

Global Genome Methylation Status in Gastritis Lesion in Comparison with Normal Adjacent Tissue and its Relationship with Clinicopathologic Findings

R. Najjar Sadeghi, M.Sc.^{1*}, H. Zojaji, M.D.¹, SR. Mohebbi, M.Sc.¹, M. Chiani, M.Sc.², D. Mirsattari, M.D.¹, MA. Pourhoseingholi, M.Sc.¹, M. Molaei, M.D.¹, R. Mashayekhi, M.D.¹, F. Derakhshan, M.D.¹, MR. Zali, M.D.¹

1. Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran

2. Pilot Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 1985711151, Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti Medical University, Taleghani Hospital, Tehran, Iran
Email: najjarsadeghi@yahoo.com

Abstract

Received: 13/Feb/2008, Accepted: 5/Jun/2008

Objective: To determine the role of global genome methylation in gastritis lesion and its relation with clinicopathologic finding.

Materials and Methods: The study was conducted on 44 gastritis and normal adjacent specimens using a technique composed of restriction enzyme digestion and pyrosequencing known as LUMA (LUMinometric Methylation Assay). At first, DNA extracted from gastritis lesion and normal tissue was digested with HpaII (sensitive to methylation in recognition site) and MspI (insensitive). These enzymes leave an overhang after cutting which are then filled in a polymerase extension assay with stepwise addition of dNTPs using pyrosequencing. The comparison of the height of peaks obtained from both enzymes provides the possibility to evaluate and compare global genome methylation level of normal and gastritis tissues. If the target site is fully methylated, the HpaII /MspI will approach toward zero. If not, this ratio will go around one. In the other conditions the ratio varies between 0-1.

Results: According to our findings, gastritis tissue was significantly more hypomethylated ($p=0.04$) than the normal tissue and Global genome methylation had no correlation with sex, age, microsatellite instability (MSI) and gastritis severity.

Conclusion: Global DNA hypomethylation occurs in the gastritis lesion. Presumably the process of hypomethylation keeps falling in the next steps leading to gastric cancer.

Keywords: Hypomethylation, DNA Methylation, Gastritis, Gastric Cancer, Sequencing

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 4, Winter 2009, Pages: 272-279

بررسی وضعیت متیلاسیون کلی ژنوم در ضایعه گاستریت در مقایسه با بافت نرمال مجاور و ارتباط آن با یافته‌های کلینیکی و پاتولوژیک

روح ا. نجار صادقی ^{۱*}، همایون زجاجی ^۱، سید رضا محبی ^۱، محسن چپانی ^۲، داریوش میرستاری ^۱، محمد امین پورحسینقلی ^۱، مهسا مولایی ^۱، رضا مشایخی ^۱، فرامرز درخشان ^۱، محمد رضا زالی ^۱، ^۱M.D.

۱. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، تهران، ایران
۲. انستیتو پاستور ایران، گروه پایلوت بیوتکنولوژی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۹۸۵۷۱۱۱۵۱، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی
پست الکترونیک: Email: najjarsadeghi@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۱۶

*** هدف:** تعیین نقش متیلاسیون کلی ژنوم در ضایعه گاستریت و ارتباط آن با یافته‌های کلینیکی و پاتولوژیک
*** مواد و روش‌ها:** در این مطالعه وضعیت متیلاسیون کلی ژنوم (Global Genome Methylation) در ۴۴ نمونه گاستریت و بافت سالم مجاور بررسی شد. تکنیک استفاده شده Luminometric Methylation Assay تلفیقی از هضم آنزیمی و پایروسکوئانس (Pyrosequencing) بود. بدین صورت که DNA استخراج شده از نمونه‌های گاستریت و سالم، به وسیله آنزیم‌های ایزوشیزومر HpaII و MspI (با جایگاه شناسایی یکسان اما آنزیم اول به متیلاسیون جایگاه حساس است) هضم شد. از آنجایی که نسبت برش این دو آنزیم به میزان متیله بودن جایگاه برشی بستگی دارد، بنابراین ناحیه هضم شده (به صورت Overhang) با استفاده پایروسکوئانس تعیین توالی و ارتفاع پیک‌های حاصله (که با تعداد نوکلئوتید پلیمریزه شده و میزان متیلاسیون متناسب است) با هم مقایسه شدند. در صورت متیله بودن کامل DNA هدف، نسبت پیک HpaII / MspI تقریباً صفر می‌شود و در صورت متیله نبودن، این نسبت به یک نزدیک می‌شود و در موارد حد واسط نیز این نسبت بین صفر و یک متغیر است.

*** یافته‌ها:** بر اساس یافته‌های این تحقیق، بافت گاستریت نسبت به بافت سالم هایپومتیله و از لحاظ آماری نیز این تفاوت سطح متیلاسیون معنی‌دار بوده است ($p=0/04$). همچنین متیلاسیون با سن، جنس، ناپایداری میکروساتلایت (MSI: Micro satellite instability) و شدت گاستریت ارتباط معنی‌داری نداشت.

