Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۶/هفته سوم تیر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱۰

بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران مبتلا به لوسمی میلوییدی حاد در زمان تشخیص

علی قاسمی[۱]، دکتر شهربانو رستمی[۲]، نسرین علیزاد قندفروش[۱]، عباس قوطاسلو[۱]، صادق عباسیان[۱]، دکتر فاطمه نادعلی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لوسمی میلوییدی حاد (AML یا Acute myeloid leukemia) گروه هتروژنی از بدخیمی‌های هماتولوژیک می‌باشند که عوامل زیادی در پاتوژنز آن‌ها دخیل هستند. متیلاسیون DNA در نواحی CpG (Cytosine-phosphate-guanine) پروموتور بعضی از ژن‌ها نقش مهمی در شروع و پیشرفت تومورها دارد. پروتئین‌های SFRP (Secreted frizzled-related protein)، تنظیم کننده‌های منفی مسیر سیگنالینگ Wnt می‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ در بیماران AML تازه تشخیص داده شده و افراد سالم مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: نمونه‌ی خون محیطی ۴۳ بیمار AML در زمان تشخیص و ۲۵ فرد طبیعی به عنوان شاهد جهت بررسی وضعیت متیلاسیون دو ژن SFRP۲ و SFRP۱ مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ از تکنیک MSP (Methylation specific- PCR یا Methylation specific- Polymerase chain reaction) استفاده شد. از آزمون Mann–Whitney U برای بررسی ارتباط بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ با پارامترهای بالینی بیماران استفاده شد.

یافته‌ها: برای ژن SFRP۱ در افراد بیمار از ۴۳ نمونه ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) و برای ژن SFRP۲ از ۴۳ نمونه ۹ مورد (۲۰/۹) هایپرمتیله بود. در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون این دو ژن مشاهده نشد. بیشترین هایپرمتیلاسیون SFRP۱ (P = ۰/۰۲۸) و SFRP۲ (P = ۰/۰۰۴) در زیر گروه M۰ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: متیلاسیون ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ همانند بسیاری از سرطان‌های تهاجمی در بیماران مبتلا به AML نیز دیده می‌شود. از این رو احتمال می‌رود که متیلاسیون این ژن‌ها در شروع بیماری نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: لوسمی حاد میلوبلاستیک، SFRP، متیلاسیون DNA

Proof Version

ارجاع: قاسمی علی، رستمی شهربانو، علیزاد قندفروش نسرین، قوطاسلو عباس، عباسیان صادق، نادعلی فاطمه. **بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران مبتلا به لوسمی میلوییدی حاد در زمان تشخیص.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ؟؟

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فاطمه نادعلی
Email: f-nadali@sina.tums.ac.ir

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

مقدمه

لوسمی میلوییدی حاد (AML یا Acute myeloid leukemia) یک اختلال کلونال سلول‌های بنیادی است که با تکثیر کنترل نشده‌ی سلول‌های بنیادی خون‌ساز، توقف بلوغ سلول‌ها در سطح بلاست و ارتشاح بلاست‌ها در خون محیطی و مغز استخوان همراه می‌باشد (۱). سلول‌های بنیادی خون‌ساز در حالت طبیعی دارای توانایی خودنوسازی (Self-renewal) و تمایز به رده‌های مختلف سلولی می‌باشند. بروز برخی از ناهنجاری‌ها از جمله تغییرات ژنتیکی و جابه‌جایی‌های کروموزومی در پاتوژنز AML مشخص شده است. AML مسؤول ۳۰ درصد از تمام لوسمی‌ها در بزرگسالان است و شایع‌ترین نوع لوسمی حاد در طی چند ماه اول زندگی و در بزرگسالان می‌باشد (۲).

