مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs17859812 پروموتر ژن *MUC5AC* با خطر ابتلا به سرطان معده

مهدی مغنی باشی *

گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: ژن MU5AC با کد کردن یکی از موسین‌های اصلی ترکیب موکوس مخاط معده، نقش مهمی در حفظ مخاط معده در برابر فاکتورهای آسیب‌زا دارد و بیان آن در سرطان معده کاهش می‌یابد. با توجه به تأثیر چندشکلی‌های ناحیه پروموتری در بیان ژن‌ها، در این مطالعه ارتباط چندشکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه پروموتری ژن MU5AC با خطر ابتلا به سرطان معده بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد- شاهدی، ابتدا قسمتی از ناحیه پروموتر ژن *MUC5AC* با تکنیک PCR در ۵۰ فرد تکثیرشده و پس از توالی‌یابی، چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs17859812 انتخاب شد و بقیه افراد با تکنیک PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. درنهایت، نتایج با آزمون‌های آماری رگرسیون لجستیک و کای ۲ آنالیز شد.

نتایج: پس از توالی‌یابی و PCR-RFLP مشخص شد که آلل C در ناحیه -۲۲۱ پروموتر خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهد (P=۰/۰۰۸، ۰۹/۱۸-۳/۵، CI=۱/۶۶، OR) و ژنوتیپ CC با خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط دارد (P<۰/۰۰۱، ۰۹/۳۸-۲/۱۰، CI=۴/۶۶، OR). همچنین ژنوتیپ CC + CT خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهد (P=۰/۰۰۷، ۱/۴۵-۳/۷، CI=۲/۰۸، OR).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که آلل C در چندشکلی rs17859812 ژن *MUC5AC* با خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط دارد. ازآنجایی‌که این چندشکلی در مجاورت جایگاه اتصالی گیرنده گلوکوکورتیکوئید است، احتمالاً از این طریق بر بیان ژن *MUC5AC* و در استعداد افراد به سرطان معده تأثیر دارد.

کلمات کلیدی: ژن *MUC5AC*، مخاط معده، سرطان معده، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، rs17859812

مقدمه

علی‌رغم کاهش جهانی بروز سرطان معده و بهبود روش‌های تشخیص و درمان این بیماری، به دلیل تشخیص سرطان معده در مراحل پیشرفته، فقط کمتر از ۲۰٪ بیماران بعد از تشخیص، ۵ سال زنده می‌مانند (۱). بررسی آمارهای ۳۰ سال گذشته نشان می‌دهد که بروز سرطان معده در ایران از میانگین جهانی بالاتر بوده و علی‌رغم کاهش بروز سرطان معده در دنیا، بروز آن در ایران در حال افزایش است (۲).

سرطان معده یک بیماری چندعاملی است به‌طوری‌که آلودگی باکتریایی، فاکتورهای محیطی و فاکتورهای ژنتیکی میزبان در ابتلا به این سرطان نقش دارند (۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد که شروع سرطان و پیشرفت مراحل بعدی آن قویاً تحت تأثیر فاکتورهایی است که با توجه به زمینه ژنتیکی فرد تعیین می شود. اکثر تنوع ژنتیکی در انسان حاصل حضور چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) است که باعث می‌شوند افراد به فاکتورهای محیطی پاسخ‌های متفاوتی نشان دهند (۳).

از آن‌جایی‌که مخاط معده به‌طور مداوم با فاکتورها و مواد مضر زیادی هم چون اسید کلریدریک، نمک‌های صفراوی، الکل، دارو و مواد غذایی با طیف وسیعی از دما و اسمولاریته مواجه است، مکانیسم‌های حفظ تمامیت ساختاری مخاط معده باعث مقاومت بافت پوششی معده در برابر مواجه مکرر با فاکتورهای آسیب‌زا

*نویسنده مسئول: **مهدی مغنی باشی**، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون،ایران
Email: mehdimoghani@yahoo.com

می‌شود (۴). سدهای دفاعی شامل سطوح مختلف مخاطی است که از لومن معده شروع شده و به سطوح عمیق‌تر بافت معده حرکت می‌کند. یکی از سدهای مهم حفاظتی مخاط معده در مقابل فاکتورهای آسیب‌زا، سد موکوسی (موکوس- بیکربنات)، است که اولین سطح دفاعی مخاطی معده است و سطح مخاط را می‌پوشاند (۴).