*** نتیجه‌گیری:** بر اساس یافته‌های این مطالعه در مرحله گاستریت هایپومتیلاسیون کلی ژنوم رخ می‌دهد. این کاهش سطح متیلاسیون احتمالاً در مراحل بعدی ادامه می‌یابد که می‌تواند به بروز سرطان ختم گردد.

*** کلیدواژگان:** متیلاسیون، متیلاسیون DNA، گاستریت، سرطان معده، تعیین توالی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۴، زمستان ۸۷، صفحات: ۲۷۹-۲۷۲

مقدمه

اپی‌ژنتیک به انتقال ویژگی‌های وراثتی بیان ژن از سلول مادر به سلول دختر بدون ایجاد تغییر در توالی ژن اطلاق می‌گردد. از جمله مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک می‌توان به تغییر الگوی متیلاسیون و تغییرات هیستون‌ها اشاره کرد که در فرایندهای تکوین (Development) و تمایز (Differentiation) و الگوی بافتی بیان ژن‌ها نقش دارند. از این بین، تغییر الگوی متیلاسیون نقش مهمی در وقوع بیماری‌هایی همچون سرطان دارد (۱).

اختلال در الگوی متیلاسیون به عنوان یک مکانیسم اپی‌ژنتیک می‌تواند آن دسته از عملکردهای سلولی که برای تکوین و تمایز سلولی ضروری‌اند را به چند روش مختل کند. این تغییرات می‌توانند سبب غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌گر توموری و فعال شدن آنکوژن‌ها شوند (۵-۲). همچنین برخی از ژن‌ها که به طور طبیعی در اثر متیلاسیون پروموتور، در بافتی خاص غیرفعالند، پس از دمتیله شدن پروموتور فعال می‌شوند. نظیر بیان ژن MAG-A1 در سارکوما، کارسینومای کلیه، رابدو میوسارکوما، ملانوما و کارسینومای سلول‌های کبدی (۹-۶).

نکته حائز اهمیت این است که طی کارسینوژنز علی‌رغم افزایش

موضعی (Local) متیلاسیون ژنوم، سطح کلی (Global) سیتوزین متیله ژنوم کاهش می‌یابد (۱۰، ۱۱). این کاهش سطح سیتوزین متیله عمدتاً در توالی‌های تکراری نظیر رتروترانسپوزان‌ها (Retrotransposones)، رتروویروس‌های اندوژن (Endogen Retroviruses) و ریزقمرها (Microsatellite) که بخش اعظم سیتوزین متیله را شامل می‌شوند، رخ می‌دهد (۱۲). علت و عواقب هایپومتیلاسیون در سرطان چندان مشخص نیست. با این حال مشاهده شد که در سلول‌های موش‌های حاصل از مهندسی ژنتیک که سطح متیلاسیون کلی ژنومی پایینی داشتند میزان بروز جهش به ویژه حذف افزایش یافته است (۱۳) و در بیماران مبتلا به سندرم Immunodeficiency, Centromere Instability and Facial Anomalies (ICF) (حاصل جهش در DNA متیل ترانسفراز) سطح متیلاسیون ستلایت‌ها شدیداً کاهش می‌یابد (۱۴). به علاوه در شماری از سرطان‌ها، دمتیلاسیون توالی ستلایتی با افزایش از دست دادن بازوی کروموزوم حامل ستلایت مذکور توأم بوده است (۱۵). به عنوان مثال در سرطان پروستات، هایپومتیلاسیون با تغییرات کروموزوم ۸ توأم بوده است (۱۲). بنابراین احتمالاً هایپومتیلاسیون DNA از طریق ناپایداری‌سازی کروموزومی در روند ایجاد سرطان

نقش دارد.

به طور کلی، عقیده بر این است که تغییر وضعیت بیان ژن‌ها و ناپایداری کروموزومی منجر به شروع یا پیشرفت تومورزایی می‌شود (۱۸-۱۶).

بر اساس مطالعات مختلف کاهش سطح متیلاسیون کل ژنوم در مراحل اولیه کارسینوژنز رخ می‌دهد اما این کاهش حتی در مراحل بعدی نیز ادامه دارد. به عنوان مثال در آدنوما (ضایعه پیش سرطانی کولون) کاهش سطح متیلاسیون کلی ژنوم چشم‌گیر و در سرطان کولورکتال کاهش سطح ۳۰-۱۰ درصد بوده است (۱). از طرف دیگر در کارسینومای سلول‌های کبدی با افزایش سطح و درجه هیستولوژیک سطح متیلاسیون کاهش می‌یابد (۱۹).