پیشرفت‌ها در تحقیقات مولکولی، درک ما را از لوکموژنز AML بسیار بهبود بخشیده است. علاوه بر عوامل خطر مرسوم مانند سن، شمارش گلبول‌های سفید و سیتوژنتیک، تغییرات ژنتیکی مولکولی مانند موتاسیون های ژن های NPM۱، FLT۳ و WT-۱ نیز از جمله عوامل پیش آگهی دهنده‌ی مهم در بیماران مبتلا به AML می‌باشند. در سال‌های اخیر، نقش ناهنجاری‌های اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون پروموتور ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور از جمله خانواده‌ی ژن‌های SFRP (Secreted frizzled related protein) در پاتوژنز سرطان‌ها نشان داده شده است؛ به طوری که این ناهنجاری‌ها می‌توانند در افزایش تکثیر و خودنوسازی، توقف تمایز و آپوپتوز بلاست‌های لوسمیک نقش داشته باشند (۳).

SFRP به عنوان آنتاگونیست مسیر سیگنال‌دهی Wnt عمل می‌کند و در افراد سالم، مانع از فعال شدن این مسیر سیگنالی می‌گردد. مسیر سیگنال‌دهی Wnt در تنظیم فرایندهایی مانند تقسیم و تمایز سلولی نقش دارد. در بعضی از سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال، سرطان سر و گردن و سرطان معده، این مسیر سیگنالی از حالت عملکرد طبیعی خودش خارج می‌گردد و باعث می‌شود تا سلول‌ها به مقدار زیادی تکثیر یابند و سبب ایجاد سرطان شوند (۴). اولین بدخیمی هماتولوژیک که نقص مسیر پیام‌دهی Wnt در آن گزارش شد، CML (Chronic myeloid leukaemia) بود (۵).

بتا کاتنین یک تنظیم کننده‌ی رونویسی درون سلول‌ها می‌باشد که نقش مهمی در سرطان‌ها دارد. کنترل مقدار بتا کاتنین و پایداری آن، یکی از مهم‌ترین وظایف مسیر سیگال‌دهی Wnt می‌باشد (۶). در شرایط عدم حضور لیگاند Wnt، مقدار بتا کاتنین درون سیتوپلاسم کاهش می‌یابد که علت آن تخریب شدن بتا کاتنین به وسیله‌ی کازئین کیناز ۱ و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳β می‌باشد (۷)؛ اما در شرایطی که لیگاند به گیرنده‌ی خود یعنی frizzled receptor اتصال می‌یابد، باعث فعال شدن پروتئین‌هایی به نام DV۱ (Dishevelled) می‌شود (۸).

با افزایش مقدار سیتوپلاسمی بتا کاتنین و انتقال آن به درون هسته، بیان ژن‌های دخیل در تقسیم و تمایز سلولی افزایش می‌یابد (۹، ۴). متیله شدن ژن SFRP سبب می‌شود تا نقش مهاری آن از روی مسیر سیگنال‌دهی Wnt برداشته شود که در پی آن، مقدار سیتوپلاسمی بتا کاتنین افزایش می‌یابد و با انتقال به هسته، به عنوان یک عامل رونویسی باعث افزایش بیان ژن‌هایی مانند MYC و سیکلین D می‌شود که در

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

تنظیم چرخه‌ی سلول نقش دارند (۱۰).

از آن جایی که متیلاسیون این ژن‌ها ممکن است در شروع بیماری و لوکموژنز AML نقش داشته باشد، در مطالعه‌ی حاضر وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ در بیماران مبتلا به AML تازه تشخیص داده شده که به مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی تهران مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

از ۲۵ فرد طبیعی به عنوان شاهد منفی و ۴۳ بیمار که ابتلای آن‌ها به AML به تازگی تشخیص داده شده بود و به مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی مراجعه کرده بودند، نمونه‌ی خون محیطی گرفته شد. بیماران بر اساس گروه‌بندی FAB (French-American-British) طبقه‌بندی شدند. اطلاعات بالینی بیماران شامل شمارش گلبول‌های سفید، پلاکت، سن، غلظت هموگلوبین و میزان بهبودی کامل بعد از شیمی درمانی القایی، از پرونده‌های پزشکی بیماران به دست آمد. بعد از نمونه‌گیری، سلول‌های تک هسته‌ای شامل بلاست‌های لوسمیک به وسیله‌ی سدیمنتاسیون گرادیان غلظت با استفاده از Ficoll-hypaque جدا شدند. سپس DNA با روش استاندارد نمک اشباع استخراج شد (۱۱).

