Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Hamta and Ghasemian Safaei. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2023;45(4):305-314.
doi: 10.34172/mj.2023.34
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

Relationship between polymorphisms in the CD40 gene with the prevalence of breast cancer: A case-control study

Ahmad Hamta*, Paniz Ghasemian Safaei

Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 16 Jan 2023
Accepted: 30 Apr 2023
ePublished: 16 Jul 2023

Keywords:
- Breast cancer
- CD40 Gene
- Single nucleotide polymorphism
- PCR-RFLP

Abstract

Background. Breast cancer with a complex inheritance pattern is a major cause of cancer death among women worldwide. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), the most common genetic variations, influence interindividual predisposition to disease and treatment outcomes with drugs. Evidence suggests that CD40 polymorphism contributes to pathogenesis of cancer. The co-stimulatory molecule CD40 plays a prominent role in immune regulation. This study aimed to test the association between polymorphisms in the CD40 gene and breast carcinogenesis in Arak, Iran.

Methods. In this case-control study, three SNPs (rs1883832, rs4810485, rs3765459) were genotyped by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. We included 80 patients with breast cancer and 80 healthy controls. Statistical analysis was performed by SPSS (version 26) using Chi-Squared test at $P<0.05$.

Results. Our data showed a statistically significant association between the two CD40 SNPs (1s1883832 and rs4810485) and breast cancer risk ($P=0.038$ and $P=0.000$, respectively). There was no significant association between rs3765459 and breast cancer risk ($P=0.190$).

Conclusion. We witnessed that CD40 gene polymorphisms (rs1883832 and rs4810485) contributed to breast cancer. So, they are associated with breast cancer risk.

Practical Implications. The obtained data revealed a significant relationship between the rs1883832 and rs4810485 polymorphisms and the risk of breast cancer. Thus, these polymorphisms could be used as biomarkers to predict breast cancer.

How to cite this article: Hamta A, Ghasemian Safaei P. Relationship between polymorphisms in the CD40 gene with the prevalence of breast cancer: A case-control study. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2023;45(4):305-314. doi: 10.34172/mj.2023.34. Persian.

Extended Abstract

Background

According to recent studies, breast cancer is a major cause of cancer death among women. Recent research has suggested that variations in some immune regulatory genes, like CD40 drive interindividual differences in breast cancer susceptibility. CD40 is a member of the group of co-stimulating molecules. The interaction between the CD40 protein and its ligand triggers a number of signaling events. For instance, chemokines such as IL-10 and VEGF induced by CD40 interactions on various cell types are all thought to have roles in malignant cell metastasis. CD40 is a crucial member of tumor necrosis superfamily. This gene is located on chromosome 20q12-13.2. Studies have shown that CD40 may contribute to tumor growth and

*Corresponding author; Email: a-hamta@araku.ac.ir
© 2023 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

metastasis. Based on recent studies, we speculated that SNPs in CD40 can influence the susceptibility to breast cancer. To investigate this hypothesis, a case-control study was conducted in Arak population in Iran.

Methods

Blood samples were obtained from 80 patients referring to Ayatollah Khansari Hospital in Arak city, Iran. We also included 80 controls in the study. All subjects were female with a mean age of 53 years. In this study, 5 ml frozen whole blood was taken to extract the genomic DNA using Zistagene DNA extraction kit according to the manufacturer's protocol. Primers for SNPs were designed by NCBI. All the genotyping was performed using the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. For all SNPs, 10 µl of PCR amplified product was incubated at 37 ^{oC} for 2 hours with specific restriction enzyme. The regions containing polymorphisms were amplified by PCR. The restriction enzymes for each SNP were N*co*I (rs1883832), M*sp*I (rs4810485), and P*flm*I (rs3765459). The digested fragments for each SNP were as follows: rs 1883832 (CC: 435 bp, TT: 635 bp, CT: 635, 435, 200 bp), rs4810485 (GG: 613, 139 bp, GT: 613, 139, 752 bp, TT: 752 bp), and rs3765459 (AA: 160, 500 bp, AG: 160, 500, 660 bp, GG: 660 bp). The results of 3% agarose gel electrophoresis were analyzed using Gel Imaging Analysis system. All data were analyzed using the SPSS (version 26). The significance level was $P< 0.05$ and relative risks associated with rare alleles, genotypes, and haplotypes were estimated as adds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI). Chi-square test was used to compare the observed genotype frequencies with the expected frequencies.

