بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs4073 ژن اینترلوکین-۸ با سرطان دهانه رحم به‌روش Tetra-primer arms-PCR

نیلوفر هاشمی ثابت[۱]، دکتر سیده مهدخت مداح[۲*]، دکتر کیومرث امینی[۳]

۱. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره) شهر ری، تهران، ایران.
۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره) شهر ری، تهران، ایران.
۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۱ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۹/۰۶

خلاصه

مقدمه: سرطان دهانه رحم، دومین سرطان شایع در بین زنان است. اینترلوکین-۸ (IL-8) عضوی از خانواده کموکاین‌ها می‌باشد و در شروع واکنش‌های التهابی مشارکت دارد. مطالعات پیشین نشان دادند که پلی‌مورفیسم‌ها در ژن IL-8 با خطر ابتلاء به انواع مختلف سرطان همراه است. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم IL-8 -251A>T (rs4073) با سرطان دهانه رحم در جمعیت زنان در تهران با استفاده از روش arms-PCR Tetra-primer انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه مورد- شاهدی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، در مجموع ۱۰۰ نمونه خون مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۵۰ نمونه مربوط به زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم و ۵۰ نمونه دیگر متعلق به زنان سالم به‌عنوان گروه کنترل بودند. پس از استخراج DNA از همه نمونه‌ها، فراوانی پلی‌مورفیسم IL-8 -251A>T(rs4073) با کمک تکنیک Tetra-primer arms-PCR بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه۲۱) و آزمون کای دو انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ TT، AT، AA در گروه بیمار به‌ترتیب ۴۲٪، ۵۰٪ و ۸٪ و در گروه کنترل به‌ترتیب ۲۴٪، ۷۰٪ و ۶٪ بود. فرکانس آلل‌های A و T در افراد بیمار به‌ترتیب برابر ۳۳٪ و ۶۷٪ و در افراد سالم به‌ترتیب برابر ۴۱٪ و ۵۹٪ بود. اختلاف معناداری در توزیع آللی (p=۰/۲۴) و ژنوتیپی در هر ۳ مدل هم‌بارز (p=۰/۱۶)، غالب (p=۰/۰۵۵) و مغلوب (p=۰/۶) بین دو گروه شاهد و بیمار مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بین پلی‌مورفیسم IL-8 -251A>T ژن و سرطان دهانه رحم در جمعیت زنان مورد مطالعه در تهران ارتباط وجود نداشت.

کلمات کلیدی: اینترلوکین-۸، پلی‌مورفیسم، سرطان دهانه رحم، Tetra-primer arms-PCR

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر سیده مهدخت مداح؛ دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره) شهرری، تهران، ایران. **تلفن:** ۰۲۱-۲۲۲۱۴۳۸۱؛ **پست الکترونیک:** s.m.maddah@iausr.ac.ir

مقدمه

امروزه، سرطان به یکی از مهم‌ترین معضلات سلامتی در سراسر جهان تبدیل شده است (۱). این بیماری یکی از دلایل اصلی مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شود و علی‌رغم پیشرفت‌های زیادی که در خصوص تشخیص زودهنگام بیماری‌ها صورت گرفته است، بیماران مبتلا به سرطان اغلب پیش‌آگهی ضعیفی دارند که می‌تواند درصد بقای آنها را تحت تأثیر قرار دهد (۲). سرطان دهانه رحم، دومین سرطان شایع و سومین عامل اصلی مرگ‌ومیر در بین جمعیت زنان در کشورهای کمتر توسعه یافته می‌باشد که عاملی است که در میزان باروی زنان نیز مؤثر است (۳). سرطان دهانه رحم از نظر بافت‌شناسی به سه دسته کارسینومای سلول سنگفرشی، کارسینومای آدنواسکواموز و آدنوکارسینومای دهانه رحم تقسیم می‌شود که حدود ۸۰٪ بیماران در گروه اول قرار دارد (۴). عوامل متعددی از جمله HPV یا آلودگی به ویروس پاپیلومای انسانی، تعدد شرکای جنسی، مصرف مداوم قرص‌های ضدبارداری و چاقی، زمینه ابتلاء به این بیماری را افزایش می‌دهند (۸-۵). سرطان دهانه رحم خوشبختانه به دلایل پیشرفت آرام، وجود ضایعات پیش‌سرطانی قابل تشخیص و روش‌های درمانی مؤثر، قابل پیشگیری می‌باشد (۹). علاوه بر این، انجام آزمایش پاپ‌اسمیر به‌طور منظم جهت غربالگری بیماران خطر ابتلاء به این بیماری را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد (۱۰). مطالعات نشان می‌دهند که عامل ژنتیک نیز نقش به‌سزایی در شکل‌گیری سرطان دهانه رحم ایفا می‌کند.

پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلوتیدی (SNP[1]) رایج‌ترین تنوع ژنتیکی در ژنوم انسان به‌حساب می‌آیند که با ایجاد تغییرات، قادر به افزایش استعداد ابتلاء به این سرطان می‌باشند و بررسی این جایگاه‌ها در جهت ایجاد داروهای مؤثرتر ضروری می‌باشد (۱۱، ۱۲). سایتوکاین‌های التهابی، عامل مهمی در پاتوژنز سرطان دهانه رحم محسوب می‌شوند (۱۳) و تاکنون بررسی‌های زیادی بر روی آنها انجام شده است که یکی از مهم‌ترین آنها اینترلوکین ۸ (IL-8) می‌باشد. نام اینترلوکین از سال ۱۹۷۹ انتخاب شد که ترکیب دو واژۀ "اینتر" به‌معنای ارتباطی و "لوکین" به مفهوم لکوسیت می‌باشد. اینترلوکین آلفا و بتا سایتوکینین‌هایی هستند که در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، واکنش‌های التهابی و هماتوپویزیس شرکت می‌کنند (۱۴، ۱۵).

ژن IL-8 بر بازوی بلند کروموزوم شماره ۴ قرار دارد و شامل ۴ اگزون و ۳ اینترون می‌باشد (۱۶). IL-8 توسط انواع سلول‌ها از جمله مونوسیت‌ها، سلول‌های اندومتریوم و سلول‌های سرطانی دهانه رحم ترشح می‌شود و به‌عنوان جاذب شیمیایی، با فراخواندن لوکوسیت‌ها از خون محیطی به محل التهاب در بافت، در تحریک و راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی مشارکت دارد (۲۰-۱۷). علاوه بر این، IL8 با اتصال به گیرنده خود، در تحریک تکثیر، چسبندگی، مهاجرت و تهاجم سلول‌ها در انواع غده‌های سرطانی نیز نقش دارد (۲۱، ۲۲). بررسی ارتباط IL-8 و گیرنده‌های آن (IL-8RB، IL-8RA) در سلول‌های سرطان دهانه رحم نشان داد که سطح IL-8 در بافت سرطان دهانه رحم در مقایسه با بافت‌های معمولی دهانه رحم، به‌طور قابل توجهی افزایش یافته و مهاجرت و تکثیر سلول‌های HeLa تیمار شده با IL-8 در مقایسه با سلول‌های سرطانی HeLa تیمار نشده نیز افزایش یافته است (۲۳). این سایتوکاین پتانسیل آنژیوژنیک قوی داشته و در شرایط در شیشه[2] با بیان افتراقی ژن‌های آنتی‌آپوپتوز و فعال‌سازی MMP-2 و MMP-9 فرآیند آنژیوژنز را تنظیم می‌کند (۲۴). بیماری‌های ژنتیکی ناشی از چندشکلی‌ها در IL8، به‌طور اساسی نتیجه تغییر وضعیت بیان و ساختار در این ژن است. یکی از انواع پلی مورفیسم‌های این ژن که این اواخر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، پلی‌مورفیسم -251A>T (rs4073) می‌باشد که در ناحیه پرومتر و در بالادست کدون آغاز قرار دارد. با بررسی دو پلی‌مورفیسم -181A>G و -251A>T از دو ژن IL8 و matrix metalloproteinase (MMPs)، بین آنها و بروز سرطان دهانه رحم ارتباط مثبت مشاهده شد و دیده شد که حاملین دو آلل T و G به‌طور قابل‌توجهی بیشتر در معرض خطر ابتلاء به این بیماری قرار دارند (۲۵). علاوه براین، این پلی‌مورفیسم با بروز

[1] single-nucleotide polymorphism

[2] In vitro

انواع سرطان مرتبط می‌باشد (۲۶، ۲۷). با توجه به اهمیت ژن IL-8 در ایجاد پاسخ التهابی و اینکه تغییرات این ژن می‌تواند منجر به افزایش استعداد ابتلاء به سرطان و سایر بیماری‌های التهابی گردد، مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم (rs4073)-251A>T ژن IL-8 با بیماری سرطان دهانه رحم در جمعیت زنان در شهر تهران انجام گرفت.

روش‌کار

در این مطالعه مورد- شاهدی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، جمع‌آوری نمونه خون از مراجعین مراکز و کلینیک-های درمان سرطان تهران انجام شد. برای گروه بیمار از بین مبتلایان به سرطان دهانه رحم، افراد بدون سابقه درمان رادیوتراپی و جراحی و در مرحله اولیه تومور انتخاب شدند. ابتدا پرسشنامه‌ای در ارتباط با سن، نحوه تغذیه از نظر مصرف سیگار و الکل، در اختیار افراد شرکت‌کننده قرار داده شد و پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از آنها، جمع‌آوری نمونه‌ها از افراد غیرسیگاری و غیرالکلی در محدوده سنی ۶۱-۳۰ سال صورت گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- محدودهٔ سنی بیماران در مرحله اولیه سرطان دهانه رحم

سن (سال)	تعداد (درصد)
۳۹-۳۰	۱۶ (۳۲)
۴۹-۴۰	۲۱ (۴۲)
۵۹-۵۰	۱۱ (۲۲)
۶۹-۶۰	۲ (۴)

از ۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه سالم (بدون پیشینه خانوادگی سرطان برای اقوام درجه ۱ و ۲)، ۵ سی‌سی خون وریدی گرفته شد و به لوله‌های آزمایش دارای ماده ضد انعقاد EDTA منتقل شد، سپس لوله‌ها در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای محاسبه حجم نمونه، از فرمول کوکران استفاده شد (۳۵). در این فرمول N حجم جامعه آماری، z برابر ۱/۹۶، p=q=۰/۵ و d مقدار خطا در نظر گرفته شد. در این محاسبه با سطح خطای ۵٪، ۵۰ نفر به‌عنوان بیمار و ۵۰ نمونه به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

استخراج مولکول DNA و سنجش کیفیت آن: جهت استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون از کیت استخراج سیناپیور EX6001 (شرکت سیناکلون-ایران) استفاده شد و بر اساس دستورالعمل کیت، استخراج انجام گردید. جهت تعیین کیفیت DNA ژنومی، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های DNA روی ژل ۱٪ آگارز، الکتروفورز گردید و عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه ژل داک (ساخت شرکت Bio Rad آمریکا) انجام شد. نمونه‌ها، جهت بررسی مولکولی در فریزر ۷۰- درجه نگه‌داری شدند.