در مرحله‌ی بعد، DNA به وسیله کیت (EpiTect Bisulfite Kit, Qiagene) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده تیمار شد. بعد از این تیمار، سیتوزین‌های غیر متیله به یوراسیل تبدیل می‌شوند، در حالی که سیتوزین‌های متیله بدون تغییر باقی می‌مانند. سپس وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ به وسیله‌ی تکنیک MSP (Methylation specific- PCR) یا (Methylation specific- Polymerase chain reaction) بررسی شد. MSP یک نوع تکنیک PCR است که برای بررسی وضعیت متیلاسیون جزایر CpG (Cytosine-phosphate-guanine) از آن استفاده می‌شود. در این روش از دو جفت پرایمر که مختص بررسی وضعیت متیله و غیر متیله است، استفاده می‌شود. توالی‌های پرایمر برای بررسی وضعیت متیله و غیر متیله در این مطالعه، به همراه اندازه‌ی محصول در جدول ۱ آمده است. توالی این پرایمرها در مطالعات قبلی طراحی شده‌اند (۱۲-۱۳).

جدول ۱. توالی پرایمرها

پرایمر	اندازه‌ی محصول (bp)	دمای التهاب	توالی
SFRP۱ MF	۱۲۶	۶۲	TGTAGTTTTCGGAGTTAGTGTCGCGC
MR۱SFRP			CCTACGATCGAAAACGACGCGAACG
UF۱SFRP	۱۳۵	۵۴	GTTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTTGTGT
UR۱SFRP			CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA
MF۲SFRP	۱۳۸	۶۲	GGGTCGGAGTTTTTCGGAGTTGCGC
MR۲SFRP			CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG
UR۲SFRP	۱۴۵	۶۴	TTTTGGGTTGGAGTTTTTTGGAGTTGTGT
UR۲SFRP			AACCCACTCTCTTCACTAAATACAACTCA

M: Methylated; U: Unmethylated; F: Forward; R: Reverse

www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Proof Version

Archive of SID

در واکنش MSP برای هر بیمار ۴ واکنش با پرایمرهای متیله و غیر متیله مربوط به ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ گذاشته شد. برای بررسی وضعیت متیله از ۲ میکرولیتر DNA که از قبل به وسیله‌ی بیسولفیت تیمار شد و ۴/۵ میکرولیتر H۲۰ d، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Forward، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Reverse و برای بررسی وضعیت غیر میتله از ۲ میکرولیتر DNA و ۸/۵ میکرولیتر H۲۰ d، ۱۲/۵میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Forward، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Reverse به همراه ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ استفاده شد. ابتدا اجزای واکنش MSP تحت شرایط پیش دمایی که شامل ۹۸ °C به مدت ۱ دقیقه و ۹۶°C به مدت ۳ دقیقه بود قرار گرفت و سپس این واکنش به وسیله‌ی ۴۰ سیکل شامل ۹۹ °C برای ۱۰ ثانیه، ۹۷ °C برای ۲۰ ثانیه، ۵۴ °C برای ۳۰ ثانیه (SFRP۱-UM Primer)، ۶۴ °C برای ۳۰ ثانیه (SFRP۲-UM Primer)، ۶۲ °C برای ۳۰ ثانیه (SFRP۱,۲-M Primer) و ۷۲ °C برای ۷ دقیقه (Extention) ادامه یافت.

