مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران؛ ۱۳۸۸، دوره ۵، شماره ۲: صفحات ۲۷-۱۹.

مقاله پژوهشی

رابطه مقادیر فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین تام پلاسما با هیپرمتیلاسیون ژن رتینوئیک اسید رسپتور- بتا۲ وابسته به سن در مبتلایان به سرطان پستان

سعید پیروزپناه[۱]، فروغ اعظم طالبان[۲]، علیرضا ابدی[۳]، مرتضی عطری[۴]، پروین مهدی‌پور[۵]

[۱] دانش آموخته دوره Ph.D، گروه تغذیه انسانی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۲] استاد،گروه تغذیه انسانی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۴] دکترای تخصصی، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش جراحی بیمارستان تخصصی دی، تهران، ایران

[۵] استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۰۸/۷؛ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۵

مقدمه و اهداف: بیان ژنی رتینوئیک اسید رسپتور- بتا۲ (RARβ2) در سلول‌های تومور پستان اهمیت درمانی داشته و معمولاً به واسطه هیپرمتیلاسیون در بخش تنظیم کننده بیان ژن (پروموتر) می‌تواند مهار می‌گردد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی ارتباط مقادیر فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 وابسته به سن در بیماران مبتلا به سرطان پستان بود.

روش‌کار: این مطالعه در جامعه‌ای مشتمل بر ۱۲۶ بیمار مبتلا به سرطان پستان در سنین بین ۲۸ الی ۸۵ سال انجام شد. وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در بافت تومور با استفاده از روش Methylation-specific PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در ۳۶/۵ درصد از بیماران مشاهده گردید. هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 با سن در زمان تشخیص بیماری و تاریخچه فامیلی سرطان پستان ارتباط عکس نشان داد. در بیماران سنین ۴۸ سال به بالا، سطح فولات پلاسما در گروه مبتلا کمتر از گروه غیر مبتلا بود (P<۰/۰۵). در حالیکه در بیماران سنین ۴۸ سال به پایین، میزان هموسیستئین تام پلاسما در گروه مبتلا بیشتر از گروه غیر مبتلا بود(P<۰/۰۵). در سنین بالاتر از ۴۸ سال، ارتباط عکس و معنی‌دار بین سطوح فولات (۰/۸۸۷-۰/۰۵۲ :۹۵CI٪ و OR=۰/۲۱۴)، ویتامین ب ۱۲ پلاسما (۰/۹۱۹-۰/۰۰۲ :۹۵CI٪ و OR= ۰/۰۳۹) و وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 مشاهده شد. در همین گروه سنی، سطح بالای هموسیستئین پلاسما (۲۵/۷-۱/۰۶۷ :۹۵CI٪، OR= ۷/۵۵) در افزایش شانس بروز هیپرمتیلاسیون RARβ2 نقش داشت.

نتیجه‌گیری: سطوح پایین فولات و ویتامین ب۱۲ پلاسما و سطح بالای هموسیستئین پلاسما می‌توانند در پیش‌آگهی هیپرمتیلاسیون RARβ2 در مبتلایان به سرطان پستان نقش داشته باشند.

واژگان کلیدی: هیپرمتیلاسیون، سرطان پستان، رتینوئیک اسید رسپتور- بتا ۲، فولات، ویتامین ب ۱۲، هموسیستئین

مقدمه

سرطان پستان بعد از سرطان معده علت اصلی میرایی ناشی از تومورهای بدخیم در بین زنان ایرانی به شمار می‌رود. شیوع سرطان پستان در بین زنان ایرانی در مقایسه با کشورهای غربی کمتر بوده، ولی تظاهرات بیماری شدیدتر و میانگین سن ابتلا پایین‌تر است (۱،۲). با توجه به شیوع روز افزون سرطان پستان در کشور (۱)، لزوم بررسی تداخل عوامل محیطی - ژنتیکی در تعریف

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]

سبب شناسی بیماری احساس می‌شود.

رتینوئیدها نظیر اسید رتینوئیک، قابلیت تنظیم تقسیم و نمو سلول و ویژگی القاء آپوپتوز را به واسطهٔ فعالیت رسپتور هسته‌ای رتینوئیک اسیدرسپتور- بتا (RARβ) در سلول‌های سرطان پستان بر عهده دارند. واکنش هیپرمتیلاسیون به عنوان فرایند موثر در کاهش و حتی مهار بیان ژنی بسیاری از ژن‌های سرکوب کننده تومور[۱] قلمداد می‌شود (۶-۳). واکنش هیپرمتیلاسیون بطور عمده در منطقهٔ پروموتر ژن (جایگاه تنظیم ژن) و بر روی نوکلئوتید سیتوزین در توالی سیتوزین- گوانوزین[۲] رخ می‌دهد. بنابراین طی فرایند هیپرمتیلاسیون در برخی از ژن‌ها، بیان ژنی و بالطبع فعالیت ژن به‌طور مؤثر مهار می‌شود (۷،۸). از ژن‌های سرکوب کننده تومور که در مسیر درمانی سرطان پستان اهمیت داشته و در نتیجهٔ هیپرمتیلاسیون به طور چشمگیر دچار سکوت می‌شود می‌توان به ژن رتینوئیک اسید رسپتور-بتا ۲ (RARβ2) اشاره نمود. با وجود اینکه تحقیقات مختلفی در زمینه هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در بافت‌های مختلف وجود دارد ولی تاکنون مطالعات بسیار محدودی مبنی بر نقش متغیرهای موثر بر روند متیلاسیون صورت گرفته است. بر پایه نتایج دیگر مطالعات تغییر در الگوی متیلاسیون DNA احتمالاً وابسته به تجمع عملکرد عوامل مختلف محیطی-فیزیولوژیکی در طی زمان است (۹،۱۰). بنابراین ارتباط عوامل مستقل نظیر سن در زمان تشخیص بیماری، طول مدت مواجهه با استرادیول (طول دوران باروری)، سنین یائسگی، بلوغ و نخستین بارداری، با هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است (۱۲-۱۰).