Results

Two SNPs genotyped in this study (rs1883832 and rs4810485) showed a statistically significant association with breast cancer (*P*=0.038 and *P*=0.000, respectively). Also, there was no significant association between rs3765459 and breast cancer (P= 0.190). For the rs1883832 and rs4810485 polymorphisms, different distributions were observed for the rs1883832 T allele and the rs4810485 T allele between patients and controls (*P*=0.033 and *P*=0.005, respectively). For the rs1883832, the frequency of T allele in patient and control groups was 38.75% and 27.5%, respectively. Besides, the frequency of C allele in patient and control groups was 61.25% and 72.5%, respectively. There was a significant relationship between TC genotype and disease (*P*= 0.027; 95% CI: 1.081-3.809; OR = 2.209). We found a strong association between breast cancer risk with rs1883832 in dominant genetic model (TT+TC vs. CC, *P*= 0.011, OR= 2.296, 95% CI: 1.209 – 4.360). For rs4810485, the frequency of T allele in patient and control groups was 41.25% and 26.25%, respectively. Besides, the frequency of G allele in patient and control groups was 58.75% and 73.75%, respectively. According to the results, there was a significant relationship between GT genotype and disease (*P*=0.000; OR=3.462; 95% CI: 1.805-6.637). For rs4810485, there was a strong association with breast cancer risk in the dominant model (TG +TT vs. GG; *P*=0.000; OR=3.667; 95% CI: 1.875-7.172). For rs3765459, the frequency of an allele in patient and control groups was 37.5% and 40%, respectively. Also, the frequency of G allele in the patient and control groups was 62.5% and 60%, respectively. According to the statistical analysis, there was no relationship between rs3765459 AG genotype and breast cancer risk (*P*=0.197; 95% CI: 0.804-2.871; OR=1.519). Also, there was no association between rs3765459 and disease in the dominant or recessive models (AA+AG vs. GG; *P*=0.733, OR=1.123; 95% CI: 0.575-2.193) (AG+GG vs; *P*=0.093; OR=0.368; 95 %CI: 0.111-1.228).

Conclusion

CD40 is a crucial member of tumor necrosis superfamily and accumulating evidence has indicated that CD40 may contribute to tumor proliferation. Polymorphisms of CD40 gene that have crucial roles in the translational efficiency of the CD40 may affect the risk and prognosis of breast cancer. In this study, we investigated the association between CD40 gene polymorphisms and the risk of breast cancer. There was a relationship between rs1883832 and rs4810485 with breast cancer risk (*P*=0.038 and *P*=0.000, respectively). Also, there was no association between rs3765459 and breast cancer

(*P*=0.190). Due to the relationship between the NNPs of CD40 with breast cancer, these polymorphisms can be used as biomarkers to predict breast cancer.

همتا و قاسمیان صفائی. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. مهر و آبان ۱۴۰۲؛۴۵(۴):۳۰۵-۳۱۴.
doi: 10.34172/mj.2023.34
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

مطالعه همبستگی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن CD40 با فراوانی سرطان پستان: مطالعه موردی – شاهدی

احمد همتا*، پانیذ قاسمیان صفائی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۶
پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰
انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۴/۲۵

کلید واژه‌ها:
- سرطان پستان
- ژن CD40
- پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی
- PCR-RFLP

چکیده

زمینه. سرطان پستان با الگوی وراثتی پیچیده، عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان در سراسر جهان است. پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs)، شایع‌ترین نوع تنوع ژنتیکی هستند که بر استعداد فردی در ابتلا به بیماری و بر نتایج حاصل از درمان با داروها اثر می‌گذارند. شواهد زیادی وجود دارد که پلی‌مورفیسم‌های CD40 منجر به ایجاد بیماری سرطان می‌شوند. مولکول کمک تحریکی CD40 نقش مهمی در تنظیم ایمنی دارد. در مطالعه حاضر ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن CD40 و سرطان پستان در جمعیت اراک را بررسی کردیم.

روش کار. سه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (rs1883832, rs4810485, rs3765459)، با روش PCR-RFLP در یک مطالعه موردی-شاهدی شامل ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۸۰ فرد سالم، تعیین ژنوتیپ شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون آماری کای اسکوئر و در نظر گرفتن $P<0/05$ به‌عنوان مقادیر معنی‌دار، توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد.

یافته‌ها. نتایج مطالعه ارتباط آماری معناداری را میان دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی CD40 (rs1883832, rs4810485) و خطر ابتلا به سرطان پستان نشان دادند (به ترتیب $P=0/000$ و $P=0/038$). همچنین هیچ ارتباط معناداری میان rs3765459 و خطر ابتلا به سرطان پستان وجود نداشت ($P=0/190$).

نتیجه‌گیری. نتایج مطالعه نشان می‌دهند که پلی‌مورفیسم‌های ژن CD40 (rs1883832، rs4810485)، منجر به ایجاد سرطان پستان شده و این دو پلی مورفیسم با خطر سرطان پستان همبستگی دارند.

پیامدهای عملی. داده‌های به‌دست‌آمده ارتباط معناداری را بین پلی‌مورفیسم‌های rs1883832 و rs4810485 و خطر ابتلا به سرطان پستان نشان می‌دهد. بنابراین، این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگر زیستی برای پیش‌بینی سرطان پستان استفاده شوند.