در این آزمایش، از کیت تجاری EpiTect PCR control DNA (Qiagen Inc., cat no. ۵۹۶۹۵) که حاوی DNA غیر متیله و DNA متیله بود، به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت استفاده شد. جهت تأیید محصول MSP، الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد انجام گرفت. تمام بیماران با رژیم درمانی ۳ + ۷ تحت شیمی درمانی القایی قرار گرفتند. طول مدت درمان برای القای بهبودی کامل در بیماران AML ۳۵-۲۵روز بود. برای بررسی ارتباط بین متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ با پارامترهای بالینی بیماران، از آزمون‌های Fisher's exact و Mann- Whitney استفاده شد. همه‌ی داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز شد. $P < ۰/۰۵۰$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

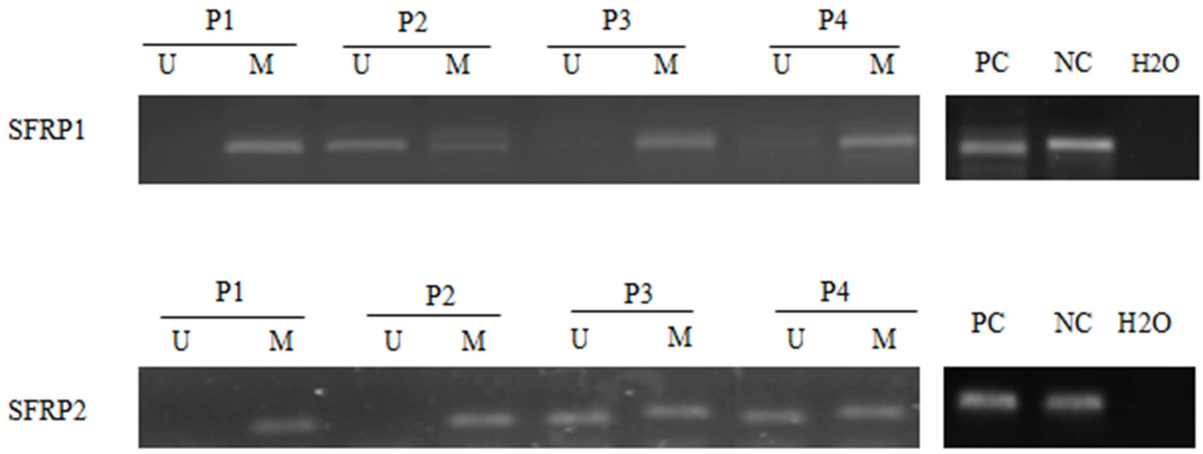
از ۴۳ بیمار مورد مطالعه، ۳۱ نفر (۷۲/۱ درصد) مرد و ۱۲ نفر (۲۷/۹ درصد) زن بودند. محدوده‌ی سنی بیماران بین ۷۲-۱۵ سال و میانگین سنی آن‌ها ۴۵/۴ سال بود. شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به ترتیب در طیف ۱۴۵۰۰۰-۶۰۰، ۲۸۰۰۰۰-۲۰۰۰ و میانگین آن‌ها به ترتیب ۲۷۸۱۸/۵ و ۹۸۶۳۳/۳ سلول در میکرولیتر بود. همچنین طیف غلظت هموگلوبین در این بیماران ۱۴/۸-۶ و میانگین آن ۹/۶ گرم درصد بود. برای ژن SFRP۱ در افراد بیمار از ۴۳ نمونه، ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) به صورت همی متیله، ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) به طور کامل متیله و ۱۷ مورد (۳۹/۵ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند.

همچنین برای ژن SFRP۲ از ۴۳ نمونه، ۱۶ نمونه (۳۷/۲ درصد) به صورت همی متیله، ۹ نمونه (۲۰/۹ درصد) به طور کامل متیله و ۱۸ مورد (۴۱/۸ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند (شکل ۱). در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون این دو ژن مشاهده نشد. ارتباط بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ با علایم بالینی و آزمایشگاهی بیماران در جدول ۲ آمده است.

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID



شکل ۱. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن‌های **SFRP۱** و **SFRP۲** در تعدادی از بیماران مبتلا به **AML**. شاهد مثبت: **PC**، شاهد منفی: **NC**، بیمار: **P**، متیله: **M**، غیر متیله: **U**. از H_2O نیز به عنوان شاهد منفی واکنش **MSP** استفاده شد.

