موتاسیون ژن P53 در مورد کارسینوم پانکراس در ایران

دکتر رسول ستوده منش*، دکتر ناصر کمالیان**، دکتر علی علی‌عسگری***،
دکتر سید عبدالرضا مرتضوی***، دکتر زهرا گودرزی***

*- استادیار گروه داخلی – گوارش دانشگاه علوم پزشکی تهران ** - استاد گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** - کارشناسان مرکز تحقیقات گوارش و کبد - بیمارستان شریعتی

چکیـده :

هدف :

هدف از این مطالعـه تعییـن شـیوع موتاسـیون در ژن P53 نـزد بیماران مبتلا به کارسینوم پانکراس در طی ۷ سال اخیر بود.

روش کار :

در طـی ۶ مـاه بـا مراجعـه بـه بایگـانی مراکـز پـاتولوژی بیمارستان‌های امام خمینی و دکتر شریعتی تـهران تعـداد ۳۷ مـورد نمونه پاتولوژی آدنوکارسینوم پانکراس استخراج گردیـد کـه پـس از بازبینی و تایید نهایی تشخیص نمونه‌های توسـط روش پراکسـیداز از نظر موتاسیون ژن P53 مورد بررسی نهایی قرار گرفتند.

یافته ها :

از ۳۷ مورد تحت.بـررسی ۲۶ مورد مربـوط به جنس مـرد و ۱۱ مـورد به جنس زن بود که متـوسط سنـی ۱۰/۴ ± ۶۰/۴ سال بـود. مصرف سیگار، سابقه خانوادگی سرطان و دیابت قندی به ترتیـب در ۴۸/۶٪، ۱۸/۹٪ و ۱۳/۵٪ بیماران وجود داشـت. موتاسـیون ژن P53 در ۲۵ مورد (۶۷/۶ ٪) مشاهده شد کـه ارتبـاطی بـا سـن، جنـس و ریسک فاکتورهای مذکور وجود نداشت.

نتیجه‌گیری :

موتاسیون ژن P53 در اغلب مـوارد کارسـینوم پـانکراس وجـود دارد و به نظر می‌رسد که به عنـوان یـک فـاکتور مسـتقل در ایجـاد پانکراس دخالت داشته باشد.

واژه های کلیدی: موتاسیون، ژن P53 ،کارسینوم پانکراس

P53 GENE MUTATION IN PANCREATIC CARCINOMA IN IRAN

Sotoudemanesh R, Kamalian N, Aliasgari A, Mortazavi A, and Godarzi Z

Digestive Diseases Research Center. Tehran University of Medical Sciences Tehran-Iran

Abstract:

Aim: To determine P53 gene mutation in pancreatic carcinoma during seven years.
Methods: During six months by using pathology files of two referral hospital center, 37 specimens of pancreatic carcinoma were chosen for gene mutation study, by "Avidin-biotin-peroxidase complex" method.
Results: 37 cases (26 males, 11 females) with mean age 60.4±10.4 were included in the study. Cigarette smoking, family history of cancer and diabetes mellitus were present in 48%, 18.9% and 13.5% respectively.
P53 gene mutations were present in 25 cases (67.6%) without any relationship with age, sex and mentioned risk factors.
Conclusion: P53 gene mutation is present in most of the pancreatic carcinoma and it seems to be not related to other known risk factors for induction of pancreatic carcinoma.

Key words: Mutation, P53 gene, Pancreatic carcinoma

مقدمه :.

