

ارزیابی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی مری

آیدا میرزاآقاسی^۱، سعید قربان^{۲*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: تغییر در سطح متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* می‌تواند در شکل‌گیری کارسینوم سلول سنگفرشی مری نقش داشته باشد. لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان تغییرات سطح متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در بافت کارسینوم سلول‌های سنگفرشی مری خواهد بود.

روش بررسی: در مطالعه مورد-شاهدی حاضر بر روی ۷۵ بلوک پارافینی بافت سرطانی مری و ۷۵ بلوک پارافینی بافت سالم از مراجعین به بیمارستان‌های نور نجات و بین‌المللی تبریز در طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۶ صورت گرفت. بعد از استخراج DNA و استفاده از متابی‌سولفیت سدیم، میزان تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* با تکنیک High Resolution melting (HRM) و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS Inc., Chicago, IL; version 16 و آزمون مجذور کای آنالیز شدند.

نتایج: نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که میزان تغییرات سطح متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی نسبت به بافت‌های سالم، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P=0/106$).

نتیجه‌گیری: در این بررسی نشان داده شد که متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در شکل‌گیری کارسینوم سلول سنگفرشی مری نقشی ندارد.

واژه‌های کلیدی: متیلاسیون، سرطان مری، *SEPT9*، ESCC

ارجاع: میرزا آقاسی آیدا، قربان سعید. ارزیابی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی مری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۱۰): ۹۲-۱۹۸.

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲-استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۶۲۹۳۸۹، پست الکترونیکی: s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir، کد پستی: ۵۴۵۱۱۱۶۷۱۴

مقدمه

علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در تشخیص و درمان بدخیمی‌ها، کارسینوم سلول سنگفرشی مری (ESCC; esophageal squamous cell carcinoma) یکی از مرگبارترین سرطان‌ها به شمار می‌رود (۱، ۲). یکی از دلایل پیش‌آگهی ضعیف این بدخیمی، بروز متاستاز لنفاوی (LNM; lymph node metastasis) در مراحل اولیه است (۳). بنابراین تشخیص و درمان زودهنگام برای بیماران مبتلا به ESCC ضروری است. پیش‌بینی حضور LNM قبل از درمان برای تصمیم‌گیری درباره شیوه درمان مناسب حائز اهمیت است. اگرچه برش و برداشت مخاط با آندوسکوپی (Endoscopic Mucosal Resection; EMR) برای درمان جزئی تهاجمی ESCC مفید است، اما اتخاذ این روش بسیار محدود است. بیشترین کاربرد ESD در مبتلایان به ESCC در مراحل اولیه بدخیمی است که سرعت LNM پایین است. اگر ESD لازم نباشد، Esophagectomy به‌عنوان راهکار بعدی برای درمان استفاده می‌شود؛ اما بیشتر بیماران در مرحله آخر بدخیمی تشخیص داده می‌شوند که غالباً با متاستازهای گسترده به گره‌های لنفاوی همراه شده‌اند. درجه متاستاز لنفاوی به‌عنوان مهم‌ترین عامل پیش‌آگهی دهنده در بیماری در مرحله آخر در نظر گرفته می‌شود (۴، ۵). حضور و درجه متاستاز لنفاوی پیامدهای بالینی مهمی برای انتخاب درمان صحیح در بیماران دچار کارسینوم سلول سنگفرشی مری دارد. تصویربرداری‌هایی از جمله توموگرافی کامپیوتری سطری مالتی‌دکتوری، اولتراسونوگرافی آندوسکوپی و توموگرافی گسیل پوزیترون قابلیت‌های تشخیصی محدودی برای شناسایی دقیق متاستاز لنفاوی منطقه‌ای دارند. حساسیت MDCT برای LNM که غالباً برای مرحله‌بندی ESCC استفاده می‌شود، تقریباً ۶۵٪ گزارش شده است. اگر LNM در طول فاز تشخیصی قبل از درمان به‌طور دقیق‌تری پیش‌بینی شود، می‌توان از درمان تهاجمی غیرضروری اجتناب کرد؛ اما علی‌رغم مطالعات متعدد، نشانگرهای بالینی LNM برای مبتلایان به ESCC شناسایی نشده‌اند. بنابراین نشان‌گرهای قدرتمند و کمتر تهاجمی LNM با قدرت پیش‌بینی بالا برای درمان مؤثر

بدخیمی ضروری است (۸ - ۶). متیلاسیون DNA یکی از فرایندهای بنیادی اپی‌ژنتیکی است. اپی‌ژنتیک به‌صورت تغییر پایدار در بیان ژن بدون تغییر در توالی ژنتیکی تعریف می‌شود. چندین مکانیسم اپی‌ژنتیکی بیان ژن را تنظیم می‌کنند، از جمله متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و RNAهای غیر کدکننده (۹) می‌توان اشاره کرد. متیلاسیون DNA یکی از فرایندهایی است که به‌طور گسترده و فشرده در اپی‌ژنتیک سرطان مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰-۱۲). هیپرمتیلاسیون DNA شامل اتصال گروه‌های متیل به CpG دی نوکلئوتیدی‌ها در ناحیه پروموتور ژن بوده و بنابراین بیان آن کنترل می‌شود. متیلاسیون DNA نابجای جزایر CpG در ناحیه پروموتور ژن‌های مهارکننده تومور به‌طور گسترده در چندین نوع سرطان گزارش شده است (۱۳، ۱۴). همچنین مطالعات بسیاری درباره متیلاسیون DNA نابجا در ESCC گزارش شده است (۱۵).

