

Study of the correlation between *CYP1A1* gene promoter methylation and smoking in gastric cancer patients

Sadeghi-Amiri L¹, Barzegar A^{1*}, Nikbakhsh-Zati N², Mehraban P¹

1- Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I. R. Iran.

2- Department of Surgery, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, I. R. Iran.

Received: 2018/10/29 | Accepted: 2019/01/13

Abstract:

Background: Gastric cancer is one of the main causes of cancer related deaths particularly in northern parts of Iran. It has been recently attributed to the increased application of agricultural pesticides in these areas. *CYP1A1* is the prototype member of the cytochrome P450 detoxifying enzymes that its gene expression alterations as a result of genetic or epigenetic changes, has been verified to have significant role on gastric cancer incidence.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, genomic DNA of tumoral and normal stomach tissues was extracted by phenol chloroform protocol and was subjected to bisulfite conversion by the EpiTech DNA Bisulfite kit. CpG-rich regions of the *CYP1A1* gene promoter was amplified using specific primers and subsequently was sequenced in both directions using direct bisulfite Sanger sequencing method. Methylation rate of the individual CpGs was calculated and its correlation with demographic features was estimated by Spearman's test.

Results: Results showed a significant positive correlation between promoter methylation of the *CYP1A1* gene, particularly those CpGs existing in Xenobiotic response elements (XRE) consensus sequence, and smoking habit as well as familial history of gastric cancer. However, increasing age showed no significant effect on the methylation rate of the *CYP1A1* gene promoter.

Conclusion: Smoking and familial history of gastric cancer showed positive correlation with *CYP1A1* gene promoter methylation. Screening of the *CYP1A1* gene promoter methylation in smokers and individuals having positive familial history of disease may be used as a marker for gastric cancer diagnosis.

Keywords: *CYP1A1*, Methylation, Gastric cancer, Smoking tobacco

* Corresponding Author.

Email: alibar647@yahoo.com

Tel: 0098 911 255 2396

Fax: 0098 113 382 2655

Conflict of Interests: *No*

Feyz, *Journal of Kashan University of Medical Sciences*, April, 2019; Vol. 23, No 1, Pages 61-67

Please cite this article as: Sadeghi-Amiri L, Barzegar A, Nikbakhsh-Zati N, Mehraban P. Study of the correlation between *CYP1A1* gene promoter methylation and smoking in gastric cancer patients. *Feyz* 2019; 23(1): 61-7.

بررسی همبستگی بین متیلاسیون ناحیه پروموتوری ژن *CYP1A1* و مصرف دخانیات در افراد مبتلا به سرطان معده

لیلی صادقی امیری^۱، علی برزگر^{۲*}، نوین نیکبخش ذاتی^۳، پویان مهربان^۲

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان معده یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در شمال ایران است. یکی از عوامل موثر در این امر، مصرف زیاد سموم کشاورزی در این مناطق است. *CYP1A1* یکی از اعضای مهم خانواده آنزیمی سیتوکروم P450 است که در مراحل سم‌زدایی نقش داشته و تغییر الگوی بیان آن تحت تاثیر مکانیسم‌های ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی، با بروز سرطان ارتباط معنی‌دار دارد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی ابتدا DNA ژنومی نمونه‌های توموری و سالم معده با روش فنل کلروفورم استخراج و تبدیل بی‌سولفیتی با استفاده از کیت EpiTech DNA Bisulfite انجام شد. نواحی غنی از CpG پروموتور ژن *CYP1A1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و سپس با روش توالی‌یابی بی‌سولفیتی سنجر و به‌صورت دو جهته توالی‌یابی شد. میزان متیلاسیون جایگاه‌های CpG محاسبه و همبستگی آن با خصوصیات دموگرافیک افراد بیمار با آزمون اسپیرمن بررسی شد. **نتایج:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که همبستگی معنادار مثبت بین متیلاسیون برخی از دی نوکلئوتیدهای CpG، به‌خصوص انواع موجود در توالی مورد توافق XRE (Xenobiotic response elements)، با مصرف سیگار و سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان معده وجود دارد. اما ارتباط معنی‌داری در خصوص تاثیر سن افراد بر میزان متیلاسیون مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** مصرف دخانیات و سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان معده تاثیر مثبت معنی‌داری بر میزان متیلاسیون پروموتور ژن *CYP1A1* دارد. بدین ترتیب می‌توان از غربالگری میزان متیلاسیون این ژن در افراد سیگاری و دارای سابقه خانوادگی ابتلا به بیماری، به‌عنوان یک مارکر برای تشخیص سرطان معده استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *CYP1A1*، متیلاسیون، سرطان معده، مصرف دخانیات