پژوهش‌های گوناگون نشان داده‌اند که اسید فولیک در تامین واحدهای تک کربنی S- آدنوزیل متیونین (SAM) و نهایتاً سوبسترای اصلی متیلاسیون داخل سلولی نقش بسزایی دارد (۱۷-۱۳). با وجود این، تاکنون ارتباط سطوح فولات و ویتامین ب۱۲ پلاسما با هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. اخیراً شواهدی دال بر تاثیر احتمالی سن در ارتباط با وضعیت فولات روی تغییرات متیلاسیون عمومی DNA ژنومیک به دست آمده است (۱۸). ولی تاکنون این فرضیه در مورد تغییرات الگوی هیپرمتیلاسیون ژن‌ها به سبب عدم تعادل سطوح فولات و ویتامین ب۱۲ پلاسما در بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد توجه قرار نگرفته است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی ارتباط سطح فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین تام پلاسما با چگونگی هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 وابسته به سن در بیماران مبتلا به سرطان پستان است.

روش کار

جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن مورد نظر در توده بافت ۱۳۷ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان (بدون سابقه سرطان دیگر) در سنین ۲۸ تا ۸۵ سال، که در سال‌های ۱۳۸۵ الی ۱۳۸۷ به بیمارستان مرجع دی در شهر تهران مراجعه نموده بودند (Consecutive case series) مورد بررسی قرار گرفت. حجم نمونه مورد بررسی با استفاده از آزمون مقایسه نسبت‌ها (اطمینان ۹۵٪ و توان آزمون ۸۰٪) و شواهد به دست آمده در گزارشات پیشین (۱۹)، ۳۱ نفر تخمین زده شد. مهم‌ترین معیارهای ورود به مطالعه تمایل به همکاری در پژوهش، اولین جراحی به واسطه ابتلا به سرطان پستان (بدون سابقه سرطان دیگر) و تایید بدخیمی تومور از نظر هیستوپاتولوژی بودند. نهایتاً ۱۲۶ نفر برای شرکت در بررسی مورد نظر مجاز شناخته شدند. با وجود محدودیت دسترسی به کلیه نمونه‌های پلاسما، ارتباط سطح پلاسمایی متغیرهای مستقل با چگونگی هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در ۱۰۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفت.

داده‌های مربوط به طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی (مجرایی [۳] و غیر مجرایی) (n=۸۹)، درجه بندی هیستوپاتولوژی(Grade: I, II , III) (n=۹۶)، اندازه تومور (۲≤، ۵-۲/۱ و ۵< سانتی متر) و وضعیت بیان ER[۴] (مثبت، منفی) (n=۹۲) با استفاده از ایمونوهیستوشیمی (IHC)[۵] از گزارش پاتولوژی تهیه شدند. از افراد مورد مطالعه در رابطه با عوامل دموگرافیک نظیر سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، سنین بلوغ، یائسگی و نخستین بارداری، تاریخچه فامیلی انواع سرطان (مثبت، منفی)، تاریخچه استعمال دخانیات و نوشیدنی‌های الکلی (مثبت، منفی و طول مدت) سئوال شد. بارداری، شیردهی، قاعدگی نامرتب، مصرف مزمن داروهای ضد تشنج، ضد بارداری، تاموکسیفن، رالوکسیفن، تیبولون، مکمل‌های هورمونی دیگر، متوتروکسات، سیکلوسپورین، تئوفیلین، متفرمین، (مثبت، منفی) مکمل‌های ویتامینی فولات و ب۱۲ (مثبت، منفی، در فاصله زمانی یک ماه پیش از تشخیص بیماری)، تاریخچه بیماری التهابی (مثبت، منفی، مدت مواجهه)، سابقه سرطان

[۱] Tumor Suppressor Genes
[۲] CpG sites
[۳] Ductal
[۴] Estrogen Receptor
[۵] Immunohistochemistry

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]

جدول ۱- ارتباط بین سن در زمان تشخیص بیماری، مشخصات تومور و تاریخچه فامیلی بیماران مبتلا به سرطان پستان و وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 (n=۱۳۷).

متغیرها	وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 غیر متیله (n=۸۷)	متیله (n=۵۰)	P
سن در زمان تشخیص بیماری (سال)			
۴۸<	۳۷(۴۵/۱)	۲۸(۶۳/۶)	۰/۰۴۷
≥۴۸	۴۵(۵۴/۹)	۱۶(۳۶/۴)	
درجه‌بندی هیستوپاتولوژی			
I	۸(۱۲/۷)	۴(۱۲/۱)	۰/۸۰۰
II	۲۵(۳۹/۷)	۱۱(۳۳/۳)	
III	۳۰(۴۷/۶)	۱۸(۵۴/۶)	
وضعیت بیان استروژن رسپتور(IHC)			
منفی	۲۰(۳۱/۷)	۱۰(۳۴/۵)	۰/۷۹۵
مثبت	۴۳(۶۸/۳)	۱۹(۶۵/۵)	
طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی			
مجرایی	۴۵(۷۸/۹)	۲۶(۸۱/۲)	۰/۷۹۵
غیر مجرایی	۱۲(۲۱/۱)	۶(۱۸/۸)	
تاریخچه فامیلی سرطان پستان			
منفی	۴۷(۷۵/۸)	۴۳(۹۱/۵)	۰/۰۳۳
مثبت	۱۵(۲۴/۲)	۴(۸/۵)	
تاریخچه فامیلی سرطان‌های دیگر			
منفی	۱۴(۲۶/۹)	۱۵(۴۴/۱)	۰/۱۱۲
مثبت	۳۸(۷۳/۱)	۱۹(۵۵/۸)	

n، تعداد افراد؛ داده‌های داخل پرانتز نمایانگر توزیع فراوانی نسبی هستند. آزمون Chi-square برای بررسی روند معنی‌داری ارزش P استفاده شد.