در سال‌های اخیر شواهدی دال بر ارتباط بین هایپرمتیلاسیون نابجا (Aberrant Hypermethylation) و سرطان معده ارائه شده است (۲۰). اما اطلاعات کمی درباره وضعیت متیلاسیون کلی ژنوم در سرطان معده و آسیب‌های پیش سرطانی موجود است. بر اساس مطالعه انجام شده کاهش سطح متیلاسیون ژنوم در مراحل اولیه کارسینومای معده از نوع رودهای (Intestinal) رخ می‌دهد (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است که متیلاسیون کلی ژنوم در سرطان‌های معده و روده وابسته به سن است و به دنبال آن آسیب‌های ژنومی رخ می‌دهد (۲۲) و نهایتاً آتوشی کائدا و همکارانش مشاهده کرده اند که در سرطان معده هایپومتیلاسیون جزایر CpG تعدادی از ژن‌های خانواده MAGE (که در بافت نرمال هایپرمتیله و غیرفعالند) با هایپومتیلاسیون کلی ژنوم توأم است (۲۳).

با توجه به موارد یاد شده، ضروری است که زمان شروع کاهش سطح متیلاسیون و نقش آن در پیشرفت سرطان به ویژه در ضایعات پیش سرطانی مشخص شود.

بر اساس پروتکل Correa's Cascade گاستریت حاد می‌تواند به سمت آتروفی و متاپلازی روده‌ای پیشرفت کند. در برخی افراد اپی‌تلیوم متاپلازی دچار تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی می‌شود که در نهایت می‌تواند به نئوپلازی مهاجم تبدیل شود (۲۴، ۲۵). بنابراین ضایعه گاستریت می‌تواند طی ترانسفورماسیون اپی‌تلیوم سالم به فرم سرطانی، واسطه مهمی باشد.

این مدل از روند سرطان‌زایی در بافت معده می‌تواند در مطالعه وقایع ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی بسیار مفید باشد. ردیابی این وقایع که ممکن هست هر کدام در مراحل مختلفی از سیر سرطان‌زایی رخ دهند می‌تواند در تعیین بیومارکر اختصاصی برای هر مرحله مفید باشد. بر همین اساس تاکنون وقایع ژنتیکی مختلفی نظیر حذف آلل‌های ژن‌های سرکوب‌گر توموری، جهش یا تکثیر (Amplification) انکوژن‌ها در ضایعات سرطانی مختلف گزارش شده است (۲۸-۲۶) اما ترتیب دقیق وقوع این تغییرات و اهمیت هر کدام کاملاً مشخص نیست. بر همین اساس یقیناً بررسی وضعیت متیلاسیون کلی ژنوم می‌تواند اطلاعاتی فراتر از وضعیت متیلاسیون ناحیه‌ای خاص ارائه دهد. چرا که متیلاسیون ناحیه‌ای خاص، انککاس درستی از تغییرات الگوی متیلاسیون کلی ژنوم محسوب نمی‌شود.

در این مطالعه تصمیم گرفته شد وضعیت متیلاسیون کلی ژنوم در ضایعه گاستریت مورد بررسی قرار گیرد و ارتباط آن با فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژیک مشخص شود.

ضمناً برای بررسی وضعیت متیلاسیون کلی ژنوم، از تکنیک (Luminometric Methylation: LUMA) استفاده شد که

تلفیقی از هضم آنزیمی و پایروسکوانس است. این روش سریع، بسیار حساس و تطبیق‌پذیر (Versatile)، است و به تیمار با بی‌سولفیت و نوکلئوتیدهای رادیواکتیو نیازی ندارد، همچنین با استفاده از این روش امکان مطالعه دقیق متیلاسیون DNA در تعداد زیادی از نمونه‌ها ممکن می‌شود. به علاوه در این روش از آنزیم EcoRI به عنوان کنترل داخلی استفاده شد تا مشکل میزان DNA استفاده شده برطرف شود (۲۹).

مواد و روش‌ها

با کسب رضایت از بیماران مبتلا به گاستریت و تایید کمیته اخلاق پزشکی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تعداد ۴۴ بیوپسی از ضایعه گاستریت و بافت سالم همان شخص تهیه شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از دریافت در فریزر نگهداری شدند تا در زمان مناسبی استخراج DNA انجام شود. همچنین یک نمونه نیز از محل ضایعه به پاتولوژی فرستاده شد تا وضعیت پاتولوژیک نمونه‌ها مشخص شود.

