

Investigation of simultaneous of CADM1 gene methylation pattern and HPV virus quantification as a diagnostic biomarker in Cervical Cancer

Asma Soltanalizadeh¹ , Changiz Ahmadizadeh² 

¹ Department of microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

² **Corresponding author**; Department of microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
Tel: +989104030464 Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com



Citation Soltanalizadeh A, Ahmadizadeh Ch. [Investigation of simultaneous of CADM1 gene methylation pattern and HPV virus quantification as a diagnostic biomarker in Cervical Cancer]. J Birjand Univ Med Sci. 2020; 27(1): 44-55. [Persian]

DOI <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.1.103>

Received: July 4, 2019

Accepted: November 4, 2019

ABSTRACT

Background and Aim: Researches have shown that promoter methylation of the CADM1 gene is one of the main mechanisms to silence its expression in cancer cells. The objective of this study was to determine the methylation pattern of the CADM1 gene promoter and to quantify the human papillomavirus.

Materials and Methods: In this research, 75 tumor tissues and 75 tumor marginal tissue samples taken from patients with definitive diagnosis of cervical cancer were examined. After extraction of DNA and ensuring the quality and quantity of DNA extracted by spectrophotometry and the agarose gel electrophoresis method, the methylation pattern of the CADM1 was performed by the HRM method. Determining the methylation pattern of the CADM1 gene, without considering the type of involved variants was performed by using the Eva Green method and comparing the high-resolution melting point and HPV quantities were determined after isolation from the block.

Results: Methylation of CADM1 gene in cervical tumor cells increased significantly ($P < 0.0001$) in comparison with the tumor margin before and after radiotherapy. But the change in the level of methylation of tumor cells before and after radiotherapy was not significant. This means that radiotherapy does not affect the level of methylation of the CADM1 gene. Moreover, the level of methylation of CADM1 gene in patients with HPV titer higher than 500 ml / IU was significantly more than that of patients with HPV titer lower than 500 ml / IU.

Conclusion: Use of DNA methylated of the cancer cells as a prognosis for cervical cancer in HPV positive women it's appropriate, also the CADM1 gene can be used as a marker of cervical cancer.

Key Words: Cervical Cancer; HPV Virus; Methylation

بررسی همزمان الگوی متیلاسیون ژن *CADMI* و کمیت ویروس *HPV* به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی در سرطان سرویکس

اسماء سلطانه‌لی زاده^۱، چنگیز احمدی زاده^۲

چکیده

زمینه و هدف: پژوهش‌ها نشان داده‌اند که متیلاسیون پروموتور ژن *CADMI* یکی از مکانیسم‌های اصلی خاموش شدن بیان آن در سلول‌های سرطانی است. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *CADMI* و تعیین کمیت ویروس پاپیلومای انسانی بود.

روش تحقیق: در این مطالعه، ۷۵ نمونه بافت توموری و ۷۵ نمونه بافت حاشیه تومور که با تشخیص قطعی سرطان سرویکس از بیماران گرفته شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفت. پس از استخراج DNA و اطمینان از کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز، الگوی متیلاسیون *CADMI* به روش HRM انجام گرفت. تعیین الگوی متیلاسیون ژن *CADMI* بدون در نظر گرفتن نوع واریانت‌های درگیر با استفاده از روش Eva Green و مقایسه نقطه ذوب با درجه تفکیک بالا صورت گرفت و کمیت *HPV* پس از جداسازی آن از بلوک بررسی گردید.