تومورها اغلب کاریوتیپ غیرطبیعی قـابل توجـهی دارنـد و از دسـت رفتن بازوهای کروموزومی بشیوع اتفاق می‌افتد(۱). با پیشـرفت‌هایی کـه در بیولوژی مولکولی رخ می‌دهد و بخصوص استفاده از آنالیزهای ژنتیکی خاص بنام Restriction fragment length polymorphism ، اجازه مطالعه خاص برای بررسی از دست رفتن ژن‌ها به عمل آمده است.
با استفاده از این تکنیک‌ها Vogelstein و همکاران از دسـت رفتـن مواد ژنتیکی در سرطان‌های کولورکتال و حذف کانون‌های خاص ژنتیکی را در اغلب مواد نشان داده‌اند(۲). این محققیـن نشـان دادنـد کـه نقـاط داغی در حذف ژنتیکی وجود دارد که به حذف ژن‌های سوپر سور تومـور منجر می‌شوند و منجر به ایجاد سرطان کولورکتال می‌شود و این فرضیـه روز به روز بیشتر تقویت شده تـا منجـر بـه کشـف روز افـزون ژن‌هـای سوپرسورتومور در کانسرهای انسان شده است(۶-۱).
مکانیزم فعال شدن ژن‌ها از یک ژن به ژن دیگر متفاوت اسـت ولـی در همه موارد غیرفعال شدن فونکسیون مهارکنندهٔ ژنی اسـت کـه نقـش

در کارسینوژنز دارد.

شاید مهمترین این ژن‌ها ژن P53 است که در حالت نرمال مانع از سنتز DNA جدید یا تقسیم سلولی می‌شود و در نتیجه ژن حساسی در ممانعت از پرولیفراسیون غیر مناسب سلولی محسوب می‌شود(۷). در صدمات سلولی سطح P53 در پاسخ به صدمه به DNA افزایش می‌یابد و در نتیجه سلول را در مرحله G1 سیکل سلولی متوقف می‌سازد و به عنوان سوپرسور پتانسیل تشکیل تومور عمل می‌کند(۸).

فعال شدن این ژن و سایر ژن‌های سوپرسورتومور برای جلوگیری از رشد بی‌حساب سلول‌های غیرطبیعی بعد از صدمه وارده به DNA سلولی، اساسی است.

فعال شدن ژن‌های سوپرسور تومور حادثه‌ای است که برای غیرفعال شدن پرولیفراسیون غیرطبیعی سلولی لازم است. دو کپی از لوکوس در ژنوم و ژن‌های سوپرسورتومور ممکن است بعنوان آلل P53 در موتاسیون نقطه‌ای ژنی دخالت داشته باشند ولی این که چگونه حضور یک فرم وحشی همراه یک فرم موتاسیون یافته P53 خواص رشدی سلولی را تغییر می‌دهد مورد اختلاف نظر است.

پروتئین P3 به عنوان ژن سلولی موتاسیون یافته از کروموزوم شماره ۱۷ (17P) عامل هتروزیگوسیته در بسیاری از تومورهاست که نشان می‌دهد این ژن مانع از رشد تومور می‌شود.

با روش PCR (Polymerase chain reaction) نشان داده شده است که موتاسیون نقطه ای در P53 در تقریباً ۸۰٪ از کانسرهای کولونی با ظهور اتفاقی و زیرگروه کوچکی از آدنوم‌های کولون و نیز بسیاری از سایر انواع تومورها وجود دارد. موتاسیون نقطه‌ای در ژن P53 در کارسینومای سلول‌های سنگفرشی (SCC) و آدنوکارسینوم مری، کارسینوم معده، آدنوکارسینوم پانکراس و کارسینوم هپاتوسلولر نیز توضیح داده شده است(۹).

کانسر پانکراس چهارمین علت شایع مرگ ناشی از کانسر در دنیاست. انسیدانس آن و میزان مورتالیته آن ثابت مانده است. میزان عمر ۵ ساله حدود ۲-۱٪ است و طول عمر متوسط بعد از تشخیص ۶-۴ ماه است(۱۰).

در ۶۳-۳۷ درصد از سرطان‌های پانکراس انسان موتاسیون در ژن P53 وجود دارد و این موتاسیون با پیش‌آگهی بدتری هم همراه است(۱۱). موتاسیون در ژن P53 در سلول‌های پانکراس ممکن است در اثر مصرف سیگار ایجاد شود که این ممکن است نقش سیگار را در سرطان‌زایی پانکراس آشکار سازد(۱۲) البته این ارتباط هنوز به اثبات نرسیده است. موتاسیون‌های انکوژن K-ras نیز در حدوداً ۸۰٪ از کانسرهای پانکراس دیده می‌شود(۱۳)، به نظر می‌رسد که بیماران مبتلا به تومورهای K-ras منفی بعد از رادیاسیون طول عمر بیشتری نسبت به K-ras مثبت‌ها دارند(۱۴). مشابهاً بیمارانی که موتاسیون ژن P53 را دارند طول عمر کوتاه‌تری بعد از رادیاسیون یا کموتراپی نسبت به فرم وحشی (بدون موتاسیون) دارند(۱۴). این یافته احتمالاً بیانگر این واقعیت است که تومورها یک ژن موتاسیون یافته P53 دارند که معمولاً مقاوم به رادیاسیون یا شیمی درمانی است.

