

متیلاسیون پروموتور ژنهای *p14, p15* و *p16* در مبتلایان ایرانی سرطان بافت سنگفرشی مری

شهلا محمدگنجی*، صدف مهبودی و فردوس رستگار جزی

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۱۶

چکیده

مطالعات نشان داده است که متیلاسیون نابه جای ژنهای سرکوبگرتومور باعث خاموش شدن آنها و در نتیجه کاهش بیان آنها شده و زمینه برای ایجاد سرطان مهیا می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی متیلاسیون سه ژن سرکوبگرتومور *p15, p14* و *p16* در مبتلایان به سرطان بافت سنگفرشی مری (ESCC) و ارتباط آن با خصوصیات دموگرافی و پاتولوژیکی بیماران می‌باشد. به این منظور از ۴۴ نفر بیمار ESCC غیرخوشاوند، ۴۴ عدد نمونه بافت توموری و ۱۹ عدد نمونه سالم (مجاور تومور) تهیه و مورد استخراج DNA و RNA قرار گرفت. سپس با پرایمر اختصاصی حالت‌های متیله و غیرمتیله این ژنها، واکنش زنجیره ای پلیمرز ویژه متیلاسیون (MSPCR) انجام شد. بیان این ژنها نیز با RT-PCR بررسی گردید. نتایج نشان داد در میان نمونه های توموری، درصد متیلاسیون برای ژنهای *p14, p15* و *p16* به ترتیب عبارتست از ۵۳، ۹ و ۲۷ درصد و در هیچ یک از نمونه های نرمال (مجاور تومور) متیلاسیونی مشاهده نشد و نیز میزان بیان این ژنها با میزان متیلاسیون نسبت عکس داشت ($p < 0.05$). فراوانی متیلاسیون پروموتور ژنهای *p14* و *p15* در نمونه های توموری SCCE به ترتیب ۴۱، ۹ درصد و فراوانی وجود متیلاسیون همزمان در ژنهای *p15+p16* و *p14+p15* به ترتیب ۱۳/۶ و ۴/۵ درصد بود در حالی که فراوانی متیلاسیون در ژنهای *p14+p16*، ۹٪ مشاهده شد ($P=0.0036$). بدین معنا که در تمامی بیماران متیله برای ژن *p14*، متیلاسیون *p16* مشاهده شد اما در بیشتر بیمارانی که *p15* متیله بود، ژنهای *p14* و یا *p16* متیلاسیون نشان نداد. مقایسه این نتایج با سایر یافته های مشابه در جهان، نشان می‌دهد وضعیت متیلاسیون ژنهای *p15, p14* و *p16* در جمعیت ایرانی مورد بررسی در محدوده گزارشاتی از شمال چین قرار دارد. به عبارتی احتمالاً مکانیسمهای مولکولی و عوامل اتیولوژیک مشابهی می‌توانند در بروز سرطان ESCC در این دو جمعیت (ایران و چین) نقش داشته باشند.

واژه های کلیدی: متیلاسیون، ژنهای *p14, p15, p16*، سرطان بافت سنگفرشی مری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۶۶-۰۲۱ پست الکترونیکی: shahlang@yahoo.com

مقدمه

سرطانی دنیا است، مشاهده می‌شود. بر اساس گزارش منتشر شده توسط انستیتو سرطان ایران، ۹ درصد کل سرطانها و ۲۷ درصد سرطانهای معده ای- روده ای مربوط به کارسینومای مری است (۷) و از هر ۱۰۰ مرگ حاصل از سرطان، ۶ مورد مربوط به سرطان مری می‌باشد. در مراحل اولیه که تومور رشد کندی دارد، بیمار معمولاً فاقد نشانه می‌باشد با این وجود زمانی که نیمی از محیط مری به وسیله تومور اشغال شود، *dysphagia* یا عدم توانایی بلع

بیماری سرطان دومین عامل مرگ و میر بعد از بیماریهای قلبی و عروقی در کشور های صنعتی و کشورهای در حال توسعه می‌باشد. از بین انواع سرطان، سرطان مری با رتبه ششم مرگ و میر در بین انواع سرطانها در دنیا، شیوع بالایی دارد بنابراین امروزه توجه زیادی معطوف تشخیص و درمان این بیماری شده است. در ایران نیز سرطان مری یکی از شایع ترین سرطانها است و بالاترین شیوع آن در نواحی شمال و شمال شرقی کشور که جزء ناحیه کمربند

CpG ناحیه پرموتر ژنها در سلول‌های نرمال متیله نمی‌شود بنابراین مشاهده ناحیه هایپرمتیله، سیگنالی مثبت دال بر وجود نابه‌هنجاری می‌باشد (۹). مزیت دیگر استفاده از هایپرمتیلاسیون جزایر CpG به عنوان مارکر توموری، وجود روش‌های بسیار حساس نظیر Methylation Specific PCR برای شناسایی توالیهای متیله بوده که می‌تواند مقادیر جزئی از DNA متیله را آشکار سازد (۵).

