

## پلی مورفیسم ژنتیکی در گیرنده استروژن آلفا (rs1801132) و خطر ابتلا به سرطان پستان در ایران

<sup>۱</sup> سکینه عباسی: استاد یار دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پیرا پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی. سیروس عظیمی: دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، انیستیتو کانسر، بخش ژنتیک پزشکی. سمیرا کلباسی: DVM. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماران ایرانی مبتلا به سرطان سینه نسبتاً جوان تر از همتهای غربی خود هستند. شواهد حاکی از آن است که تغییرات در مسیرهای سیگنالینگ استروژن، از جمله گیرنده استروژن آلفا ( $ER-\alpha$ )، در طول ایجاد سرطان پستان در سفیدپوستان نقش مهمی دارد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که الگوهای سن بروز سرطان پستان در آسیایی ها با سفیدپوستان متفاوت است. بنابراین داده های ژنومی در  $ER-\alpha$  هر دو جمعیت متفاوت بوده و از ارزش خاصی در شناخت منشا ژنتیکی و بالینی سرطان پستان در ایران بر خوردار است.

**مواد و روش ها:** مطالعه ای از نوع مورد- شاهد به منظور ایجاد یک پایگاه داده ها از پلی مورفیسم های  $ER-\alpha$  در جمعیت زنان ایرانی (آسیایی- قفقازی) به منظور مقایسه با جوامع غربی و آسیایی در توزیع و ارزیابی پلی مورفیسم به عنوان یک شاخص ژنتیکی - بالینی انجام شد. نمونه DNA از زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره) (۱۵۰ نفر) و از افراد سالم (۱۴۷ نفر گروه شاهد سالم) آماده شد و سپس جهت آنالیز ژنتیکی از روش PCR تک رشته پلی مورفیسم (SSCP-PCR) استفاده شد.

**نتایج:** در کدان ۳۵۲ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) rs1801132 (CCG→CCC) مشاهده شد، که پیش از این نیز در مطالعات انجام شده در جوامع غربی و شرقی، اما در فراوانی های بسیار متفاوت گزارش شده بود. فراوانی آلل (CCG) در کدان ۳۲۵ در بیماران مبتلا به سرطان پستان (۳۹/۶٪) بالاتر از افراد شاهد (۲۸/۹٪؛  $P=0/007$ ) همچنین فراوانی آلل (CCG) با بروزمتاستاز در غدد لنفاوی نیز ارتباط قابل توجهی را نشان داد.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان می دهد که پلی مورفیسم  $ER-\alpha$  در کدان ۳۲۵ اگزون ۴ با جنبه های مختلف سرطان پستان در ایران ارتباط مستقیم دارد. ژنوتیپ  $ER-\alpha$ ، به عنوان یک عامل تعیین کننده در طی ارزیابی های پیش از عمل جراحی بوده و می تواند شاخص مهمی جهت پیش بینی متاستاز گره های لنفاوی در سرطان پستان باشد.

**کلید واژه:** سرطان پستان، متاستاز گره های لنفاوی، پلی مورفیسم،  $ER-\alpha$ ، SSCP-PCR.

## مقدمه

سرطان پستان، بالاترین درصد مرگ و میر ناشی از سرطان را در میان زنان در اکثر نقاط جهان، از جمله ایران داراست. تنوع جغرافیایی در شیوع و میزان مرگ و میر ناشی از سرطان پستان نشان می دهد که عوامل خطر شناخته شده سرطان پستان ممکن است در نقاط مختلف جهان متفاوت باشد.

عوامل محیط زیست از اهمیت بیشتری نسبت به فاکتورهای ژنتیکی برخوردار می باشد (۱). به عنوان مثال، در ایران نشان داده شده است که، زنان جوان در میزان خطر نسبتاً بیشتری برای ابتلا به سرطان پستان نسبت به هم‌تایانشان در غرب قرار دارند. (۲ و ۴). سرطان پستان به طور معمول ناشی از تغییر در سلول های اپیتلیال مجرای غدد پستانی می باشد (۵، ۶). این سلول ها دارای گیرنده های استروژن (ERS) بوده، که پاسخ به استروژن تخمدانی منجر به رشد طبیعی غده پستانی می گردد. فعال سازی ER توسط استروژن به نوبه خود باعث فعال شدن رونویسی ژنهای مختلفی که در تکثیر سلولی نقش دارند می گردد. نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض استروژن خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می دهد که این افزایش با مدت زمان قرار گرفتن در معرض استروژن نسبت مستقیم دارد (۷). محققان دریافته اند که ژن های ERs با گوناگونی های متفاوتی در تومورهای پستان یافت می شود. و بیمارانی با ERs+ بهتر از سایر بیماران به درمان هورمونی پاسخ می دهند [8]. بطوریکه روشهای سنجش ایمونو هیستولوژیکی بیان ژن ER در بافت تومور به طور گسترده ای در روشهای سنجش بالینی مورد استفاده قرار میگیرد. ER- $\alpha$  در سلولهای مجرای اپیتلیوم طبیعی و یا سرطانی ولی نه در همه سلول های استرومای پستان بیان می شود و به نظر میرسد در بروز سرطان پستان نقش مهمی داشته باشد (۹).