متد و روشها:

با مراجعه به فایل‌های پاتولوژی بیمارستان‌های امام خمینی و دکتر شریعتی و انستیتو کانسر، فایل‌های مربوط به کارسینوم پانکراس در طی سالهای ۱۳۷۸-۱۳۷۰ استخراج شدند و در کل ۴۷ نمونه در این مطالعه بررسی شدند. ابتدا آقای دکتر کمالیان، استاد پاتولوژی دانشگاه تهران، لام‌های پاتولوژی را در بخش پاتولوژی بیمارستان دکتر شریعتی بازبینی می‌کردند و در صورت تایید و اثبات تشخیص کارسینوم پانکراس نمونه‌های پارافینه این بیماران به بخش پاتولوژی بیمارستان دکتر شریعتی ارسال می‌گشت. پس از بازبینی هر ۴۷ مورد بعنوان سرطان پانکراس تایید شدند.

برای بررسی وجود پروتئین محصول موتاسیون در ژن P53، نمونه‌ها برش خورده، روی لام فیکس شده، تحت پروسه ایمیونوهیستوکیمیکال قرار می‌گرفتند. در این روش که تحت عنوان کامل Avidin-Biotin-Peroxidase complex شناخته می‌شود(۱۵)، با استفاده از واکنش بیوتین با آویدین فرآیندی صورت می‌پذیرد. بدین ترتیب که بیوتین که پروتئین سفیده تخم مرغ است، تمایل شدیدی به ویتامین کم وزنی به نام آویدین دارد. این واکنش که چندین بار قوی‌تر از اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی است، غیرقابل برگشت است. در این روش آنتی‌بادی حاوی بیوتین به وسیله کمپلکس آویدین - بیوتین پراکسیداز مواجه شده و در نتیجه کمپلکس‌های شبکه مانندی از مولکول‌های پراکسیداز فعال بسیاری ایجاد می‌شود. هنگامی که نمونه‌ای حاوی پروتئین محصول موتاسیون در ژن P53 باشد در این صورت در زیر میکروسکوپ در جای‌جای لام، رنگ نارنجی به شکل رشته رشته ایجاد می‌شود که بر اساس شدت واکنش مربوطه میزان رنگ‌پذیری متفاوت خواهد بود. این روش یکی از بالاترین حساسیت‌ها را در میان همه روش‌های ایمیونوهیستوکمیکال دارد.

با توجه به قدیمی بودن برخی بافت‌ها و مشکلات تکنیکی در بررسی موتاسیون P53 ۲۱ مورد (۴۴/۷٪ نمونه‌ها) تکرار آزمون بررسی موتاسیون P53 لازم شد که البته این شامل مواردی می‌شود که دوبار تکرار انجام شد. علاوه بر این، پس از انجام آزمون بررسی موتاسیون P53 علیرغم بازبینی لام‌ها و تکرار آزمون در موارد لازم، ۱۰ نمونه به دلایل زیر از مطالعه حذف شدند: ۴ نمونه متعلق به بافتی غیر از پانکراس بودند، در ۴ نمونه بافت تومورال وجود نداشت و ۲ نمونه کمبود بافت بر روی لام به علت مشکلات تکنیکی (عمدتاً مربوط به قدیمی بودن لام‌ها). تمامی این موارد از مطالعه حذف شدند و در نهایت ۳۷ بیمار/ نمونه در این مطالعه بررسی شدند.

پس از انجام آزمون بررسی موتاسیون P53، با مراجعه به بایگانی بیمارستان‌های نامبرده و پرونده پزشکی بیماران، اطلاعات مربوط به

سن، جنس ، مصرف دخانیات، اعتیاد به مصرف الکل، حضور سابقه فامیلی سرطان و سابقهٔ دیابت قندی در بیمار نیز استخراج گردید و اطلاعات مربوطه در پرسشنامه‌ای وارد شد.