در این پروژه، متیلاسیون پرموتر ژنهای p14 و p15 و P16 در بیماران مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری مورد بررسی قرار گرفت. این ژنها در واقع، ژنهای سرکوبگر تومور هستند که محصول آنها پروتئینهای مهاری اختصاصی می‌باشد. این پروتئینهای مهاری اعضای خانواده INK بوده که به ترتیب به صورت p15INK4b, p14INK4c, p16INK4a نام گذاری شده و باعث مهار اینترکشن سیکلینها با cdk می‌شوند.

ژنهای P14 و p16 که به صورت CDKN2A نیز نشان داده می‌شوند در کنار ژن p15 (CDKN2B) و بر روی کروموزوم 9p21 انسان قرار دارد. ژن p15 در کنار CDKN2A و در منطقه ای قرار دارد که اغلب اوقات و در طیف وسیعی از تومورها دچار موتاسیون یا حذف می‌شود. این ژن مهارکننده، CDK ای را کد می‌کند که با تشکیل کمپلکس با CDK4 یا CDK6، از فعال شدن کینازهای CDK جلوگیری می‌کند. بنابراین پروتئینی را کد می‌کند که به عنوان تنظیم‌کننده رشد سلول، پیشروی مرحله G1 چرخه سلولی را کنترل می‌کند. بیان این ژن تحت تأثیر TGF beta قرار دارد و پیشنهاد شده است که نقش مهاری در القاء رشد TGF beta دارد.

حاصل رونویسی از ژن p16 چند رونوشت متفاوت است که تفاوت این رونوشتها در آگزون اولشان می‌باشد. Kamb در ۱۹۹۴ نشان داد ژن CDKN2A واجد سه آگزون E1، E2 و E3 می‌باشد (شکل ۱). طول آگزونهای یک، دو و سه به ترتیب 125bp، 307bp و 12bp می‌باشد (۱۳ و ۱۴).

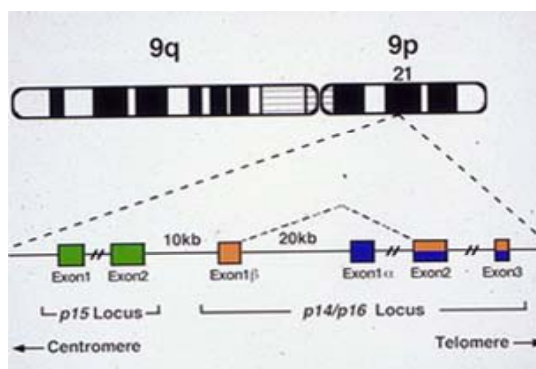
رخ می‌دهد که یکی از متداول‌ترین نشانه‌های سرطان بافت سنگفرشی مری می‌باشد. نحوه درمان ESCC به مرحله بیماری بستگی دارد. در مراحل اولیه بیماری، نواحی آسیب دیده توسط جراحی برداشته می‌شود و در صورتی که نواحی میان سینه درگیر شده باشد، کل مری برداشته می‌شود. درمان با جراحی در مراحل اولیه بیماری مفید است اما پس از انتشار نئوپلاسم به بخش زیر مخاطی، رشد تومور سریع بوده و به گره‌های لنفاوی، کبد، شش و استخوان متاستاز می‌دهد (۱).

از جمله فرآیندهای مولکولی سرطان متیلاسیون دی نوکلئوتید CpG است که در تمام انواع سرطانها متداول می‌باشد. امروزه فرآیند هایپرمتیلاسیون پرموتر، افقهای نوینی را در جهت دستیابی به مارکرهای مولکولی سرطان گشوده است. تقریباً ۹۰-۶۰ درصد از دی نوکلئوتیدهای CpG ژنوم پستانداران متیله است با این وجود عمده CpGهای غیر متیله در توالیهای غنی از CpG (جزایر CpG) که در ناحیه پرموتر ژنها قرار دارند متمرکز شده اند (۱۸). در شرایط طبیعی، جزایر CpG که پرموتر و جایگاه آغاز رونویسی را در بر می‌گیرند غیر متیله اند (به جز ژنهای Imprint و ژنهای موجود بر روی کروموزوم X غیر فعال) و در صورتی که این ناحیه هایپرمتیله شود بیان ژن متوقف می‌شود (۵). البته این در حالی است که الگوی متیلاسیون ژنومی در سلولهای سوماتیک، پایدار و قابل توارث می‌باشد. تغییر الگوی متیلاسیون در بسیاری از انواع سرطانها رخ می‌دهد که باعث مهار بیان ژنها و ناپایداری کل ژنوم می‌گردد (۳). ثابت بودن موقعیت متیلاسیون نابه‌هنجار در ژنهای هدف (یعنی جزایر CpG)، تشخیص وجود آن را نسبت به جهشهای متعدد، آسان تر می‌کند. موقعیت جهشهایی از این دست در ژن ممکن است حتی برای یک نوع خاص تومور از یک بیمار به بیمار دیگر متفاوت باشد اما برای هر ژن می‌توان با یک تست تشخیصی نابه‌هنجاری متیلاسیون پرموتر را بررسی کرد. یکی از کاربردهای متیلاسیون به عنوان مارکر توموری این است که جزایر

