

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره نهم، شماره اول، بهار ۱۳۸۹، ۲۷-۳۶

# ارتباط جابه‌جایی بازی ناحیه تنظیمی AP-1 در ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ و تشکیل تومور در بافت پستان

مجید متولی‌باشی<sup>۱</sup>، ذهرا حجتی<sup>۲</sup>، مرتضی صادقی<sup>۳</sup>

دریافت اصلاحیه از نویسنده ۸۸/۱۰/۱۲ دریافت اصلاح: ۸۷/۹/۳۰ ارسال مقاله به نویسنده ۸۸/۱۱/۶ پذیرش مقاله:

## چکیده

**زمینه و هدف:** ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ از آنزیمهای پروتئولیتیکی است که قادر به هضم کلائز و ژلاتین می‌باشد. یک تغییر تک نوکلئوتیدی سیتوزین به تیمین در ناحیه AP-1 در ناحیه تنظیمی، باعث افزایش بیان این ژن می‌شود. هدف مطالعه حاضر، بررسی نقش باز تیمین در تشکیل تومور در سلول‌های داکت و لوبول (Ducts & Lobules) بافت پستان است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد – شاهدی ۹۰ بیمار مبتلا به تومور پستان از بیمارستان امید اصفهان بین سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۶ به همراه ۱۰۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. ژنوتیپ افراد توسط تکنیک RFLP-PCR تعیین شد. در انتهای با تعیین توالی، ژنوتیپ افراد مجدداً کنترل گردید. همچنین وجود تومور در سلول‌های داکت و لوبول بافت پستان تمامی افراد بیمار توسط ماموگرافی و پزشک مربوط تأیید گردید.

**یافته‌ها:** مقایسه افراد بیمار و گروه کنترل گویای وجود ژنوتیپ‌های تیمین/تیمین (TT) و سیتوزین تیمین (CT)، به ترتیب در صفر و ۹٪ از نمونه‌های کنترل و ۲۲٪ و ۲/۳٪ از نمونه‌های سرطانی بود. بنابراین حدس زده می‌شود که وجود نوکلئوتید تیمین در منطقه تنظیمی AP-1 می‌تواند تسهیل‌کننده شروع سرطان پستان در افراد حامل باشد و باعث افزایش خطر ایجاد تومور بافت پستان گردد [ $p=0.004$ ,  $OR=3/27$ ,  $CI=1/438-7/423$ ].

**نتیجه‌گیری:** ارتباط مثبت بین وجود نوکلئوتید تیمین در جایگاه AP-1 و ایجاد تومور پستان می‌تواند ناشی از عملکرد پروتئازی آنزیم و در نتیجه افزایش حساسیت سلول‌ها برای سرطانی شدن به علت هضم مهارکننده‌های فاکتورهای رشد و افزایش رهایی این فاکتورها باشد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، ماتریکس متالوپروتئیناز-۹، جابه‌جایی بازی

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، بخش ژنتیک دانشگاه اصفهان  
تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۹۰، دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۵۶، پست الکترونیکی: mbashi@sci.ui.ac.ir

۲- استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، بخش ژنتیک دانشگاه اصفهان

۳- کارشناس ارشد گروه آموزشی ژنتیک، بخش ژنتیک دانشگاه اصفهان

**مقدمه**

وجود نوکلئوتید تیمین در ناحیه AP-1 باعث جذب عوامل الگوبرداری در منطقه تنظیمی زن می‌گردد. شواهد حاکی از آن است که این ناحیه به عنوان محلی برای اتصال پروتئین‌های مهارکننده رونویسی عمل می‌کند. به طوری که جایه‌جایی در این جایگاه مانع برهم کنش این پروتئین‌ها با DNA واجد آل‌های تیمین و در نتیجه باعث افزایش بیان زن در آل‌های واجد تیمین می‌شود که می‌تواند منجر به جدایی سلول‌ها از غشاء پایه و ورود آنها به مرحله سرطان شود [۱۰-۱۱]. تاکنون نقش وجود باز تیمین در جایگاه AP-1 پرومотор این زن در سرطان‌های مختلفی از جمله معده، سر و گردن، سینه و پروستات مشخص شده است [۱۲-۱۴].

