مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات متیلاسیون راه‌انداز ژن ویمنتین در سرطان پستان

ناهید نجات[۱]، سید احمد آل‌یاسین[۲*]، سید عبدالحمید انگجی[۱]، سعید آیریان[۱]

۱- دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: تغییرات اپی‌ژنتیکی از رایج‌ترین تغییرات در ایجاد انواع سرطان‌هاست. این تغییرات در سلول باعث کاهش یا افزایش بیان ژن‌های خاصی می‌شوند که در سبب‌شناسی سرطان نقش مهمی دارند. افزایش بیان ژن ویمنتین به علت تغییرات اپی‌ژنتیکی در انتقال از مرحله اپیتلیال به مزانشیمال (EMT) در سرطان پستان به‌خوبی مشخص شده است. ویمنتین نشانگر اصلی EMT است که این وظیفه را از طریق افزایش بیان ژن‌های مرتبط با EMT در طی تهاجم انجام می‌دهد. هدف این تحقیق بررسی متیلاسیون راه‌انداز ژن ویمنتین در یک جایگاه مشخص است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی الگوی متیلاسیون راه‌انداز ژن ویمنتین در یک جایگاه خاص در افراد سالم و بیمار بررسی شد. خون‌گیری از ۳۰ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۳۰ فرد سالم انجام شد. جهت بررسی متیلاسیون، از روش Restriction Enzyme PCR استفاده گردید. DNA نمونه‌ها مورد تیمار آنزیمی قرار گرفت. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت بررسی کیفی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی جهت بررسی کمّی متیلاسیون انجام شد.

نتایج: با استفاده از Ct value و فرمول $\%Me = (e^{-0.7\,(\Delta Ct)})$ متیلاسیون نمونه‌ها به دست آمد. در نرم‌افزار SPSS ارتباط متیلاسیون بابیان گیرنده‌های استروژن (ER)، پروژسترون (PR) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) بررسی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که راه‌انداز ژن ویمنتین در جایگاه موردبررسی به‌صورت قابل‌ملاحظه‌ای متیلاسیون خود را ازدست‌داده و با ER همبستگی داشته ولی با PR و HER2 همبستگی ندارد ($p = 0/5$) درنتیجه می‌توان متیلاسیون ژن ویمنتین در این جایگاه به‌عنوان یک نشانگر مولکولی پیشنهاد کرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، متیلاسیون، ویمنتین، هضم آنزیمی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی

مقدمه

سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در بین زنان و دومین دلیل رایج مرگ ناشی از سرطان در دنیا است (۱). بر اساس آمارهای سازمان جهانی بهداشت در دنیا از هر ۱۰ زن، یک نفر و در ایران از هر ۱۵ زن یک نفر احتمال ابتلا به این نوع سرطان را دارا است (۲). این بیماری ازنظر ویژگی‌های مولکولی و الگوهای بیان ژن به پنج گروه شامل لومینال A، لومینال B، غنی از HER2، شبه بازال و کلودین کاهش‌یافته تقسیم می‌شود که هرکدام از آن‌ها ویژگی‌های زیست‌شناختی و تشخیصی خاصی دارند (۳). سرطان پستان یک بیماری چندعاملی است که در اثر تأثیر متقابل عوامل ژنتیکی و غیرژنتیکی/محیطی ایجاد می‌شود و تجمع پیش‌رونده این تغییرات منجر به بروز آن می‌شود. دلایل غیرژنتیکی مانند سابقه قاعدگی و تولیدمثلی، وزن بالای بدن، مصرف الکل، دوز بالای استروژن و کاهش فعالیت فیزیکی در بروز این سرطان مؤثراند. دلایل ژنتیکی با جهش در ژن‌های مستعد کننده خاصی ازجمله BRCA1 و BRCA2 همراهی نشان می‌دهند (۴). تغییرات اپی‌ژنتیکی از رایج‌ترین تغییرات در انواع سرطان‌ها هستند. این تغییرات در سلول باعث کاهش یا افزایش بیان ژن های خاصی می‌شوند که در سبب‌شناسی سرطان نقش مهمی دارند. از تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌توان به متیلاسیون DNA، تغییرات هیستون‌ها و RNAهای مداخله‌گر اشاره کرد (۵).