علاوه بر این، تعداد نواحی ویژه‌ای که دستخوش تغییرات متیلاسیون شده‌اند و در ارتباط با LNM در ESCC می‌باشند، گزارش شده است (۱۶-۱۸). در بررسی اخیر، Nagata و همکاران در یک مطالعه Genome-wide وضعیت متیلاسیون CpG واقع در منطقه پروموتور هشت ژن از جمله *FES*، *DDIT3*، *SOX17* و *SOX1*، *SEPT9*، *SEPT5*، *NTRK3*، *FLT3* شناسایی نشانگرهای پیش‌آگهی دهنده در بیماران مبتلا به ESCC مورد ارزیابی قرار گرفته است. سطح متیلاسیون این هشت ژن در بافت‌های توموری را نسبت به نمونه‌های طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، با تعیین وضعیت متیلاسیون ژن‌های *SEPT9* و *HOXB2* را به‌عنوان نشانگرهای پیش‌بینی کننده LNM در ESCC معرفی شدند (۱۵). ژن *SEPT9* بر روی کروموزوم 17q25.3 انسانی قرار دارد. محصول ژن یکی از اعضای خانواده پروتئین سپتین‌ها است که در چرخه سلولی و تنظیم سیتوکینز نقش دارد که واجد چندین واریانت پیرایشی است. نتایج مطالعات متعددی نشان داده است که ژن *SEPT9* در مبتلایان به بدخیمی‌های ESCC، تخمدان، پستان، پروستات و روده بزرگ به‌طور غیرطبیعی بیان شده است بررسی‌های نشان داده است که تغییرات اپی‌ژنتیکی ممکن

با استفاده از فرمول کوکران تعداد ۱۵۰ نمونه (۷۵ نمونه بیمار و ۷۵ نمونه شاهد) تعیین گردید. معیارهای ورود به مطالعه نمونه‌های بیمارانی بودند که قبل از نمونه برداری آندوسکوپی تحت درمان‌های رادیوتراپی و یا شیمی‌درمانی قرار نگرفته بودند. هم‌چنین نمونه‌هایی که توسط متخصصین آسیب‌شناسی به صورت قطعی کارسینوم سلول سنگفرشی مری تشخیص داده شده بودند و Stage بدخیمی آنها تعیین گردیده بود، انتخاب شدند. از طرفی، افرادی که تحت شیمی‌درمانی و رادیوتراپی قرار گرفته بودند از مطالعه خارج می‌شدند. معیارهای ورود به مطالعه در گروه شاهد شامل نمونه‌هایی بودند که بعد از آندوسکوپی و بررسی‌های آسیب‌شناسی بدخیمی تشخیص داده نمی‌شدند. این مطالعه به صورت کاملاً محرمانه و با رعایت کامل موازین، به طوری که مشخصات فردی نمونه‌های مورد مطالعه ناشناخته و با کد اختصاری علامت‌گذاری شده بودند. از بلوک‌های پارافینی دو تا برش ۱۵ میکرومتری توسط دستگاه میکروتوم برش و در میکروتیوب گردآوری شدند.

استخراج DNA و تیمار با متابی سولفیت سدیم

به منظور جداسازی DNA از نمونه‌های بلوک پارافینی از کیت NucleoSpin® DNA FFPE XS بر اساس راهنمای کیت شرکت سازنده (Macherey-Nagel-آلمان) انجام شد. کمیته DNAهای استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop™ ND-1,000-آمریکا) و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفت. بعد از حصول اطمینان از کیفیت DNA استخراج‌شده، با استفاده از کیت Bisulfite Conversion (EpiMark®-Biolabs New England-انگلستان) فرآیند تیمار با بی‌سولفیت سدیم مطابق دستورالعمل پیشنهادی کیت انجام گرفت.

در طی فرآیند تیمار با بی‌سولفیت سدیم انتظار می‌رود که سیتوزین‌ها در مناطق CpG تبدیل به یوراسیل گردند. این در حالی است که چنانچه این سیتوزین‌ها در نتیجه فرآیند متیلاسیون فعالیت آنزیم متیل ترانسفراز قرار گرفته و تبدیل به ۵-متیل سیتوزین شده باشند، تیمار تأثیری بر روی آنها نخواهد گذاشت و تغییر نیافته باقی خواهند ماند.

