

ارتباط پلی مورفیسم T۴۰۰K ژن ABCG۸ با استعداد ابتلا به سنگ کیسه صفرا

سامان میلانی زاده، امیر هوشنگ محمد علیزاده، پدram عظیم زاده، سارا رومانی، محمد روشنی، مهسا خوان یغما،
محمدرضا زالی، سیدرضا محبی^{۱*}

(مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران)

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۴

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۸

چکیده

مقدمه: تشکیل سنگ کیسه صفرا که یکی از شایع ترین اشکال بیماری کیسه صفرا می باشد در صورت اشباع صفرا با کلسترول و رسوب آن افزایش پیدا می کند. تغییر در پروتئین ABCG۸ که یکی از ناقلین اصلی کلسترول در کیسه صفرا می باشد می تواند منجر به افزایش کلسترول صفرا شود. هدف این مطالعه بررسی تغییر ژنتیکی T۴۰۰K است که می تواند بر روی عملکرد این پروتئین مؤثر باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۲۲۰ نفر انجام شد که در دو گروه ۱۱۱ نفر بیمار و ۱۰۹ نفر کنترل قرار می گرفتند. تعیین ژنوتایپ افراد به وسیله تکثیر قطعه مورد نظر و سپس واکنش آنزیمی قطعات محدود شونده انجام شد. شناسایی تفاوت های بین گروه های بیمار و کنترل با تجزیه و تحلیل آماری انجام شد.

یافته های پژوهش: در این مطالعه ۵۹/۵ درصد افراد ژنوتایپ C/C، ۳۹/۵ درصد افراد ژنوتایپ C/T و تنها ۱ درصد افراد ژنوتایپ T/T داشتند. با مقایسه آماری داده های دو گروه بیمار و کنترل ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسم و احتمالاً ابتلا به سنگ کیسه صفرا یافت نشد.

بحث و نتیجه گیری: هترو دایمر پروتئینی ABCG5/ABCG8 در انتقال کلسترول در کیسه صفرا نقش اصلی را بازی می کند و هر گونه تغییر در این پروتئین ها می تواند در تشکیل سنگ کیسه صفرا مؤثر باشد. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم T۴۰۰K و ابتلا به سنگ کیسه صفرا یافت نشد. این تفاوت می تواند به دلیل تفاوت های ژنتیکی بین اقوام مختلف باشد.

واژه های کلیدی: پروتئین 8ABCG، پلی مورفیسم، سنگ کیسه صفرا، واکنش آنزیمی قطعات محدودکننده

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: Srmohebbi@gmail.com

مقدمه

مورفیسم های این ژن می باشد که تا به حال مورد بررسی قرار گرفته است. ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری های دیگر از جمله سرطان کیسه صفرا مورد بررسی قرار گرفته و تاثیرگذاری آن در جمعیت های دیگر تایید شده است. میزان استرول های خونی و ارتباط آن ها با این پلی مورفیسم مورد تایید قرار گرفته است، (۱۰). اهمیت بالای این تغییر ژنتیکی و لزوم پیشگیری از ابتلا به سنگ کیسه صفرا بررسی بیشتر بر روی این پلی مورفیسم را متضمن می باشد. هدف از این مطالعه تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم T۴۰۰K در ژن ABCG8 و ارتباط آن با ابتلا به سنگ کیسه صفرا می باشد.

