فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال چهاردهم، شماره ۴، صفحه ۲۲۹ - ۲۲۰ (زمستان ۱۳۹۰)

بررسی جهش‌های پروموتر و اگزون‌های ۴-۲ و ۱۱-۹ ژن P53 به‌روش PCR-SSCP در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری

جواد صفاری چالشتری[۱]، محمدتقی مرادی[۲]، عفت فرخی[۱]، محمدامین طباطبایی‌فر[۳]، مریم طاهرزاده[۱]، فاطمه آزادگان[۴]، غلامرضا مبینی[۵]، مهدی بنی‌طالبی[۶]، قربان‌علی رحیمیان[۷]، مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۴*]

۱ گروه بیوشیمی، مرکزتحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۲ گروه حشره‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۳ گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴ گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۵ گروه ویروس‌شناسی، مرکزتحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۶ گروه هماتولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۷ گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

چکیده

زمینه: سرطان معده از جمله مهم‌ترین بیماری‌ها است و بعد از سرطان ریه دومین عامل مرگ و میر در میان سرطان‌ها در جهان است. فاکتورهای ژنتیکی شامل انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌گر تومور مهم‌ترین عوامل بروز این بیماری هستند. ژن P53 یکی از مهم‌ترین ژن‌های سرکوب‌گر تومور است و نقش کلیدی در محافظت از ژنوم و تعمیر DNA دارد. هدف اصلی این مطالعه تشخیص جهش‌های ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی جهش‌های پروموتر و اگزون‌های ۴-۲ و ۱۱-۹ ژن P53 در نمونه‌های پارافینه بیوپسی معده در ۳۸ بیمار مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری را مورد بررسی قرار داده است. استخراج DNA به روش استاندارد فنل کلروفرم و آزمایشات مولکولی بر روی توالی‌های مذکور به‌روش PCR-SSCP انجام شد.

یافته‌ها: در نتایج حاصل از این بررسی، در نمونه‌های سرطان معده مورد مطالعه هیچ نشانه‌ای مبنی بر وقوع جهش در پروموتر و اگزون‌های ۴-۲ و ۱۱-۹ ژن P53 مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با وجود اینکه جهش‌های ژن P53 به‌عنوان فراوان‌ترین تغییرات ژنی در بروز سرطان‌ها شناخته شده است و حدود ۵۰ درصد از بدخیمی‌ها ناشی از جهش در این ژن است، اما در مطالعه ما هیچ جهشی مشاهده نشد که این می‌تواند به‌دلیل تعداد کم نمونه‌ها باشد و یا اینکه لازم است مطالعات بیشتری بر روی ژن‌های دیگر انجام داد و حتی مطالعات در سطح تغییرات اپی‌ژنتیکی را گسترش داد.

واژگان کلیدی: سرطان معده، جهش، ژن P53، پروموتر، PCR-SSCP
دریافت مقاله: ۸۹/۲/۷- پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۱۰

* شهرکرد، رحمتیه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
E-mail: mchalesh@yahoo.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

مقدمه

سرطان معده بعد از سرطان مری دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان را به‌خود اختصاص داده است و معمولاً پیش‌آگهی بدی دارد (۱). لورن (Louren) از نظر بافت‌شناسی دو نوع آدنو کارسینومای معده را شرح داد یکی روده‌ای (Intestinal) و نوع دوم منتشر (diffuse) که الگوی بهتری را برای درک اتیولوژی این بیماری ارائه می‌کند (۲ و ۳). در مناطق اصلی شیوع سرطان معده نوع روده‌ای آن نسبت به‌نوع منتشر شیوع بیشتری دارد (۴).

سرطان معده بیشتر در مردان شایع است و معمولاً سنین بالای ۴۰ سال را شامل می‌شود که با افزایش سن خطر، ابتلا به این سرطان افزایش می‌یابد به‌طوری‌که مردان بالای ۶۰ سال شدیداً در معرض ابتلا به سرطان معده هستند (۵). عفونت با نوعی باکتری به‌نام «هلیکوباکتر پیلوری» (Helicobacter pylori) نیز منجر به گاستریت (Gastritis) (زخم و التهاب معده) مزمن و در برخی موارد سرطان معده می‌شود (۶). این باکتری از طریق القاء تکثیر و رشد سلول‌ها و از طرفی دیگر با فعال کردن واکنش‌های اکسیداتیو منجر به آسیب‌های DNA می‌گردد (۷).