با توجه به مطالعات گسترده انجام گرفته بر روی تغییر تک نوکلئوتیدی سیتوزین به تیمین در ناحیه AP-1 زن MMP-9، هدف مطالعه حاضر بررسی ارتباط این جا به جایی با شروع سرطان پستان با کمک تکنیک Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR) باشد. به موازات مطالعات ژنتیکی بررسی‌های بالینی و آزمایشات ماموگرافی توسط متخصص مربوطه در بیماران انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها**

تهیه نمونه‌ها: در این مطالعه مورد – شاهدی ۹۰ زن مبتلا به سرطان پستان مراجعه‌کننده به بیمارستان امید اصفهان و ۱۰۰ زن سالم (گروه کنترل) مورد مطالعه قرار گرفتند. در مدت مطالعه و درمان، هیچ‌کدام از بیماران عالیم بهبودی کامل و یا تغییر وضعیت در نوع سرطان را نشان ندادند. حجم نمونه با توجه به مطالعات مشابه انجام

سرطان پستان اولین عامل مرگ زنان در جهان است [۱]. شناسائی سرطان در مراحل اولیه، اهمیتی اساسی در درمان و مهار این بیماری دارد، و تأخیر در درمان سرطان باعث کاهش بقاء و افزایش احتمال مرگ در این بیماران می‌شود [۲-۳]. ماتریکس متالو پروتئیناز-۹ (Matrix Metalloproteinase-9; MMP-9) یکی از اعضای خانواده آنزیم‌هایی است که در تجزیه اتصالات بین غشاء پایه سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی ایفای نقش می‌کنند [۴]. تفاوت در افزایش بیان انواع مختلف روند سرطانی رده‌های سلولی سرطانی در مراحل مختلف روند سرطانی شدن گویای این مطلب می‌باشد که سلول‌های بدخیم در مقایسه با سلول‌های خوش‌خیم آنزیم بیشتری ترشح می‌کنند [۲]. MMP-9 یکی از مهم‌ترین اعضاء این خانواده می‌باشد که بر روی اتصالات بین سلولی شامل کلژن‌ها، الاستین و پروتئوگلایسین‌ها اثر می‌کند و همچنین در هضم مهارکننده‌های عوامل رشد دخیل است [۵-۶]. این پروتئین به دلیل دارا بودن فعالیت کلازنایزی در حالت افزایش بیان، با از هم گسیختگی غشاء پایه از یک طرف و افزایش رهایی عوامل رشد و هضم مهارکننده‌های این عوامل از طرف دیگر، نقشی اساسی در سرطانی شدن سلول‌ها ایفا می‌کند [۷]. میزان بیان این آنزیم و در نتیجه مقدار مشارکت آن در هضم اتصالات بین سلولی و پیشروی سرطان می‌تواند تحت تأثیر توالی‌های تنظیمی در پرمotor زن باشد. تنظیم بیان این زن در سطح رونویسی در سه منطقه با جذب عوامل مختلف الگوبرداری و از طریق جایگاه‌های EtS (Specific Protein-1) SP1، (Enhancing Twenty Six) و

نگهداری گردید. برای استخراج DNA ژنومی از خون، از روش نمکی میلر استفاده شد [۱۸].

تعیین ژنوتیپ به وسیله PCR-RFLP و Sequencing (یکی از کم‌هزینه‌ترین روش‌های ژنتیکی که دارای دقت نسبتاً بالایی نیز هست و معمولاً جهت آنالیز جابه‌جایی بازی و جهش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد) صورت گرفت. بدین منظور ابتدا ناحیه ژنی واحد پلی‌مورفیسم توسط PCR تکثیر شد. برای طراحی پرایمر از موتورهای جستجوگر و نرم‌افزارهای مربوط مانند موتور جستجوگر SGD و نرم‌افزار Oligo استفاده گردید. سپس محصولات PCR به کمک آنزیم محدود‌کننده PaeI که فقط برای آلل حاوی نوکلئوتید تیمین، دارای جایگاه شناسایی است مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه به همراه ۵ واحد از آنزیم مورد نظر و ۱۰ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس محصولات هضم آنزیمی با رنگ مخصوص (Loading dye) به نسبت ۱ به ۳ مخلوط و حدود ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵٪ بارگیری شد.

