Original Article

Investigation of the *E-cadherin* Promoter Methylation in Patients with Colorectal Cancer in Iran

Shahla Mohammad Ganji[1*], Elham Samei[2], Ahmad Hashemi[3], Amir Rezagholizadeh[4], Anooshirvan Kazemnejad[5], Zahra Mostakhdemin Hosseini[6]

1- Assistant Professor, Department of Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2- M.Sc., Department of Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3- M.Sc. Student, Department of Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
4- M.Sc. Student, Department of Biology, Islamic Azad University, East Tehran branch, Tehran, Iran
5- Professor, Department of Biostatistics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
6- Assistant Professor, Iran Tumor bank, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1417863171, Department of Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Shahrak-e Pajoohesh, km 15 Tehran- Karaj Highway, Tehran, Iran*
Email: shahlamg@yahoo.com

Received: 15/Sep/2013, Accepted: 15/Nov/2013

Abstract

Objective: *E-cadherin* is widely down-regulated and tightly associated with tumor invasion and metastasis in multiple human cancer types. Recent studies have shown that aberrant methylation of the *E-cadherin* gene promoter contributes to its silencing. However, information regarding epigenetic inactivation of *E-cadherin* in colorectal cancer is insufficient. Herein, we correlate association of the methylation of the *E-Cadherin* promoter with pathological features of colorectal cancer as well as history and demographic data.

Methods: We used methylation specific polymerase chain reaction (MSPCR) to examine methylation status of the 5' CpG island of *E-cadherin* along with its expression by using RT-PCR following surgical resection of 66 unrelated patients with colorectal cancer.

Results: Results showed that 35 out of 66 tumor DNA samples (53%) showed aberrant methylations. In contrast, all normal tissues were unmethylated.

Conclusion: The obtained results show a similarity with the Japanese (54.5%) and Greek (55.7%) populations. The results have confirmed methylation of this gene in sporadic colorectal cancer cases (40.8%) in the Iranian population by researchers in Shiraz. These data suggest that epigenetic silencing via aberrant methylation of the *E-cadherin* promoter plays a critical role in the inactivation of this tumor suppressor gene in colorectal cancer.

Keywords: E-cadherin promoter, Methylation, Epigenetic, Colorectal cancer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 2, Summer 2013, Pages: 75-83

مقاله اصیل

بررسی مولکولی متیلاسیون پروموتور ژن E– کادهرین در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان روده بزرگ

شهلا محمدگنجی[1*]، الهام سامعی[2]، سیداحمدهاشمی[3]، امیررضا قلی‌زاده[4]، انوشیروان کاظم‌نژاد[5]، زهرا مستخدمین حسینی[6]

۱- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی زیست فناوری مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، پژوهشکده بیوتکنولوژی زیست فناوری مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشکده بیوتکنولوژی زیست فناوری مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران
۵-استاد، گروه آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۶- استادیار، تومور بانک ایران، انستیتو کنسر، بیمارستان امام خمینی، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۸۶۳۱۷۱، کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
Email: shahlamg@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۲/۰۶/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۸/۲۵

چکیده

هدف: مطالعات نشان می‌دهد متیلاسیون نابجای پروموتر ژن E- کادهرین باعث خاموش شدن این ژن و در نتیجه کاهش بیان آن می‌شود. ارتباط کاهش میزان بیان این ژن در سرطان‌های مختلف انسانی مشاهده شده است که با مرحله هجوم تومور و متاستاز آن نیز ارتباط دارد. در این راستا این مطالعه با هدف بررسی رابطه بین متیلاسیون پروموتر E- کادهرین در مبتلایان سرطان روده بزرگ و خصوصیات پاتولوژیکی آن‌ها طرح‌ریزی شد. هرچند که اطلاعات موجود در خصوص پدیده اپی ژنتیک غیرفعال شدن این ژن در سرطان روده بزرگ هنوز کافی نیست.