در بسیاری از موارد سرطان، عواملی غیر از این باکتری در بروز این بیماری دخیل‌اند؛ از جمله عوامل ژنتیکی و جهش‌های اعمال شده بر روی بسیاری از ژن‌های سرکوب‌گر تومور (Tumor Suppressor Gene) و پروتوانکوژن‌ها (Proto Oncogene) (۸). یکی از عوامل پیش‌آگهی در آدنوکارسینومای معده جهش ژن P53 می‌باشد در آدنوکارسینوم معده بیمارانی که تومور آن‌ها شواهدی ازجهش این ژن را ندارند بقاء بیشتری نسبت به‌گروه مقابل دارند همچنین این جهش بر روی نتایج شیمی درمانی و پرتو درمانی در آدنوکارسینوم معده مؤثر است (۹ و ۱۰).

ناهنجاری بر روی مولکول P53 (ژن مهارکننده سرطان) معمول‌ترین ناهنجاری مولکولی است که در سرطان‌های انسانی مشاهده شده است. P53 پروتئین مهار کننده توموری است که به مولکول DNA متصل می‌شود. حدود ۵۰ درصد سرطان‌ها مرتبط با مهار فعالیت این ژن است (۱۰). این ژن بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۷ قرار گرفته (۱۱ و ۱۲)، از ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون تشکیل شده است (۱۳).

براساس مطالعات رایسمن (Reisman D) و همکاران دو نوع پروموتر برای ژن P53 معرفی شد. اولین پروموتر در منطقه ۱۰۰ تا ۲۵۰ bp در فرادست اولین اگزون و دومین پروموتر که پروموتر بزرگ‌تری است در اولین اینترون قرار دارد (۱۴) در سال ۱۹۹۸ نشان داده شد که پروموتر دوم واقع در اولین اینترون نقش چندانی در بیان ژن ندارد (۱۵).

بوردن (Bourdon) و همکاران نشان دادند که ژن P53 در اینترون شماره چهار خود دارای یک پروموتر داخلی است و اینکه این ژن می‌تواند به‌صورت متناوب (Alternative) و چند فرمی بیان شود. در قسمت C-terminal سه ایزوفرم از پروتئین این ژن به نام‌های P53 و P53 آلفا و P53 بتا حاصل می‌شود که دو ایزوفرم آخری فاقد انتهای اولیگومریزه شده هستند (۱۶).

پروموتر متناوب منجر به‌بیان یک پروتئین ناقص در انتهای N-terminal می‌شود و از کدون ۱۳۳ آغاز می‌شود. مطالعات بر اساس تکنیک وسترن بلات وجود ۶ نوع ایزوفرم از مولکول P53 را نشان

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

می‌دهد (۱۶).

بیمارانی که دارای جهش در ژن p53 هستند در سنین قبل از ۳۰ سالگی احتمال ۵۰ درصد مبتلا شدن به سرطان را دارند. این احتمال در سنین قبل از ۶۵ سالگی به ۹۵ درصد افزایش می‌یابد. جهش بر روی این ژن همچنین می‌تواند منجر به بروز بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی دیگر شود (۹). جهش‌های این ژن اغلب به‌صورت حذف (Deletion)، دخول (Insertion)، و یا جهش‌های نقطه‌ای (point mutation) ظاهر می‌شود (۱۷). در برخی از سرطان‌ها اغلب جهش در منطقه خاصی از ژن بروز می‌کند برای مثال در هپاتوسلولار کارسینوما جهش اغلب در کدون 249 از اگزون شماره 7 ژن P53 مشاهده می‌شود این در حالی است که در سرطان معده تاکنون چنین وضعیتی مشاهده نشده است (۱۷).

پروتئین P53 در کنترل کردن سیکل سلولی، آپوپتوزیس، فرایند پیری و تعمیر DNA مؤثر است. فرایندهای پس از ترجمه (Post translation) مانند مودیفیکاسیون (Modification) وهمین‌طور فسفریلاسیون (Phosphorilation)، استیلاسیون (Acetylation) و آلکیلاسیون (Alkylation) به‌طور معمول بر P53 اعمال می‌شوند. در اغلب سرطان‌های انسانی فعالیت این پروتئین با یوبی کوئیتینه (Ubiquitination) شدن کاهش یافته و یا اینکه حساسیت سیگنال‌های سلولی به این پروتئین کاهش می‌یابد (۲۰-۱۸).