است نقش پاتولوژیکی مهمی را در شروع و پیشرفت سرطان‌ها داشته باشند (۲۰، ۱۹). سپتین‌ها متعلق به خانواده پروتئین‌های متصل شونده به GTP هستند که تاکنون در پستانداران ۱۴ عضو از این خانواده شناسایی شده‌اند. ارتباط بین سپتین‌ها با اکتین و توبولین برای انجام سیتوکینز تقسیم سلولی ضروری است. به دلیل نقش مهم سپتین‌ها در تقسیم و قطبیت سلولی، بدون شک این دسته از پروتئین‌ها نقش‌های کلیدی در شکل‌گیری سرطان‌ها ایفا خواهند کرد. در بررسی‌ها نشان داده شده است که ژن *SEPT9* در سرطان‌های مختلف به‌عنوان انکوژن و یا سرکوبگر توموری نقش داشته باشد (۲۲، ۲۱). در حال حاضر مطالعات اندکی در مورد وضعیت الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در مبتلایان به ESCC انجام شده است که گاهاً نتایج متناقضی از نقش این ژن در سرطان‌زایی گزارش شده است. علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در حوزه ژنتیک مولکولی و مکانیسم‌های سرطان‌زایی، ناشناخته‌های زیادی در مسیرهای شکل‌گیری ESCC باقی مانده است، شناسایی نشانگرهای زیستی که نقش پیش‌آگهی دهنده داشته باشند، ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این‌که تاکنون هیچ‌گونه نتایجی مبنی بر نقش و اهمیت تغییر سطح متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در شکل‌گیری بدخیمی ESCC در ایران گزارش نشده است. از طرفی به‌منظور بررسی کارآمدی و معرفی احتمالی این تغییر اپی‌ژنتیکی به‌عنوان نشانگر پیش‌آگهی دهنده در این بدخیمی، در این مطالعه، وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در مبتلایان به ESCC برای اولین بار در ایران در مراجعین به بیمارستان‌های نور نجات و بین‌المللی شهر تبریز مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

نمونه‌ها

در مطالعه مورد-شاهدی که بر روی ۷۵ بلوک پارافینی بافت سرطانی و ۷۵ بلوک پارافینی بافت سالم مری که در طی بررسی‌های آندوسکوپی از مراجعین به بیمارستان‌های نور نجات و بین‌المللی شهر تبریز در طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۶ دریافت شده بود، از آرشیو پاتولوژی انتخاب شدند. حجم نمونه

بی سولفیت، ۰/۵ میکرو لیتر پرایمرهای مستقیم و معکوس و ۷ میکرو لیتر آب مقطر دوبار تقطیر با یکدیگر در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر مخلوط شدند. سپس میکروتیوبها را در شرایط تکثیر زمانی و دمایی به ترتیب، واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سپس ۴۰ سیکل در دمای واسرشته سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد.

برای ارزیابی میزان متیلاسیون پروموتور ژن از دستگاه مربوطه Eco Biosystems شرکت (دانمارک) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به ژن (Accession number: NC_000017.11) با استفاده از نرم‌افزار آنلاین MethPrimer طراحی (۲۰) و اختصاصیت آنها ارزیابی گردید (جدول ۱). واکنشها بر مبنای استفاده از رنگ Eva green I (ساخت شرکت فرمنتاز فرانسه) انجام شد. در هر واکنش، ۱۰ میکرولیتر Eva green Real time PCR master mix، ۲ میکرو لیتر DNA

جدول ۱: توالی جفت پرایمرها و اندازه محصول تکثیری در ژن *SEPT9* در مبتلایان به ESCC (۲۰).

| نام آغازگرها | توالی آغازگرها | اندازه محصول PCR |
|----------------|------------------------------|------------------|
| <i>SEPT9-F</i> | 5'-CGGTGATAGAGAATTTTGTGGT-3' | ۱۷۸ جفت باز |
| <i>SEPT9-R</i> | 5'-CGACCTCAACCCCTCCC-3' | |

Chicago, IL; Version 16 انجام و مقادیر کمتر از ۰/۵ تفاوت معنی‌داری لحاظ گردید.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق با کد مصوب ۹۵۱۰۱۲ به تأیید شورای پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر رسیده است.

نتایج

در این تحقیق، سطح متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در ۱۵۰ نمونه که متشکل از ۷۵ بیمار مبتلا به ESCC و ۷۵ نمونه شاهد (بر اساس معیارهای ورود و خروج از مطالعه) مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه HRM به مقادیر مناسبی از DNA با کیفیت نیاز دارد، لذا با الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌هایی که کیفیت خوبی نداشتند از مطالعه حذف شدند. نمونه‌ای از نتایج DNA استخراج شده پس از خالص‌سازی و تیمار با بی سولفیت سدیم در شکل ۱ نشان داده شده است. در بررسی حاضر، سطح میزان متیلاسیون ژن *SEPT9* به دو شکل هیپومتیله و هایپرمتیله در نمونه‌های بافت سرطانی مری طبقه‌بندی شدند. میانگین سنی