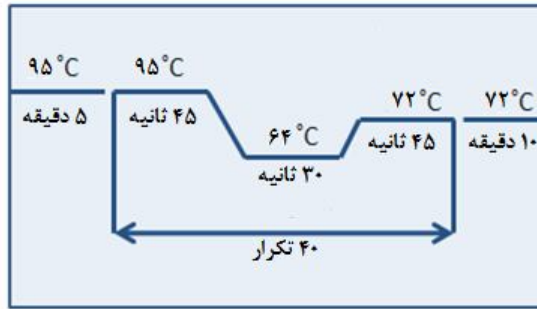
مواد و روش ها

این بررسی با مقایسه دو گروه شاهد و بیمار و مشاهده تفاوت های ژنتیکی آن دو انجام شده است. گروه بیمار شامل ۱۱۱ نفر افرادی می باشند که با علائم سنگ کیسه صفرا به بیمارستان طالقانی مراجعه کرده اند و با تشخیص سنگ کیسه صفرا مورد ERCP قرار گرفته اند و هم چنین افرادی که دارای سابقه سنگ کیسه صفرا بوده و کوله سیستکتومی شده اند و گروه شاهد شامل ۱۰۹ نفر افرادی بودند که سابقه خانوادگی سنگ کیسه صفرا نداشته و فاقد سنگ کیسه صفرا بودند. پس از انتخاب افراد مورد بررسی و تهیه رضایت نامه برای شرکت در طرح تحقیقاتی نمونه خون محیطی از این افراد گرفته شده و به بخش ژنتیک مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی تحویل داده شد. در نهایت DNA خونی به وسیله روش استخراج نمکی به دست آمد و مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفت. برای شناسایی ناحیه چند شکل از تکثیر به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مرایی استفاده شد. توالی پرایمر پیشرو اختصاصی مورد استفاده در این واکنش 5'-GTAAGGTGGCAGGCGACTC-3' و توالی پرایمر معکوس 5'-AATAGAAAGGGCTTAAT-3' می باشد. این پرایمر ها به وسیله نرم افزار generunner طراحی و سپس در پایگاه اطلاعاتی NCBI ارزیابی (BLAST) و مورد تایید قرار

تشکیل سنگ در کیسه صفرا و عفونت مزمن کیسه، شایع ترین اشکال بیماری کیسه صفرا می باشند. ۲۰ درصد از آمریکایی های بزرگسال دارای سنگ کیسه صفرا می باشند که البته آن ها را دچار مشکل نمی کند، به این حالت «سنگ کیسه صفرا بدون علامت» می گوئیم، (۳-۱). در سن میانسالی (حدود ۶۵ سالگی) تقریباً ۴۰ درصد از افراد دارای سنگ کیسه صفرا می باشند که معمولاً بدون تشخیص باقی می ماند مگر این که هنگام تشخیص بیماری دیگری توسط اشعه X، سونوگرافی یا جراحی شگم کشف شوند. تنها زمانی علائم سنگ کیسه صفرا رخ می دهد که مجرای خروجی آن مسدود شده و کیسه صفرا عفونت کند، درد و یرقان نیز (پوست زرد) به دلیل انسداد مجرای خروجی کیسه به وسیله سنگ به وجود می آید، (۴). بیش از ۹۰ درصد از سنگ های کیسه صفرا در افرادی که در جوامع زندگی می کنند که رژیم غذایی آن ها دارای کلسترول زیادی است، بروز می کند، (۵). اگر مایع صفرا در کیسه صفرا با کلسترول اشباع شود، رسوب کلسترول به شکل کریستال های جامد آغاز شده و به تدریج تبدیل به سنگ هایی با اندازه های گوناگون می گردد. کلسترول توسط پروتئین های انتقالی خاصی به صفرا ترشح می شود. ناقل اختصاصی کلسترول در کیسه صفرا پروتئین هتروداپیری می باشد که از ABCG5 و ABCG8 تشکیل شده و کلسترول محلول در صفرا را فراهم می کنند، (۶). این پروتئین جزو خانواده ناقلین ABC (کاست متصل شونده به ATP) می باشد که در ترشح انواع مختلفی از مواد از عرض غشا به خارج سلول با مصرف ATP نقش دارند. ساختار این پروتئین ها دارای یک ناحیه متصل شونده به نوکلئوتید در N-ترمینال و ناحیه غشایی متشکل از چند مارپیچ عرض غشایی در C-ترمینال می باشد، (۷). ژن ABCG8 در نزدیک ژن ABCG5 بر روی کروموزوم ۲ در جهت معکوس هم قرار داشته و به یک ناحیه ۸۵ یا ۱۴۰ بازی از هم جدا می شوند، (۸،۹). چند شکلی ژنتیکی T۴۰۰K در ژن ABCG8 یکی از شایع ترین پلی

میزان ۱۰۰ ng مورد استفاده قرار گرفته و غلظت هر کدام از پرایمرها نیز ۵ میکرومولار بود. بازه زمانی چرخه های واکنش زنجیره ای پلی مرازی و دماهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ مشخص شده است.

