

## بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن CXCL5 با دیابت

شیرین حسنی رنجبر<sup>۱</sup>، پروین امیری<sup>۱</sup>، مهسا نمکچیان<sup>۱</sup>، رامین حشمت<sup>۱</sup>، محمدعلی سجادی<sup>۲</sup>، محمدرضا میرزایی<sup>۲</sup>، ابراهیم رضازاده<sup>۲</sup>، پریسا بالائی<sup>۲</sup>، جواد توکلی بزاز<sup>۱</sup>، شبنم عباس زاده اهرنجانی<sup>۱</sup>، باقر لاریجانی<sup>۱</sup>، مهسا محمد آملی<sup>۱\*</sup>

### چکیده

مقدمه: ژن CXCL5 که به بیان دیگر پپتید فعال کننده نوتروفیل از منشا سلول‌های اپیتلیال (Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide, ENA-78) نامیده می‌شود؛ کم‌کینی است که در بروز بیماری‌های قلبی-عروقی و برخی دیگر از بیماری‌ها نقش دارد. ما قبلاً توالی کامل ژن CXCL5 را اسکن کرده و پلی مورفیسم (rs352046) (G/C-156) را در منطقه پروموتور این ژن گزارش کرده ایم. هدف از این مطالعه تعیین وجود و یا عدم وجود ارتباط بین این پلی مورفیسم و بیماری دیابت یا عوارض ماکروواسکولار آن در مقایسه با جمعیت کنترل سالم ایرانی می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه ۲۳۰ نفر از افراد دیابتی ساکن شهر رفسنجان وارد طرح شده و به عنوان گروه شاهد، ۱۰۲ نفر از افراد سالم ساکن همان منطقه انتخاب شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه افراد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد فراوانی بیشتری از نظر ژنوتیپ CC یا GC نشان دادند (CG+CC vs. GG P=0.004, OR= 2.17, 95%CI; 1.27-3.80). همچنین فراوانی آلل C به طور قابل ملاحظه‌ای در بیماران دیابتی بیشتر از گروه شاهد به دست آمده است. (p=0.01 OR 1.72 95%CI; 1.07-2.86). در این مطالعه ارتباط خاصی بین این پلی مورفیسم و عوارض ماکروواسکولار دیابت یافت نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه، نشان دهنده نقش CXCL5 در پاتوژنز دیابت هستند. سازوکار این دخالت باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. همچنین تکرار این مطالعه در جمعیت با حجم نمونه بالا جهت تایید این یافته‌ها پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، ژن CXCL5، دیابت

۱- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

\* نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۴، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۲۷-۲۸، فاکس: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

## مقدمه

ژن CXCL5 که به بیان دیگر پپتید فعال کننده نوتروفیل از منشا سلول‌های اپیتلیال (Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide, ENA-78) نامیده می‌شود؛ متعلق به زیر خانواده کموکین‌ها بوده و بعد از تحریک توسط سیتوکین‌های پیش التهابی مثل  $IL-1\beta$  و  $\alpha$ -TNF، توسط سلول‌های اپیتلیال بروز پیدا کرده و سبب جذب نوتروفیل‌های پلی مورفونوکلوثر (PMN) می‌گردد [۱].

Zimmerman و همکارانش نشان دادند که CXCL5 توسط سلول‌های تحریک شده اندوتلیال در ریه و سایر بافت‌های انسان نیز آزاد شده و می‌تواند در کنار IL-8، سبب ایجاد فعالیت Pro-adhesive نوتروفیل‌ها شود [۲]. سطوح بالایی از CXCL5 در افراد مبتلا به پانکراتیت مزمن در مقایسه با افراد سالم دیده می‌شود و همچنین سطوح آن در پانکراتیت حاد افزایش پیدا می‌کند و بیان کننده در گیر بودن این کموکین در هر دو مرحله ابتدایی و سیر بیماری می‌باشد [۳ و ۴].

این ژن همچنین به عنوان یک کموکین مهم در برخی بیماری‌های التهابی مانند بیماری کرون، کولیت اولسرو و آرتریت روماتوئید مشاهده شده است [۵ و ۶]. از طرف دیگر، تولید CXCL5 از سلول‌های اندوتلیال در پاسخ به آتورواستاتین کاهش پیدا کرده است که بیانگر نقش احتمالی این ژن در پاسخ به داروهای قلبی عروقی است [۷].

