتبط می باشد (۲۱). مطالعات اپیدمیولوژیک برای ارتباط بین پلی مورفیسم SHBG Asp327Asn و خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیت های گوناگون انجام شده است. با این حال، نتایج متناقضی به جای نتایج قطعی گزارش شده است (۲۰). از آنجا که جمعیت ایرانی از نظر ژنتیکی متفاوت از سایر جمعیت های دنیاست و از طرف دیگر به دلیل انجام نشدن این بررسی بر روی زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان، این پژوهش صورت گرفت. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با برخی از مطالعات مطابقت داشت. در تحقیق Cui



## References

1. Bhandari R, Kelley G.A, Hartley T.A, Rockett I.R.H. Metabolic Syndrome Is Associated with Increased Breast Cancer Risk: A Systematic Review with Meta-Analysis. Review Article. International Journal of Breast Cancer. 2014; 2014: 1- 13.
2. Jones KL, Buzdar AUA. review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2004; 11(3):391-406.
3. Hammond GL. "Diverse Roles for Sex Hormone-Binding Globulin in Reproduction". Biology of Reproduction. 2011; 85 (3): 431–441.
4. Försti A, Jin Q, Grzybowska E, Söderberg M, Zientek H, Sieminska M, et al. Sex hormone-binding globulin polymorphisms in familial and sporadic breast cancer. Carcinogenesis. 2002; 23(8):1315-20.
5. Hammond GL, Bocchinfuso WP. "Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses". Horm. Res. 1996;45(3–5): 197–201.
6. Bérubé D, Séralini GE, Gagné R, Hammond GL. "Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12→p13)". Cytogenetic and Genome Research. 1991;54 (1–2): 65–7.
7. Gershagen S, Lundwall Å, Fernlund P. Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis Nucl. Acids Res. 1989; 17 (22): 9245-9258.
8. Hammond GL, Bocchinfuso WP. "Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses". Horm. Res. 1996; 45 (3–5): 197–201.
9. Hammond G.L, Underhill D.A, Smith C.L, Goping I.S, Harley M.J, Musto N.A, et al. "The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain". FEBS Letters . 1987; 215 (1): 100–104.
10. Pugeat M, Nader N, Hogeveen K, Raverot G, Déchaud H, Grenot C. Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome. Mol Cell Endocrinol. . 2010;316(1):53-9.
11. Becchis M, Frairia R, Ferrera P, Fazzari A, Ondei S, Alfano A, et al. The additionally glycosylated variant of human sex hormone-binding globulin (SHBG) is linked to estrogen-dependence of breast cancer. Breast cancer Research and Treatment. 1999, 54(2): 101-107
12. Dunning Alison M, Healey Catherine S, Pharoah Paul D.P, Dawn Teare M, Ponder Bruce A.J, Easton Douglas F. A Systematic Review Of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. Cancer Epidemiol Biomarkers. 1999; 8: 843.
13. Cui Y, Shu X.O, Cai Q, Jin F, Cheng J.R, Cai H, et al. Association of Breast Cancer Risk with a Common Functional Polymorphism (Asp327Asn) in the Sex Hormone-Binding Globulin Gene . Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14(5); 1096-101.
14. Noguera NI, Tallano CE, Bragos IM, Milani AC. Modified salting-out method for DNA isolation from newborn cord blood nucleated cells. J Clin Lab Anal. 2000;14(6):280-283.
15. Hammond G.L, Underill D.A, Rykse H.M, Smith C.L. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. Mol Endocrinol. 1989; 3(11): 1869-1876.
16. Forsti A, Qianren J, Grzybowska E, Soderberg M, Zientek H, Sieminska M, et al. Sex hormone-binding globulin polymorphisms in familial and sporadic breast cancer. Carcinogenesis. 2002; 23(8): 1315-1320.
17. Costantino L, Catalano MG, Frairia R, Carmazzi CM, Barbero M, Coluccia C, et al. Molecular mechanisms of the D327N SHBG protective role on breast cancer development after estrogen exposure. Breast Cancer Res Treat. 2009;114(3):449-56.
18. Fortunati N, Catalano MG, Boccuzzi G, Frairia R. Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG), estradiol and breast cancer . Molecular and Cellular Endocrinology. 2010; 316(1): 86–92.
19. Zhou JY, Shi R, Yu HL, Zheng WL, Ma WL. Association between SHBG Asp327Asn (rs6259) polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of 10,454 cases and 13,111 controls. Mol Biol Rep. 2012; 39(8):8307-14.
20. Piccioni C, Graziella Catalano M, Boccuzzi G, Fortunati N. Sex hormone-binding globulin (SHBG) gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism in breast cancer: link to estrogen sensitivity Endocrine Abstracts. 2010; 22: 390.
21. Cui Y, Shu X-O, Cai Q, Jin F, Cheng J-R, Cai H, Gao Y-T and Zheng W. Association of Breast Cancer Risk with a Common Functional Polymorphism (Asp327Asn) in the Sex Hormone-Binding Globulin Gene . Cancer Epidemiol Biomarkers Prev . 2005; May 14,10-16.
22. Becchis M, Frairia R, Ferrera P, Fazzari A, Ondei S, Alfano A, Coluccia C, Biglia N, Sismondi P, Fortunati N. The additionally glycosylated variant of human sex hormonebinding globulin (SHBG) is linked to estrogen-dependence of breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1999, 54:101–7.



Original Article

## Investigation of Association between E326K in SHBG Gene and Breast Cancer in Iranian Females

Haghighi N<sup>1</sup>, Tahmasebifard Z<sup>2\*</sup>, Nafisi N<sup>3</sup>

- 1- Department of Genetics, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran.  
2- Department of Biology, Islamic Azad University, Roudehen Branch, Roudehen, Iran.  
3- Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 26 Dec 2014

Accepted: 24 May 2015

**Background & Objective:** Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) is a plasma glycoprotein that regulates the action of steroid hormones on several levels. Since SHBG is one of the growth regulators of breast cancer cells, the aim of this study was to evaluate the association between polymorphisms E326K and the risk of breast cancer.

**Materials & Methods:** This study was done as a case-control study on 79 patients with breast cancer and on 79 healthy women who had gone to Shohada-e Tajrish Hospital in Tehran. The average age of patients and control subjects were 48±8 and 43±6 years, respectively. After blood sampling and DNA extraction, genotyping of all samples were determined by PCR-RFLP method and the results were statistically analyzed using SPSS 19 software.

**Results:** After counting the genotypes, their percentages in the cancerous specimens and control group were AA (56.9%), GG (35.4%), AG / GA (7.6%) and AA (12.6%), GG (77.2%), AG / GA (10.1%), respectively. In addition, according to Hardy-Weinberg equilibrium, in cancer patients, the frequency of allele A was 60.7% and the frequency of allele G was 39.2% and in control group the frequency of allele A was approximately 21.5% and the frequency of allele G was calculated 82.3%. Statistically, a significant correlation was observed between the homozygotes of the two groups (P-Value <0.05).

**Conclusion:** The results showed that the E326K polymorphism in exon 8 of *SHBG* gene is associated with the risk of breast cancer and it may be a factor involved in it.

**Keywords:** Polymorphism E326K, Breast cancer, Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG), Gene

\*Corresponding author: Zahra Tahmasebi Fard, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Roudehen Branch, Roudehen, Iran.  
Tel: +982176505015  
Email: ztahnasebi@riau.ac.ir