

بررسی شیوع پلی مورفیسم ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ در بیماران مبتلا به تومور های تیروئیدی از شمال غرب ایران

مهديه یونسی^۱، محمدعلی حسین پور فیضی^{۱*}، ناصر پولادی^۲

(۱) گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۹

چکیده:

مقدمه: همراهی پلی مورفیسم PAI-1 با افزایش خطر ابتلا به انواع بدخیمی ها در مطالعات متعددی، نشان داده شده است. لذا هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی شیوع پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G در بیماران مبتلا به تومور های تیروئیدی در شمال غرب ایران می باشد.

مواد و روش ها: در یک مطالعه ی مورد - شاهدهی، نود بیمار مبتلا به تومور تیروئیدی و ۱۸۰ فرد سالم از جمعیت شمال غرب ایران انتخاب شدند. استخراج DNA از خون محیطی نمونه ها انجام گردید و پلی مورفیسم 4G/5G ژن PAI-1 به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: توزیع ژنوتیپ بین بیماران (4G/4G=۱۳/۳۳، 4G/5G=۶۳/۳۳ و 5G/5G=۲۳/۳۳) و در گروه کنترل (4G/4G=۱۷/۲۲، 4G/5G=۶۷/۲۲ و 5G/5G=۱۵/۵۵) بود. علاوه بر این فرکانس آلل های 5G و 4G بین بیماران (۴۵٪ و ۵۵٪) و در گروه کنترل (۵۰/۸۳٪ و ۴۹/۱۶٪) محاسبه گردید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که فرکانس های ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G تفاوت معنی داری را بین بیماران مبتلا به تومور های تیروئیدی و افراد گروه کنترل در جمعیت مورد مطالعه ما نداده است.

واژه های کلیدی: پلی مورفیسم، سیستم فعال کننده پلاسمینوژن، تومور های تیروئیدی.

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email: pourfeizi@eastp.ir

مقدمه

سرطان تیروئید شایع ترین بدخیمی سیستم غدد درون ریز می باشد که در دهه های اخیر، بروز آن در بسیاری از کشورها افزایش یافته است (۱،۲). سرطان تیروئید در جمعیت ایران، هفتمین سرطان شایع در زنان و چهاردهمین در مردان محسوب می شود (۲). به عبارت دیگر شیوع سرطان تیروئید در زنان دو برابر مردان می باشد (۳).

شواهد تجربی فراوانی وجود دارد که سیستم فعال کننده پلاسمینوژن در تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی دخالت داشته و منجر به حمله سلول های توموری و متاستاز می شود (۴،۵). این سیستم متشکل از فعال کننده پلاسمینوژن نوع بافتی (TPA)، فعال کننده پلاسمینوژن نوع اوروکینازی (UPA)، گیرنده اوروکیناز (UPAR) و مهار کننده های فعال کننده پلاسمینوژن PAI-1 و PAI-2 می باشد (۶،۷).

ژن PAI-1 یکی از مهار کننده های اصلی سیستم تجزیه فیبرین به وسیله غیر فعال کردن، فعال کننده پلاسمینوژن نوع بافتی و نوع اوروکینازی می باشد که در تنظیم مهاجرت سلولی، تهاجم و چسبندگی سلول ها نیز نقش دارد (۸،۹). ژن PAI-1 انسانی در بازوی بلند کروموزوم ۷ با نه اگزون و هشت اینترون می باشد که در اندوتلیوم عروق سنتز شده و تولید آن از طریق هورمون ها، سیتوکین ها و عوامل رشد تنظیم می گردد (۱۰-۱۲).

در میان واریانت های ژن PAI-1 پلی مورفیسم 4G/5G اغلب مورد مطالعه بوده است. این پلی مورفیسم در منطقه پروموتور ژن واقع شده که نقش احتمالی آن در تنظیم رونویسی را نشان می دهد (۱۳). حاملان ژنوتیپ 4G/4G در مقایسه با ژنوتیپ 5G/5G غلظت بالاتری از PAI-1 را دارند چرا که هر دو آلل می توانند به فعال کننده رونویسی متصل شوند، در حالی که آلل 5G به یک پروتئین رپرسور نیز متصل شده و باعث کاهش رونویسی از ژن PAI-1 می شود (۱۴،۱۵).