روش کار: در این مطالعه ابتدا جامعه آماری مورد نظر و حجم نمونه با توجه به عواملی چون شیوع سرطان مری در ایران، مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین بر روی این ژن و نتایج حاصله، در نظر گرفتن خطاهای نوع اول و دوم، تعداد ۴۴ نمونه توموری و ۱۹ عدد نمونه سالم تعیین گردید. این تعداد نمونه از میان بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی و تومور بانک ایران تهیه شد. همراه با نمونه های بافتی، اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلایان به سرطان مری به دست آمد. بافتها به صورت تازه و در شرایط ازت مایع به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل گردید. همچنین به منظور رعایت قوانین اخلاق زیستی، قبل از نمونه گیری از تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضایت نامه ای گرفته شد. در ادامه، اطلاعات حاصل از بیماران و نمونه ها مورد بررسی دقیق قرار گرفت و تعدادی از نمونه ها از ادامه مطالعه در این پروژه خارج شد. در واقع، اینها نمونه هایی بودند که فاقد شرایط لازم زیر بودند: اگر محل اولیه سرطان نامشخص بود، اگر بیمار علاوه بر مری به نوع دیگری از سرطان مبتلا بود، اگر از نظر هیستولوژیکی برای تومور، تشخیصی غیر از مری تأیید شده بود، اگر اطلاعات دقیقی در مورد تاریخچه یا گزارشات پاتولوژی بیماران در دسترس نبود و در صورتی که بیماران با هم نسبت فامیلی داشتند.

از تمامی نمونه های بافتی، استخراج DNA به روش فنل - کلروفرم انجام شد. سپس DNA ها توسط کیت EZDNA Methylation-Gold™ Kit (ZymoResearch Co.,CA,USA) مورد تیمار با بی سولفیت سدیم قرار گرفت. پرایمر اختصاصی برای حالت‌های متیله و غیرمتیله ژنهای P16، P15 و P14 طراحی شده مطالعه قبلی همین گروه مورد استفاده قرار گرفت (۹). آزمایش Methylation Specific PCR (MSP) برای ژن فوق به شرح زیر انجام شد. برای آزمایش MSP، مواد زیر در حجم 12.5 μL به

مطالعات Quelle نشان داد آگزون E1 شامل بخشهای آلفا و بتا است و نقش آگزون آلفا، کد کردن رونوشت p16(INK4a) می باشد که سبب القاء اتمام رشد در فیبروبلاست پستانداران می گردد (۲۰ و ۲۱). محصول ترجمه ژن *CDKN2A*، حداقل سه واریانت مشخص پروتئینها است که یکی از آنها (p16) بوده که از نظر ساختمانی و عملکردی، ایزوفرمهای مهار کننده کینازی CDK4 است. P16 در فسفریلاسیون رتینوبلاستوما نقش دارد و در کنترل رشد با مهار CDK4 و CDK6 در ارتباط است. کاهش بیان p16 با بسیاری از سرطانهای انسانی، از جمله گلیوما، سرطانهای مری و معده ارتباط دارد (۱۱). آنالیز بیان مولکول p16 می تواند در پیشگویی رفتار تومورهای astrocytic جهت درمان بسیار مفید باشد (۲۴).



شکل ۱- کروموزوم ۹ و لکوسهای مربوط به p15, p16, p14 (۱۴)

بدین منظور در این پروژه تحقیقاتی، به بررسی مارکرهای چندگانه ژنتیکی در ایجاد سرطان بافت پوششی سنگفرشی مری در مبتلایان ایرانی پرداخته شد. بررسی هایپرمتیلاسیون پروموتورهای چند ژن مهم مهارکننده کینازی وابسته به سیکلینها (p14, p15, p16)، به عنوان یکی از مهمترین فرآیندهای مولکولی متداول در تمام انواع سرطانها از جمله سرطان مری، از اهداف انجام این پروژه تحقیقی بود.

مواد و روشها

p15_Un meth_R: 5' CCA TAC AAT AAC CAA
ACA ACC AA 3'

p16_meth_F: 5' TTA TTA GAG GGT GGG GCG
GAT CGC 3'

p16_meth_R: 5' CCA CCT AAA TCG ACC TCC
GAC CG 3'

p16_Un meth_F: 5' TTA TTA GAG GGT GGG
GTG GAT TGT 3'

p16_Un meth_R: 5' CAA CCC CAA ACC ACA
ACC ATA A 3'

در مرحله بعد، استخراج RNA از بافتهای سرطانی و نرمال (بافت مجاور تومور) به کمک کیت استخراج RNA شرکت Intron و مطابق پروتکل آن انجام شد. در ادامه سنتز cDNA به کمک کیت Intron و مطابق دستور کار مربوطه انجام گرفت.