ER- $\alpha$  یکی از مهم ترین واسطه ها در روند پاسخ هورمونی در بافت های حساس به استروژن مانند پستان (۱۰) است که نقش حیاتی در رشد و تمایز و همچنین در روند سرطانی شدن پستان دارد (۱۱) ژن ER- $\alpha$  انسان روی کروموزوم ۶ q24-q27 با ۸ اگزون و وزن مولکولی kb140 (۱۲) قرار دارد. تحقیقات نشان می دهد که جهش و پلی مورفیسم ژنهای مرتبط با سرطان در پیش بینی و پیش آگهی تشکیل تومور از اهمیت خاصی برخوردار است (۹). در حال حاضر اطلاعات کمی در مورد بیان ژن، میزان موتاسیون و گوناگونی آلههای ژن ER- $\alpha$  در سرطان پستان در میان جوامع آسیایی - قفقازی هموجود است. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی پلی مورفیسم rs1801132 در ژن ER- $\alpha$  در میان زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان به منظور ایجاد یک پایگاه ژنتیکی داده ها در جمعیت ایران است. و همچنین ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن ER- $\alpha$  و ویژگی های مختلف بالینی قابل مشاهده در سرطان پستان در زنان ایرانی، و ارزیابی اثر این پلی مورفیسم در میزان خطر ابتلا به سرطان پستان را برای اولین بار مورد مطالعه قرار می دهد.

## روش ها

## جامعه مورد مطالعه

مطالعه مذکور مورد- شاهدهی و از اردیبهشت ماه ۱۳۸۵ تا دی ماه ۱۳۸۹ بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان (۱۵۰ نفر) و عمدتاً ساکن تهران که به تازگی تشخیص داده شده بودند انجام گرفت. شرط ورود آنها به این مطالعه تایید آزمایشات پاتولوژیک در تشخیص سرطان پستان در مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره) پس از معاینات بالینی بود. گروه شاهد (۱۴۷ نفر) زنان سالم بدون سابقه سرطان پستان و یا هر بیماری بدخیم دیگری بودند. بعلاوه هیچ یک از بستگان درجه اول وی سابقه سرطان پستان نداشته باشد (۱۴). زنانی که در طول زندگی هیستریکتومی، یائسگی مصنوعی داشته و یا در معرض هر نوع اشعه و شیمی درمانی قرار داشته اند از مطالعه حذف شدند. شایان ذکر است که تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه و قبل از ورود به این تحقیق ملزم به مطالعه و امضای رضایت نامه کتبی آگاهانه گردیدند.

اطلاعات جمعیتی و عوامل خطر ابتلا با استفاده از پرسشنامه کوتاه ساختاری از جمله اطلاعات مربوط به سن، وزن، قد، نژاد، مذهب، وضعیت تأهل، تعداد حاملگی و تعداد فرزندان، سن در تولد اولین فرزند، مدت متوسط دوره شیردهی، سابقه خانوادگی سرطان پستان (بستگان درجه اول)، سن شروع قاعدگی، سن ازدواج، وضعیت یائسگی، سن یائسگی، گروه های خونی ABO و Rh، نژاد، سن شروع سرطان پستان، متاستاز غدد لنفاوی، مرحله سرطان در زمان آزمایش بیان ژن  $ER-\alpha$  در بافت سرطان پستان جمع آوری شد. نمونه های خون محیطی از هر دو گروه مورد و شاهد جمع آوری و تا زمان انجام آزمایشات و تجزیه و تحلیل‌های ژنومی در  $20^{\circ}C$  ذخیره شد.