با وجود مقالات متعدد در نشریات مبنی بر نقش اجزای سیستم فعال کننده پلاسمینوژن در پیشرفت بسیاری از سرطان ها، اثر PAI-1 در سرطان تیروئید و همچنین

نقش آن در پیش آگهی تومور های تیروئیدی هنوز نامشخص می باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع پلی مورفیسم 4G/5G ژن PAI-1 در بیماران مبتلا به تومور های تیروئیدی از شمال غرب ایران می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد-شاهدی ۹۰ بیمار مبتلا به تومور تیروئیدی (با میانگین سنی ۳۶/۶۶) و ۱۸۰ فرد سالم غیر خویشاوند به عنوان گروه کنترل (با میانگین سنی ۴۶/۵۰) از جمعیت شمال غرب ایران انتخاب شدند. تشخیص بیماران با توجه به تست های غربالگری و تشخیصی توسط متخصصان و با تأیید پاتولوژیست صورت گرفت. افراد گروه کنترل نیز از نظر سن و جنس همسان با گروه بیمار و فاقد هر گونه سابقه قبلی سرطان یا تومور در خانواده خود بودند. پس از اخذ رضایت از تمامی افراد مورد مطالعه، نمونه خون محیطی تهیه و DNA ژنومی با استفاده از روش نمک اشباع استخراج گردید (۱۶).

تجزیه و تحلیل مولکولی: پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G به وسیله سیستم تکثیر مقاوم به جهش واکنش زنجیره ای پلیمرز (ARMS-PCR) و با استفاده از پرایمر های اختصاصی آلل مورد مطالعه قرار گرفت (۱۱،۱۲). شرایط واکنش PCR شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، به دنبال آن یک چرخه ۳۰ تایی از دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و طولی سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، به دنبال آن طولی سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه بود. محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و زیر نور UV رؤیت شدند. همچنین تعدادی از نمونه ها انتخاب و با استفاده از روش تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفتند.

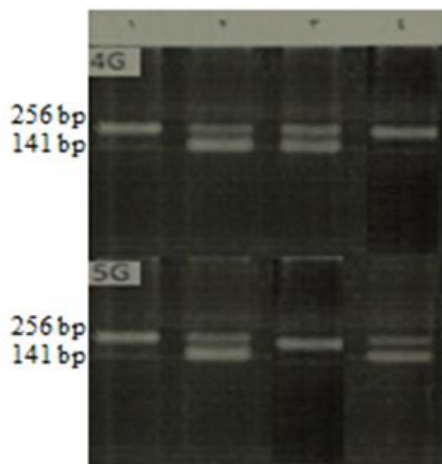
تجزیه و تحلیل آماری: ارتباط پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G بین گروه بیمار و کنترل با استفاده از آزمون مجذور کای و آزمون دقیق فیشر محاسبه گردید. نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان (CI) در سطح اطمینان

۹۵٪ برای همه داده ها محاسبه و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

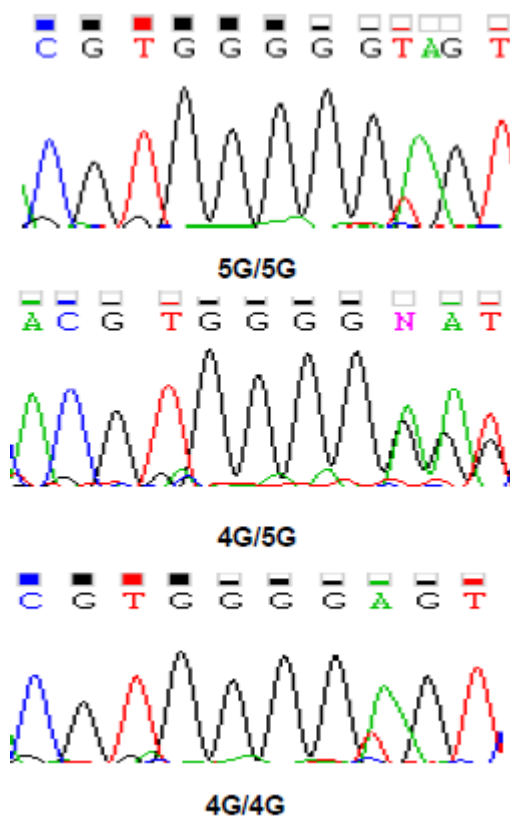
یافته های پژوهشی

تشخیص پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G با کمک روش ARMS-PCR انجام گرفت (شکل شماره ۱) و برای اطمینان از صحت نتایج به دست آمده نیز از روش