گرفتند. واکنش زنجیره ای پلی مرازی در میکروتیوپ های ۰/۲ با حجم نهایی ۱۲۵ انجام شده و مواد مورد استفاده در این واکنش شامل بافر، منیزیم کلراید (MgCl₂)، dNTP ها و آنزیم (Super Taq) محصول شرکت ژن فناوریان می باشند. DNA ژنومی به



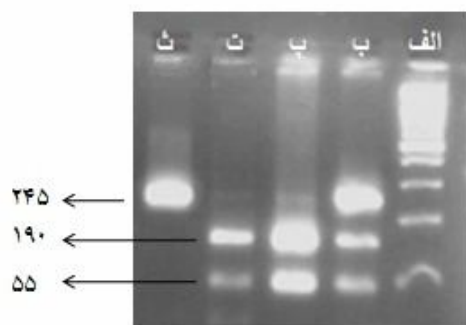
شکل شماره ۱. شرایط دمایی و زمانی واکنش زنجیره ای پلی مرازی

در این مطالعه ۲۲۰ نفر مورد بررسی قرار گرفت که در دو گروه بیمار و کنترل جا داشتند. در گروه بیماران ۵۵ درصد مرد و ۴۵ درصد زن بوده و در مقابل در گروه کنترل ۴۹/۵ درصد مرد و ۵۰/۵ درصد زن بودند. ۳۰/۶ درصد از بیماران سیگار مصرف می کردند در حالی که ۶۹/۴ درصد آن ها تا به حال مصرف سیگار نداشته اند، از طرف دیگر در گروه کنترل ۲۵/۷ درصد افراد مصرف سیگار داشته اند و ۷۴/۳ درصد افراد سیگار مصرف نمی کرده اند. میانگین جمعیت مورد مطالعه ۵۰/۸ تعیین گردید. وجود یک جایگاه شناسایی برای آنزیم محدود کننده باعث شد که در صورت هترو زیگوت بودن (C/A) سه باند و در صورت هوموزیگوت بودن با شناسایی کامل (C/C) دو باند و در صورت عمل نکردن آنزیم (A/A) تنها یک باند قابل شناسایی باشد. الگوی برش قطعات توسط آنزیم محدود کننده در شکل شماره ۱ قابل مشاهده می باشد. قطعات حاصل عبارتند از ۲۴۵ نوکلئوتیدی در صورت برش نخوردن با آنزیم محدود کننده که در واقع همان محصول واکنش پلی مرازی می باشد. و قطعات ۱۹۰ و ۵۵ نوکلئوتیدی در صورت اثر آنزیم محدود کننده.

صحت انجام واکنش پلی مرازی با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده باند تکثیر شده با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد تایید قرار گرفته و محصول PCR برای انجام چند شکلی قطعات طولی محدود شوند (RFLP) مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم به کار رفته شده در این سنجش Hpy166II می باشد که به وسیله نرم افزار NEBcutter 2.0 طراحی شده و محصول شرکت New England biolabs می باشد. غلظت به کار رفته از آنزیم ۱۰ واحد بر میلی لیتر بوده است.

