دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نوزدهم، شماره ۶، صفحه ۹۵۰– ۹۴۰ (بهمن و اسفند ۱۳۹۵)
Iran South Med J 2017; 19(6): 940-950

مطالعه وضعیت متیلاسیون ژن‌های NANOG1–، RASSF1A، SFN، CASP8، WIF1 و CTSL2 در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان پستان در ایران

علی متولی‌زاده اردکانی [1*]، مهسا شیرانی [1]، احمد هاشمی [1]، زهره بصیری [1]، یزدان رحمتی [1]، نوین نیک‌بخش [2]، سحر ادریسی [2]، شهلا محمدگنجی [1]

[1] پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
[2] مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۷/۲۸ - پذیرش مقاله: ۹۴/۱۱/۳)

چکیده

زمینه: غربالگری ماموگرافی برای تشخیص سرطان پستان در زنان جوان نتایج مثبت و منفی کاذب نشان می‌دهد و بنابراین برای تشخیص سرطان پستان در مراحل ابتدایی نیاز به یک روش غیرتهاجمی و کم هزینه دیگر نیز هست. تغییرات متیلاسیون DNA یکی از رایج‌ترین تغییرات مولکولی در سرطان‌های انسانی و از جمله سرطان پستان است. بنابراین بررسی الگوی متیلاسیون بافت‌ها می‌تواند در تشخیص زود هنگام سرطان مورد استفاده قرار گیرد. همچنین شباهت الگوهای متیلاسیون یافت شده در نمونه‌های توموری و در پلاسما، کاربرد بالقوه شناسایی مولکولی سرطان پستان، بر پایه خون را نشان می‌دهد. هدف از این بررسی ارزیابی قابلیت متیلاسیون پروموتور برای تشخیص بالینی سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی متیلاسیون پروموتور برای تشخیص بالینی سرطان پستان ۲۱ بافت توموری و ۲۱ بافت نرمال مورد مطالعه قرار گرفتند. وضعیت متیلاسیون ۶ ژن (NANOG1، RASSF1A، SFN، CASP8، WIF1 و CTSL2) با استفاده از روش PCR مختص متیلاسیون (MS-PCR) آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد ژن NANOG در ۹۴/۷ درصد نمونه‌های توموری و ۱۰۰ درصد نمونه‌های سالم، ژن RASSF1A در ۹/۵ درصد بافت‌های توموری و صفر درصد بافت‌های سالم، ژن SFN در ۱۴/۳ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم، ژن CASP8 در ۳۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم، ژن WIF1 در ۸۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم و ژن CTSL2 در ۲۸/۶ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم متیله بود. آنالیز داده‌ها توسط آزمون فیشر ارتباط معنی‌داری بین این نتایج نشان نداد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دادند که وضعیت متیلاسیون ۶ ژن برای افتراق دو گروه سرطانی و نرمال کافی نبوده است. این مطالعه مشکلات متدولوژی (MSPCR) استفاده شده در ارزیابی مارکرهای متیلاسیون برای ارزیابی وضعیت متیلاسیون به عنوان بیومارکرهای تشخیصی را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: متیلاسیون DNA، سرطان پستان، MSPCR، ژن های NANOG1، RASSF1A، SFN، CASP8، WIF1 و CTSL1

[*] تهران، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
Email: Ardekani@nigeb.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان و دومین عامل مرگ و میر زنان است (۱). در ایران نیز سرطان پستان عمومی‌ترین سرطان در بین زنان است، ۲۴/۴ درصد کل سرطان‌های زنان در ایران را سرطان پستان تشکیل می‌دهد. بیشترین شیوع سرطان پستان در ایران در سنین ۴۰ تا ۴۹ سال است و بیش از ۳۰ درصد بیماران زیر ۳۰ سال سن دارند (۲ و ۳).

ماموگرافی رایج‌ترین روش تشخیص سرطان پستان است و تشخیص سرطان توسط این تست، آمار مرگ و میر حاصل از سرطان پستان را کاهش داده است. با این وجود غربال‌گری ماموگرافی به خصوص در زنان جوان (کمتر از ۵۰ سال) نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب نشان می‌دهد که باعث درمان اضافی می‌شود.

حساسیت ماموگرافی در زنان ۵۰ ساله و بیشتر، ۶۸ تا ۹۰ درصد است، در حالی‌که این میزان در زنان ۴۰ تا ۴۹ ساله بین ۶۲ تا ۷۶ درصد تخمین زده می‌شود.