یافته‌ها: متیلاسیون ژن *CADMI* در سلول‌های تومور سرویکس در مقایسه با حاشیه تومور، قبل و بعد از رادیوتراپی افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.001$)؛ اما تغییر در میزان متیلاسیون سلول‌های توموری، قبل و بعد از رادیوتراپی معنی‌داری نبود. به این معنی که رادیوتراپی در میزان متیلاسیون ژن *CADMI* تأثیری نداشت. همچنین میزان متیلاسیون ژن *CADMI* در بیماران با تیتراژ *HPV* بالای ۵۰۰ ml/IU به‌طور معنی‌داری بیشتر از بیماران با تیتراژ پایین‌تر از ۵۰۰ ml/IU بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از DNA متیله سلول‌های سرطانی به عنوان پیش‌آگهی برای رخداد سرطان سرویکس در زنان *HPV* مثبت مناسب است؛ همچنین می‌توان از ژن *CADMI* نیز به‌عنوان یک نشانگر سرطان سرویکس استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سرطان سرویکس؛ ویروس پاپیلومای انسانی؛ متیلاسیون

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۹؛ ۲۷(۱): ۴۴-۵۵.

دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۳

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

^۲ نویسنده مسؤول؛ گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

آدرس: دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

تلفن: +۹۸۹۱۰۴۰۳۰۴۶۴ پست الکترونیکی: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

مقدمه

سرطان دهانه رحم، دومین سرطان شایع در میان زنان جهان است که سالانه نزدیک به ۵۰۰ هزار زن در اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۱). دو فرم اصلی از سرطان گردن رحم وجود دارد که شامل سرطان بدخیم سلول سنگفرشی (Squamous cell carcinomas) و آدنوکارسینومای گردن رحم (Adenocarcinomas) می‌باشد. حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد سرطان‌های گردن رحمی از نوع SCC است. این فرم سرطان، از بخش خارجی سرویکس (گردن رحم) ایجاد می‌شود (۲). سرطان دهانه رحم در مراحل اولیه به راحتی قابل تشخیص و درمان کامل می‌باشد و در صورتی که تشخیص آن به تأخیر بیافتد درمان آن مشکل و گاهی ناموفق خواهد بود (۳). تشخیص زودهنگام این سرطان به وسیله تست پاپ اسمیر امکان پذیر است. در جوامعی که برنامه‌های غربالگری فعالی دارند، طی ۳۰ سال گذشته میزان مرگ و میر ناشی از این نوع سرطان تا ۵۰ درصد کاهش یافته است (۴). براساس مطالعات انجام شده، در کشور سوئد ۹۵ درصد زنان نسبت به برنامه‌های غربالگری سرطان دهانه رحم آگاهی داشته و حداقل یکبار برای انجام این تست مراجعه نموده‌اند (۵).

یکی از دلایل اصلی سرطان یا به عبارتی، دلیل اولیه سرطان، تغییرات ژنتیکی زیاد و ناپایداری ژنتیکی است. ناپایداری ژنتیکی، یک موقعیت گذرا یا دائمی است که موجب یک سری از حوادث جهشی می‌شود که به تغییرات جهشی ناخالص منجر می‌گردد (۶). HPV^۱ با تغییر پروتوانکوژن و ژن‌های تومور ساپرسور، باعث ایجاد تغییر شکل سلول شده و موجب بروز سرطان می‌شود. انکوژن‌ها از موتاسیون پروتوانکوژن‌ها و یا از بیان غیر طبیعی آنها حاصل می‌شوند و باعث تکثیر غیرطبیعی سلول‌ها و توسعه تومور می‌شوند (۷). عفونت مداوم با انواع پرخطر ویروس پاپیلومای