ژنوتایپینگ با تکنیک Tetra primer Arms-PCR:

الف) سنتز پرایمر: برای هر یک از آلل‌های نرمال و جهش‌یافته یک جفت پرایمر با دمای ذوب ۵۸ درجه سانتی‌گراد بر اساس مطالعه ماتسون و همکاران (۲۰۰۶) و نیز با استفاده از برنامه Oligo Primer (نسخه ۷) کنترل گردید (جدول ۲) و توسط شرکت ژن فناوران سنتز شدند (۲۸).

ب) واکنش Tetra primerArms-PCR: هر ویال واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم از DNA الگو بود. مسترمیکس PCR ×۱ شرکت سیناکلون شامل ۰/۰۸ واحد/ میکرولیتر تگ‌پلی‌مراز در بافر واکنش، ۳ میلی‌مولار کلرید منیزیوم و ۲ میلی‌مولار dNTPs استفاده شد. از هر پرایمر خارجی با غلظت ۵ میکرومول بر لیتر و هر پرایمر داخلی با غلظت ۲۵ میکرومول بر لیتر در حجم ۱ میکرولیتر به مخلوط اضافه شد (۲۵، ۲۸). نمونه‌ها با تنظیم شرایط بهینه در دستگاه ترموسایکلر ۴۸ چاهکی (شرکت Bio Rad آمریکا) به‌روش Tetra primer

Arms-PCR تکثیر شدند (۲۹، ۳۰). برنامه دمایی و زمانی PCR به‌ترتیب عبارت است از:

۱) مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه.

۲) سه مرحله واسرشت‌سازی ثانویه، اتصال پرایمر و گسترش به‌ترتیب در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه در مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به‌مدت ۶۰ ثانیه در ۳۲ سیکل.

۳) گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه (۲۸).

ج) ارزیابی محصول PCR: جهت اطمینان از صحت تکثیر محصول PCR و بررسی ژنوتیپ نمونه‌ها، ۵ میکرولیتر از محصول PCR هر یک از نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۲٪ همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ safe DNA stain (سینا کلون) و با استفاده از بافر ۱× TBA، الکتروفورز شد. برای هر ژل همراه با نمونه‌های حاصل از محصول PCR، نمونه کنترل مثبت که از قبل سکانس آنها تأیید شده بود و نیز یک نمونه کنترل منفی و همچنین شناساگر زیستی که در آن باند outer، bp ۳۴۹ و آلل bp A ۲۲۸ و آلل bp T ۱۶۹ بود، بارگذاری گردید. پس از اتمام الکتروفورز، عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه ژل داک (ساخت شرکت Bio Rad آمریکا) صورت گرفت.

جدول ۲- توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و نیز طول محصول (۲۸)

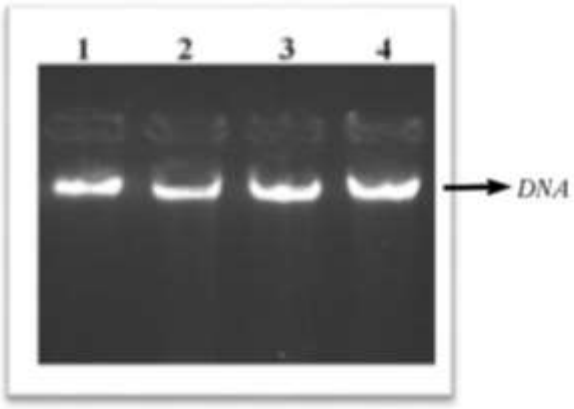
نام پرایمر	توالی	طول محصول bp
Forward outer primer	5′-CATGATAGCATCTGTAATTAACTG -3′	۳۴۹
Reverse outer primer	5′-CACAATTTGGTGAATTATCAAA -3′	۳۴۹
Forward inner primer (T)	5′-GTTATCTAGAAATAAAAAAGCATACAA-3′	۱۶۹
Reverse inner primer (A)	5′-CTCATCTTTTCATTATGTCAGAG-3′	۲۲۸

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) و آزمون کای دو با محاسبه OR با فاصله اطمینان ۰/۹۵٪ (۹۵٪: CI) صورت گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