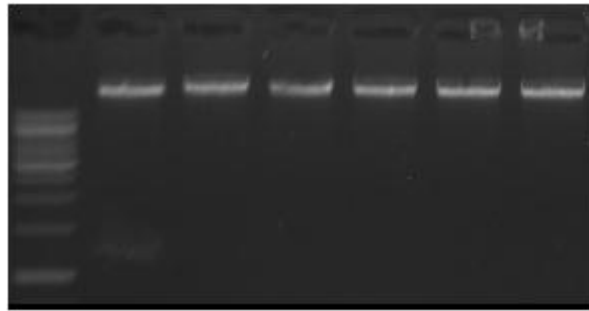
در واکنش‌های تعیین درصد متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* با روش HRM، تمامی نمونه‌ها به‌صورت دوتایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر سری واکنش، یک کنترل منفی که فاقد DNA متیله شده بود استفاده شد. هم‌چنین از یکسری درصد‌های مختلف از DNA متیله شده (Zymo Research، آمریکا) به ترتیب ۰٪، ۶/۲۵٪، ۱۲/۵٪، ۲۵٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪ استفاده گردید. از DNA غیرمتیله شده استخراج شده از گلبول‌های سفید خون به‌عنوان مرجع استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور محاسبه کمی میزان شدت متیلاسیون از روش مقایسه‌ای با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده گردید. مقادیر متیلاسیون به‌دست‌آمده به‌صورت درصد محاسبه گردید. برای ارزیابی کمی درصد میزان متیلاسیون، چنانچه درصد متیلاسیون ژن *SEPT9* از میانگین درصد متیلاسیون در نمونه‌های سالم بالاتر باشد، به‌عنوان نمونه متیله شده در نظر گرفته می‌شود. جهت آنالیز نتایج از آزمون مجذور کای استفاده شد. آنالیزهای آماری مربوط به اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار SPSS Inc.,

مختلف متفاوت بودند. به طوری که در Stage I (۳۹٪)، Stage II (۱۲٪)، در Stage III (۴۳٪) و در Stage IV (۶٪) به دست آمد. در گروه هایپرمتیله در Stage I (۱۸٪)، Stage II (۲۴٪)، در Stage III (۴۵٪) و در Stage IV (۱۳٪) شناسایی شدند.

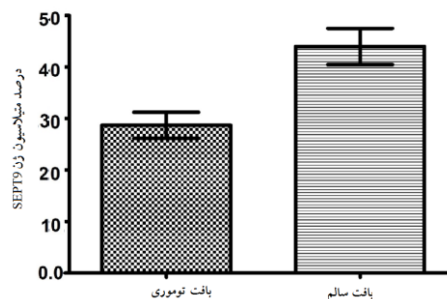
بیماران مبتلابه ESCC در گروه هایپومتیله $59/2 \pm 2/53$ سال و در گروه هایپرمتیله $61/8 \pm 3/1$ سال بود که اختلاف معناداری نشان نداد ($P=0/295$). ۳۷ مورد از نمونه‌ها (۴۹٪) پروموتور هایپومتیله و در ۳۸ مورد (۵۱٪) هایپرمتیله شناسایی شدند. درصد متیلاسیون در گروه هایپومتیله در Stage های



شکل ۱: الکتروفورز DNA پس از خالص سازی و تیمار با متا بی سولفیت سدیم بر روی ژل آگارز ۱٪. مارکر: 1Kb

پروموتور ژن *SEPT9* با روش HRM به ترتیب ۸۰٪ و ۷۸٪ به دست آمد. علاوه بر این، فراوانی متیلاسیون با ویژگی‌های بالینی و اطلاعات دموگرافیکی بیماران مبتلابه ESCC مورد مقایسه قرار گرفت که با هیچ کدام از پارامترهای Stage بیماری ($p=0/166$)، متاستاز ($p=0/064$)، مصرف نوشیدنی‌های داغ ($p=0/110$)، مصرف الکل ($p=0/113$)، موقعیت اجتماعی ($p=0/301$) و میزان مصرف سیگار ($p=0/713$) ارتباط معناداری نشان داده نشد (جدول ۲).

در این مطالعه، وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در نمونه‌های بلوک پارافینی با روش HRM مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی، HRM می‌تواند به عنوان یک روش ساده، مقرون به صرفه و قابل اعتماد برای اندازه‌گیری با توان بالا از نظر سطح متیلاسیون DNA در مواد بالینی کاربرد ویژه‌ای داشته باشد. درصد متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم تفاوت معناداری را نشان نداد ($p=0/106$) (شکل ۱). در این مطالعه، حساسیت و اختصاصیت برای شناسایی سطح متیلاسیون



شکل ۱: مقایسه درصد متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت توموری نسبت به بافت سالم در مبتلایان به سرطان مری. اختلاف معناداری از نظر سطح متیلاسیون در بین دو بافت نشان داده نشد ($P>0/05$).

جدول ۲: میزان فراوانی متیلاسیون پروموتور ژن SEPT9 با اطلاعات دموگرافیکی و بالینی بیماران مبتلابه سرطان مری