مقدمه

بر اساس مطالعات اخیر، امروزه سرطان پستان یکی از بزرگ‌ترین علل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان است.[۱،۲] با وجود افزایش شیوع سرطان پستان، به دلیل تغییر تدابیر درمانی، مرگ‌ومیر ناشی از آن کاهش یافته است. با این حال هنوز حدود ۲۴/۵ درصد از کل موارد سرطان و ۱۵/۵ درصد مرگ‌ومیر ناشی از آن مربوط به سرطان پستان است.[۳] مطالعات نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم ژن‌های دخیل در تنظیم ایمنی باعث می‌شوند که افراد در ابتلا به سرطان پستان خطر متفاوتی داشته باشند.[۴] مولکول CD40 یکی از پروتئین‌های مهمی است که در ایمنی هومورال و ایمنی با واسطه سلولی نقش دارد. پروتئین CD40 و لیگاند CD40 باعث شروع تعدادی از مسیرهای سیگنالینگ شروع می‌گردد.[۴-۶] در نهایت این مسیرها منجر به تحریک APC و T helper و رشد و پایداری سلول‌های B می‌شود.[۷] CD40 علاوه بر سلول‌های ایمنی، در سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست هم بیان می‌شود.[۸-۱۱] مولکول CD40 باعث افزایش اندازه تومور و متاستاز می‌شود.[۱۲] CD40 در سلول‌های اندوتلیال باعث کاهش آپوپتوز و افزایش تکثیر سلولی شده و همین موجب افزایش اندازه تومور و رگ‌زایی می‌شود.[۱۳،۱۴] محصول این ژن در سلول‌های مختلف می‌تواند کموکاین‌هایی مانند IL-10 و VEGF را القاء کند که همین امر موجب متاستاز می‌شود. برخی آگونیست‌های CD40 می‌توانند

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: a-hamta@araku.ac.ir

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

در درمان سرطان‌های بدخیم مؤثر باشند.[۱۵،۱۶] ژن CD40 یکی از ژن‌هایی است که پلی مورفیسم‌های آن با سرطان پستان همبستگی دارد. این ژن یکی از اعضای ابر خانواده تومورنکروزیس است که روی کروموزوم ۲۰ (q12-13.2۰) واقع شده است.[۱۷] این ژن ۹ اگزون و ۸ اینترون دارد و کدکننده پروتئین CD40 است. ۷۵ درصد بدخیمی‌های اپی‌تلیال مربوط به زمانی است که ژن CD40 به میزان زیادی بیان شود.[۱۸،۱۹] آلل T rs1883832 بر توالی کانسنسوس کوزاک و آلل T rs4810485 بر اینترون شماره ۱ واقع شده است که از طریق جلوگیری از تثبیت کمپلکس ریبوزوم-mRNA موجب کاهش بیان CD40 روی سطح سلول‌های ایمنی می‌شوند. همچنین توسط القای نابه‌جای اسپلایسینگ، سلول‌های ایمنی را از پیدا کردن و حذف سلول‌های پیش سرطانی باز داشته و بنابراین موجب افزایش خطر سرطان می‌شوند. نتایج مشابهی نیز برای rs3765459 کشف شده است. این SNP در اینترون ۸ جایی که ممکن است منجر به القای نابه‌جای اسپلایسینگ شود (به علت تخریب جایگاه برش) واقع شده است.[۲۰-۲۳] بنابراین با توجه به اهمیت و نقش ژن CD40 در ایمنی و وجود همبستگی میان پلی مورفیسم‌های این ژن و خطر ابتلا به سرطان، سه عدد از مهم‌ترین پلی مورفیسم‌های این ژن جهت مطالعه و بررسی ارتباط آن‌ها با سرطان پستان انتخاب شدند.

روش کار

این مطالعه مورد- شاهدی شامل ۸۰ نمونه خون مربوط به افراد سالم (کنترل) جمع آوری شده از میان افراد مراجعه‌کننده به مرکز انتقال خون اراک و ۸۰ نمونه خون گرفته شده از زنان مبتلا به سرطان پستان است که در بیمارستان آیت‌الله خوانساری، جمع‌آوری شده است. طبق پروتکل، ۵ میلی‌لیتر خون منجمد برای استخراج توسط کیت استخراج DNA شرکت زیستاژن استفاده شد. ژنوتیپ افراد برای سه پلی مورفیسم توسط روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) تعیین شد. تمام بیماران بررسی شده در این مطالعه زن بوده و میانگین سنی ۵۳ سال داشتند. برای تکثیر پلی‌مورفیسم‌های rs4810485، rs1883832 وrs3765459 ابتدا پرایمرها از طریق وبگاه NCBI طراحی و توسط شرکت تی‌ای‌جی کوپنهاگن (TAG Copenhagen) سنتز شدند.

توالی پرایمرهای استفاده شده برای پلی‌مورفیسم rs1883832،

F:GGGGGAATTAGATTGTGGGAATG
R:GGGGGAATTAGACTTGTGGGAATG

طول قطعه حاصل از تکثیر ۶۳۵ جفت باز بود. پرایمرهای طراحی شده برای rs4810485،

F:CAGAAGCCTACACTTGACTCACTTT
R:GTCTGTCAATCTCCAGTTCTCACTC

و طول قطعه تکثیر شده این پلی مورفیسم ۷۵۲ جفت باز بود.