جدول ۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار متغیرهای مربوط به بیماران مبتلا به سرطان پستان در گروه با هیپرمتیلاسیون RARβ2 در مقایسه با گروه غیرمتیله (n=۱۰۰)

	سن ۴۸> سال			سن ۴۸≥ سال		
	غیر متیله	متیله	P	غیر متیله	متیله	P
فولات (ng/ml)	۱۰/۲±۳/۲*	۹/۶±۳/۸	۰/۵۴۹	۱۱/۳±۴/۱	۸/۳±۳/۶	۰/۰۲۳
ویتامین ب۱۲ (pmol/l)	۴۰۵±۲۱۵	۴۳۱±۳۵۷	۰/۷۴۱	۳۹۲±۲۴۸	۳۷۲±۲۶۴	۰/۸۴۵
هموسیستئین (µmole/l)	۶/۶±۲/۶	۸/۷±۳/۹	۰/۰۳۵	۷/۳±۳/۶	۸/۳±۳/۴	۰/۳۵۹

برای بررسی مقادیر پلاسمایی فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین، تعداد بیماران مورد مطالعه در دو گروه متیله و غیر متیله به ترتیب شامل ۳٤ و ٦٦ نفر هستند.

* داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است.

(مثبت، منفی)، سابقه دریافت شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و هورمون‌درمانی (مثبت، منفی)، هیپرتیروئیدیسم و سابقه جراحی پستان و تخمدان (مثبت، منفی) نیز مورد پرسش قرار گرفته و به عنوان معیار خروج از مطالعه تلقی گردیدند. با کسر تاریخ اولین قاعدگی از تاریخ یائسگی، طول مدت مواجهه با استرادیول (طول دوران باروری) که به عنوان عامل محرک تقسیم سلولی در پستان مطرح است (۲۰)، تخمین زده شد (به ازای ماه). گاهی برخی از داده‌های مربوط به مشخصات دموگرافیک و هیستوپاتولوژیک بیماران مورد بررسی در دسترس نبود. لذا برخی از یافته‌های توصیفی این مطالعه با حجم نمونه یکسان مورد تحلیل قرار نگرفته‌اند. از بیماران، رضایت نامه کتبی برای شرکت در پژوهش اخذ شد. در ضمن روش مطالعه توسط کمیته اخلاق انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور تایید گردید.

آزمایش‌های بیوشیمیایی

جهت سنجش مقادیر ویتامین ب ۱۲ و فولات از روش Automated Electrochemiluminescence Immunoassay، با

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]

جدول ۳- توزیع فراوانی، نسبت شانس تعدیل شده (OR) و ۹۵٪ فاصله اطمینان (۹۵CI٪) بروز هیپرمتیلاسیون RARβ2 در ارتباط با سطح فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان

	سن ۴۸> سال			سن ۴۸≥ سال		
	غیرمتیله	متیله	P	غیرمتیله	متیله	P
فولات (ng/ml)						
<۹/۸	۱۵(۵۵/۶)	۱۲(۶۰/۰)	۰/۷۶۱	۱۴(۳۵/۹)	۹(۶۴/۳)	۰/۰۶۶
≥ ۹/۸	۱۲(۴۴/۴)	۸(۴۰/۰)		۲۵(۶۴/۱)	۵(۳۵/۷)	
نسبت شانس خام	۰/۷۳۳(۰/۲۵۸-۲/۶۹۴)			۰/۳۱۱(۰/۰۸۷-۱/۱۱۲)		
نسبت شانس تعدیل شده*	۱/۱۵(۰/۳۲-۴/۱۹)			۰/۲۱۴(۰/۰۵۲-۰/۸۸۷)		
ویتامین ب۱۲ (pmol/l)						
<۳۶۰	۱۴(۵۱/۹)	۹(۴۵/۰)	۰/۶۴۲	۲۰(۵۱/۳)	۷(۵۰/۰)	۰/۹۳۴
≥۳۶۰	۱۳(۴۸/۱)	۱۱(۵۵/۰)		۱۹(۴۸/۷)	۷(۵۰/۰)	
نسبت شانس خام	۱/۳۱۶(۰/۴۱۳-۴/۱۹۹)			۱/۰۵۳(۰/۳۱-۳/۵۷)		
نسبت شانس تعدیل شده†	۲/۴۴(۰/۴۱۹-۱۴/۳)			۰/۰۳۹(۰/۰۰۲-۰/۹۱۹)		
هموسیستئین(µmole/l)						
<۶/۷	۱۴(۵۱/۹)	۸(۴۰/۰)	۰/۴۲۱	۲۱(۵۳/۸)	۶(۴۲/۹)	۰/۴۸۰
≥۶/۷	۱۳(۴۸/۱)	۱۲(۶۰/۰)		۱۸(۴۶/۲)	۸(۵۷/۱)	
نسبت شانس خام	۱/۶۱۵(۰/۵۰۱-۵/۲۰۸)			۱/۵۵۶(۰/۴۵۴-۵/۳۳)		
نسبت شانس تعدیل شده‡	۲/۲۷۵(۰/۴۵۴-۱۱/۴۰)			۷/۵۵(۱/۰۶۷-۲۵/۷)		

داده‌های داخل پارانتز نمایانگر توزیع فراوانی نسبی هستند. از آزمون Chi-square برای بررسی روند معنی‌داری P استفاده شده است. نسبت شانس و ۹۵٪ فاصله اطمینان به صورت OR (۹۵CI٪) نشان داده شده است.

در تخمین نسبت شانس از سطوح فولات، ویتامین ب ۱۲ و هموسیستئین پایین پلاسما به عنوان مقادیر مرجع استفاده شده است.

* اثر متغیرهای سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، مصرف سیگار (مثبت، منفی) و درجه‌بندی هیستوپاتولوژی (I،II و III) تعدیل شدند.