جدول ۲. ارتباط بین ها رمتیلاسیون پروموتور ژن‌های **SFRP۱** و **SFRP۲** با علایم بالینی و آزمایشگاهی بیماران

ویژگی‌ها	SFRP۱			SFRP۲		
	M	U	مقدار P	M	U	مقدار P
تعداد بیماران (درصد)	۱۳ (۳۰/۲)	۳۰ (۶۹/۷)	۰/۳۱۹	۹ (۲۰/۹)	۳۴ (۷۹/۱)	۰/۶۹۲
سن میانگین (محدوده) (سال)	۴۵/۴ (۲۳–۶۰)	۳۹/۶ (۱۵–۷۰)	۰/۶۵۱	۴۶ (۲۴–۷۰)	۵۷ (۱۵–۷۲)	۰/۶۹۲
جنس						
مرد	۱۰	۲۱		۶	۲۵	
زن	۳	۹		۳	۹	
متوسط تعداد گلبول سفید 10^9/L	۱۵/۷	۳۱/۷	۰/۱۰۷	۶۶/۱	۱۴/۴	۰/۱۸۲
متوسط تعداد پلاکت 10^9/L	۱۰۵/۲	۹۵/۶	۰/۳۰۰	۸۹	۱۱۸	۰/۴۰۸
متوسط میزان هموگلوبین g/dL	۸/۹	۹/۹	۰/۱۹۰	۸/۹	۹/۹	۰/۰۹۶
نوع FAB تعداد (درصد)						
M۰	۲ (۱۵/۳)	۰	۰/۰۲۸	۲ (۲۲/۲)	۰	۰/۰۰۴
M۱	۲ (۱۵/۳)	۵ (۱۶/۶)	۰/۹۱۹	۰	۷ (۲۰/۵)	۰/۶۴۶
M۲	۴ (۳۰/۷)	۸ (۲۶/۶)	۰/۷۸۹	۳ (۳۳/۳)	۹ (۲۶/۴)	۰/۲۲۳
M۴	۲ (۱۵/۳)	۸ (۲۶/۶)	۰/۴۳۳	۲ (۲۲/۲)	۸ (۲۳/۵)	۰/۹۳۶
M۵	۲ (۱۵/۳)	۴ (۱۳/۳)	۰/۸۶۳	۲ (۲۲/۲)	۸ (۲۳/۵)	۰/۹۳۶
M۶	۰	۲ (۶/۶۶)	۰/۳۵۲	۰	۲ (۵/۸)	۰/۴۶۸
طبقه‌بندی نشده	۱ (۷/۶)	۳ (۱۰)	۰/۸۱۶	۰	۴ (۱۱/۷)	۰/۲۹۱
نتایج تعداد (درصد)						
بهبودی کامل	۹ (۶۹/۲)	۱۹ (۶۳/۳)	۰/۷۱۷	۵ (۵۵/۵)	۲۵ (۷۳/۵)	۰/۳۰۸
بهبودی ناقص	۳ (۲۳/۰)	۷ (۲۳/۳)	۰/۹۶۸	۲ (۲۲/۲)	۸ (۲۳/۵)	۰/۱۴۲
مرگ	۱ (۷/۶)	۱ (۳/۳)	۰/۵۴۴	۱ (۱۱/۱)	۱ (۲/۹)	۰/۳۱۲
عود	۲ (۱۵/۳)	۴ (۱۳/۳)	۰/۸۶۳	۱ (۱۱/۱)	۵ (۱۴/۷)	۰/۷۸۸

M: Methylated; U: Unmethylated; FAB: French-American-British

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

فراوانی هایپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص به ترتیب ۳۰/۲۳ درصد (۱۳ نفر از ۴۳ بیمار) و ۲۰/۹ درصد (۹ نفر از ۴۳ بیمار) بود. همچنین ۳۲/۲ درصد بیماران در زمان تشخیص (۱۳ نفر از ۴۳ بیمار) برای هر دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ متیله بودند (جدول ۲).