| مقدار P | پروموتور هیپومتیله | پروموتور هایپرمتیله | مشخصات بالینی |
|---------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| ۰/۲۹۵ | ۵۹/۲±۲/۵۳ | ۶۱/۸±۳/۱ | سن |
| ۰/۱۶۶ | | | Stage (%) |
| | ۲۱ (%۲۸) | ۱۸ (%۲۴) | I و II |
| | ۲۵ (%۳۳) | ۱۱ (%۱۵) | III و IV |
| ۰/۰۶۴ | | | شرایط متاستاز (%) |
| | ۱۹ (%۲۵) | ۲۲ (%۲۹) | مثبت |
| | ۲۳ (%۳۱) | ۱۱ (%۱۵) | منفی |
| ۰/۱۱۰ | | | مصرف نوشیدنی‌های داغ (%) |
| | ۳۶ (%۴۸) | ۹ (%۱۲) | زیاد |
| | ۱۹ (%۲۵) | ۱۱ (%۱۵) | کم |
| ۰/۱۱۳ | | | مصرف الکل (%) |
| | ۱۹ (%۳۱) | ۲۱ (%۲۸) | بله |
| | ۲۳ (%۲۵) | ۱۲ (%۱۶) | خیر |
| ۰/۳۰۱ | | | موقعیت اجتماعی (%) |
| | ۲۸ (%۳۷) | ۲۰ (%۲۷) | خوب |
| | ۱۹ (%۲۵) | ۸ (%۱۱) | ضعیف |
| ۰/۷۱۳ | | | میزان مصرف سیگار (%) |
| | ۲۲ (%۲۹) | ۱۵ (%۲۰) | زیاد |
| | ۲۱ (%۲۸) | ۱۷ (%۲۳) | کم |

سرکوبگر تومور به خاموشی و تنظیم کاهش‌ی بیان ژن منجر می‌شود که با تشکیل و پیشرفت تومور ارتباط دارد (۲۳-۲۷). متیلاسیون DNA یک فرایند آنزیمی شامل افزودن گروه متیل به جایگاه ۵' حلقه پیریمیدین سیتوزین‌ها جهت تولید ۵-متیل سیتوزین است. این تغییر کووالانسی از طریق آنزیم DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) در قسمت‌های کوتاه DNA غنی از CpG موسوم به جزایر CpG کاتالیز می‌شود. جزایر CpG روی ناحیه پروموتور قرار گرفته و پروموتورها به‌طور نابجا هیپرمتیلاسیون شده و سرکوبی رونوشتی به‌لحاظ کاهش بیان ژن روی می‌دهد؛ بنابراین، غیرفعال‌سازی ژن‌های سرکوبگر توموری در نتیجه هیپرمتیلاسیون پروموتور در فرایند چند مرحله‌ای سرطان‌زایی نشان داده شده است (۲۸). در این مطالعه که برای اولین بار در بیماران مبتلابه ESCC در

بحث

کارسینوم سلول سنگفرشی مری یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان به‌شمار می‌رود که بروز آن در سال‌های اخیر در کشورهای آسیایی رو به افزایش بوده و به‌عنوان چهارمین علت شایع مرگ و میر مربوط به سرطان در چین محسوب می‌گردد. میزان بقای پنج‌ساله این بدخیمی بسیار ضعیف گزارش شده است. مکانیسم‌های اساسی عمدتاً نامعلوم هستند، اگرچه مطالعات همه‌گیری شناختی و سبب‌شناختی نقش‌های مهم عوامل محیطی و ژنتیکی را در سرطان‌زایی مری نشان داده‌اند که به بیش از ۹۵٪ ESCC در چین و بیش از ۹۰٪ آدنوکارسینوم مری در آمریکا و اروپا منجر شده‌اند. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که خاموشی یا کاهش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور می‌تواند یکی از علل عمده سرطان‌زایی مری باشد. هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های

به ESCC مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، ۶۷ نمونه بافت سرطانی و ۶۷ نمونه بافت سالم مجاور با استفاده از روش Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip مطالعه شد که در این غربالگری نواحی مختلفی از پروموتور ژن از نظر سطح متیلاسیون موردسنجش قرار گرفت. در این مطالعه از سه ژن *SEPT9* و *SLC15A3*، *HOXB2* به عنوان کاندید پیش‌آگهی دهنده متاستاز به غدد لنفاوی در مبتلایان به ESCC انتخاب شده بودند. نتایج مطالعه آنان نشان داد که پروموتور ژن‌های *HOXB2* و *SEPT9* در نمونه‌هایی که از نظر متاستاز مثبت بودند به شدت متیله شده بودند. بر اساس این نتایج، پیشنهاد شده بود که ژن‌های *HOXB2* و *SEPT9* ممکن است به عنوان نشانگرهای اپی‌ژنتیکی در پیش‌بینی و ارزیابی متاستاز در مبتلایان به ESCC مؤثر باشند. علاوه بر این، نتایج آن‌ها نشان داد که سطح متیلاسیون ژن *SEPT9* در بین بافت‌های سرطانی ESCC نسبت به سالم در تمام Stage‌های مختلف به طور معناداری متفاوت بود (۱۵).