محصول واکنش RFLP بر روی ژل آگارز ۳ درصد برده شده و الگوی باندهای مشاهده شده تعیین ژنوتایپ این ناحیه چند شکل را بر عهده داشت. اطلاعات ژنتیکی به دست آمده به وسیله نرم افزار SPSS از لحاظ آماری مورد بررسی و سنجش قرار گرفت. در این مطالعه ارتباط سن، جنس و مصرف سیگار با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش



شکل شماره ۲. الگوی قطعات برش خورده به وسیله آنزیم محدود کننده. الف=مارکر 100bp؛ ب=هتروزایگوت C/A دارای سه باند؛ پ،ت=هوموزایگوت C/C؛ ث=هوموزایگوت A/A

بررسی آماری گروه های بیمار و کنترل به صورت مجزا برای شناسایی پراکندگی ژنوتایپی و اللی در جمعیت مورد مطالعه نتایجی را که در جدول شماره ۱ مشاهده می شود، به دست آورد.

طبق الگوی برش قطعات مشاهده شده ۵۹/۵ درصد ژنوتایپ C/C داشته و ۳۹/۵ درصد افراد دارای ژنوتایپ C/T می باشند و ۱ درصد باقی مانده دارای ژنوتایپ T/T بودند. شیوع ال C برابر ۷۹/۳ درصد بود و ال T در کل جمعیت شیوعی برابر ۲۰/۷ درصد داشت.

جدول شماره ۱. پراکندگی ژنوتایپی و اللی نمونه ها در جمعیت مورد مطالعه

بیمار(درصد)تعداد	کنترل(درصد)تعداد		
۶۶(۵۹/۵)	۶۵(۵۹/۶)	C/C	ژنوتایپ
۴۴(۳۹/۶)	۴۳(۳۹/۴)	C/A	
۱(۰/۹)	۱(۱)	A/A	
۱۷۶(۷۹/۳)	۱۷۳(۷۹/۴)	C	اللی
۴۶(۲۰/۷)	۴۵(۲۰/۶)	A	

مداخله گر استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی ارتباط معنی داری را بین ژنوتایپ ها و اللی های این پلی مورفیسم با ابتلا به سنگ کیسه صفرا نشان ندادند. داده های حاصل از این مطالعه در جدول شماره ۲ قابل مشاهده می باشند

طبق یافته های این مطالعه، جنس ($P=0.178$) و مصرف سیگار ($P=0.116$) ارتباط معنی داری با ابتلا به بیماری نداشته اند اما سن با آزمون T با بیماری ارتباط خود را نشان داد ($P<0.001$) بدین منظور در بررسی های آتی در ارتباط پلی مورفیسم T۴۰۰K با سنگ کیسه صفرا از یکسان سازی داده ها بر مبنای سن به عنوان عامل

جدول شماره ۲. ارتباط ژنوتیپ ها و ال های پلی مورفیسم T400K در ابتلا به سنگ کیسه صفرا، داده ها از نظر سن یکسان سازی شده اند.

مرجع	۹۵CI درصد		OR	P	
	پایین	بالا			
مرجع				۱	C/C
۱/۹۸۱	۰/۶۱۷		۱/۱۰۶	۰/۷۳۳	C/A
۵/۷۹۲	۰/۱۸۲		۳/۱۰۴	۰/۴۳۳	A/A
مرجع				۱	C
۱/۵۹۴	۰/۶۳۳		۱/۰۱۷	۰/۹۸۴	A