پرایمرهای مربوط به پلی مورفیسم rs3765459 نیز

F:GTTTCTTATCTGGCCTCTCCAACTC
R:AAGATCGTCGGGAAAATTGATCTCC

همچنین طول قطعه تکثیر شده این پلی مورفیسم نیز ۶۶۰ جفت باز بود. چرخه دمایی دو پلی مورفیسم rs3765459 و rs1883832 به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه؛ ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه؛ ۶۱ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه بود. چرخه دمایی در مورد پلی مورفیسم rs4810485 نیز به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه؛ ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه؛ ۵۹ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه بود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR با ۱ واحد آنزیم اختصاصی مربوط به هر پلی مورفیسم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. در نهایت محصولات هضم روی ژل آگارز سه درصد بررسی شدند. آنزیم محدودکننده اختصاصی برای هضم سه پلی مورفیسم rs3765459، rs4810485 و rs1883832 به ترتیب *Pflm*I، *Msp*I و *Nco*I بودند که تصاویر مربوط به هضم آن‌ها (همراه با اندازه طول قطعات) در شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. تحلیل آماری و پردازش داده‌ها در میان زنان مبتلا و گروه کنترل با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و با استفاده از روش کای اسکوئر و تعیین هاپلوتایپ و ژنوتیپ‌ها انجام و $P<0/05$ به‌عنوان سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد. همچنین همراهی بین بیماری و ژنوتیپ‌ها با استفاده از نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد (CI) محاسبه شد.

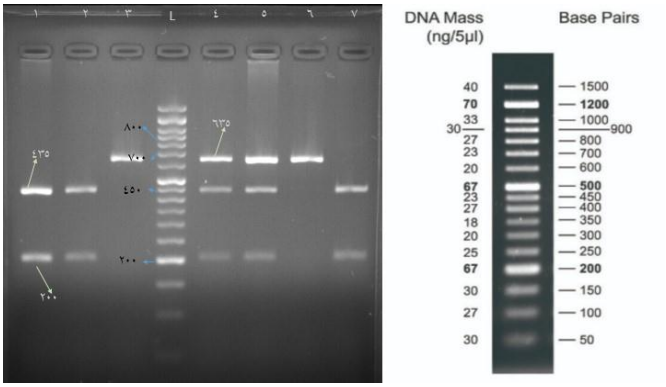
یافته‌ها

نتایج، ارتباط معناداری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم‌های rs1883832 و rs4810485 و سرطان پستان نشان دادند (به ترتیب $P=0/038$ و $P=0/000$)، در حالی که هیچ ارتباط معناداری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs3765459 و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد ($P=0/190$). در مورد دو پلی مورفیسم rs1883832 و rs4810485، فراوانی آلل T در دو گروه کنترل و بیمار متفاوت بود (به ترتیب $P=0/005$، $P=0/033$). دو پلی مورفیسم یاد شده آلل T، موجب افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان می‌شود. در مورد rs4810485، ژنوتیپ هتروزیگوت GT در مقایسه با دو ژنوتیپ GG و TT به طور معناداری با خطر افزایش‌یافته سرطان پستان مرتبط

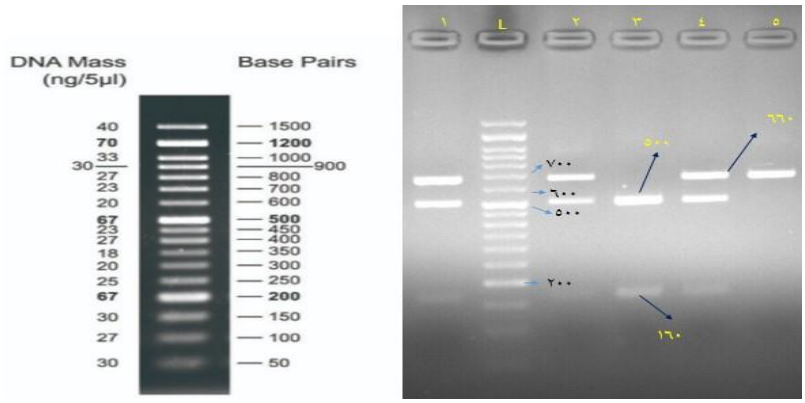
بود (P=۰/۰۰۰). همچنین ترکیب ژنوتیپ‌های GT+TT (مدل غالب) نیز ارتباط معناداری با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان نشان می‌دهند (P=۰/۰۰۰). در مورد rs1883832 نیز ژنوتیپ TC ارتباط معناداری بین تنوع ژنتیکی و سرطان پستان نشان داد (P=۰/۰۲۷). همچنین ترکیب ژنوتیپ‌های TC+CC نیز ارتباط معناداری نشان دادند (P=۰/۰۱۱) (مدل غالب). در مورد rs3765459 با توجه به نتایج، هیچ ارتباط معناداری میان آلل‌های این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد (P=۰/۶۴۶). میان ژنوتیپ AG و افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان، ارتباط معناداری وجود نداشت (P=۰/۱۹۷). همچنین ترکیب ژنوتیپ‌های AG+AA نیز ارتباط معناداری نشان ندادند (P=۰/۷۳۳). نتایج حاصل از توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم‌های ژن CD40 در جدول شماره ۱ ارائه شده است. بررسی تعادل هاردی واینبرگ نشان داد که هر سه پلی‌مورفیسم در تعادل هاردی واینبرگ بودند. در این تعادل، فراوانی مشاهده شده در جمعیت با فراوانی ژنوتیپی مورد انتظار مقایسه شد و با توجه به این که اعداد P به دست آمده از بررسی‌های آماری برای هر سه پلی مورفیسم، بزرگ‌تر از ۰/۰۵ بود در نتیجه جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشت. (عدد P برای rs1883832، ۰/۶۲۵، برای rs4810485، ۰/۳۰۲ و برای rs3765459 نیز ۰/۰۵۳ حاصل شد).