نتایج :

۳۷ مورد بافت با تشخیص صحیح کارسینوم پانکراس تحت بررسی قرار گرفت که ۲۶ مورد آن مربوط به جنس مرد و ۱۱ مورد مربوط به جنس زن بود . میانگین سنی بیماران ۱۰/۴±۶۰/۴ بود (حداقل سن ۳۷ و حداکثر ۷۹ سال).

در ۱۸ مورد (۴۸/۶٪) مصرف سیگار (به میزان متوسط ۲۰ pack-year) وجود داشت. در ۷ مورد (۱۸/۹٪) سابقهٔ سرطان سایر اعضای خانواده وجود داشت و در ۵ مورد(۱۳/۵٪) سابقهٔ دیابت قندی دیده می‌شد.

عمده سرطان‌ها مربوط به نوع آدنوکارسینوم بود۳۴ مورد(۹۱/۹٪) و ۳ مورد نیز سیستادنوکارسینوم (۸/۱٪) وجود داشت. موتاسیون ژن P53 در ۲۵ مورد (۶۷/۶٪) وجود داشت. در این گروه متوسط سن ۵۹ سال بود.

جدول ۱ شیوع عوامل خطر سرطان پانکراس را در دو گروه با و بدون پروتئین P53 نشان میدهد:

عامل خطر		گروه P53 مثبت	گروه P53 منفی
سن	زیر ۶۰ سال (n=16)	۱۲	۴
	بالای ۶۰ سال (n=21)	۱۳	۸
جنس	مرد (n=26)	۱۹	۷
	زن (n=11)	۶	۵
اعتیاد به سیگار	مثبت (n=18)	۱۳	۵
	منفی (n=19)	۱۲	۷
سابقهٔ خانوادگی سرطان	مثبت (n=7)	۴	۳
	منفی (n=30)	۲۱	۹
سابقهٔ دیابت	مثبت (n=5)	۳	۲
	منفی (n=32)	۲۲	۱۰

هرچند که آزمون‌های آماری در مقایسهٔ متغیرهای بررسی شده با وجود پروتئین محصول P53 هیچ تفاوت آماری معنی‌داری را نشان ندادند، اما با توجه به پایین بودن تعداد نمونه در این مطالعه، یافته‌های ما از قدرت آزمون (β - 1) کافی برخوردار نیستند.

بحث :

تغییراتی که در محصول ژن P53 رخ می‌دهد در تعداد قابل توجهی از نئوپلاسم‌ها شامل کارسینوم کولون سرطان پستان و سرطان ریه آمده است(۱۶). مقادیر متفاوتی از موتاسیون ژن P53 در تومورهای مختلفی گزارش شده است. در کارسینوم کولورکتال این میزان بالاست(۱۷) و در تومورهای پستان و پروستات هم که این میزان بالاست با پیش‌آگهی بد بیماری همراه است(۱۹،۱۸). همین مطلب در مورد کارسینوم پانکراس هم وجود دارد.

در مورد کارسینوم درجای (in situ) پانکراس نیز حضور موتاسیون ژن P53 آمده است(۲۰). مشابهاً در مورد کارسینوم‌های اینتراداکتال پستان(۱۹) و نیز در مراحل نهایی آدنوم‌های کولورکتال آمده است(۲۱). این یافته ها نشان می‌دهند که در برخی موارد موتاسیون در ژن P53 ممکن است در مرحله‌ای قبل از تهاجم بافتی رخ دهد و بنابراین در کارسینوم پانکراس و نیز سایر تومورها، تغییر در ژن P53 ممکن است در پاتوژنز ضایعات پیش سرطانی به سمت سرطان واضح دخیل باشد.

این مارکر در تشخیص کارسینوم پانکراس ارزشی ندارد به نحوی که در مطالعه‌ای در ۵۹٪ از موارد پانکراتیت مزمن و در ۶۷٪ از موارد کارسینوم پانکراس این موتاسیون وجود دارد(۲۲).