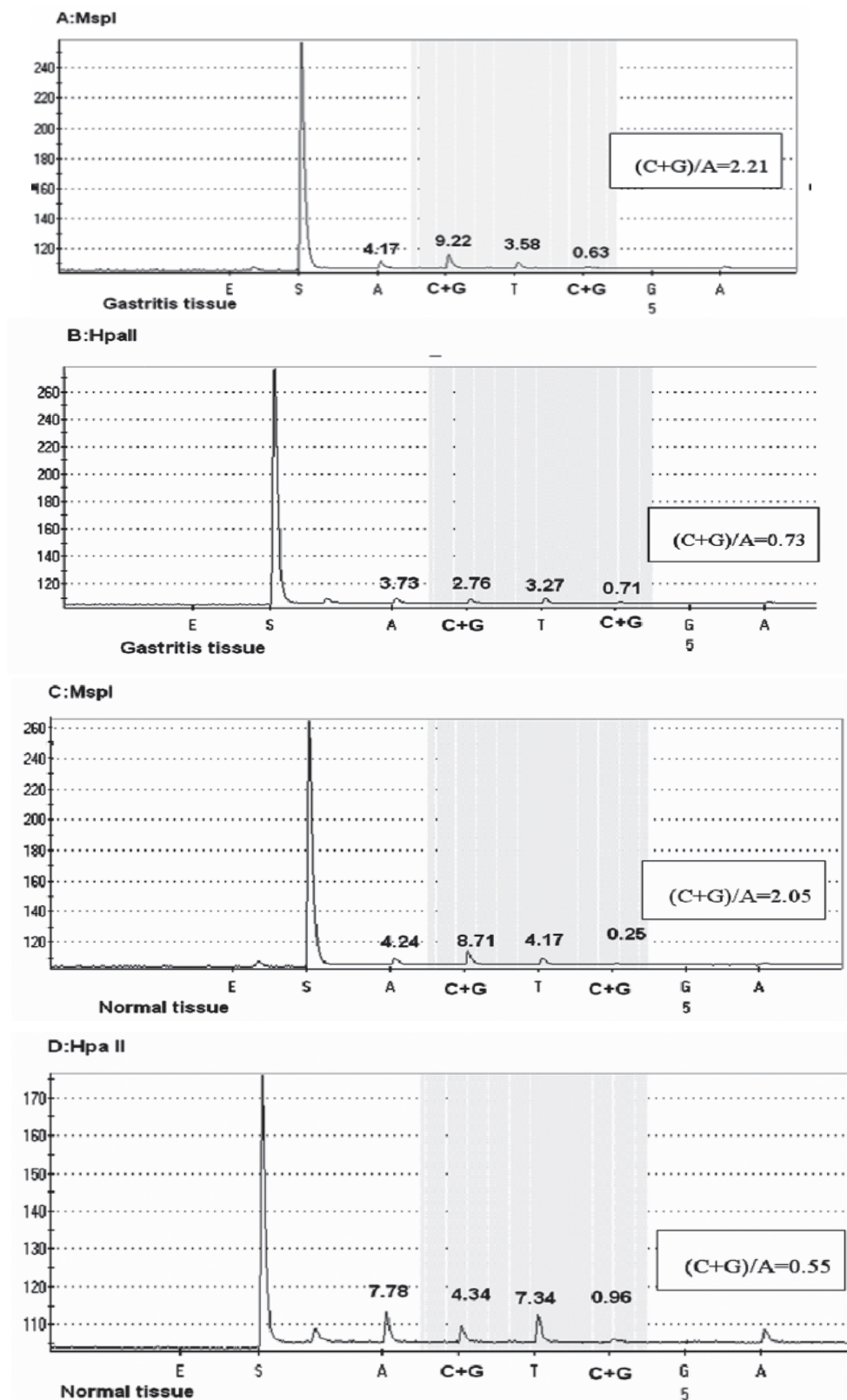
استخراج DNA

برای استخراج DNA از بافت‌ها و خون از کیت استخراج DNA شرکت کیاژن (Qiamp DNA mini kit cat NO. 51304) استفاده شد.

ارزیابی وضعیت کلی متیلاسیون ژنوم

در این مطالعه با استفاده از روش LUMA وضعیت متیلاسیون ژنوم بررسی شد. بدین صورت که ابتدا ۳۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده از بافت گاستریتی در دو تیوپ به وسیله آنزیم‌های HpaII+EcoRI و MspI+EcoRI به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شدند (آنزیم‌ها از شرکت New England Biolabs خریداری شدند). همین کار در مورد DNA استخراجی از بافت سالم نیز انجام شد. سپس نمونه‌های هضم شده به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا این که آنزیم‌های مذکور غیرفعال شوند. آنزیم اول به متیلاسیون در جایگاه برشی خود (CCGG) حساس است اما MspI حساسیتی به متیلاسیون در جایگاه برشی خود ندارد. برش این دو آنزیم طوری است که در یک رشته زائده (Overhang) ایجاد می‌کند که می‌توان در رشته مقابل آن دو نوکلئوتید را طی پایروسکوانس (۳۰) افزود.

در مرحله بعد به نمونه هضم شده ۲۰ میکرولیتر بافر (۲۰ میلی متر تریس-استات، ۲ میلی‌متر منیزیم-استات با pH=۶/۷) افزوده شد. مخلوط حاصله برای پلیمراسیون ناحیه زائده حاصل از برش آنزیم‌ها، با استفاده از کیت تعیین توالی پایروسکوانس (Pyro Gold Reagents Biotag AB) در دستگاه Pyrosequencer قرار داده شد. این کیت شامل dNTP و آنزیم‌های پلیمراز، ATP سولفوریلاز و لوسیفراز است. در نتیجه افزودن نوکلئوتیدها به زنجیره در حال تولید شدن، PPI تولید می‌شود که به وسیله آنزیم سولفوریلاز به ATP تبدیل می‌شود. ATP حاصله نیز در واکنش لوسیفراز مصرف می‌شود که فرآورده آن (اکسی لوسیفیرین) خاصیت فلورسنت دارد و نور تولید می‌کند. میزان آن نیز با تعداد نوکلئوتید پلیمریزه شده متناسب است. این نور به وسیله دستگاه Pyrosequencer شناسایی می‌شود و نرم افزار دستگاه آنرا به پیک تبدیل می‌کند.



