متیلاسیون پروموتور ژن GSTP1 در سرطان کلورکتال

حمید نعمانی[۱*]؛ نغمه ژاله‌جو[۱]؛ بهرام یغمایی[۲]؛ شاهرخ محمدزاده قبادلو[۲]؛ علی‌اصغر کشاورز[۳]؛ بابک ایزدی[۴]

چکیده

زمینه: *عدم رونویسی از ژن‌های سرکوب‌گر تومور و وابسته به تومور از جمله GSTP1 به‌واسطه متیلاسیون نواحی پروموتور حاوی CpG island، به‌عنوان مکانیسم مهم در طی سرطانی شدن مطرح می‌باشد. ژن GSTP1، آنزیم گلوتاتیون S – ترانسفراز Pi را کد می‌کند که در دفاع سلولی در مقابل آسیب اکسیداتیو و کارسینوژن‌های الکتروفیلی نقش دارد.*

روش‌ها: *در این تحقیق، برای دستیابی به بینشی در مورد نقش خاموشی اپی‌ژنتیکی GSTP1 در سرطان کلورکتال، متیلاسیون این ژن در نمونه خون (n=۳۷)، بافت توموری و بافت سالم مجاور تومور (n=۲۹) در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال و خون افراد سالم گروه شاهد (n=۴۲) به‌وسیله PCR بعد از به‌کار بردن آنزیم محدودالاثر حساس به متیلاسیون ACCI مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *متیلاسیون پروموتور GSTP1 به‌میزان ۹/۵۲، ۱۰/۸۱، ۱۷/۲۴ و ۶۲/۱ درصد به‌ترتیب در نمونه‌های خونی گروه کنترل و خون، بافت سالم مجاورتومور و بافت توموری گروه مورد، شناسایی شد. از نظر آماری، ارتباط معناداری بین متیلاسیون GSTP1 در بافت توموری و خطر سرطان کلورکتال در مقایسه با بافت سالم مجاور تومور به‌دست آمد(OR = ۷/۸۶ ؛ ۹۵٪ CI=۲/۳۱۶-۲۶/۶۳۳)، اما اختلاف معناداری در ارتباط با متیلاسیون این ژن بین نمونه‌های خونی گروه مورد و شاهد وجود نداشت (OR = ۱/۱۲۱ ؛ ۹۵٪ CI =۰/۲۶-۴/۸۴).*

نتیجه‌گیری: *یافته‌های مطالعه حاضر، پیشنهاد می‌کند که متیلاسیون پروموتور GSTP1 می‌تواند در بافت توموری کولون شناسایی شده و به‌عنوان یک ابزار تشخیصی برای کمک به شناسایی و درمان سرطان کلورکتال درآینده عمل نماید.*

کلیدواژه‌ها: *ژن وابسته به تومور، متیلاسیون، CpG island، گلوتاتیون S- ترانسفراز، سرطان کلورکتال*

«دریافت: ۱۳۸۷/۹/۲۰ پذیرش:۱۳۸۸/۳/۱۹»

۱. گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳. گروه داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۴. گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

* **عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، سرخه لیژه، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، تلفن: ۰۹۱۸۱۳۱۷۲۹۶

Email: dr_hamidnomani@yahoo.com

مقدمه

سرطان کلورکتال در کشورهای توسعه‌یافته شیوع بالاتری نسبت به کشورهای در حال توسعه داشته و رتبه سوم را در مردان و رتبه دوم را در بین زنان دارد (۱). میزان شیوع این سرطان در بیشتر جمعیت‌ها در حال افزایش است (۲). در ایران نیز طی تحقیق انجام‌شده در کرمانشاه، مشخص گردیده است که سرطان کلورکتال در مردان، هفتمین و در زنان، ششمین سرطان را به‌خود اختصاص داده است (۳).