بحث و نتیجه گیری

اشباع صفرا به وسیله کلسترول مرحله اولیه در تشکیل سنگ های کلسترولی می باشد. در صورتی که میزان کلسترول در صفرا بیش از حد طبیعی باشد به راحتی رسوب کرده و به وسیله صفرا پوشیده شده و ایجاد سنگ می کند، (۱۱). ABCG8 به همراه ABCG5 در جذب و ترشح کلسترول به کیسه صفرا نقش اصلی را بر عهده دارند. این دو پروتئین به همراه هم در پایداری میزان کلسترول در صفرا همکاری می کنند. در موش هایی که با دستوری ژنتیکی این پروتئین ها به میزان بش از اندازه بیان شوند کاهش جذب کلسترول غذایی و افزایش دفع کلسترول در صفرا مشاهده می شود، (۱۲، ۱۳). طی بررسی های انجام شده توسط ونگ و همکاران احتمال ایجاد سنگ کیسه صفرا در اقوام مختلف متفاوت می باشد، هم چنین احتمال ایجاد سنگ کیسه صفرا در افراد مذکر بیشتر از افراد مؤنث بوده است، (۱۴). این تفاوت ها به دلیل استعدادهای ژنتیکی متفاوت در جمعیت های مختلف می باشد. پلی مورفیسم ها به صورت مستقیم دلیل ابتلا به بیماری نمی باشند اما تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژنوم افراد به عنوان یکی از مهمترین عامل های افزایش یا کاهش احتمال بروز بیماری ها محسوب می شوند. این مطالعه برای بررسی ارتباط ناحیه پلی مورفیک T400K در ژن ABCG8 با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا در یک جمعیت ایرانی انجام شده است. طبق یافته های حاصل پلی مورفیسم موجود بر روی ژن ABCG8 فاقد تاثیر بر ابتلا به سنگ کیسه صفرا می

باشد. در صورت یکسان سازی داده ها از نظر سن نیز ارتباط معنی داری بین ابتلا به بیماری و ژنوتایپ ها و ال های این چند شکلی مشاهده نشده است. هم چنین ارتباطی بین جنسیت و احتمال ابتلا به بیماری یافت نشده است. مطالعات متعددی ارتباط پلی مورفیسم T400K را با میزان کلسترول موجود در خون بررسی کرده اند، میزان استرول های خونی متفاوت را با تغییرات ژنتیکی ABCG8 مورد بررسی قرار داده اند، (۱۰). در مطالعه ای که توسط پلات و همکاران انجام شده است میزان استرول های پلاسمایی افراد مورد بررسی قرار گرفته است و ژنوتایپ T400K با تغییر استرول های پلاسمایی خون ارتباط داشته است همچنین حاملین ال K فعالیت ABCG8 بیشتری را از خود نشان داده اند، (۱۵)، و به نظر می رسد که این افراد توان بیشتری در بازجذب کلسترول و ترشح آن به صفرا داشته باشند. طبق یافته های سیداپورام در سال ۲۰۱۰ که بر روی یک جمعیت هندی انجام شده بود ارتباط معنی داری بین توضیح الی این پلی مورفیسم و سنگ کیسه صفرا یافت نشده است در صورتی که میزان لیپید پلاسمایی و صفراوی این افراد مورد بررسی قرار گرفته و ارتباط مستقیمی را با ژنوتیپ های افراد نشان داده است، (۱۱). اما در مطالعه ای که توسط ونگ و همکاران بر روی یک جمعیت چینی انجام شده است مشاهده شده که در صورت یکسان سازی داده ها از نظر سن، مردان حامل ال غیر اصلی K نسبت به مردان دارای ژنوتایپ اصلی (T) به میزان ۲/۳۱ برابر افزایش احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا را نشان می

کلسترول موجود در خون ارثی بوده و پلی مورفیسم ABCG8 در تغییرات ژنتیکی میزان کلسترول خون مؤثر می باشد،(۱۰). افزایش کلسترول به علت افزایش احتمال رسوب و تشکیل کریستال های کلسترول در صفرا احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا را افزایش می دهد اما ژنوتایپ های متفاوت پلی مورفیسم اخیر در احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا در یک جامعه ایرانی مؤثر نمی باشد که نشان دهنده تفاوت یافته های بررسی حاضر نسبت به بررسی های پیشین بر روی دیگر جوامع می باشد و نشان دهنده تفاوت عملکرد پلی مورفیسم T400K در جامعه مورد مطالعه می باشد.