† اثر متغیرهای درجه‌بندی هیستوپاتولوژی (I،II، III)، شرایط یائسگی (مثبت، منفی)، مصرف سیگار (مثبت، منفی) و نمایه توده بدن در ۵ سال گذشته (۲۴/۹≤ ۲۹/۹-۲۵ و ۳۰≤) و هموسیستئین تام پلاسما (۶/۷>، ۶/۷≤ µmole/l) تعدیل شدند.

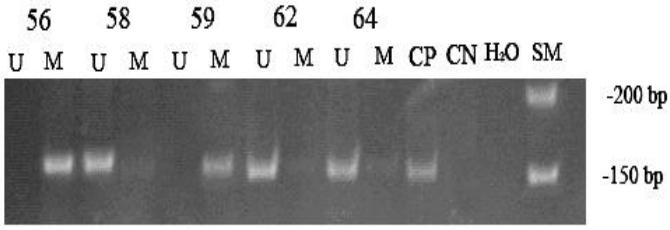
‡ اثر متغیرهای سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، درجه‌بندی هیستوپاتولوژی (I،II و III)، شرایط یائسگی (مثبت، منفی)، مصرف سیگار (مثبت، منفی) و ویتامین ب ۱۲پلاسما (۳۶۰>، ۳۶۰≤ pmol/l) تعدیل شدند.

کمک کیت‌های Roche Elecsys Folate II reagent kit (USA) و Roche Elecsys Vitamin B12 reagent kit (USA) مطابق دستورالعمل استفاده شد. میزان هموسیستئین در نمونه‌های مورد بررسی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، با دیتکتور فلورسنس اندازه‌گیری گردید. ۲۵ درصد از نمونه‌ها به منظور کنترل صحت بررسی، با کدهای متفاوت مورد آزمایش مجدد قرار گرفتند. در ضمن کارکنان آزمایشگاه از وضعیت نمونه‌ها آگاه نبودند. آزمایش‌های بیوشیمیایی در آزمایشگاه تخصصی بیمارستان دی در شهر تهران انجام پذیرفت.

بررسی هیپرمتیلاسیون ژن

در زمان جراحی نمونهٔ بافت در نیتروژن مایع ذخیره شد و بعد به فریزر۷۰- سانتی‌گراد منتقل گردید. برای بررسی وضعیت متیلاسیون RARβ2، DNA، نمونه‌های بافتی بدخیم (تایید شده از نظر هیستوپاتولوژی)، با کمک فنل- کلروفرم استخراج شد. صحت DNA استخراج شده با کمک ژل آگارز ۱/۵٪ و خوانش جذب نوری در OD260 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی وضعیت هیپرمتیلاسیون از واکنش بیسولفیت سدیم پیشنهادی توسط Herman و همکاران (۳) استفاده شد. در این روش سیتوزین غیر متیله در ژنوم با کمک بیسولفیت سدیم تبدیل به اوراسیل می‌گردد ولی سیتوزین متیله شده، بدون تغییر باقی خواهد ماند. بنابراین می‌توان با تنظیم پرایمرهای اختصاصی دو حالت متیله و غیر متیله و با استفاده از تکنیک MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction)، توالی DNA متیله در مقایسه با توالی غیرمتیله را تمیز داد. از اینرو جهت بررسی وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2، از پرایمرهای تنظیم شده برای تولید قطعه ۱۴۶ bp که شامل 5'-

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]



شکل ۱- آنالیز MSP بر روی پروموتر ژن RARβ2 در کارسینومای پستان (شماره نمونه:٦٤-٥٦) نشان داده شده است. فراورده های PCR در خطوط M و U به ترتیب نشان دهنده باندهای هیپرمتیله و غیر متیله ژن RARβ2 هستند. کنترل مثبت (Positive control: CP) در هر دوره واکنش PCR همراه نمونه‌های دیگر تکرار شده و طرز تهیه این نوع نمونه با آنزیم SssI methylase در قسمت روش تحقیق مقاله ذکر شده است. DNA لنفوسیتهای فرد طبیعی که به واسطه واکنش با بیسولفیت سدیم تیمار شده است به عنوان کنترل منفی (Negative control:NC) در PCR استفاده شد. از آب دیونیزه به جای نمونه‌های DNA در هر دوره PCR برای آزمون احتمال آلودگی مواد آزمایشگاهی استفاده شد (H2O). اندازه طول فرآورده‌های PCR با Marker size به ازای bp نشان داده شده است.

(sense) 5'-TCGAGAACGCGAGCGATTCG-3' و (antisense) 5'-GACCAATCCAACCGAAACGA-3' هستند، استفاده شد. برای بررسی قطعه غیر متیله (۱۴۶bp)، پرایمرهای (sense) 5'-TTGAGAATGTGAGTGATTTGA-3' و 5'-AACCAATCCAACCAAAACAA-3' به کار رفت(۲۱). دمای annealing برای هر دو واکنش به ترتیب شامل ۵۹ و ۵۲ درجه سانتی‌گراد بود. ترکیب واکنش PCR[۶] شامل ۱× بافرPCR، ۱/۲۵ میلی مول dNTPs، ۲ میلی مول MgCl2، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد از آنزیم Taq پلی مراز و ۱۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA تیمار شده با بیسولفیت سدیم در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. فرآورده‌های PCR بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۷٪ بارگذاری شده و نهایتاً بعد از رنگ‌آمیزی Ethidium bromide با تصویرساز UV باند اختصاصی مشاهده شد (شکل ۱). از DNA لنفوسیت تیمارشده با بیسولفیت سدیم و نیز آب دیونیزه به عنوان کنترل‌های منفی در واکنش MSP با پرایمرهای اختصاصی متیلاسیون استفاده شد. در ضمن از DNA لنفوسیت تیمار شده با آنزیم SssI methyltransferase (New England Biolabs,MA) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای بررسی پایایی نتایج هیپرمتیلاسیون، آزمایش در مورد کلیه نمونه‌ها ۳-۲ بار تکرار گردید. علاوه بر این در صورت مشاهده باند فراورده PCR ضعیف، مجدداً واکنش PCR تکرار می‌شد (۲-۱بار). در تفسیر نتایج، وجود شرایط هتروژن متیله و غیر متیله برای نمونه‌ها نمایانگر حالت متیله بود (شکل ۱).

در ضمن برای ارزیابی روایی داده‌های قطعه bp ۱۴۶ (نمونه کنترل مثبت و ۸ مورد از نمونه‌ها با هیپرمتیلاسیون در قطعه مورد بررسی) از پرایمرهای-'5 AAGTAGTAGGAAGTGAGTTGTTTAGA-3' (sense) و-'5 CCAAATTCTCCTTCCAAATAA-3' (antisense) برای تولید فراورده bp ۲۰۷ استفاده شد(در برگیرنده قطعه bp ۱۴۶) و از آنزیم Tail (MaeII) (Biolabs, CA) برای ایجاد برش درتوالی متیله شده ACGT برروی ژن RARβ2 طبق روش Youssef و همکاران استفاده شد (۴). علاوه بر این بعد از استخراج DNA از باند مشاهده شده درbp ۲۰۷ (ژل پلی آکریلامید) از cloned into a plasmid وR/T540 TA Cloning vector (Fermentase, miniprep kit (Fermentase) برای تخلیص و تکثیر توالی مورد نظر استفاده شد. نهایتاً بعد از اطمینان از حضور پلاسمیدهای حاوی قطعه مورد نظر با انجام PCR مجدد، توالی DNA پلاسمید با استفاده از دستگاه ABI automated DNA sequencer تعیین و تایید شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (Chicago,IL) انجام پذیرفت. آزمون کولموگروف- اسمیرنف برای تحلیل توزیع نرمال متغیرهای کمی پیوسته بکار رفت. آزمون t مستقل برای مقایسه داده‌های کمی پیوسته بین دو گروه بیماران با متیلاسیون و بدون متیلاسیون بکار گرفته شد. برای مقایسه سطح ویتامین ب ۱۲ پلاسما از آزمون ناپارامتری Mann-Whitney U بعد از تعدیل لگاریتمی استفاده شد. در ضمن از میانه (median) داده‌های مربوط به سطح پلاسمایی فولات، ویتامین ب ۱۲ و هموسیستئین و سنین مورد بررسی برای طبقه‌بندی دوتایی

[۶] Polymerase Chain Reaction

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]

متغیرها استفاده شد. ارتباط و روند محتمل بین وضعیت متیلاسیون RARβ2 با داده‌های مستقل گروه‌بندی شده با کمک مربع کای[۷] مورد تحلیل قرار گرفتند. آزمون رگرسیون لجستیک برای تعیین ارتباط فاکتورهای مستقل از میان فراسنج‌های بیوشیمیایی با وضعیت هیپرمتیلاسیون استفاده شد. بدین ترتیب تخمینی از نسبت شانس(Odd's Ratio) و فاصله اطمینان ۹۵٪ بدست آمد. البته اثر دیگر متغیرهای مستقل (با اثر مخدوش کننده) که با عوامل بیوشیمیایی و یا وضعیت هیپرمتیلاسیون ارتباط داشتند کنترل گردید. مقادیر ارزش P بصورت دو دامنه و کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌داری تلقی گردید.

یافته‌ها

از ۱۳۷ نمونه تومور مورد بررسی، هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در ۵۰ مورد (۳۶/۵ ٪) مشاهده شد. در دو مورد توده فیبروزسیستیک، هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در وضعیت غیرمتیله قرار داشت. میانگین سن در زمان تشخیص بیماری ۹/۴ ± ۴۹/۶ سال بود. تومورهایی با مشخصه RARβ2 متیله در مقایسه با گروه غیر متیله در سنین پایین‌تر دیده شدند (به ترتیب شامل ۷/۷±۴۸/۰ در مقایسه با ۱۰/۳±۵۰/۴ سال) که این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود (P=۰/۱۸۷). میانگین سنین مربوط به اولین قاعدگی، یائسگی و نخستین بارداری بیماران، بین گروه متیله و گروه غیرمتیله تفاوت چشمگیری نداشت. بین مشخصه‌های طبقه‌بندی شده مربوط به این سنین با وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 ارتباط معنی‌دار یافت نشد (نتایج نشان داده نشده است). طبق نتایج نشان داده شده در جدول ۱، توزیع فراوانی هیپرمتیلاسیون RARβ2 در گروه سنی پایین‌تر از ۴۸ سال به طور معنی‌دار بیش از گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال بود (P <۰/۰۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هیپرمتیلاسیون RARβ2 با تاریخچه فامیلی سرطان پستان ارتباط عکس دارد (n=۸۶) (جدول ۱). هیپرمتیلاسیون RARβ2 در ۹۱/۵ ٪ از بیماران بدون تاریخچه فامیلی مشاهده شد (P <۰/۰۵). تاریخچه فامیلی دیگر انواع سرطان با هیپرمتیلاسیون RARβ2 ارتباط نداشت (جدول ۱). نتایج رنگ‌آمیزی IHC، از عدم بیان پروتئین ER در ۳۳ درصد از بیماران (۳۱/۹۳) حکایت می‌کرد. بین بیان پروتئین ER و هیپرمتیلاسیون RARβ2 در تومور، ارتباط قوی یافت نشد (P=۰/۷۹۵). بین طبقه‌بندی و درجه‌بندی هیستوپاتولوژی و وضعیت هیپرمتیلاسیون همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد، ولی هیپرمتیلاسیون RARβ2 بیشتر در تومورهای نوع مجرایی (۸۱/۲ درصد) مشاهده گردید.

با توجه به همبستگی موجود بین سن در زمان تشخیص بیماری و وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2، دو گروه سنی بیشتر و کمتر از ۴۸ سال برای مقایسه میانگین مقادیر فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین تام پلاسما در حالات مختلف هیپرمتیلاسیون RARβ2 مورد استفاده قرار گرفته و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. با بررسی میانگین سطح فولات پلاسمایی بیماران در سنین بالاتر از ۴۸ سال مشاهده شد که سطح فولات در گروه متیله بطور معنی‌دار کمتر از گروه غیرمتیله بود (P <۰/۰۵). سطح ویتامین ب۱۲ تفاوت معنی‌دار بین دو گروه نشان نداد. مقدار هموسیستئین تام پلاسما در بین زنان سنین پایین‌تر از ۴۸ سال و درگروه متیله بطور قابل ملاحظه ای بالاتر از گروه غیرمتیله بود (P <۰/۰۵).

در جدول ۳، مقادیر نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ در مورد ارتباط مقادیر فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان در هر دو گروه سنی نشان داده شده است. در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال، سال هیپرمتیلاسیون RARβ2 با مقادیر فولات پلاسما ارتباط عکس داشته و نسبت شانس تخمینی در حدود ۰/۲۱۴ (۰/۸۸۷-۰/۰۵۲:۹۵CI٪) بود. در گروه سنی پایین‌تر از ۴۸ سال، بعد از تعدیل ارتباط عوامل مخدوش‌کننده، نقش فولات در ارتباط با وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 معنی‌دارنبود (جدول ۳). بین سطح ویتامین ب ۱۲ پلاسما و هیپرمتیلاسیون RARβ2 ارتباط عکس وجود داشت (۰/۹۱۹-۰/۰۰۲: ۹۵CI٪ OR=۰/۰۳۹). در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال، بین سطح هموسیستئین تام پلاسما و وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 با نسبت شانس ۷/۵۵ (۲۵/۷-۱/۰۶۷: ۹۵CI٪) ارتباط عکس مشاهده شد.

بحث

توزیع فراوانی نسبی هیپرمتیلاسیون RARβ2 در بخش قابل ملاحظه‌ای از تومورهای بدخیم پستان (۳۶/۵ درصد) مشاهده گردید. نتایج مطالعات پیشین در زنان مبتلا به سرطان پستان بر فراوانی نسبی هیپرمتیلاسیون RARβ2 (در حدود ۴۲-۱۰ درصد) دلالت داشته‌اند (۲۴-۵،۲۲). بنابراین همسو با نتایج پژوهش‌های صورت گرفته، توزیع فراوانی مشاهده شده در بیماران ایرانی نیز در

[۷] Chi-square test

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]

همین محدوده است. از نظر طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی، مطالعات گذشته نشان داده‌اند که پدیده هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در تومورهایی غیر از نوع مجرایی بیشتر تظاهر پیدا می‌کند (۶،۱۱) ولی در مطالعه حاضر برداشت معنی‌داری بدست نیامد. یافته‌های بدست آمده حاکی از ارتباط منفی بین تاریخچه فامیلی سرطان و هیپرمتیلاسیون RARβ2 بود. Bean و همکاران (۷) نشان دادند که هیپرمتیلاسیون ژن BRCA1[۸] با بروز سرطان پستان فامیلی ارتباط ندارد. مطابق با نتایج بررسی حاضر، یافته‌های پژوهش دیگر بر روی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان نشان داد که میزان بروز متیلاسیون BRCA1 در افراد با تاریخچه فامیلی منفی سرطان، بیشتر است؛ در حالیکه در مبتلایان به CRC، ارتباط مثبت بین تاریخچه فامیلی سرطان با هیپرمتیلاسیون برخی از ژن‌ها گزارش شده است(۲۵،۲۶). با وجود داده‌های متناقض، تا بحال وابستگی منفی هیپرمتیلاسیون RARβ2 در رابطه با وراثت سرطان گزارش نشده بود. بنابراین شواهد موجود می‌تواند بر رویکرد متفاوت تاریخچه فامیلی بر روی متیلاسیون بر حسب نوع بافت و ژن دلالت داشته باشد. به علاوه، چنین همبستگی منفی بین احتمال اثر وراثت و متیلاسیون می‌تواند نقش سببی عوامل محیطی را بیشتر روشن نماید.

برخلاف جهش ژنتیکی[۹] که پدیده‌ای غیر قابل برگشت است، وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن‌ها بطور برگشت‌پذیر توسط عوامل محیطی قابل تغییر و تعدیل هستند (۱۲). سن که معرف تجمع اختلالات متیلاسیون در گذر زمان است، ظاهراً بر حسب نوع بافت و ژن بر الگوی متیلاسیون ژن‌ها تاثیر اختصاصی می‌گذارد (۷،۲۸،۲۷). برخلاف یافته بررسی حاضر مبنی بر همبستگی منفی بین سن و وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2، نتایج مطالعهٔ دیگر در سرطان پستان از عدم وجود ارتباط بین وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 و سن در زمان تشخیص بیماری حکایت می‌کنند (۷). در بیماری CRC مشاهده شده است که ویژگی هیپرمتیلاسیون RARβ2 وابسته به سن است (۴). از تفاسیر ممکن توسط Shelnutt و همکاران (۱۸) بر می‌آید که تاثیر افزایش سن در پیدایش متیلاسیون DNA (در بیماران مبتلا به CRC) می‌تواند در ارتباط با عدم کفایت دریافت فولات باشد. به عبارت دیگر در سنین بالا، احتمال مواجهه با تکرر عدم تعادل در دریافت عوامل تغذیه‌ای موثر در متیلاسیون نظیر فولات و یا ویتامین ب۱۲ بیشتر بنظر می‌رسد (۱۲). همسو با گزارش Shelnutt، یافته‌های مطالعه حاضر بر فراوانی معنی‌دار هیپرمتیلاسیون RARβ2 در افراد سنین بالای ۴۸ سال با سطح پایین فولات پلاسما دلالت داشت. علاوه بر این ارتباط قوی و معکوس بین سطح فولات و ویتامین ب۱۲ پلاسما با هیپرمتیلاسیون RARβ2 در مبتلایان به سرطان پستان با سنین بالاتر از ۴۸ سال مشاهده شد، در حالیکه این ارتباط عکس در زنان جوان‌تر معنی‌دار نبود. بنابراین با جمع‌بندی شواهد بدست آمده می‌توان بر ارتباط سطح پایین فولات و حتی ویتامین ب ۱۲ پلاسما در روند بروز تغییرات متیلاسیون پروموتر ژن RARβ2 به واسطه عامل گذر زمان تفسیر و تاکید نمود. به عبارت دیگر، نقش کمبود مزمن فولات و یا کوبالامین در سایهٔ بررسی گذر زمان می‌تواند به عنوان عامل القا کننده غیر مستقیم متیلاسیون RARβ2 جلوه نماید. همسو با نتایج بدست آمده از این مطالعه، یافته‌های van England و همکاران بر شیوع بالای متیلاسیون پروموتر ژن‌ها در بیماران مبتلا به CRC با دریافت فولات پایین در مقایسه با بیماران با دریافت کافی فولات اشاره دارد. برخلاف یافته‌های مطالعه ما، نتیجه پژوهش van England نه تنها اثر بالقوه سن را بررسی نکرده بود بلکه یافته‌های آن نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود (۱۶). به غیر از پژوهش حاضر تاکنون به ارتباط سطوح فولات و ویتامین ب ۱۲ پلاسما و وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 با لحاظ تاثیر بالقوهٔ سن اشاره‌ای نشده است. هر چند که بر اساس گزارش پیشین، کمبود ویتامین ب۱۲ با خطر بروز سرطان پستان ارتباط عکس دارد (۱۳،۱۵)، ولی تاکنون شواهدی مبنی بر همبستگی بین مقدار ویتامین ب۱۲ پلاسمای بیماران و هیپرمتیلاسیون RARβ2 گزارش نشده بود.

کمبود فولات و ویتامین ب۱۲ از شاخص‌های مهم و تعیین کننده افزایش سطح هموسیستئین است (۸). نتایج مطالعات در شرایط in vitro و نمونه حیوانی نشان داده‌اند که S-آدنوزیل هموسیستئین (SAH) داخل سلولی می‌تواند آنزیم DNA methyltransferase(DNMT) را با پتانسیل بالا مهار سازد (۸). بنابراین تجمع SAH به واسطه کمبود مزمن فولات و یا ویتامین ب۱۲ در سطح سلولی می‌تواند متیلاسیون DNA را مختل نماید (۱۰). به عبارت دیگر، فرض بر این است که اختلالات ممکن در الگوی متیلاسیون DNA که ناشی از عدم کفایت فولات است، احتمالاً بصورت هیپومتیلاسیون عمومی DNA و یا هیپرمتیلاسیون در جایگاه‌های تنظیم کننده فعالیت برخی از ژن‌های حیاتی تظاهر پیدا می‌کند (۱۰). با وجود این تاکنون مطالعه‌ای در مورد رابطه هموسیستئین تام با هیپرمتیلاسیون RARβ2 انجام نشده بود. نتایج پژوهش حاضر در زنان جوان‌تر از ۴۸ سال نشان داد که

[۸] Breast Cancer–Associated Gene 1
[۹] Mutation

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]

سطح هموسیستئین بیماران در گروه متیله بطور معنی‌دار بیش از بیماران گروه غیرمتیله بود. علاوه بر این، در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال، هیپرمتیلاسیون RARβ2 با مقادیر بالای هموسیستئین تام بعد از کنترل اثر متغیرهای بالقوه دیگر ارتباط مستقیم داشت. با وجود اینکه Friso و همکاران بر نقش هموسیستئین در هیپومتیلاسیون DNA اتفاق نظر دارند (۲۹،۳۰)، ولی شواهدی دقیق مبنی بر ارتباط سطح هموسیستئین تام با هیپرمتیلاسیون ژن‌های دیگر در مطالعات اپیدمیولوژیک بسیار نادر و متناقض بوده و بیشتر در بافت CRC مطرح شده‌اند. حال از یافته‌های بدست آمده چنین برداشت می‌شود که میزان هموسیستئین به عنوان شاخص حساس کمبود مزمن فولات (۸)، هیپرمتیلاسیون RARβ2 را در سنین بالا تحت تاثیر قرار می‌دهد. به عبارت دیگر، هموسیستئین تام پلاسما می‌تواند در پیش آگهی نسبت SAM به SAH در سطح سلولی مطرح باشد. در نتیجه، افزایش هموسیستئین پلاسما نه تنها می‌تواند گویای کمبود مزمن فولات و مهار آنزیم متیله کننده DNA (هیپومتیلاسیون عمومی DNA) باشد (۲۹)، بلکه حتی توانایی القا هیپرمتیلاسیون به طور بالقوه در سنین بالا را بر عهده دارد. احتمالا در محیط بیولوژیک، برای جبران و برطرف کردن مهار موجود به سبب افزایش هموسیستئین، بیان ژنتیکی آنزیم DNMT ارتقا پیدا کرده (۱۷) و سرانجام بعد از هیپومتیلاسیون DNA در برخی از جایگاه‌های تنظیم‌کننده بیان ژن‌های سرکوب کننده تومور همانند RARβ2 ،متیلاسیون نابجا (هیپرمتیلاسیون) تظاهر پیدا می‌کند.