با توجه به مطالعات گذشته (۲۱) بر روی همین نمونه‌ها و عدم وجود جهش در مناطق Hot spot و اگزون‌های ۸-۵ ژن P53، دراین مطالعه به بررسی جهش‌های این ژن در پروموتر و اگزون‌های ۴-۲ و ۱۱-۹ پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌کار

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، تعداد ۳۸ نمونه پارافینه بیوپسی معده بیماران مبتلا به سرطان معده از آرشیو آزمایشگاه مرکزی بیمارستان آیت ا... کاشانی شهرکرد در طی سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ به‌روش آسان جمع‌آوری شد.

نمونه‌ها پس از تأیید در آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان آیت ا... کاشانی شهرکرد و انتقال به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، پارافین‌زدایی شده و به‌روش معمول فنل کلرفرم استخراج DNA انجام گرفت.

به‌این‌ترتیب حدود ۲۵ میلی‌گرم از هر نمونه بافت به طریقه فیزیکی کاملاً خرد شده و با استفاد از گزیلول و اتانول مطلق (به‌صورت شیب غلظت معکوس) در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد پارافین‌زدایی گردید. سپس DNA نمونه‌ها با استفاده از روش استاندارد فنل کلرفرم استخراج شد (۲۲) و غلظت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتر (Unico 2100 USA) اندازه‌گیری شد.

توالی‌های آغازگر (Primer) شامل توالی‌های جلوبرنده F (Forward) و توالی‌های معکوس R (Reverse) برای پروموتر و اگزون‌های شماره ۲ تا ۴ و ۹ تا ۱۱ از پایگاه اینترنتی UCSC و با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی و توسط شرکت ژن فن‌آوران (ایران) خریداری شدند (جدول شماره ۱). در عین حال از آغازگرهایی با جهش‌های ساختگی نیز به‌عنوان کنترل مثبت جهت افزایش دقت روش PCR-SSCP استفاده شد. به این‌ترتیب که، یک نوکلئوتید (ترجیحاً بازهای پیریمیدین (C به T و T به C و بعضاً بازهای پورین) از انتهای ۴ تا ۶ نوکلئوتیدی در سمت '3 آغازگر Forward تغییر

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

داده شد (جدول شماره ۱).

جدول ۱) آغازگرهای طراحی شده برای انجام واکنش‌های PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	Tm	طول محصول PCR
$P_{pro}F$	5’ TCT GGG AGA AAA CGT TAG GG 3’	۵۷/۳ °C	۳۴۵ bp
$P_{pro}R$	5’ CTG GCA CAA AGC TGG ACA GT 3’	۵۹/۴ °C	
$P_{pro}m$	5’ TCT GGG AGA AAA CGT TT*G GG 3’	۵۷/۳ °C	
P2F	5’ ATC CCC ACT TTT CCT CTT GC 3’	۵۷/۳ °C	۱۹۸ bp
P2R	5’ TCC CAC AGG TCT CTG CTA GG 3’	۶۱/۴ °C	
P2m	5’ ATC CCC ACT TTT CCT T*TT GC 3’	۵۵/۳ °C	
P3F	5' CCA TGG GAC TGA CTT TCT GC 3’	۵۹/۴ °C	۱۷۰bp
P3R	5’ GGG GAC TGT AGA TGG GTG AA 3’	۵۹/۴ °C	
P3m	5' CCA TGG GAC TGA CTT C*CT GC 3’	۶۱/۴ °C	
P4F	5’ CCT GGT CCT CTG ACT GCT CT 3’	۶۱/۴ °C	۳۶۰bp
P4R	5’ GCC AGG CAT TGA AGT CTC AT 3’	۵۷/۳ °C	
P4m	5’ CCT GGT CCT CTG AT*T GCT CT 3’	۵۹/۴ °C	
P9F	5' TTG CCT CTT TCC TAG CAC TG 3'	۵۷/۳ °C	۱۰۰bp
P9R	5' CCC AAG ACT TAG TAC CTG AA 3'	۵۵/۳ °C	
P9m	5' TTG CCT CTT TCC TAG T*AC TG 3'	۵۵/۳ °C	
P10F	5' CTC TGT TGC TGC AGA TC 3'	۲۸/۸ °C	۱۴۰bp
P10R	5' GCT GAG GTC ACT CAC CT 3'	۵۵/۲ °C	
P10m	5' CTC TGT TGC TGC G*GA TC 3'	۵۵/۲ °C	
P11F	5’ TGT CAT CTC TCC TCC CTG CT 3’	۵۹/۴ °C	۲۰۵ bp
P11R	5’ CAA GGG TTC AAA GAC CCA AA 3’	۵۵/۳ °C	
P11m	5’ TGT CAT CTC TCC TCC T*TG CT 3’	۵۷/۳ °C	