غربالگری پلی مورفیسم  $rs1801132$  ژن  $ER-\alpha$  توسط روش  $PCR$ - پلی مورفیسم تک رشته ( $SSCP$ ):

به منظور شناسایی میزان پلی مورفیسم  $rs1801132$  در جامعه ایران، همه نمونه ها با استفاده از روش  $SSCP$ - $PCR$  غربالگری شدند. در این مرحله در مجموع ۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و تعداد ۱۴۷ نفر به عنوان گروه شاهد به منظور تعیین ارتباط این بیماری با پلی مورفیسم  $rs1801132$  غربال شدند. DNA از سلول های خون (طبق دستورالعمل کارخانه سازنده) با استفاده از کیت استخراج Plus-DNGTM Extraction Solution استخراج شد. سپس DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم) جهت آزمایشات  $PCR$  مورد استفاده قرار گرفت.

اگزون ۴ از ژن  $ER-\alpha$  با استفاده از مجموعه آغازگر های الیگونوکلوئیدی ذکر شده در مقاله Hsiao et al, 2004 با روش  $PCR$  تکثیر شد (۱۵).

#### Oligonucleotide sequences

#### Melting Temperature ( $^{\circ}C$ )

##### Forward primer: (336–357)

5'- ACCTGTGTTTTTCAGGGATACGA - 3' 58.5

##### Reverse primer: (705–686)

5' - GCTGCGCTTCGCATTCTTAC - 3' 65.5

تکثیر DNA به مدت ۳۰ دوره در  $30^{\circ}C$  ثانیه در دمای  $95^{\circ}C$ ،  $30^{\circ}C$  ثانیه در دمای  $58^{\circ}C$  و  $40^{\circ}C$  ثانیه در دمای  $72^{\circ}C$  انجام پذیرفت و سپس جهت جدایی رشته های DNA به روش  $SSCP$  از الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد در بافر ( $90\text{mM}$   $1^{-1}$  تریس-بورات و  $2\text{mM}$   $1^{-1}$  EDTA) و در ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۲ ساعت و سپس با ولتاژ ۲۵۰ به مدت ۲۴ ساعت در  $16^{\circ}C$  درجه سانتی گراد استفاده شد. پس از الکتروفورز، باندهای مشاهده شده با استفاده از ۱٪ نیترات نقره رنگ آمیزی شد. نمونه های بدست آمده از  $PCR$  که در روی ژل الگوی باندهای متفاوتی را نشان دادند جهت تعیین توالی ابتدا با پرایمر Forward، مستقیماً از روی ژل آگارز برداشته و با استفاده از کیت استخراج DNA، K0153 # Fermentas، آلمان استخراج شده و بطور مستقیم توسط big dye 3 (ABI 3130XL (16 capillaries) Sequencer و V3.1 Cycle Sequencing kit protocol Terminator تعیین توالی می گردد.

سپس به منظور تایید نتایج محصولات  $PCR$  پس از تصفیه با استفاده از کیت QIAquick PCR purification Kit (50)، با پرایمر Reverse مجدداً تعیین توالی شدند. QIAGEN cat. # 28104 آمریکا، با پرایمر Reverse مجدداً تعیین توالی شدند.

## تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون  $\chi^2$  به منظور بررسی تاثیر پلی مورفیسم بر ویژگی های سرطان پستان استفاده شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS جهت محاسبه Odds Ratio (ORs) با 95% confidence intervals (CIs) و همچنین بررسی میزان خطر ابتلای هر یک از عوامل خطر برای سرطان پستان (در حالیکه  $P > 0.05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد) انجام گرفت.

## نتایج

توزیع فراوانی ویژگی های دموگرافیک و عوامل خطر مهم در ایجاد سرطان پستان مطالعه کل جمعیت: سرطان پستان در مقابل گروه شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است. گروه مورد یا مبتلا به سرطان پستان ( $N = 150$ ) با میانگین سنی  $49/47 \pm 11/43$  سال و گروه شاهد ( $N = 147$ ) با میانگین سنی  $40/75 \pm 10/54$  سال بود. متوسط سن شروع قاعدگی، در گروه مورد  $12/94 \pm 1/62$  سال) نسبت به گروه شاهد ( $13/24 \pm 1/25$  سال) کمتر بود. سن ازدواج یکی دیگر از عوامل خطر در ابتلا به سرطان سینه نیز در گروه مورد (سن متوسط  $4/72 \pm 19/24$  سال) نسبت به گروه شاهد (سن متوسط  $22/14 \pm 4/56$  سال) کمتر بود.