برای مشاهده باندهای حاصل، ژل آگارز با ولتاژ ۱۰۰ ولت برای یک ساعت در بافر Tris-Boric acid EDTA (TBE) الکتروفورز شد و بدین صورت قطعات حاصل از برش از یکدیگر تفکیک شدند. بنابراین آلل‌های واحد نوکلئوتید تیمین در منطقه پلی‌مورفیسم به دو قطعه بریده می‌شوند ولی آلل‌های حاوی نوکلئوتید سیتوزین (در منطقه پلی‌مورفیسم) دست نخورده باقی می‌مانند. همچنین محصولات PCR، ۱۰ نمونه بیمار به طور تصادفی

گرفته در ایران (بررسی ارتباط آماری ژنوتیپ با مراحل مختلف سرطان با کمک تکنیک RFLP-PCR در جمعیت‌های ایرانی) تعیین گردید [۱۵-۱۷]. نمونه‌های سالم به صورت تصادفی از زنان مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون اصفهان جهت انجام تست سلامتی در طول سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۴ انتخاب شدند که در هیچ یک از این افراد علایم سرطان پستان و یا سایر سرطان‌ها مشاهده نشده و محدوده سنی آنها نزدیک به گروه افراد سرطانی بود. نمونه‌های کنترل از لحاظ وضعیت استعمال دخانیات مشابه با نمونه‌های بیماران انتخاب شدند و همچنین فاقد سابقه فامیلی از لحاظ سرطان بودند. نمونه‌های سرطان پستان در طول مدت اردیبهشت سال ۱۳۸۶ تا شهریور سال ۱۳۸۶ از بخش سرطان بیمارستان امید اصفهان که وجود تومور در آنها توسط ماموگرافی به وسیله متخصص مربوطه ثابت شده بود، انتخاب شدند. میانگین طول درمان بیماران ۲ سال بود و بیماران در طول مدت مطالعه، هر سه ماه در دوره اولیه درمان و سپس هر ۶ ماه مورد آزمایشات کلینیکی قرار گرفتند و هرگونه تغییر در وضعیت بیماران در برگه اطلاعات آنها ثبت شد.

معیار ورود به این مطالعه، تشخیص وجود تومور فاقد متاستاز در بافت پستان توسط ماموگرافی و معیار خروج، رد وجود توده سرطانی توسط پزشک مربوط و یا پیش‌رفته بودن سرطان و درگیر بودن بافت‌های اطراف علاوه بر بافت پستان بود. همسان‌سازی این مطالعه به صورت گروهی صورت گرفت که کل افراد بر اساس علایم و تشخیص متخصص انکولوژی در دو گروه کنترل (سالم) و گروه بیماران سرطانی بررسی شدند. برای بررسی ژنوتیپ افراد حدود ۳ میلی‌لیتر خون وریدی از هر فرد گرفته شد و در Ethylene-Di-amin-Tetra گلوله‌های مخصوص حاوی

آزمون مجدور کای استفاده گردید. ارزش  $p$  کوچکتر از  $0.05$  به عنوان اختلاف آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

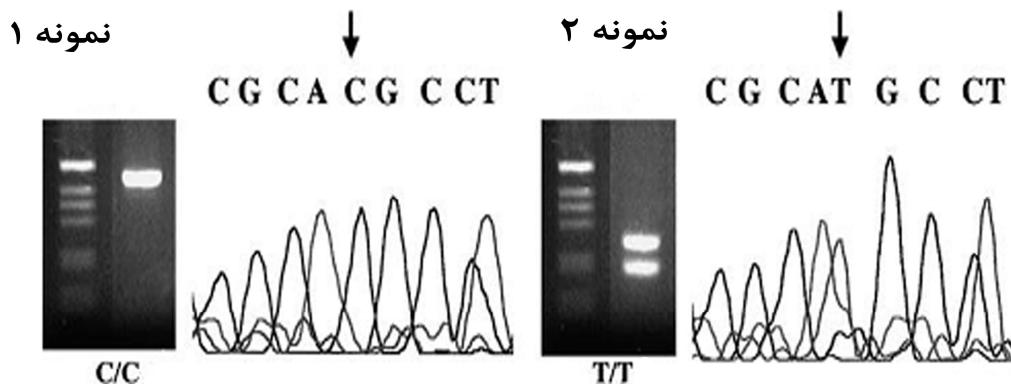
### نتایج

میانگین سنی افراد مبتلا به سرطان پستان  $47 \pm 11$  سال و افراد گروه کنترل  $45 \pm 10$  سال بود. در این مطالعه ژنتیپ افراد در دو گروه بیماران واجد سرطان پستان و افراد گروه کنترل توسط تکنیک RFLP-PCR شناسایی گردید (شکل ۱).

تعیین توالی شدن و در آخر ژنتیپ تک تک افراد در ناحیه تنظیمی مورد نظر مشخص گردید.