مواد و روش‌ها: به این منظور از ٦٦ بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ که رابطه فامیلی نداشتند، نمونه بافت توموری و نمونه سالم (مجاور تومور) تهیه شد. سپس برای حالت‌های متیله و غیر متیله ژن E- کادهرین آغازگر اختصاصی طراحی شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ویژه متیلاسیون انجام شد. بیان این ژن در بافت‌ها نیز توسط آزمایش RT-PCR بررسی شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ و آزمون‌های T و Fisher Exact Test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که ۳۵ تا از ٦٦ نمونه توموری دارای متیلاسیون ژن E- کادهرین بودند (۵۳ درصد) و در هیچ یک از نمونه‌های سالم (مجاور تومور) متیلاسیونی مشاهده نشد. همچنین مشاهده شد میزان بیان این ژن با میزان متیلاسیون نسبت عکس دارد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به دلیل اهمیت نقش اپی‌ژنتیک در ایجاد سرطان به‌ویژه سرطان روده بزرگ که متأسفانه در جامعه ما شیوع بالایی دارد، به نظر می‌آید که مهم‌ترین کار برای انجام استراتژی‌های کارآمد در پیش‌بینی، تشخیص، درمان، پیگیری سرطان روده بزرگ، در دسترس بودن نشانگرهای مولکولی مناسب مانند E- کادهرین است.

کلیدواژگان: پروموتر ژن E- کادهرین، متیلاسیون، اپی‌ژنتیک، سرطان روده بزرگ

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات: ۷۵-۸۳۰

مقدمه

سرطان روده بزرگ (Colorectal Cancer)، سومین سرطان رایج و چهارمین دلیل مرگ و میر در جهان است. سالانه حدود ٤٠٠٠٠٠ نفر در دنیا به علت ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. شیوع این سرطان بیش از ۹ درصد تمام انواع سرطان‌ها است. در سطح جهان سرطان روده بزرگ ۹/٤ درصد از میزان بروز سرطان در مردها و ۱۰/۱ درصد از این میزان را در زن‌ها شامل می‌شود. شیوع این بیماری در جهان یکنواخت نیست طوری که در ایالات متحده آمریکا، استرالیا، نیوزیلند و اروپای غربی بیش از ٤٠ نفر در ۱۰۰۰۰۰ نفر و در آفریقا و بخش‌هایی از آسیا کمتر از ۵ نفر از ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا هستند. متأسفانه در ایران وضعیت بسیار نگران کننده است و شیوع بیشتری نسبت به میانگین جهانی دیده می‌شود به‌طوری که در جمعیت ایرانی ١٦٠ نفر به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا به این سرطان هستند. سرطان روده بزرگ در ایران، پس از سرطان‌های معده، مثانه و پروستات در مردان، چهارمین سرطان بوده و در زنان بعد از سرطان سینه، دومین سرطان محسوب می‌شود و هر سال حدود ٤٠٠٠ مورد جدید با مرگ و میر سالانه ۱۱۵۰ رخ می‌دهد. میزان بقای یک سال و پنج سال برای زنان به‌ترتیب برابر با ۸۸ درصد و ٤٥ درصد بوده در حالی که این مقادیر برای مردان به‌ترتیب برابر با ٨٦ و ۳۹ درصد است. میانگین بقای کل برای سرطان روده بزرگ در ایران ۳/۵ سال برآورد شده است. بدترین وضعیت بقا برای بیماران جوان‌تر از ۲۰ سال و بیماران مسن‌تر از ۸۰ سال دیده شده است. در مطالعات انجام شده طی سال‌های ۲۰۰۰ و ۲۰۰۵، میزان بقای سرطان روده بزرگ در ایران ٤١ درصد به‌دست آمد که قابل مقایسه با بعضی از کشورهای پیشرفته است [۱]. بنابراین سرطان روده بزرگ یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها محسوب می‌شود. فقدان علایم زودرس اولیه سبب می‌شود تا در زمان تشخیص، بیماری در مراحل پیشرفته باشد.