عوامل ژنتیکی و محیطی مختلف می‌توانند در ایجاد این سرطان نقش داشته باشند (۴). بررسی تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی سلول‌های نئوپلاستیک در نمونه‌های بالینی می‌تواند در شناسایی و درمان به‌موقع سرطان مؤثر باشد (۵). متیلاسیون DNA یکی از تغییرهای عمده اپی‌ژنتیکی است که از اولین و فراوان‌ترین حوادث در طی ایجاد سرطان‌های انسانی است (۶) و الگوی آن در بافت‌های مختلف منحصر به فرد می‌باشد (۷). متیلاسیون معمولاً در موقعیت کربن ۵ باز سیتوزین در نواحی غنی از دی‌نوکلئوتید CG به نام CpG island در ناحیه پروموتور ژن‌های سرکوب‌گر تومور و ژن‌های ترمیم DNA اتفاق می‌افتد که منجر به خاموشی و عدم بیان این ژن‌ها و تومورزایی می‌شود (۱۰-۷). هیپرمتیلاسیون ژن گلوتاتیون S– ترانسفراز P1 (GSTP1) (که در روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد) و در نتیجه عدم بیان این ژن، در ارتباط با کارسینوژنز و پیشرفت سرطان‌ها از جمله سرطان کلورکتال گزارش شده است. آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز Pi که توسط این ژن کد می‌شود، یکی از اعضاء خانواده آنزیمی گلوتاتیون ترانسفرازها می‌باشد که انتشار بافتی وسیعی داشته و در بیوترانسفورماسیون سوبستراهای الکتروفیلی و سم‌زدایی گزنوبیوتیک‌ها نقش دارد (۱۱).

هدف از این مطالعه، تعیین میزان متیلاسیون پروموتورژن GSTP1 در بافت تومروی، بافت سالم مجاور و خون در افراد مبتلا به سرطان کلورکتال (گروه مورد) در مقایسه با افراد سالم (گروه کنترل) می‌باشد. بررسی و شناسایی این تغییرات می‌تواند در گسترش آزمایش‌های جدید برای تشخیص زودهنگام بیماری مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

● **جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی DNA:** با بررسی‌های آماری انجام‌گرفته و براساس مطالعات مشابه، در این تحقیق، گروه مورد شامل ۳۷ نفر بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال در دامنه سنی ۸۲-۲۰ سال مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهر کرمانشاه بودند که تحت عمل جراحی قرار گرفتند. نمونه‌های خون (در لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA) برای جداسازی DNA لوکوسیت‌ها به‌عنوان کنترل طبیعی و نمونه‌های بافت توموری و سالم مجاور آن‌ها جمع‌آوری شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. گروه شاهد، ۴۲ نفر افراد سالم (گرفتن شرح‌حال و عدم وجود علایم بالینی) بودند که نمونه‌های خونی این افراد گرفته شد و نگه‌داری گردید. افراد انتخاب‌شده از نظر جنس و سن با گروه مورد، همسان بودند. سپس DNA نمونه‌های بافتی و

گلبول‌های سفید خونی جداسازی گردید (۱۲) و با اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، غلظت DNA استخراج‌شده، اندازه‌گیری شد.

ذکر این نکته ضروری است که از ۳۷ نفر گروه مورد، فقط ۲۹ نفر تمایل به انجام عمل داشته و تحت عمل قرار گرفتند و نمونه‌های بافتی آن‌ها جمع‌آوری شد.

● **تأثیر Restriction endonuclease ACCI برای شناسایی نواحی متیله و غیرمتیله:** هر یک از نمونه‌ها تحت تأثیر آنزیم محدودالاثر ACCI حساس به متیلاسیون قرار گرفتند. در توالی مورد شناسایی این آنزیم، بازهای CG قرار داشته که متیلاسیون سیتوزین، موجب عدم توانایی آن در برش ناحیه مذکور می‌گردد، در نتیجه جفت شدن پرایمرهای طراحی‌شده در طی PCR با آن نواحی انجام شده و تکثیر صورت می‌گیرد.

● **PCR نمونه‌ها و انجام الکتروفورز:** با استفاده از پرایمرهای forward و Reverse برای ناحیه پروموتور ژن GSTP1 با غلظت حدود ۳۰۰ng/µl برای هر یک از نمونه‌هایی که تحت تأثیر آنزیم قرار گرفتند، PCR انجام شد (۱۳ و ۱۴):

Forward

5-TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC-3

Reverse

5-GCCCCAATACTAAATCACGACG-3

با توجه به این‌که در صورت غیرمتیله بودن توالی موردنظر، آنزیم ACCI قادر به برش نبوده، امکان جفت شدن پرایمر وجود ندارد و محصول PCR نخواهیم داشت، از پرایمرهای ژن B-globin به‌عنوان کنترل مثبت و برای اثبات درستی انجام PCR استفاده گردید:

Forward

5-CAACTTCATCCACGTTCACC-3

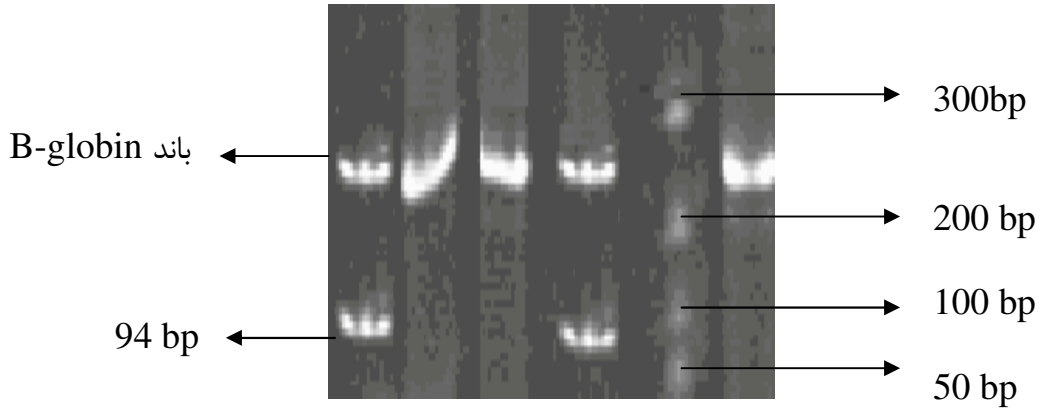
Reverse

5-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3

نتایج PCR در روی ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید آنالیز شد و پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، نتایج با دستگاه uv ایلومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی نتایج، میزان متیلاسیون ناحیه پروموتور ژن GSTP1 در نمونه‌های خون دو گروه و نمونه‌های بافتی گروه مورد، با هم و در دو گروه مقایسه شد. داده‌های به‌دست‌آمده با به‌دست آوردن شیوع متیلاسیون در گلبول‌های سفید خون و بافت و اندازه‌گیری odds ratio و confidence Interval، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۱).

یافته‌ها

نتایج نشان داد که در نمونه‌های بافت توموری ۱۸ نفر از ۲۹ نفر (۶۲/۱٪) متیلاسیون مشاهده شد، اما متیلاسیون GSTP1 فقط در نمونه‌های بافت سالم مجاور تومور ۵ نفر از ۲۹ نفر گروه مورد که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند (۱۷/۲۴٪) مشاهده گردید. میزان متیلاسیون در نمونه‌های خونی بیماران، ۴ مورد از ۳۷ مورد (۱۰/۸۱٪) به‌دست آمد و در بین ۴۲ نفر افراد سالم، فقط ۴ مورد متیلاسیون (۹/۵۲٪) مشاهده گردید.



شکل ۱– شیوع متیلاسیون در گلبول های سفید خون و بافت

هیچ موردی مشاهده نشد که در آن بافت سالم مجاور، متیله باشد ولی بافت توموری، متیله نباشد. مقایسه متیلاسیون پروموتور ژن GSTP1 در نمونه‌های بافت سرطانی و بافت سالم مجاور با استفاده از آزمون آماری انجام‌شد و برابر ((۲/۳۲-۲۶/۶۳)= confidence CI Interval ۹۵٪؛ OR=۷/۸۵۶) به‌دست آمد که ارتباط معناداری را بین متیلاسیون ناحیه پروموتور این ژن و سرطان کلورکتال نشان می‌دهد، اما با بررسی میزان متیلاسیون نمونه‌های خونی با استفاده از آزمون آماری ((۰/۲۶-۴/۸۴)=confidence Interval CI ۹۵٪؛OR=۱/۱۲۱)، تفاوت معناداری در ارتباط با متیلاسیون گلبول‌های سفید خون در دو گروه شاهد و مورد به‌دست نیامد (جدول ۱).

جدول ۱– مقایسه مقادیر متیلاسیون در گروه مورد و شاهد در بافت و خون

متغیرها	گروه مورد (تعداد=۳۷)	گروه شاهد (تعداد= ۴۲)	٪۹۵CI	OR
خون (متیلاسیون)	٪۱۰/۸۱	٪۹/۵۲	۰/۲۶-۴/۸۴	۱/۱۲۱
بافت توموری (متیلاسیون)*	٪۶۲/۱۱	___	۲/۳۱۶-۲۶/۶۳۳	۷/۸۶
بافت طبیعی (متیلاسیون)*	٪۱۷/۲۴	___		

* مقدار OR و فاصله اطمینان ۹۵ درصد از مقایسه متیلاسیون بافت توموری به بافت مجاور به‌دست آمده است.

بحث

با توجه به شیوع و میزان مرگ و میر بالای سرطان کلورکتال، انجام آزمایش‌هایی که بتواند در غربال‌گری و تشخیص زودهنگام و در نهایت درمان بیماری کمک‌کننده باشد، اهمیت فراوانی دارد. در حال حاضر، برای بررسی و تشخیص این سرطان، از بعضی تومورمارکرها در کنار سایر روش‌های تشخیصی مانند کلونسکوپی، آزمایش‌های پاتولوژی بیوپسی بافتی و خون مخفی در مدفوع استفاده می‌شود. اندازه‌گیری تومورمارکرهایی مانند CEA سرم، گرچه در پیگیری درمان مفید می‌باشد ولی برای تشخیص سرطان کلورکتال مناسب نیست. از طرفی، طی مطالعات مختلف، مشخص شده است که انجام هم‌زمان اندازه‌گیری چند تومورمارکر، میزان حساسیت و اختصاصی بودن نتایج برای یک بدخیمی خاص را با توجه به تغییرات تومورمارکرها به‌صورت یک الگوی ویژه نشان می‌دهد (۱ و ۵)، لذا اضافه شدن هر بیوتومور مارکر جدید با استفاده از مطالعات بالینی می‌تواند گامی مهم برای رسیدن به تشخیص آسان و زود هنگام بدخیمی را فراهم نماید.

در حال حاضر بررسی تغییر مولکولی اپی ژنتیکی متیلاسیون، به‌عنوان تغییر عمدهٔ برگشت پذیر در طی مراحل اولیه تومورزایی مطرح می باشد (۷ و ۱۵).تغییرات متیلاسیون ژن GSTP1 و در نتیجه تغییر در بیان آنزیم GSTPi که به‌عنوان آنزیم اصلی فاز II سم‌زدایی در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو نقش دارد (۱۶)، در سرطان‌های مختلف مطالعه و بررسی شده است (۱۹-۱۷). با توجه به نقش و اعمال مهم GSTPi در سم‌زدایی کار سینوژن‌ها و عدم بیان آن به‌واسطه متیلاسیون، مطالعه حاضر به‌وسیله انجام PCR بعد از استفاده از آنزیم محدودالاثر حساس به متیلاسیون ACCI و با هدف تعیین میزان متیلاسیون GSTP1 در بافت توموری، بافت سالم مجاور و خون در افراد مبتلا به سرطان کلورکتال انجام گرفت. بافت سالم مجاور تومور به‌عنوان شاهد برای مقایسه با بافت توموری و خون افراد سالم به‌عنوان شاهد و برای مقایسه با خون بیماران مبتلا به سرطان، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده، نشان‌دهنده ارتباط معنادار بین متیلاسیون ناحیه پروموتورژن GSTP1 در بافت توموری و خطر بروز سرطان کلورکتال می‌باشد. مقایسه نتایج این مطالعه با سایر مطالعات انجام‌گرفته (۱۷ و ۲۱-۱۹) نشان می‌دهد که احتمالاً نقش متیلاسیون ژن GSTP1 در سرطان پروستات نسبت به سرطان کلورکتال بارزتر است اما متیلاسیون پروموتور این ژن، در سرطان کلورکتال نسبت به دیگر بافت‌های سرطانی از جمله سرطان کلیه، مری، مثانه، معده و.... اهمیت بیشتری دارد، به‌طوری‌که میزان متیلاسیون این ژن در سرطان پروستات حدود ۹۰ درصد ودر سرطان‌های معده، مری و مثانه به‌طور میانگین حدود ۱۰ درصد به‌دست آمد. چون تغییر اپی‌ژنتیکی متیلاسیون از جمله اولین تغییرات در طی سرطانی شدن بافت می‌باشد (۶) و با توجه به این‌که متیلاسیون و یا عدم آن و نه میزان متیلاسیون در این مطالعه همانند مطالعات مشابه در سرطان پروستات بررسی گردید، لذا اثر مراحل بیماری مورد مطالعه قرارنگرفت.

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که در بیماران سرطانی معمولاً DNA مشتق از سلول‌های سرطانی نکروتیک و آپوپتوتیک، براساس نوع بافت سرطانی به‌طور غیرطبیعی در سطوح بالا در پلاسما، ادرار، مدفوع و ... وجود دارد (۲۲)، می‌توان با به‌دست آوردن الگوی متیلاسیون DNA با بررسی این‌گونه سلول‌ها در پلاسما و مدفوع بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال، از آن به‌عنوان یک بیومارکر مولکولی جدید و اختصاصی برای گسترش روش‌های غیرتهاجمی برای شناسایی اولیه، تشخیص و غربال‌گری این بیماری در افراد با خطر بالا استفاده نمود. همچنین دمتیلاسیون DNA با استفاده از داروهای مهارکننده آنزیم DNA متیل ترانسفراز مانند ۵- آزا – ۲ – داکسی‌سیتیدین و پروکاینامید، می‌تواند یک راه‌کار درمانی قوی در آینده باشد تا بیان ژن‌های خاموش از نظر رونویسی را دوباره فراهم نماید.

References

1. Skibber J., Minsky B, Hoff P. cancer of the colon. In; cancer: principles and practice of oncology.. Lippincott's Williams and wilkins, 6th ed; Philadelphia. 2001:1216.
2. Cotton S, sharp L, Little W,Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer, Issue of the American Journal of Epidemiology 2000; 151(1): 7-32.
3. Izadi B.[Epidemyologic study of reported neoplasms in pathologic centers of Kermanshah in 70-74(Persian)].
4. Fearon, E., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell.1990; 61(5): 759 – 767.
5. Sidransky, D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. Science. 1997; 278: 1054 – 1058,
6. Novik K, Nimmrich I. Epigenomics: Genome- wide study of methylation phenomena. Curr Issues. Mol Biol 2002; 4(4): 111-128.
7. Jaroslaw P, wanda B , Dubowska K. Epigenetic diagnostics of cancer – the application of DNA methylation markers. J Appl Geney 2006; 47(4): 365-373.
8. Merlo A, Herman J,Mao G, Lee D, Gabrielson E. Burger P. et al. 5 CPG insland methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDK N2/MTS1 in human cancers. Nat. Med 1995; 1(7): 686-692.
9. Baylin S B, Herman J, Graff R, Vertino M, Issa G. Alteration in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv. Cancer Res 1988; 72: 141 -196.
10. Jones P, Laird W. cancer epigenetics comes of age. Nat. Genet 1999; 21(2): 163 – 167.
11. Jubb M, Bell H, Quirke P. Methylation and colorectal cancer – Journal of Pathology 2001; 195: 111-134.
12. Boom R,.Sol C, Salimans M, Jansem P. Wertheim VanDillen K. .Method of extraction of DNA.J.Clin. Miccrobiol 1998; 28:495-503.
13. Nakayama M,Gonzalgo M,Yegnasubramania S,Lin X,Demarzo M,Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer.J Cell Biochem 2004; 91(3): 540-2.
14. Douglas S Millar K,Cheryl P,Pamela J Russell L,Molloy L , Susan J,Clark R.Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer.Oncogene 1999; 18; 1313-1324.
15. Bird A. The relationship of DNA methylation to cancer. Cancer surv 1996; 28(6); 8787-101.
16. Ryberg D., Skaug V., Hewer A. Phillips D., Harries L. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for Lung DNA adduct Levels and cancer risk. Carcinogenesis (Lond) 1997; 18(7); 1285-1289.
17. Carsten G, Markus M DNA- Based detection of prostatic cancer in blood, urine and ejaculates. Annals of the New york Academy of sciences 2001; 945 (1): 51-58.
18. cairns P, Esteller M, Herman G, schoen berg. M. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 Hypermethylation. Clinical cancer Research 2001; 7(9): 2727-2730.
19. Esteller M, Corn P, Baylin B, James G. Herman J. A Gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Research 2001; 61(8): 3225-3229.
20. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka K, Arvind K.Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. Clinical cancer Research 2002; 8(2): 514-519.
21. Leung W, Negek H, Tok F, Map k, Lee T, Gomy F, et al. Concurrent hypermethylation of multiple tumor – related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. Cancer 2001; 91(12): 2297-2301.
22. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Harolt D, Fackelmayer F, Hesch R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Research 2001; 61(4): 1659-1665.