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۹۸، صفحات ۶۷-۶۱

مقدمه

این سرطان بیشتر در مردان و در سنین بالای ۴۰ سال شایع بوده و با افزایش سن خطر ابتلا به آن افزایش می‌یابد. بیشترین میزان شیوع سرطان معده در ایران، در استان‌های شمالی و شمال شرقی ثبت شده است [۴،۳]. به‌طور کلی اتیولوژی سرطان معده پیچیده بوده و ناشی از برهم‌کنش عواملی از قبیل اختلالات ژنتیکی، تغییرات اپی‌ژنتیکی و عوامل محیطی هم‌چون رژیم غذایی، آلودگی باکتریایی، مصرف دخانیات و کارسینوژن‌ها است [۵]. سموم شیمیایی از جمله مهم‌ترین کارسینوژن‌های شیمیایی هستند که به‌طور گسترده و کنترل نشده به‌ویژه در نواحی شمالی کشور (مازندران و گلستان) جهت دفع آفات نباتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اغلب کارسینوژن‌های شیمیایی پس از ورود به بدن توسط سیستم‌های آنزیمی فاز ۱ و ۲ متحمل تغییرات بیوشیمیایی می‌گردند تا به‌صورت محلول و قابل دفع درآیند. آنزیم‌های ابرخانواده سیتوکروم P450 مسئول کاتالیز واکنش‌های فاز اول دفع زئوبیوتیک‌ها از سلول‌ها هستند [۶]. فرم‌های آلی جهش‌یافته و یا کاهش میزان بیان برخی از اعضای خانواده سیتوکروم P450 ارتباط مستقیمی با بروز سرطان معده دارند [۸،۷]. هم‌چنین، بررسی‌های اخیر نشان داده است که تغییرات اپی‌ژنتیکی به‌خصوص در نواحی کنترلی ژن این آنزیم‌ها با تغییر میزان رونویسی آنها منجر به تغییر میزان پروتئین فعال

سرطان معده با درصد کشندگی ۱۵/۵ درصد در مردان و ۸/۴ درصد در زنان دومین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است [۱]. باوجود کاهش میزان وقوع سرطان معده در بسیاری از نقاط جهان، این بیماری هم‌چنان از مهم‌ترین دغدغه‌های درمانی محسوب می‌شود؛ چرا که این بیماری معمولاً در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود و گزینه‌های درمانی زیادی در این مراحل وجود ندارد [۲]. شواهد حاکی از آن است که نرخ بروز سرطان معده و مرگ‌ومیر ناشی از آن در کشورهای توسعه یافته، دو برابر کشورهای در حال توسعه است.

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
^۲ استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
^۳ دانشیار، گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
*** نشانی نویسنده مسئول:**
ساری، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تلفن: ۰۹۱۱۲۵۵۲۳۹۶ **درونویس:** ۰۱۱۳۳۸۲۲۶۵۵
پست الکترونیک: alibar647@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۷/۱۰/۲۳

بهشتی، مهرگان، بابل کلینیک و روحانی شهر بابل تحت عمل جراحی معده قرار گرفته بودند، استفاده شد. جمعیت مورد مطالعه افراد مبتلا به سرطان معده بودند که بدون محدودیت جنسی و سنی در نظر گرفته شدند. این افراد که بر اساس صلاح دید پزشک تحت عمل جراحی قرار گرفتند، با اطلاع کامل در این پژوهش شرکت نمودند. مدت زمان مطالعه قریب به ۲۴ ماه به طول انجامید که طولانی شدن آن به دلیل محدودیت جمع آوری نمونه‌های مورد نیاز بود. از هر بیمار دو نمونه بافتی، یکی از محل تومور و دیگری از بافت سالم مجاور آن توسط جراح متخصص استخراج و به صورت منجمد و استریل به آزمایشگاه منتقل شد. خصوصیات دموگرافیک افراد بیمار نظیر سن، مصرف دخانیات و سابقه فامیلی بیماری از پرونده پزشکی بیماران استخراج شد (جدول شماره ۱). این طرح پژوهشی با کد IR.MAZUMS.REC.1397.D110 در کمیته اخلاق بالینی دانشگاه علوم پزشکی مازندران مورد تأیید قرار گرفت.