موکوس کمپلکس لزج ترشحی و چسبنده‌ای است که توسط سلول‌های گابلت اختصاصی اپی تلیوم استوانه‌ای معده‌ای- روده-ای ساخته می‌شود و سطح آن‌ها را می‌پوشاند، موکوس علاوه بر نقش حفاظتی عملکردهای متنوع دیگری ازجمله تسهیل عبور مواد، حفظ یک‌لایه آبی روی اپی‌تلیوم، یک سد برای پاتوژن‌ها و مواد مضر و یک‌لایه ژلی قابل‌نفوذ برای تبادل گازها و مواد با اپی‌تلیوم زیر آن را بر عهده دارد (۵).

٪ ۹۵حجم موکوس را آب تشکیل می‌دهد اما مهم‌ترین ترکیب موکوس که مسئول خصوصیات ویسکوزی و ارتجاعی ژل‌مانند آن است، موسین‌ها می‌باشند (۵). موسین‌ها گلیکوپروتئین‌های پیچیده‌ای هستند که توسط سلول‌های اپی‌تلیالی سطحی معده (و دیگر اندام‌ها) ساخته می‌شوند و مشخصه آن‌ها وزن مولکولی و محتوای کربوهیدراتی (۶) است که ۲۰٪ وزن آن‌ها را بخش پروتئینی و ۸۰٪ باقی‌مانده را کربوهیدرات‌ها تشکیل می‌دهد (۵).

تاکنون ۲۱ ژن کدکننده موسین در انسان شناسایی، کلون و به‌طور جزئی توالی‌یابی شده است که بعضی از این ژن‌ها، موسین-های ترشحی مثل *MUC7, MUC5AC, MUC2, MUC5B* و *MUC6* و بعضی از آن‌ها موسین‌های غشایی مثل *MUC3A, MUC1, MUC3B, MUC4, MUC16, MUC17, MUC12* و *MUC13*را کد می‌کنند (۷). موسین‌های ترشحی با ایجاد پیوندهای دی سولفیدی، ساختارهای الیگومری تشکیل می‌دهند که در ساختار ژل‌مانند موکوس نقش دارد.

در موکوس معده موسین‌های ترشحی *MUC5AC*، *MUC6* و موسین غشایی *MUC1* بیان می‌شوند (۸). یکی از تغییرات ژنتیکی که در سرطان معده دیده می‌شود کاهش بیان ژن‌های *MUC5AC* و *MUC6* است که در مطالعات متعدد گزارش شده است (۹، ۱۰ و ۱۱).

ژن *MUC5AC* بر روی کروموزوم ۱۱ قرار گرفته است. در ناحیه پروموتری ژن *MUC5AC* توالی‌های تنظیمی متعددی وجود دارد و مسیرهای تنظیمی constitutive و regulated اثر خود را از طریق این توالی‌ها اعمال می‌کنند، تغییرات نوکلئوتیدی در این نواحی می‌تواند بر بیان این ژن تأثیر داشته باشد (۱۲ و ۵). مطالعه‌های متعدد حاکی از ارتباط معنی‌دار چندشکلی پروموتر ژن‌های مختلف با انواع سرطان‌ها ازجمله سرطان معده است (۳، ۱۳ و ۱۴).

با توجه به اینکه موسین‌ها ترکیب اصلی موکوس است و گزارش‌های متعددی مبنی بر کاهش بیان ژن *MUC5AC* در سرطان معده وجود دارد، می‌توان این فرض را مطرح کرد که چندشکلی‌های ژنتیکی ناحیه پروموتری این ژن می‌تواند با خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط داشته و به‌عنوان مارکرهای مولکولی در غربالگری افراد مستعد ابتلا به سرطان معده استفاده کرد.