نتیجه‌گیری

هیپرمتیلاسیون RARβ2 به نسبت قابل ملاحظه‌ای در بیماران مبتلا به سرطان پستان مشهود بود. تاریخچه فامیلی سرطان پستان و سن در زمان تشخیص بیماری با هیپرمتیلاسیون RARβ2 ارتباط عکس نشان دادند. با توجه به نقش فولات و ویتامین ب۱۲ در متابولیسم عوامل متیلی، ارتباط عکس بین هیپرمتیلاسیون RARβ2 و مقادیر فولات و ویتامین ب ۱۲ پلاسما در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال نشان داده شد. سطح هموسیستئین پلاسما نیز در بیماران گروه متیله در مقایسه با گروه غیر متیله بالاتر بود و ارتباط بالقوه و مثبت با هیپرمتیلاسیون RARβ2 در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال ارائه نمود. در نتیجه درک تداخل ممکن بین عوامل موثر در سطح SAM سلولی و الگوی متیلاسیون DNA (به خصوص ژن‌های مؤثر در روند درمان) در قالب کنترل اثر بالقوه سن می‌تواند در هدایت به سوی مطالعات گسترده‌تر در بیماران مبتلا به سرطان پستان موثر واقع گردد.

تشکر وقدردانی

بدین وسیله از مسئولان محترم انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور برای تامین تسهیلات اعتباری این پژوهش، همکاران بیمارستان تخصصی دی و بیماران سپاسگزاری نموده و در ضمن یافته‌های منعکس شده در این نوشتار از داده‌های پایان نامه دوره دکترا است.

منابع

1. Akbari M. Iran Cancer Report. Cancer Research Center. Shahid Beheshti University(MC). 1st ed. 2008. 135-77.
2. Atri M, Jafarimojarad E, Javidroozi M, and Mehdipour P. Lack of association between early onset of breast cancer and numbers of affected relatives in an Iranian population. Familal Cancer 2003; 2: 117-8.
3. Herman J, Graff J, Myhanen S, Nelkin B, and Baylin S. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1996; 93: 9821-6.
4. Youssef E, Lotan D, Isaa J, Wakasa K, Fan Y, Mao L, et al. Hypermethylation of the retinoic acid receptor ß2 gene in head and neck carcinogenesis. Clinical Cancer Research 2004; 10: 1733-42.
5. Fackler M, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. International Journal of Cancer 2003; 107: 970-5.
6. Bae Y, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler M ,Sukumar S, et al. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. Clinical Cancer Research 2004; 10: 5998-6005.
7. Bean G, Ibarra C, Drendall C, Goldenberg V, Baker J, Troch M, et al. Hypermethylation of the breast cancer-associated gene 1 promoter does not predict cytologic atypia or correlate with surrogate end points of breast cancer risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2007; 16: 50-6.
8. Kim Y. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2004; 13: 511-9.
9. Euhus D, Bu D, Milchgrub S, Xie X, Bian A, Leitch A, et al. DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2008; 17: 1051-9.
10. Johnson I and Belshaw N. Environment, diet and CpG island methylation: Epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 1346-59.
11. Li S, Rong M, and Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. Cancer Letters 2006; 237: 272-80.
12. Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. Mutagenesis 2007; 22: 91-103.

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]

13. Zhang S, Willett W, Selhub J, Hunter D, Giovannucci E, Holmes M, et al. Plasma Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, Homocysteine, and Risk of Breast Cancer. Journal of the National Cancer Institute 2003; 95: 373-80.
14. Kim Y. Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? Nutrition Review 2006; 1: 468-75.
15. Zhang SM, Hankinson SE, Hunter DJ, Giovannucci EL, Willett WC. Folate Intake and Risk of Breast Cancer Characterized by Hormone Receptor Status. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2005; 14: 2004-8.
16. van Engeland M, Weijenberg M, and Roemen GM ea. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. Cancer Res 2003; 63: 3133-7.
17. Sohn K, Stempak J, Reid S, Shirwadkar S, Mason J, and Kim Y. The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA methylation in rat colon. Carcinogenesis 2003; 24 81-90.
18. Shelnutt K, Kauwell G, Gregory J, Maneval D, Quinlivan E, Theriaque D, et al. Methyltetrahydrofolate reductase 677C-T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. Journal of Nutritional Biochemestry 2004; 15: 544-60.
19. van Engeland M, Weijenberg M, Roemen GM, Brink M, de Bruine A, Goldbohm R, et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. Cancer Research 2003; 63: 3133 – 7.
20. Nkhata K, Ray A, Dogan S, Grande J, and Cleary M. Mammary tumor development from T47-D human breast cancer cells in obese ovariectomized mice with and without estradiol supplements. Breast Cancer Research and Treatments 2008.
21. Cote S, Sinnett D, and Momparler R. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycitidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. Anticancer Drugs 1998; 9: 743-50.
22. Yang Q, Sakurai T, Yoshimura G, Mori I, Nakamura M, Nakamura Y, et al. Hypermethylation does not account for the frequent loss of the retinoic acid receptor beta2 in breast carcinoma. Anticancer Research 2001; 21: 1829-33.
23. Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta S, Ralhan R. Detection of RASSFIA and RARb hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. Epigenetics 2006; 1: 88-93.
24. Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Muller H, Amberger A, Zeschnigk M, et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. Journal of the National Cancer Institute 2000; 29: 826-32.
25. Chan A, Issa J, Morris J, Hamilton S, and Rashid A. Concordant CpG islands methylation in hyperplastic polyposis. American Journal of Pathology 2002; 160: 529-36.
26. Baldwin R, Nemeth E ,Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. Cancer Research 2000; 60: 5329-33.
27. Issa J. CpG-island methylation in aging and cancer. Current Topics in Microbiology and Immunology 2000; 249: 101-18.
28. Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. Ageing Research Review 2003; 2: 245-61.
29. Friso S, Choi W, Girelli D, Mason J, Dolnikowski G, Bagley P, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation thorough an interaction with folate status. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2002; 99: 5606-11.
30. Friso S, Lamon-Fava S, Jang H, Schaefer E, Corrocher R, and Choi S. Oestrogen replacement therapy reduces total plasma homocysteine and enhances genomic DNA methylation in postmenopausal women. British Journal of Nutrition 2007; 97: 617-21.

1.

[Downloaded from irje.tums.ac.ir on 2024-08-25]