بیان ژنهای p14 و P15 با آزمایش RT-PCR بررسی گردید. ژن بتاکتین نیز به عنوان استاندارد داخلی و ژن خانه دار (House keeping) مورد آزمایش RT-PCR قرار گرفت. دمای annealing برای این مرحله از آزمایش ۵۳ درجه سانتی گراد و طول قطعه مورد نظر، 174bp می باشد.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه در چند بخش قابل ارائه است:

نتایج آنالیز بررسی مارکرهای ژنتیکی بر روی بیماران SCCE: در مجموع، این بیماران شامل ۲۹ نفر مرد (۶۶ درصد) و ۱۵ نفر زن (۳۴ درصد) در طیف سنی ۳۷ تا ۸۷ سال با میانگین سنی $(60/84 \pm 13/88)$ بودند در حالی که هیچیک، نسبت خویشاوندی با یکدیگر نداشتند و اکثر آنها بالاتر از ۴۵ سال داشتند (۸۱/۱ درصد). اکثر بیماران نژاد آذری (۷۰/۵ درصد) و ۲۹/۵ درصد بیماران نژاد غیر آذری (کرد، لر، فارس) داشتند. اعتیاد سیگار و سایر مخدرها، در ۴۱٪ بیماران دیده شد. از نظر تاریخچه خانوادگی نیز، هیچیک از افراد فامیل این بیماران مبتلا به سرطان مری یا

۱ mM dNTPs (Fermentase Co., میکروتیوب اضافه شد Burlington, Ontario, Canada), 0.2 μ M specific oligonucleotide primers, 100 ng modified DNA, U/ μ L Taq polymerase (Hot start, Qiagen, Valencia, CA, USA).

میکروتیوبهای بالا در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، و سپس ۳۵ سیکل به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد، annealing ۶۴ درجه سانتی گراد برای پرایمرهای متیله و غیر متیله ژن P14 و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای پرایمرهای متیله و غیر متیله ژن P15) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای هر دما و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در دستگاه ترموسیکلر مدل PeQLab, 96 universal gradient, UK thermal cycler قرار داده شد. نمونه کنترل مثبت نیز از شرکت New England Biolab خریداری گردید. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، مشاهده باند با طول 122bp نشانه وجود متیله بودن پروموتور ژن P14 و وجود باند با طول 132 bp نشانه عدم متیله بودن آن می باشد. همچنین مشاهده باند با طول 148bp نشانه وجود متیله بودن پروموتور ژن P15 و وجود باند با طول 154 bp نشانه عدم متیله بودن این ژن می باشد. توالی پرایمرهای اختصاصی برای حالت متیله و غیر متیله پروموتور ژنهای مورد نظر برای آزمایش MSPCR عبارتست از:

p14_meth_F: 5' GTG TTA AAG GGC GGC GTA
GC 3'

p14_meth_R: 5' AAA ACC CTC ACT CGC GAC
GA 3'

p14_Un meth_F: 5' TTT TTG GTG TTA AAG GGT
GGT GTA GT 3'

p14_Un meth_R: 5' CAC AAA AAC CCT CAC
TCA CAA CAA 3'

p15_meth_F: 5' GCG TTC GTA TTT TGC GGT T 3'

p15_meth_R: 5' CGT ACA ATA ACC GAA CGA
CCG A 3'

p15_Un meth_F: 5' TGT GAT GTG TTT GTA TTT
TGT GGT T 3'

سایر سرطانها نبودند (جدول ۱). نتایج آزمایشات پاتولوژی نیز نشان داد ۹ درصد بیماران از نظر تمایزی، grade II و ۶۳/۶ درصد در مرحله T3 بودند. از نقطه نظر تهاجم لنفی،

۴۷/۸ درصد مرحله N1 را نشان دادند و فقط ۹/۱۶ درصد ایشان متاستاز داشتند (جدول ۱).

جدول ۳-۱- اطلاعات فردی، دموگرافی، و پاتولوژی بیماران ESCC

	Total (n=44) %		Total (n=44) %
Age (mean±SD), years	60.84±13.88	Race	
		Azeri	31(70.5)
		Non-Azeri	13(29.5)
Age		Sex	
<45	8(18.2)	Male	29(66)
>45	36(81.8)	Female	15(34)
Lymph node invasion		Metastasis	
N0	13(29.5)	M0	12(27.24)
N1	21(47.8)	M1	4(9.16)
NX	10(22.7)	MX	28(63.6)
Tumor T stage		Tumor Necrosis Present	
T1	1(2.27)	Yes	15(34)
T2	10(22.7)	No	21(47.8)
T3	28(63.6)	Unknown	8(18.2)
T4	1(2.27)		
Unknown	4(9.16)		
BMI>25		Perineural Invasion	
Yes	15(34)	Yes	16(36.36)
No	27(61.3)	No	24(54.47)
Unknown	2(4.7)	Unknown	4(9.16)
Air born occupational exposures		Grade Differentiation	
Yes	15(34)	I	10(22.7)
No	26(59)	II	26(59)
Unknown	3(7)	III	5(11.3)
		Unknown	3(7)
Smoking		Tumor size (Cm)	
Yes	18(41)	<4.9	19(43)
No	26(59)	>5	25(57)