مواد و روش ها

پس از هماهنگی‌های لازم با بخش شیمی‌درمانی بیمارستان امید اصفهان و سازمان انتقال خون پس از اخذ رضایت‌نامه از افراد شرکت‌کننده از ۱۱۳ بیمار مبتلا به سرطان معده (تحت نظارت بیمارستان و توسط کارکنان بیمارستان) و ۱۱۶ فرد سالم (مرد و زن) ۵ سی‌سی نمونه خون در لوله‌های حاوی ۷۰ µl از M EDTA ۰/۲۵ جمع‌آوری شد و به همراه پرسش‌نامه که برای هر فرد تکمیل شده بود، به آزمایشگاه منتقل و نمونه‌ها در دمای ˚C ۲۰- نگهداری شد تا استخراج DNA انجام گیرد. قابل‌ذکر است که در این مطالعه برای طبقه‌بندی نوع سرطان معده بیماران از سیستم Lauren استفاده شد که اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط ارائه شد و اساس آن ظاهر بافتی تومور است. بر این اساس، سرطان معده به دو نوع intestinal و diffuse تقسیم‌بندی می-شود (۸ و ۱۱) و به‌طور گسترده توسط دانشمندان اپیدمیولوژی و ژنتیک استفاده می‌شود.

پس از استخراج DNA با روش salting out (۱۵)، بر اساس توالی‌های موجود در مقالات و سایت معتبر NCBI و با استفاده از نرم‌افزار OLIGO، برای تکثیر ناحیه پروموتری ژن *MUC5AC* یک جفت پرایمر با توالی‌های F 5-TGTGCTCTCTCTCTAGGCATC-3 و R 5-CAACACTCATTGTGTGGACGG-3 طراحی گردید. به‌منظور اطمینان از اختصاصیت توالی پرایمرها، از طریق سایت NCBI و به کمک نرم‌افزار BLAST، توالی پرایمرها کنترل شد. پرایمرها توسط شرکت سیناژن سنتز گردید.

مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر (۱۰X) AMS buffer (سیناژن، ایران)، ۰/۹ میکرولیتر (۵۰ mM) $MgCl_2$ (سیناژن، ایران)، ۰/۶ میکرولیتر

dNTP (۴۰ mM) (سیناژن، ایران)، ۱/۲ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ pmol)، ۱/۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۵۰ نانوگرم)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز (۵ Unit) (سیناژن، ایران) و ۲۱/۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود.

تکنیک PCR طی مراحل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل (۹۴ °C به مدت یک دقیقه، ۶۱/۲°C به مدت یک دقیقه، ۷۲ °C به مدت یک دقیقه) و طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بهینه شد.

توالی‌یابی

صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد تأیید شد (برای رنگ‌آمیزی ژل از DNA Stain ساخت شرکت کیاژن استفاده شد که یک ماده ایمن برای رنگ‌آمیزی نوکلئیک اسید است). پس از اطمینان از صحت انجام PCR، ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه را درون تیوب‌های ۰/۲ ml کدگذاری کرده، درب تیوب‌ها با پارافیلم بسته شده و توالی‌یابی با پرایمر Reverse توسط شرکت زیست پیشگام انجام شد.

تکنیک PCR–RFLP

برای تعیین ژنوتیپ چندشکلی rs17859812 در ژن *MUC5AC* از تکنیک RFLP-PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا پرایمر-های جدید با توالی F:5-AAGGTCGGCAGCTCCACT -3 و R: 5-GCTCCAGCCCCGTGCTTC-3 طراحی گردید و ناحیه‌ای از پروموتر که دربرگیرنده SNP موردنظر بود، با تکنیک PCR تکثیر شد. مواد و مقادیر استفاده شده و همچنین برنامه PCR مثل حالت قبل بود با این تفاوت که دمای Annealing آن ۶۷ °C است. سپس برای شناسایی ژنوتیپ‌های چندشکلی rs17859812 ژن MUC5AC از آنزیم محدودگر *BcnI* (CCSGG که در جایگاه S می‌تواند یکی از دو باز C یا T باشد که اگر C باشد برش داده می‌شود) استفاده شد. برای تیمار با آنزیم اشاره شده از آب مقطر دوبار استریل (۹ میکرولیتر)، 10X buffer R (۱ میکرولیتر)، محصول PCR (۵ میکرولیتر) و آنزیم محدودگر (۱ میکرولیتر برابر با ۱ واحد آنزیم) مورد نظر در تیوب ۰/۵cc مخلوط کرده و به حجم ۱۶ µl رسانده و به مدت ۳ ساعت در بن‌ماری با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با توجه به‌اندازه قطعات، ژنوتیپ‌های هر فرد مشخص شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

آنالیز نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 20.0 و با آزمون‌های آماری رگرسیون لجستیک و X^2 با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ > انجام شد.