آمار موتاسیون در ژن P53 در سرطان پانکراس در بین کشورهای مختلف متفاوت است. یافته ما که موتاسیون ژن P53 در تعداد قابل توجهی از بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم پانکراس رخ می‌دهد (۶۷/۶٪) نشان می‌دهد که تغییر در این ژن ممکن است نقشی در پاتوژنز این نئوپلاسم‌ها داشته باشد.

در مطالعه مشابهی که توسط Barton و همکارانش انجام شده است موتاسیون ژن P53 در ۲۳ درصد گزارش شده است(۲۰) که این اختلاف آماری می‌تواند به دلیل نقش اختلاف فاکتورهای محیطی - جغرافیایی یا اختلاف در روش بررسی این موتاسیون باشد.

در برخی مطالعات به جای بررسی حضور ژن P53 در نمونه‌های مربوط به کارسینوم پانکراس ، محصولات پروتئینی این موتاسیون ژنی را بررسی کرده اند. تغییر در فونکسیون ژن P53 با ایجاد پروتئین‌های با نیمه عمر طولانی همراه بوده است(۲۳). اخیراً ارتباط حضور محصول پروتئین موتاسیون‌های ژنی را با موتاسیون ژن P53 بیشتر مطالعه کرده‌اند(۱۷) و در درصد قابل توجهی از آنان موتاسیون ژن P53 را یافته‌اند ولی ارتباط بین این موتاسیون ژنی و حضور پروتئین‌های محصول، مطلق نیست(۱۷) و تعیین موتاسیون ژن P53 به وسیله حضور یا عدم حضور این محصولات پروتئینی ممکن است مختصری باعث اشکال در تعیین دقیق موتاسیون شود چرا که معمولاً میزان حضور محصول ژنی مختصری بیشتر از میزان حضور موتاسیون در ژن P53 است .

موتاسیون در ژن P53 می‌تواند همزمان با موتاسیون در ژن K-ras در محیط آزمایشگاه هم وجود داشته باشد(۲۴). این همکاری بین دو ردهٔ ژنی نشان می‌دهد که این دو ممکن است در داخل بدن نیز در ایجاد کارسینوم همکاری داشته باشند.

در مطالعات انجام شده ارتباطی بین سن و جنس با ایجاد این موتاسیون دیده نشده است(۲۵).

در برخی مطالعات ارتباط عوامل خطر مختلف سرطان پانکراس با وجود این موتاسیون بررسی شده است. ارتباط اعتیاد به سیگار با ایجاد موتاسیون در این ژن در مطالعات متعددی بررسی شده و به نظر می‌رسد که سیگار در ایجاد چنین موتاسیونی نقش داشته باشد(۱۲). سابقهٔ مثبت خانودگی از نظر سرطان نیز در مطالعهٔ Dergham بررسی شد و احتمال وجود چنین رابطه‌ای در آن مطالعه پیشنهاد شده است(۲۶). به نظر می‌رسد که رابطهٔ ابتلا به دیابت قندی با این موتاسیون تاکنون بررسی نشده باشد. در مطالعهٔ ما به علت کمبود نمونه و مشکلات اجرایی با نمونه‌های قدیمی که منجر به حذف تعدادی نمونه شد، امکان اظهار نظر درمورد رابطهٔ این عوامل خطر با وجود موتاسیون در ژن P53 وجود ندارد.

در برخی مطالعات ارتباط این موتاسیون ژنی با کاهش طول عمر بیماران مطرح شده است(۱۴) و متاسفانه در این مطالعه بدلیل گذشته‌نگر (رتروسپکتیو) بودن مطالعه و عدم دسترسی به آدرس و تلفن بیماران امکان بررسی این ارتباط مقدور نبود.

در این مطالعه که البته در مورد تعداد کمی از موارد سرطان پانکراس انجام شده است ظاهراً به این نتیجه می‌رسیم که فاکتور موتاسیون در ژن P53 به عنوان یکی از عوامل ایجاد سرطان پانکراس در کشور ما دارای اهمیت بالایی است (به علت شیوع بالا) و نیاز به انجام تحقیقات آینده‌نگر و وسیعتر در این زمینه وجود دارد.