ژن E- کادهرین یک گلیکوپروتئین عرض غشایی است که روی سطح سلول‌های پوششی (Epithelial Cells) بیان می‌شود. در بافت‌های پوششی، نقش میانجی‌گری E- کادهرین باعث چسبندگی بین سلولی وابسته به کلسیم، هموفیلیک و در نهایت نگهداری ساختار سالم بافت می‌شود. دومین (Domain) سیتوپلاسمی E کادهرین، از طریق کاتنین آلفا (alpha Catenin) و بتا (beta Catenin) به اکتین موجود در اسکلت سلولی متصل می‌شود که این واکنش برای عملکردش ضروری است [۲]. کاهش میزان بیان E- کادهرین در مراحل بالاتر و پیشرفته بیشتر کارسینوما (Carcinoma) مشاهده شده است که آن را با القای EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) در طول تهاجم کارسینوما مرتبط می‌دانند. که مکرراً در طول تهاجم کارسینوما رخ می‌دهد [۳]. EMT شامل تبدیل یک سلول پوششی به یک سلول مزانشیمال (Mesenchymal Cells) است که به‌وسیله یک فنوتیپ متهاجم‌تر و جنبنده‌تر مشخص می‌شود و در واقع یکی از تغییراتی است که در طول فرآیند متاستاز (Metastasis) رخ می‌دهد. این تغییرات به بسیاری از سلول‌های تومور اجازه مهاجرت از ماتریکس خارج سلولی را می‌دهد و در اولین مراحل فرآیند متاستاز از طریق رگ‌های خونی و لنف مهاجرت می‌کنند. نتایج تمامی مشاهدات از جمله اطلاعات حاصل از سیستم‌های مدلینگ، از این ایده اولیه که E- کادهرین می‌تواند به عنوان یک ژن مهار کننده تهاجم لحاظ شود، حمایت می‌کند [٤]. تصور می‌شود غیر فعال‌سازی یا کاهش عملکرد E- کادهرین (مولکول اصلی چسبندگی سلولی در سلول‌های پوششی)، یک مرحله مهم در گسترش تومور و متاستاز است. بنابراین در سال‌های اخیر تلاش‌هایی برای درک تنظیم بیان و عملکرد E- کادهرین شده است. چندین مکانیسم در تنظیم بیان E- کادهرین درگیر است که شامل ژنتیک، اپی‌ژنتیک (Epigenetics) و تغییرات رونویسی است اگرچه تصویر کاملی از چگونگی تنظیم این مولکول هنوز کاملاً روشن نشده است.

یکی از دیدگاه‌های مورد توجه در تشخیص سرطان، مطالعه فرآیندهای بیوشیمیایی و مولکولی است. به دلیل وجود رابطه نزدیک بین تولید مثل سلول‌ها و سرطان و با توجه به این

نکته که غیرفعال شدن ژن‌های مهار کننده سرطان‌زایی (Tumor Genes Suppressor) نقش مهمی در شناخت سبب‌شناسی (Ethiology)، مکانیسم مولکولی سرطان‌ها و دست‌یابی به نشانگرهای مولکولی دارد؛ بنابراین در این مقاله با هدف بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی سرطان روده بزرگ، هایپرمتیلاسیون (Hypermethylation) پروموتر ژن E- کادهرین در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان روده بزرگ مطالعه شد. در واقع بررسی هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن E- کادهرین که به طور طبیعی نقش ضد تهاجمی دارد و در اکثر سرطان‌ها از جمله سرطان روده بزرگ این نقش به سبب هایپرمتیلاسیون از بین رفته یا کم رنگ شده است، از اهداف انجام این پروژه تحقیقی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ابتدا جامعه آماری مورد نظر و حجم نمونه با توجه به عواملی چون شیوع سرطان روده بزرگ در ایران [۱]، مطالعات انجام شده قبلی توسط سایر محققین روی این ژن و نتایج به‌دست آمده، در نظر گرفتن خطاهای نوع اول و دوم، تعداد ٦٦ نمونه توموری و ۳۰ عدد نمونه سالم تعیین شد. این تعداد نمونه از میان بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی و بانک تومور ایران تهیه شد. همراه با نمونه‌های بافتی، اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی و آسیب‌شناسی (Pathology) بیماران مبتلایان به سرطان روده بزرگ از تومور بانک ایران به‌دست آمد. بافت‌ها به‌صورت تازه و در شرایط ازت مایع به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل شد. همچنین به منظور رعایت قوانین اخلاق زیستی، قبل از نمونه‌گیری از تمامی بیمارانی که مایل به شرکت در این پروژه تحقیقاتی بودند، رضایت‌نامه‌ای گرفته شد. در نهایت در طول سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱، تعداد ٦٦ نمونه بافت توموری تازه از بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ و ۳۰ نمونه سالم (بافت مجاور تومور) از همان بیماران به‌دست آمد. سپس اطلاعات حاصل از بیماران و نمونه‌ها مورد بررسی دقیق قرار گرفت و تعدادی از نمونه‌های بیماران که حتی دارای یکی از شرایط زیر بودند از مطالعه خارج شدند: اگر محل اولیه سرطان نامشخص بود، اگر بیمار علاوه بر روده بزرگ به نوع دیگری از سرطان مبتلا بود، اگر از نظر بافت شناختی (Histopathological) برای تومور، تشخیصی غیر از کولورکتال تأیید شده بود، اگر اطلاعات دقیقی در مورد تاریخچه یا گزارش‌های آسیب‌شناسی بیماران در دسترس نبود و در صورتی که بیماران با هم نسبت فامیلی داشتند.