شکل ۱: با توجه به اشکال A-D ارتفاع پیکها، نسبت C/A برای هر واکنش و سپس نسبت H/M برای نمونه‌های کاستریت و نرمال محاسبه شد: برای بافت کاستریت $H:M=0/73-2/21=0/33$ و برای بافت نرمال $H:M=0/73-2/21=0/33$ بنابراین سطح متیلاسیون در بافت کاستریت نسبت به بافت نرمال پایین‌تر بود. به کوتاه بودن پیک C+G در گراف‌های مربوط به آنزیم Hpa II توجه شود.

متیلاسیون کلی ژنوم در ضایعه گاستریت

از آنجایی که آنزیم *MspI* به متیلاسیون CG حساسیتی ندارد بنابراین در هر صورت در جایگاه هدف برش ایجاد می‌کند. اما آنزیم *HpaII* در صورت متیله بودن CG جایگاه هدف قادر به برش نخواهد بود. بنابراین در صورتی که جایگاه هدف متیله نباشد هر دو آنزیم برش ایجاد می‌کنند و نسبت *HpaII/MspI* یک می‌شود. اما در صورتی که جایگاه هدف متیله باشد *HpaII* قادر به برش نیست و نسبت مذکور به صفر میل می‌کند. در موارد دیگر این نسبت بین صفر و یک خواهد بود (شکل ۱).

پس از محاسبه سطح متیلاسیون برای بافت گاستریت و سالم، این دو نسبت با هم مقایسه شدند. در صورتی که نسبت مربوط به بافت گاستریت بیشتر از نسبت مربوط به بافت سالم باشد، بافت گاستریتی نسبت به بافت نرمال هایپومتیله است (چون آنزیم *Hpa II* برش بیشتری انجام داده است).

با توجه به زواید حاصل از برش آنزیم‌های *HpaII* و *MspI* (GC) و *EcoRI* (AATT) برنامه دستگاه Pyrosequencing برای افزودن dNTP به محلول واکنش به صورت زیر تعیین شده است:

۱. dATP

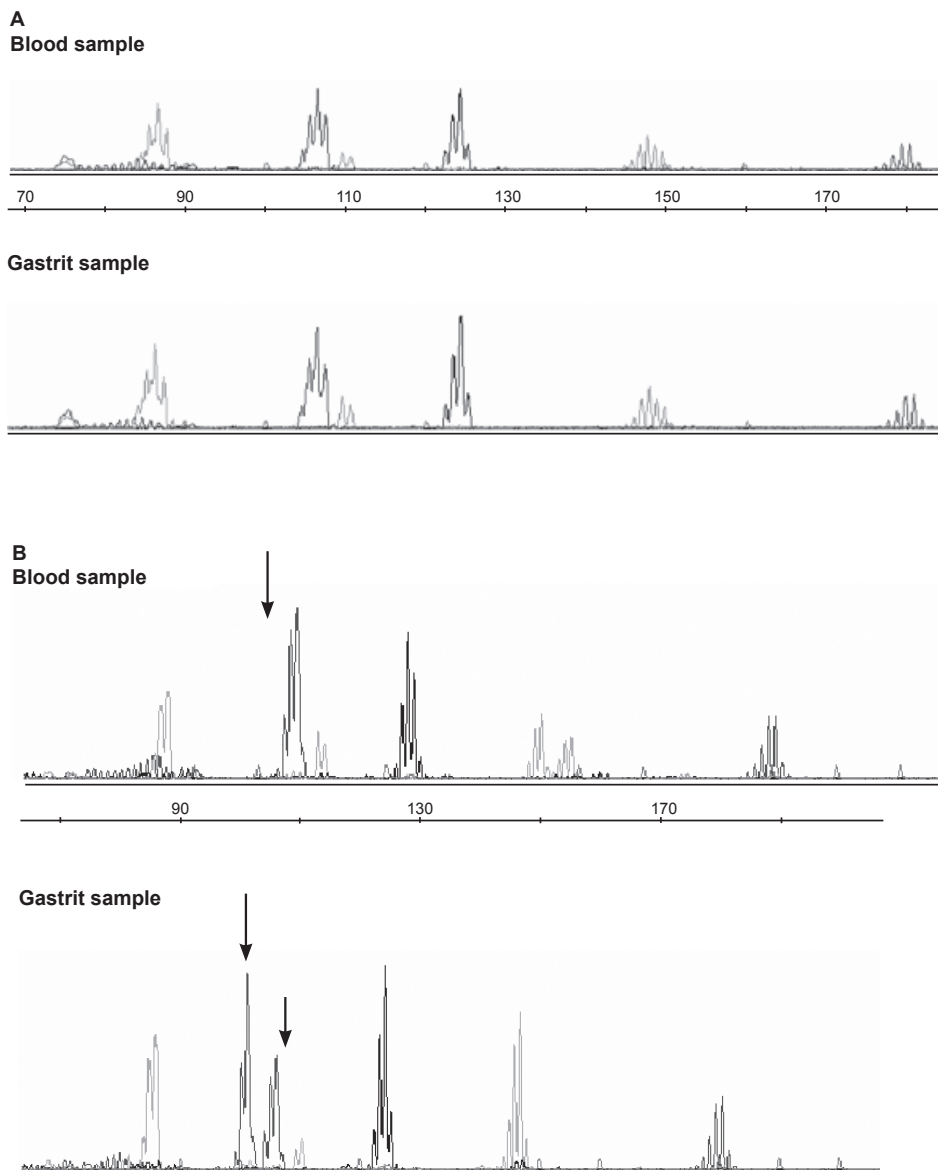
۲. مخلوط dGTP+dCTP

۳. dTTP

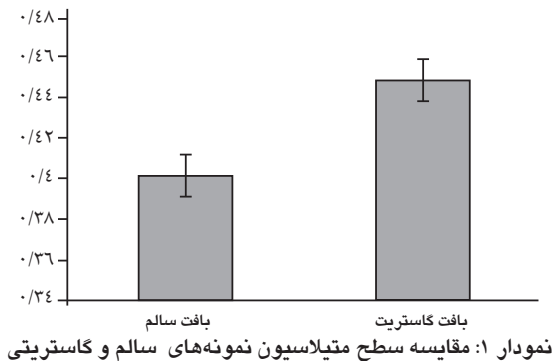
۴. dCTP+dGTP (کنترل برای تکمیل مرحله ۲)

۵. ارتفاع پیک‌ها به وسیله دستگاه محاسبه و سپس نسبت پیک‌های مربوط به آنزیم‌ها به صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{سطح متیلاسیون} = \frac{\text{HpaII/ECOR I}}{\text{MspI/ECORI}} = \frac{(\text{dGTP+dCTP})/\text{dATP}}{(\text{dGTP+dCTP})/\text{dATP}}$$



شکل ۲: بررسی وضعیت میکروسنتالیت‌ها در نمونه بافت و خون. در نمودار **A** نمونه از لحاظ میکروسنتالیت‌ها پایدار است در حالی که در نمودار **B** نمونه در مارکر دوم ناپایدار شده است.

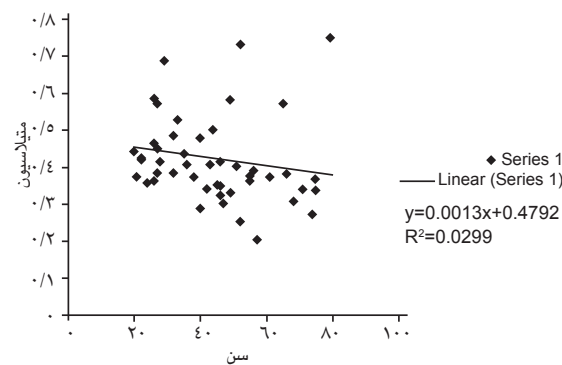


وضعیت پایداری میکروستلایت‌ها

از ۴۴ نمونه گاستریتی فقط ۶ نمونه در یک مارکر ناپایدار بودند. یعنی یکی از میکروستلایت‌ها دارای دو پیک (دو فرآورده PCR) بود (شکل ۲B) و مابقی نمونه‌ها دارای میکروستلایت‌های پایدار بودند. یعنی تمامی میکروستلایت‌های مورد ارزیابی واجد یک فرآورده PCR بودند (شکل ۲A). بنابراین به نظر می‌رسد که در این مرحله (گاستریت)، ژنوم هنوز از لحاظ میکروستلایت‌های مورد ارزیابی پایدار است.

ارتباط سطح متیلاسیون با سن، جنس و فاکتورهای پاتولوژیک

از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری بین سطح متیلاسیون و سن ($p=0/331$)، جنس ($p=0/57$)، MSI ($p=0/142$) و شدت گاستریت ($p=885$) مشاهده نشد. البته با افزایش سن، نسبت HpaII/MspI کاهش می‌یابد (نمودار ۲) یعنی اینکه آنزیم Hpa II نسبت به آنزیم Msp I برش کمتری ایجاد کرده است و جایگاه برشی، بیشتر متیله بوده است.