نتایج

در این مطالعه درمجموع ۷۹ مرد و ۳۴ زن مبتلا به سرطان معده و ۸۰ مرد و ۳۶ زن به‌عنوان گروه کنترل شرکت داشتند که طیف سنی افراد بیمار ۸۵-۲۶ سال و گروه کنترل ۸۳-۲۶ بود. با توجه به اینکه گروه بیمار و گروه سالم ازنظر سنی باهم جور شده بودند ازنظر میانگین سنی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. مشخصات جمعیت مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

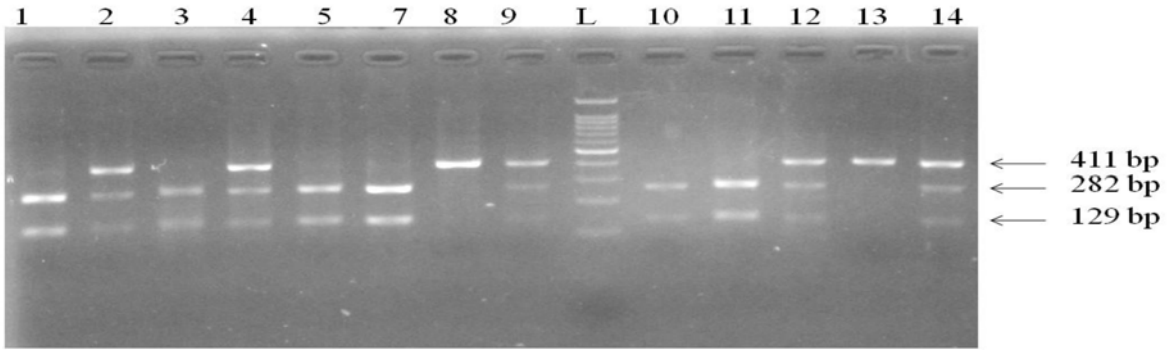
با توجه به تفاوت ژنتیکی جمعیت‌های مختلف، به‌منظور شناسایی چندشکلی‌های جدید در پروموتر ژن *MUC5AC*، در این مطالعه ابتدا قسمتی از پروموتر ژن MUC5AC با استفاده از تکنیک PCR در ۲۵ فرد بیمار و ۲۵ فرد سالم تکثیر گردید و طبق انتظار باند اختصاصی ۶۸۰ bp تکثیر گردید. پس از تکثیر نواحی مورد نظر، توالی‌یابی (Sequencing) انجام شد و با استفاده از نرم‌افزار Chromas و بررسی چشمی پیک‌ها به‌منظور تائید صحت نتایج توالی‌یابی، توالی نمونه‌ها مشخص گردید و درنهایت با استفاده از نرم‌افزار Seqman، ترادف نمونه‌های توالی‌یابی شده با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که چندشکلی‌های مشاهده شده با چندشکلی‌های گزارش شده در سایت NCBI مطابقت دارد و SNP جدیدی مشاهده نمی‌شود.

پس از توالی‌یابی و عدم مشاهده SNP جدید در جمعیت مورد مطالعه، بر اساس فراوانی آللی و نزدیک بودن به ناحیه شروع رونویسی، از چندشکلی‌های گزارش شده در سایت NCBI چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs17859812 که در موقعیت ۲۲۱- ژن قرار گرفته است و دارای MAF=0.37 است، انتخاب شد.

همچنین برای تعیین ژنوتیپ چندشکلی rs17859812 در ژن *MUC5AC* پرایمر Forward و Reverse جدید طراحی گردید و ناحیه‌ای از پروموتر که دربرگیرنده SNP مورد نظر بود، با تکنیک PCR تکثیر شد که طبق انتظار باند ۴۱۱ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱ چاهک ۸ و ۱۳). سپس محصول PCR با آنزیم *BcnI* تیمار گردید. با توجه به شکل ۱ وجود باندهای ۲۸۲/۱۲۹، ۲۸۲/۱۲۹/۴۱۱ و ۴۱۱ به ترتیب نشان‌دهنده ژنوتیپ های CC، CT و TT است.