References

- 1-Acalovschi M, Pascu M, Iobagiu S, Petrescu M, Olinici CD, Ban A, et al. Increasing gall-stone prevalence and cholecystectomy rate in a large Romanian town. A necropsy study. *Dig Dis Sci* 1995;40:2582-6.
- 2-Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:423-33.
- 3-Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. *Lancet* 2006; 368:230-9.
- 4-Chen CH, Huang MH, Yang JC, Nien CK, Etheredge GD, Yang CC, et al. Prevalence and risk factors of gallstone disease in an adult population of Taiwan: an epidemiological survey. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1737-43.
- 5-Yoon JH, Kuver R, Choi HS: ABCG8 D19-H polymorphism: a basis for the genetic prediction of cholesterol gallstone disease: *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1713-4.
- 6-Wittenburg H, Carey MC. Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J Clin Invest* 2002;110:605-9.
- 7-Kusuhara H, Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G(ABCG family). *Pfluegers Arch* 2007;453:735-44.
- 8-Remaley AT, Bark S, Walts AD, Freeman L, Shulenin S, Annilo T, et al. Comparative genome analysis of potential regulatory ele-

ments in the ABCG5-ABCG8 gene cluster. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295: 276-82.

9-Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290:1771-5.

10-Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, et al. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2002;43:486-94.

11-Siddapuram SP, Mahurkar S, Duvvuru NR, Mitnala S, Guduru VR, Rebala P, et al. Hepatic cholesterol transporter ABCG8 polymorphisms in gallstone disease in an Indian population. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25: 1093-8.

12-Klett EL, Lu K, Kosters A, Vink E, Lee MH, Altenburg M, et al. A mouse model of sitosterolemia: absence of Abcg8/sterolin-2 results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med* 2004;2:5-9.

13-Kushwaha RS, Rosillo A, Mc Gill HC. Expression levels of genes for ATP-binding cassette transporters and sterol 27-hydroxylase in liver and intestine of baboons with high and low cholesterolemic responses to dietary lipids. *J Med Primatol* 2005;34: 122-9.

14-Wang Y, Jiang ZY, Fei J, Xin L, Cai Q, Jiang ZH, et al. ATP binding cassette G8

T400K polymorphism may affect the risk of gallstone disease among Chinese males. Clin Chim Acta 2007;384:80-5.

15-Plat J, Bragt MC, Mensink RP. Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. J Lipid Res 2005;46:68-75.

Association Between The T400K Polymorphism In The ABCG8 Gene and Predisposition to Gallstone Disease

Milanizadeh S¹, Mohamad Alizadeh A.H¹, Azimzadeh P¹, Romaniaei S¹, Raoshani M¹, Khaneyaghma M¹, Zali M.R¹, Mohebi S.R^{1*}

(Received: 23 April 2012

Accepted: 6 Febr. 2013)

Abstract

Introduction: Gallstone disease is a very common disease of gallbladder. Gallstone formation occurs when too much cholesterol is secreted into bile, leading to bile supersaturation and precipitation. Alteration in abcg8 protein which is one of the key transporters in gallbladder could result in increased bile cholesterol level. The aim of this study was to analyze the T400K genetic change that could have an effect on the function of this protein.

Materials & Methods: This study was conducted on 220 people, dividing into two groups of cases (n=111) and controls (n=220). Genotyping was carried out by amplification of the target sequence followed by restriction fragment length polymorphism. Detection of any differences between cases and controls was done via statistic analysis.

Findings: In this study, frequencies of the genotypes C/C, C/T and T/T were 59.5%, 39.5% and 1%, respectively. After statistical analysis of the data, there were no associations between this polymorphism and gallstone susceptibility.

Discussion & Conclusion: The heterodimer protein, abcg5/abcg8, has a key role in the transportation of cholesterol in gallbladder and any changes in these proteins could result in gallstone formation. We could not find any association between T400K polymorphism and gallstone formation. This differentiation may be a result of genetic drifts among ethnic groups of populations.

Keywords: ABCG8 protein, polymorphism, gall stone, restriction fragment length polymorphism

1. Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
*(corresponding author)