P : آغازگری F: آغازگر Forward، R: آغازگر Reverse، Pm: آغازگر جهش‌یافته (Forward)،

* نوکلئوتید تغییر داده شده در توالی آغازگر Forward

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر پروموتر و اگزون‌های ۴-۲ و ۱۱-۹ ژن P53 انجام شد. هر میکروتیوپ PCR شامل: ۱ میکرولیتر از هر یک از دو آغازگر F وR با غلظ ۵۰ پیکومول، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر (۵unit/µ۱)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفات با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۲/۵ میکرولیتر یون $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار(۵۰ mM) مخصوص PCR و۱ میکرولیتر DNA (حدود ۱۰۰ نانوگرم) بود که حجم نهایی به ۲۵میکرولیتر رسید.

تنظیمات دستگاه چرخه حرارتی (PCR)، (ASTEC,PC818 Japan) برای پروموتر و هر شش اگزون ژن P53 به این‌ترتیب انجام شد که هر نمونه، در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد برای سه دقیقه واسرشته شدن ابتدایی(Pre Denaturation) و پس از اعمال برنامه‌های ذکر شده در جدول شماره ۲، هر کدام از نمونه‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۸ دقیقه (دمای Final extention) حرارت دیدند (جدول شماره ۲).

پس از پایان واکنش‌ها، محصول PCR هر نمونه بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (Merk Germany) ۸ درصد، تحت جریان ۵۰ میلی آمپر الکتروفورز، و

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

سپس با رنگ‌آمیزی نیترات نقره تشخیص و مورد تأیید قرار گرفت.

جدول ۲) برنامه‌های دمایی تنظیم شده برای واکنش‌های زنجیره‌ای PCR

Exons	Denaturation	Time	Annealing	Time	Extension	Time	Cycles
Promoter	۹۶C°	۵۰ses	۵۹° C	۴۰ses	۷۲° C	۴۰ses	۳۵
Exon 2	۹۶C°	۱min	۶۱-۰/۵ ° C	۱min	۷۲° C	۱min	۵
	۹۶C°	۳۰ses	۵۸ ° C	۳۰ses	۷۲° C	۳۰ses	۳۰
Exon ۳	۹۶C°	۳۰ses	۶۳ ° C	۳۰ses	۷۲° C	۳۰ses	۳۶
Exon ۴	۹۶C°	۱min	۵۷ ° C	۴۰ses	۷۲° C	۵۰ses	۳۵
Exon ۹	۹۶C°	۳۰ses	۵۸ ° C	۳۰ses	۷۲° C	۳۰ses	۳۵
Exon ۱۰	۹۶C°	۳۰ses	۵۸ ° C	۳۰ses	۷۲° C	۳۰ses	۳۵
Exon ۱۱	۹۶C°	۳۰ses	۶۲ ° C	۳۰ses	۷۲° C	۳۰ses	۳۵

برای انجام الکتروفورز SSCP ابتدا ۵ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه را با ۴ میکرولیتر محلول Loading Buffer 1X (حاوی Formamid ۹۰ درصد، EDTA ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (با pH=۸)، Xylen Cyanol، Bromophenol Blue، 1mg/ml) مخلوط کرده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد حرارت داده تا دو رشته‌ای‌های DNA به‌صورت تک‌رشته تبدیل شوند. برای جلوگیری از بازگشت تک رشته‌های DNA و دو رشته‌ای شدن آنها، بلافاصله نمونه‌ها را باید با استفاده از یخ سرد کرد (۲۳). سپس نمونه‌ها را در کنار نمونه کنترل مثبت بر روی ژل الکتروفورز SSCP (دستگاه Atto,Japan) بارگذاری می‌کنیم. برای هر اگزون شرایط اختصاصی آن بر روی ژل الکتروفورز SSCP در جدول شماره ۳ ذکر شده است. (جدول شماره ۳)

پس از پایان الکتروفورز باندهای DNA با استفاده از روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند.