متیلاسیون DNA یک تغییر پس از همانندسازی است که تقریباً همیشه در پنجمین موقعیت حلقه پیرمیدین نوکلئوتیدهای سیتوزین در جزایر CpG اتفاق می‌افتد. در انسان،

*نویسنده مسئول: سید احمد آل یاسین، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران Email: Sogand@nigeb.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-0224-9726

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

جزایر CpG در انتهای ´۵، ۶۰٪ ژن‌ها قرار دارند و دارای سه نوع الگوی متیلاسیون هستند: کاملاً متیله در کروموزوم X و یا ژن-هایی که در مقطع خاصی بیان‌شده و دیگر بیان نمی‌شوند، کاملاً هیپومتیله در ژن‌های خانه‌دار و متیله ناهمگن در بافت‌های مختلف بدن و سلول‌های سرطانی (۶). هایپومتیلاسیون با فعال شدن ژن و ناپایداری کروموزوم مرتبط است و ممکن است به بیان بیش‌ازحد پروتو انکوژن‌ها، افزایش نوترکیبی، افزایش نرخ جهش، از دست رفتن مهرگذاری‌های ژنومی و غیرفعال شدن منحرف‌شده کروموزوم x منجر شود (۷). هایپرمتیلاسیون باعث سرکوب و خاموشی ژن‌های سرکوبگر تومور، ژن‌های ترمیمی DNA و ژن‌های مهارکننده تهاجم و رگ‌زایی می‌شود (۸). این تغییرات را می‌توان به‌عنوان نشانگرهای سرطان در انسان در نظر گرفت. شناخت تغییرات اپی‌ژنتیکی و ارتباط آن‌ها با سرطان پستان درزمینه تشخیص، پیش‌آگهی و درمان از اهمیت زیادی برخوردار است (۹).

در مطالعات متعددی ارتباط بین انتقال از مرحله اپیتلیال به مزانشیمال (EMT) و فرآیند تهاجم در بدخیمی‌ها تائید شده است (۱۰). EMT در مراحل اولیه تکامل رویان (امبریوژنز)، در سلول‌های اپی‌تلیال برای ایجاد اولین لایه‌ی مزودرمی اتفاق می-افتد و متعاقباً، اکتودرم با روش‌های متعددی منجر به ایجاد ماهیچه، استخوان، عصب و بافت همبند می‌شود (۱۱). در طی EMT سلول‌های اپیتلیالی در یک واحد مجتمع سازمان‌دهی می-شوند و با از دست دادن پروتئین‌های اتصال سلولی و عناصر اسکلت سلولی (مانند اتصالات کادهرین/ ادهرین، اتصالات سخت و دسموزومی، اینتگرین‌های جانبی و سیتوکراتین) به دست آوردن جنبش و کادهرین‌های مزانشیمی و غنی شدن از ویمنتین به سلول‌های مزانشیمال تبدیل می‌شوند (۱۲).

افزایش بیان ویمنتین به علت تغییرات اپی‌ژنتیکی در EMTs در سرطان پستان به‌خوبی مشخص شده است و از طرفی ارتباط بین EMT و تهاجم و متاستاز نیز تائید شده است. در ابتدا تصور می‌شد که ویمنتین تنها به‌عنوان مارکری در مرحله مزانشیمال عمل می‌کند اما یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که این پروتئین نقش مهمی در ایجاد فنوتیپ مزانشیمی دارا است (۱۳).

ژن ویمنتین روی کروموزوم ۱۰p۱۳ قرار دارد و یک فیلامنت حد واسط نوع III را کد می‌کند. این پروتئین ۴۶۶ اسیدآمینه داشته و 57-kDa وزن دارد، غنی از مارپیچ‌های α محافظت‌شده بوده و ساختار Coiled-coil دارد. ویمنتین فیلامنت حد واسط اختصاصی در سیتوپلاسم سلول‌های مزانشیمال است؛ یعنی جایی که شبکه اسکلت سلولی خود را تشکیل می‌دهد (۱۴). ویمنتین در پایداری mRNA کلاژن، پروتئین Scrib و گیرنده تیروزین کینازی Axl1 نیز نقش‌های مهمی دارد. Scrib پروتئینی است که در مهاجرت سلول نقش دارد و تا زمانی که با ویمنتین تعامل دارد از تخریب توسط پروتئازوم محافظت می-شود، این پروتئین واسطه نقش ویمنتین در افزایش ظرفیت تهاجم سلول توموری است (۱۵). ویمنتین با القا و تحریک Axl1 نیز مهاجرت سلولی را افزایش می‌دهد (۱۶). ویمنتین یکی از پروتئین‌های اصلی روی غشا است که باعث اتصال سلول به بستر ماتریکسی بافت می‌شود. این پروتئین نوعی پروتئین لنگر انداز است. هایپومتیلاسیون ویمنتین با افزایش بیان آن در ارتباط بوده و در اتصال سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر و متاستاز در سلول‌های مهاجم نقش اساسی دارد (۱۷).