جدول شماره ۱- خصوصیات دموگرافیک افراد مبتلا به سرطان معده

تعداد (درصد)	خصوصیات
	سن
۸ (۳۰ درصد)	۵۰-۵۹
۶ (۲۳ درصد)	۶۰-۶۹
۹ (۳۵ درصد)	۷۰-۷۹
۳ (۱۲ درصد)	۸۰-۸۹
	سابقه خانوادگی بیماری
۱۳ (۵۰ درصد)	۱- مثبت
۱۳ (۵۰ درصد)	۲- منفی
	مصرف دخانیات
۱۱ (۴۲ درصد)	۱- مثبت (بیش از ۱۰ نخ در روز)
۲ (۷ درصد)	۲- ترک سیگار (بیش از ۱۰ سال پیش)
۱۳ (۵۰ درصد)	۳- منفی (مطلقاً مصرف ندارد)

استخراج DNA و تبدیل بی سولفیتی

DNA ژنومی به روش فنل کلورفرم استخراج شد؛ بدین صورت که نمونه‌های بافتی ابتدا در نیتروژن مایع پودر شده و در بافر TSE (EDTA 0.1%, SDS 0.5%, Tris-HCl 10mM) لیز شد. آلودگی پروتئینی با آنزیم پروتیناز K تخریب شده و در اثر شست‌وشو با فنل-کلورفرم از محلول حذف گردید. سپس، DNA ژنومی با اتانول مطلق سرد رسوب داده شده و در آب مقطر حل شد. کیفیت DNA استخراجی با الکتروفورز در ژل آگاروز ۰/۸ درصد و کمیت آن با تکنیک اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. واکنش تبدیل بی سولفیتی DNA به وسیله کیت EpiTech

می‌گردد. از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های اپی ژنتیکی تغییر هیستون‌ها و وارپته‌های هیستونی، متیلاسیون DNA و RNAهای کوچک تنظیمی (miRNA) هستند [۱۰،۹]. متیلاسیون از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های اپی ژنتیکی است که تغییر میزان آن تأثیر چشم‌گیری بر میزان بیان ژن‌ها دارد [۹]. زونویوتیک‌ها ترکیباتی هستند که از طریق تغییر الگوی بیان ژن‌های مختلف مثل ژن‌های فرونشاندن تومور و انکوژن‌ها در بروز بیماری‌های مختلف به خصوص سرطان نقش دارند. از جمله زونویوتیک‌هایی که به عنوان عوامل سرطان‌زا وارد بدن می‌شوند، می‌توان به دود حاصل از مصرف دخانیات اشاره کرد. مصرف دخانیات به طور معنی‌داری باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان معده می‌شود [۱۱]. به علاوه، الگوی متیلاسیون ناحیه تنظیمی برخی از ژن‌ها در افراد سیگاری و غیرسیگاری تفاوت معناداری داشته و این میزان تفاوت در الگوی متیلاسیون می‌تواند عامل تفاوت در بیان ژن‌ها و به دنبال آن تفاوت در میزان و شدت بروز بیماری‌هایی مثل سرطان شود [۱۲،۱۳]. سیتوکروم P4501A1 (CYP1A1) عضوی از خانواده پروتئین‌های واجد هم (Heme) است که در متابولیسم زونویوتیک‌ها نقش دارد [۱۴]. ژن این آنزیم به طول ۵۹۸۷ جفت باز در جایگاه 15q22-q24 قرار داشته و پروتئینی به طول ۵۱۲ اسید آمینه را کد می‌کند. در ناحیه حدود ۴/۲ کیلوبازی بالادست نقطه شروع رونویسی ژن CYP1A1 دو جزیره CpG شامل CpGI در ناحیه ۲۸۱۳- تا ۳۵۶۵- و CpGII در ناحیه ۱۷۸- تا ۱۷۱۲- وجود دارد. این نواحی در گذشته به عنوان ناحیه افزایش دهنده ژن CYP1A1 معرفی شده بودند [۱۵]. این نواحی جایگاه‌های اتصال زونویوتیک‌ها هستند و هرگونه تغییر شیمیایی در این نواحی پتانسیل اتصال فاکتورهای خارجی را تغییر می‌دهد [۱۵]. بیان ژن CYP1A1 در بافت‌های گوناگون ارتباط معناداری با مصرف سیگار دارد [۱۶]. الگوی متیلاسیون ناحیه پرموتری ژن CYP1A1 در افراد مبتلا به سرطان‌های مختلف به خصوص سرطان ریه و سرگردن بررسی شده است [۱۷]، اما تاکنون بررسی در خصوص تأثیر مصرف سیگار بر تغییر الگوی متیلاسیون این ناحیه در بافت توموری و نرمال سرطان معده انجام نشده است. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین مصرف سیگار با تغییر الگوی متیلاسیون ناحیه ۳۹۲۳- تا ۳۳۳۷- پرموتر ژن CYP1A1 در افراد مبتلا به سرطان معده در استان مازندران است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های بافتی سرطان معده