جدول ۳) شرایط بهینه برای الکتروفورز SSCP محصولات PCR

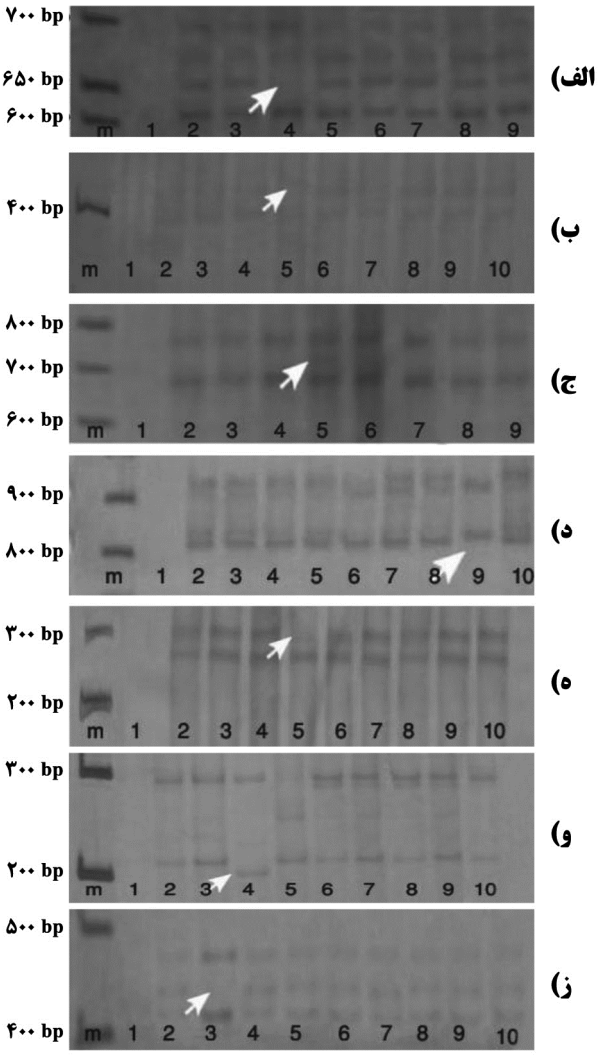
اگزون	دما C°	شدت جریان A	زمان ساعت	غلظت ژل	سایر ترکیبات
۲	۲۰	۳۲	۵/۵	٪۸	–
۳	۲۰	۳۲	۶/۵	٪۱۰	–
۴	۴	۱۳	۱۴	٪۶	۱۰ گرم اوره ٪۱۰۰
۹	۲۰	۳۲	۳/۵	٪۶	۱۰ گرم اوره ٪۱۰۰
۱۱	۲۰	۳۲	۷	٪۱۲	–
پروموتر	۲۰	۳۲	۱۰	٪۱۲	۱۰ گرم اوره ٪۱۰۰

یافته‌ها

میانگین سنی بیماران ۱۱/۵۲±۶۴/۶۳ سال بود. در این میان تعداد ۳۰ نمونه مربوط به مردان با دامنه سنی ۵۱ تا ۷۷ سال و ۸ نمونه مربوط به زنان با دامنه سنی ۳۸ تا ۷۰ سال بود. از طرفی تعداد ۹ نمونه از نوع سرطان معده منتشر و تعداد ۲۹ نمونه از نوع سرطان معده