بحث

با توجه به فراوانی وقوع هایپومتیلاسیون در انواع مختلف سرطان‌ها (۳۲-۳۵) عقیده بر این است که هایپومتیلاسیون نقش مهم و اساسی در تومورزایی دارد. بر اساس مطالعه‌ای جدید تغییر بیان حدود ۸۰ ژن دخیل در تنظیم چرخه سلولی، انتقال سیگنال، پاسخ به استرس، آپوپتوز و شماری از انکوژن‌ها با هایپومتیلاسیون کلی ژنوم مرتبط بوده است (۳۶). همچنین مشخص شده است که هایپومتیلاسیون کلی ژنوم با تکوین (Progression) تومور در کارسینومای سینه مرتبط

آنالیز آماری

اختلاف بین گروه‌های سالم و گاستریت از لحاظ سطح متیلاسیون و رابطه آن با سن، جنس و فاکتورهای پاتولوژیک نمونه گاستریت به وسیله روش‌های آماری *t-test*، *Anova*، *Regression* (نرم‌افزار SPSS) ارزیابی شد. در تمام محاسبات $p=0/05$ و فاصله اطمینان (CI) ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

آنالیز وضعیت میکروستلایت‌ها

وضعیت میکروستلایت‌ها با استفاده از ۵ مارکر Bat-25، Bat-26، NR-22، NR-24 بررسی شد (۳۱). به طور خلاصه ابتدا با استفاده از DNA استخراج شده از ضایعه گاستریت و خون، PCR (Eppendorf Mastercycler Gradient) با شرایط $MgCl_2=2mM$ ، پرایمر Taq، $10pM$ ، $NTP=0.2mM$ در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. برای تعیین ناپایداری میکروستلایت‌ها، Fragment Analysis بر روی فرآورده PCR به وسیله دستگاه ABI Genetic Analysis 3130X انجام شد (شکل ۲).

برای دسته‌بندی وضعیت میکروستلایت‌ها در صورتی که نمونه در یک مارکر ناپایدار بود آن نمونه MSI-low و در صورتی که در بیشتر از یک مارکر ناپایدار بود MSI-high در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های مربوط به وضعیت بیماران

۴۴ نمونه از بیماران دریافت شد. از این تعداد ۲۱ نفر مرد و ۳۲ نفر زن بودند و سن بیماران نیز از ۲۰ تا ۷۹ سال متغیر بوده است. اطلاعات مربوط به شدت ضایعه گاستریت از لحاظ پاتولوژیک نیز در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: تشخیص پاتولوژی بیماران مورد مطالعه

تشخیص پاتولوژی	فراوانی	درصد فراوانی
moderate active chronic gastritis	۱۳	۲۹/۵۴
moderate chronic gastritis	۱۷	۳۸/۶۳
sever chronic active gastritis	۱۱	۲۵
sever chronic gastritis	۳	۶/۸۱
Total	۴۴	۱۰۰

وضعیت متیلاسیون کلی ژنوم در نمونه‌های گاستریت و سالم

با توجه به ارتفاع پیک‌های به‌دست آمده از پاپروسکوانس (شکل ۱) سطح متیلاسیون بر اساس فرمول محاسبه شد. میانگین سطح متیلاسیون در نمونه‌های گاستریت ۰/۴۴۸۷ و در نمونه‌های سالم مجاور ۰/۴۰۱۲ بوده است (نمودار ۱) و تفاوت سطح متیلاسیون ضایعه گاستریت و سالم مجاور از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($t\text{-test } p=0/04$).

سطح متیلاسیون)، اگرچه این افزایش از لحاظ آماری اهمیت ندارد اما خود بیانگر وجود ارتباط بین متیلاسیون و سن است که شاید مطالعه حاضر به علت کم بودن تعداد نمونه نتواند آن را نشان دهد. در هر صورت برای روشن شدن این مطلب نیز بهتر است مطالعه دیگری با تعداد نمونه‌های بیشتر انجام شود.

MSI نیز ارتباط معنی‌داری با سطح متیلاسیون نداشت. با این حال به علت وجود رابطه بین کاهش سطح متیلاسیون و اختلالات کروموزومی و جهش، پایین بودن ناپایداری میکروستلایت‌ها در نمونه‌های گاستریتی می‌تواند حاکی از این مطلب باشد که هنوز در مرحله گاستریت ناپایداری میکروستلایت‌ها رخ نمی‌دهد و شاید در مراحل بعدی، به علت کاهش سطح متیلاسیون (که در مرحله گاستریت صورت گرفت) و یا به عللی دیگر رخ می‌دهد.

در مجموع، مطالعه اخیر با یافته‌های قبلی، دال بر وقوع هایپومتیلاسیون در مراحل اولیه، مطابقت دارد و پیشنهاد می‌شود برای روشن شدن ارتباط هایپومتیلاسیون با سایر فاکتورها نظیر سن، جنس، قومیت و... مطالعه جامع‌تری از لحاظ تعداد و نوع نمونه (پیش‌سرطانی و سرطانی) انجام گیرد.

تقدیر و تشکر

هزینه طرح تحقیقاتی حاضر به وسیله مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تامین شده است. نویسندگان مقاله حاضر بر خود لازم می‌دانند که از پرسنل آزمایشگاهی این مرکز تشکر کنند. به علاوه از همکاران فلوشیپ بخش آندوسکوپی بیمارستان طالقانی که در تهیه نمونه ما را یاری کردند نیز کمال تشکر را داریم و از خداوند متعال برای بیماران حاضر در این طرح آرزوی سلامتی داریم.