جدول ۱- مشخصات جمعیت موردمطالعه

مشخصات	گروه شاهد	گروه بیمار
تعداد نمونه‌ها	۱۱۶	۱۱۳
جنسیت		
مرد	۸۰	۷۹
زن	۳۶	۳۴
سن (سال)		
دامنه سنی	۲۶-۸۳	۲۶-۸۵
میانگین سن ± انحراف معیار	۵۷/۸۸ ± ۱۲/۸۷	۵۸/۶۱ ± ۱۴۱۲
میانگین سن بروز ± انحراف معیار	-	۵۶/۴۳ ± ۱۱/۱۱
میانگین سن بروز در مردان ± انحراف معیار	-	۵۶/۶۰ ± ۱۱/۳۵
میانگین سن بروز در زنان ± انحراف معیار	-	۵۶ ± ۱۰/۷۲
نوع سرطان معده		
Intestinal	۰	۴۷
Diffuse	۰	۲۲
نامشخص	۰	۴۴
تعداد افراد مبتلا به زخم معده		
مردان	۰	۳۵
مردان نامشخص		۲۳
زنان	۰.	۸
زنان نامشخص	۰	۱۱



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR تیمار شده با آنزیم محدودگر BcnI. وجود باندهای ۲۸۲/۱۲۹ جفت بازی در چاهک‌های ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۱ نشان دهنده ژنوتیپ CC است. وجود باندهای ۲۸۲/۱۲۹/۴۱۱ جفت بازی در چاهک‌های ۲، ۴، ۹، ۱۲ و ۱۴ نشان‌دهنده ژنوتیپ CT است. وجود باند ۴۱۱ جفت بازی در چاهک ۸ و ۱۳ نشان‌دهنده ژنوتیپ TT است.

قابل‌ذکر است که ژنوتیپ‌های مختلف از نمونه‌های توالی‌یابی شده، با تکنیک PCR-RFLP نیز بررسی شد. همپوشانی نتایج توالی‌یابی و PCR-RFLP تائید کننده صحت نتایج حاصل از آزمایش‌ها است. همچنین برای تائید صحت عملکرد آنزیم محدودگر، ۱۰ درصد آزمایش‌های PCR-RFLP تکرار شد که نتایج یکسان به دست آمد.

نتایج نشان داد که فراوانی آلل T در بیماران و گروه کنترل به ترتیب ۵۷ و ۷۵ درصد است و فراوانی آلل C در بیماران و گروه

کنترل به ترتیب ۴۳ و ۲۵ درصد است. آنالیز آماری نشان داد که آلل C به‌عنوان آلل خطرساز بوده و سرطان معده را ۲/۲۶ برابر افزایش می‌دهد (P=۰/۰۰۸، CI=۱/۴-۲۴/۱۲). فراوانی ژنوتیپ-ها در افراد بیمار و کنترل در جدول ۲ مشاهده می‌شود. فراوانی ژنوتیپی در گروه شاهد (X^2=۲/۷۹، df=۱، p >۰/۰۵) در تعادل هاردی- واینبرگ بود اما گروه بیمار (p<۰/۰۵ ، df=۱، X^2=۱۶/۷۴) در تعادل هاردی- واینبرگ نشان نداد.

ارتباط چندشکلی rs17859812 ژن *MUC5AC* با خطر ابتلا به سرطان معده بررسی گردید و نتایج آن در جدول ۲ مشاهده می‌شود. نتایج این بررسی نشان داد که بین این چندشکلی و خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط معنی‌داری وجود دارد و ژنوتیپ CC با خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱، CI=۲/۱۰-۰۹/۳۸، OR= ۴/۶۶). همچنین ژنوتیپ CC + CT خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهد (P=۰/۰۰۷، CI=۱/۳-۲۱/۴۹، OR= ۲/۰۸). همچنین ارتباط چندشکلی rs17859812 ژن*MUC5AC* با خطر ابتلا به سرطان معده در جمعیت زنان و مردان به‌طور جداگانه بررسی گردید. نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ CC خطر ابتلا به سرطان معده در مردان (P=۰/۰۰۲، CI=۱/۱۱-۷۱/۶۷، OR= ۵) و زنان (P=۰/۰۳، CI=۱/۲۱-۱۶/۴۲، OR= ۴/۴۸) را افزایش می‌دهد.