بر اساس شواهد سال‌های اخیر، ژن *SEPT9* با سرطان‌های بدخیمی در ارتباط است. مطالعات Peterson و همکاران با روش‌های ایمونوفلورسانت و ایمونوپرسی پیتاسیون نشان دادند که *SEPT9_i1* با هر دو نوع توبولین‌های الفا و بتا برهمکنش دارد. بررسی‌ها نشان داده شده که در نتیجه بیان *SEPT9_i1* در سلول‌ها، با نقایص قابل توجهی در جداسازی کروموزوم‌ها، تکثیر سانتروزومی و نقایص سیتوکینزی همراه شده است که در واقع بیانگر ناپایداری ژنومی از طریق دو مکانیسم مولکولی احتمالی از قبیل نقص در جدا شدن کروموزوم‌ها و نقص در سیتوکینز می‌شوند. قبلاً اشاره شده بود که پروتئین‌های سپتین در فرآیندهای مختلفی از جمله تقسیم سیتوپلاسم، قطبیت سلول، انتقال وزیکول‌ها و ترمیم غشاء سلولی نقش دارند. پروتئین سپتین ۹ به نظر می‌رسد که به عنوان یک سرکوبگر توموری عمل می‌کند. این بدین معنی است که در تنظیم رشد سلول و ممانعت از رشد سریع و غیرقابل کنترل سلول‌ها نقش دارد. در نتیجه وقوع متیلاسیون در جزایر CpG در پروموتور ژن‌ها و افزایش سطح ۵-متیل سیتوزین در نواحی پروموتوری، منجر به

جمعیت شمال غرب ایران انجام شد، وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* را در نمونه‌های بلوک پارافینی و با روش HRM مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر، از نظر درصد متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم تفاوت معناداری را نشان نداد به طوری که با نتایج محققان پیشین متناقض بود. تاکنون مطالعات متعددی بر روی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در بیماران مبتلابه سرطان روده بزرگ انجام شده است. مطالعه Tóth و همکاران که بر روی ۱۸۴ نمونه پلاسمای متشکل از ۹۴ بیمار مبتلابه سرطان روده بزرگ و ۹۲ فرد سالم و فاقد علائم انجام شده بود، حساسیت و اختصاصیت این روش سنجش متیلاسیون برای تشخیص بیماری به ترتیب ۹۵/۶٪ و ۸۴/۸٪ گزارش کرده بودند. نتایج حاصل از این بررسی اختلاف معناداری از نظر سطح متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در بافت‌های سرطانی نسبت به سالم نشان داد (۲۹). علاوه بر این، چندین مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ توسط محققین بر روی مبتلایان به سرطان روده بزرگ در ارتباط با این ژن مورد ارزیابی قرار گرفته بود که استفاده از این نشانگر اپی‌ژنتیکی با حساسیت در محدوده بین ۴۸/۲٪ تا ۸۸/۴٪ و اختصاصیت آن در محدوده ۸۲٪ تا ۹۱/۵٪ گزارش شد (۳۱، ۳۰، ۱۹). هم‌چنین ارزیابی Nian و همکاران نشان دادند که بررسی سطح متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* به عنوان یک نشانگر موجود در خون برای شناسایی سرطان روده بزرگ به‌ویژه در مراحل پیشرفته بیماری بسیار کارآمد است (۳۲).

نتایج مطالعه حاضر برخلاف آنچه تاکنون در ارتباط با هیپرمتیلاسیون پروموتور این ژن در سرطان روده بزرگ گزارش شده است، درصد متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم تفاوت معناداری را نشان نداد. البته مطالعه الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در مبتلایان به ESCC تنها در یک مورد گزارش شده است (۱۵). در ارزیابی Nagata و همکاران که به صورت Genome-wide طراحی شده بود، غربالگری DNA متیله شده و ارتباط آن با متاستاز به غدد لنفاوی در مبتلایان

به دیگر قومیت‌ها و نژادهای مختلف نیست. از طرفی، فراوانی بدخیمی ESCC در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است که در این مطالعه صرفاً بیماران مربوط به استان آذربایجان شرقی مورد بررسی قرار گرفتند. شایان ذکر است که استفاده از نمونه‌های بلوک پارافینه در ارزیابی‌های مولکولی دارای محدودیت‌های خاصی از جمله مدت زمان نگهداری نمونه بافت پارافینه و نوع ماده تثبیت کننده دارد به طوری که بر حفظ تمامیت مولکول DNA نقش ویژه‌ای خواهد داشت. به هر حال به منظور تأیید نتایج فوق نیازمند مطالعات گسترده و با انواع روش‌های مختلف سنجش سطح متیلاسیون DNA خواهد بود.

نتیجه‌گیری

در مطالعات حاضر نشان داده شد که تغییر در الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *SEPT9* در شکل‌گیری بدخیمی ESCC در جمعیت مورد مطالعه نقشی ندارد.

سپاس‌گزاری

مقاله حاضر، مستخرج از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است که هزینه این پژوهش توسط دانشجو تأمین شده است. از تمامی بیماران و پرسنل محترم مراکز درمانی که در این مطالعه یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.
تعارض منافع: وجود ندارد.