در این مطالعه تجربی ۵۲ نمونه بافتی از ۲۶ فرد مبتلا به سرطان معده که طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۶ در بیمارستان‌های

به مدت ۱۰ دقیقه بود. قطعه تکثیری ۵۸۶ جفت باز طول داشته و در آن ۵۱ دی‌نوکلئوتید CpG قرار داشت که در اطراف منطقه اتصال فاکتورهای رونویسی C/EBPs قرار دارند. پس از تکثیر، کیفیت قطعه مورد نظر با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی شد و سپس تخلیص و توالی‌یابی توسط شرکت ژن‌فن‌آوران انجام گرفت. طی فرآیند بی‌سولفیتاسیون DNA، سیتوزین‌های غیرمتبله به یوراسیل و سپس تیمین تبدیل می‌شوند. سیتوزین‌هایی که در کربن شماره ۵ خود دارای گروه متیل باشند در اثر واکنش بی‌سولفیتاسیون تغییر نمی‌کنند. توالی‌های به دست آمده با ابزار BLAST و نرم‌افزار Chromas Version 2.6 بررسی شده و طول پیک‌های سیتوزین اندازه‌گیری شد. درصد متیلاسیون سیتوزین موجود در هر جایگاه CpG با تقسیم ارتفاع پیک سیتوزین بر مجموع ارتفاع سیتوزین و تیمین به دست آمد.

Kit Bisulfite (Qiagen, Germany) انجام شده و در نهایت در بافر TE حل گردید. تکثیر ناحیه ۳۹۲۳- تا ۳۳۳۷- بالادست ژن CYP1A1 به طول ۵۸۶bp با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد (جدول شماره ۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل غلظت ۱X بافر PCR، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار هرکدام از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی بی‌سولفیت شده و ۲/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز Taq انجام شد (تمامی ترکیبات استفاده شده در PCR از شرکت سیناژن تهیه گردید). چرخه‌های دمایی و زمانی واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۲ چرخه شامل: واسرشت‌سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۹°C به مدت ۹۰ ثانیه، بسط آغازگرها در دمای ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C

جدول شماره ۲- خصوصیات جفت آغازگر مورد استفاده برای تکثیر ناحیه ۳۹۲۳- تا ۳۳۳۷- بالادست ژن CYP1A1

نام	توالی	طول قطعه تکثیری	دمای اتصال
CYP1A1F	5'-GGTATTATTTTAGGATTGGATTA-3'	۵۸۶ جفت باز	۵۹°C
CYP1A1R	5'-ACATCCATCTAAAAACCAAATTC-3'		

نتایج

در این مطالعه ۵۲ نمونه بافتی از ۲۶ فرد مبتلا به سرطان معده مورد بررسی قرار گرفتند که تمامی نمونه‌ها مرد، با میانگین سنی ۷۰±۵ سال بودند. در بین افراد مورد بررسی، ۱۳ نفر (۵۰ درصد) سابقه مصرف دخانیات داشتند. هم‌چنین، ۱۳ نفر از افراد دارای سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان بودند. میزان متیلاسیون ناحیه ۳۹۲۳- تا ۳۳۳۷- بالادست ژن CYP1A1 به طول ۵۸۶ bp که دارای ۵۱ دی‌نوکلئوتید CpG می‌باشد با روش Bisulfite sequencing تعیین شد. پس از استخراج DNA ژنومی و تبدیل بی‌سولفیت، قطعه‌ای به طول تقریبی معادل ناحیه مورد بررسی با آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد (شکل شماره ۱). درصد متیلاسیون باز سیتوزین موجود در دی‌نوکلئوتیدهای CpG با بررسی و مقایسه پیک‌های سیتوزین و تیمین در کروماتوگرام توالی‌های حاصل به دست آمد (اطلاعات منتشر نشده) (شکل شماره ۲). فرآیند بی‌سولفیتاسیون بازهای سیتوزین را به بازهایی مشابه ساختار تیمین تبدیل کرده و تنها سیتوزین‌های متبله در برابر این تغییر مقاومت می‌کنند و ساختار سیتوزین برای آن‌ها باقی می‌ماند.