ارتباط ژنوتیپ‌های چندشکلی rs17859812 ژن *MUC5AC* با نوع سرطان معده در جمعیت بیمار بررسی گردید و نتایج نشان داد که ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

بحث و نتیجه گیری

یکی از سرطان‌های شایع که پیش‌آگهی ضعیف و به‌تبع آن مرگ‌ومیر بالایی دارد، سرطان معده است. علی‌رغم کاهش بروز و مرگ‌ومیر سرطان معده طی ۷۰ سال گذشته، این سرطان چهارمین سرطان شایع در دنیا و دومین علت مرگ‌ومیر به دلیل سرطان است (۲ و ۱۶) و سالیانه ۷۰۰۰۰۰ نفر به دلیل سرطان معده می‌میرند (۱۷).

معده با شرایط سخت مثل اسید معده، پاتوژن‌ها و انواع آسیب-ها مواجه است و برای محافظت سلول‌های دیواره معده از این آسیب‌ها سدهای متفاوتی وجود دارد که یکی از آن‌ها سنتز

جدول ۲- ارتباط چندشکلی rs17859812 ژن *MUC5AC* با خطر ابتلا به سرطان معده

ژنوتیپ	گروه شاهد	گروه بیمار	OR (95% CI)	P
TT	70	48	1 (reference)	-
CT	36	33	1.33 (0.73-2.43)	0.34
CC	10	32	4.66 (2.09-10.38)	< 0.001

پروتئین‌های موسین ازجمله *MUC5AC* توسط سلول‌های اپی-تلیالی سطحی یا غده‌های واقع در بافت پیوندی زیر مخاطی معده است. موسین‌ها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که با ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی، ساختارهای الیگومری تشکیل می‌دهند و در تشکیل موکوس پوشاننده سطح مخاط معده نقش مهمی دارد (۱۲).

بیان ژن‌های موسین، اختصاصی سلول-بافتی است و سنتز آن-ها تحت کنترل مسیرهای constitutive و regulated است. مسیر constitutive مسئول ساخته شدن مداوم و مقدار پایه موسین‌هاست تا لایه مخاطی را محافظت کند درحالی‌که مسیر regulated در پاسخ به محرک‌های محیطی یا فیزیولوژیک، باعث بیان مقدار زیاد موسین‌ها می‌شود (۱۲).

علی‌رغم مطالعات زیادی که در ارتباط با بررسی بیان ژن *MUC5AC* در سرطان معده انجام گرفته است ارتباط چندشکلی‌های ناحیه پروموتری این ژن و سرطان معده بررسی نشده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ CC در پلی‌مورفیسم rs17859812 ناحیه پروموتر ژن *MUC5AC* خطر ابتلا به سرطان معده را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. همچنین ژنوتیپ CC + CT خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهد و آلل C به‌عنوان آلل خطر به‌طور معنی‌داری با خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط دارد.

تا به امروز، چندین مطالعه اپیدمیولوژیکی ارتباط چندشکلی-های ژن *MUC5AC* با خطر ابتلا به سرطان معده را بررسی

کرده‌اند. در مطالعه‌ای که Jia و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی جمعیت لهستان انجام دادند، گزارش کردند که سه چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs868903، rs2014486 و rs2735733 که در ناحیه '۳ ژن *MUC5AC* قرار دارند با سرطان معده ارتباط معنی-داری وجود دارد (۱۸).

همچنین در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای که توسط Wang و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که چندشکلی طولی نواحی تکراری در ناحیه مجاور پروموتر ژن *MUC5AC* با سرطان معده ارتباط دارد (۱۹) که نتایج هر دو مطالعه در راستای نتایج مطالعه حاضر است.