خاموش شدن بیان ژن می‌گردد. با افزایش سطح DNA متیله شده در طولانی‌مدت، بیان ژن کاهش و ممکن است منجر به غیرفعال شده ژن‌های سرکوبگر توموری گردد (۳۳). در توجیه تناقضات بین نتایج بررسی فوق بامطالعه حاضر می‌توان این‌گونه ادعان کرد که نوع نمونه‌های مورد ارزیابی با یکدیگر متفاوت بودند. به طوری که در ارزیابی ما بر روی نمونه‌های بلوک پارافینه انجام گرفته بود در حالی که در مطالعه Nagata نمونه‌های بیوپسی تازه مورد بررسی قرار گرفته بود. از طرف دیگر نوع روش بکار گرفته شده در ارزیابی سطح متیلاسیون پروموتور ژن کاملاً متفاوت بود. مطالعه ما بر مبنای روش HRM بود در حالی که در روش مطالعه قبلی بر مبنای Pyrosequencing که دقت و حساسیت آشکارسازی فوق‌العاده‌ای دارد. علاوه بر این ممکن است که ناشی از اختلاف در تعداد نمونه‌هایی است که از نظر متاستاز مثبت بودند و مورد آنالیز قرار گرفتند، این تناقضات به وجود آمده باشد. یکی دیگر از علل احتمالی نتایج متناقض، ممکن است ناشی از تعداد نواحی واجد جزایر CpG در پروموتور ژن *SEPT9* که مورد سنجش قرار گرفته شده باشد. از جمله موارد نقاط ضعف در این مطالعه می‌توان به تعداد نمونه‌هایی که مورد ارزیابی قرار گرفتند، اشاره نمود چرا که در تحقیقات پیشین، در یک جامعه آماری وسیع‌تری مورد مطالعه قرار گرفته بودند. علاوه بر این، این نتایج مربوط به یک نژاد خاص (ترک) است که الزاماً قابل تعمیم

References:

- 1- Cheng CP, Kuo IY, Alakus H, Frazer KA, Harismendy O, Wang YC, et al. *Network-Based Analysis Identifies Epigenetic Biomarkers of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression*. *Bioinformatics* 2014; 30(21): 3054-61.
- 2- Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman FT, Benhattar J. *Alterations of the Wnt Signaling Pathway during the Neoplastic Progression of Barrett's Esophagus*. *Oncogene* 2006; 25(21): 3084-92.
- 3- Agarwal A, Polineni R, Hussein Z, Vigoda I, Bhagat TD, Bhattacharyya S, et al. *Role of Epigenetic Alterations in the Pathogenesis of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma*. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5(5): 382-96.

- 4- Demeester SR. *Epidemiology and Biology of Esophageal Cancer*. *Gastrointest Cancer Res* 2009; 3(2 Suppl 1): S2-5.
- 5- An JY, Fan ZM, Gao SS, Zhuang ZH, Qin YR, Li JL, et al. *Loss of Heterozygosity in Multistage Carcinogenesis of Esophageal Carcinoma At High-Incidence Area in Henan Province, China*. *World J Gastroenterol* 2005; 11(14): 2055-60.
- 6- Audigier JC, Tuyns AJ, Lambert R. *Epidemiology of Oesophageal Cancer in France. Increasing Mortality and Persistent Correlation with Alcoholism*. *Digestion* 1975; 13(4): 209-19.
- 7- Anupam K, Tusharkant C, Gupta SD, Ranju R. *Loss Of Disabled-2 Expression Is an Early Event in Esophageal Squamous Tumorigenesis*. *World J Gastroenterol* 2006; 12(37): 6041-45.
- 8- Arai M, Imazeki F, Sakai Y, Mikata R, Tada M, Seki N, et al. *Analysis of the Methylation Status of Genes Up-Regulated by the Demethylating Agent, 5-Aza-2'-Deoxycytidine, in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *Oncol Rep* 2008; 20(2): 405-12.
- 9- Antequera F. *Structure, Function and Evolution of CpG Island Promoters*. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(8): 1647-58.
- 10- Baba S, Yamada Y, Hatano Y, Miyazaki Y, Mori H, Shibata T, et al. *Global DNA Hypomethylation Suppresses Squamous Carcinogenesis in the Tongue and Esophagus*. *Cancer Sci* 2009; 100(7): 1186-91.
- 11- Baba Y, Ishimoto T, Harada K, Kosumi K, Murata A, Miyake K, et al. *Molecular Characteristics of Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: Analysis of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations and LINE-1 Methylation*. *Ann Surg Oncol* 2015; 22(11): 3659-65.
- 12- Ghorbian S, Ardekani AM. *Non-Invasive Detection of Esophageal Cancer Using Genetic Changes in Circulating Cell-Free DNA*. *Avicenna J Med Biotechnol* 2012; 4(1): 3-13.
- 13- Balmain A, Gray J, Ponder B. *The Genetics and Genomics of Cancer*. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 238-44.
- 14- Bao Y, Wang Q, Guo Y, Chen Z, Li K, Yang Y, et al. *Correction: PRSS8 Methylation and Its Significance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *Oncotarget* 2017; 8(18): 30617-8.
- 15- Nagata H, Kozaki K-I, Muramatsu T, Hiramoto H, Tanimoto K, Fujiwara N, et al. *Genome-Wide Screening of DNA Methylation Associated with Lymph Node Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *Oncotarget* 2017; 8(23): 37740-50.
- 16- Baylin SB, Jones PA. *A Decade of Exploring the Cancer Epigenome-Biological and Translational Implications*. *Nature Rev* 2011; 11: 726-34.
- 17- Bedi U, Mishra VK, Wasilewski D, Scheel C, Johnsen SA. *Epigenetic Plasticity: A Central Regulator of Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Cancer*. *Oncotarget* 2014; 5(8): 2016-29.
- 18- Kuo IY, Chang JM, Jiang SS, Chen CH, Chang IS, Sheu BS, et al. *Prognostic CpG Methylation Biomarkers Identified by Methylation Array in*

- Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients*. Int J Med Sci 2014; 11(8): 779-87.
- 19- Su XL, Wang YF, Li SJ, Zhang F, Cui HW. **High Methylation of the SEPT9 Gene in Chinese Colorectal Cancer Patients**. Genet Mol Res 2014; 13(2): 2513-20.
- 20- Behrouz Sharif S, Hashemzadeh S, Mousavi Ardehaie R, Eftekharsadat A, Ghojzadeh M, Mehrtash AH, et al. **Detection of Aberrant Methylated SEPT9 And NTRK3 Genes in Sporadic Colorectal Cancer Patients as a Potential Diagnostic Biomarker**. Oncology Letters 2016; 12(6): 5335-43.
- 21- Jankowska AM, Millward CL, Caldwell CW. **The Potential of DNA Modifications as Biomarkers and Therapeutic Targets in Oncology**. Expert Rev MolDiagn 2015; 15(10): 1325-37.
- 22- Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G. **Genome-wide Analysis of Aberrant Methylation in Human Breast Cancer Cells Using Methyl-DNA Immunoprecipitation Combined with High-Throughput Sequencing**. BMC Genomics 2010; 11: 137.
- 23- Ghorbian S, Ardekani AM. **Non-Invasive Detection of Esophageal Cancer Using Genetic Changes in Circulating Cell-Free DNA**. Avicenna J Med Biotechnol 2012; 4(1): 3-13.
- 24- Wang X, Fan JC, Wang AR, Leng Y, Li J, Bao Y, et al. **Epidemiology of Esophageal Cancer in Yanting - Regional Report of a National Screening Programme in China**. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(4): 2429-32.
- 25- Ma K, Cao B, Guo M. **The Detective, Prognostic, and Predictive Value of DNA Methylation in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma**. Clin Epigenetics 2016; 8: 43.
- 26- Kuo IY, Chang JM, Jiang SS, Chen CH, Chang IS, Sheu BS, et al. **Prognostic CpG Methylation Biomarkers Identified by Methylation Array in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients**. Int J Med Sci 2014; 11(8): 779-87.
- 27- Li JS, Ying JM, Wang XW, Wang ZH, Tao Q, Li LL. **Promoter Methylation of Tumor Suppressor Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma**. Chin J cancer 2013; 32(1): 3-11.
- 28- Siegfried Z, Simon I. **DNA Methylation and Gene Expression**. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2010; 2(3): 362-71.
- 29- Toth K, Sipos F, Kalmar A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, et al. **Detection of Methylated SEPT9 in Plasma is a Reliable Screening Method for Both Left- And Right-Sided Colon Cancers**. PLoS One 2012; 7(9): e46000.
- 30- Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. **Prospective Evaluation of Methylated SEPT9 in Plasma for Detection of Asymptomatic Colorectal Cancer**. Gut 2014; 63(2): 317-25.
- 31- Johnson DA, Barclay RL, Mergener K, Weiss G, Konig T, Beck J, et al. **Plasma Septin9 Versus Fecal Immunochemical Testing for Colorectal Cancer Screening: A Prospective Multicenter Study**. PLoS One 2014; 9(6): e98238.
- 32- Nian J, Sun X, Ming S, Yan C, Ma Y, Feng Y, et al. **Diagnostic Accuracy Of Methylated SEPT9 for**

Blood-Based Colorectal Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clin Transl Gastroenterol 2017; 8(1): E216.

33- Wang Y, Chen PM, Liu RB. *Advance in Plasma SEPT9 Gene Methylation Assay for Colorectal Cancer Early Detection.* World J Gastrointestinal Oncology 2018; 10(1): 15-22.

Analysis of *SEPT9* Gene Promoter Methylation Status in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Aida Mirza Aghasi ¹, Saied Ghorbian ^{*2}

Original Article

Introduction: The changes in the level of *SEPT9* gene promoter methylation can contribute to the formation of esophageal squamous cell carcinoma. The aim of this study was to evaluate the level of changes in the level of *SEPT9* gene promoter methylation in the esophageal squamous cell carcinoma.

Methods: In the present case-control study, we collected 75 paraffin blocks of esophageal cancer tissues and 75 paraffin blocks healthy tissues, which were referred to the Noor-E-Nejat and Tabriz International Hospitals during 2013-2017. After DNA extraction and treatment with sodium metabisulfite, the changes of *SEPT9* gene promoter methylation assessed using high resolution melting (HRM) technique. The data were analyzed by SPSS 22 and Chi-square test.

Results: Our findings did not show a statistically significant difference between the changes of *SEPT9* gene promoter methylation in cancer tissues compared to the healthy tissues (P=0.106).

Conclusion: This study shows that *SEPT9* gene promoter methylation cannot contribute to the esophageal squamous cell carcinoma cancerogenesis.

Keywords: Methylation, Esophageal cancer, ESCC, *SEPT9*

Citation: Mirza Aghasi A, Ghorbian S. Analysis of *SEPT9* Gene Promoter Methylation Status in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2020; 27(10): 1981-92.

¹Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

²Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09132629389, email: s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir