مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هفتم، شماره دهم، دی ۱۳۹۸
تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۱۱/۰۹
تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۱/۲۴

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

آیدا میرزاآقاسی[۱]، سعید قربیان[*۲]

مقاله پژوهشی

مقدمه: تغییر در سطح متیلاسیون پروموتر ژن SEPT9 می‌تواند در شکل‌گیری کارسینوم سلول سنگفرشی مری نقش داشته باشد. لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان تغییرات سطح متیلاسیون پروموتر 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 پروموتر ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی نسبت به بافت‌های سالم، ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۱۰۶).

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

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

ارجاع: میرزا آقاسی آیدا ، قربیان سعید. **ارزیابی وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* در مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی مری**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۱۰): ۹۲-۱۹۸۱.

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

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 (۲، ۱). 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 مبتلابه 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 (۵، ۴). حضور و درجه متاستاز لنفاوی پیامدهای بالینی مهمی برای انتخاب درمان صحیح در بیماران دچار کارسینوم سلول سنگفرشی مری دارد. تصویربرداری‌هایی ازجمله توموگرافی کامپیوتری سطری مالتی‌دتکتوری، 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٪ گزارش‌شده 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 باقدرت پیش‌بینی بالا برای درمان مؤثر بدخیمی ضروری است (۸ ـ 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، ازجمله 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 موردبررسی قرارگرفته است (۱۲-۱۰). هیپرمتیلاسیون DNA شامل اتصال گروه‌های متیل به CpG دی نوکلئوتیدی‌ها در ناحیه پروموتر ژن بوده و بنابراین بیان آن کنترل می‌شود. متیلاسیون DNA نابجای جزایر CpG در ناحیه پروموتر ژن‌های مهارکننده تومور به‌طور گسترده در چندین نوع سرطان گزارش‌شده است (۱۴، ۱۳). هم‌چنین مطالعات بسیاری درباره متیلاسیون DNA نابجا در ESCC گزارش‌شده است (۱۵).

علاوه براین، تعداد نواحی ویژه‌ای که دستخوش تغییرات متیلاسیون شده‌اند و در ارتباط با LNM در ESCC می‌باشند، گزارش‌شده است (۱۸-۱۶). در بررسی اخیر، Nagata و همکاران در یک مطالعه Genome-wide وضعیت متیلاسیون CpG واقع در منطقه پروموتر هشت ژن ازجمله *FES*،*DDIT3*، *FLT3*،*NTRK3*، *SEPT5*، *SEPT9*، *SOX1* و SOX17 به منظور شناسایی نشانگرهای پیش‌آگهی دهنده در بیماران مبتلابه 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 ژن های *HOXB2* و *SEPT9* را به عنوان نشانگرهای پیش‌بینی کننده LNM در ESCC معرفی شدند (۱۵). ژن *SEPT9* بر روی کروموزوم 17q25.3 انسانی قرار دارد. محصول ژن یکی از اعضاء 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 اپی ژنتیکی ممکن

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

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 شناسایی‌شده‌اند. ارتباط بین سپتین‌ها با اکتین و توبولین برای انجام سیتوکینز تقسیم سلولی ضروری است. به دلیل نقش مهم سپتین ها 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 پروموتر 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 پروموتر 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 پروموتر 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 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 آندوسکپی تحت درمان‌های رادیوتراپی و یا شیمی‌درمانی قرار نگرفته بودند. هم‌چنین نمونه هایی 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 قرارگرفته 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 به‌صورت کاملاً محرمانه و با رعایت کامل موازین، به‌طوری‌که 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 گرداوری شدند.

استخراج *DNA* و تیمار با متابی سولفیت سدیم

به‌منظور جداسازی DNA از نمونه‌های بلوک پارافینی از کیت NucleoSpin® DNA FFPE XS بر اساس راهنمای کیت شرکت سازنده (Macherey-Nagel-آلمان) انجام شد. کمیت 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 EpiMark®.Bisulfite Conversion (Biolabs New England-انگلستان) فرآیند تیمار با بی‌سولفیت سدیم مطابق دستورالعمل پیشنهادی کیت انجام گرفت.

در طی فرآیند تیمار با بی سولفیت 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 متیل‌ترانسفرازی قرار گرفته و تبدیل به ۵-متیل سیتوزین شده باشند، تیمار تأثیری بر روی آنها نخواهد گذاشت و تغییر نیافته باقی خواهند ماند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

برای ارزیابی میزان متیلاسیون پروموتر ژن از دستگاه مربوطه Eco شرکت Eco Biosystems (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 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.

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

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	اندازه محصول PCR
SEPT9-F	5'-CGGTGATAGAGAATTTTGTTTGGT-3'	۱۷۸جفت باز
SEPT9-R	5'-CGACCTCAACCCCTCCC-3'	

در واکنش‌های تعیین درصد متیلاسیون پروموتر 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.

تجزیه‌وتحلیل 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., Chicago, IL; Version 16 انجام و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ 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.

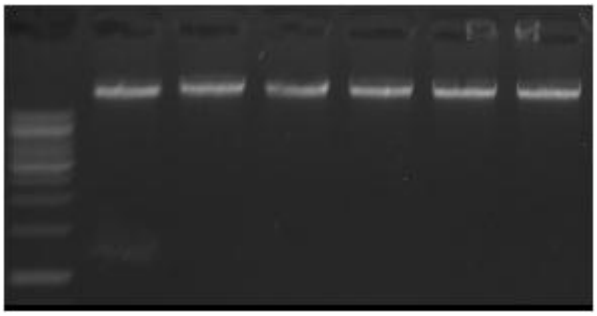
نتایج

در این تحقیق، سطح متیلاسیون پروموتر 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

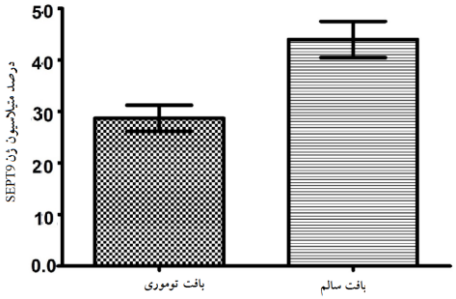
[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

بیماران مبتلابه ESCC در گروه هیپومتیله ۵۹/۲±۲/۵۳ سال و در گروه هایپرمتیله ۶۱/۸±۳/۱ سال بود که اختلاف معناداری نشان نداد (*P*=۰/۲۹۵). ۳۷ مورد از نمونه‌ها (۴۹٪) پروموتر هیپومتیله و در ۳۸ مورد (۵۱٪) هایپرمتیله شناسایی شدند. درصد متیلاسیون در گروه هیپومتیله در Stageهای مختلف متفاوت بودند. به‌طوری‌که 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.



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

در این مطالعه، وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* در نمونه‌های بلوک پارافینی با روش HRM مورد بررسی قرار گرفت. به‌طورکلی، HRM می‌تواند به‌عنوان 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 پروموتر ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم تفاوت معناداری را نشان نداد (*p*=۰/۱۰۶) (شکل ۱). در این مطالعه، حساسیت و اختصاصیت برای شناسایی سطح متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* با روش HRM به ترتیب ۸۰٪ و ۷۸٪ به‌دست آمد. علاوه براین، فراوانی متیلاسیون با ویژگی‌های بالینی و اطلاعات دموگرافیکی بیماران مبتلابه ESCC مورد مقایسه قرار گرفت که با هیچ‌کدام از پارامترهای Stage بیماری (*p*=۰/۱۶۶)، متاستاز (*p*=۰/۰۶۴)، مصرف نوشیدنی‌های داغ (*p*=۰/۱۱۰)، مصرف الکل (*p*=۰/۱۱۳)، موقعیت اجتماعی (*p*=۰/۳۰۱) و میزان مصرف سیگار (*p*=۰/۷۱۳) ارتباط معناداری نشان داده نشد (جدول ۲).



شکل ۱: مقایسه درصد متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت توموری نسبت به بافت سالم در مبتلایان به سرطان مری. اختلاف معناداری ازنظر سطح متیلاسیون در بین دو بافت نشان داده نشد (*P*>۰/۰۵).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