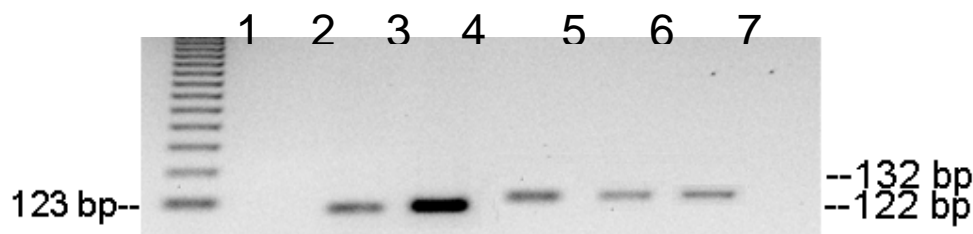
دیده شد. بین متیلاسیون پروموتور ژن p15 و فاکتورهای چاقی (P=0.025)، Lymph node invasions (P=0.04)، Perineural Invasion (P=0.0036) و Tumor Necrosis Present (P=0.04) ارتباط معنادار مثبت مشاهده شد. نتایج حاصل از تستهای آزمایشگاهی: نتایج نشان داد که کیفیت و کمیت DNA و RNA استخراج شده از بافتها دارای وضعیت خوبی هستند. میانگین غلظت DNA هر نمونه بین ۳۳۰ ng/ul تا ۱۵۰ و نسبت ۲۶۰ λ به ۲۸۰ λ نیز

تجزیه و تحلیل آماری ارتباط مثبتی بین متیلاسیون ژنهای p15، p14، p16 و برخی فاکتورهای دموگرافی و پاتولوژی بیماران مبتلایان SCCE، نشان داد که ارتباط مثبت بین متیلاسیون CDKN2A/p16 و فاکتورهای ذرات آلاینده شغلی (P=0.0082) و چاقی BMI (P=0.00142) دیده شد. بین متیلاسیون پروموتور ژن CDKN2A/p14 و ذرات آلاینده هوا (P=0.02)، درجه تمایزی تومور (grade I) نسبت به (grade II) (P=0.005) و متاستاز (P=0.003) ارتباط مثبت

کیفیت خوبی بوده و عمل *modification* به خوبی انجام شده است. این آزمایش جهت اطمینان از مناسب بودن واکنش تیمار با سدیم بی سولفیت، از ژن *TPEF* به عنوان کنترل تیمار و *MSPCR* استفاده شد (شکل ۲)

بین ۱/۸ تا ۲ بود و DNAها عاری از هر گونه آلودگی بودند.

نتایج حاصل از آزمایش *MSPCR* با پرایمرهای اختصاصی *TPEF* نشان داد که کلیه DNAهای تیمار شده دارای



شکل ۲- آزمایش *MSPCR* با پرایمرهای ژن *p14* بر روی ژل ۱/۵٪ آگارز. از چپ به راست (طول قطعه تکثیر شده با جفت پرایمر متیله، ۱۲۲bp و با جفت پرایمر غیر متیله، ۱۳۲bp می باشد). چاهک ۱: سایز مارکر ۱۲۳bp، *Invitrogen*. چاهک ۲: کنترل منفی برای حالت متیله، چاهک ۳: حالت متیله برای نمونه توموری یکی از بیماران، چاهک ۴: کنترل مثبت، چاهک ۵: کنترل مثبت برای حالت غیر متیله، چاهک ۶: حالت غیر متیله برای نمونه توموری یکی از بیماران. چاهک ۷: حالت غیر متیله یکی از نمونه های نرمال بافتی، چاهک ۸: کنترل منفی برای حالت غیر متیله.

فراوانی متیلاسیون در ژنهای *p14+p16* ۹ درصد مشاهده شد ($P=0.0036$). بدین معنا که در تمامی بیمارانی که برای ژن *p14* متیله بود، متیلاسیون *p16* هم مشاهده شد اما در بیشتر بیمارانی که *p15* متیله بود، ژنهای *p14* و یا *p16* متیلاسیون نشان نمی داد.

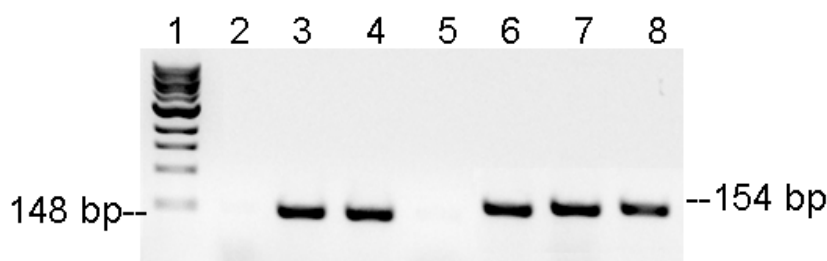
از طرف دیگر آزمایشهای RT-PCR برای بررسی بیان نمونه هایی که برای این ژنها متیله بودند، نشان از ارتباط معکوس بین میزان متیلاسیون و بیان این ژنها در بافتها داشت. در واقع مطابق نتایج، اولاً برای ژن بتااکتین در همه نمونه های نرمال و توموری بیان مشاهده شد. دوماً بیان RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی برای تک تک ژنهای سرکوبگر توموری (*p15*, *p14* و *p16*)، متناسب با حالت متیله یا غیر متیله بودن این ژنها بود. به عبارت دیگر، برای نمونه های توموری که از نظر هر یک از ژنهای سرکوبگر تومور متیله بود، بیانی مشاهده نشد در حالی که نمونه های توموری غیر متیله برای این ژنها، بیان داشتند. همچنین

نتایج حاصل از آزمایش *MSPCR* برای ژن *p14* نشان داد که فقط ۴ نمونه از ۴۴ عدد DNA بیماران، متیله است و تمامی نمونه های غیر توموری (بخش سالم هم جوار تومورها) غیر متیله می باشد (شکل ۲). بدین ترتیب ۹ درصد نمونه ها برای پروموتور ژن *p14* متیله می باشند.