متیلاسیون نابه‌جای این دو ژن در تمام زیر گروه‌های FAB-AML این مطالعه شامل M۰، M۱، M۲، M۴ و M۵ به جز زیر گروه M۶ دیده شد. هایپرمتیلاسیون SFRP۱ (P = ۰/۰۲۱) و SFRP۲ (P = ۰/۰۰۴) در ارتباط با زیر گروه FAB-M۰ مشاهده شد (جدول ۲). هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ با پارامترهای بالینی بیماران شامل جنس، سن، شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید مشاهده نشد (جدول ۲). از ۴۳ بیمار ۶ نفر دچار عود شده بودند که از این بین، ۲ نفر (۴/۶ درصد) برای پروموتور ژن SFRP۱ و ۱ نفر (۲/۳ درصد) برای پروموتور ژن SFRP۲ هایپر متیله بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ با عود بیماران مشاهده نشد.

همچنین اطلاعات مربوط به پاسخ به درمان ۳۸ نفر (۸۸/۳۷ درصد) از بیماران موجود بود. از این تعداد، ۲۸ نفر (۷۵/۶۷ درصد) پس از درمان القایی وارد فاز بهبودی کامل شدند که از این تعداد به ترتیب ۹ و ۵ نفر دارای هایپرمتیلاسیون در پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ بودند. ۱۰ نفر (۲۴/۳۳ درصد) از بیماران مقاوم به درمان القایی بودند و وارد فاز بهبودی نشده بودند که از این تعداد، به ترتیب ۳ و ۲ نفر دارای هایپرمتیلاسیون در پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۱ و SRFP۲ در بیماران با و بدون متیلاسیون و بهبودی کامل پس از درمان القایی مشاهده نشد.

بحث

مسیر سیگنال‌دهی Wnt/β-catenin در فرایندهایی نظیر تکثیر، مورفولوژی، حرکت، تعیین سرنوشت سلول و رشد ارگان‌ها نقش دارد (۱۴). اختلال در مسیر سیگنال‌دهی Wnt/β-catenin سبب رشد و تکثیر سلول‌های توموری و همچنین کاهش آپوپتوز آن‌ها می‌شود (۱۵-۱۴). نقش مسیر سیگنال‌دهی Wnt در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سبب به وجود آمدن این فرضیه شده است که نقص در این مسیر سیگنال‌دهی، ممکن است در پاتوژنز لوسمی‌ها نقش داشته باشد (۱۶). SFRP یک پروتئین سرکوب کننده‌ی تومور می‌باشد که به وسیله‌ی اتصال به پروتئین Wnt مانع از اتصال آن به گیرنده‌اش یعنی Wnt-frizzled receptor می‌شود و در نتیجه باعث غیر فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt می‌گردد. از این رو بین متیلاسیون ژن‌های آنتاگونیست Wnt و فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt در تومورهای توپر و لوسمی‌ها ارتباط وجود دارد (۱۷، ۱۵). متیلاسیون نابه‌جای ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور یکی از شایع‌ترین حوادث ژنتیکی در اکثر سرطان‌های انسانی می‌باشد (۱۹-۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۲ و SFRP۱ در ۴۳ بیمار مبتلا به

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

AML در زمان تشخیص بیماری و در ۲۵ نمونه‌ی طبیعی خون محیطی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ به ترتیب با فراوانی ۳۰/۲۳ درصد (۱۳ نفر از ۴۳ بیمار) و ۲۰/۹ درصد (۹ نفر از ۴۳ بیمار) در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص بیماری اتفاق می‌افتد. در حالی که هیچ کدام از نمونه‌های طبیعی، متیلاسیون را در ناحیه‌ی پروموتوری این دو ژن نشان ندادند.

Veeck و همکاران نشان دادند که در سرطان سینه، SFRP۱ دچار تغییرات اپی‌ژنتیک از جمله متیلاسیون می‌شود که حتی با پیش‌آگهی بد در بیماران نیز در ارتباط می‌باشد (۲۰۰۲). Cooper و همکاران بعد از تحقیقاتشان پیشنهاد کردند که روی SFRP۱ نوترکیب ممکن است یک استراتژی درمانی جدید برای سرطان‌هایی باشد که بیان SFRP۱ در آن‌ها مهار شده است (۲۲). همچنین متیلاسیون SFRP۲ به عنوان یکی از اهداف اپی‌ژنتیکی در سرطان‌هایی از جمله سرطان کولون (۲۳)، سرطان ازوفاگوس (۱۳)، سرطان مثانه (۹)، سرطان معده (۲۵-۲۴)، سرطان کبد (۲۶) و سرطان ریه (۱۲) نشان داده شده است.

مطالعه‌ی حاضر نیز مانند سایر مطالعات نشان داد که این دو ژن از اهداف اپی‌ژنتیک در بیماران مبتلا به AML هستند که پس از متیلاسیون غیر فعال می‌شوند، از این رو متیلاسیون این دو ژن ممکن است در شروع بیماری نقش داشته باشد. متیلاسیون ژن‌های SFRP در بدخیمی‌های هماتولوژیک نیز نشان داده شده است؛ به طوری که Pehlivan و همکاران نشان دادند که فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt از طریق متیلاسیون پروموتور ژن SFRP۱، سبب مقاومت بیماران مبتلا به CML به درمان با ایماتینیب از طریق مهار اثر ایماتینیب بر روی مسیر سیگنال‌دهی BCR-ABL می‌شود (۲۷).

Wang و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که متیلاسیون ژن‌های SFRP در بیماران مبتلا به MDS (Myelodysplastic syndrome) با پیش‌آگهی بد بیماران و بقای کمتر آن‌ها در ارتباط می‌باشد (۱۷). در این مطالعه هیچ گونه ارتباطی بین هایپرمتیلاسیون این ژن‌ها و عوامل پیش‌آگهی دهنده‌ی مرسوم در AML مانند سن و شمارش گلبول‌های سفید مشاهده نشد. همچنین هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون این ژن‌ها و دیگر پارامترهای بالینی مانند جنس بیماران، شمارش پلاکتی و غلظت هموگلوبین مشاهده نشد که ممکن است در صورت افزایش حجم نمونه، ارتباط دیده شود. در مطالعه‌ای که توسط Hou و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که بیشترین هایپرمتیلاسیون مهار کننده‌های مسیر سیگنال‌دهی Wnt در زیر گروه M۰ و کمترین آن در زیر گروه M۳ صورت می‌پذیرد (۲۸).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که متیلاسیون نابه‌جای این دو ژن در تمام زیر گروه‌های FAB-AML (French-American-British- Acute myeloid leukemia) این مطالعه شامل M۰، M۱، M۲، M۴ و M۵ به جز M۶ اتفاق می‌افتد. همچنین بیشترین هایپرمتیلاسیون SFRP۱ (P = ۰/۰۲۸) و SFRP۲ (P = ۰/۰۰۴) در زیر گروه M۰ و کمترین هایپرمتیلاسیون SFRP۲ (P = ۰/۹۱۹) و SFRP۲ (P = ۰/۹۳۶) به ترتیب در زیر گروه‌های M۱ و M۴ صورت می‌پذیرد. بهبودی کامل بعد از درمان القایی

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

در ۸۰-۶۰ درصد بیماران زیر ۶۰ سال مبتلا به AML، مشاهده می‌شود. بهبودی کامل به حضور کمتر از ۵ درصد بلاست در مغز استخوان و اصلاح شمارش سلول‌های خونی (شمارش نوتروفیل بیشتر از ۱۰۰۰ سلول در میکرولیتر، شمارش پلاکت بیشتر از ۱۰۰۰۰۰ سلول در میکرولیتر، هموگلوبین بیشتر از ۱۰ گرم در دسی‌لیتر و عدم حضور بلاست در خون محیطی) تعریف می‌شود. همچنین سلولاریته‌ی مغز استخوان بیشتر از ۲۰ درصد با شواهدی از خون‌سازی هر سه رده‌ی سلولی، باید وجود داشته باشد (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ و بهبودی کامل پس از درمان القایی مشاهده نشد و میزان پاسخ به درمان در بیماران با و بدون هایپرمتیلاسیون یکسان بود.

همچنین در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ با یافته‌های بالینی بیماران مانند سن، جنس، شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها و بهبودی کامل پس از درمان القایی مشاهده نشد. از این رو متیلاسیون این ژن‌ها تنها عامل مرتبط با بیماری نیست؛ بلکه حوادث مولکولی دیگری نیز دخیل می‌باشند. با این وجود، پیشنهاد می‌شود مطالعات وسیع‌تری با تعداد نمونه‌های بیشتر، جهت مشخص شدن نقش هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP در پاتوژنز AML و همچنین سایر بدخیمی‌های هماتولوژیک صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌ی اجرای این مطالعه را تأمین نمود، قدردانی می‌گردد.

References

1. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1999; 341(14): 1051-62.
2. Parkin D, Whelan S, Ferlay J, Teppo L, Thomas D. Cancer incidence in five continents. Vol 3. Lyon, France: IARC Scientific Publications; 2002. p. 155.
3. Jost E, Schmid J, Wilop S, Schubert C, Suzuki H, Herman JG, et al. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2008; 142(5): 745-53.
4. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. Nat Rev Cancer 2008; 8(5): 387-98.
5. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Engl J Med 2004; 351(7): 657-67.
6. Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. Neoplasma 2008; 55(3): 165-76.
7. Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. Bioessays 2002; 24(9): 811-20.
8. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 2004; 20: 781-810.
9. Marsit CJ, Karagas MR, Andrew A, Liu M, Danaee H, Schned AR, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. Cancer Res 2005; 65(16): 7081-5.
10. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. J Cell Sci 2008; 121(Pt 6): 737-46.
11. 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.
12. Huang ZH, Li LH, Yang F, Wang JF. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

and precancerous lesions. World J Gastroenterol 2007; 13(6): 950-4.
13. Zou H, Molina JR, Harrington JJ, Osborn NK, Klatt KK, Romero Y, et al. Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. Int J Cancer 2005; 116(4): 584-91.
14. Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y, Zheng DL, Yang PY, et al. Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. BMC Cancer 2007; 7: 126.
15. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nat Rev Cancer 2001; 1(1): 55-67.
16. Mikesch JH, Steffen B, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. Leukemia 2007; 21(8): 1638-47.
17. Wang H, Fan R, Wang XQ, Wu DP, Lin GW, Xu Y, et al. Methylation of Wnt antagonist genes: a useful prognostic marker for myelodysplastic syndrome. Ann Hematol 2013; 92(2): 199-209.
18. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004; 429(6990): 457-63.
19. Nakamoto D, Yamamoto N, Takagi R, Katakura A, Mizoe JE, Shibahara T. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of malignant mucosal melanoma using whole genome amplification. Bull Tokyo Dent Coll 2008; 49(2): 77-87.
20. Veeck J, Bektas N, Hartmann A, Kristiansen G, Heindrichs U, Knuchel R, et al. Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. Breast Cancer Res 2008; 10(5): R82.
21. Veeck J, Geisler C, Noetzel E, Alkaya S, Hartmann A, Knuchel R, et al. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. Carcinogenesis 2008; 29(5): 991-8.
22. Cooper SJ, von Roemeling CA, Kang KH, Marlow LA, Grebe SK, Menefee ME, et al. Reexpression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. Mol Cancer Ther 2012; 11(10): 2105-15.
23. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van EM, Weijenberg MP, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. Nat Genet 2002; 31(2): 141-9.
24. Fukui T, Kondo M, Ito G, Maeda O, Sato N, Yoshioka H, et al. Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. Oncogene 2005; 24(41): 6323-7.
25. Qi J, Zhu YQ, Luo J, Tao WH. Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. World J Gastroenterol 2006; 12(44): 7113-7.
26. Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, Morandell M, Goebel G, Zitt M, et al. Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? Lancet 2004; 363(9417): 1283-5.
27. Pehlivan M, Sercan Z, Sercan HO. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. Leuk Res 2009; 33(8): 1062-7.
28. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Lee MC, Tang JL, Chen CY, et al. Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. Br J Cancer 2011; 105(12): 1927-33.
29. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 50(3): 197-222.

Proof Version

www.SID.ir