بنابراین ماموگرافی بیشتر متوجه زنان مسن‌تر (۵۰ تا ۶۹ سال) می‌شود. اما ۲۰ درصد سرطان‌های پستان در زنان جوان‌تر از ۵۰ سال رخ می‌دهد که سرطان تهاجمی‌تر و با رشد بیشتر دارند (۴). بنابراین نیاز به روش دیگری برای غربالگری است که بتواند در کنار ماموگرافی و به عنوان روشی کمتر تهاجمی و ارزان، فرایند غربالگری را بهبود بخشد.

الگوهای متیلاسیون DNA و ساختار اجزای کروماتین به شدت مرتبط با تغییرات در وضعیت اپی‌ژنوم هستند که بیان ژن را تنظیم می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که الگوی متیلاسیون DNA در سلول‌های توموری دارای تفاوت‌های اساسی نسبت به بافت نرمال است. همچنین فعالیت نادرست DNA متیل ترانسفرازها نیز در سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده است (۵ و ۶).

الگوهای متیلاسیون DNA علاوه بر تشخیص زودهنگام می‌توانند به طور بالقوه به عنوان بیومارکر برای پیش‌بینی خطر ابتلا، رده‌بندی انواع سرطان پستان، پیش آگهی بیماری و پاسخ به درمان استفاده شوند (۷). دو تغییر عمده در الگوی متیلاسیون DNA در سرطان پستان شامل هایپومتیلاسیون منطقه‌ای ژن‌های اختصاصی و هایپومتیلاسیون عمومی می‌باشند. هایپرمتیلاسیون، ژن‌های تنظیم کننده رشد را خاموش می‌کند و باعث رشد خارج از کنترل می‌شود در حالی‌که هایپومتیلاسیون به فعالیت ژن‌های مورد نیاز برای متاستاز می‌انجامد (۸).

مطالعات قبلی متیلاسیون ژن‌هایی مانند ژن‌های درگیر در تنظیم چرخه سلولی (p16INK4A، p14ARF، p15، CCDN2، DAPK)، ترمیم DNA (MGMT، hMLH1)، متابولیسم زنوبیوتیک (GSTP1)، انتقال پیام (RAR β2، APC، ER β) و چسبندگی و متاستاز (CDH1، CDH13) را نشان داده است (۹-۱۱). این تغییرات در مراحل اولیه سرطان اتفاق می‌افتند که نشان می‌دهد متیلاسیون DNA می‌تواند بیومارکری در تشخیص زودهنگام این بیماری باشد.

در این مطالعه متیلاسیون ۶ ژن NANOG1، RASSF1A، SFN، CASP8، WIF1 و CTSL2 در نمونه‌های توموری و بافت سالم افراد مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. NANOG1 فاکتور رونویسی را کد می‌کند که در حفظ ویژگی خودسازی و چندتوانی سلول‌های بنیادی جنینی عمل می‌کند (۱۲-۱۴)، ژن RASSF1A یک ژن سرکوبگر تومور است (۱۵ و ۱۶)، ژن SFN در تنظیم چرخه سلولی (۱۷)، ژن CASP8 در آپوپتوز و بلوغ سیتوکین‌ها (۱۸)، ژن Ctsl1 در تخریب پروتئین‌های داخل سلولی و خارج سلولی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

نقش دارد (۱۹) و ژن WIF1 پروتئینی را کد می‌کند که مهار کننده مسیر پیام رسانی WNT است (۲۰).

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، بافت توموری از ۲۱ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۲۱ نمونه بافت سالم مورد بررسی قرار گرفت. ۱۵ نمونه از این ۲۱ نمونه با تأیید کمیته اخلاق (IRB) دانشگاه علوم پزشکی بابل گردآوری و ۶ نمونه از بانک بافت سرطان ایران، واقع در بیمارستان امام خمینی ایران خریداری شد. DNA این بافت‌ها با استفاده از کیت استخراج AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit شرکت Bioneer استخراج شد. سپس DNA در معرض سدیم بیسولفیت قرار گرفت و بعد آزمایش MSPCR انجام شد. مرحله تیمار با سدیم بیسولفیت، سیتوزین غیرمتیله را در DNA به یوراسیل تبدیل می‌کند. سپس تست PCR برای تشخیص وضعیت متیلاسیون در منطقه‌ی مورد نظر انجام می‌شود.

برای انجام این مرحله محلول بی‌سولفیت با اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر آب به یک واحد پودر بی‌سولفیت به دست آمد. سپس ۸۵ میکرولیتر محلول بی‌سولفیت و ۳۵ میکرولیتر محلول محافظ DNA به محلول حاوی DNA اضافه شد. تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری حاوی ۲-۱ میکروگرم DNA، ۸۵ میکرولیتر مخلوط بی‌سولفیت، ۳۵ میکرولیتر بافر محافظت کننده DNA و آب مقطر فاقد RNAase آماده شد و محتویات هر میکروتیوب کاملاً مخلوط شد. سپس میکروتیوب‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر و سپس سانتریفوژ گذاشته شد. بافر BL شامل ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Carrier RNA به هر نمونه اضافه شد و سپس ترکیب حاصل در میکروتیوب‌های حاوی ستون فیلتردار به مدت ۱ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر BD به هر ستون اضافه شد و بعد از سانتریفوژ مجدد ۵۰۰ میکرولیتر بافر BW به هر ستون اضافه گردید. در روش MSPCR این DNA به صورت الگو در واکنش PCR استفاده می‌شود. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر این ۶ ژن در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR در ۴۰ سیکل انجام شد. شرایط دمایی این واکنش عبارت بود از: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، تکرار ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۵۰ ثانیه در ۵۵/۵ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه و طویل‌سازی نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه صورت گرفت. بعد از انجام واکنش PCR، الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد انجام شد.

آنالیزهای آماری

داده‌های مربوط به نمونه‌ها جمع‌آوری و معنی‌دار بودن یا نبودن آنها سنجیده شد. آنالیز آماری داده‌ها با آزمون Fisher انجام شد. نتایج با P<۰/۰۵ به عنوان نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۲۱ نمونه بافت توموری و ۲۱ نمونه بافت سالم مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA از این بافت‌ها کمیت و کیفیت DNA به‌وسیله نانودراپ و ژل آگارز سنجیده شد (شکل ۱). وضعیت متیلاسیون در پروموتور ژن‌های RASSF1A، SFN، CASP8، WIF1 و CTSL2 در این بافت‌ها از طریق تکنیک MSPCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). در شکل ۲ نمونه‌های ژل آگارز از ۴ ژن آورده شده است. محصول PCR هر ۶ ژن در جدول ۱ ذکر گردیده است.

نتایج MSPCR برای این ۶ ژن و آنالیز آنها توسط آزمون فیشر ارتباط معنی‌داری بین نتایج نشان نداد (جدول ۲).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در MSPCR ۶ ژن NANOG، RASSF1A، SFN، CASP8، CTSL2 ،WIF1

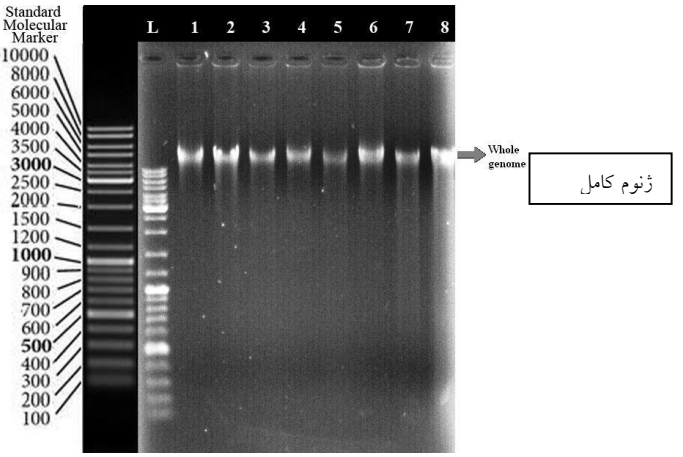
اسامی ژن‌ها	توالی (5' → 3')	محصول PCR(bp)
NANOG(M)-F	TTAGGTTGGAGTATAGTGGCGC	۲۲۸
NANOG(M)-R	CAATAAATTAAAAAACCGTAACAAACGA	۲۲۸
NANOG(U)-F	TTTAGGTTGGAGTATAGTGGTGTGA	۲۳۰
NANOG(U)-R	CCAATAAATTAAAAAACCATAACAAACA	۲۳۰
RASF1A(M)-F	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	۱۶۹
RASSF1A(M)-R	GCTAACAAACGCGAACCG	۱۶۹
RASSF1A(U)-F	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG	۱۶۹
RASSF1A(U)-R	CACTAACAAACACAAACCAAG	۱۶۹
SFN M(F)	TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC	۲۵۰
SFN(R)	CCTCTAACCGCCCACCACG	۲۵۰
SFN U(F)	ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT	۲۵۱
SFN U(R)	CCCTCTAACCACCCACCACA	۲۵۱
Caspase8 M(F)	TGTTGTTTGGGTAACGTATCGA	۱۰۵
Caspase8 M(R)	CCCTACTTAACTTAACCCTACTCGAC	۱۰۵
Caspase8 U(F)	TTGTTGTTTGGGTAATGTATTGA	۱۰۷
Caspase8 U(R)	CAACCCTACTTAACTTAACCCTACTCA	۱۰۷
CTSL2 M(F)	TTTGTGGGTTGAAGTCGGATCG	۱۳۵
CTSL2 M(R)	GAACCGAAACAAACAACTCCCG	۱۳۵
CTSL2 U(F)	TTTGTGGGTTGAAGTTGGATTG	۱۳۵
CTSL2 U(R)	GAACCAAAACAAACAACTCCCA	۳۵
WIFI M(F)	CGTTTTATTGGGCGTATCG	۱۴۴
WIFI M(R)	ACTAACGCGAACGAAATACGA	۱۴۴
WIFI U(F)	GGGTGTTTTATTGGGTGTATTGT	۱۴۵
WIFI U(R)	AAAAAAACTAACACAAACAAAATACAAAC	۱۴۵

جدول ۲) آنالیز آماری داده‌های متیلاسیون ژن‌های NANOG، RASSF1A، SFN، CASP8، WIF1، CTSL2
(UN: نامعلوم، M: حالت متیله، U: حالت غیر متیله، M/U: حالت متیله و غیرمتیله همزمان)

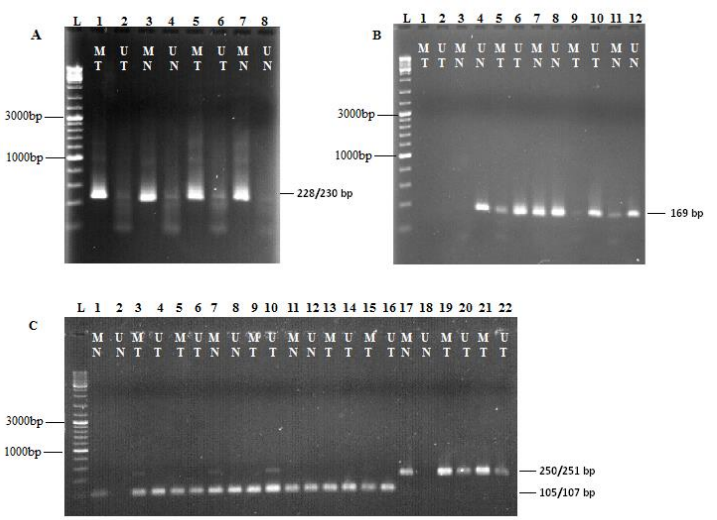
نام ژن‌ها	بافت تومور (۲۱ نمونه)					بافت نرمال (۱۹ نمونه)					گروه‌ها	مقدار P
	M/U (حالت متیله و غیرمتیله همزمان)	U (حالت غیرمتیله)	M (حالت متیله)	UN (نامعلوم)	جمع	M/U (حالت متیله و غیرمتیله همزمان)	U (حالت غیرمتیله)	M (حالت متیله)	UN(نامعلوم)	جمع		
NANOG	۱	۰	۱۸	۲	۲۱	۰	۰	۱۶	۳	۱۹	M vs U	۱
	-	-	-	-		-	-	-	-		M vs M/U	۱
	-	-	-	-		-	-	-	-		U vs M/U	۱
RASSF1A	۸	۱۱	۲	۰	۲۱	۴	۱۴	۰	۱	۱۹	M vs U	۰/۲۲
	-	-	-	-		-	-	-	-		M vs M/U	۱
	-	-	-	-		-	-	-	-		U vs M/U	۰/۲۹
SFN	۱۴	۴	۳	۰	۲۱	۱۲	۱	۵	۱	۱۹	M vs U	۰/۲۶
	-	-	-	-		-	-	-	-		M vs M/U	۰/۶۹
	-	-	-	-		-	-	-	-	-	U vs M/U	0/۳۷
CASP8	۹	۵	۶	۱	۲۱	۱۳	۰	۴	۲	۱۹	M vs U	۰/۲۳
	-	-	-	-		-	-	-	-		M vs M/U	۰/۴۵
	-	-	-	-		-	-	-	-		U vs M/U	۰/۰۴
WIF1	۴	۱۶	۰	۱	۲۱	۶	۷	۵	۱	۱۹	M vs U	۱
	-	-	-	-		-	-	-	-		M vs M/U	۰/۶
	-	-	-	-		-	-	-	-		U vs M/U	۰/۲۹
CTSL2	۲	۱۳	۶	۰	۲۱	۲	۱۱	۴	۲	۱۹	M vs U	۰/۲۲
	-	-	-	-		-	-	-	-		M vs M/U	۱
	-	-	-	-		-	-	-	-		U vs M/U	۰/۲۹

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]



شکل ۱) نمونه DNA استخراج شده از بافت. L: مارکر DNA، چاهک‌های ۱-۴ نمونه‌های بافت تومور، چاهک‌های ۵-۸ نمونه‌های بافت سالم



شکل ۲) نمونه آگارز ژل از محصول‌های MSPCR در تست متیلاسیون نمونه‌های بافت تومور و نرمال برای چهار ژن *NANOG*، *RASSF1A*، *CASP8*، *SFN*
A) محصول MSPCR ژن NANOG (طول محصول PCR در حالت متیله ۲۲۸bp و در حالت غیرمتیله ۲۳۰ bp است) *B*) محصول MSPCR ژن RASSF1A (طول محصول PCR در هر دو حالت متیله و غیرمتیله ۱۶۹ bp است.) *C*) محصول MCPCR دو ژن SFN و CASP8، ۱۶ چاهک اول مربوط به ژن SFN و ۶ چاهک بعدی مربوط به ژن CASP8 است. (طول محصول PCR برای ژن SFN در حالت متیله ۲۵۰bp و در حالت غیرمتیله ۲۵۱ bp و برای ژن CASP8 در حالت متیله ۱۰۵ و در حات غیرمتیله ۱۰۷ bp است.) *L*: مارکر *M*: نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر مخصوص حالت متیله *U*: نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر مخصوص حالت غیرمتیله *N*: نمونه‌های مربوط به بافت نرمال *T*: نمونه‌های مربوط به بافت توموری

بحث

مطالعات بسیاری تغییرات متیلاسیون ژن‌های مختلف مانند GSTP1، RASSF1A، RAR-B2، ESR1، APC، CyclinD2، RAR-β، E-cad، 14-3-3، Twist، HIN-1 و غیره را در بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان داده‌اند و بر اهمیت این موضوع در تشخیص زودهنگام سرطان تأکید کرده‌اند (۲۵-۲۱). فرگوسن (Ferguson) و همکاران با روش SAGE نشان دادند بیان ژن SFN (14-3-3 σ) در سلول‌های سرطان پستان ۷ برابر کمتر از سلول‌های اپی تلیال در

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]
[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

بافت سالم پستان است و این در حالی است که تغییرات ژنتیکی در این ژن مانند از دست رفتن هتروزیگوسیتی تنها در یک بیستم موارد و جهش در هیچ یک از موارد دیده نشد. تیمار رده‌های سلولی فاقد بیان با 5-azaCDR با متیلاسیون پروموتر و بیان مجدد SFN (14-3-3 σ) همراه بود (۲۶).

زوریتا (Zurita) و همکاران با استفاده از تکنیک QMSP و BSP متیلاسیون ژن SFN (14-3-3 σ) را در گروهی از بیماران سرطان پستان که در مراحل اولیه تحت درمان قرار گرفته‌اند و در حال حاضر بدون علائم متاستاز هستند و گروهی که در مراحل پیشرفته بیماری هستند مقایسه کردند و نشان دادند که سطح متیلاسیون SFN(14-3-3 σ) در گروهی که دچار متاستاز شده‌اند بیشتر از افراد سالم و بیماران مراحل اولیه است (۲۷).

ماهاوچ (Mhawech) و همکاران نشان دادند، کاهش بیان ژن SFN (14-3-3 σ) در سرطان تخمدان، پروستات و اندومتریال با متیلاسیون جزایر CpG در پروموتر این ژن همراه است (۲۸).

وا (Wu) و همکاران، متیلاسیون CASP8 و MASPIN را در ۴ ردهٔ سلولی سرطان پستان SKBR3، MDA-MB231، MCF-7 و HCC1937 دو ردهٔ سلولی غیر توموری MCF12A و MCF10 توسط MSPCR بررسی و مقایسه کردند. نتایج حاکی از کاهش بیان هر دو ژن در اثر متیلاسیون پروموتر در هر ۴ ردهٔ سرطانی بود، در حالی که دو ردهٔ غیر سرطانی غیر متیله بودند (۲۹).

هاپکینز (Hopkins) و همکاران نیز وضعیت متیلاسیون پروموتر ۳ ژن TRaI-R1، CASP8 و FAS را در تومور SCLC با روش MSPCR بررسی کرده و مشاهده کردند، متیلاسیون حداقل دو تا از این ژن‌ها در ۷۲ درصد تومورهای SCLC دیده می‌شود و این متیلاسیون همراه با کاهش بیان ژن‌های مربوطه می‌باشد، آنها همچنین نشان دادند تیمار این تومورها با 5-azadeoxycytidine تا حدی موجب بازگشت بیان این ژن‌ها شد (۳۰).

وانگ (Wang) و همکاران در بررسی تغییرات اپی‌ژنتیک ژن‌های چند توانی در سرطان کبد و چند رده سلولی سرطانی نشان دادند که در مقایسه با سلول‌های نرمال کبد (L02) که ۳۹ درصد متیلاسیون ژن NANOG را نشان می‌دهد، این ژن در رده‌های سلولی سرطان کبد (97H، 97L، PLC) هایپومتیله شده است (به ترتیب ۱۸، ۸ و ۱۴ درصد). همچنین آنها مشاهده کردند متیلاسیون NANOG در سلول‌های سرطانی خون K-۵۶۲ K، ۳۹ درصد بود که بیش از دو برابر نسبت به سلول‌های نرمال خون کاهش داشت (۸۱ درصد). در این مطالعه رده‌های سلولی دیگر سرطان‌ها متیلاسیون متفاوت پروموتر NANOG را نشان دادند. AGS، HCT116، MCF7 و Hela به ترتیب ۹۱، ۹۲، ۷۱ و ۲۵ درصد متیله بودند (۳۱).

باربی (Burbee) و همکاران در سال (۲۰۰۱) متیلاسیون پروموتر ژن RASSF1A را در ۲۲ رده سلولی سرطان پستان و در ۳۹ بافت توموری پستان بررسی کردند. آنها در ۶۴ درصد رده‌های سلولی سرطان پستان و در ۴۹ درصد بافت‌های توموری پستان، هایپرمتیلاسیون ژن RASSF1A را شناسایی کردند (۳۲).

دامان (Dammann) و همکاران در یک مطالعه مشاهده کردند جزایر CpG پروموتر ژن RASSF1A در ۵ رده سلولی سرطان پستان (MCF7، MDA-MB-157، MDA-MB-231، T47D، ZR75-1) کاملاً متیله بودند و در ۶۲ درصد تومورهای ۴۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان نیز پروموتر این ژن متیله بود (۳۳).

ویک (Veeck) و همکاران در سال ۲۰۰۹ الگوی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

متیلاسیون ژن WIF1 را در نمونه‌های بیماران سرطان پستان مطالعه کردند، یافته‌های آنها حاکی از وجود متیلاسیون در راه‌انداز این ژن در ۶۳/۳ درصد از نمونه‌ها بود (۳۴).

نتایج بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های NANOG1–، RASSF1A، SFN، CASP8، WIF1 و CTSL2 در مطالعه حاضر نشان داد، ژن NANOG در ۹۴/۷ درصد نمونه‌های توموری و ۱۰۰ درصد نمونه‌های سالم، ژن RASSF1A در ۹/۵ درصد بافت‌های توموری و صفر درصد بافت‌های سالم، ژن SFN در ۱۴/۳ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم، ژن CASP8 در ۳۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم، ژن WIF1 در ۸۰ درصد نمونه‌های توموری و ۲۷/۸ درصد نمونه‌های سالم و ژن CTSL2 در ۲۸/۶ درصد نمونه‌های توموری و ۲۳/۵ درصد نمونه‌های سالم، متیله بود، که هیچ‌کدام از این نتایج معنی‌دار نبود.

با وجود اینکه مطالعات قبلی تغییر در وضعیت متیلاسیون این ۶ ژن را در سرطان‌های مختلف نشان می‌دهد (۳۴–۲۱)، اما در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری میان میزان متیلاسیون این ژن‌ها و سرطان پستان دیده نشد. این امر می‌تواند به دلیل وجود مشکلات تکنیکی در این روش باشد. از جمله اینکه بافت‌هایی که از آنها DNA استخراج شده ممکن است حاوی سلول‌های توموری و سالم باشند. در نتیجه پس از استخراج DNA مخلوطی از DNA سلول‌های سالم و توموری به دست می‌آید که می‌تواند دارای پروموتر متیله و یا غیرمتیله‌ی ژن مورد نظر باشد. هتروژنوس بودن متیلاسیون برخی ژن‌ها در مطالعات قبلی دیده شده است (۳۸–۳۵). دلیل دیگر می‌تواند مربوط به هتروزیگوس بودن آلل‌های این ژن‌ها برای متیلاسیون پروموتر باشد. علاوه بر این، در یک بافت تومور، سلول‌های توموری در مراحل متفاوت سرطانی شدن قرار دارند. ممکن است تعدادی از سلول‌ها از نظر زمانی زودتر وارد مسیر سرطانی شدن شوند و بعد از آن در اثر پیشرفت سرطان، سلول‌های مجاور نیز فرایند سرطانی شدن را آغاز کنند. در نتیجه سلول‌های اولیه نسبت به سلول‌های مجاور در مراحل پیشرفته‌تر سرطان هستند. سلول‌هایی که در مراحل مختلف سرطان هستند می‌توانند متیلاسیون متفاوتی داشته باشند و این در چندین مطالعه نشان داده شده است (۴۳–۳۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه به محققین حوزه تشخیص زودرس سرطان در کشور نشان می‌دهد تا در طراحی مطالعه و استفاده از نمونه‌های بافتی بسیار دقت کنند، چرا که مطالعه وضعیت متیلاسیون با روش MSPCR می‌تواند با مشکلاتی مواجه شود که در بالا توضیح داده شد.

سپاس و قدردانی

این مقاله بخشی از مطالعه‌ای است که توسط گرانت تحقیقاتی شماره CRP/13/001 از طرف مرکز بین‌المللی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (ICGEB) به نویسنده مسئول این مقاله در سال ۲۰۱۳ تعلق گرفته و تحت حمایت مالی آن سازمان قرار داشت. همچنین از آقای آروتین غریبیان برای پیشنهادهایشان در مراحل مختلف انجام پروژه قدردانی می‌شود. نتایج این مطالعه در قالب پایان‌نامه دانشجویان ارشد در پژوهشگاه ارایه شد.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسنده بیان نشده است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

References:

1.Pal R, Srivastava N, Chopra R, et al. Investigation of DNA damage response and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. Mol Cancer 2010; 9: 303-9.
2.Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Breast J 2007; 13(4): 383-91.
3.Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, et al. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(1): 367-70.
4.Debald M, Franken S, Heukamp LC, et al. Identification of specific nuclear structural protein alterations in human breast cancer. J Cell Biochem 2011; 112(11): 3176-84.
5.Daniel FI, Cherubini K, Yurgel LS, et al. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. Cancer 2011; 117(4): 677-87.
6.Pogribny IP. Epigenetic events in tumorigenesis: putting the pieces together. Exp Oncol 2010; 32(3): 132-6.
7.Van De Voorde L, Speeckaert R, Van Gestel D, et al. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer. Mutat Res 2012; 751(2): 304-25.
8.Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. Biochem Pharmacol 2004; 68(6): 1187-97.
9.Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. Cancer Res 2004; 64(13): 4442-52.
10.Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in situ and invasive lobular breast carcinoma. Ine J Cancer 2003; 107(6): 970-5.
11.Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. Clin Cancer Res 2004; 10(16): 5349-54.
12.Ahmed IA, Pusch CM, Hamed T, et al. Epigenetic alterations by methylation of RASSF1A and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA. Cancer Genet Cytogenet 2010; 199(2): 96-100.
13.Bai L, Deng X, Li Q, et al. Down-regulation of the cavin family proteins in breast cancer. J Cell Biochem 2012; 113(1): 322-8.
14.Jeter CR, Badeaux M, Choy G, et al. Functional evidence that the selfrenewal gene NANOG regulates human tumor development. Stem Cells 2009; 27(5): 993-1005.
15.Brooks JD, Cairns P, Shore RE, et al. DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: Results of a nested case-control study. Cancer Epidemiol 2010; 34(6): 717-23.
16.Brooks J, Cairns P, Zeleniuch-Jacquotte A. Promoter methylation and the detection of breast cancer. Cancer Causes Control 2009; 20(9): 1539-50.
17.Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. Nat Rev Cancer 2003; 3(12): 931-43.
18.Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of “The End”. IUBMB Life 2000; 50(2): 85-90.
19.Santamaría I, Velasco G, Cazorla M, et al. Cathepsin L2, A novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. Cancer Res 1998; 58(8): 1624-30.
20.Shepelev MV, Korobko EV, Korobko IV. WIF1: perspectives of application in oncology. Mol Gen Mikrobiol Virusol 2005; (4): 3-7.
21.Bae YK, Shim YR, Choi JH, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and plasma of breast cancer patients. Cancer Res Treat 2005; 37(4): 233-40.
22.Bardowell SA, Parker J, Fan C, et al. Differential methylation relative to breast cancer subtype and matched normal tissue reveals distinct patterns. Breast Cancer Res Treatment 2013; 142(2): 365-80.
23.Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the cpG island of Ras

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21. 3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. Cancer Res 2001; 61(7): 3105-9.

24.Martínez-Galán J, Torres B, Del Moral R, et al. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. Cancer Biol Therapy 2008; 7(6): 958-65.

25.Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M, et al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARβ2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. Breast Cancer Res Treat 2012; 132(1): 165-73.

26.Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, et al. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 σ locus leads to gene silencing in breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(11): 6049-54.

27.Zurita M, Lara PC, del Moral R, et al. Hypermethylated 14-3-3-sigma and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. BMC Cancer 2010; 10: 217.

28.Mhawech P, Benz A, Cerato C, et al. Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. Mod Pathol 2005; 18(3): 340-8.

29.Wu Y, Alvarez M, Slamon DJ, et al. Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. BMC Cancer 2010; 10: 32.

30.Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, et al. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. Cell Death Diff 2003;10(3): 356-64.

31.Wang XQ, Ng RK, Ming X, et al. Epigenetic regulation of pluripotent genes mediates stem cell features in human hepatocellular carcinoma and cancer cell lines. PLoS One 2013; 8(9): e72435.

32.Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. Cancer Res 2001; 61(7): 3105-9.

33.Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. J Natl Cancer Inst 2001; 93(9): 691-9.

34.Veek J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010; 15(1): 5-17.

35.Zare M, Rastgar Jazii F, Alivand MR, et al. Qualitative analysis of Adenomatous Polyposis Coli promoter: hypermethylation, engagement and effects on survival of patients with esophageal cancer in a high risk region of the world, a potential molecular marker. BMC Cance 2009; 9: 24.

36.Rasti M, Arabsolghar R, Azmand S. Methylation Status of Tumor-Related Genes in Mcf7, Mda-Mb-468 and Bt-474 Breast Cancer Cell Lines with Different Estrogen Receptor Status. Middle East J Cancer 2014; 5(4): 207-13.

37.Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 1995; 55(20): 4525-30.

38.Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, et al. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. Cancer Res 2001; 61(3): 900-2.

39.Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. Biochem Pharmacol 2004; 68(6): 1187-97.

40.Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. Cancer Res 2005; 65(4): 1141-5.

41.Kloten V, Becker B, Winner K, et al. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. Breast Cancer Res 2013; 15(1): R4.
42.Mirza S, Sharma G, Parshad R, et al. Clinical Significance of Promoter Hypermethylation of ERb and RARb2 in Tumor and Serum DNA in Indian Breast Cancer Patients. Ann Surg Oncol 2012; 19(9): 3107-15.
43.Naeimi S. Study of P14/ARF Gene Promoter Methylation and Effect of Interleukin-17 Gene Polymorphism on this Methylation among Breast Cancer Patients. Iran South Med J 2016; 19(5): 809-18. (Persian)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]

Iran South Med J 2017; 19(6): 940-950

Original Article

Methylation Status of *NANOG1*, *RASSF1A*, *SFN*, *CASP8*, *WIF1*,*CTSL2* Genes in Iranian Breast Cancer Patients

A. Motevalizadeh Ardekani [1*], M. Shirani [1], A. Hashemi [1], Z. Basiri [1], Y. Rahmati [1], N. Nikbakhsh [2], S. Edrisi [2], S. Mohammadganji [1]

[1] Department of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[2] Cancer Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received 20 Oct, 2015 Accepted 23 Jan, 2016)

Abstract

Background: Mammographic screening to diagnose the breast cancer showe false-negative and false-positive results in young women and therefore a non-invasive and low cost method is needed, to diagnose the breast cancer in the early stages. DNA methylation changes are the most common molecular changes in human cancers and including breast cancer. Therefore, The pattern of tissues methylation can be used in the early diagnosis of cancer. Also similar methylation patterns found in tumors and in plasma shows potential application of molecular detection of breast cancer, based on blood. The aim of this study was to assess the promoter methylation for the clinical diagnosis of breast cancer.

Material and Methods: To examine the promoter methylation 21 tumor tissues and 21 normal tissues have been studied for clinical diagnosis of breast cancer. 6 gene methylation status (*NANOG1*, *RASSF1A*, *SFN*, *CASP8*, *WIF1* and *CTSL2*) was analyzed by methylation specific PCR (MS-PCR).

Results: The results show that NANOG gene was methylated in 94.7% of tumor specimen and 100% of normal specimen, RASSF1A gene was methylated in 9.5% of tumor specimen and 0% of normal specimen, SFN gene was methylated in 14.3% of tumor specimen and 27.8% of normal specimen, CASP8 gene was methylated in 30% of tumor specimen and 23.5% of normal specimen, WIF1 gene was methylated in 80% of tumor specimen and 27.8% of normal specimen, CTSL2 gene was methylated in 28.6% of tumor specimen and 23.5 % of normal specimen were methylated. Data analysis did not show a significant relationship between these results. (P >0.05).

Conclusion: The results of this study demonstrate that 6 gene methylation status was not enough to differentiate between the cancer and normal groups. This study demonstrates the methodological problems (MS PCR) which was used to assess the methylation markers to evaluate the methylation status as diagnostic biomarkers.

Key words: DNA methylation, breast cancer, MS-PCR, *NANOG1*, *RASSF1A*, *SFN*, *CASP8*, *WIF1*،*CTSL2* genes

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Motevalizadeh Ardekani A, Shirani M, Hashemi A, Basiri Z, Rahmati Y, Nikbakhsh N, Edrisi S, Mohammadganji S. Methylation Status of NANOG1, RASSF1A, SFN, CASP8, WIF1,CTSL2 Genes in Iranian Breast Cancer Patients. Iran South Med J 2017; 19(6): 940-950.

Copyright © 2017 Motevalizadeh Ardekani, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*] *Address for correspondence:* Department of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran; E-mail: Ardekani@nigeb.ac.ir.

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.940]