تعیین توالی استفاده گردید (شکل شماره ۲). مطالعه حاضر شامل ۲۱ مرد (۲۳/۳۳٪) و ۶۹ زن (۷۶/۶۶٪) در گروه بیمار و ۹۰ مرد (۵۰٪) و ۹۰ زن (۵۰٪) در گروه کنترل بود. با توجه به اطلاعات بالینی ۵۸ بیمار کارسینومای پاپیلاری تیروئید، ۴ بیمار کارسینومای فولیکولار تیروئید، ۱ بیمار کارسینومای مدولاری تیروئید و ۲۶ بیمار به آدنومای فولیکولار مبتلا بودند.



شکل شماره ۱. نتایج حاصل از ARMS-PCR برای پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G (۱- نمونه کنترل منفی، ۲- نمونه هتروزیگوت 4G/5G، ۳- نمونه هموزیگوت 4G/4G، ۴- نمونه هموزیگوت 5G/5G)



شکل شماره ۲. توالی حاصل از ژن PAI-1 به منظور تأیید پلی مورفیسم 4G/5G

نشان می دهد که فرکانس های ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G تفاوت معنی داری را بین بیماران مبتلا به تومور های تیروئیدی و افراد گروه کنترل در جمعیت مورد مطالعه ما نشان نداده است (جدول شماره ۱).

توزیع ژنوتیپ بین بیماران (4G/4G=۱۳/۳۳) و در گروه کنترل (4G/5G=۶۳/۳۳ و 5G/5G=۲۳/۳۳) و در گروه های 4G و 5G بین بیماران (۴۵٪ و ۵۵٪) و در گروه کنترل (۵۰/۸۳٪ و ۴۹/۱۶٪) محاسبه گردید. نتایج

جدول شماره ۱. توزیع ژنوتیپ و آلی بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل

P-value	OR(%۹۵ CI)	گروه کنترل n=۱۸۰(%۱۰۰)	گروه بیمار n=۹۰(%۱۰۰)	ژنوتیپ ها و آلی ها
۰/۴۸۶	۰/۷۳۹	۳۱(%۱۷/۲۲)	۱۲(%۱۳/۳۳)	4G/4G
۰/۵۰۹	۰/۸۴۲	۱۲۱(%۶۷/۲۲)	۵۷(%۶۳/۳۳)	4G/5G
۰/۱۴۰	۱/۶۵۳	۲۸(%۱۵/۵۵)	۲۱(%۲۳/۳۳)	5G/5G
۰/۴۹۴	۰/۷۹۱	۱۸۳(%۵۰/۸۳)	۸۱(%۴۵/۰۰)	4G
۰/۴۶۵	۱/۲۶۴	۱۷۷(%۴۹/۱۶)	۹۹(%۵۵/۰۰)	5G

*P-values < ۰/۰۵

4G/5G در جمعیت مورد بررسی نشان نداد، اگر چه میزان خطر برای ژنوتیپ 5G/5G در مقایسه با 4G/4G و آلی 5G در مقایسه با 4G کمی افزایش یافته بود. هم چنین می توان اشاره کرد که داده های مطالعه حاضر یافته های گزارش قبلی ما بر روی سرطان پستان را نیز تأیید می نماید (۲۷). از سوی دیگر بر اساس اطلاعات منتشر شده، شیوع ژنوتیپ 5G/5G در جمعیت سوئد حدود ۱۵/۹٪، در جمعیت ترکیه ۲۵/۵٪ و در جمعیت بریتانیا ۳۰/۵٪ می باشد (۷،۲۴،۲۸). شیوع ژنوتیپ 5G/5G در جمعیت مورد مطالعه ما ۲۳/۳۳٪ بود که در توافق با داده های حاصل از جمعیت ترکیه است. از این رو فرکانس ژنوتیپی پلی مورفیسم PAI-1 در میان نژاد ها و گروه های قومی، متفاوت می باشد. لذا مطالعات بیشتر، در مقیاس بزرگتر و در سایر گروه های قومی برای روشن شدن نقش دقیق پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G در بیماران مبتلا به تومور های تیروئیدی لازم می باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از پرسنل محترم بیمارستان نورنجات و آزمایشگاه پاتولوژی آذربایجان جهت همکاری در نمونه گیری و جمع آوری داده های بالینی تشکر و قدردانی می شود.