تاکنون ۱/۶ kb از پروموتر ژن *MUC5AC* منتشر شده است (Gen Bank accession number: AF016834) و مشخص شده است که این ناحیه حاوی جایگاه‌های اتصالی برای فاکتورهای رونویسی SP1، AP-2، گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید (GR)، PEA3 و NF-kappaB است (۲۰ و ۲۱).

علاوه بر این Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که دو چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs3793946 و rs11040869 در ژن *MUC5AC* با خطر ابتلا به سرطان معده غیر کاردیا نقش دارد (۲۲). همچنین Kocer و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که بیان ژن *MUC5AC* می‌تواند با آلودگی H.*Pylori* ارتباط داشته باشد (۲۳).

چندین جایگاه اتصالی فرضی برای گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدها در پروموتر ژن *MUC5AC* شناسایی شده است (۱۲). در ارتباط با نقش گلوکوکورتیکوئیدها بر بیان ژن‌های *MUC* چندین مطالعه صورت گرفته است. به‌طوری‌که نشان داده شده است که دگزامتازون بیان ژن *MUC5AC* را در سلول‌های اندومتریوم افزایش می‌دهد اما در سلول‌های NCI-H292 ریه بیان این ژن را کاهش می‌دهد. همچنین مشخص شده است که ژن *MUC5AC* با استروژن افزایش بیان دارد اما در مقابل پروژسترون تأثیری نشان نمی‌دهد (۱۲).

با توجه به اینکه چندشکلی rs17859812 در ناحیه‌ای قرار دارد که دو توالی تنظیمی پاسخ‌دهنده به گیرنده گلوکوکورتیکوئید (GRE) وجود دارد می‌تواند در تنظیم بیان این ژن نقش داشته باشد. با توجه به نقش مهم *MUC5AC* در ترکیب موکوس مخاط معده و محافظت از دیواره معده و نواحی تنظیمی متعدد در ناحیه پروموتری این ژن به نظر می‌رسد چندشکلی‌های این ژن نقش مهمی در فرایند سرطان‌زایی معده داشته باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات دیگر با تعداد نمونه‌های بیشتر و در جمعیت‌های دیگر این مطالعه صورت گیرد و در صورت به دست آمدن نتایج مثبت می‌توان از این چندشکلی در غربالگری استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون با کد ۵۱۵۲۳۸۷۱۲۰۹۰۰۷ (سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی) است. در پایان از سرکار خانم دکتر محمدی نژاد بابت همکاری صمیمانه در پیشبرد این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenter. 2006;12(19):2979-2990.
2. Khalighinejad N, Hariri H, Behnamfar O, Yousefi A, Momeni A. Adenoviral gene therapy in gastric cancer: A review. World J Gastroenterol. 2008;14(14):180-184.
3. Wang D, Sadee W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). The AAPS Journal. 2006;8(3) E515-20.
4. Tulassay Z, Herszenyi L. Gastric MUCosal defense and cytoprotection. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2010;24(2):99-108.
5. Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2006;11(2-3):164-170.
6. Callaghan MR, Voynow JA. Respiratory tract MUCin genes and MUCin glycoproteins in health and disease. Physiol Rev. 2006;86(1):245-278.