با توجه به پیش‌آگهی ضعیف در سرطان‌های پستان بابیان بالای ویمنتین، تشخیص زنانی که در معرض ریسک بالای ابتلا به سرطان پستان هستند و دادن مشاوره ژنتیکی مناسب به آن‌ها امری ضروری است. درصورتی‌که کاهش متیلاسیون ویمنتین با افزایش بیان ژن و متاستاز مرتبط باشد، اگر در فرد مبتلا به سرطان پستان الگوی متیلاسیون ژن ویمنتین در جایگاه مشخصی بررسی و با افراد سالم مقایسه شود و تفاوت معناداری بین آن‌ها دیده شود، می‌توان از متیلاسیون این نقطه به‌عنوان یک نشانگر مولکولی در پیش‌آگهی استفاده کرد. در این مطالعه مورد- شاهدی، متیلاسیون راه‌انداز ژن ویمنتین با فرض نشانگر، در یک جایگاه مشخص در افراد بیمار و سالم بررسی‌شده و ارتباط آن با گیرنده‌های استروژن (ER)، پروژسترون (PR) و فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) تعیین گردیده است.

مواد و روش ها

استخراج DNA: از ۳۰ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان و ۳۰ زن سالم، نمونه خون محیطی (در لوله‌های حاوی EDTA) گرفته شد. نمونه‌گیری بیماران از بیمارستان امام خمینی تهران با کسب رضایت کتبی آگاهانه انجام شد. DNA نمونه‌های تازه با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران) طبق روش ذکرشده‌ی کیت، استخراج و کیفیت DNAهای استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودارپ (شرکت Thermo fisher، آمریکا) در طول‌موج ۲۸۰/۲۶۰ nm بررسی شد.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

بررسی جزایر CpG در راه‌انداز ژن ویمنتین و طراحی پرایمر: توالی راه‌انداز ژن ویمنتین با استفاده از پایگاه داده TRED (Transcriptional Regulatory Element Database) مشخص شد. مناطق CpG با احتمال متیلاسیون نزدیک به ۱۰۰ توسط پایگاه داده CpG plot تعیین گردید. جایگاه‌های برش برای آنزیم‌های محدودکننده حساس به متیلاسیون در توالی راه-انداز در این مناطق با کمک پایگاه داده NEB Cutter بررسی شد. از بین آنزیم‌های موجود آنزیم SacII با جایگاه برش CCGCGG انتخاب شد. با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner برای دو طرف جایگاه برش آنزیم، پرایمر طراحی گردید و توالی پرایمرها در سایت Primer BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرها و دمای ذوب آن‌ها

Primers	Sequence	Tm
Forward	5ó-GACCATGCCCAGTCCCAG-3ó	59.73°c
Reverse	3ó-CAGGTCAGGAGACGGTGAGA-5ó	60.61°c

آماده‌سازی نمونه‌های DNA با واکنش هضم آنزیمی: واکنش هضم آنزیمی برای نمونه‌های بیمار و سالم برای توالی CCGCGG با استفاده از آنزیم حساس به متیلاسیون SacII (شرکت TaKaRa، ژاپن) انجام شد. هضم‌های آنزیمی در دو تیوب مجزا یکی دارای آنزیم و دیگری بدون آنزیم به‌عنوان کنترل انجام گردید. برای اطمینان از هضم کامل واکنش‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه عمل آنزیم است، طبق دستور شرکت سازنده، انکوبه شدند. برش در جایگاه شناسایی آنزیم در صورت غیرمتیله بودن انجام خواهد شد و عدم انجام برش به معنای متیله بودن جایگاه است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (شرکت امپلیکون، دانمارک) در ۳۵ سیکل برای نمونه‌های هضم شده و کنترل (بدون تیمار آنزیمی) با این شرایط انجام شد: ۹۵°c برای ۵ دقیقه، ۹۵°c برای ۱ دقیقه، °c ۶۴ برای ۴۵ ثانیه، ۷۲°c برای ۴۰ ثانیه و ۷۲°c برای ۱۰ دقیقه. الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE به‌منظور بررسی محصولات PCR انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی به روش سایبرگرین (SYBR green Real time PCR): واکنش زنجیره-ای پلیمراز زمان واقعی با استفاده از کیت SYBR green Real time PCR (شرکت TaKaRa، ژاپن) برای DNA تیمار شده و تیمار نشده در گروه بیمار و سالم با شرایط دمایی قبل انجام شد. درصد متیلاسیون در نمونه‌های DNA با توجه به مقادیر value Ct و فرمول $\%Me = (e^{-0.7\,(\Delta Ct)})$ تعیین می‌شود. ΔCt=1 نشان‌دهنده ۵۰ درصد شکست و ΔCt=2 نشان‌دهنده ۷۵ درصد شکست در نمونه‌های تیمار شده توسط آنزیم است.

محاسبات آماری: داده‌های Real time PCR با استفاده از نرم‌افزار LinReg برای هر واکنش تجزیه‌وتحلیل شدند. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گردید. مقایسه بین ۳۰ نمونه بیمار و ۳۰ نمونه سالم با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) صورت گرفت. سپس ارتباط متیلاسیون ویمنتین با ER، PR و HER2 با همبستگی Eta بررسی شد، زیرا متیلاسیون داده‌ای کمّی و مارکرهای ER، PR و HER2 داده‌هایی کیفی هستند. (p = ۰/۵) به‌عنوان حد آماری معنادار در نظر گرفته شده است.

نتایج

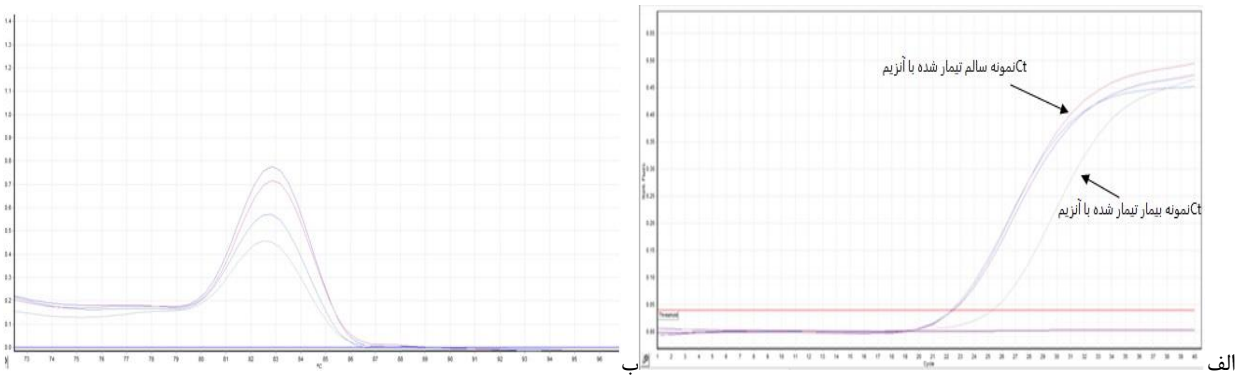
بررسی متیلاسیون ژن ویمنتین با روش Restriction Enzyme PCR (REP): نتایج PCR نشان می‌دهد که محصولات تکثیر در گروه سالم تیمارشده با آنزیم به‌صورت کامل تکثیرشده ولی در گروه بیمار تیمارشده، در ۴۰٪ نمونه‌ها تکثیر اصلاً انجام‌نشده و ۶۰٪ دیگر به‌طور نسبی تکثیرشده‌اند. نمونه-های تیمار نشده در هر دو گروه به‌طور کامل تکثیرشده‌اند. با توجه به این نکته که آنزیم SacII فقط توالی‌های غیرمتیله را می‌برد بنابراین جایگاه موردبررسی در افراد بیمار متیلاسیون خود را یا به‌طور کامل یا نسبی ازدست‌داده است (شکل ۱). نتایج الکتروفورز با نرم‌افزار Gel Analyser نیز بررسی و از دست رفتن متیلاسیون تائید شد. این نتایج با فرض اولیه که هایپومتیله شدن ویمنتین با افزایش بیان آن در EMT مرتبط است، هم‌راستا است.

تائید نتایج متیلاسیون با SYBR green Real time PCR: به‌منظور تجزیه‌وتحلیل کمی متیلاسیون نمونه‌ها، DNA تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم، با روش PCR زمان واقعی تکثیر و داده‌ها با نرم‌افزار Linreg بررسی شدند. با توجه به بیشتر بودن

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

شکل ۱- تجزیه‌وتحلیل نتایج الکتروفورز محصولات RE-PCR ژن ویمنتین. T: تیمار شده، UT: تیمار نشده، L: Ladder

شکل **الف** گروه سالم: در نمونه‌های تیمارشده و تیمار نشده با آنزیم، به علت متیله بودن جایگاه موردنظر، برش آنزیمی صورت نگرفته و همه نمونه‌ها به‌طور کامل تکثیرشده‌اند. شکل **ب** گروه بیمار: در نمونه‌های تیمار شده به علت هایپومتیله بودن برش آنزیمی اتفاق افتاده و نمونه‌ها به‌طور نسبی تکثیرشده‌اند ولی در نمونه‌های تیمار نشده تکثیر به‌طور صحیح و کامل انجام شده است. شکل **ج** گروه بیمار: در نمونه‌های تیمار شده اصلاً تکثیر انجام‌نشده که حاکی از برش آنزیمی و هایپومتیلاسیون کامل جایگاه مورد بررسی است. نتیجه تکثیر در باند ۲۰۰bp باید واقع شود.



شکل ۲- منحنی تکثیر(الف) و ذوب (ب) نمونه‌های سالم و بیمار. همان‌گونه که در شکل پیداست Ct value نمونه سالم (۲۲/۳۳) کمتر از نمونه بیمار (۲۵/۳۱) است؛ زیرا DNA نمونه بیمار در اثر تیمار آنزیمی برش خورده و نسبت به DNA نمونه سالم دیرتر تکثیر شده است که این نتیجه در راستای فرض ما مبنی بر هیپومتیله بودن جایگاه مورد نظر است. منحنی ذوب نیز گویای صحت تکثیر و نبود محصولات غیراختصاصی است.

مقادیر Ct نمونه‌های بیمار نسبت به سالم، درمی‌یابیم که جایگاه موردبررسی در اثر تیمار آنزیمی برش خورده و دیرتر تکثیرشده است ولی منحنی نمونه‌های تیمار نشده نتایج مشابهی نشان داده‌اند (شکل ۲). انجام روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) روی میانگین ΔCt نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم در افراد سالم و بیمار نشان می‌دهد که میانگین ΔCt در نمونه‌های تیمار نشده نسبت به نمونه‌های تیمار شده به‌طور قابل‌توجهی کمتر است (p = ۰/۵) که حاکی از تفاوت در میزان تکثیر این دو گروه است. درصد متیلاسیون نمونه‌ها با استفاده از فرمول $\%Me = (e^{-0.7\,(\Delta Ct)})$ محاسبه شد. میانگین درصد هایپومتیلاسیون نمونه‌های سالم (۲۱/۵٪) و نمونه‌های بیمار (۸۵٪) است. مقایسه میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) هایپومتیلاسیون قابل‌توجه در جایگاه موردنظر را در بیماران نشان می‌دهد (p = ۰/۰۱)

بررسی ارتباط داده‌های پاتولوژی با متیلاسیون: از مهم‌ترین فواید داده‌های پاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان پستان استفاده از نشانگرهای خاصی مثل ER، PR و HER2 است که در پیش‌آگهی و تشخیص و درمان استفاده می‌شوند. ارتباط این سه نشانگر با متیلاسیون با همبستگی Eta بررسی و مشاهده شد که متیلاسیون ویمنتین در این جایگاه با ER همبستگی داشته ولی با PR و HER2 ارتباط معنادار ندارد. میزان متیلاسیون راه‌انداز ژن ویمنتین در نمونه‌های بیمار ER^- (۷۰٪ نمونه‌های بیمار) نسبت به ER^+ (۳۰٪ نمونه‌های بیمار) کمتر است و این اختلاف معنادار است (p = ۰/۰۰۲).

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

بحث و نتیجه گیری

تلاش برای مبارزه با سرطان و یافتن درمان مؤثر برای آن، از بزرگ‌ترین دغدغه‌های قرن بیستم است. باوجوداینکه درمان برخی از انواع سرطان به شکل قابل‌توجهی پیشرفت داشته ولی بسیاری از سرطان‌های مرگبار هنوز بدون درمان باقی‌مانده‌اند. با توجه به پیچیدگی دلایل شروع سرطان و درگیر بودن مسیرهای مختلف سلولی و ژن‌های مختلف، یافتن راهی برای کنترل همه این مسیرها که منجر به درمان سرطان شود، بسیار پیچیده است. با توجه به دشوار بودن مسیر درمان توجه بسیاری از محققان به پیش‌آگهی و پیشگیری از این بیماری معطوف شده است. یافتن بیومارکرهای تشخیصی برای غربالگری جمعیت ازجمله بهترین راهکارهاست. سرطان پستان را قاتل خاموش نامیده‌اند چون درد و علامتی در مراحل ابتدایی بیماری ندارد و فرد وقتی متوجه می‌شود که بیماری تا حد زیادی پیشرفت کرده است. ازاین‌رو یافتن بیومارکرهایی که بتوانند سرطان را در مراحل اولیه و قبل از متاستاز پیش‌بینی کنند حائز اهمیت است. یافتن و توسعه‌ی روش‌های جدید برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان بسیار مهم است زیرا با تشخیص زودهنگام می‌توان نرخ زنده ماندن بیماران را افزایش داد (۱۸). از طرفی در فرد مبتلا، توانایی تومور برای متاستاز تعیین‌کننده مرگ و زندگی بیمار سرطانی است؛ بنابراین شناخت مسیرهای متاستاز، پروتئین‌های درگیر در این مسیر و تلاش برای مهار آن‌ها از اهمیت بالایی در درمان برخوردار است. در این میان یافتن نشانگرهای مولکولی با روش‌های غیرتهاجمی مثل نمونه خون محیطی که بیمار را تحت تنش جراحی قرار نمی‌دهد، از اهمیت بالایی برخوردار است. از دلایل انتخاب سلول‌های خونی برای بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی و یافتن نشانگر این است که مشخص‌شده این سلول‌ها مانند سلول‌های بافت سرطانی دچار تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌شوند و با بررسی آن‌ها می‌توان نشانگرهای جدیدی کشف و گزارش کرد (۱۹).

در این مطالعه، از DNA ژنومی سلول‌های سفید خون افراد سالم و بیمار مبتلا به سرطان پستان، برای بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی استفاده شد. تغییر متیلاسیون راه‌انداز ژن ویمنتین در یک جایگاه مشخص با روش RE-PCR و PCR زمان واقعی ارزیابی شد. این روش که (qAMP) quantitative Analysis of DNA Methylation-real-time PCR نام دارد با مقدار کم DNA درزمانی کوتاه با هزینه‌ی مناسب، می‌تواند متیلاسیون تعداد زیادی نمونه را به‌طور دقیق بررسی کند و سختی‌ها و هزینه‌های سنگین روش توالی‌یابی بی‌سولفیت را نیز ندارد (۲۰). نتایج این مطالعه نشان داد که راه‌انداز ژن ویمنتین در جایگاه موردبررسی در بیماران به شکل قابل‌ملاحظه‌ای هایپومتیله شده است. نتایج ما مبنی بر هیپومتیله شدن ژن ویمنتین و افزایش بیان آن با یافته‌های قبلی از بررسی این ژن با روش‌های دیگر، هم‌خوانی داشته و مؤید یکدیگر هستند (۱۳،۱۴، ۱۶، ۲۱ و ۲۲).

همچنین ارتباط هایپومتیلاسیون با داده‌های پاتولوژی ازجمله گیرنده استروژن (ER)، پروژسترون (PR) و فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) بررسی شد. این بیومارکرها در تشخیص و پیش‌آگهی کاربرد گسترده‌ای دارند (۲۳، ۳). بیومارکر HER2 می‌تواند نرمال بودن نمونه را ازنظر مقدار پروتئین HER2 یا تعداد کپی‌های ژن آن مشخص کند. درنتیجه به تشخیص زودهنگام، موقعیت سرطان و انتخاب گزینه‌های درمانی کمک می‌کند (۲۴). از طرفی سرطان‌های پستان با منشأ هورمونی به درمان‌های هورمونی خوب پاسخ می‌دهند. تشخیص اینکه سلول‌های سرطانی پستان، گیرنده استروژن یا پروژسترون را بیان کرده‌اند در انتخاب راهکار درمانی بسیار مفید است (۲۵). یافتن ارتباط بین متیلاسیون و هریک از این بیومارکرها را می‌توان به‌عنوان یک بیومارکر معتبرتر پیشنهاد کرد. یافته‌های ما حاکی از ارتباط هایپومتیلاسیون ژن ویمنتین با ER است. میزان متیلاسیون راه‌انداز ژن ویمنتین در نمونه‌های بیمار ER^- نسبت به ER^+ به شکل معناداری کمتر است و این ارتباط مثبت هیپومتیلاسیون ویمنتین با ER^- را به‌عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص سرطان پیشنهاد می‌کنیم. مطالعات بیشتر روی جمعیت‌های بزرگ‌تر ممکن است همبستگی‌های دیگر را نیز تائید کند.

انحراف در انتخاب نمونه (selection bias) نگرانی همه مطالعات جهت یافتن نشانگر است، ولی تلاش بر این بود که تا حد ممکن این خطا را کاهش دهیم (۲۶). بدین شکل که همه بیماران خانم‌هایی در محدوده سنی ۶۰-۳۰ بوده و طی ۱۰ سال گذشته ساکن تهران بوده‌اند. محل زندگی آن‌ها ازنظر نزدیکی به فرودگاه و دکل‌های مخابراتی و ماهواره‌ای بررسی شد تا احتمال تأثیر این موارد بر بیماری در نظر گرفته شود ولی از ۶۰ فرد بیمار فقط یک نفر نزدیک فرودگاه و یک نفر نزدیک دکل مخابراتی زندگی می‌کردند که قابل‌ملاحظه نبود. هیچ‌یک از بیماران در طول زندگی رژیم غذایی خاصی اتخاذ نکرده بودند و تحت درمان خاصی نبودند، به‌جز یک نفر که ۲۵ بار IVF انجام داده بود و

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

طبق نظر پزشکان هورمون درمانی‌های مکرر احتمالاً دلیل اصلی ابتلای آن شخص به بیماری بود. شغل افراد ازنظر احتمال کار با اشعه و مواد رادیواکتیو و جهش‌زا بررسی شد و مشخص شد که هیچ‌یک از افراد در معرض موارد مذکور نبوده‌اند.

تشکر و قدردانی

با تشکر از خانم‌ها دکتر عاطفه شیرکوند و دکتر زهرا نیکی بابت کمک‌های بی‌دریغشان و با تشکر از آزمایشگاه ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهران. کد ثبت دانشگاه خوارزمی: ۱۰۹۶۹

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Lukon KF. Understanding breast cancer – The long and winding road. BBA Clinical. 2017; 7(2): 64-77.
2. Kaviani A, Scientific Secretary Of The Third Breast Congress, At The Third News Conference. 1388 Esfand 10.
3. Peddi PF, Ellis MJ, Ma C. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. International journal of breast cancer. 2011; 2012(5):155-162.
4. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet. 2001; 358(9291): 1389-1399.
5. Jovanovic J, Rønneberg JA,Tost J. The epigenetics of breast cancer. Molecular oncology. 2010; 4(3): 242-254.
6. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes & development. 2002; 16(11-12): 6-21.
7. De Smet C, Loriot A,Boon T. Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 50 region of gene MAGE-A1 in tumor cells. Molecular and cellular biology. 2004; 11(21): 4781-4790.
8. Fahrner JA, Eguchi s, Herman JG, SB Baylin. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. Cancer research. 2002; 62(24): 98-105.
9. Lim DH, Maher ER. Genomic imprinting syndromes and cancer. Advances in Genetics. 2010; 70(7): 145-175.
10. Yang J,Weinberg. RA. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. Cell. 2008; 14(6): 818-829.
11. Kalcheim C. Epithelial–mesenchymal transitions during neural crest and somite development. Journal of clinical medicine. 2015; 5(1): 716-725.
12. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nature Review Molecular Cell Biolog. 2006; 7(18): 131–142.
13. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer-observations in vitro and in vivo. Cells Tissues Organs. 2007; 185(1-3): 191–203.
14. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cellular and molecular life sciences, 2011; 68(18): 3033–3046.
15. Phua DC, Humbert PO, Hunziker W. Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation. Mol Biol Cell. 2009; 20(12): 2841–2855.
16. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. Oncogene. 2011; 30(3): 1436– 1448.
17. Wu Y, Zhang X, Salmon M, Lin X, Zehner ZE. TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2007; 1773(3): 427–439.
18. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini E, Senkus F. Clinical Use Of Biomarkers In Breast Cancer: Updated Guidelines From The European Group On Tumor Markers (EGTM). European Journal Of Cancer. 2017; 75(21): 284-298.
19. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A. An Epigenetic Signature in Peripheral Blood Predicts Active Ovarian Cancer. Plos one. 2009; 4(18): 223-231.
20. Oakes CC, La Salle S, Robaire B, Trasler JM. Evaluation of a Quantitative DNA Methylation Analysis Technique using Methylation-Sensitive/Dependent Restriction Enzymes and Real-Time PCR. Epigenetics. 2006; 1(3): 146-152.
21. Dwedar FI, Khalil GI, Nayer SA, Farouk A. Aberrant Vimentin Methylation Is Characteristic of Breast Cancer.Advances In Breast Cancer Research. 2016; 5(4): 150-162.
22. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wulfing P, Vandiest PJ, Brandt B. The origin of Vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial–mesenchymal transition, myoepithelial

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? Pathology. 2005; 206(4): 451–457.
23. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nature Review Cancer. 2005; 5(18): 845-856.
24. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 2007; 19: 56–62.
25. Cochrane DR, Bernales S. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. Breast Cancer Research, 2014; 19(1): 468-482.
26. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. Clinical Oncology. 2005; 100(2): 229–235.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

Original Article

Investigating Methylation Changes of Vimentin Gene in Breast Cancer

Nejat N[1], Aleyasin SA[2*], Angji SA[1], Ayrian S[1]

1. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Medical Biotechnology Division, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Iran

Received: 01 Oct 2017 Accepted: 27 Dec 2017

Abstract

Background & Objective: Epigenetic changes are one of the most common changes in development of cancers. These changes alter the expression of certain genes that play important roles in the etiology of cancer. Increasing the expression of Vimentin gene due to epigenetic changes in Epithelial-Mesenchymal Transition(EMT) in breast carcinoma is well known. The relation between EMT and the malignancy invasion process has also been confirmed. Vimentin is the principal EMT marker that performs this task during metastasis. The purpose of this study is to investigate the methylation of the vitamin gene in a specific position.

Material & Methods: In this case-control study, the methylation pattern of the promoter of the Vimentin gene was evaluated in a specific site. Blood samples were taken from 30 breast cancer patients and 30 healthy individuals. DNA samples were digested with the methylation sensitive restriction enzyme. Control and treated DNA was amplified by PCR for qualitative investigation and real time PCR for quantitative analysis of methylation.

Results: Using the Ct value and the $\%Me=100(e^{-0.7(\Delta Ct)})$ formula, the correlation between Vimentin hypomethylation and expression of Estrogen Receptor(ER), Progesterone Receptor(PR) and Human Epidermal growth factor Receptor2(HER2) status was checked (p-value <0.05).

Conclusion: The results indicate that hypomethylated promoter of the Vim gene in the examined site correlates with ER, but does not have any correlation with PR and Her2, and hence the hypomethylation of the Vimentin gene in this position can be proposed as a molecular biomarker.

Keywords: Breast cancer, Methylation, Vimentin, Restriction Enzyme PCR, Real Time PCR

***Corresponding Author: Seyyed Ahmad Aleyasin,** Medical Biotechnology Division, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Iran
Email: Sogand@nigeb.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-0224-9726

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2018.8.2.8.6]

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 770-777