بررسی آماری

کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. بررسی ارتباط بین میزان متیلاسیون هر CpG با خصوصیات دموگرافیک با استفاده از آزمون اسپیرمن و در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ انجام شد. جهت بررسی همبستگی، میزان متیلاسیون و خواص دموگرافیک به صورت ترتیبی (غیرپارامتریک) در نظر گرفته شد. میزان متیلاسیون از صفر تا ۱۰۰ در ۵ گروه طبقه‌بندی گردید (جدول شماره ۳) و سپس با آزمون اسپیرمن آنالیز انجام شد [۱۸]. جهت بررسی ارتباط میزان تغییر متیلاسیون و سابقه خانوادگی از آزمون مجذور کای استفاده شد.

جدول شماره ۳- دسته‌بندی درصد متیلاسیون سیتوزین

ترتیب در نظر گرفته شده	میزان متیلاسیون
۱ (خیلی کم)	۱-۱۹
۲ (کم)	۲۰-۳۹
۳ (متوسط)	۴۰-۵۹
۴ (زیاد)	۶۰-۷۹
۵ (خیلی زیاد)	۸۰-۱۰۰

بررسی همبستگی بین متیلاسیون ناحیه پروموتری، ...

میزان متیلاسیون دی‌نوکلئوتیدهای CpG در افراد سیگاری و غیرسیگاری متفاوت بود. بررسی آماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین میزان متیلاسیون CpG‌های جایگاه‌های -۳۸۷۹، -۳۸۶۲، -۳۸۵۱، -۳۸۴۶، -۳۷۵۹، -۳۶۹۰، -۳۶۷۵، در بافت نرمال و جایگاه‌های -۳۸۷۹، -۳۸۵۳، -۳۸۱۴، -۳۷۶۶، -۳۷۵۹، -۳۷۰۱، -۳۶۸۳، -۳۶۵۰، -۳۶۱۱، -۳۵۹۳، -۳۵۹۱، -۳۵۸۵ و -۳۵۷۵ در بافت توموری با مصرف دخانیات وجود دارد (جدول شماره ۳). در بررسی همبستگی میزان متیلاسیون و مصرف دخانیات در آزمون اسپیرمن، متیلاسیون برخی جایگاه‌ها ارتباط هم‌سویی را با مصرف دخانیات نشان می‌دهد. این ارتباط هم‌سو در هر دو بافت توموری و نرمال (در CpG‌های متفاوت) مشاهده شده است که گواه تأثیر مواد مخدر بر تغییر الگوی متیلاسیون می‌باشد. این تفاوت در تغییر الگوی متیلاسیون در بافت نرمال و توموری سبب تفاوت میزان فشردگی ناحیه تنظیمی ژن سیتوکروم 1A1 شده و در نهایت تغییر بیان این ژن را به دنبال خواهد داشت. بررسی آماری نقش سابقه خانوادگی بیماری بر میزان متیلاسیون جزایر CpG نشان داد که متیلاسیون ارتباط معنی‌داری با سابقه خانوادگی ندارد. هم‌چنین، در بررسی تأثیر سن ابتلا به سرطان معده بر میزان متیلاسیون دی‌نوکلئوتیدهای CpG مشخص گردید افزایش سن به بالای ۶۰ سال تغییری در الگوی متیلاسیون ایجاد نکرده و این پارامتر بر تغییر الگوی بیان ژن تأثیرگذار نخواهد بود ($P > 0.05$).

بحث

علی‌رغم کاهش میزان موارد ابتلا به سرطان معده در بسیاری از نقاط دنیا، شمال و شمال غربی ایران هم‌چنان جزو مناطق با میزان بالای ابتلا به این بیماری بوده و حتی در بعضی گزارش‌ها این میزان افزایش یافته است. سموم ارگانوفسفره از جمله زنبوبوتیک‌های مهمی هستند که به میزان بالایی در شمال کشور جهت دفع سموم آفات نباتی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