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

روده‌ای بود، نتایج حاصل از الکتروفورز SSCP محصولات PCR نشان‌دهنده حرکت متفاوت باندهای نمونه کنترل مثبت نسبت به نمونه‌های مورد مطالعه بیماران بود. این تفاوت در تمام اگزون‌ها و پروموتر مشاهده شد، اما در خصوص نمونه‌های بیماران موارد مشکوکی مشاهده نشد و حرکت باندهای واسرشته شده بدون تفاوت با یکدیگر همگی در یک راستا قرار گرفتند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱) نتایج حاصل از الکتروفورز PCR-SSCP
m =مارکر ۱=نمونه کنترل منفی شامل محصول PCR اگزون واسرشته نشده (الف) پروموتر: 4 =کنترل مثبت. ۹-۵، ۳-۲=نمونه‌های بیماران، بدون جهش. ب) اگزون شماره ۲: ۵= کنترل مثبت.۱۰-۶،۴-۲=نمونه‌های بیماران، بدون جهش. ج) اگزون شماره ۳: ۵=کنترل مثبت. ۹-۶،۴-۲=نمونه‌های بیماران بدون جهش. د) اگزون شماره ۴: ۹=کنترل مثبت ۸-۱۰-۲= نمونه‌های بیماران، بدون جهش. ه) اگزون شماره ۹: ۵=کنترل مثبت.۱۰-۶،۴-۲=نمونه‌های بیماران بدون جهش.و اگزون شماره ۱۰: ۴=کنترل مثبت.۱۰-۵،۳،۲= نمونه‌های بیماران، بدون جهش. ز) اگزون شماره ۱۱: ۳=کنترل مثبت. ۱۰-۴،۲= نمونه‌های بیماران بدون جهش.

بحث

سرطان معده یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در ایران است. حدس زده می‌شود که همانند اغلب نقاط دنیا دومین سرطان شایع در ایران باشد. در بعضی از مناطق ایران مانند اردبیل، سرطان معده، شایع‌ترین نوع سرطان است (۲۴) و در استان چهارمحال و بختیاری دومین سرطان شایع در سال ۱۳۸۵ شناخته شده است. ایجاد سرطان یک فرایند چند مرحله‌ای است که شامل تغییرات ژنتیکی در ژن‌های سرطان از جمله ژن‌های سرکوب کننده سرطان می‌باشد. شایع‌ترین تغییراتی که در ارتباط باسرطان مشاهده شده است به‌ویژه مربوط به ژن P53 در سرطان معده است (۲۵).

اما با توجه به مطالعات انجام شده بر روی ژن P53 جهش بر روی این ژن در سرطان معده بسیار متفاوت گزارش شده است.

مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۷ بر روی ۳۸ نمونه از بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری به‌روش PCR-RFLP انجام شد. هیچ جهشی بر روی کدون‌های ۲۴۸ و ۲۸۲ مشاهده نشد (۲۶) نواحی Hot spot این ژن یعنی اگزون‌های ۵-۸ به‌روش PCR-SSCP نیز مورد مطالعه قرار گرفتند اما مورد جهشی شناسایی نشد (۲۱). در مطالعه حاضر نیز پروموتر و سایر اگزون‌ها (۲-۴ و ۹-۱۱) بر روی نمونه‌های مذکور به‌روش PCR-SSCP مورد ارزیابی قرار گرفتند و مجدداً هیچ جهشی مشاهده نشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

مطالعات مشابه محدودی نیز در ایران انجام شده است. در مطالعهء جوشقانی و همکاران میزان شیفت در ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده که به روش PCR - SSCP در سه بیمارستان تهران انجام شد در کل ۲۰/۵ درصد جهش در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. در این مطالعه که از نمونه‌های تازه و غیرپارافینه استفاده شد، یک شیفت در اگزون ۵، ۳ شیفت در اگزون ۶،۳ شیفت در اگزون ۷ و ۴ شیفت در اگزون ۸ مشاهده شد (۲۷).

در مطالعه مرتضوی و همکاران که بر روی ۶۰ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم معده انجام شد، میزان شیفت در ژن P53 ۲۶/۷ درصد گزارش گردید (۲۸).

در مطالعه‌ای که توسط شیائو (Shiao) و همکاران در ایتالیا صورت گرفت میزان بالایی از جهش ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده (۶۶ درصد) گزارش شد (۲۹). امالوئینتی (Luinetti) و همکاران میزان جهش این ژن را حتی در سرطان پیشرفته معده ۲۶ درصد گزارش کردند (۳۰).

در مطالعه یوچینو (Uchino) و همکاران بر روی ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده، میزان ۲۵ درصد جهش را در سرطان اولیه معده و ۴۲ درصد جهش بر روی این ژن را در سرطان پیشرفته معده گزارش کردند (۳۱).