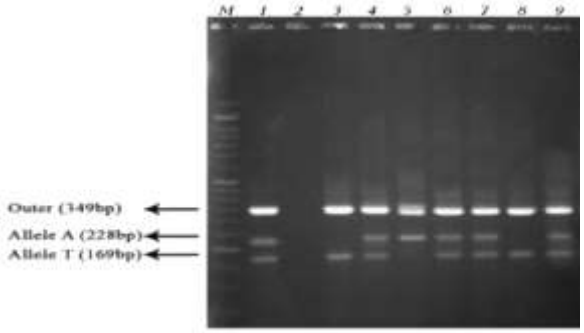
یافته‌ها

در مطالعه حاضر وجود رابطه بین پلی‌مورفیسم rs4073 A>T در ناحیه پروموتر ژن IL-8 با سرطان رحم با استفاده از روش Tetra Arms PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از استخراج مولکول‌های DNA از نمونه‌های خون برای اطمینان از استخراج صحیح و کیفیت مولکول‌ها الکتروفورز آگارز ۱٪ انجام شد که با تشکیل باند، از صحت انجام کار، اطمینان حاصل شد (شکل ۱).

با توجه به اینکه دستگاه الکتروفورز مورد استفاده ۱۵ شانه‌ای بود، برای الکتروفورز محصول PCR برای هر یک از دو گروه سالم و بیمار که هر گروه شامل ۵۰ نفر بودند، در مجموع ۱۰ ژل مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس شکل ۲، در ژل‌های الکتروفورز محصول PCR، افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت (AT) سه باند ۱۶۹، ۲۲۸ و ۳۴۹ جفت بازی و افراد با ژنوتیپ هموزیگوت (AA) و هموزیگوت (TT) به‌ترتیب دو باند ۳۴۹، ۲۲۸ و ۳۴۹، ۱۶۹ جفت بازی را تشکیل دادند. با بررسی دقیق ژل‌ها، فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.



شکل ۱- نمونه DNA استخراج شده از افراد بیمار و سالم



شکل۲- محصولات PCR پلی‌مورفیسم IL-8 -251A>T بر ژل الکتروفورز افقی. نمونه‌های شماره ۱، ۴، ۶، ۷ و ۹ ژنوتیپ هتروزیگوت (AT)، نمونه‌های ۳ و ۸ ژنوتیپ TT و نمونه شماره ۵ ژنوتیپ AA را نشان می‌دهند. چاهک شماره ۱ و ۲ به‌ترتیب نمونه کنترل مثبت و منفی می‌باشد. M مارکر ۵۰ جفت بازی است.

بر اساس جدول ۳، فراوانی آلل‌های T و A در گروه بیمار به‌ترتیب ۰/۶۷٪ و ۰/۳۳٪ و در گروه کنترل ۰/۵۹٪ و ۰/۴۱٪ بود که علی‌رغم بیشتر بودن فراوانی آلل T، این اختلاف معنی‌دار نبود (p=۰/۲۴).

بر اساس جدول ۴ در مقایسه ژنوتیپ‌ها، از ۵۰ زن مبتلا به سرطان دهانه رحم، ۴ نفر (۸٪) دارای ژنوتیپ AA، ۲۵ نفر (۵۰٪) دارای ژنوتیپ AT و ۲۱ نفر (۴۲٪) دارای ژنوتیپ TT بودند و از بین ۵۰ زن سالم نیز ۳ نفر (۶٪) دارای ژنوتیپ AA، ۳۵ نفر (۷۰٪) دارای ژنوتیپ AT و ۱۲ نفر (۲۴٪) دارای ژنوتیپ TT بودند. در توزیع ژنوتیپی نیز بین دو گروه بیمار و کنترل در هر ۳ مدل هم‌بارز (p=۰/۱۶)، غالب (p=۰/۰۵۵) و مغلوب (p=۰/۶) نیز ارتباط معناداری مشاهده نشد. در شکل ۳ برای مقایسه راحت‌تر درصد فراوانی ژنوتیپ‌ها، نمودار آنها در دو گروه سالم و بیمار نشان داده شده است. با توجه به اینکه در این آزمون p>۰/۰۵ به‌دست آمد، نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن تفاوت در توزیع ژنوتیپ‌های مختلف و فراوانی آلل‌ها برای پلی‌مورفیسم مربوطه در زن اینترلوکین-۸ (rs4073) بین دو گروه بیمار و کنترل بود.

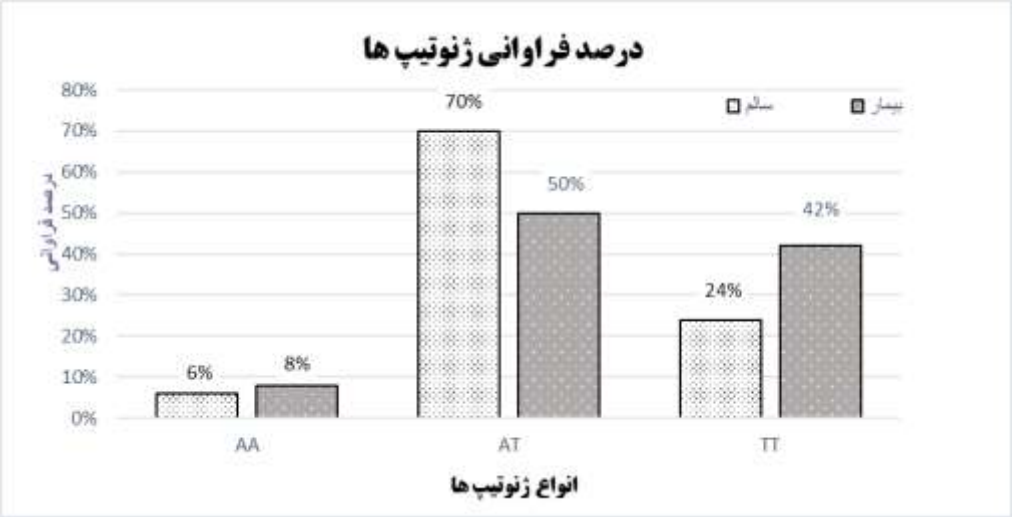
جدول ۳- نتایج آزمون بررسی فراوانی آللی پلی‌مورفیسم Rs4073 A>T با استفاده از آزمون کای دو