جدول ۱. توزیع ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم‌های ژن CD40 در بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل

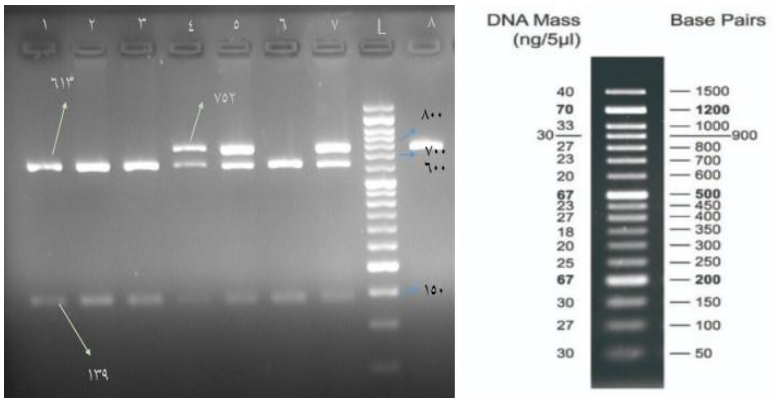
متغیر ها	کنترل	بیمار	P	OR	%۹۵CI
آلل rs1883832					
C	(% ۷۲/۵)۱۱۶	(% ۶۱/۲۵) ۹۸			
T	(% ۲۷/۵) ۴۴	(% ۳۸/۷۵)۶۲	۰/۰۳۳	۰/۶۰۰	۰/۳۷۴ -۰/۹۶۰
ژنوتیپ rs1883832					
CT	(% ۴۰) ۳۲	(% ۵۷/۵)۴۶	۰/۰۲۷	۲/۰۲۹	۱/۰۸۱ -۳/۸۰۹
CC	(% ۵۲/۵)۴۲	(% ۳۲/۵)۲۶			
TT	(% ۷/۵) ۶	(% ۱۰) ۸			
آلل rs4810485					
G	(% ۷۳/۷۵) ۱۱۸	(% ۵۸/۷۵) ۹۴			
T	(% ۲۶/۲۵) ۴۲	(% ۴۱/۲۵) ۶۶	۰/۰۰۵	۰/۵۰۷	۱/۳۱۶ -۰/۸۱۳
ژنوتیپ rs4810485					
GT	(% ۳۷/۵) ۳۰	(% ۶۷/۵) ۵۴	۰/۰۰۰	۳/۴۶۲	۱/۸۰۵-۶/۶۳۷
TT	(% ۷/۵) ۶	(% ۷/۵) ۶			
GG	(% ۵۵)۴۴	(% ۲۵)۲۰			
آلل rs3765459					
A	(% ۴۰)۶۴	(% ۳۷/۵) ۶۰	۰/۶۴۶	۱/۱۱۱	۰/۷۰۸-۱/۷۴۳
G	(% ۶۰)۹۶	(% ۶۲/۵) ۱۰۰			
ژنوتیپ rs3765459					
AG	(% ۵۵) ۴۴	(% ۶۵)۵۲	۰/۱۹۷	۱/۵۱۹	۰/۸۰۴-۲/۸۷۱
AA	(% ۱۲/۵) ۱۰	(% ۵)۴			
GG	(% ۳۲/۵) ۲۶	(% ۳۰)۲۴			



شکل ۱. تصویر ژل محصول PCR بعد از هضم با آنزیم *Nco*I روی ژل آگارز ۳ درصد. لدر استفاده شده ۵۰ است. ۱۰ میکرولیتر از محصولات هضم آنزیمی به همراه ۲ میکرولیتر لودینگ بافر در هر چاهک بارگذاری شده است. زمان انجام الکتروفورز ۲۷ دقیقه بود. ولتاژ استفاده شده ۱۰۰ ولت است. چاهک‌های ۱،۲،۷ نشان‌دهنده ژنوتیپ CC، چاهک ۶ و ۳ نشان‌دهنده ژنوتیپ TT و چاهک‌های ۴،۵ نشان‌دهنده ژنوتیپCT هستند.



شکل ۲. تصویر ژل محصول PCR بعد از هضم با آنزیم *Pflm*I روی ژل آگارز ۳ درصد. لدر استفاده شده ۵۰ است. ۱۰ میکرولیتر از محصولات هضم آنزیمی به همراه ۲ میکرولیتر لودینگ بافر در هر چاهک بارگذاری شده است. زمان انجام الکتروفورز ۲۷ دقیقه بود. ولتاژ استفاده‌شده ۱۰۰ ولت است. چاهک ۳ نشان‌دهنده ژنوتیپ AA، چاهک‌های ۱،۲،۴ نشان‌دهنده ژنوتیپ AG و چاهک ۵ نشان‌دهنده ژنوتیپGG هستند.