نتایج حاصل از آزمایش *MSPCR* برای ژن *p15* نیز نشان داد که ۱۸ نمونه از DNA بیماران متیله (۴۱ درصد) و ۲۶ عدد از نمونه های توموری بیماران و تمامی نمونه های غیر توموری (بخش سالم هم جوار تومورها) غیر متیله می باشند (شکل ۳). همچنین نتایج آزمایش *MSPCR* برای ژن *p16* نیز نشان داد که ۱۲ عدد از ۴۴ عدد نمونه DNA بیماران متیله بود (۲۷ درصد) در حالی که تمامی نمونه های غیر توموری (بخش سالم هم جوار تومورها) غیر متیله هستند (شکل ۳).

فراوانی وجود متیلاسیون همزمان در ژنهای *p15+p16* و *p14+p15* به ترتیب ۱۳/۶ و ۴/۵ درصد بود در حالی که

تمامی بافتهای نرمال برای تک تک این ژنها بیان نشان دادند زیرا هیچیک از آنها متیله نبودند.



شکل ۳- آزمایش MSPCR با پرایمرهای ژن *p15* بر روی ژل ۱/۵٪ آگارز. از چپ به راست (طول قطعه تکثیر شده با جفت پرایمر متیله، ۱۴۸bp و با جفت پرایمر غیر متیله، ۱۵۴bp می باشد). چاهک ۱: سایز مارکر *Invitrogen*، ۱۲۳bp. چاهک ۲: کنترل منفی برای حالت متیله نمونه های توموری، چاهک ۳: حالت متیله برای یکی از نمونه های توموری بیماران. چاهک ۴: کنترل مثبت برای حالت متیله، چاهک ۵: کنترل منفی برای حالت غیر متیله، چاهک ۶: کنترل مثبت برای حالت غیر متیله، چاهک ۷: حالت غیر متیله برای نمونه توموری یکی از بیماران. چاهک ۸: حالت غیر متیله یکی از نمونه های نرمال بافتی. نمونه های کنترل مثبت جهت انجام این آزمایشها خریداری شده از شرکت *New England Biolab* است.

بحث

در این مطالعه مشاهده شد که درصد متیلاسیون برای ژنهای *P14* و *P15* و *P16* از میان ۴۴ بیمار ایرانی مبتلا به سرطان بافت سنگفرشی مری، به ترتیب ۴۱، ۹ و ۲۷ درصد می باشد. از مقایسه نتایج این تحقیق با مطالعات انجام شده توسط سایر محققین به این نتیجه می توان رسید که کاهش بیان ژنهای *p14* و *p15* در سرطان مری با افزایش تهاجم و متاستاز در ارتباط است، فقدان یا کاهش بیان ژنهای *p14* و *p15* به عنوان یک نتیجه ژنتیکی، در مرحله تهاجم و متاستاز چندین تومور مختلف انسانی مشاهده شده است. از نتایج این تحقیق، عدم وجود متیلاسیون پرموتر ژنهای مورد بررسی در بافتهای سالم مری است ($P < 0.05$). این یافته نشان دهنده این است که مکانیسم متیلاسیون، فقط به تومور اختصاص دارد و مؤید نتایج سایر محققینی است که نشان دادند ارتباطی مثبت بین متیلاسیون *CDKN2A* و نقش آن به عنوان یک بیومارکر با ریسک فاکتورهای سرطان مری وجود دارد. به عنوان مثال *Igaki* در ۱۹۹۴، حذف هموزیگوس *p16* را در ۱۲/۱۳ رده سلولی سرطان مری و ۲/۹ رده سلولی سرطان معده مطالعه کرد (۱۰) و نشان داد حذف ژن *p16* باعث

سرطان مری از جمله بیماریهای بسیار کشنده است و ایران که در منطقه کمربند مرکزی آسیای سرطانی قرار دارد، کشوری است که با ۱۶۵/۵ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر بالاترین میزان وقوع این سرطان را در جهان دارا است (۴). به طور کلی در جهان شایع ترین نوع سرطان مری از نظر هیستولوژیک، نوع ESCC بوده اما در ۱۵ سال اخیر وقوع آدنوکارسینومای مری در کشور های غربی و آمریکا رو به افزایش و در عوض میزان ESCC رو به کاهش است یا در حالت ثابت قرار دارد (۱۹). در ایران، اغلب بیماران سرطانی مربوط به شمال و شمال شرقی می باشند و مطابق تحقیق منتشر شده توسط انستیتو سرطان ایران، شیوع سرطان مری (عمدتاً نوع ESCC) در استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، ۳۱ درصد (اولین سرطان شایع)، مازندران ۱۲/۹ درصد (دومین سرطان شایع) و در استان گیلان ۸/۷ درصد (چهارمین سرطان شایع) بود و در کل در ایران شیوع آدنوکارسینومای مری به فراوانی کشورهای غربی نمی باشد. نسبت مبتلایان به این سرطان از نظر جنسیتی، ۰/۹۲: ۱ زن به مرد گزارش می باشد.

سرطان مری، ممکن است به دلیل افزایش فراوانی متیلاسیون لکوسهای *CDKN2A/p16*، *p14*، در این دسته از کارگران باشد. اگرچه بایستی احتمال درگیر بودن سایر ژنها و نقش آنها (در نتیجه رخدادهای ژنتیکی مانند متیلاسیون) را نیز مورد توجه قرار داد.

ارتباط با اهمیتی بین متیلاسیون *CDKN2A/p16* و *p15* و فاکتور چاقی در *SCCE* گویای ریسک بالای *SCCE* در بیماران چاق ($BMI > 25$) است. از طرف دیگر چاقی به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای سرطان مری در مردان و به ویژه آدنوکارسینومای مری گزارش شده است (۸). از آنجا که نمونه‌های مورد نظر در این آزمایش، همگی *SCCE* است و تاکنون گزارش مشابهی در مقالات دیده نشده است، می‌توان ادعا کرد که این یافته، اولین یافته‌ای است که نشان دهنده ارتباط *BMI* با متیلاسیون *CDKN2A/p16* و *p15* در *SCCE* می‌باشد (۱۷). گزارشهای موجود مبنی بر اختصاصیت افزایش *BMI* به عنوان ریسک فاکتور در سرطانهای کولون، پروستات، مثانه، اندومتریال، و سینه می‌باشد (۲ و ۶)، برخی مطالعات انجام شده بر روی گاستریک کاردیا، ادعا دارد که افزایش *BMI* در ایجاد این سرطان نقشی ندارد. Hampel و همکارانش، ارتباط بین *BMI* و آدنوکارسینومای مری را نشان دادند (۸). ایشان با محاسبه odds ratios مساوی ۹۵٪ CI ۲/۷۸ (1.15-2.0) برای افزایش وزن و (1.85-4.16) برای چاقی، نشان دادند که ارتباط معناداری بین فاکتورهای چاقی و افزایش وزن با آدنوکارسینومای سرطان مری وجود دارد.

از مقایسه نتایج این پروژه با سایر مطالعات مشابه در جهان، مشاهده می‌شود که وضعیت متیلاسیون ژنهای *p14*، *p15* و *p16* در جمعیت ایرانی مورد بررسی در محدوده گزارشات قبلی از شمال چین قرار دارد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً مکانیسمهای مولکولی و عوامل

موتانهای ژن سیکلین *D1* و *p53* می‌شود که به طور مستقل در این رده‌های سلولی اتفاق می‌افتد. در واقع تغییرات ژن *p16* در بیشتر سرطانهای مری نقش دارند و نقش حیاتی را در توسعه این نوع سرطانهای بدخیم بازی می‌کنند (۱۵ و ۱۶).

Serrano در ۲۰۰۰، با آنالیز گاسترینوما از ۴۴ بیمار دارای موتاسیون *CDKN2A*، نتایج آزمایش را با رفتار بیولوژیک توموری، الگوی رشد تومور و قدرت تهاجمی آن مرتبط دانست (۲۲). او با گزارش ۵۲ درصدی هاپر متیلاسیون ناحیه 5'-CpG پروموتور *CDKN2A* در گاسترینوما، نشان داد حضور یا فقدان متیلاسیون ژن *CDKN2A* ارتباطی با علائم کلینیکی این سرطان، رفتار بیولوژیک، حضور یا فقدان فاکتورهای شناخته شده (مانند سائز و موقعیت تومور، متاستاز غده لنفی، و متاستاز کبدی)، یا الگوی رشد این سرطان ندارد. اما متیلاسیون این ژن احتمالاً "مرکزی برای پروسه پاتوژنز مولکولی این تومورهاست.

در مجموع بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر (به ویژه بالا بودن سطح متیلاسیون *p15* در نمونه‌های سرطانی) به نظر می‌رسد در جریان تغییرات (اپی)ژنتیکی ناحیه 9p21 که به ESCC ختم می‌گردند، ژن *p15* می‌تواند یکی از ژنهای هدف باشد و تعیین نقش آن در کارسینوژنز ESCC به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور نیازمند مطالعات جامع‌تری می‌باشد.

ارتباط مثبت بین متیلاسیون ژنهای *CDKN2A/p16*، *p14*، *p27* و ذرات آلاینده شغلی بیماران مبتلا به *SCCE* در مقایسه با بیماران مبتلا به *SCCE* که در معرض ذرات آلاینده شغلی نبودند، می‌تواند نشان دهنده نقش تنظیمی این ژن مهارکننده سرطان در چرخه سلولی در بیماران *SCCE* باشد. مطالعات سایر محققین نیز نقش ذرات آلاینده را به عنوان فاکتوری مهم در اتیولوژی سرطان مری، نشان داده است (۱۲ و ۲۳). با توجه به نتایج حاصله از این بررسی، می‌توان پیشنهاد داد که افزایش خطر توسعه

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولان و پرسنل محترم بیمارستان امام خمینی و تومور بانک ایران که در تهیه نمونه‌های مورد نظر برای این تحقیق، همکاری و مساعدت خوبی داشتند قدردانی نمایند.

اتیولوژیک مشابهی می‌توانند در بروز سرطان ESCC در این دو جمعیت (ایران و چین) نقش داشته باشند.

تشکر و قدردانی:

منابع

- Allen JW, Edeards MJ. 1997. SCCE: a review and update. *Surgerical Oncology*, 6:193-200.
- Bergstrom A, Pisani P, Tenet V, Wolk A. 2001. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*, 91:421-430.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetics memory. *Genes Dev*, 16(6-21).
- Day NE, Munoz N. 1982. *Cancer Epidemiology and Prevention* Schottenfeld, S & Fraumeni, J F Saunders, Philadelphia:596.
- Eads CA, Laird PW. 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nuc Acids Res*, 28:E32.
- Gates E J, Hirschfield L, Matthews R P, Yap O W. 2006. Body mass index as a prognostic factor in endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. *J Natl Med Assoc*, 98:1814-1822.
- Ghavamzadeh A, Mousavi A, Jahani M, Rastegarpanah M. 2001. Esophageal cancer in Iran. *Seminars in On cology*, 28(2):153-157.
- Hampel H, Abraham N S, El-Serag H B. 2005. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med*, 143:199-211.
- Herman JC. 2003. Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349:2042-2054.
- Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, *et al.* 1994. Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 203(1090-1095).
- Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. 2001. The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neurooncol*, 219-229.
- Jansson C, Plato N, Johansson A L, Nyren O, Lagergren J. 2006. Airborne occupational exposures and risk of oesophageal and cardia adenocarcinoma. 63:107-112.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, *et al.* 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264:436-440
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, *et al.* 1994. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet*, 26:23-28.
- Liu L, Lassam NJ, Slingerland JM, Bailey D, *et al.* 1995. Germline p16(INK4A) mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma. *Oncogene*, 11:405-412.
- Liu Q, Yan Y, McClure M, Nakagawa H, *et al.* 1995. MTS-1 (CDKN2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene*, 10:619-622.
- Mohammad Ganji S, Miotto E, Callegari E, Sayehmiri K, *et al.* 2010. Associations of risk factors obesity and occupational airborne exposures with CDKN2A/p16 aberrant DNA methylation in esophageal cancer patients. *Diseases of the Esophagus*.
- Ng H.H. 1999. A. Bird: DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, 9:158-163.
- Pera M. 2001. Recent changes in the epidemiology of esophageal cancer. *Surgerical Oncology*, 10:81-90.
- Quelle DE, Ashmun RA, Hannon GJ, *et al.* 1995. Cloning and characterization of murine p16(INK4a) and p15(INK4b) genes. *Oncogene*, 11:635-645.
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 83:993-1000.
- Serrano J, Goebel SU, Peghini PL, *et al.* 2000. Alterations in the p16INK4a/CDKN2A tumor

- suppressor gene in gastrinomas. *J Clin Endocr Metab*, 85:4146-4156.
23. Thuret A, Geoffroy-Perez B, Luce D. 2007. Goldberg M: A 26-year cohort mortality study of French construction workers aged 20-64 years. *J Occup Environ Med*:546-556.
24. Zolota V, Tsamandas AC, Aroukatos P, Panagiopoulou V, *et al.* 2008. Expression of cell cycle inhibitors p21, p27, p14 and p16 in gliomas. Correlation with classic prognostic factors and patients' outcome. *Neuropathology*, 28:35-42.

Investigation of the aberrant DNA methylation of p14, p15, p16 genes in patients with ESCC in Iran

Mohammad Ganji Sh., mahboudi S. and Rastgar-Jazii F.

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Studies have shown that aberrant methylation of the tumor suppressor genes could be lead to silencing and reducing of their gene expression, consequently occurring the cancer. The aim of this study was investigation of the aberrant DNA methylation of p14, p15, p16 genes in Iranian patients with Esophageal Squamous cell carcinoma (ESCC) and its association with demographic and pathological characteristics. Therefore we extracted the DNAs and RNAs of 44 tumor tissues and 19 normal tissues from 44 unrelated Iranian patients with ESCC. The methylation specific PCR (MSPCR) was performed for both methylated and unmethylated status of these genes and the expression of these genes have done with RT-PCR. The results showed the 53%, 9% and 27% methylation for the p14, p15 and p16 genes respectively in the tumor tissues and no methylation frequency in none of the normal sample. Regarding the gene expression, there was an inverse relationship between methylation status and gene expression ($p < 0.05$). The frequency of methylation of p15 and p14 in tumor samples was 41%, 9% respectively and abundance of methylation the p15+p16 and p14+p15, was 6/13%, and 5/4%, respectively, while the frequency of methylation in p14+p16 genes was observed 9% ($P = 0.0036$). It means that all patients which are methylated for the p14 had the methylation in p16 too while in most patients with p15 methylated, the p14 or p16 methylation was not found. Comparing these results with other reports shows a similarity between the Iranian population and Chinese population (North of China) maybe because of a similar molecular mechanisms and etiology of ESCC cancer in these populations.

Key words: methylation, p14, p15, p16, Esophageal Squamous cell carcinoma (ESCC)