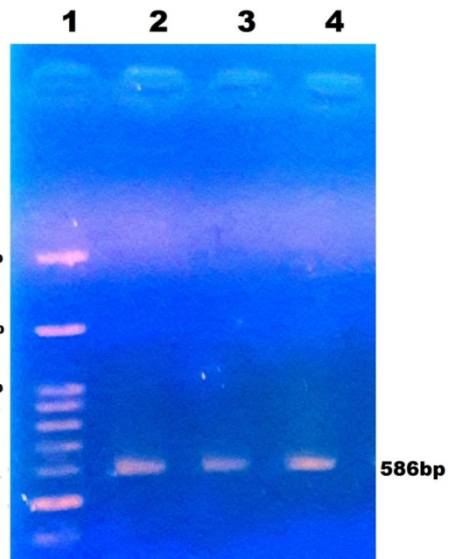
جدول شماره ۳- ارتباط میزان متیلاسیون دی‌نوکلئوتیدهای CpG ناحیه -۳۹۲۳ تا -۳۳۳۷ بالادست ژن *CYP1A1* با مصرف دخانیات در افراد مبتلا

به سرطان معده

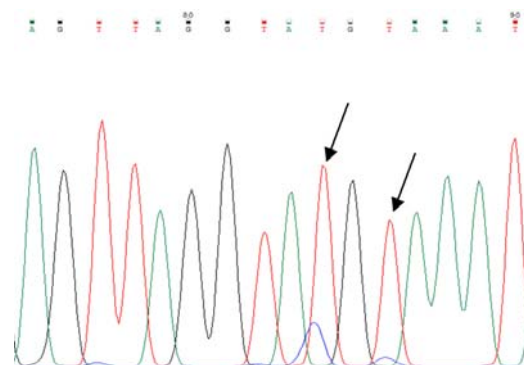
CpG site (*P value*)

CpG شماره	-۳۶۷۵	-۳۶۹۰	-۳۷۵۹	-۳۸۴۶	-۳۸۵۱	-۳۸۶۲	-۳۸۷۹						
بافت سالم	(۰/۰۰۷)	(۰/۰۲۷)	(۰/۰۳۲)	(۰/۰۲۵)	(۰/۰۰۷)	(۰/۰۴۶)	(۰/۰۰۱)						
CpG شماره	-۳۵۷۵	-۳۵۸۵	-۳۵۹۱	-۳۵۹۳	-۳۶۱۱	-۳۶۵۰	-۳۶۸۳	-۳۷۰۱	-۳۷۵۹	-۳۷۶۶	-۳۸۱۴	-۳۸۵۳	-۳۸۷۹
بافت توموری	(۰/۰۱۳)	(۰/۰۰۵)	(۰/۰۰۷)	(۰/۰۱۱)	(۰/۰۰۳)	(۰/۰۱۸)	(۰/۰۰۱)	(۰/۰۳۷)	(۰/۰۳۲)	(۰/۰۲۲)	(۰/۰۱۴)	(۰/۰۰۷)	(۰/۰۳۱)

همبستگی مصرف مواد مخدر و میزان متیلاسیون نوکلئوتیدهای سیتوزین توسط آزمون اسپیرمن ($P > 0.05$) بررسی گردید که در نتیجه‌ی این بررسی آماری، افزایش میزان متیلاسیون برخی از دی‌نوکلئوتیدها با مصرف مواد مخدر ارتباط معنادار نشان داده است.



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول حاصل از تکثیر ناحیه -۳۹۲۳ تا -۳۳۳۷ بالادست ژن *CYP1A1* در ژل آگاروز ۱ درصد. ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمتاس. ۲، ۳ و ۴: قطعه تکثیر شده از تعدادی از نمونه‌های DNA ژنومی بی‌سولفیت‌شده با طول ۵۸۶ جفت باز



شکل شماره ۲- تصویر بخشی از کروماتوگرام توالی ناحیه -۳۹۲۳ تا -۳۳۳۷ بالادست ژن *CYP1A1* در نرم‌افزار Chromas را نشان می‌دهد. فلش‌ها نشان‌دهنده پیک بلند تیمین هستند که در قسمت پایین آن پیک‌های سیتوزین به صورت کوتاه نشان داده می‌شود.