استخراج DNA از تمامی نمونه‌های بافتی به روش فنل- کلروفرم انجام شد. سپس DNA ها توسط کیت EZDNA Methylation-GoldTM Kit (ZymoResearch، آمریکا) مورد تیمار با بی‌سولفیت سدیم قرار گرفت. آغازگر (Primer) اختصاصی برای حالت‌های متیله و غیرمتیله ژن E- کادهرین طراحی شده مطالعه قبلی همین گروه استفاده شد که توالی آن‌ها به شرح زیر است:

E.cad-meth-F:
5´-TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3´
E.cad-meth-R:
5´-TAACTAAAAATTCACCTACCGAC-3´
E.cad-Un meth-F:
5´-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTG-3´
E.cad-Un meth-R:
5´-CACAACCAATCAACAACACA-3´.

آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ویژه متیلاسیون (Methylation Specific PCR: MSP) برای ژن فوق به شرح زیر انجام شد. ابتدا مواد زیر در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر به میکروتیوب اضافه شد: ۱ میلی‌مول dNTPs (Fermentase، کانادا)، ۰/۲ میکرومول آغازگرهای اختصاصی، ۱۰۰ نانوگرم DNA تیمار شده، ۰/۵ *Taq* polymerase U/µL (Hot start) (Qiagen، آمریکا).

سپس میکروتیوب‌های بالا در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه به‌صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) ۵۳ درجه سانتی‌گراد و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای هر دما و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در دستگاه ترموسیکلر مدل

PeQLab, 96 universal gradient, UK thermal cycler. قرار داده شدند. نمونه کنترل مثبت نیز از شرکت New England Biolab (انگلستان) خریداری شد. پس از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، مشاهده باند با طول ۱۲۰ جفت‌باز نشانه وجود متیله بودن پروموتر ژن E- کادهرین و وجود باند با طول ۱۳۰ جفت‌باز نشانه عدم متیله بودن در نظر گرفته شد.

در مرحله بعد استخراج RNA از بافت‌های سرطانی و سالم (بافت مجاور تومور) به کمک کیت استخراج RNA شرکت Intron (کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل آن انجام شد. در ادامه سنتز cDNA به کمک کیت Intron و مطابق دستور کار مربوط انجام گرفت.

بیان ژن E- کادهرین با آزمایش RT-PCR بررسی شد. ژن بتا- اکتین (β-actin) نیز به عنوان استاندارد داخلی و ژن خانه‌دار (House Keeping) مورد آزمایش RT-PCR قرار گرفت. دمای اتصال (Annealing) برای این مرحله آزمایش ۵۳ درجه سانتی‌گراد و طول قطعه مورد نظر ۱۷٤ جفت‌باز بود.

نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده بالا و داده‌های به‌دست آمده از پرونده بیماران شامل اطلاعات دموگرافی، بالینی و آسیب‌شناختی (Pathologic) آن‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ بررسی شد. از آزمون‌های Fisher Exact test و X^2 و آزمون t (t-test)، برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد و در صورتی که P<۰/۰۵ بود، نتایج از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آماری حاصل از اطلاعات دموگرافی و پرونده پاتولوژی بیماران

در بررسی حاضر ٦٦ نمونه بافت توموری و ۳۰ نمونه بافت سالم (بافت مجاور تومور) مورد مطالعه مربوط به ٦٦ بیمار غیر خویشاوند مبتلا به سرطان روده بزرگ مراجعه کننده به بیمارستان بود. این بیماران شامل ۳۰ نفر زن و ۳٦ نفر مرد با میانگین سنی ٤۸/۸۳ سال و طیف سنی ۱٦ تا ۷٤ سال بودند که در این مطالعه شرکت داشتند (جدول ۱). از نظر بافت‌شناسی (Histology)، ٥٦ تا از نمونه‌ها آدنوکارسینوما (Adenocarcinoma) و ۸ نمونه موسینوس [Mucinous (Colloid)] بود. نتایج پاتولوژی که از بیمارستان امام خمینی و تومور بانک ایران به‌دست آمد و براساس سیستم TNM (Tumor Node Metastasis) و توسط پاتولوژیست تأیید شده بود نشان داد که از نظر اندازه اولیه تومور و مهاجرت آن به بافت‌های مجاور، ۱۹ تا از نمونه‌ها T1، ۲٦ تا از نمونه‌ها T2، ۱۷ نمونه T3، ۲ نمونه T4 و ۲ نمونه نیز TX (ناشناخته) بود. همچنین از نظر درگیر شدن گره‌های لنفی ۳۰ نمونه N0، ۲۰ نمونه N1 و ۱٦ نمونه در مرحله N2 بود. از نظر متاستاز هم ۲۰ عدد از نمونه‌ها دارای متاستاز (M1) و ٤٤ نمونه غیر متاستاز (M0) بود و در ۲ نمونه هم متاستاز شناسایی نشده بود (MX) (جدول ۱).

از نظر درجه تمایزی (Grade Differentiation)، ۱۸ عدد از نمونه‌ها مرحله یک (Stage I)، ۱٦ عدد مرحله دو (Stage II)، ۳۰ عدد از نمونه‌ها مرحله سوم (Stage III) و ۲ نمونه از نظر مرحله توموری نامشخص (Stage X) بود.

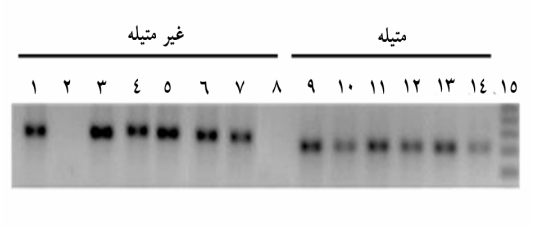
نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی

نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی نشان داد که ۳۵ تا از ٦٦ نمونه توموری دارای متیلاسیون ژن E- کادهرین بودند (۵۳ درصد) و در هیچ‌یک از نمونه‌های سالم (مجاور تومور) متیلاسیونی مشاهده نشد (شکل ۱). همچنین مشاهده شد که میزان بیان این ژن با میزان متیلاسیون نسبت عکس دارد (P<۰/۰۵) (شکل ۲ الف و ب) . نتایج به‌دست آمده تا حدودی با نتایج بررسی سایر محققین در جمعیت‌های ژاپنی (٥٤/٥ درصد) و یونانی (٥٥/۷ درصد) مشابهت دارد. همچنین نتایج

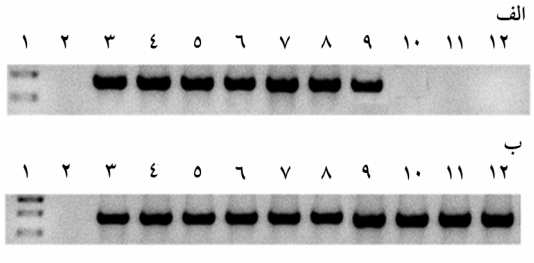
حاصل تأییدی بر مطالعه متیلاسیون این ژن روی جمعیت ایرانی مبتلا به سرطان روده بزرگ اسپورادیک (Sporadic Colorectal Cancer) توسط محققین دانشگاه شیراز (۴۰/۸ درصد) است [۵]. خلاصه‌ای از نتایج ارزشمند کسب شده در خصوص بررسی متیلاسیون E- کادهرین در جمعیت‌های مختلف دنیا که شامل نوع مطالعه، درصد متیلاسیون ژن E- کادهرین، نوع بافت، نوع جمعیت و منابع مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. بیشترین فراوانی مشاهده شده از متیلاسیون سرطان روده بزرگ مربوط به اسپانیا (۷۱/۴ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به کره جنوبی (۲۸ درصد) است.

جدول ۱ اطلاعات دموگرافی و آسیب‌شناسی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ که در این مطالعه مورد بررسی متیلاسیون پروموتر ژن E- کادهرین قرار گرفته‌اند.

سن (برحسب سال) (میانگین ± انحراف استاندارد)	< ۶۰ سال	۲۷ (۴۱ درصد)
	≥ ۶۰ سال	۳۹ (۵۹ درصد)
جنس	مرد	۳۰ (۴۵/۴ درصد)
	زن	۳۶ (۵۴/۶ درصد)
موقعیت	دور	۵۰ (۷۵/۷ درصد)
	نزدیک	۱۶ (۲۴/۳ درصد)
درجه تمایزی	I	۱۸ (۲۷/۳ درصد)
	II	۱۶ (۲۴/۲ درصد)
	III	۳۰ (۴۵/۵ درصد)
	ناشناخته	۲ (۳ درصد)
مرحله توموری (T)	T1	۱۹ (۲۸/۸ درصد)
	T2	۲۶ (۳۹/۴ درصد)
	T3	۱۷ (۲۵/۸ درصد)
	T4	۲ (۳ درصد)
	ناشناخته	۲ (۳ درصد)
تهاجم به غدد لنفی	N0	۳۰ (۴۵/۵ درصد).
	N1	۲۰ (۳۰/۳ درصد)
	NX	۱۶ (۲۴/۲ درصد)
متاستاز	M0	۲۰ (۳۰/۳ درصد)
	M1	۴۴ (۶۶/۷ درصد)
	MX	۲ (۳ درصد)



شکل ۱ بررسی متیلاسیون پروموتر ژن E- کادهرین با آزمایش MSP و آغازگرهای اختصاصی حالت‌های متیله و غیر متیله ژن E- کادهرین برای نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ روی آگارز ۱/۵ درصد؛ از DNA تیمار شده بیماران برای این آزمایش استفاده شد. چاهک ۱) کنترل مثبت برای حالت غیر متیله ژن E- کادهرین، چاهک ۲) کنترل منفی برای حالت غیر متیله ژن E- کادهرین، چاهک‌های ۳ تا ۷) پنج تا از نمونه‌های بافتی که برای پروموتر ژن E- کادهرین غیر متیله هستند (نمونه‌های ۸، ۴، ۱۲ و ۱۰). چاهک ۸) کنترل منفی برای حالت متیله ژن E- کادهرین، چاهک ۹) کنترل مثبت برای حالت متیله ژن E- کادهرین، چاهک‌های ۱۰ تا ۱۴) پنج تا از نمونه‌های بافتی که برای پروموتر ژن E- کادهرین متیله هستند (نمونه‌های ۳، ۲۴، ۲۷، ۴۰ و ۴۲). چاهک ۱۵) اندازه نشانگر مولکولی (Ladder ۱۲۳ جفت‌بازی)



شکل ۲ بررسی بیان ژن E- کادهرین با آزمایش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های E- کادهرین و بتا- اکتین برای نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ روی آگارز ۱/۵ درصد؛ **(الف)** چاهک ۱) اندازه نشانگر مولکولی (Ladder ۱۲۳ جفت‌بازی)، چاهک ۲) کنترل منفی برای بیان ژن E- کادهرین، چاهک ۳) کنترل مثبت برای بیان ژن E- کادهرین، چاهک‌های ۴ تا ۹) چند نمونه که برای ژن E- کادهرین دارای بیان بودند شامل سه نمونه غیرمتیله برای این ژن (نمونه‌های ۱، ۴ و ۱۰) و دو نمونه بافت سالم (نمونه‌های ۳ و ۲۴)، **(ب)** چاهک ۱) اندازه نشانگر مولکولی (Ladder ۱۲۳ جفت‌بازی)، چاهک ۲) کنترل منفی برای بیان ژن بتا- اکتین، چاهک ۳) کنترل مثبت برای بیان ژن بتا- اکتین، چاهک‌های ۴ تا ۸) چند نمونه که برای ژن بتا- اکتین دارای بیان بودند شامل سه نمونه غیر متیله برای ژن E- کادهرین (نمونه‌های ۱، ۴ و ۱۰) و دو نمونه بافت سالم (نمونه‌های ۳ و ۲۴)، چاهک‌های ۱۰ تا ۱۲) بررسی بیان ژن بتا- اکتین برای سه نمونه بافتی متیله برای ژن E- کادهرین (نمونه‌های ۳، ۲۴ و ۲۷)، بافت سالم به عنوان کنترل مثبت و ژن بتا- اکتین به عنوان کنترل داخلی در این آزمایش استفاده شد.

جدول ۲ فراوانی متیلاسیون پروموتر ژن E- کادهرین در سرطان روده بزرگ در سایر جمعیت‌ها

درصد متیلاسیون (تعداد)	نوع سرطان	جمعیت	مرجع
۲۸/٦ درصد (۱۲/٤۲)	CRC	سوریایا، اندونزی	[٦]
۲۸ درصد(۲۸/۱۰۰)	CRC	بوسان، کره	[۷]
٥٤/٥ درصد (۱۲/۲۲)	Por& Muc	توکیو، ژاپن	[۸]
٤۳/۹ درصد (٦٦/۱٤۹)	CRC	سئول، کره	[۹]
٥٥/۷ درصد (۳٤/٦۱)	SCRC	آتن، یونان	[۱۰]
۳۹/٦ درصد (۲۱/٥۳)	CRC	اسلو، نروژ	[۱۱]
٤٦/٦ درصد (۳٤/۷۳)	CRC	اسفکس، تونس	[۱۲]
٥/۹ درصد (۱۱/۱۸٥)	SCRC	تایپه، تایوان	[۱۳]
۷۱/٤ درصد (۱٥/۲۱)	CRC	بادالونا، اسپانیا	[۱٤]
٤٦ درصد (۱۳/۲۸)	SCRC/UCACRC	آکسفورد، امریکا	[۱٥]
٤۳/٦ درصد (۸۸/۲۰۲)	CRC	میلان، ایتالیا	[۱٦]

CRC: Colorectal Cancer؛ SCRC: Sporadic Colorectal Cancer؛ Por & Muc: Poorly differentiated adenocarcinoma and Mucinous carcinoma of the colon and rectum؛ UCACRC: Ulcerative Colitis Associated Colorectal Cancer؛ BC: Breast Cancer؛ OSCC: Oral Squamous Cell Carcinoma

بحث

اپی‌ژنتیک یکی از تغییرات قابل توارث و برگشت‌پذیر در بیان ژن است در حالی که در توالی DNA تغییری ایجاد نمی‌کند. یکی از مکانیسم‌های مولکولی اپی‌ژنتیک، متیلاسیون DNA است. افزایش متیلاسیون باعث مهار ژن‌ها و ناپایداری ژنومی شده و کاهش آن باعث فعال شدن ژن‌ها و افزایش نرخ جهش می‌شود. معمولاً کربن شماره ٥ ستیوزین‌های موجود در دی‌نوکلئوتید CpG و سیتوزین رشته مکمل آن در ژنوم مهره‌داران متیله می‌شوند (متیلاسیون متقارن) و این دو سیتوزین متیله در ساختار سه بعدی در شیار بزرگ مارپیچ DNA قرار می‌گیرند. الگوی متیلاسیون ژنومی در سلول‌های سوماتیک (Somatic Cells)، پایدار و قابل توارث است و تغییر الگوی متیلاسیون که در بسیاری از انواع سرطان‌ها رخ می‌دهد، سبب مهار بیان ژن‌ها و ناپایداری کل ژنوم می‌شود [۱۷].

کاهش بیان E- کادهرین در سرطان روده بزرگ با افزایش تهاجم و متاستاز در ارتباط است، در حالی که جهش‌های E- کادهرین یک اتفاق نادر است. در حالی که عدم بیان و هایپرمتیلاسیون E- کادهرین به طور متناوب دیده می‌شود، جهش‌ها در اغلب تومورها رواج کمتری دارد و در تعداد کمی از تومورهای به‌خصوص دیده می‌شود [٤].

فقدان یا کاهش بیان E- کادهرین به عنوان یک نتیجه ژنتیکی و مرتبط با تغییرات اپی‌ژنتیک، در مرحله تهاجم و متاستاز چندین تومور مختلف انسانی مشاهده شده است.

در مطالعه حاضر نیز ٥۳ درصد متیلاسیون پروموتر ژن E- کادهرین در مبتلایان سرطان روده بزرگ مشاهده شد. از طرفی مطالعات نشان می‌دهد فراوانی متیلاسیون ژن E- کادهرین در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ در سایر کشورها، در طیفی از ۲۸ درصد تا ۷۱/٤ درصد [٦، ۹، ۱٤] مشاهده می‌شود.

در زمینه بررسی متیلاسیون E- کادهرین در جمعیت ایرانی و توسط محققین ایرانی، تاکنون سه مطالعه مشابه در سرطان‌های اسپورادیک روده بزرگ، پستان و کارسینومای سلول‌های سنگفرشی بافت دهان (Oral Squamous Cell Carcinoma) منتشر شده است که در زیر به آن‌ها اشاره می‌شود.

بررسی متیلاسون ژن CDH1 در مبتلایان به سرطان روده بزرگ نوع اسپورادیک در شیراز نشان داد ۲۰ تا از ٤۹ نمونه بافتی بیماران برای این ژن متیله است (٤۰/۸ درصد) [٥]. نتیجه گروه تحقیقی مطالعه کننده متیلاسیون ژن E- کادهرین روی بیماران مبتلا به سرطان پستان در بیماران تبریزی نشان داد که ۹٤ درصد متیلاسیون در پروموتر این ژن دیده می‌شود و در واقع در ٤۷ نمونه بافتی از ٥۰ نمونه، متیلاسیون ژن E- کادهرین را مشاهده کردند [۱۸]. کردی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کارسینومای سلول‌های سنگفرشی بافت دهان در زاهدان نشان دادند که ٦۱/۸ درصد نمونه‌های توموری (٤٤ تا از ۷٦ نمونه) دارای متیلاسیون برای ژن E- کادهرین است [۱۹].

به دلیل اهمیت بررسی متیلاسیون پروموتر ژن E- کادهرین

به عنوان یک عامل مهم اپی‌ژنتیکی در ایجاد سرطان، پیشنهاد می‌شود مطالعات مشابه روی سایر انواع سرطان و با تعداد نمونه بیشتر انجام شود.

به دلیل اهمیت نقش اپی‌ژنتیک در ایجاد سرطان به‌ویژه سرطان روده بزرگ که متأسفانه در جامعه ما شیوع بالایی دارد، به نظر می‌آید که مهم‌ترین کار برای انجام استراتژی‌های کارآمد در پیش‌بینی، تشخیص، درمان، پیگیری سرطان روده بزرگ، در دسترس بودن نشانگرهای مولکولی مناسب مانند E- کادهرین است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه پرسنل و پزشکان محترم بانک تومور ایران، بابت در اختیار گذاردن نمونه‌ها و تمامی اطلاعات بالینی و آسیب‌شناسی مربوط به بیماران، قدردانی نمایند.

منابع

[1] Moradi A, Khayamzadeh M, Guya M, Mirzaei HR, Salmanian R, Rakhsha A, Akbari ME. Survival of colorectal cancer in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2009; 10(4): 583-6.

[2] Ling ZQ, Li P, Ge MH, Zhao X, Hu FJ, Fang XH, Dong ZM, Mao WM. Hypermethylation modulated down-regulation of CDH1 expression contributes to the progression of esophageal cancer. Int J Mol Med 2011; 27(5): 625-35.

[3] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2002; 2(6): 442-54.

[4] Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim Biophys Acta 1994; 1198(1): 11-26.

[5] Naghibalhossaini F, Hosseini HM, Mokarram P, Zamani M. High frequency of genes' promoter methylation, but lack of BRAF V600E mutation among Iranian colorectal cancer patients. Pathol Oncol Res 2011; 17(4): 819-25.

[6] Darwanto A, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. MeCP2 and promoter methylation cooperatively regulate E-cadherin gene expression in colorectal carcinoma. Cancer Sci 2003; 94(5): 442-7.

[7] Kang HJ, Kim EJ, Kim BG, You CH, Lee SY, Kim DI, Hong YS. Quantitative analysis of cancer-associated gene methylation connected to risk factors in Korean colorectal cancer patients. J Prev Med Public Health 2012; 45(4): 251-8.

[8] Kanazawa T, Watanabe T, Kazama S, Tada T, Koketsu S, Nagawa H. Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. Int J Cancer 2002; 102(3): 225-9.

[9] Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. Lab Invest 2004; 84(7): 884-93.

[10] Garinis GA, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulos K, Karavitis G, Parassi I, Christeli E, Patrinos GP, Manolis EN, Peros G. Hypermethylation-associated transcriptional

silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. J Pathol 2002; 198(4): 442-9.

[11] Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. Mol Cancer 2004; 3: 28.

[12] Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Damak R, Ayadi L, Khabir A, Frikha F, Kallel L, Amouri A, Frikha M, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Hyper-methylation of RARβ2 correlates with high COX-2 expression and poor prognosis in patients with colorectal carcinoma. Tumour Biol 2010; 31(5): 503-11.

[13] Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chiou HY, Chang JG. Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. Oncol Rep 2004; 11(2): 341-8.

[14] Ramírez N, Bandrés E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I, Martínez-Rodenas F, Zárate R, Bitarte N, Monzó M, García-Foncillas J. Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. Eur J Cancer 2008; 44(17): 2689-95.

[15] Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF. Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. Gut 2001; 48(3): 367-71

[16] Miranda E, Destro A, Malesci A, Balladore E, Bianchi P, Baryshnikova E, Franchi G, Morenghi E, Laghi L, Gennari L, Roncalli M. Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. Br J Cancer 2006; 95(8): 1101-7.

[17] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 2002; 16(1): 6-21.

[18] Shargh SA, Sakizli M, Farajnia S, Montazer-Saheb S. Evaluation of methylation pattern in promoter region of E-cadherin gene and its relation to tumor grade and stage in breast cancer. Afr J Biotechnol 2011; 10(10): 1745-51.

[19] Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Roodi AK, Rigi-Ladiz MA, Hashemi M, Birjandian E, Torkamanzehi A. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. Arch Oral Biol 2010; 55(10): 809-14.