برای تأیید صحت ژنتیپ افراد مورد مطالعه علاوه بر Sequencing از RFLP-PCR یا تعیین توالی نیز به عنوان یک آزمون تکمیلی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از کار عملی، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۲ استفاده شد. به منظور بررسی اختلاف فراوانی توزیع ژنتیپی موجود در گروه های مستقل مطالعه، از



شکل ۱- نتایج حاصل از RFLP-PCR و تعیین توالی در یک فرد سالم (شماره ۱) و یک فرد سرطانی (شماره ۲) با ژنتیپ های مختلف.

اندازه تومور در افرادی که دارای دو آلل تیمین بودند بسیار بزرگتر ( $2/5$  سانتی متر) از افرادی بود که واجد یک آلل تیمین بودند. داده ها و آنالیز های آماری - مقایسه ای بین افراد دو گروه که واجد یک آلل تیمین هستند گویای این مطلب می باشد که افراد با ژنتیپ های TT، CT حدود سه برابر بیشتر از افراد گروه کنترل با ژنتیپ CC در معرض سرطان و تشکیل تومور بافت پستان هستند (جدول ۱).  $OR = 3/27, CI = 1/438 - 7/423$

گروه بیماران و گروه کنترل از نظر ژنتیپ های تیمین / تیمین (TT) و سیتیوزین تیمین (CT)، مورد مقایسه قرار گرفتند که نتایج در جدول ۱ آورده شده است. عکس های ماموگرافی بیماران گویای متفاوت بودن اندازه تومور بین  $5$  میلی متر تا  $2/5$  سانتی متر بود. بررسی و مقایسه آنالیز های آماری حاصله از تعیین ژنتیپ افراد با نتایج ماموگرافی، نشانگر وجود تطابق بین نتایج این دو آزمایش و دخالت داشتن آلل واجد نوکلئوتید تیمین در سرطانی شدن سلول ها و ایجاد تومور است، به طوری که

جدول ۱- توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های بیماران سرطانی و افراد سالم

ژنوتیپ	بیماران سرطانی (%)	افراد سالم (%)	(OR <sup>a</sup> /95 CI)	p
CC	(۷۵/۵)۶۸	(۹۱)۹۱	= ۱۰۰ تعداد	—
CT	(۲۲/۲)۲۰	(۹)۹	۲/۹۷(۱/۲۹۴-۶/۸۱۵)	.۰/۰۰۹*
TT	(۲/۳)۲	(۰)۰	—	.۰/۱۹
CT+TT	(۲۴/۵)۲۲	(۹)۹	۳/۲۷ (۱/۴۳۸-۷/۴۲۳)	.۰/۰۰۴*

\*: اختلاف معنی دار آماری

. میزان افزایش خطر ابتلا با فاصله اطمینان (CI) برابر ۹۵٪.

Javier cotignola [۲۱] در مطالعه‌ای بر روی جمعیت آمریکا نشان داد که وجود آلل تیمین در این قسمت از پرومتوور ۹ MMP با ایجاد تومورهای ملانوما در افراد در ارتباط است [۲۲].

Karolina با مطالعه بر روی جامعه هلند و پلی مورفیسم ناحیه AP-1 پرومتوور ۹ MMP نشان داد که وجود آلل T در این جایگاه می‌تواند حدود ۲/۵ برابر (OR=۲/۶۱) با بدحیمی سرطان پستان و متاستاز به غدد لنفاوی در این جمعیت در ارتباط باشد [۲۳] در میان افراد مبتلا به سرطان پستان در مطالعه حاضر نیز بیشترین میزان غلظت پلاسمایی ۹ MMP مربوط به افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت TT بود که این امر تأییدکننده نتایج مطالعه Karolina و نشان‌دهنده نقش قابل توجه آلل T در افزایش بیان این ژن (OR برابر ۳/۲۷ برای آلل تیمین) است. بنابراین از تلفیق نتایج این دو مطالعه می‌توان استنباط کرد که وجود آلل T در این ناحیه از پرومتوور ۹ MMP باعث افزایش بیان این ژن و افزایش شکل فعلی پلاسمایی این آنزیم و در نهایت منجر به افزایش آسیب‌پذیری ماتریکس خارج سلولی و غشاء پایه نگهدارنده

## بحث

طبق یافته‌های این مطالعه، فراوانی آلل‌های تیمین و سیتیوزین ناحیه AP-1 ژن ۹ MMP در افراد سالم و سرطانی دارای اختلاف معنی‌داری است به طوری که افراد دارای نوکلتوقید تیمین در این ناحیه، بیش از سه برابر بیشتر از افراد فاقد نوکلئوپید تیمین در معرض خطر ایجاد تومور پستان هستند (OR=۳/۲۷, p=.۰/۰۰۴).