References:

1. Reichmann A , Maritn P, Levin B "Chromosomal banding pattern in human large bowel Cancer" Int J Cancer 1981; 28: 431.
2. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al. "Allelotype of colorectal carcinomas" Science 1989; 244: 207.
3. Bishop JM "Molecular themes in oncogenesis" Cell 1991; 64: 235.
4. Hunter T "Coopertation between oncogenes" Cell 1991; 64: 249.
5. Marshall CJ "Tumor Suppressor genes" Cell 1991; 64:313.
6. Harris CC, Hollstein M "Clinical implications of the P53 tumor suppressor gene" N Engl J Med 1993; 329: 1318.
7. Hane DP "P53, guardian of the genome" Nature 1992; 358: 15.
8. El-Deiry WS, Harper JW, O'connor PM et al. "WAF1 / CIP1 is induced in P53-Mediated G1 arrest and apoptosis" Cancer Res 1994; 54: 1169.
9. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. "Mutations in the P53 gene occur in diverse human tumor types" Nature 342: 705, 1989.
10. "Cancer rates and figures, 2000" Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2000.
11. Sato Y, Nio Y, Song MM et al. "P53 protein expression as prognostic factor in human pancreatic cancer" Anticancer Res. 1997; 17: 2779-2788.
12. Lee EU, Cibull ML, O'Daniel-Pieru E, et al. "Expression of P53 protein in pancreatic adenocarcinoma relationship to cigarette smoking" Int J pancreatol. 1995; 17:237-242.
13. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant C-K-ras genes" 1988; 53: 549-554.
14. Dergham ST, Dugan MC, Sarkar FH, et al. "Molecular alterations associated with improved survival in pancreatic cancer patients treated with radiation or chemoradiotherapy" J Hepatbiliary pancreat surg. 1998; 5: 269-272.
15. Hsu SM, Raine L, Fanger H "Use of avidine-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between unlabaled antibody (PAP) procedures" J Histochem Cytochem; 1981; 29: 577-580.
16. Levine AJ "The P53 tumor suppressor gene" N Engl J Med 1992; 326: 1350-1352.
17. Baa Io, Mulder Jwk, Offerhaus GJ A, Vogelstein B, Hamilton SR. "Immunohistochemistry of altered P53 suppressor gene product in colorectal neoplasms" Lab Invest 1993; 68: 234. Abstract.
18. Visakorpit, Kalliomiemi O-P, Heikkinen TK, et al. "Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic cancer defined by P53 accumulation" J Natl Cancer Inst 1992; 84: 883-887.
19. Isola J, Visakorpi T, Holi K, et al. "Association of overexpression of tumor suppressor protein P53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients" J Natl Cancer Inst 1992; 84: 1109-1114.
20. Barton CM, Stoddon SL, Hughes CM "Abnormalities of the P53 tumor suppressor gene in human pancreatic cancer" Br J Cancer 1991; 64: 1076-1082.
21. Fearon ER, Vogelstein B. "A genetic model for colorectal tumorigenesis" Cell 1990; 61: 759-767.
22. Lee CS, Rush M, Charalambous D, Rode J "Immuno-histochemical demonstration of the P53 tumor suppressor gene product in cancer of the pancreas and chronic pancreatitis" J Gastroenterol Hepatol 1993; 8: 465-9.
23. Reich NC, Oren M, Levine AJ "Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, P53" Mol cell Bil 1983; 3: 2143-2150.
24. Hinds P, Finlay C, Leine AJ "Mutation is required to activate the P53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation" J virol 1989; 63: 739-746.
25. Zhang SY, Ruggeri B, Agarwal P, Sorling AF, Obara T, Ura H, et al "Immunohistochemical analysis of P53 expression in human pancreatic carcinomas" Arch Pathol Lab Med 1994; 118 (2); 150-4.
26. Dergham ST, Dugan MC, Arlauskas P, Du W, Vaitkevicius VK, Crissman JD, Sarkar FH "Relationship of family cancer history to the expression of p53, p21WAF-1, HER-2/neu, and K-ras mutation in pancreatic adenocarcinoma" Int J Pancreatol 1997; 21: 225-34.