غربالگری اگزون ۴ ژن  $ER-\alpha$  ۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۴۷ فرد سالم برای حضور هر نوع جهش توسط روش PCR-SSCP و تعیین توالی نشان داد که تنها یک نوع جهش ساکت (Silent mutation) از نوع پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی یا Single Nucleotide Polymorphism (SNP) در کدان ۳۲۵ در جمعیت مورد مطالعه ما وجود دارد (CCC → CCG) (dbSNP۱۲۸) rs 1801132، که در آن نوکلئوتید C به G تبدیل شده است (CCC و CCG هر دو کدان اسید آمینه پرولین می باشند).

مشاهده افراد با ژنوتیپ های مختلف نشان داد که این SNP از تعادل هاردی واینبرگ در هر دو گروه شاهد و بیمار ( $P < 0/05$ ) تبعیت می کند. و این در حالی است که تفاوت فراوانی این پلی مورفیسم در هر دوشکل هموزیگوت (CCC / CCC و CCG / CCG) و هتروزیگوت (CCG / CCC) در بیماران مبتلا به سرطان، در مقایسه با گروه شاهد ( $X^2 = 27/035$ ،  $P = 0/029$ ) معنی دار بود (جدول ۲).

در میان تمام عوامل خطر مورد مطالعه، سابقه خانوادگی سرطان پستان، متاستاز غدد لنفاوی (LN) و سن شروع قاعدگی، اختلاف آماری معنی داری بین ژنوتیپ های مختلف نشان داد. بررسی سابقه فامیلی سرطان پستان مثبت، نشان داد که در میان بیماران مبتلا به سرطان پستان با سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت غیرنرمال (CCG/CCG)، سه برابر (۳۶/۷ درصد) بیشتر از کسانی است که هیچ گونه سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول نداشتند (۱۲/۲٪). و بالعکس در میان بیماران مبتلا به سرطان پستان و با هیچ سابقه ای از سرطان پستان در فامیل درجه اول، فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (CCC/CCC)، شش برابر بالاتر از کسانی است با فامیل درجه اول مبتلا به سرطان پستان (به ترتیب ۳/۳٪ و ۵/۳٪) [ $X^2 = 10/587$ ،  $P = 0/005$ ]. برای عامل خطر متاستاز غدد لنفاوی، نتایج نشان داد که در میان بیماران مبتلا به سرطان پستان با متاستاز غدد لنفاوی، فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت غیر نرمال (CCG/CCG) (۴۷/۸٪)، نسبت به افراد بدون متاستاز LN (۹/۵٪) پنج برابر بالاتر است. و بالعکس در میان بیماران مبتلا به سرطان پستان و بدون متاستاز گره های لنفاوی، فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (CCC/CCC) نسبت به بیماران با متاستاز LN دو و نیم برابر بیشتر است (به ترتیب ۱۳٪ و ۳۰/۷٪) ( $X^2 = 22/349$ ،  $P = 0/001$ ).

مطالعه حاضر نشان داد که همانطوریکه انتظار آن نیز می رفت فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (CCC / CCC)، ۲۸/۰٪ در گروه مورد در مقابل ۵۳/۱٪ در گروه شاهد بود. ژنوتیپ هتروزیگوت نیز (CCG / CCC) فراوانی بالاتری در گروه مورد نسبت به گروه شاهد (به ترتیب ۵۶/۷٪ و ۳۶/۱ درصد) نشان داد. فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت غیر نرمال (CCG / CCG) نیز در گروه مورد (۱۵،۳٪) نسبت به گروه شاهد (۱۰/۸ درصد) بالاتر بود. شایان ذکر است تمامی تفاوت های آماری مشاهده شده معنی دار بودند ( $X^2 = 19/448$ ،  $P = 0/001$ ).

فراوانی آلل (CCG) در میان بیماران مبتلا به سرطان (۳۹/۶٪) نسبت به افراد شاهد (۲۸/۹٪)، در مقایسه با فراوانی آلل (CCC) (به ترتیب ۶۰/۴٪ و ۷۱/۱٪) افزایش قابل ملاحظه ای را نشان داد ( $X^2=7/345$ ,  $P=0/007$ ).

فراوانی آلل (CCG) به میزان قابل توجهی در بیماران مبتلا به سرطان با متاستاز غدد لنفاوی (۶۷/۴٪) در مقایسه با مورد مشابه ولی بدون متاستاز LN (۳۹/۴٪) بالاتر بود، و این در حالی است که فراوانی آلل نرمال (CCC) بطور قابل توجهی در بیماران مبتلا به سرطان با متاستاز LN (۳۲/۶٪) در مقایسه با مورد مشابه ولی بدون متاستاز LN (۶۰/۶٪) پایین تر بود ( $X^2=12/432$ ,  $P=0/001$ ).