SNP	آلل‌ها	بیمار تعداد (درصد)	کنترل تعداد (درصد)	OR	(CI ٪۹۵:)	سطح معنی‌داری
rs4073 A>T	T	۶۷ (۶۷)	۵۹ (۵۹)	۱/۴۱	۰/۲-۵/۷۹	۰/۲۴
	A	۳۳ (۳۳)	۴۱ (۴۱)			

OR: نسبت شانس، CI 95%: فاصله اطمینان ۹۵٪

جدول ۴- نتایج آزمون بررسی فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم Rs4073 A>T با استفاده از آزمون کای دو

SNP	نمونه‌ها	فراوانی ژنوتیپ			ژنوتیپ		مدل غالب		مدل هم‌بارز		مدل مغلوب	
		TT	AT	AA	P	p	OR (CI :/۹۵)	p	OR (CI :/۹۵)	p	OR (CI :/۹۵)	p
rs4073 A>T	بیمار	۲۱ (۴۲)	۲۵ (۵۰)	۴ (۸)	۰/۱۱	۰/۰۵۵	۲/۲۹ (۰/۹۷ -۵/۴۰)	۰/۱۶	۰/۶۱ (۰/۳۱-۱/۲۳)	۰/۶	۰/۷۳ (۰/۱۵۵-۳/۴۶)	
	کنترل	۱۲ (۲۴)	۳۵ (۷۰)	۳ (۶)								



شکل ۳- نمودار فراوانی ژنوتیپ‌ها: ژنوتیپ AA مدل مغلوب با p=۰/۶ و ژنوتیپ AT مدل هم‌بارز با p=۰/۱۶ و ژنوتیپ TT مدل غالب با p=۰/۰۵۵ اختلاف معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها نشان نمی‌دهد.

بحث

سرطان دهانه رحم، دومین سرطان شایع در بین زنان در سراسر جهان است (۳۰). علاوه بر سبک زندگی نادرست، عامل ژنتیک نیز زمینه ابتلاء به این سرطان را تقویت می‌کند (۳۱). تاکنون مطالعات زیادی بر چندشکلی‌ها به‌ویژه در ژن‌های مرتبط با سایتوکاین‌ها صورت گرفته است که یکی از آنها اینترلوکین-۸ (IL-8) است. IL-8 از اعضای خانواده بزرگ کموکاین‌ها می‌باشد که توسط انواع سلول‌های سرطانی و سالم ترشح و با اتصال به گیرنده خود (CXCR1، CXCR2) در سطح سلول و راه‌اندازی مسیرهای سیگنالی، در ایجاد و تقویت واکنش‌های التهابی مشارکت دارد (۳۲). یکی از پلی‌مورفیسم‌های مهم در ناحیه پروموتر ژن IL-8، واریانت (rs4073) 251A>T- می‌باشد که اخیراً بسیار مورد بررسی قرار گرفته است. بررسی دو واریانت 251A/T- و 181A/G- از دو ژن IL-8 و MMP-7 نشان داد افراد دارای ژنوتیپ‌های IL-8-251TT و MMP-7-181GG بیشتر در معرض خطر ابتلاء به سرطان دهانه رحم و متاستاز لنفاوی قرار دارند (۲۵). علاوه بر این، این پلی‌مورفیسم با بروز بیماری‌هایی مانند برونشیت و سایر سرطان‌ها در جمعیت‌های مختلف نیز مرتبط می‌باشد (۳۳، ۳۴).

در مطالعه حاضر که ارتباط پلی‌مورفیسم (rs4073) - 251A>T ژن IL-8 با بروز سرطان دهانه رحم مورد بررسی قرار گرفت، فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AT، TT در گروه بیمار به‌ترتیب برابر ۸٪، ۵۰٪، ۴۲٪ و در گروه کنترل به‌ترتیب برابر ۶٪، ۷۰٪ و ۲۴٪ بودند که اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود نداشت، بنابراین در جمعیت مورد بررسی، پلی‌مورفیسم rs4073 ژن IL-8 با بروز سرطان دهانه رحم ارتباط نداشت. علاوه بر این، بین این پلی‌مورفیسم و ایجاد سرطان پستان در جمعیت زنان ایرانی نیز ارتباط معناداری مشاهده نشد (۳۵). نتایج