References

1. Ann S. Wilson, Barbara E. Power, Peter L. Molloy. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775: 138-162.
2. Stirzaker C, Millar DS, Paul CL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, et al. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res*. 1997; 57: 2229-2237.
3. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res*. 1997; 57: 3347-3350.
4. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6870-6875.
5. Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene*. 1998; 17: 1807-1812.
6. De Smet C, Courtois SJ, Faraoni I, Lurquin C, Szikora JP, De Backer O, et al. Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene. *Immunogenetics*. 1995; 42: 282-290.
7. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-

riche promoter. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 7327-7335.

8. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is related with genome wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 7149-7153.

9. Xiao J, Hong-song C, Ran F, Xu C, Li-ping W, Yan W, et al. Expression of MAGE-A1 mRNA is associated with gene hypomethylation in hepatocarcinoma cell lines. *J Gastroenterol*. 2005; 40: 716-721.

10. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 687-692.

11. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*. 2001; 20: 3139-3155.

12. Schulz WA, Elo JP, Flori AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, et al. 1 Hans-Helge Seifert, and Tapio Visakorpi. Genomewide DNA Hypomethylation Is Associated With Alterations on Chromosome 8 in Prostate Carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 35: 58-65.

13. Chen RZ, Petterson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998; 395: 89-93.

14. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. 1999; 402: 187-191.
15. Kanai Y, Ushuima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CpG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer*. 2001; 91: 205-211.
16. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 415-428.
17. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003; 300: 455.
18. Menendez L, Benigno BB, McDonald JF, HERV WL. Retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas. *Mol Cancer*. 2004; 3: 12.
19. Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, et al. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001; 61: 4238-4243.
20. Kim TY, Jong HS, Jung Y, Kim TY, Kang GH, Bang YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20 Suppl 1: 131-142.
21. Cravo M, Pinto R, Fidalgo P, Chaves P, Gloria L, Nobre-Leitao C, et al. Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma. *Gut*. 1996; 39: 434-438.
22. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi Sh, Yamashita K, Perucho M. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer cell*. 2006; 9(3)L: 199-207.
23. Kaneda A, Tsukamoto T, Takamura-Enya T, Watanabe N, Kaminishi M, Sugimura T, et al. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci*. 2004; 95: 58-64.
24. Correa P. The epidemiology and pathogenesis of chronic gastritis. Three etiologic entities. *Front Gastroenterol Res*. 1980; 6: 98-108.
25. Correa P, Shiao Y. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1994; 54 (Suppl): 1941-1943.
26. Rhyu MG, Park WS, Jung YJ, Choi SW, Meltzer SJ. Allelic deletions of MCC/APC and p53 are frequent late events in human gastric carcinogenesis. *Gastroenterology*. 1994; 106: 1584-1588.
27. Oda N, Tsujino T, Tsuda T, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W, et al. DNA ploidy pattern and amplification of ERBB and ERBB2 genes in human gastric carcinomas. *Virchows Arch B cell Pathol*. 1990; 58: 273.
28. Hongyo T, Buzard GS, Palli D, Weghorst CM, Amrosi A, Galli M, et al. Mutations of the K-ras and p53 Genes in gastric adenocarcinomas from a high-incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res*. 1994; 55: 2665-2672.
29. Mohsen Karimia B, Johansson S, Stachc D, Corcorand M, Grandérd D, Schallingb M, et al. Ekströma, LUMA (LUminometric Methylation Assay)-A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp Cell Res*. 2006; 312(11): 1989-1995.
30. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001; 11(1): 3-11.
31. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Disease Markers*. 2004; 20: 251-257.
32. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*. 1983; 11: 6883-6894.
33. Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res*. 1998; 48: 1159-1161.
34. Kliasheva RI. DNA methylation in human lung tumors. *Voprosy Onkologii*. 1990; 36: 186-189.
35. Cheng P, Schmutte C, Cofer KF, Felix JC, Yu MC, Dubeau L. Alterations in DNA methylation are early, but not initial, events in ovarian tumorigenesis. *Br J Cancer*. 1997; 75: 396-402.
36. Chen H, Liu J, Merrick BA, Waalkes MP. Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: applications of cDNA microarray technology. *Mol Carcinogen*. 2001; 30: 79-87.
37. Soares J, Pinto AE, Cunha CV, Andre S, Barao I, Sousa JM, et al. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma—correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer*. 1999; 85: 112-118.
38. Najjar Sadeghi R, Mesbah-Namin SA, Rastgar-Jazii F. Methylation Status of p15 Gene in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Methylation-Specific PCR. *Yakhteh*. 2007; 9(33): 39-44.
39. Abbaszadegan MR, Raziiee HR, Ghafarzadegan K, Shakeri MT, Afsharnezhad S, Ghavamnasiry MR. Aberrant p16 Methylation, a Possible Epigenetic Risk Factor in Familial Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Gastrointest*. 2005; 36: 47-54.