فراوانی آلل غیر نرمال (CCG) در بیماران سرطانی با سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول بطور قابل ملاحظه ای بیش از مورد مشابه ولی بدون سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول نشان میدهد (به ترتیب ۶۵/۸٪ و ۴۰/۵٪). همچنین نتایج مشابه در فراوانی آلل نرمال (CCC) در بیماران سرطانی با سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول در مقایسه با مورد مشابه ولی بدون سابقه سرطان پستان در فامیل درجه اول بدست آمد به ترتیب ۳۴/۲٪ و ۵۹/۵٪ ( $X^2=8/657$ ,  $P=0/003$ ).

فراوانی آلل غیر نرمال (CCG) نیز در میان بیماران مبتلا به سرطان با سن شروع قاعدگی  $\geq 12$  سال (۵۵/۸٪) نسبت به افراد با سن شروع قاعدگی  $< 12$  سال (۶/۳۵٪) در مقایسه با فراوانی آلل نرمال (CCC) در مورد مشابه (۴۴/۲٪ و ۴۶/۴٪) به میزان قابل توجهی بالاتر بود که این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود ( $X^2=12/035$ ,  $P=0/001$ ).

هنگامی که فقط سرطان پستان در نظر گرفته شد، توزیع فراوانی ژنوتیپی کدان ۳۲۵ تفاوت معنی داری بین دو گروه مورد و شاهد نشان داد ( $P=0/001$ ). خطر برآورد شده برای گروه مورد (۶۱/۶٪) بیش از گروه شاهد (۳۸/۴٪) برای ژنوتیپ هتروزیگوت (CCG / CCC) برآورد شده برای گروه مورد (۵۹٪) بیش از گروه شاهد (۴۱٪) بود (OR 0/336، ۹۵ CI 0/202-0/558). و همچنین برای ژنوتیپ هموزیگوت غیر نرمال (CCG / CCG) هم خطر است که خطر برآورد شده برای ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (CCC/CCC) برای گروه شاهد (۶۵٪) و دو برابر بیش از گروه مورد (۳۵٪) بود.

در مطالعه فراوانی ژنوتیپی برای عامل خطر سن شروع قاعدگی کمتر از ۱۲ سال سن در مقایسه با بیش از ۱۲ سال سن، برای کدان ۳۲۵ ( $P=0/001$ ) اختلاف آماری معنی داری را نشان می دهد. فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت (CCC / CCG) برای افراد با سن شروع قاعدگی  $\geq 12$  سال (۵۷/۶٪) بود و برای افراد بالاتر از ۱۲ سال (۴۲/۴٪) (OR 0/179-0/008-0/162، ۹۵ CI 0/037، و فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت غیرنرمال (CCG/CCG) برای موارد مشابه به ترتیب ۳۹/۱٪ و ۶۰/۹٪ بود (یک و نیم برابر بیشتر) (OR 0/078، ۹۵ CI 0/015-0/404)، در حلیکه فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (CCC / CCC) برای موارد مشابه به ترتیب ۴/۸٪ و ۹۵/۲٪ (بسیار برابر بیشتر) مشاهده شد.

فراوانی ژنوتیپی در حضور و عدم حضور سابقه فامیلی درجه اول سرطان پستان، برای کدان ۳۲۵ ( $P=0/005$ ) نشان داد که فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت (CCC / CCG) برای افراد با سابقه فامیلی درجه اول، و برای کسانی که بدون سابقه خانوادگی سرطان پستان (۸۷/۱٪) (هفت برابر بیشتر) است (OR 0/102-1/316، ۹۵ CI 0/164، که این تفاوت از نظر آماری معنی دار نیز بود. و همچنین نتایجی مشابه برای فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت غیر نرمال (CCG / CCG) (به ترتیب ۳۰/۴٪ و ۶۹/۶٪) (دو برابر) به دست آمد (OR 0/056، ۹۵ CI 0/020-1/316)، درحلیکه در شرایط مشابه برای فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (CCC/CCC) به ترتیب ۲/۴٪ و ۹۷/۶٪ (چهل برابر) مشاهده شد.

علاوه بر این، تفاوت آماری معنی داری در حضور و عدم حضور متاستاز LN در ژنوتیپ های کدان ۳۲۵ ( $P=0/001$ ) به دست آمد. فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت (CCC / CCG) برای بیماران مبتلا با LN متاستاز ۱۰/۱۶٪ و برای بیماران مبتلا بدون LN متاستاز (۸۹/۴٪) (هشت برابر بیشتر) (OR 0/166-2/537، ۹۵ CI 0/650، و برای فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت غیرنرمال

هموزیگوت نرمال (CCC/CCC) که به ترتیب ۷/۱٪ و ۹۲/۹٪ (سیزده برابر بیشتر) مشاهده شد.  $ER-\alpha$  (CCG/CCG) ۴۷/۸٪ به ترتیب ۴۷/۸٪ و ۵۲/۲٪ (OR=۰/۰۸، CI 0/200-0/351) در مقایسه با برای فراوانی ژنوتیپ

#### بحث

نتایج نشان می دهد که پلی مورفیسم  $ER-\alpha$  در کدان ۳۲۵ آگزون ۴ با جنبه های مختلف سرطان پستان در ایران ارتباط مستقیم دارد. در میان انواع جهشهای DNA در ژن  $ER-\alpha$  تنها چند نوع به دلیل ارتباط بالقوه با سرطان پستان و بیماریهای وابسته به هورمون دیگر مورد توجه خاص محققین است [۱۶]، امامتالعات نشان می دهد انواع دیگر از این گوناگونیها رابطه ای با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان ندارند (۱۷و۱۸).

شواهد قابل توجهی در مطالعات انجام شده مبنی بر مشارکت ژن های  $ER-\alpha$  در تومورزایی غده پستانی و ارتباط نزدیک بین پلی مورفیسم های این ژن و استعداد ابتلا به سرطان پستان وجود دارد (۲۹و۱۹). جهش سوماتیک ژن  $ER-\alpha$  شناخته شده است (۳۰)، اما جهش ژن  $ER-\alpha$  سلولهای جنسی بنظر میرسد در خطر ابتلا به سرطان پستان نقشی نداشته باشد. تفاوت های غیر قابل توضیح بین جوامع آسیایی و غربی در بروز سرطان پستان باعث شد ما را به جستجوی عوامل ژنتیکی ناشناخته است در ژنوم جمعیت ایران ترغیب نمود ولی مطالعه حاضر جهش جدیدی را در آگزون ۴ مشاهده نکرد.

فراوانی آلل (CCG) در کدان ۳۲۵ در بیماران مبتلا به سرطان پستان (۳۹/۶٪) بالاتر از گروه شاهد (۲۸/۹٪) بود. مطالعات قبلی فراوانی آلل (CCG) در میان افراد مبتلا به سرطان پستان در تایوان (۵۲/۱٪) که با در صد به دست آمده در کره جنوبی (۵۰،۰ درصد) نزدیک، و در مقایسه با مطالعه مشابه در ایالات متحده آمریکا، انگلستان، استرالیا و پرتغال (حدود ۲۰٪) [۱۴] حدود ۳۰٪ بالاتر است. در مطالعه ای مشابه میزان به دست آمده از جمعیت ایران با جمعیت غربی تشابه نزدیکی دارد تا به جمعیت آسیایی. اگر چه، فراوانی آلل (CCG) در کدان ۳۲۵، هر دو برای جمعیت ایرانی و غربی در بیماران نسبت به گروه شاهد بیشتر بود، اما در جمعیت آسیایی فراوانی آلل (CCG) در کدان ۳۲۵ در بیماران نسبت به گروه شاهد کمتر بود (۱۴).

فراوانی آلل (CCG) در بیماران مبتلا به سرطان پستان با سن شروع قاعدگی  $\Rightarrow$  ۱۲ سال در مقایسه بیماران مبتلا به سرطان پستان با سن شروع قاعدگی بالای ۱۲ سال بطور قابل توجهی بیشتر بود. همچنین، فراوانی آلل (CCG) برای عامل خطر مربوط به سابقه فامیلی درجه اول سرطان پستان، به طور معنی داری در بیماران مبتلا به سرطان با سابقه فامیلی درجه اول سرطان پستان نسبت به افراد بدون سابقه فامیلی بیشتر بود. بنابراین، در جامعه ایران، این عوامل به طور مستقیم می تواند دقت و صحت پیش بینی رشد سرطان پستان را تحت تاثیر قرار دهد. همچنین، فراوانی آلل (CCG) در جمعیت ایرانی بسیار بیشتر از جوامع غربی مورد مطالعه بود. این یافته ها، همراه با بروز سرطان پستان نسبتا پایین در ایران، حاکی از آن است که این SNP می تواند یک عامل محافظتی در مقابل سرطان پستان است در میان زنان ایرانی محسوب گردد.

بررسی متاستاز LN می تواند به عنوان شاخص بالینی برای ارزیابی ها و تصمیم گیریهای پیش از جراحی حداقل در جمعیت ایرانی بکار رود. و به دلیل ارتباط تهاجمی غدد لنفاوی که با عود و پیشرفت بیماری همراه است بررسی متاستاز LN بسیار قابل توجه است. مضافا اینکه متاستاز LN یک شاخص مهم در تصمیم گیری برای شیمی درمانی محسوب می شود [۳۱-۳۵]. توزیع فراوانی ژنوتیپ در حضور و عدم حضور LN متاستاز اختلاف قابل توجهی را نشان داد که از نظر آماری معنی دار است ( $P=0/001$ ). با این حال، داده های ما نشان داد که همبستگی منفی بین آلل (CCG) و متاستاز LN وجود دارد که این خود نمایانگر این نکته است که حضور آلل (CCC) و عدم حضور آلل (CCG) ممکن است پارامترهای مستقلی در بروز متاستاز گره لنفاوی باشند. این نتایج با مطالعات انجام شده در تجزیه و تحلیل کدان ۳۲۵ ژن  $ER-\alpha$  در جوامع تایوانی، چینی و پرتغالی بر روی نمونه بافت سرطان مطابقت دارد (۱۴و۱۷و۲۲) به همین دلیل است که فراوانی بیشتر آلل (CCG)، احتمال کمتر متاستاز LN در بیماران پستان سرطان در ایران به همراه دارد.

با توجه به مطالعات انجام شده، ارتباط بین پلی مورفیسم های ساکت و فنوتیپ نامشخص است. یکی از احتمالات آن است که پلی مورفیسم ساکت در ارتباط با جهش دیگر ژنتیکی است که به طور مستقیم فنوتیپ سرطان پستان را تحت تاثیر قرار می دهد. احتمال دیگر آن است که ترکیب نوکلئوتیدی محل جهش ساکت در ژن می تواند در سطح بیان ژن  $ER-\alpha$  تاثیر گذاشته و آنرا تغییر دهد، و این نیز به نوبه خود منجر به تشکیل متاستاز LN در سرطان پستان گردد. به دلیل محدود بودن حجم نمونه در مطالعه حاضر، ارتباطات مشاهده شده به تایید بیشتر نیاز دارد. بطوریکه افزایش حجم نمونه به عنوان بخشی از کارهای آینده ما برنامه ریزی شده، زیرا تعیین SNP از خون محیطی می تواند یک گزینه بسیار عملی و غیر تهاجمی و ساده برای ارزیابی و تصمیم گیری های قبل از عمل جراحی باشد.

### نتیجه گیری

بطور خلاصه، پلی مورفیسم ژن  $ER-\alpha$  در زنان ایرانی (۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۴۷ نفر گروه شاهد) با استفاده از روش PCR-SSCP و از طریق تجزیه و تحلیل ژنتیکی سلولهای خون محیطی انجام گرفت.

SNP گزارش شده در مطالعات غربی نیز در جمعیت مورد مطالعه ما وجود داشت، اما در فراوانی مختلف که ارتباط آماری معنی داری بین توزیع فراوانی آللها در میان بیماران مبتلا به سرطان و گروه شاهد، همچنین بین سابقه فامیلی سرطان پستان مثبت، متاستاز LN و سن شروع قاعدگی مشاهده شد.

### اختصارات

BMI = شاخص توده بدن، CI = فاصله اعتماد به نفس، ESR = گیرنده استروژن، LN = گره های لنفاوی، OR = odd ratio، PCR = واکنش زنجیره ای پلی مرز، (Rh) = سیستم خونی Rhesus، SNP = پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، SSCP = چند ریختی در شکل سه بعدی تک رشته DNA.

### تداخل منافع

نویسندگان اعلام کردند که آنها هیچ گونه رقابتی در منافع ندارند.

### تقدیر و تشکر

این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران (گزارش # ۲۸۵۰) پشتیبانی مالی شده است.

در اینجا لازم می دانیم که از خانم الهام فرازنده و خانم معصومه جعفری افتخار از درمانگاه مرکزی سرطان، مجتمع بیمارستان امام خمینی<sup>(۵)</sup>، که در تهیه نمونه های خون و اطلاعات بالینی نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی نمائیم. و همچنین از خانم مهندس رویا شریفیان برای انجام تجزیه و تحلیل های آماری بی نهایت سپاسگزاریم.

**Reference:**

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000;321:624-8.
2. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, et al. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. *Public Health* 2000;114:143-5.
3. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, et al. Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review. *The Breast Journal* 2007;13 (4):383-91.
4. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures*. Atlanta: American Cancer society 2011.
5. Anderson E, Clarke RB, Howell A. Estrogen responsiveness and control of normal human breast proliferation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998;3:23-35.
6. Anderson E. 2002. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*; 2002;4:197-201.
7. Key TJ, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:29-43.
8. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992;10:1284-91.
9. Clarke RB, Howell A, Potten CS, et al. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 1997;57:4987-91.
10. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001;38(1):103-13; 113-6.
11. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer- analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000;343(2):78-85.
12. Feigelson HS, Henderson BE. Future possibilities in the prevention of breast cancer: role of genetic variation in breast cancer prevention. *Breast Cancer Res* 2000;2(4):277-82.
13. Shin A, Kang D, Nishio H, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80(1):127-31.

14. Abbasi S. Screening of polymorphisms in estrogen receptor -alpha and beta genes in breast cancer patients from Imam Khomeini Medical Center [Ph.D thesis]. Malaysia: Universiti Putra Malaysia; 2008.
15. Hsiao WC, Young KC, Lin SL, et al. Estrogen receptor-? polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004;6(3): R180-R6.
16. Van Duij nhoven FJ, Bezemer ID, Peeters PH, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(11 Pt 1):265.
17. Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, et al. Polymorphisms in ER-alpha gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clin Cancer Res* 2005;11:1093-8.
18. Shen Y, Li DK, Wu J, et al. Joint effects of the CYP1A1 MspI, ERalpha Pvu II, and ERalpha XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:342-7.
19. Roodi N, Bailey LR, Kao WY, et al. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor- negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:446-51.
20. Iwase H, Greenman JM, Barnes DM, et al. Sequence variants of the estrogen receptor (ER) gene found in breast cancer patients with ER negative and progesterone receptor positive tumors. *Cancer Lett* 1996;108:179-84.
21. Southey MC, Batten LE, McCredie MR, et al. Estrogen receptor polymorphism at codon 325 and risk of breast cancer in women before age forty. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:532-6.
22. Curran JE, Lea RA, Rutherford S, et al. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer* 2001; 95:271-5.
23. Kang HJ, Kim SW, Kim HJ, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor-alpha gene and breast cancer risk. *Cancer Lett* 2002;178:175-80.
24. Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, et al. Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Breast J* 2002; 8:226-9.
25. Einarisd S K, Darabi H, Li Y, et al. ESR1 and EGF genetic variation in relation to breast cancer risk and survival. *Breast Cancer Res* 2008;10(1): R15.
26. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet* 2007;39:655-60.
27. Abbasi S. Estrogen Receptor- Beta Gene Polymorphism in Women with Breast Cancer At the imam Khomeini Hospital complex, Iran. *MBC Med Genetics* 2010, 11:109.
28. Sakoda LC, Blackston CR, Doherty JA, Ray RM, Lin MG, Gao DL, Stalsberg H, Feng Z, Thomas DB, Chen C. Selected estrogen receptor 1 and androgen receptor gene polymorphisms in relation to risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions among Chinese women. *Cancer Epidemiol* 2011, 35(1):48-55.
29. Teraoka SN, Bernstein JL, Reiner AS, Haile RW, Bernstein L, Lynch CF, Malone KE, Stovall M, Capanu M, Liang X, Smith SA, Mychalekyj J, Hou X, Mellemkjaer L, Boice JD Jr, Siniard A, Duggan D, Thomas DC; WECARE Study Collaborative Group, Concannon P. Single nucleotide polymorphisms associated with risk for contralateral breast cancer in the Women's Environment, Cancer, and Radiation Epidemiology (WECARE) Study. *Breast Cancer Res* 2011, 13(6):R114.
30. Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, et al. Estrogen receptor variants and mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;62:363-72.

31. Henson DE, Rie L, Freedman LS, et al. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 1991; 68:2142-9.
32. Goldhirsch A, Wood WC, Senn HJ, et al. Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Ins* 1995;87:1441-5.
33. Canavese G, Catturich A, Vecchio C, et al. Prognostic role of lymph-node level involvement in patients undergoing axillary dissection for breast cancer. *Eur J Surg Onco* 1998;24:104-109.
34. Fasching PA, Pharoah PD, Cox A, Nevanlinna H, Bojesen SE, Karn T, Broeks A, van Leeuwen FE, et al. The role of genetic breast cancer susceptibility variants as prognostic factors. *Hum Mol Genet.* 2012, Apr 24. [Epub ahead of print]
35. Yu KD, Rao NY, Chen AX, Fan L, Yang C, Shao ZM. A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 126(1):37-45.