ژن CXCL5 بر روی کروموزوم 4q13-q21 در مکانی یکسان با سایر زیرخانواده‌های ژن CXC قرار گرفته است و شامل ۴ اگزون و ۳ انترون است و ساختاری مشابه با IL-8 دارد [۸].

ما قبلاً توالی کامل ژن را اسکن کردیم و دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) را در ناحیه پروموتور -156G/C (rs352046) و دیگری (rs 425535) 398 G/A واقع در اگزون ۲ که همانم بودند را گزارش کردیم [۹]. فراوانی ژنوتیپ و آلل این پلی مورفیسم در جمعیت آمریکایی و اروپایی گزارش شده است [۹-۱۱].

همچنین نقش عملکردی برای پلی مورفیسم -156 G/C توضیح داده و نشان داده شده است که حامل‌های مختلف آلل C دارای مقادیر بالایی از غلظت CXCL5 در گردش خون و همچنین بر روی لکوسیت‌ها هستند [۱۲]. هدف این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم پروموتور -156G/C (rs352046) و دیابت نوع ۲ یا عوارض ماکروواسکولار آن در مقایسه با افراد سالم ایرانی است.

## روش‌ها

### خصوصیات افراد

گروه مطالعه در این تحقیق شامل ۲۳۰ نفر از افراد دیابتی مراجعه کننده به بیمارستان علی ابن ابی طالب دانشگاه رفسنجان بودند و جمعیت کنترل را ۱۲۰ نفر از افراد سالم همین منطقه تشکیل می‌دادند.

تمام افراد شرکت کننده در این طرح از منطقه فارس زبان بودند. ترکیب جمعیتی در این منطقه نادر است. افراد با قومیت‌های دیگر در این مطالعه وارد نشدند.

بعد از ثبت و تهیه داده‌های دموگرافیک و اطلاعات فردی، ۳-۵ سی سی از خون وریدی افراد شرکت کننده در طرح گرفته شده و در لوله‌های EDTA جمع آوری شده و در  $20^{\circ}\text{C}$  - جهت استخراج DNA نگهداری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه تهران تصویب شده و فرم رضایتنامه جهت تمام بیماران شرکت کننده در طرح تکمیل گردید.

### معیارهای تشخیصی

در این بیماران تشخیص دیابت بر اساس معیارهای انجمن دیابت آمریکا (ADA) گذاشته شد. رتینوپاتی دیابتی توسط یک پزشک متخصص چشم و توسط معاینه افتالموسکوپی تشخیص داده شد. جهت بررسی نفروپاتی دیابتی، میکروآلبومینوری ادرار بررسی و اگر در بیش از ۲ تا ۳ نمونه بیش از ۳۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت آلبومین دفع شده بود، با حذف سایر علل مسبب پروتئین اوری، تشخیص نفروپاتی دیابتی گذارده شد. جهت تشخیص نوروپاتی، از علایم یافت شده توسط پزشک و بیمار مطابق

با معیارهای بررسی عوارض و کنترل دیابت استفاده گردید [۱۳]. بیماران با زخم پای نوروپاتیک، در دسته نوروپاتی قرار گرفتند.

## یافته‌ها

نسبت مرد به زن در گروه بیماران دیابتی ۶۹/۱۶۱ و در گروه کنترل ۶۲/۴۰ بود. میانگین سنی در گروه دیابتی ۵۳±۱۰ سال و در گروه کنترل ۵۰±۱۰ سال بود. میانگین BMI در افراد دیابتی ۲۷±۴ و در افراد کنترل ۲۳±۳ برآورد شد.

فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم ژن *CXCL5* در بیماران دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم: در این مطالعه فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم *CXCL5* - 156G/C در هر دو جمعیت بیماران و گروه کنترل از موازنه Hardy-Weiberg مطابقت می‌کند.

در مقایسه با فراوانی پلی مورفیسم ژن *CXCL5* در بیماران دیابتی و افراد سالم؛ مشاهده شد که فراوانی افراد دارای ژنوتیپ GC یا CC در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل بیشتر است (OR ۲/۱۷، ۹۵٪ CI: ۱/۲۷-۳/۸۰).  $P=0/004$  (CG+CC vs. GG) (جدول ۱) پس از مطابقت نمودن جهت پارامترهای سن، BMI و جنسیت با استفاده از آنالیز رگرسیون (OR ۱/۹۸، ۹۵٪ CI: ۱/۰۸-۳/۶۲)، این ارتباط همچنان معنی دار باقی ماند. همچنین، فراوانی آلل C به طور معنی داری در افراد دیابتی در مقایسه با گروه سالم افزایش داشت (OR ۱/۷۲، ۹۵٪ CI: ۱/۰۷-۲/۸۶)،  $P=0/01$  (جدول ۱).

فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم ژن *CXCL5* در بیماران دیابتی مبتلا به عوارض دیابت در مقایسه با افراد بدون عوارض دیابتی: اختلاف معنی داری در فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم *CXCL5* - 156G/C در بیماران با و بدون نوروپاتی یا رتینوپاتی دیابتی دیده نشد (جدول ۲). با این وجود، فراوانی ژنوتیپ GC در بیماران مبتلا به نوروپاتی افزایش داشت (۴۵٪) ولی وقتی این گروه با افراد بدون نوروپاتی مقایسه شدند، اختلاف معنی داری به دست نیامد (جدول ۲).

## استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ

DNA از نمونه های خون جمع آوری شده در لوله های EDTA با روش Salting Out استخراج شد. تعیین ژنوتیپ با روش PCR-RFLP انجام شد و از پرایمرهای ذیل استفاده شد:

Forward-5'-CTCCTCCTGGCCACCCTCGC-3'  
Reverse-5'-TCAAGCTTTGGGATGCTGGGGGA-3'

چرخه های PCR به صورت ذیل شرح داده شد: 95°C برای ۱۵ دقیقه که با ۴۰ چرخه از ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه ادامه یافت، ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی با درجه حرارت ۷۲°C برای ۷ دقیقه پایان یافت.

محصول نهایی فرآورده PCR (۱۱۴ جفت باز) بر روی ژل آگارز ۲٪ آغشته شده به اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR با آنزیم Restriction Endonuclease Nur1 تجزیه گردید. محصول تجزیه شده برای مدت ۲۴ ساعت تحت حرارت ۳۷°C انکوبه شد. آنزیم Restriction Endonuclease Nur1 سبب هضم و تجزیه فرآورده PCR شده و در صورت وجود آلل G سبب ایجاد قطعات DNA از ۱۹ و ۹۵ جفت باز می‌شود. سپس محصولات هضم شده بر روی ژل ۳/۵٪ آگارز آغشته شده به اتیدیوم بروماید مشاهده می‌گردند.

نتایج حاصل از این تعیین ژنوتیپ، توسط استفاده از نمونه های با ژنوتیپ مشخص از جمعیت اسپانیا و آمریکا و سیستم های Pyrosequencing و Taqman قابل تکرار بودند.

## آنالیز آماری

ارتباط بین گروه های مختلف و آلل ها یا ژنوتیپ های پلی مورفیسم ژن *CXCL5* با استفاده از نسبت شانسن (odds ratio) (OR) و ضریب اطمینان ۹۵٪ برآورد گردید که با استفاده از آنالیز Fisher exact و Chis-square تعیین شد.

جدول ۱- فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم CXCL5-156 G/C در افراد دیابتی نوع ۲ و گروه کنترل

گروه کنترل (n = ۱۰۲)	گروه دیابتی (n = ۲۳۰)	تعداد بیماران ژنوتیپ*
۷۹ (%۷۷)	۱۴۱ (%۶۱)	GG
۱۹ (%۱۹)	۸۲ (%۳۶)	GC
۴ (%۴)	۷ (%۳)	CC
آلل <sup>†</sup> (2N)		
۱۷۷ (%۸۷)	۳۶۴ (%۷۹)	G
۲۷ (%۱۳)	۹۶ (%۲۱)	C

\* GC+CC vs GG, P=۰/۰۰۴ OR ۲/۱۷, %۹۵ CI; ۱/۲۷-۳/۸۰

† Allele C vs. Allele G, P=۰/۰۱ OR ۱/۷۲, %۹۵ CI; ۱/۰۷-۲/۸۶

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپ پلی مورفیسم CXCL5-156 G/C در افراد دیابتی با و بدون نوروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی

ژنوتیپ	CC	GC	GG
وجود نوروپاتی	۵ (%۳)	۴۸ (%۳۳)	۹۳ (%۶۴)
عدم وجود نوروپاتی	۲ (%۲)	۳۲ (%۴۰)	۴۶ (%۵۸)
وجود نوروپاتی	۰ (%۰)	۹ (%۴۵)	۱۱ (%۵۵)
عدم وجود نوروپاتی	۶ (%۳)	۶۷ (%۳۴)	۱۲۳ (%۶۳)
وجود رتینوپاتی	۱ (%۳)	۱۲ (%۳۱)	۲۶ (%۶۶)
عدم وجود رتینوپاتی	۵ (%۳)	۶۲ (%۳۵)	۱۰۸ (%۶۲)

\* مقادیر P در هیچ یک از مقایسه‌ها معنی‌دار نبود (P&gt; ۰/۰۵).

## بحث

نمونه پایین این مطالعه تفسیر شود. در گزارش اخیر Zineh و همکارانش در مورد کاربرد عملی این پلی مورفیسم، آنها افزایش غلظت پلاسمايي CXCL5 را در افراد حامل آلل C یافته اند [۱۲]. همچنین آنها اثر آلل C در تولید CXCL5 توسط لکوسیت‌ها را نشان داده اند [۱۲]. در مطالعات گذشته هیچ ارتباط معنی‌داری بین این پلی مورفیسم و واسکولیت اولیه در جمعیت اسپانیایی دیده نشده است [۱۱]. گزارش‌های قبلی، فراوانی این پلی

در این مطالعه ما ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم پروموتور CXCL5-156 C و دیابت در جمعیت ایرانی به دست آوردیم در حالی که ارتباطی بین این پلی مورفیسم و نوروپاتی، نوروپاتی یا رتینوپاتی دیابتی یافت نشد. با این وجود، فراوانی ژنوتیپ GC به طور نسبی در افراد با نوروپاتی دیابتی بیشتر بود. این یافته می‌تواند با حجم

باشد که ممکن است از طریق فعال سازی نوتروفیل باشد. سازوکار CXCL5 در پاتوژنز دیابت باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. ضمناً تکرار مطالعه در سایر جمعیت‌ها و با حجم نمونه بیشتر جهت تایید داده های مشاهده شده در این مطالعه مورد نیاز است.

مورفیسم را در جمعیت‌های آمریکایی، اسپانیایی و انگلیسی تشریح کرده‌اند. فراوانی آلل و ژنوتیپ در هر سه جمعیت یکسان بوده است. [۹-۱۱]. فراوانی آلل‌های مختلف در جمعیت سالم ایرانی اندکی کمتر به دست آمده است (۱۳٪). برای آلل C در مقابل ۱۶٪ در سایر جمعیت‌ها). ارتباط یافت شده بین پلی مورفیسم ژن CXCL5 و دیابت در این مطالعه، نشان دهنده نقش جدید آن در دیابت می

## ماخذ

- Walz A, Burgener R, Car B, et al. Nucleotide Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *J Exp Med* 1991; 174:1355-62.
- Imaizumi T, Albertine KH, Jicha DL, et al. Human endothelial cells synthesize ENA-78: relationship to IL-8 and to signaling of PMN adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:181-92.
- Saurer L, Reber P, Schaffner T, et al., Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 118: 356-367.
- Shokuhi S, Bhatia M, Christmas S, et al. Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 566-572.
- Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, et al. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest* 1994;94:1012-8.
- Walz A, Schmutz P, Mueller C, Schnyder-Candrian S. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J Leukoc Biol* 1997;62:604-11.
- Zineh I, Luo X, Welder GJ, et al. Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors. *Pharmacotherapy* 2006 Mar;26(3):333-40.
- Chang MS, McNinch J, Basu R, et al. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 25277-82.
- Amoli MM, Larijani B, Thomson W, et al. Two polymorphisms in the epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *Dis Markers* 2005; 21(2): 75-7.
- Zineh I, Welder GJ, Langaee TY. Development and cross-validation of sequencing-based assays for genotyping common polymorphisms of the CXCL5 gene. *Clin Chim Acta* 2006; 370(1-2):72-5.
- Amoli MM, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. Lack of association of epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA)-78 gene polymorphism with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25(1 Suppl 44):S40.
- DCCT Research group. Factors in development of diabetic neuropathy. Baseline analysis of neuropathy in feasibility phase of Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The DCCT Research Group. *Diabetes* 1988 ;37(4):476-81.
- Zineh I, Aquilante CL, Langaee TY, et al. CXCL5 gene polymorphisms are related to systemic concentrations and leukocyte production of epithelial neutrophil-activating peptide (ENA-78). *Cytokine* 2006 7;33(5):258-63.