بحث و نتیجه گیری

شواهد به دست آمده در طول سال های اخیر نشان می دهد که PAI-1 نقش مهمی را در انتقال سیگنال، چسبندگی و مهاجرت سلولی ایفا می کند و در نهایت منجر به ترویج تهاجم و متاستاز می گردد (۱۷). علاوه بر این، همراهی پلی مورفیسم ژن PAI-1 با استعداد ابتلا به اختلالاتی مانند سکنه قلبی حاد، بیماری عروق کرونر، تب مدیترانه ای فامیلی، بیماری التهابی روده و دیابت نوع ۲ نشان داده شده است (۱۱،۱۲،۱۸). لذا هدف از مطالعه حاضر ارزیابی شیوع پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G در بیماران مبتلا به تومور های تیروئیدی از شمال غرب ایران می باشد. که بر اساس دانش ما، این اولین گزارش ارائه شده در ارتباط با پلی مورفیسم ژن PAI-1 و تومور های تیروئیدی در جمعیت ایران می باشد.

همان طور که برخی از مطالعات قبلی نشان داده اند ژنوتیپ 4G/4G یا آلی 4G می تواند یک عامل خطر برای توسعه بیماری محسوب شود (۲۴-۱۹)، در حالی که سایر مطالعات یک نقش محافظتی برای ژنوتیپ 4G/4G یا آلی 4G پیشنهاد کرده اند (۲۶،۲۵،۱۲،۱۱). از سوی دیگر، Blasiak و Lei و همکاران هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم PAI-1 با سرطان پستان نیافتند (۲۱،۷). مطالعه ما نیز در توافق با دو مطالعه قبلی، هیچ ارتباط ژنوتیپی و آلی بین بیماران و گروه کنترل برای پلی مورفیسم PAI-1

References

1. Dehghan R, Hosseinpourfeizi MA, Pouladi N, Babaei E, Montazeri V, Fakhrajoo A, et al. Association of p53 -16ins-pro haplotype with the decreased risk of differentiated thyroid carcinoma in Iranian Azeri patients. *Pathol Oncol Res* 2015; 21:449-54.
2. Dehghan R, Hosseinpourfeizi MA, Pouladi N, Adampourezare M, Farajzadeh D. The TP53 intron 6 G13964C polymorphism and risk of thyroid and breast cancer development in the Iranian Azeri population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16:3073-7.
3. Khayamzadeh M, Khayamzadeh M, Tadayon N, Salmanian R, Zham H, Razzaghi Z, et al. Survival of thyroid cancer and social determinants in Iran 2001-2005. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12:95-8.
4. Horvaticherceg G, Herceg D, Kralik M, Kulic A, Bencezigman Z, TomicbBrzac H, et al. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor type-1 as prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 149:533-40.
5. Horvaticherceg G, Herceg D, Kralik M, Bencezigman Z, Tomicbrzac H, Kulic A. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in thyroid neoplasms a cytosol study. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118:601-9.
6. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, Barollo S, Gnessi L, Catania A, et al. High expression of the urokinase plasminogen activator and its cognate receptor associates with advanced stages and reduced disease-free interval in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:504-8.
7. Lei H, Hemminki K, Johansson R, Altieri A, Enquist K, Henriksson R, et al. PAI-1 -675 4G/5G polymorphism as a prognostic biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109:165-75.
8. Mashiko S, Kitatani K, Toyoshima M, Ichimura A, Dan T, Usui T, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2015; 16:253-60.
9. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Sci World J* 2014; 2014:858293.
10. Torrecarrillo N, Magdalena Torrecarrillo N, Vazquezdel Mercado M, Rangelvillalobos H, Parrarojas I, Sanchezenriquez S, et al. Distribution of -844 G/A and Hind III C/G PAI-1 polymorphisms and plasma PAI-1 levels in Mexican subjects comparison of frequencies between populations. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008; 14:220-6.
11. Bonyadi M, Shaghaghi Z, Hagi M, Dastgiri S. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism in Iranian Azeri Turkish patients with FMF disease and its association with amyloidosis. *Eur J Pediatr* 2013; 172:91-8.
12. Shaghaghi Z, Bonyadi M, Somi MH, Khoshbaten M. Association of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism with inflammatory bowel disease in Iranian Azeri Turkish patients. *Saudi J Gastroenterol* 2014; 20:54-8.
13. Palmirotta R, Ferroni P, Savonarola A, Martini F, Ciatti F, Laudisi A, et al. Prognostic value of pre-surgical plasma PAI-1 plasminogen activator inhibitor-1 levels in breast cancer. *Thromb Res* 2009; 124:403-8.
14. Zhang H, Dong P, Yang X, Liu Z. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with coronary artery disease risk a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7:3777-88.
15. Xu X, Xie Y, Lin Y, Xu X, Zhu Y, Mao Y, et al. PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism (rs1799768) contributes to tumor susceptibility evidence from meta-analysis. *Exp Ther Med* 2012; 4:1127-33.
16. Miller SA, Dynes DD, Polesky F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
17. Dellas C, Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 2005; 93:631-40.

18. Anderson JL, Muhlestein JB, Habashi J, Carlquist JF, Bair TL, Elmer SP, et al. Lack of association of a common polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene with coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1778-83.
19. Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G/4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost* 1999; 82:1121-6.
20. Lima LM, Carvalho MDS, Neto CPF, Garcia JCF, Sousa MO. PAI-1 4G/5G Polymorphism and plasma levels association in patients with coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol* 2011; 97:462-7.
21. Blasiak J, Smolarz B. Plasminogen activator inhibitor-1 PAI-1 gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *Acta Biochim Pol* 2000; 47:191-9.
22. Zhang X, Shu XO, Cai Q, Ruan Z, Gao YT, Zheng W. Functional plasminogen activator inhibitor-1 gene variants and breast cancer survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6037-42.
23. Castello R, Espana F, Vazquez C, Fuster C, Almenar SM, Aznar J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thromb Res* 2006; 117:487-92.
24. Sternlicht MD, Dunning AM, Moore DH, Pharoah PD, Ginzinger DG, Chin K, et al. Prognostic value of PAI1 in invasive breast cancer: evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI1 expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:2107-14.
25. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. Clinicopathological significance of plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G polymorphism in breast cancer: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2013; 44:39-45.
26. Yagmurdu MC, Atac FB, Tutar NU, Verdi H, Isiklar I, Ozdemir BH, et al. Prognostic value of the PAI-1 4G/5G polymorphism in invasive ductal carcinoma of the breast. *Int Surg* 2008; 93:163-8.
27. Younesi M, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N. [Study of PAI-1 -675 4G/5G Polymorphism in breast cancer patients from North West of Iran]. *J Tabriz Uni Med Sci* 2017;1:23-9.(Persian)
28. Ozen F, Erdis E, Sik E, Silan F, Uludag A, Ozdemir O. Germ-line MTHFR C677T, FV H1299R and PAI-1 5G/4G variations in breast carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14:2903-8.

Evaluating the Prevalence of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Polymorphism in Patients with Thyroid Tumors from North West of Iran

Younesi M¹, Hosseinpour Feizi M^{1*}, Pouladi N²

(Received: January 9, 2016

Accepted: February 14, 2016)

Abstract

Introduction: Association of PAI-1 polymorphisms with the increased risk of various malignancies has been shown in numerous studies. Therefore, the aim of the current study is to evaluate the prevalence of PAI-1 4G/5G polymorphism in patients with thyroid tumors from North West of Iran.

Materials & methods: Ninety patients with thyroid tumors and 180 healthy controls were selected from North West of Iran. DNA was extracted from peripheral blood samples and 4G/5G polymorphism of the PAI-1 gene was evaluated by polymerase chain reaction using specific primers.

Findings: Genotype distribution between patients was (4G/4G=13.33%, 4G/5G=63.33% and 5G/5G=23.33%) and controls (4G/4G=17.22%, 4G/5G=67.22% and 5G/5G=15.55%). Additionally, the frequencies of the 4G and 5G alleles between patients were (45% and 55%) and control group (50.83% and 49.16%).

Discussion & conclusions: Results indicate that the genotypic and allelic frequencies of PAI-1 4G/5G polymorphism showed no significant difference between patients with thyroid tumors and control individuals in this cohort.

Keywords: Polymorphism, Plasminogen activation system, Thyroid tumors

1. Dept of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

2. Dept of Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* Correspondin author Email: pourfeizi@eastp.ir