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

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

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

جمعیت شمال غرب ایران انجام شد، وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* را در نمونه‌های بلوک پارافینی و با روش HRM مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر، از نظر درصد متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم تفاوت معناداری را نشان نداد به‌طوری‌که با نتایج محققان پیشین متناقض بود. تاکنون مطالعات متعددی بر روی وضعیت متیلاسیون پروموتر 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 انجام‌شده بود، حساسیت و اختصاصیت این روش سنجش متیلاسیون برای تشخیص بیماری به ترتیب۹۵/۶٪ و ۸۴/۸٪ گزارش کرده بودند. نتایج حاصل از این بررسی اختلاف معناداری از نظر سطح متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* در بافت‌های سرطانی نسبت به سالم نشان داد (۲۹). علاه براین، 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 پروموتر ژن *SEPT9* به‌عنوان 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 پروموتر این ژن در سرطان روده بزرگ گزارش‌شده است، درصد متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* در نمونه‌های بافت سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم تفاوت معناداری را نشان نداد. البته مطالعه الگوی متیلاسیون پروموتر ژن *SEPT9* در مبتلایان به ESCC تنها در یک مورد گزارش‌شده است (۱۵). در ارزیابی Nagata و همکاران که به‌صورت Genome-wide طراحی‌شده بود، غربالگری DNA متیله شده و ارتباط آن با متاستاز به غدد لنفاوی در مبتلایان 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 پروموتر ژن ازنظر سطح متیلاسیون موردسنجش قرار گرفت. در این مطالعه از سه ژن *SLC15A3،HOXB2* و *SEPT9* به‌عنوان کاندید پیش‌آگهی دهنده متاستاز به غدد لنفاوی در مبتلایان به ESCC انتخاب‌شده بودند. نتایج مطالعه آنان نشان داد که پروموتر ژن‌های *HOXB2* و *SEPT9* در نمونه‌هایی که ازنظر متاستاز مثبت بودند به‌شدت متیله شده بودند. بر اساس این نتایج، پیشنهادشده بود که ژن‌های *HOXB2* و *SEPT9* ممکن است به‌عنوان نشانگرهای اپی‌ژنتیکی در پیش‌بینی و ارزیابی متاستاز در مبتلایان به ESCC مؤثر باشند. علاوه براین، نتایج آن‌ها نشان داد که سطح متیلاسیون ژن *SEPT9* در بین بافت‌های سرطانیESCC نسبت به سالم در تمام Stageهای مختلف به‌طور 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 توبولین های الفا و بتا برهمکنش دارد. بررسی‌ها نشان داده‌شده که درنتیجه بیان SEPT9_i1 در سلول‌ها، با نقایص قابل‌توجهی 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 ازجمله تقسیم سیتوپلاسم، قطبیت سلول، انتقال وزیکول‌ها و ترمیم غشاء سلولی نقش دارند. پروتئین سپتین ۹ به نظر می‌رسد که به‌عنوان یک سرکوبگر توموری عمل می‌کند. این بدین معنی است که در تنظیم رشد سلول و ممانعت از رشد سریع و غیرقابل‌کنترل سلول‌ها نقش دارد. درنتیجه وقوع متیلاسیون در جزایر CpG در پروموتر ژن‌ها و افزایش سطح ۵- متیل سیتوزین در نواحی پروموتری، منجر به

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

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 اذعان کرد که نوع نمونه‌های مورد ارزیابی با یکدیگر متفاوت بودند. به‌طوری‌که در ارزیابی ما بر روی نمونه‌های بلوک پارافینه انجام گرفته بود درحالی‌که در مطالعه Nagata نمونه‌های بیوپسی تازه مورد بررسی قرار گرفته بود. از طرف دیگر نوع روش بکار گرفته شده در ارزیابی سطح متیلاسیون پروموتر ژن کاملاً متفاوت بود. مطالعه ما بر مبنای روش HRM بود درحالی‌که در روش مطالعه قبلی بر مبنای Pyrosequencing که دقت و حساسیت آشکارسازی فوق‌العاده‌ای دارد. علاوه براین 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 پروموتر ژن *SEPT9* که مورد سنجش قرار گرفته شده باشد. ازجمله 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 موردمطالعه قرارگرفته بودند. علاوه بر این، این نتایج مربوط به یک نژاد خاص (ترک) است که الزاماً قابل‌تعمیم 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 به‌طوری‌که بر حفظ تمامیت مولکول DNA نقش ویژه‌ای خواهد داشت. به‌هرحال به‌منظور تائید 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 پروموتر 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 تأمین‌شده است. از تمامی بیماران و پرسنل محترم مراکز درمانی که در این مطالعه یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع: وجود ندارد.

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

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 SurgOncol 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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

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, Ghojazadeh 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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences **Received: 29 Jan 2019**
Vol 27| NO 10 | Jan 2020 **Accepted: 13 Feb 2020**

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.

[1]Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
[2]Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09132629389, **email:** s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-19]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2405]