Archive of SID

مقاله اصیل

# بررسی فرایند متیلاسیون پروموتر ژن p15 در سرطان بافت پوششی مری با استفاده از روش Methylation-specific PCR

روح‌ا... نجارصادقی .M.Sc[1]، سیدعلیرضا مصباح نمین .Ph.D[1*]، فردوس رستگار جزی .Ph.D[2]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی
۲. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوشیمی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
پست الکترونیک: Email: mesbahna@modares.ac.ir

## چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۹/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۶/۲/۱۵

**هدف:** تعیین وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن p15 در نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی مری

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن p15 در ۳۰ نمونه توموری و ۱۰ نمونه بافتی نرمال با تکنیک PCR مختص متیلاسیون (Methylation Specific PCR) بررسی شد. پس از استخراج DNA از بافت‌ها و هضم آنزیمی، DNA هضم شده به وسیله بی‌سولفیت سدیم تیمار شد. سپس وضعیت متیلاسیون پروموتر با استفاده ازپرایمرهای متیله و غیرمتیله با حضور فراورده‌هایPCR مختص این دو حالت مشخص شد. همچنین از DNA استخراج شده از خون افراد سالم به عنوان کنترل منفی و پس از متیلاسیون با آنزیم متیلاز (SssI) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در ارزیابی نتایج، با استفاده از نرم افزار SPSS، از آزمون دقیق فیشر (Fisher's exac test) با سطح معنی‌داری $p<0.05$ استفاده شد.

**یافته‌ها:** بر اساس این مطالعه تمامی ۱۰ نمونه بافت نرمال، غیرمتیله و فقط ۵ نمونه از ۳۰ نمونه سرطانی (۱۶/۶درصد) متیله بودند که این یافته از نظر آماری، با انجام آزمون دقیق فیشر، ارتباط معنی‌داری را میان متیلاسیون پروموتر ژن p15 و بروز سرطان ESCC نشان نمی‌دهد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به تعداد نمونه‌های توموری به دست آمده از بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی مری و نتایج حاصل از آن، به نظر می‌رسد که میان هیپرمتیلاسیون ژن p15 و بروز این بیماری از نظر آماری ارتباطی وجود ندارد و یا هیپرمتیلاسیون این ژن نقش اصلی در این امر را ایفا نمی‌کند اما مکانیسم‌های دیگری باید در مهار این ژن نقش داشته باشند که برای اثبات آن نیاز به تحقیق گسترده‌تری وجود دارد.

**کلیدواژگان:** سرطان سلول‌های سنگفرشی مری، p15، متیلاسیون DNA، PCR مختص متیلاسیون

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۴۴-۳۹

## مقدمه

سرطان مری یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در ایران است که اغلب در مناطق شمال و شمال شرقی کشور ملاحظه می‌شود. بر اساس تحقیقی که توسط انیستیتو سرطان ایران انجام و منتشر شده است، ۹درصد کل سرطان‌ها و ۲۷درصد سرطان‌های معده‌ای- روده‌ای (Gastrointestinal cancer) مربوط به کارسینومای مری بوده است (۱).

متداول‌ترین نوع هیستولوژیک سرطان مری، سرطان سلول‌های سنگفرشی، (Esophageal Squamous Cell Carcinoma: ESCC) است (۲). این نوع سرطان از سلول‌های سنگفرشی بافت پوششی مری منشا می‌گیرد و اختلالات مورفولوژیک (dysplasia) اپی‌تلیال، زمینه‌ساز آسیب‌های آن است (۳). از منظر میکروسکوپی، آسیب به صورت تجمعی از سلول‌های غیرمعمول (واجد هسته‌ای هایپرکروم) دیده می‌شود و در ادامه فرایند توموری شدن، دیسپلازی و به دنبال آن کارسینوما در محل بافت (Carcinoma In Situ) ایجاد می‌شود که خود زمینه‌ای برای کارسینومای تهاجمی است (۷-۴).

میزان بقای (Survival) ۵ ساله بیماران مبتلا به سرطان مری ۱۰-۳ درصد تخمین زده می‌شود و ۷ درصد بیماران در سال اول تشخیص فوت خواهند کرد. این مساله تا حدودی ناشی از مراجعه دیر هنگام به پزشک است. نیمی از این افراد زمانی به پزشک مراجعه می‌کنند که دیگر امکان درمان از طریق جراحی وجود ندارد. در دو دهه اخیر روش‌های درمانی به کار رفته، تاثیر زیادی بر بقای بیماران نداشته‌اند (۱۵-۱۰ درصد در سال ۱۹۸۸، ۲۰-۱۵ درصد در سال‌های اخیر) (۷).

مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که توزیع جغرافیایی این نوع سرطان بسیار پراکنده است و علل بروز آن معلوم نیست. به طوری که در مناطقی مثل چین، سنگاپور، ایران، روسیه، پورتریکو، شیلی، برزیل، آفریقای جنوبی، فرانسه و سوئیس بسیار شایع است اما در کشورهای در حال توسعه مقام پنجم را در میان دیگر سرطان‌ها دارد و هر ساله ۳۰۰۰۰۰ نمونه جدید آن شناسایی می‌شود (۸، ۹). بر اساس



www.SID.ir

Archive of SID



مجموعه اطلاعات و برآوردهای آماری که در ظرف دو دهه اخیر در مجله International J. of Cancer تحت عنوان The Global Burden of Cancer (GLOBOCAN) به چاپ رسیده است سرطان مری هشتمین سرطان شایع با توزیع جغرافیایی بسیار پراکنده بوده است (۱۰).

در گزارشی که در سال ۱۹۷۵ ارائه شد میزان شیوع ESCC در روستاهای شمال شرقی ایران (سواحل دریای مازندران) ۱۷۱ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر بر آورد شده است (۱۱). بر اساس مطالعات سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ (سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ هجری شمسی)، سرطان مری در ایران دومین سرطان شایع در بین مردان (۱۷/۶ در ۱۰۰ هزار) و در زنان (۱۴/۴ در ۱۰۰ هزار) بوده است (۱۲).

از لحاظ اتیولوژیک علل دقیق بروز سرطان مری مشخص نیست اما با توجه به شیوع بالای این نوع سرطان در ایران و زمینه‌های ژنتیکی مناسبی که وجود دارد همراه با عوامل محیطی، مانند مصرف کم میوه و سبزیجات تازه، مصرف نوشیدنی‌های داغ واعتیاد به مواد مخدر که از عوامل خطر (Risk factor) برای بروز سرطان مری در ایران به شمار آمده (۱۳) ضروری است که روش مناسبی برای تشخیص زود هنگام آن تهیه شود.

متیلاسیون دی‌نوکلیوتیدهای CpG از جمله فرایندهای مولکولی سرطان محسوب می‌شود که در انواع سرطان‌ها متداول است (۱۴). امروزه بررسی فرایند هایپرمتیلاسیون پروموتر افق‌های نوینی را در جهت دستیابی به مارکرهای مولکولی سرطان گشوده است.

در ژنوم مهره‌داران معمولا کربن شماره ۵ سیتوزین‌های موجود در دی‌نوکلئوتید CpG متیله می‌شوند (۱۵). دی نوکلئوتیدهای CpG در سرتاسر ژنوم پراکنده‌اند اما در نواحی خاصی از ژنوم که جزایر CpG به آنها اطلاق می‌شود و عموما ناحیه پروموتری ژن‌ها را در بر می‌گیرد (۱۶)، فراوانی CpG در این جزایر پنج برابر فراوانی آن در کل ژنوم (یک CpG به ازای هر ۸۰ دی نوکلئوتید) است (۱۷). در شرایط نرمال، جزایر CpG غیرمتیله‌اند به جز ژن‌هایی که در روند تکوین و تمایز از طریق متیلاسیون غیرفعال شوند که بدان بر چسب زنی (Imprinting) می‌گویند و یا ژن‌های موجود بر روی کروموزوم X غیرفعال. در صورتی که این ناحیه، هایپرمتیله شود بیان ژن متوقف می‌شود (۱۸). در اثر متیلاسیون سیتوزین‌های جزایر CpG، اتصال پروتیین‌های MeCP2 و MeCP1 ممکن و دسترسی فاکتورهای رونویسی به توالی‌های تنظیم بیان ژن کاهش می‌یابد (۱۹). به علاوه پروتیین‌های اخیر قادرند که کمپلکس‌های حاوی هیستون داستیلازها را فراخوانی کنند که با داستیله کردن بقایای لیزینی N ترمینال هیستون‌ها، میانکنش هیستون‌های مجاور را تسهیل و بدین طریق تشکیل ساختاری از کروماتین را سبب می‌شوند که از لحاظ رونویسی غیرفعال است (۱۵).

از طرف دیگربرخی از فاکتورهای رونویسی درجایگاه‌های شناسایی خود حاوی CpG هستند که در صورت وقوع متیلاسیون در این جایگاه‌ها دیگر قادر به اتصال به DNA نخواهند بود و بدین صورت متیلاسیون از بیان ژن‌ها ممانعت می‌کند (۲۰).

مشاهده متیلاسیون در جزایر CpG که پروموتر و جایگاه آغاز رونویسی را در بر می‌گیرند ، نشان از وجود یک فرایند نابجا (Aberrant methylation) و مهار احتمالی ژن دارد. در همین راستا در مطالعه حاضر وضعیت متیلاسیون ژن p15 (سرکوب‌گر توموری) در نمونه‌های سرطانی مبتلایان به سرطان ESCC و نمونه‌های نرمال مجاور آن مورد بررسی قرار گرفته است.

جایگاه ژن p15 در کروموزوم ۹، بازوی کوتاه، ناحیه ۲ و باند ۱ (9p21) قرار دارد. کروموزومی که حدود ۵۰ کیلوبایت طول دارد در بر گیرنده چند ژن سرکوبگر توموری نظیر p15 و p16 است که علاوه بر نزدیکی جایگاه ژنی، از لحاظ ساختار ژنومی نیز بسیار مشابهند. با این وجود پروتیین p15 برخلاف p16 در مسیر سیگنال‌های مهاری که از خارج سلول منشا می‌گیرند نظیر TGFβ نقش دارد (۲۱). p15 به cdk4 و cdk6 متصل و عملکرد سیکلین cdk4/6-D را مهار می‌کند و با ممانعت از فسفریلاسیون پروتیین رتینوبلاستوما به وسیله این کمپلکس، مانع از آزاد شدن فاکتور رونویسی E2F (که برای بیان ژن‌های دخیل در گذار G1 به S و همانندسازی DNA نقش دارد) می‌شود (۲۴-۲۲). از طرف دیگر p15 با اتصال به cdk4 & 6 از اتصال p27 به این پروتیین‌ها ممانعت می‌کند و p27 آزاد به کمپلکس سیکلین cdk2-E (ضروری برای ورود سلول به فاز S) متصل و عملکرد کینازی آن را مهار می‌کند. بنابراین p15 از یک طرف مانع از آزادسازی E2F و از طرف دیگر سبب افزایش اتصال p27 به کمپلکس سیکلین cdk2-E می‌شود و بدین ترتیب سلول را در فاز G1 متوقف می‌سازد (۲۵، ۲۶). بنابراین در صورت وقوع هر نوع اختلالی در این مسیر سیگنالی، سلول می‌تواند به سمت توموری شدن پیش رود.

با بررسی متون مقالات و بانک ژنی در مورد ژن p15 مشخص شد که پروموتر این ژن از نظر وجود دی نوکلئوتید CpG بسیار غنی است و احتمال اینکه فرایند متیلاسیون در این منطقه از این ژن بالا باشد به نظر منطقی آمد. با توجه به اینکه جایگاه ژنی p15 در نزدیکی ژن p16 قرار داشت و در مورد متیلاسیون این ژن ( p16) در میان نمونه‌های بیماران ایرانی مبتلا به این نوع سرطان تک گزارشی وجود داشت که به طور غیر عادی میزان متیلاسیون این ناحیه را بسیار بالا (۶۴/۳ درصد) گزارش کرده بود (۲۷) انگیزه لازم برای پژوهش در مورد ژن p15 را ایجاد کرد. با این فرض که هیپرمتیلاسیون خوبی شناسایی خواهد شد و از نظر آماری فرضیه H0 رد نخواهد شد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌های بافتی سرطان سلول‌های سنگفرشی مری

با کسب رضایت نامه از بیماران مبتلا به سرطان ESCC بستری در بیمارستان مدائن که توسط پزشک و جراح معالج انجام گرفته بود، تعداد ۳۰ نمونه توموری ESCC به همراه ۱۰ نمونه نرمال مجاور آنها از این افراد دریافت و پس از فریز شدن در هوای مایع به آزمایشگاه منتقل شد. به منظور نگهداری طولانی و استفاده در فرصت مناسب، نمونه‌های بافتی در فریزر تحت دمای منهای ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

نمونه بافت‌های توموری و سالم جمع‌آوری شده از این افراد شامل ۱۳ مرد و ۱۷ زن بود که به جز ۴ نمونه که سن آنها مشخص نبود، سن بقیه بیماران به این شرح بود:

۱۶ نمونه از بیماران بین ۷۰-۶۱ ، ۴ بیمار بین ۵۵-۵۱ و ۴ بیمار بین



www.SID.ir

Archive of SID



۷۵-۷۱ سال سن داشتند. یک بیمار ۳۹ ساله و یک بیمار ۴۶ ساله نیز در میان بیماران بود.

### استخراج DNA و هضم آنزیمی

استخراج DNA بر اساس روش استاندارد فنل، کلروفرم و SDS-پروتیناز K صورت گرفت (۲۸). به منظور تسهیل در تک رشته کردن DNA، ۳-۲ میکروگرم از DNA استخراج و با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Ava II* با قابلیت برش‌دهی انتهای چسبان (Sticky ends)، که داخل ناحیه پروموتر این ژن جایگاه برش وجود ندارد، هضم شد.

### روش PCR مختص متیلاسیون

برای بررسی الگوی متیلاسیون DNA در پروموتر ژن p15 از روش خاص PCR (۲۹) استفاده شد. از آنجایی که آنزیم Taq پلیمراز طی PCR بین سیتوزین متیله و غیرمتیله فرقی نمی‌گذارد، برای ایجاد این تمایز از بی‌سولفیت سدیم استفاده شد. این ترکیب سبب می‌شود سیتوزین‌های غیرمتیله موجود در DNA تک رشته، دآمینه و به یوراسیل تبدیل شوند، در حالی که سیتوزین‌های متیله بدون تغییر باقی می‌مانند این تبدیل عامل اصلی تفکیک DNA متیله از غیرمتیله طی PCR است.

### تیمار DNA با سدیم بی سولفیت

به طور خلاصه حدود ۱ میکروگرم از DNA هضم شده به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و ویال حاوی DNA سریعا به مخلوط آب و یخ منتقل شد. سپس به محلول DNA، سود با غلظت نهایی ۰/۳ مولار اضافه شد تا تک رشته شدن DNA کامل شود. متعاقبا دو برابر حجم نمونه، آگارز (از نوع LMP) ۲ درصد به آن اضافه و مخلوط شد. ۵ میکرولیتر از مخلوط حاصله به ویال حاوی روغن معدنی سرد اضافه شد تا دانه آگارزی تشکیل گردد. بنابراین هر دانه آگارزی حاوی ۲۰۰ نانوگرم از DNA شد. محلول تازه تهیه شده سدیم بی‌سولفیت (شامل بی‌سولفیت ۵ مولار و هیدروکینون ۱۲۵ میلی‌مولار با pH۵) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به هر دانه آگارزی اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از تخلیه محلول بی‌سولفیت، دانه‌های آگارزی ۴ بار (هر بار به مدت ۱۵ دقیقه) با استفاده از بافر TE،دو بار (هر بار به مدت ۱۵ دقیقه) با استفاده از سود ۰/۲ مولار و در نهایت مجددا با استفاده از بافر TE (هر بار به مدت ۱۵ دقیقه) شستشو داده شد. از این دانه‌های آگارزی حاوی DNA می‌توان برای PCR استفاده کرد (۳۰).

### انجام PCR به روش Nested

به علت اسیدی بودن محلول بی‌سولفیت، بخش اعظم DNA طی تیمار تخریب می‌شود که ممکن است مقدار الگو برای PCR را کم کند. لذا برای افزایش کارآمدی و حساسیت PCR از روش Nested استفاده شد.

مرحله اول PCR ژن p15 ( با شماره دسترسی AF058758 از بانک ژنی) با استفاده از پرایمرهای جلو و عقب (که مستقل از وضعیت متیلاسیون و برای ناحیه فاقد CpG طراحی شده بود) به شرح و برنامه دمایی زیر انجام شد.

**P15-EX-F) 5'GAGTTGAGGGTAGTGGTGAATATTTTT 3'**

**P15-EX-R) 5'AAACCCTAAAACCCCAACTACCTAAA 3'**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | | ۳ دقیقه | ۹۷ درجه سانتی‌گراد |
| 10 cycles | Denaturation | ۱ دقیقه | ۹۶ درجه سانتی‌گراد |
| | Annealing | ۵۰ ثانیه | ۶۳-۵۸ درجه |
| | Extension | ۱ دقیقه | سانتی‌گراد ۷۲ درجه سانتی‌گراد |
| 30 cycles | Denaturation | ۵۰ ثانیه | ۹۶ درجه سانتی‌گراد |
| | Annealing | ۵۰ ثانیه | ۵۸ درجه سانتی‌گراد |
| | Extension | ۱ دقیقه | ۷۲ درجه سانتی‌گراد |
| Final extension | | ۸ دقیقه | ۷۲ درجه سانتی‌گراد |

مخلوط واکنش شامل

PCR buffer 1x, $MgCl_2$ 1mM, dNTPs 0.2mM

غلظت پرایمرها هر کدام ۲۰ پیکومول در هر واکنش، آلبومین ۰/۸ میکروگرم در هر میکرولیتر و ۸ درصد DMSO بود و با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس دانه آگارزی که حدود ۵ میکرولیتر بود به هر مخلوط واکنش اضافه شد. محصول این واکنش PCR یک قطعه ۸۰۴ جفت بازی است.

در مرحله دوم PCR، با استفاده از فرآورده PCR مرحله اول و پرایمرهای اختصاصی برای حالت‌های متیله (M) وغیرمتیله (U) و با برنامه دمایی زیر انجام شد:

**P15M-F: 5'GGTTCGGGTTTGGTTTTTCGGC 3'**
**P15M-R: 5'CCGTACAATAACCGAACGACCGA 3'**
**P15U-F: 5'GTGTTGGTTTGGGTTTGGTTTTTTGGT 3'**
**P15U-R: 5'AAACCCCATACAATAACCAAACAACCAA 3'**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | | ۴ دقیقه | ۹۶ درجه سانتی‌گراد |
| 35 cycles | Denaturation | ۳۵ ثانیه | ۹۶ درجه سانتی‌گراد |
| | Annealing | ۳۵ ثانیه | ۶۰ درجه سانتی‌گراد |
| | Extension | ۵۰ ثانیه | ۷۲ درجه سانتی‌گراد |
| Final extention | | ۸ دقیقه | ۷۲ درجه سانتی‌گراد |

محصولات به دست آمده، قطعه ۳۱۴ جفت بازی برای حالت غیرمتیله و قطعه ۳۰۴ جفت بازی برای حالت متیله‌اند. مخلوط واکنش شامل ۰/۲ میلی مولار dNPTs، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، بافر PCR با غلظت 1X، ۰/۸ میکروگرم در ۱ میکرولیتر BSA و ۸درصد DMSO بود و غلظت پرایمرها هر کدام ۲۰p mol/reaction بود و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

همچنین در بررسی متیلاسیون پروموتر ژن p15، جهت کنترل منفی از DNA خون افراد سالم و برای کنترل مثبت از DNA تیمار شده با آنزیم متیل ترانسفراز که قادر به متیلاسیون نواحی CpG است استفاده شد.

### روش آماری

در ارزیابی نتایج، با استفاده از نرم‌افزار SPSS، از آزمون دقیق



www.SID.ir

Archive of SID



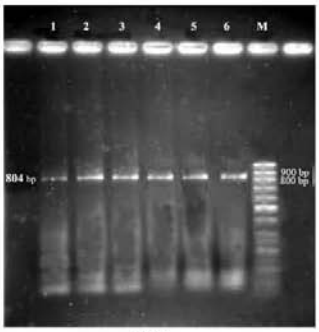
فیشر (Fisher's exact test) با سطح معنی‌داری (p) کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

## یافته‌ها

نمونه‌های بافت توموری و سالم جمع‌آوری شده از افراد مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی مری شامل ۳۰ بیمار بودند که ۲۴ مورد از آنان، بیشتر از ۵۰ سال سن داشته‌اند. بنابراین به نظر می‌رسد که این بیماری بعد از دروه میانسالی شیوع بیشتری دارد.

### بررسی متیلاسیون نابجا در پروموتر ژن p15

در مرحله اول چنانچه انتظار می‌رفت باند ۸۰۴ جفت بازی نمونه‌های نرمال، سرطانی،خون ( به عنوان کنترل منفی حالت متیله) و DNA متیله (به عنوان کنترل مثبت حالت متیله) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصدی در الکتروفورز مشاهده شد (شکل۱) و در مرحله دوم با استفاده از محصول PCR مرحله اول باندهای ۳۱۴ جفت بازی برای حالت غیرمتیله و ۳۰۴ جفت بازی برای حالت متیله به دست آمد (شکل ۲).




شکل ۱: الکتروفورز محصول مرحله اول PCR نمونه‌های مربوط به ستون‌های ۱، ۳ و ۵ سرطانی و ستون‌های ۲، ۴ و ۶، نرمال و ستونM مربوط به مارکر DNA با رده نردبانی ۱۰۰ جفت باز و اندازه باند تکثیر یافته ۸۰۴ جفت باز هستند.

شکل۲ : الکتروفورز محصول PCR مرحله دوم: نوارهای تکثیر یافته برای نمونه‌های تومووری ( شماره‌های ۱، ۲ و ۹، ۱۰) ، برای نمونه‌های بافت نرمال ( شماره‌های ۳، ۴ و ۱۱، ۱۲)، برای نمونه‌های خون نرمال (شماره های ۵ و ۶) و برای نمونه‌های DNA متیله ( شماره‌های ۷ و ۸) و مارکر DNA با رده نردبانی ۵۰ جفت باز در این شکل دیده می‌شوند. نوارهای با اندازه ۳۰۴ جفت بازی برای حالت متیله و فقط در ستون‌های ۱ نمونه توموری و ۷ نمونه DNA متیله دیده می‌شوند، اما با اندازه ۳۱۴ جفت بازی برای حالت غیر متیله در ستون‌های ۴، ۶، ۱۰ و ۱۲ قابل مشاهده هستند.

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تنها در ۵ نمونه از ۳۰ نمونه سرطانی (۱۶/۶درصد) پروموتر ژن p15 متیله بودند که سه مورد از میان نمونه‌های مردان و دو مورد دیگر در میان نمونه‌های زنان بودند، اما در هیچ یک از ۱۰ نمونه بافت نرمال (هیستولوژیک) مجاور تومور، متیلاسیون مشاهده نشد.

### آنالیز آماری

با توجه به نتایج به دست آمده، تحلیل آماری این نتایج از طریق آزمون غیرپارامتری Chi square امکان پذیر نشد و به دلیل آنکه مقادیر مورد انتظار (Expected count) در هر دو مورد نمونه‌های متیله توموری و نمونه‌های متیله نرمال کمتر از ۵ بود، از آزمون دقیق فیشر (Fisher's exact test) و نرم‌افزار آماری SPSS تحلیل آماری انجام شد. ارزیابی این نتایج نشان داد مقدار احتمال یا سطح معنی‌داری (p) به دست آمده (۰/۲۱۷) بیشتر از سطح معنی‌داری ۰/۰۵ است. بنابراین فرضH0 یا عدم وجود رابطه معنی‌دار بین متیلاسیون ژن p15 و ایجاد تومور(ESCC) رد نمی‌شود. به عبارت دیگر فرایند متیلاسیون این ژن در بروز سرطان ESCC نقش تعیین کننده‌ای ندارد.

## بحث

در میان گزارش‌های مختلفی که در مورد اهمیت متیلاسیون پروموترها ارائه شده است بیشترین توجه به پروموتر p16 بوده وکمتر به ژن p15 پرداخته شده است. اتفاقا تنها گزارشی که در مورد این نوع مطالعه در نمونه‌های سرطان ESCC در ایران وجود دارد نیز بر روی پروموتر p16 بوده، متیلاسیون آن پروموتر در بیشتر نمونه‌های خون به دست آمده از خانواده‌ای از استان خراسان، با میزان در صد بالایی (۶۴/۳ درصد) گزارش شده است (۲۷). در حالی که این دو ژن در ناحیه کروموزومی 9p21 و در مجاورت هم واقعند (۳۱) و از لحاظ توالی نوکلیوتیدی تشابه زیادی (به ویژه در اگزون شماره ۲) با هم دارند (۱). پروتین p15 بر خلاف p16، در مسیر سیگنال‌های مهاری که از خارج سلول منشا می گیرند (نظیرTGFβ و اینترفرون) نقش دارد (۲۱، ۳۲). با این وجود همانند p16 اثرمهاری خود را از طریق مهار فعالیت سیکلین CDK4/6-D اعمال می کند و بدین طریق از فسفریلاسیون پروتین رتینوبلاستوما به وسیله این کمپلکس ممانعت می کند (۲۲). بنابراین در صورت مهار p15 نیز رشد و تکثیر سلول از کنترل خارج می‌شود و سلول به سمت توموری شدن پیش خواهد رفت.

از جمله مکانیسم‌هایی که می‌تواند منجر به غیرفعال شدن ژن p15 شود مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی است که از میان آنها امروزه به متیلاسیون پروموتر ژن‌ها توجه ویژه‌ای می‌شود. متیلاسیون پروموتر ژن‌ها می‌تواند به مهار ژن ها ختم گردد.

در شماری از سرطان‌ها نظیر لوسمی (۳۳، ۳۴)کارسینومای سلول‌های سنگفرشی سر و گردن (۳۵)، کارسینومای کبدی (۳۶) و همچنین در سرطان سلول‌های سنگفرشی مری (۴۰-۳۷) متیلاسیون پروموتر ژن p15 گزارش شده است. اما نقش دقیق این ژن در بروز و تکوین سرطان ESCC مشخص نیست. بر اساس گزارش‌های محدود قبلی، متیلاسیون ژن p15 در سرطان ESCC بین ۱۷/۶-۱۱/۷درصد (۳۹-۳۷) و در یک مورد پژوهش ۶۰درصد (۴۰) گزارش شده است که



www.SID.ir

Archive of SID



گزارش‌های اول مربوط به شمال چین (یکی از نواحی پر وقوع سرطان ESCC است اما در گزارش دوم اشاره ای به محل نمونه گیری نشده است.

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر و محدودیت دسترسی به تعداد بیشتر نمونه‌ها، احتمالا متیله نبودن پروموتر ژن p15 در بافت‌های نرمال حاکی از این مطلب است که متیلاسیون این ژن در مراحل اولیه سرطانی شدن سلول‌های سنگفرشی مری نقش چندانی ندارد. این یافته با مطالعه قبلی سازگار است که میزان متیلاسیون در بافت‌های مجاور بافت توموری (نرمال هیستولوژیک) صفر و در بافت‌های حاوی ضایعات پیش سرطانی(Basal cell hyperplasia و Dysphasia) ۸درصد بوده است (۳۷). البته برای اظهار نظر دقیق‌تر لازم است نمونه‌های نرمال بیشتری مورد بررسی قرار گیرد.

میزان متیلاسیون ژن p15 در نمونه‌های توموری مورد مطالعه در تحقیق حاضر برابر با ۱۶/۶درصد بوده که حاکی از اهمیت کم فرایند متیلاسیون این ژن در سرطان ESCC است. البته این نتیجه در محدوده گزارش‌های قبلی از شمال چین (۱۷/۶-۱۱/۷درصد) قرار دارد (۳۹-۳۷).

لازم به ذکر است در مناطق شمالی ایران و چین، فراوانی این سرطان تقریبا یکسان است (۴۱) واحتمالا مکانیسم‌های مولکولی و عوامل اتیولوژیک مشابهی می‌توانند در بروز سرطان ESCC در این دو جمعیت (ایران و چین) نقش داشته باشند.

مقایسه وضعیت ژن‌های p15 و p16 در ESCC با هم نیز جالب است. متیلاسیون ژن p16 در نمونه‌های شمال چین حدود ۵۰-۴۰درصد و از دست دادگی هتروزایگوسیته (LOH) حدود ۱۷درصد گزارش شده است. در حالی که در مورد ژن p15 متیلاسیون بین ۱۷/۶-۱۱/۷ درصد و حذف هموزایگوس ۵۳درصد بوده است. به عبارت دیگر این دو ژن که در مجاورت هم قرار دارند با مکانیسم‌های متفاوتی کنترل می‌شوند (۳۷، ۳۸).

نکته حایز اهمیت دیگر این است که بر اساس مطالعات انجام شده، متیلاسیون و حذف ژن p15 با متیلاسیون و حذف ژن p16 توام است و در نمونه‌هایی که p16 دچار تغییر نشده باشد وضعیت ژن p15 نیز تغییر چندانی نمی‌کند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای، در رده‌های سلولی ESCC ژن p15 در ۵۳درصد (۱۶ نمونه از ۲۸ نمونه) دچار حذف هموزایگوس شده و از همین ۱۶ نمونه، در ۱۵ نمونه اگزون α ژن p16 نیز حذف شده بود (۳۱). بنابراین به نظر می‌رسد که تغییرات ژن p15 عمدتا ناشی از تغیرات ژن p16 است.

## نتیجه‌گیری

در مجموع بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر (نبود متیلاسیون در نمونه‌های نرمال و پایین بودن سطح متیلاسیون در نمونه‌های سرطانی) و یافته‌های قبلی به نظر می‌رسد که در جریان تغییرات (اپی) ژنتیکی ناحیه p219 که به ESCC ختم می گردند، فرایند متیلاسیون ژن p15 در بروز سرطان مری فرایند غالبی نیست و احتمالا مکانیسم‌های دیگری نظیر LOH می‌تواند نقش مهم‌تری در غیرفعال‌سازی این ژن داشته باشد. تعیین نقش دقیق این ژن در کارسینوژنز ESCC به عنوان یک ژن سرکوب گر تومور نیازمند مطالعه جامع‌تر است و ضروری به نظر می‌رسد که هم‌زمان با این ژن، وضعیت تغییرات اپی ژنتیکی چند ژن دیگر نیز بررسی شوند تا اینکه بتوان به طور دقیق تری در مورد اهمیت تغییرات p15 اظهار نظر کرد.

## References


1. Ghavamzadeh A, Mousavi A, Jahani M, Rastegarpanah M, Iravani M. Esophageal cancer in Iran. Seminars in Oncology 2001; 28 (2): 153-157
2. Lam AKY. Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma. Critical reviews in oncology/hematology 2000; 33: 71-90
3. Kuwano H. Peculiar histopathologic features of esophageal cancer. Surg Today 1998; 28: 573-575
4. Anani PA, Gardio LD, Savary M, Monnier P. An extensive morphological and comparative study of clinically early and obvious squamous cell carcinoma of the esophagus. Pathol Res Prac 1991; 187: 214-219
5. Kuwano H, Watanabe M, Sadanaga N, Ikebe M, Mori M, Sugimachi K. Squamous epithelial dysplasia associated with squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer Lett 1993; 72: 141-147
6. Kuwano H, Saeki H, Kawaguchi H, Sonoda K, Kitamura K, Nakashima H, Toh Y, Sugimachi K. Proliferative activity of cancer cells in front and center areas of carcinoma in situ and invasive sites of esophageal squamous-cell carcinoma. Int J Cancer 1998; 78: 149-152
7. Kuwano H, Masuda N, Kato H, Sugimachi K. The subepithelial extension of esophageal carcinoma for determining the resection margin during esophagectomy: a serial histopathologic investigation. Surgery 2002; 131: 14-21
8. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 1999; 49: 8-31
9. Li JY. Epidemiology of esophageal cancer in China, Natl Cancer Inst. Monogr. 1982; 62: 113-120
10. Parkin DM, Baray F, Ferlay J, Pisani P. Estimates of the world cancer burden: Globocan 2000, Int J Cancer. 2001; 94: 153-156
11. Hormodzdiari H, Day NE, Aramesh B, Mahboubi E. Dietary factors and esophageal cancer in the Caspian Littoral of Iran. Cancer Res 1975; 35: 3493-3498
12. Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Donald MP. Cancer Occurrence in Iran in 2002, an International Perspective. Asian Pac J Cancer Prev 2005; 6: 359-363
13. Pourshams A, Saadatian-Elahi M, Nouraie M, Malekshah AF, Rakhshani N, Salahi R, Yoonessi A. Golestan cohort study of oesophageal cancer: feasibility and first Results. Br J Cancer 2005: 92, 176-181




www.SID.ir

Archive of SID



14. Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. Mol Cancer. 2006; 5: 60
15. Ohki I, Shimotake N, Fujita, N, Jee J, Ikegami T, Nakao M. Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. Cell 2001; 105: 487-497
16. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. Curr Opin Genet Dev 1999; 9: 158-163
17. Costello JF, Plass C: Methylation matters. J Med Genet 2001; 38: 285-303
18. Ordway JM, Curran T. Methylation matters: modeling a manageable genome. Cell Growth & differentiation 2002; 13:149-162
19. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. Cell 1999; 99: 451-454
20. Meehan RR, Lewis J, Cross S, Nan X, Jeppesen P, Bird A. Transcriptional repression by methylation of CpG. J Cell Sci Suppl 1992; 16: 9-14
21. Hannon GJ, Beach D. P15ink4b is a potential effector of TGF-induced cell cycle arrest. Nature 1994; 371: 257-261
22. Nikola P. Pavletich: Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks , their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. J Mol Biol 1999; 287: 821-828
23. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Bioch Bioph Acta 2002; 1602: 73-87
24. Dynlacht BD, Moberg K, Lees JA, Harlow E, Zhu L. Specific Regulation of E2F Family Members by Cyclin-Dependent Kinases. Mol and Cell Biol 1997:17; 3867-3875
25. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes & Dev 1999; 13: 1501-1502
26. Reynisdottir I, Massague J. The subcellular locations of p15INK4b and p27Kip1 coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. Genes & Dev 1997: 11; 492-503
27. Abbaszadegan MR, Raziee HR, Ghafarzadegan K, Shakeri MT, Ghavamnasiry MR, Afsharnezhad S. Aberrant p16 methylation, a possible epigenetic risk factor in familial esophageal squamous cell carcinoma. Int J Gastrointest Cancer 2005; 36: 47-54
28. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning. Third edition, Cold spring harbor laboratory press, New York, 2001; section 6.4
29. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9821-9826
30. Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nuc Acids Res 1996:24; 5064-5066
31. Tanaka H, Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I, Ishizaki K. Multiple types of aberrations in the p16 (ink4a) and the p15 (ink4b) genes in 30 esophageal squamous-Cell-carcinoma cell lines. Int J Cancer 1997; 70: 437-442
32. Sangfell O, Erikson S, Einhorn S, Grander D. Induction of Cip/Kip and INK4 cyclin dependent kinase inhibition by interferon-alfa in hematopoietic cell lines Oncogene. 1997; 14: 415-423
33. Chim BCS, Liang R, Tam CYY, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 Genes in Acute Promyelocytic Leukemia: Potential Diagnostic and Prognostic Significance. J Clin Onc 2001; 19: 2033-2040
34. Nguyen TT, Mohrbacher AF, Tsai YC, Groffen J, Heisterkamp N, Nichols PW. Quantitative measure of c-abl and p15 methylation in chronic myelogenous leukemia: biological implications. Blood 2000; 95: 2990-2992
35. González M V Pello, M F, Larrea C, Suárez C, Menndez M J, Coto E. Deletion and methylation of the tumour suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. Clin Pathol 1997; 50: 509–512
36. Wong IHN, Dennis Lo YM, Yeo W, Lau WY, Johnson PJ. Frequent p15 Promoter Methylation in Tumor and Peripheral Blood from Hepatocellular Carcinoma Patients .Clinical Cancer Research 2000; 6: 3516-3521
37. Nie Y, Liao J, Zhao X, Song Y, Yang GY, Wang LD, Yang CS. Detection Of Multiple gene hypermethylation in the development of esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis 2002; 23: 1713-172
38. Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang G-Y, Cai YC, Wang LD, Yang CS. Mechanisms of inactivation of p14arf, p15ink4b, and p16ink4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 1999; 5: 2704-2713
39. Xing EP, Nie Y, Wang LD, Yang GY, Yang CS. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China Carsinogenesis1999; 20: 77-84
40. Kroeger H, Wilhelm S, Koppitz E, Freund M, Lorenz M, Petrowsky H, Koehne CH. Hypermethylation of p15and p16 genes in esophageal carcinoma. Am Soc Clin Oncology (ASCO): Annual Meeting, Abstract No. 2000; 1267
41. Islami F, Kamangar F, Aghcheli K, Fahimi S, Semnani S, Taghavi N, Marjani HA, Merat S, Nasseri-Moghaddam S, Pourshams A, Nouraie M, Khatibian M, Abedi B, Brazandeh MH, Ghaziani R, Sotoudeh M, Dawsey SM, Abnet CC, Taylor PR, Malekzadeh R. Epidemiologic features of upper gastrointestinal tract cancers in Northeastern Iran. British Journal of Cancer. 2004; 90: 1402-1406



www.SID.ir