متیلاسیون پرموتر این ژن در بافت نرمال تحت تاثیر دخانیات را نشان می‌دهد [۲۲]. مشخص شده است که مصرف تنباکو و دخانیات باعث افزایش میزان پروتئین‌های انتهایی در خون می‌شود [۲۳]. علاوه بر این، در خلال همین تحقیقات مشخص شد که متیلاسون کلی ژنوم با مصرف تنباکو و دخانیات افزایش می‌یابد. Lee و همکارانش نیز نشان دادند که افزایش میزان متیلاسیون ژنوم می‌تواند در اثر عوامل مختلف رخ دهد [۲۴]. با این حال، محققین نتیجه گرفتند که بالا رفتن میزان متیلاسیون و مصرف دخانیات رابطه‌ای معنی‌دار دارند. همچنین، دیگر مطالعات بر رابطه معنی‌دار بین افزایش متیلاسیون و مصرف دخانیات مهر تایید زده‌اند و نشان داده‌اند که این افزایش متیلاسیون برگشت‌پذیر است و با عدم مصرف دخانیات کاهش می‌یابد [۲۵]. در بررسی آماری سن افراد مبتلا به سرطان، در هر دو بافت نرمال و توموری متیلاسیون هیچ-کدام از CpGها با رده سنی ارتباط معنادار نشان نداده و متیلاسیون را رخدادی مستقل از سن معرفی می‌کند. هرچند تحقیقاتی مبنی بر وجود رابطه معنی‌دار بین این دو متغیر وجود دارد، اما نتایج حاصل از هر پژوهش تحت اثر شرایط مختلفی از- جمله جامعه آماری و شرایط زندگی افراد آن جامعه متفاوت است؛ بنابراین ما می‌توانیم تنها نتایج حاصل از این پژوهش را به‌عنوان یک دستاورد آزمایشگاهی گزارش کنیم و نمی‌توانیم آن را به تمامی جامعه تعمیم دهیم.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مصرف دخانیات ارتباط معنی‌داری با افزایش متیلاسیون جایگاه‌های مختلف از جمله جایگاه ۳۸۱۴- دارد. بنابراین بررسی متیلاسیون این ناحیه می‌تواند یک مارکر تشخیصی مناسب برای غربالگری افراد مستعد ابتلا به سرطان معده و همچنین بررسی روند پیشرفت بیماری باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل نتایج پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد با موضوع "بررسی تاثیر عصاره فلاونوئیدی جلبک قرمز *Laurencia caspica* در مواجهه با سم دورسبان بر متیلاسیون ناحیه پرموتری ژن CYP1A1 در رده سلولی AGS" می‌باشد. این پژوهش حامی مالی نداشته و با هزینه شخص انجام شده است.

نتایج حاصل از تحقیقات گذشته نشان می‌دهند که زنبیوتیک‌ها از طریق ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیکی از قبیل متیلاسیون DNA و تغییر بیان ژن‌های مرتبط، در بروز سرطان معده نقش دارند. CYP1A1 یکی از مهم‌ترین اعضاء ابرخانواده سیتوکروم P450 است که همراه با بعضی اعضاء دیگر مسئول کاتالیز واکنش‌های فاز اول دفع سموم و ترکیبات خارجی از سلول‌ها است. در این تحقیق ارتباط متیلاسیون پرموتر ژن CYP1A1 با برخی از خصوصیات دموگرافیک در افراد مبتلا به سرطان معده در استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌های بافتی نرمال متیلاسیون بسیاری از دی‌نوکلئوتیدهای CpG همبستگی معنادار مثبتی داشته و می‌توان این‌گونه بیان کرد که متیلاسیون در یک ناحیه به‌صورت هم‌سو افزایش یا کاهش می‌یابد؛ بدین‌صورت که متیلاسیون و دمتیلاسیون در این ناحیه از ژن را می‌توان یک رخداد تعاونی دانست. این پدیده در بافت‌های توموری بارزتر بوده و افزایش متیلاسیون در تعداد بیشتری از دی‌نوکلئوتیدهای CpG به‌صورت چشم‌گیر با یکدیگر در ارتباط است. در برخی پژوهش‌ها این توالی‌های غنی از CpG در ناحیه پرموتری را نواحی حساس به زنبیوتیک [Xenobiotic response elements (XRE)] نام‌گذاری کرده‌اند. با توجه به اهمیت ناحیه پرموتری این ژن به‌خصوص نواحی غنی از CpG برای اتصال فاکتورهای رونویسی از جمله گیرنده آریل هیدروکربن AHR هرگونه تغییر در ساختار شیمیایی نوکلئو-تیدها موجب تغییر میزان تمایل فاکتورها برای اتصال شده و به-دنبال آن بر میزان و چگونگی رونویسی تاثیرگذار خواهد بود [۱۵، ۱۹]. ناحیه مورد بررسی در این تحقیق شامل سه توالی حساس به زنبیوتیک بوده و CpG شماره ۳۸۱۴- دقیقاً در توالی XRE شماره ۵ قرار گرفته است. این توالی محل اتصال کمپلکس پروتئینی Ahr/ARNT بوده و اتصال این کمپلکس موجب تغییر ساختار کروماتین و میزان فشرده‌گی آن ناحیه خواهد شد [۲۰]. نیمی از افراد مورد بررسی در پژوهش حاضر سابقه مصرف دخانیات داشته و تغییر اپی‌ژنتیکی در اکثر دی‌نوکلئوتیدهای CpG به‌خصوص CpG موجود در توالی XRE شماره ۵ با میزان مصرف مواد دخانی ارتباطی هم‌سو داشت. تحقیقات Tekpli و همکاران نیز گواه ارتباط معنادار متیلاسیون ناحیه پرموتری ژن CYP1A1 در بافت سالم و توموری ریه با مصرف سیگار می-باشد [۲۱]. تحقیقات Antila و همکاران نیز حاکی از تفاوت الگوی متیلاسیون ناحیه پرموتری ژن CYP1A1 در رده سلولی نرمال و توموری ریه است و همچنین تحریک تغییر الگوی