مطالعه حاضر با نتایج وایراکتاریس و همکاران (۲۰۰۷) بر روی کارسینوم سلول سنگفرشی مخاط دهان و نتایج هوانگ و همکاران (۲۰۱۸) بر روی کارسینوم نازوفارنژیال (ناحیه‌ای پشت بینی و بالا و عقب دندان) (۳۶، ۳۷) همخوانی نداشت. علت این مغایرت می‌تواند تفاوت نوع سرطان و نوع بدخیمی مورد بررسی و نیز تفاوت در حجم نمونه و جمعیت مورد بررسی باشد. بررسی واریانت دیگر از این ژن نشان داد (rs2227307)، حاملین ژنوتیپ IL-8 +396 GG، با تولید میزان بالایی از IL-8، قادرند عفونت HPV که با توسعه نئوپلازی‌های اپی‌تلیال گردن رحم و سرطان مهاجم دهانه رحم مرتبط است را از طریق جذب گرانولوسیت‌ها به مکان‌های عفونت کنترل کنند (۳۸). علاوه بر IL-8، گزارش شده است که سایر سایتوکاین‌ها از جمله IL-6، TNF-α و IL-10 استعداد ابتلاء به سرطان دهانه رحم را افزایش می‌دهند (۳۹، ۴۰).

مطالعات نشان دادند میزان بیان IL-8 و گیرنده‌های مرتبط با آن (IL-8RB، IL-8RA) در بافت سرطانی دهانه رحم در مقایسه با بافت نرمال آن به‌طور قابل توجهی بالاتر است و به علاوه، در رده سلولی هلای[1] سرطان دهانه رحم تحت تیمار IL-8 بیان دو پروتئین NUMB و ERKs که به‌ترتیب در توسعه، تمایز و تعیین سرنوشت سلولی نقش دارند، تغییر کرده است و مسیرهای مولکولی آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۳). کیم و همکاران (۲۰۱۸) دو رده سلولی HeLa و SiHa را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که پروتئین CCAR2 در تنظیم ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها تحت شرایط اکسیداتیو مشارکت داشته و در سلول‌ها با تولید ناکافی این پروتئین، میزان IL-8 به‌طور قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند. از آنجا که تومور ماهیت اکسیداتیو دارد و گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) که توسط سلول‌های توموری، فیبروبلاست‌ها و ماکروفاژهای مرتبط با سرطان، یک محیط پیش‌التهابی پایدار ایجاد می‌کنند، ترشح سایتوکاین‌ها منجر به تقویت التهاب ناشی از ROS، تکثیر، متاستاز و در نهایت بقای سلول‌های سرطانی خواهد شد (۴۱). بیان بالای IL-8 در رابطه با انواع سرطان‌های دیگر نیز گزارش شده است که با تقویت رگ‌زایی و توسعه تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی از طریق فرآیند اتوکرین اثر می‌کند (۴۲، ۴۳). علاوه بر این، بیان بالای IL-8، منجر به پاسخ ضعیف‌تر نسبت به داروهای شیمی‌درمانی می‌گردد (۴۴). پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی در ژن‌های سایتوکاین‌ها به‌طور بالقوه با ایجاد یا حذف موتیف‌های کلیدی در ناحیه پروموتر یا توالی‌های تنظیمی بر تولید آنها تأثیر گذاشته و قادر به افزایش استعداد ابتلاء به سرطان می‌باشند (۴۵).

در بررسی خطر و ارزش پیش‌آگهی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی IL-8، MMP-1 و MMP-13 در کارسینومای سلول‌های سنگ‌فرشی دهانی و حلقوی (SCC) مشخص گردید rs2252070 در MMP-13 ممکن است موجب محافظت در برابر SCC دهان و حنجره شود. علاوه بر این اثرات ترکیبی (rs4073) IL-8، (rs2071230 and rs470558) MMP- و MMP-13 (rs2252070) با عوامل سرطان‌زای محیطی، مانند تنباکو و الکل با افزایش خطر ابتلاء به SCC دهان و حنجره مرتبط است (۴۶).

بررسی اثر چندریختی‌های (IL-8 -251T>A) rs4073 بر بقای کلی در بیماران مبتلا به سرطان معده (GC) ارتباط مثبت بین آنها را نشان داد، از این رو می‌توان این پلی‌مورفیسم اینترلوکین-۸ را به‌عنوان کاندید پیش‌آگهی سرطان معده پیشنهاد نمود (۴۷).

مقیمی و همکاران (۲۰۲۰) با تجزیه و تحلیل متاآنالیز پلی‌مورفیسم اینترلوکین-۸ در سرطان معده جمعیت‌های آسیایی نشان دادند این پلی‌مورفیسم با افزایش خطر ابتلاء به سرطان معده به‌ویژه از نظر قومیت و کشور همراه است (۴۸).