در مطالعه روگ (Rugge) و همکارن ۸ درصد (۱ درصد از نوع روده‌ای و ۷ درصد از نوع منتشر (۳۲). در مطالعه اوکی (OKI) و همکاران (در نوع روده‌ای ۴۰/۶ درصد و در نوع منتشر ۸/۲ درصد) (۳۳). و در مطالعه رنزانی (Ranzani) و همکاران (در نوع روده‌ای ۴۱ درصد و نوع منتشر ۴ درصد) (۳۴). در مطالعه تالبرت (Tolbert) و همکاران این میزان نیز متفاوت گزارش شده است (۴۲ درصد در نوع روده‌ای و ۲۱ درصد از نوع منتشر) (۳۵). در مطالعه هیژ (Hsich) و همکاران در ۱۸ مورد از ۸۰ تومور (۲۲/۵ درصد) جهش مشاهده گردید (۳۶). اما در مطالعه یامادا (Yamada) و همکاران در ۱۹ مورد سرطان اولیه معده که در قسمتی از جامعه ژاپن انجام شده است بر روی ژن P53 هیچ جهشی را مشاهده نکردند (۳۷).

تکنیک PCR-SSCP یک تکنیک بسیار حساس و دقیق می‌باشد و حساسیت آن در بسیاری موارد به ۹۰ درصد گزارش شده است (۳۸). اما در هر صورت خطاهای آزمایشگاهی تأثیر بسیار زیادی در نتایج حاصل از این تکنیک به همراه دارد. با این حال استفاده از نمونه‌های کنترل مثبت به‌طور چشم‌گیری از میزان خطا در نتایج حاصل می‌کاهد. در نتایج این مطالعه جابجایی باندهای نمونه‌های کنترل مثبت در صفحه ژل الکتروفورز SSCP کاملاً مشهود است و نشان‌دهنده وجود جهش در توالی مورد مطالعه است اما نمونه‌های بیماران فاقد هر گونه جابجایی حرکتی است که احتمال وجود جهش را در این نمونه‌ها بسیار ضعیف می‌کند.

با این وجود در ایران مطالعات اندکی در ارتباط با اهمیت و نقش جهش‌های ژن P53 در ایجاد سرطان‌ها انجام شده که عمدتاً با استفاده از روش PCR-SSCP انجام شده و حدود ۱۵ تا ۲۴ درصد جهش ژنی گزارش نموده‌اند که البته هیچ‌کدام از این مطالعات با روش Sequencing مورد تأیید

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

قرار نگرفته‌اند و عملاً از نظر علمی قابل اعتماد نیستند (۲۷ و ۲۸).

این مطالعات نشان‌دهنده تأثیر کم جهش‌های ژن P53 در بروز سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری است. اما با وجود اهمیت این ژن در جلوگیری از سرطان‌ها لازم است مطالعات مولکولی در سطح پروتئین و بیان ژن در این بیماران برای ژن P53 نیز انجام شود و حتی لازم به‌نظر می‌رسد مطالعات بیشتری را بر روی سایر ژن‌های مهارکننده سرطان و حتی انکوژن‌ها در این جوامع انجام داد، تا ارتباط دقیق ژن‌های دخیل در فرایند سرطان با بروز سرطان در این جامعه در مقایسه با سایر جوامع مشخص شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کارکنان بیمارستان آیت اله کاشانی شهرکرد و بخش پاتولوژی آن مخصوصاً جناب آقای نگهدار ریاحی به‌خاطر تهیه نمونه‌های بیوپسی معده، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تأمین بودجه و از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1.Pellicano R, Fagoone S, Palestro G, et al. Intestinal metaplasia, dysplasia, gastric cancer and helicobacter pylory epidemiological observation. Minerva Med 2005; 96: 1-10.
2.Katiyar S, Dash BC, Thakur V, et al. P53 tumor suppressor gene mutations in hepatocellular carcinoma patients in India. Cancer 2000; 88: 1565-73.
3. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand 1965; 64: 31-49.
4.Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, et al. P53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4: 223-31.
5.Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature 1998; 392: 402-5.
6.Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res 1988; 48: 3554-60.
7.Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. Int J Cancer 2002; 100: 249-60.
8.Cho YG, Kim CJ, Park CH, et al. Genetic alterations of the KLF6 gene in gastric cancer. Oncogene 2005; 24: 4588-90.
9.Fondevila C, Metges JP, Fuster J, et al. P53 and VEGF expression are independent predictors of tumor recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. Br J Cancer 2004; 90: 206-15.
10.Okuyama T, Maehara Y, Kabashima A, et al. Combined evaluation of expressions of P53 and P21 proteins as prognostic factors for patients with gastric carcinoma. Oncology 2002; 63: 353-61.
11.Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, et al. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. Somat Cell Mol Genet 1985; 11: 505-10.
12.Isobe M, Emanuel BS, Givol D, et al. Localization of gene for human P53 tumor antigen to band 17p13. Nature 1986; 320: 84-5.
13.Miller C, Mohandas T, Wolf D, et al. Human P53 gene localized to short arm of chromosome 17. Nature 1986; 319: 783-4.
14.Reisman D, Balint E, Loging WT, et al. A novel transcript encoded within the 10-kb first intron of the human p53 tumor suppressor gene (D17S2179E) is induced