References:

- [1] Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol* 2008; 20(3): 56-63.
- [2] Rugge M, Fassan M, Graham DY. Epidemiology of gastric cancer. In *Gastric Cancer*: Springer, Cham; 2015; 23-34.
- [3] Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nourai M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: Results of a population-based Cancer Registry from Iran. *Int J Cancer* 2003; 107(1): 113-8.
- [4] Pakseresht M, Forman D, Malekzadeh R, Yazdanbod A, West RM, Greenwood DC, et al. Dietary habits and gastric cancer risk in north-west Iran. *Cancer Causes Control* 2011; 22(5): 725-36.
- [5] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- [6] Sergentanis TN, Economopoulos KP. Four polymorphisms in cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122(2): 459-69.
- [7] Nishimoto IN, Hanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, et al. Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(7): 675-80.
- [8] Cai L, Zheng ZL, Zhang ZF. Cytochrome p450 2E1 polymorphisms and the risk of gastric cardia cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(12): 1867-71.
- [9] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2): 143.
- [10] Toutouchi M, Shahhosseini M, Moumeni MM, Baharvand H. Epigenetic of stem cells. *Cell J (Yakhteh)* 2007; 9(1): 51-66.
- [11] Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, Pinheiro-Torres T, Pinto I, Santos-Pereira R, et al. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control* 2008; 19(7): 689-701.
- [12] Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet* 2011; 88(4): 450-7.
- [13] Breton CV, Byun HM, Wenten M, Pan F, Yang A, Gilliland FD. Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Critical Care Med* 2009; 180(5): 462-7.
- [14] Walsh AA, Szklarz GD, Scott EE. Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J Biol Chem* 2013; 288(18): 12932-43.
- [15] Kress S, Reichert J, Schwarz M. Functional analysis of the human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) gene enhancer. *Eur J Biochem* 1998; 258(2): 803-12.
- [16] Kim JH, Sherman ME, Curriero FC, Guengerich FP, Strickland PT, Sutter TR. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199(3): 210-9.
- [17] Sharma R, Panda NK, Khullar M. Hypermethylation of carcinogen metabolism genes, CYP1A1, CYP2A13 and GSTM1 genes in head and neck cancer. *Oral Dis* 2010; 16(7): 668-73.
- [18] Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet* 2011; 88(4): 450-7.
- [19] Nukaya M, Bradfield CA. Conserved genomic structure of the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci and their dioxin responsive elements cluster. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(4): 654-9.
- [20] Nakajima M, Iwanari M, Yokoi T. Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells. *Toxicol Lett* 2003; 144(2): 247-56.
- [21] Tekpli X, Zienolddiny S, Skaug V, Stangeland L, Haugen A, Mollerup S. DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer* 2012; 131(7): 1509-16.
- [22] Anttila S, Hakkola J, Tuominen P, Elovaara E, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Nurminen T. Methylation of cytochrome P4501A1 promoter in the lung is associated with tobacco smoking. *Cancer Res* 2003; 63(24): 8623-28.
- [23] Dogan MV, Shields B, Cutrona C, Gao L, Gibbons FX, Simons R, et al. The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. *BMC Genomics* 2014; 15(1): 151.
- [24] Lee KW, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet* 2013; 4: 132.
- [25] Wan ES, Qiu W, Baccarelli A, Carey VJ, Bacherman H, Rennard SI, et al. Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. *Hum Mol Genet* 2012; 21(13): 3073-82.