شکل ۳. تصویر ژل محصول PCR بعد از هضم با آنزیم *Msp*I روی ژل آگارز ۳ درصد. لدر استفاده شده ۵۰ است. ۱۰ میکرولیتر از محصولات هضم آنزیمی به همراه ۲ میکرولیتر لودینگ بافر در هر چاهک بارگذاری شده است. زمان انجام الکتروفورز ۲۷ دقیقه بود. ولتاژ استفاده‌شده ۱۰۰ ولت است. چاهک‌های ۱،۲،۳،۶ نشان‌دهنده ژنوتیپ GG، چاهک ۸ نشان‌دهنده ژنوتیپ TT و چاهک‌های ۴،۵و۷ نشان‌دهنده ژنوتیپ GT هستند.

بحث

مولکول CD40، یک مولکول مهم در تنظیم ایمنی بوده و مسیر پیام‌رسانی این مولکول نقش پیچیده‌ای در سرطان دارد. به علت نقش پیچیده مسیر پیام‌رسانی مولکول CD40 در پیش‌آگهی سرطان، پلی‌مورفیسم‌هایی از این ژن که نقش مهمی در ترجمه کارآمد پروتئین CD40 دارند و ممکن است خطر و پیش‌آگهی سرطان پستان را تحت تأثیر قرار دهند در این مطالعه بررسی شدند.[۲۵] در این پژوهش، ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم‌های rs1883832 و rs4810485 با خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده شد ولی ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs3765459 و خطر ابتلا به سرطان پستان به اثبات نرسید. در مقایسه این پژوهش با سایر مطالعات، در مطالعه شانگ و همکاران در شمال چین در سال ۲۰۱۱ روی ۵۹۱ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۶۰۰ فرد کنترل، میان پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی rs1883832، rs4810485 و rs3765459 و خطر ابتلا به سرطان پستان ارتباط معناداری وجود داشت (به ترتیب (P=۰/۰۰۱۳، P=۰/۰۰۱۲ و P=۰/۰۲۷۹). نتیجه این تحقیق با مطالعه ما در مورد پلی مورفیسم‌های rs1883832 و rs4810485 همخوانی دارد.[۲۴] در مطالعه آنتوناکوپولو و همکاران در سال ۲۰۲۱ روی ۲۹۹ فرد سالم و ۲۲۹ فرد مبتلا به سرطان ریه (NSCLC) ارتباط معناداری میان پلی‌مورفیسم rs1883832 و خطر ابتلا به سرطان ریه یافت شد. بنابراین نتیجه این تحقیق یافته‌های مطالعه ما را تأیید می‌کند.[۲۵] در مطالعه دولن و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی DNA استخراج شده از خون محیطی ۲۳۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۹۴ فرد کنترل در جمعیت ترکیه هیچ ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs1883832 و خطر ابتلا به سرطان پستان وجود نداشت (P=۰/۴۱۷). نتایج این بررسی با مطالعه ما متفاوت است و علت آن هم می‌تواند مربوط به متفاوت بودن موقعیت جغرافیایی جمعیت‌های بررسی شده باشد.[۲۶] در مطالعه کریشناپا و همکاران در سال ۲۰۱۷ روی ۲۰۰ نمونه مربوط به دهانه رحم در جمعیت مالزی میان پلی‌مورفیسم‌های rs1883832 و rs3765459 و سرطان دهانه رحم ارتباط معناداری وجود داشت، اما میان پلی‌مورفیسم rs4810485 با سرطان دهانه رحم ارتباط معناداری مشاهده نشد. نتیجه این تحقیق در مورد پلی‌مورفیسم rs1883832 با مطالعه ما همخوانی داشته و در مورد دو پلی مورفیسم دیگر همخوانی ندارد.[۲۷] در مطالعه اسکیبولا و همکاران در سال ۲۰۰۸ روی ۳۷۶ فرد مبتلا به لنفوم و ۸۰۱ فرد کنترل در جمعیت کالیفورنیا میان پلی‌مورفیسم rs1883832 و ابتلا به لنفوم ارتباط معناداری وجود نداشت. نتیجه این بررسی با مطالعه ما همخوانی ندارد و ممکن است به علت متفاوت بودن بافت سرطانی مورد مطالعه باشد.[۲۸] مطالعات پیشین نشان می‌دهد که می‌توان از پلی‌مورفیسم‌های ژن CD40 به‌عنوان نشانگر زیستی در تشخیص زودهنگام و استفاده از روش‌های درمانی هدفمند سرطان پستان بهره برد و در این مطالعه نیز نتایج آماری نشان می‌دهد که این دو پلی مورفیسم با سرطان پستان همبستگی داشته و می‌توان از آن‌ها به عنوان نشانگر زیستی استفاده کرد. با این حال برای دستیابی به نتایج قطعی‌تر، مطالعه بیشتر روی پلی مورفیسم‌های مهم این ژن و استفاده از حجم نمونه بزرگ‌تر در جمعیت‌های مختلف جهت تعیین مکانیسم مولکولی این ژن و تأثیر آن بر سرطان پستان اهمیت دارد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر که یک مطالعه مورد-شاهدی است روی ۸۰ فرد بیمار و ۸۰ فرد سالم از زنان ساکن استان مرکزی انجام شد. با توجه به نتایج، ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم‌های rs1883832 و rs4810485 و خطر ابتلا به سرطان پستان وجود داشت اما میان پلی مورفیسم rs3765459 و خطر ابتلا به سرطان پستان ارتباط معناداری مشاهده نشد. از ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌هایrs1883832 و rs4810485 و خطر ابتلا به سرطان پستان، می‌توان نتیجه گرفت به علت این که از پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی به‌عنوان منابع ژنتیکی اصلی جهت تغییرات فنوتیپی درون‌گونه‌ای استفاده می‌شود، بنابراین این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند به‌عنوان یک نشانگر زیستی نقش مهمی در پیش‌گویی بالینی در ارتباط با خطر ابتلا به سرطان پستان داشته باشند. پیشنهاد می‌شود از جامعه آماری بزرگ‌تری برای بررسی همبستگی پلی‌مورفیسم‌ها با سرطان پستان استفاده شده، پلی‌مورفیسم‌های بیشتر این ژن و درجه تومور بررسی و نوع جراحی و مرحله سرطان با توجه پرونده بیماران ارزیابی شوند.

قدردانی

مؤلفان از تمام افرادی که در این پژوهش ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌کنند.

مشارکت پدیدآوران

این مقاله از پروژه تحقیقاتی پانیذ قاسمیان صفائی با راهنمایی جناب آقای دکتر احمد همتا اقتباس شده است. دکتر احمد همتا به عنوان استاد راهنما طرح موضوع، ایده پردازی اولیه، طراحی

اثر، جمع‌آوری نمونه و نظارت و بررسی مقالات پایگاه‌های اطلاعاتی و پانیذ قاسمیان صفائی اجرا طرح و انجام کارهای آزمایشگاهی، تحلیل نتایج و بررسی مقالات را عهده داشتند. همچنین تمام نویسندگان نسخه نهایی را خوانده و تأیید کرده‌اند و در مورد بخش‌های مختلف آن هیچ اختلافی ندارند.

منابع مالی

بخشی از هزینه مالی این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و بخشی توسط خود دانشجو تأمین شده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

تمام داده‌های ایجاد شده در این مطالعه در این مقاله گنجانده شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه خون افراد کنترل از میان افراد مراجعه کننده به مرکز انتقال خون اراک و نمونه خون زنان مبتلا به سرطان پستان در بیمارستان آیت‌الله خوانساری به صورت داوطلبانه پس از دریافت کد اخلاق (IR.ARAKMU.REC.1399.294) از دانشگاه علوم پزشکی اراک، جمع‌آوری شد.

تعارض منافع

مؤلفان اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچ تضاد منافعی با سازمان‌ها و اشخاص دیگر ندارد.

References

1. Pal R, Gochhait S, Chattopadhyay S, Gupta P, Prakash N, Agarwal G, et al. Functional implication of TRAIL–716 C/T promoter polymorphism on its in vitro and in vivo expression and the susceptibility to sporadic breast tumor. Breast cancer research and treatment. 2011;126:333-43. doi: 10.1007/s10549-010-0900-5
2. Hamta A, Adl S. The Fibroblast of the Relationship Between FGFR2 Gene Rs2981582 Polymorphism and Breast Cancer Risk. J Arak Uni Med Sci. 2021;24(1):122-35. doi: 10.32598/jams.24.1.5833.1
3. Pezeshki M, Ansari J, Rezaie J, Ahmadloo M. Investigation Risk Factors for Breast Cancer in Women: A Case–Control Study in Arak, Iran. 2018;13(3):1-11. doi: 10.21203/rs.3.rs-57287/v1
4. Speletas M, Bakaros E, Peristeri AM, Voulgaridi I, Sarrou S, Paliatsa V, et al. The rs1883832 Polymorphism (CD40-1C> T) Affects the Intensity of IgA Responses after BNT162b2 Vaccination. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(22):14056. doi: 10.3390/ijms232214056
5. Karnell JL, Rieder SA, Ettinger R, Kolbeck R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. Advanced drug delivery reviews. 2019;141:92-103. doi: 10.1016/j.addr.2018.12.005
6. Yan C, Richmond A. Hiding in the dark: pan-cancer characterization of expression and clinical relevance of CD40 to immune checkpoint blockade therapy. Molecular Cancer. 2021;20(1):1-5. doi: 10.1186/s12943-021-01442-3
7. Qin J, Xing J, Liu R, Chen B, Chen Y, Zhuang X. Association between CD40 rs1883832 and immune-related diseases susceptibility: A meta-analysis. Oncotarget. 2017;8(60):102235. doi: 10.18632/oncotarget.18704
8. Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunological reviews. 2009;229(1):152-72. doi: 10.1111/j.1600-065x.2009.00782.x
9. Purkerson JM, Smith RS, Pollock SJ, Phipps RP. The TRAF6, but not the TRAF2/3, binding domain of CD40 is required for cytokine production in human lung fibroblasts. European journal of immunology. 2005;35(10):2920-8. doi: 10.1002/eji.200526219
10. Tan J, Town T, Mori T, Obregon D, Wu Y, DelleDonne A, et al. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. The EMBO journal. 2002;21(4):643-52. doi: 10.1093/emboj/21.4.643
11. Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW. CD40 and epithelial cells: across the great divide. Immunology today. 1998;19(11):502-6. doi: 10.1016/s0167-5699(98)01340-1
12. Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, et al. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. The