مشاهدات بسیاری حاکی از آن است که میزان رگ‌زایی به عنوان یک فاکتور کلیدی در سرطانی شدن سلول‌ها و همچنین رشد و گسترش تومورهای جامد ایفای نقش می‌کند [۱۹]. از عملکردهای مهم ماتریکس متابول پروتئیناز-۹ علاوه بر هضم اتصالات سلولی و رهایی فاکتورهای رشد سلولی، رگ‌زایی می‌باشد [۲۰]. افزایش بیان این ژن تاکنون در انواعی از سرطان‌ها شامل سرطان معده، سرطان سینه و سرطان پروستات مشاهده شده است [۱۲-۱۴].

Hsi-Feng در مطالعه‌ای بر روی جمعیت تایوان نشان داد که وجود آلل تیمین در جایگاه AP-1 این ژن با ایجاد سرطان در سلول‌های فلسی شکل دهان در ارتباط است

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، زنان دارای ژنوتیپ‌های CT و TT در ناحیه AP-1 MMP-9 جزء افراد مستعد برای ابتلا به سرطان پستان و تشکیل تومور پستان معرفی می‌گردند و شاید بتوان از این آزمایش ژنتیکی، برای تشخیص زنان مستعد ابتلا به تومور بافت پستان استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با همکاری و مساعدت بخش سرطان بیمارستان امید، سازمان انتقال خون و همچنین حمایت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان انجام شد. بدین‌وسیله از خدمات سرکار خانم سیمین همتی متخصص انکولوژی بیمارستان امید اصفهان برای همکاری در تأیید نمونه‌های سرطانی و مساعدت در بررسی وضعیت بیماران و تهییه نمونه خون تشکر می‌شود.

سلول‌ها شود که این عامل می‌تواند با همکاری سایر عوامل باعث تسهیل مراحل سرطانی شدن سلول‌ها در افراد دارای این ژنوتیپ گردد. طبق داده‌های این مطالعه وجود آلل تیمین در این قسمت از پروموتور ژن MMP-9 ابتلا به سرطان پستان را افزایش می‌دهد. بنابراین می‌توان انتظار داشت که این پلی‌مورفیسم در پروموتور ژن MMP-9 بتواند به عنوان یک شاخص ژنتیکی برای مشخص کردن میزان خطر ابتلای افراد به سرطان سینه در نظر گرفته شود. یافته‌های جدید حاکی از آن است که جابه جایی آلل سیتوزین با تیمین در جایگاه تنظیمی AP-1 در پروموتور این ژن مانع اتصال پروتئین‌های مهارکننده رونویسی به این ناحیه از پروموتور می‌گردد [۶-۷]. با این وجود انجام یک تحقیق وسیع‌تر از کل جامعه ایران برای اثبات این نظریه لازم به نظر می‌رسد. برای مطالعات بعدی در این زمینه پیشنهاد می‌گردد که بیماران علاوه بر تعیین ژنوتیپ، از لحاظ بیان ژن در بافت مورد نظر نیز بررسی گرددند.

### References

- [1] Marcus JN., Watson P, Page DL, Narod SA, Lenoir GM, Tonin P, et al. Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* 1996; 77(4): 697-709.
- [2] Ramirez AJ, Westcombe AM, Burgess CC, Sutton S, Littlejohns P, Richards MA. Factors predicting delayed presentation of symptomatic breast cancer: a systematic review. *Lancet* 1999; 353(9159): 1127-31.

- [3] Richards MA, Westcombe AM, Love SB, Littlejohns P, Ramirez AJ. Influence of delay survival in patients with breast cancer: a systematic review. *Lancet* 1999; 353(9159): 1119-26.
- [4] Forget MA, Desrosiers RR, Beliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases; implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77(7): 465-80.
- [5] Pryzybylowska K, Kluuczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kuling A, Rykala J, et al. Polymorphisms of the Promoter regions of matrix metalloproteinase genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 95: 65-72.
- [6] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3): 161-74.
- [7] Ozalp HM, Tanir OT, Yalcin S, Kabukcuoglu U, M Ueay. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) expression in epithelial ovarian tumors. *Gynaecol Oncol* 2003; 24: 417-20.
- [8] Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks MJ, Plinkert PK, Koitschev A, et al. The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp Cell Res* 2001; 271(2): 344-55.
- [9] Chandrasekar B, Mummidis S, Mahimainathan L, Patel DN, Bailey SP, Imam SZ, et al. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappa B- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. *J Biol Chem* 2006; 281(22): 15099-109.
- [10] Ogawa K, Chen H, Kuang C, Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- $\beta$  is mediated by a nuclear factor- $\kappa$ B site. *Biochem J* 2004; 381: 413-22.
- [11] Zhang B, Ye S, Hermann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99(14): 1788-94.