7. Tan Sh, Cheng PW. MUCin Biosynthesis Identification of the cis-Regulatory Elements of Human C2GnT-M Gene. AJRCMB. 2007;36(6).737-45.
8. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006;12(3) 354-362.
9. Stock M and Otto F. Gene deregulation in gastric cancer. Gene. 2005;360(1) 1 – 19.
10. Ho SB, Shekels LL, Neil WT, Young SK, Lyftogt C, et al. MUCin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. Cancer Res. 1995;55(12) 2681-2690.
11. Babu SD, Jayanthi V, Devaraj N, Reis CA, Devaraj H. Expression profile of MUCins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in Helicobacter pylori infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium.Mol Cancer. 2006:19(5)10.
12. Seuningen IV, Pigny P, Perrais M, Porchet N, Aubert JP. Transcriptional regulation of the 11p15 MUCin genes. Toward new biological tools ion human therapy, in inflammatory diseases and cancer? Front. Biosci. 2001;1(6):1216-1234.
13. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X,et al. Interleukin-10 -1082 promoter polymorphism associated with gastric cancer among Asians. Eur J Cancer. 2008;44(17):2648–2654.
14. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Shoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. Gastroenterology. 2003;124(5):1193–201.
15. Miller S, Dykes D. Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids Res. 1988;16(3):1215.
16. Cervantes A,Rodríguez Braun E, Pérez Fidalgo, Chirivella González I, Molecular biology of gastric cancer. Clin Transl Oncol, 2007 Apr, 9 (4):208-215.
17. Taghavi N, Nasrollahzadeh D, Merat Sh, Yazdanbod A, Hormazdi M, Sotyoudeh M, et al. Epidemiology of upper gastrointestinal cancers in Iran: A sub site analysis of 761 cases. World J Gastroenterol. 2007;13(40):5367-5370.
18. Jia Y, Persson C, Hou L, Zheng Z, Yeager M, Lissowska J, et al. A comprehensive analysis of common genetic variation in MUC1, MUC5AC, MUC6 genes and risk of stomach cancer. Cancer Causes Control. 2010;21(2):313–321.
19. Wang C, Wang J, Liu Y, Guo X, Zhang C. MUC5AC upstream complex repetitive region length polymorphisms are associated with susceptibility and clinical stage of gastric cancer. PLoS One. 2014;9(6).e98327
20. Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. J Biol Chem. 1998;273(12):6812-6820.
21. Young HW, Olatunji W, Williams OW, Chandra D, Bellinghausen LK, Perez G, et al. Central Role of Muc5ac Expression in Mucous Metaplasia and Its Regulation by Conserved 59 Elements. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2007;37(3):273-290.
22. Zhou CJ, Zhang LW, Gao F, Zhang B, Wang Y, Chen DF,et al. Association analysis of common genetic variations in MUC5AC gene with the risk of non-cardia gastric cancer in a Chinese population. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(10):4207-10.
23. Kocer B, Ulas M, Ustundag Y, Erdogan S, Karabeyoglu M, Yldrim O. A confirmatory report for the close interaction of Helicobacter pylori with gastric epithelial MUC5AC expression. J Clin Gastroenterol. 2004;38(6) 496-502.

Original Article

Investigating the Association between rs17859812 Polymorphism in *MUC5AC* Gene Promoter and Risk of Gastric Cancer

Moghanibashi M*

Department of Genetics, School of Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Received: 31 Jan 2017 Accepted: 11 Oct 2017

Abstract

Background & Objective: MU5AC gene plays a key role in the maintenance of gastric mucosa against harmful factors in the stomach through encoding a main mucin of mucus lining gastric mucosa and its expression is reduced in the gastric cancer. In this study, due to the effect of genetic polymorphisms in the promoter region on the gene expression, the association between single nucleotide polymorphism of MU5AC gene promoter and the risk of gastric cancer was assessed.

Materials & Methods: in this case-control study, a fragment of MUC5AC gene promoter was amplified by PCR technique in 50 individuals and rs17859812 single nucleotide polymorphism was selected by sequencing, and other subjects were genotyped using PCR-RFLP method. Finally, logistic regression and chi-square tests were used for data analysis.

Results: Following sequencing and PCR-RFLP, the findings showed that allele C in the -221 of the promoter increased the risk of gastric cancer (OR= 1.66, CI= 3.09-5.18, p = 0.008) and CC genotype increased the risk of gastric cancer (OR= 4.66, CI= 2.09-10.38, p< 0.001). Also, CC + CT genotypes increased the risk of gastric cancer (OR=2.08, CI= 3.1-7.45 p= 0.007).

Conclusion: The results of this study showed that allele C in the rs17859812 polymorphism of the MUC5AC gene is associated with the risk of gastric cancer. As this polymorphism is located in the vicinity of the glucocorticoid receptor binding site, it may affect the MUC5AC gene expression and may result in gastric cancer susceptibility.

Key Words: MUC5AC Gene, Gastric Mucosa, Gastric Cancer, Single Nucleotide Polymorphism, rs17859812.

***Corresponding Author: Mehdi Moghanibashi,** Department of Genetics, School of Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

Email: mehdimoghani@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2018): 530-537