در ارتباط با سرطان دهانه رحم، بررسی متاآنالیز واو و همکاران (۲۰۱۴) بر پلی‌مورفیسم‌های IL-1RN و IL-1AY511C/T نشان داد این پلی‌مورفیسم‌ها ممکن است به حساسیت ژنتیکی سرطان دهانه رحم کمک کنند (۴۹). مطالعه متاآنالیز جاوو و همکاران (۲۰۱۷) بر روی چندشکلی اینترلوکین ۱۸ و خطر ابتلاء به سرطان

[1] Hela

دهانه رحم نشان داد چند شکل بودن IL-18 ممکن است در پیشرفت سرطان دهانه رحم نقش نداشته باشد (۵۰). مطالعه متاآنالیز گویو و همکاران (۲۰۱۸) در ارتباط با اثر چندشکلی اینترلوکین-۱۰ بر سرطان دهانه رحم نشان داد این چندشکلی ممکن است نقش‌های مختلفی را در رابطه با خطر ابتلاء به سرطان دهانه رحم، به‌ویژه در آسیایی‌ها داشته باشد (۴۰). تجزیه و تحلیل‌های مطالعه پریرا و همکاران (۲۰۲۰) ارتباط بین سرطان دهانه رحم و چندشکلی IL-10 c.-592C> A را نشان داد و مشخص گردید که وجود آلل A به‌طور مستقل با خطرات بالاتری از پیشرفت سرطان دهانه رحم مرتبط است (۵۱).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تفاوت معناداری در توزیع آللی و ژنوتیپی بین دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. بنابراین نتیجه‌گیری شد که جایگزینی تک‌نوکلیوتیدی - 251 A/T ژن IL-8، با بروز سرطان دهانه رحم در جمعیت زنان در تهران مرتبط نمی‌باشد. این نتایج حاصل مطالعه یک جمعیت محدود است و نتایج قطعی‌تر نیازمند جامعه آماری بزرگ‌تر می‌باشد. به‌علاوه سن، نژاد، عوامل محیطی و موقعیت جغرافیایی نیز می‌تواند نتایج را تحت تأثیر قرار دهد که پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده مورد بررسی قرار گیرد. همچنین پیشنهاد می‌گردد بیان ژن اینترلوکین-۸ در سطح RNA و پروتئین سنجیده شود و با نتایج ژنتیکی به‌دست آمده مقایسه گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیر و کارشناسان آزمایشگاه پاسارگاد و مسئولین دانشگاه آزاد واحد یادگار امام (ره) شهر ری و همچنین از سرکار خانم مه‌لقا امین‌ملک که ما را در مراحل مختلف انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Bal MS, Bodal VK, Kaur J, Kaur M, Sharma S. Patterns of cancer: a study of 500 Punjabi patients. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2015; 16(12):5107-10.
2. Xu XC. Risk factors and gene expression in esophageal cancer. Cancer epidemiology 2009: 335-60.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer 2010; 127(12):2893-917.
4. Wright Jr TC, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. New England Journal of Medicine 2003; 348(6):489-90.
5. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. Journal of clinical virology. 2000; 19(1-2):1-5.
6. Liu ZC, Liu WD, Liu YH, Ye XH, Chen SD. Multiple sexual partners as a potential independent risk factor for cervical cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2015; 16(9):3893-900.
7. Iversen L, Sivasubramaniam S, Lee AJ, Fielding S, Hannaford PC. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. American journal of obstetrics and gynecology 2017; 216(6):580-e1.
8. Gu W, Chen C, Zhao KN. Obesity-associated endometrial and cervical cancers. Front Biosci (Elite Ed). 2013; 5(1):109-8.
9. Leyden WA, Manos MM, Geiger AM, Weinmann S, Mouchawar J, Bischoff K, et al. Cervical cancer in women with comprehensive health care access: attributable factors in the screening process. Journal of the National Cancer Institute 2005; 97(9):675-83.
10. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J. Screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. CA Cancer J Clin 2012; 62(3):147-72.
11. Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. Trends in Ecology & Evolution 2003; 18(5):249-56.
12. Mitani Y, Lezhava A, Kawai Y, Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, et al. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. Nature Methods 2007; 4(3):257-62.
13. Wang Y, Liu XH, Li YH, Li O. The paradox of IL‐10‐mediated modulation in cervical cancer. Biomedical Reports 2013; 1(3):347-51.
14. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, et al. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. Science 1988; 241(4865):585-9.

15. Zafari Zangeneh F, Abdollahi A, Naghizadeh MM, Bagheri M. A low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome: Role of interleukin-1 alpha, 1 beta, 17A and TNFα. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2015; 17(135):9-15.
16. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. The Journal of clinical investigation 1989; 84(4):1045-9.
17. Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). The Journal of Immunology 1987; 139(3):788-93.
18. Li MQ, Luo XZ, Meng YH, Mei J, Zhu XY, Jin LP, et al. CXCL8 enhances proliferation and growth and reduces apoptosis in endometrial stromal cells in an autocrine manner via a CXCR1-triggered PTEN/AKT signal pathway. Human reproduction 2012; 27(7):2107-16.
19. Xie F, Meng YH, Liu LB, Chang KK, Li H, Li MQ, et al. Cervical carcinoma cells stimulate the angiogenesis through TSLP promoting growth and activation of vascular endothelial cells. American Journal of Reproductive Immunology 2013; 70(1):69-79.
20. Marshall RM, Salerno D, Garriga J, Graña X. Cyclin T1 expression is regulated by multiple signaling pathways and mechanisms during activation of human peripheral blood lymphocytes. The Journal of Immunology 2005; 175(10):6402-11.
21. Araki S, Omori Y, Lyn D, Singh RK, Meinbach DM, Sandman Y, et al. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. Cancer research 2007; 67(14):6854-62.
22. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. Expert review of clinical immunology 2014; 10(5):593-619.
23. Jia L, Li F, Shao M, Zhang W, Zhang C, Zhao X, et al. IL‐8 is upregulated in cervical cancer tissues and is associated with the proliferation and migration of HeLa cervical cancer cells. Oncology letters 2018; 15(1):1350-6.
24. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. The Journal of Immunology 2003; 170(6):3369-76.
25. Wu S, Lu S, Tao H, Zhang L, Lin W, Shang H, et al. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences] 2011; 31(1):114-9.
26. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8-251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. BMC cancer 2007; 7(1):1-5.
27. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M, Khairi H, Helal AN, et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. BMC cancer 2010; 10(1):1-2.
28. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-α polymorphisms and airway disease. Journal of Human Genetics 2006; 51(3):196-203.
29. Siasi E, Ghane B, Ashrafi F. Study of relation on breast cancer and rs3803662 polymorphism of TOX3 gene in Iranian female population by Tetra Arms PCR. Journal of Developmental Biology 2019; 11(3):62-74 (Persian).
30. Allafan S, Hasanzadeh Nazarabadi M, Enghelabifar M, Khayatzadeh J, Shahrokh Abadi K, Jalali M, et al. No association between recurrent implantation failure (RIF) following in vitro Fertilization (IVF) with gene Polymorphism (P53 Arg72Pro). Iran J Obstet Gynecol Infertil 2015; 18(172):18-25.
31. La Vecchia C, Boccia S. Oral contraceptives, human papillomavirus and cervical cancer. European journal of cancer prevention 2014; 23(2):110-2.
32. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. Cytokine & growth factor reviews 2001; 12(4):375-91.
33. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. Thorax 2000; 55(12):1023-7.
34. Ren YI, Poon RT, Tsui HT, Chen WH, Li Z, Lau C, et al. Interleukin-8 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. Clinical Cancer Research 2003; 9(16):5996-6001.
35. Siasi E, Gholami M, Ashrafi F. Study of relation on breast cancer and A/T 251 polymorphism of IL-8 gene in Iranian female populations by Tetra Arms PCR. Journal of Cell & Tissue 2019; 10(1):12-23.
36. Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, et al. The interleukin-8 (−251A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. European Journal of Surgical Oncology (EJSO) 2007; 33(4):504-7.
37. Huang CY, Chang WS, Tsai CW, Hsia TC, Shen TC, Bau DT, et al. The contribution of interleukin-8 genotypes and expression to nasopharyngeal cancer susceptibility in Taiwan. Medicine 2018; 97(36):e12135.
38. Lima SF, Tavares MM, Macedo JL, Oliveira RS, Heráclio SD, Maia MD, et al. Influence of IL-6, IL-8, and TGF-β1 gene polymorphisms on the risk of human papillomavirus-infection in women from Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2016; 111(11):663-9.

39. Gupta MK, Singh R, Banerjee M. Cytokine gene polymorphisms and their association with cervical cancer: A North Indian study. Egyptian Journal of Medical Human Genetics 2016; 17(2):155-63.
40. Guo C, Wen L, Song JK, Zeng WJ, Dan C, Niu YM, et al. Significant association between interleukin-10 gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. Oncotarget 2018; 9(15):12365-75.
41. Kim W, Pyo J, Noh BJ, Jeong JW, Lee J, Kim JE. CCAR2 negatively regulates IL-8 production in cervical cancer cells. Oncotarget 2018; 9(1):1143-55.
42. Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, Khatchadourian V, Yang D, et al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. British journal of cancer 2012; 106(11):1833-41.
43. Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. Angiogenesis 2005; 8(1):63-71.
44. Park SY, Han J, Kim JB, Yang MG, Kim YJ, Lim HJ, et al. Interleukin-8 is related to poor chemotherapeutic response and tumourigenicity in hepatocellular carcinoma. European Journal of Cancer 2014; 50(2):341-50.
45. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. Genes & Immunity 2002; 3(6):313-30.
46. de Matos FR, de Moura Santos E, de Pontes Santos HB, Machado RA, Lemos TM, Coletta RD, et al. Association of polymorphisms in IL-8, MMP-1 and MMP-13 with the risk and prognosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Archives of oral biology 2019; 108:104547.
47. Gonzalez-Hormazabal P, Romero S, Musleh M, Bustamante M, Stambuk J, Pisano R, et al. IL-8-251T> A (rs4073) polymorphism is associated with prognosis in gastric cancer patients. Anticancer research 2018; 38(10):5703-8.
48. Moghimi M, Dastgheib SA, Heiranizadeh N, Zare M, Sheikhpour E, Neamatzadeh H. Association of IL-8-251T> A (rs4073) polymorphism with susceptibility to gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on 33 case-control studies. Arquivos de gastroenterologia 2020; 57:91-9.
49. Wu S, Hu G, Chen J, Xie G. Interleukin 1β and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and cervical cancer: a meta-analysis. International Journal of Gynecologic Cancer 2014; 24(6):984-990.
50. Gao B, Yang S, Li N. Relationship of IL-18 genetic polymorphism to cervical cancer risk: A metaanalysis. Biomedical Research (0970-938X) 2017; 28(22):10020-25.
51. Pereira AP, Trugilo KP, Okuyama NC, Sena MM, Couto-filho JD, Watanabe MA, et al. IL-10 c.-592C> A (rs1800872) polymorphism is associated with cervical cancer. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2020; 146:1971-8.