- [12] Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 1998; 43(6): 791-7.
- [13] Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 1999; 189(2):161-8.
- [14] Sehgal I, Baley PA, Thompson TC. Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. *Cancer Res* 1996; 56(14):3359-65.
- [15] Motovali-Bashi M, Hojati Z, Hajihoseini S. The role of matrix metalloproteinase-3 functional 5A/6A promoter polymorphism in tumor progression and metastasis of breast cancer. *IJB* 2008; 6:45-9.
- [16] Motovali-Bashi M, Hojati Z, Kouhkan F. Genetic variation in MMP1 promoter region and breast cancer susceptibility. *J Sci IR Iran* 2008; 19: 9-14.
- [17] Kouhkan F, Motovali-Bashi M, Hojati Z. The influence of interstitial collagenase-1 genotype polymorphism on colorectal cancer risk in Iranian population. *Cancer Invest* 2008; 26(8): 836-42.
- [18] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- [19] Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3(2): 65-71.
- [20] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa V, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284(5751): 67-8.
- [21] Hsi-Feng Tu, Cheng-Hsien Wu, Shou-Yen Kao, Chung-Ji Liu, Tsung-Yun Liu, Man-Tin Lui. Functional -1562 C-to-T polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promoter is associated with the risk for oral squamous cell carcinoma in younger male areca users. *J of Oral Path* 2007; 36: 409-14.i
- [22] Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai S, Patel A, et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with

- cutaneous malignant melanoma. *BMC Medical Genet* 2007; 8: 10.
- [23] Karolina P, Anita K, Marek Z, Tadeusz K, Andrzej K, Jan R, et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *INIST* 2008; 12: 324-36.

## Association between a Single Base Substitution at AP-1 Regulating Region in *MMP-9* gene and Tumor Creation in Breast Tissue

**M. Motovali-Bashi<sup>1</sup>, Z. Hojati<sup>2</sup>, M. Sadeghi<sup>3</sup>**

Received:14/04/08

Sent for Revision:20/12/08

Received Revised Manuscript: 01/02/10

Accepted: 25/02/10

**Background and Objectives:** Matrix metalloproteinase-9 is one of the proteolytic enzymes that serves in the digestion of collagen and gelatin. A single cytosine to thymidine substitution in AP-1 site in the promoter causes over-expression in the thymidine allele. The aim of this study was the detection of thymidine base function on ducts and lobules cells of breast tissue for entering the cancer step.

**Materials and Methods:** This research is a case-control study involving 90 breast cancer patients without metastasis to other tissues from Omid hospital between 2006-2008; and 100 healthy controls. Sample genotypes were detected by RFLP-PCR technique. At the end genotype of samples was detected by direct sequencing. Also the existence of tumor in ducts and, lobules cells of breast tissues in all the respondents was determined by mammography and expert physicians.

**Results:** Comparison of the case and control groups showed T/T genotype and C/T genotype in 0% and 9% of the control groups, and 2.3% and 22.2% of the patients. Therefore, thymine nucleotide at AP-1 region of *MMP-9* gene could be a facilitated factor for initiation of breast cancer, and could increase the risk of initiation and development of breast tumor ( $p= 0.004$ ), ( $CI=1.438-7.423$ ;  $OR=3.27$ ).

**Conclusions:** The positive association between the thymine nucleotide at AP-1 site and creation of tumor in breast tissue can arise from enzyme protease activity and result in the digestion of growth factor inhibitors and release of these factors.

**Key words:** Breast Cancer, Matrix metalloproteinase-9, Base substitution

**Funding:** This study was funded by Graduate Studies Office of Isfahan University.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Isfahan University approved the study.

1- Assistant Prof., Dept. of Biology, Genetic Division, Isfahan University, Isfahan, Iran  
(Corresponding Author) Tel: (0311) 7932490, Fax: (0311) 7932456, E-mail: mbashi@sci.ui.ac.ir  
2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Genetic Division, Isfahan University, Isfahan Iran  
3- Master of Science, Dept. of Biology, Genetic Division, Isfahan University, Isfahan, Iran