Journal of experimental medicine. 1995;182(1):33-40.doi: 10.1084/jem.182.1.33
13. Deregibus MC, Buttiglieri S, Russo S, Bussolati B, Camussi G. CD40-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway mediates endothelial cell survival and in vitro angiogenesis. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(20):18008-14. doi: 10.1074/jbc.m300711200
14. Flaxenburg JA, Melter M, Lapchak PH, Briscoe DM, Pal S. The CD40-induced signaling pathway in endothelial cells resulting in the overexpression of vascular endothelial growth factor involves Ras and phosphatidylinositol 3-kinase. The Journal of Immunology. 2004;172(12):7503-9. doi: 10.4049/jimmunol.172.12.7503
15. Flaxenburg JA, Melter M, Lapchak PH, Briscoe DM, Pal S. The CD40-induced signaling pathway in endothelial cells resulting in the overexpression of vascular endothelial growth factor involves Ras and phosphatidylinositol 3-kinase. The Journal of Immunology. 2004;172(12):7503-9. doi: 10.1182/blood.v96.12.3801
16. Vonderheide RH, Flaherty KT, Khalil M, Stumacher MS, Bajor DL, Gallagher M, et al. Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody. Journal of Clinical Oncology. 2006;24(18_suppl):2507. doi: 10.1200/jco.2006.08.3311
17. Gomes EM, Rodrigues MS, Phadke AP, Butcher LD, Starling C, Chen S, et al. Antitumor activity of an oncolytic adenoviral-CD40 ligand (CD154) transgene construct in human breast cancer cells. Clinical Cancer Research. 2009;15(4):1317-25. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-1360
18. Djureinovic D, Wang M, Kluger HM. Agonistic CD40 antibodies in cancer treatment. Cancers. 2021;13(6):1302. doi: 10.3390/cancers13061302
19. Deng ZH, Sun MH, Li YS, Luo W, Zhang FJ, Tian J, et al. Single nucleotide polymorphisms in the CD40 gene associate with the disease susceptibility and severity in knee osteoarthritis in the Chinese Han population: a case-control study. BMC Musculoskeletal Disorders. 2017;18:1-8. doi: 10.1186/s12891-017-1466-8
20. Gao C, Zhuang J, Zhou C, Li H, Liu C, Liu L, Feng F, Liu R, Sun C. SNP mutation-related genes in breast cancer for monitoring and prognosis of patients: a study based on the TCGA database. Cancer Medicine. 2019;8(5):2303-12. doi: 10.1002/cam4.2065
21. Huang HT, Guo J, Xiang Y, Chen JM, Luo HC, Meng LQ, et al. A SNP in 5′ untranslated region of CD40 gene is associated with an increased risk of ischemic stroke in a Chinese population: a case-control study. Genetics and molecular biology. 2017;40:442-9. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2016-0212
22. Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. Endocrinology. 2005;146:2684-91. doi: 10.1210/en.2004-1617
23. Ramroodi N, Saboori H, Sanadgol N. Investigation of association between CD40 current gene variants (rs4810485, rs1883832 and rs3765459) and serum CD154 protein levels in Iranian migraineurs. Cellular and Molecular Biology. 2018;64(14):72-8. doi: 10.14715/cmb/2018.64.14.12
24. Shuang C, Dalin L, Weiguang Y, Zhenkun F, Fengyan X, Da P, et al. Association of CD40 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han women of Northeast China. PloS one. 2011;6(8):e23762. doi: 10.1371/journal.pone.0023762
25. Dimitrakopoulos FI, Antonacopoulou AG, Kottorou AE, Kalofonou M, Panagopoulos N, Dougenis D, et al. Genetic Variations of CD40 and LTβR Genes Are Associated With Increased Susceptibility and Clinical Outcome of Non-Small-Cell Carcinoma Patients. Frontiers in Oncology. 2021;11:721577. doi: 10.3389/fonc.2021.721577
26. Dolen Y, Yilmaz G, ESENDAĞLI G, Guler N, Guc D. CD40-1C> T single nucleotide polymorphism and CD40 expression on breast tumors. Cytokine. 2010;50(3):25-32. doi: 10.1016/j.cyto.2010.03.010
27. Krishnappa P, Kong HM, Mohamad IB, Voon K, Somanath SD. CD40 polymorphism in cervical carcinoma in a subset of Malaysian population. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2017;43(5):923-8. doi: 10.1111/jog.13277
28. Skibola CF, Nieters A, Bracci PM, Curry JD, Agana L, Skibola DR, et al. A functional TNFRSF5 gene variant is associated with risk of lymphoma. Blood, The Journal of the American Society of Hematology. 2008;111(8):4348-54. doi: 10.1182/blood-2007-09-112144