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

during differentiation of myeloid leukemia cells. Genomics 1996; 38: 364-70.
15.Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, et al. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. EMBO J 1998; 17: 4657-67.
16.Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev 2005; 19: 2122-37.
17.Menke-Pluymers MB, Hop WC, Mulder AH, et al. DNA ploidy as a prognostic factor for patients with an adenocarcinoma in Barrett's esophagus. Hepatogas-troenterology 1995; 42: 786-8.
18.Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat Rev Cancer 2006; 6: 909-23.
19.Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. Cancer 2007; 97: 277-82.
20.Vousden KH, Lane DP. P53 in health and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 275-83.
21.Saffari Chaleshtori J, Moradi MT, Farrokhi E, et al. Detection of Mutations in exons 5-8 of the P53 gene in gastric cancer samples using PCR-SSCP in Chaharmahal Va Bakhtiari province, Iran, 2003 Shahrekord Univ of Med Sci J 2009; 11: 61-9.
22.Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acid Res 1999; 27: e12.
23.Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. Hum Mutat 1993; 2: 404-14.
24.Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, et al. Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based cancer registry from Iran. Int J Cancer 2003; 107: 113-8.
25.Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL, et al. The prognostic significance of the accumulation of P53 tumor-suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. Br J Cancer 1994; 69: 943-6.
26.Saffari Chaleshtori J, Moradi MT, Farrokhi E, et al. Study of two common P53 gene mutations in gastric cancer using PCR-RFLP in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran, 2003. Shahrekord Univ of Med Sci J 2009; 10: 43-50.
27.Joshaghani H, Koochaki ShE, Amini R, et al. Study of P53 mutations in gastric cancer by PCR-SSCP. J Gorgan Univ Med Sci 2003; 12: 36-42.
28.Mortazavi SH, Esfehanian N, Payam M, et al. Study of between Helicobacterpylory with P53 gene mutation in gastric cancer. Pajhohandeh 2005; 10: 139-43.
29.Shiao YH, Rugge M, Correa P, et al. P53 alteration in gastric precancerous lesions. Am J Pathol 1994; 144: 511-7.
30.Luinetti O, Fiocca R, Villani L, et al. Genetic pattern, histological structure, and cellular phenotype in early and advanced gastric cancers: evidence for structurerelated genetic subsets and for loss of glandular structure during progression of some tumors. Hum Pathol 1998; 29: 702-9.
31.Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, et al. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. Int J Cancer 1993; 54: 759-64.
32.Rugge M, Shiao YH, Busatto G, et al. The p53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. Mol Pathol 2000; 53: 207-10.
33.Oki E, Tokunaga E, Nakamura T, et al. Genrtic mutual relationship between PTEN and P53 in gastric cancer. Cancer Lett 2005; 227: 33-8.
34.Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, et al. P53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4: 223-31.
35.Tolbert D, Fenoglio-Preiser C, Noffsinger A, et al. The relation of P53 gene mutaions in gastric cancer subsite and phenotype. Cancer Causes Control 1999; 10: 227-31.
36.Hsieh LL, Hsieh JT, Wang LY, et al. P53 mutations in gastric cancers from Taiwan. Cancer Lett 1996; 100: 107-13.
37.Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, et al.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

38.Behn M, Schuermann M. Sensitive detection of P53gene mutant enriched PCR-SSCP technique. Nucleic Acid Reserch 1998; 26: 1356-8.

P53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. Cancer Res 1991; 51: 5800-5.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]