انسانی یا HPV، بزرگترین فاکتور خطر برای توسعه بدخیمی‌های دستگاه تناسلی می‌باشد (۸). هر فردی می‌تواند از طریق تماس جنسی محافظت نشده با کسی که ناقل ویروس است، به ویروس HPV آلوده شود. انواع مختلفی از ویروس HPV وجود دارد که نقش متفاوتی در ایجاد سرطان سرویکس دارند. حدود ۷۰ درصد بیوپسی‌های سرطان دهانه رحم، حاوی عفونت پاپیلومایی از نوع ۱۶ و ۱۸ می‌باشد (۹). تحقیقات نشان داده است که متیلاسیون نواحی CpG ژن‌های انکوژنی، به عنوان یک مکانیزم مهم اپی ژنتیکی برای خاموش شدن ژن، اولین و رایج ترین تغییر مولکولی در فرآیند سرطان زایی چندمرحله‌ای است. شناخت الگوهای متیلاسیون مشخص در انواع تومورها می‌تواند طیف وسیعی از فرصت‌ها را برای تشخیص و پیش‌آگهی تومور فراهم کند (۱۰). بررسی عملکرد مولکولی سلول‌های سرطانی نشان داده است که بیان برخی از ژن‌ها در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های طبیعی بیشتر از حد معمول شده و یا متوقف می‌شود. یکی از این ژن‌ها Cell adhesion Molecule 1 (CADM1) می‌باشد که یک منطقه خاص با تقریباً ۷۰۰ کیلوبایت در کروموزوم 11q23.2 است و متعلق به خانواده بزرگ ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشد. فعالیت بیولوژیکی اصلی CADM1 شامل: چسبندگی سلولی، حرکت سلولی، انتقال سیگنال، تنظیم ایمنی و سرکوب تومور است (۱۱). بسیاری از محققان دریافته‌اند که ژن CADM1 در سرطان دهانه رحم، سرطان پستان، کارسینوم ناحیه بینی و بسیاری دیگر از تومورهای بدخیم به صورت خاموش و فاقد عملکرد می‌باشد (۱۲). ژن CADM1 می‌تواند رشد تومور را از طریق فعالیت‌های ضد Proliferative and Propoptotic سوق دهد و از دست رفتن بیان آن می‌تواند منجر به تهاجم تومور یا متاستاز شود (۱۳). تحقیقات نشان داده است که متیلاسیون پروموتور ژن CADM1، یکی از مکانیسم‌های اصلی خاموش شدن بیان آن در سلول‌های سرطانی است (۱۴).

¹ Human papillomavirus

Filter انتقال داده شد و به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس به مدت ۲ دقیقه در سرعت ۱۱,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد؛ فیلتر و RTA Receiver دور انداخته شد و مجدد مخلوط به داخل RTA Spin Filter داخل RTA Receiver جدید انتقال داده شد. مقدار $500 \mu\text{l}$ از Wash Buffer I به RTA Spin Filter افزوده شد و به مدت یک دقیقه در ۱۱,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید؛ دوباره فیلتر و RTA Receiver دور انداخته شد و مجدد مخلوط به داخل RTA Spin Filter داخل RTA Receiver جدید انتقال داده شد. مقدار $700 \mu\text{l}$ از Buffer II Wash افزوده شد و به مدت یک دقیقه در ۱۱,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید؛ سپس فیلتر، جدا و روی تیوپ قرار داده شد. مقدار $700 \mu\text{l}$ از Wash Buffer II اضافه شد و به مدت یک دقیقه در سرعت ۱۱,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام گرفت. فیلتر و RTA Receiver Tube دور انداخته و RTA Spin Filter داخل تیوپ جدیدی انتقال داده شد و به مدت ۴ دقیقه برای حذف کامل اتانول، در حداکثر سرعت سانتریفیوژ شد. فیلتر و RTA Receiver Tube کنار گذاشته شد و به مدت ۱۵ دقیقه داخل فیلتر جدیدی انتقال داده شد. مقدار $100 \mu\text{l}$ از Elution Buffer که قبلاً تا 56°C گرم شده بود، به داخل RTA Spin Filter افزوده شد و مخلوط در دمای اتاق به مدت یک دقیقه انکوبه گردید. مخلوط در ۱۱,۰۰۰ rpm به مدت ۱۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. RTA Spin Filter دور انداخته شد و در تیوپ $1/5$ میلی لیتری بسته و DNA ویروسی در 4°C یا در -20°C (به مدت زمان زیادی) ذخیره سازی شد.

بررسی متیلاسیون ژن CADM1:

ابتدا برای این بررسی، تغییرات متیلاسیون بر روی DNAهای مورد مطالعه از طریق کیت (Zymo Research, EZ-96 DNA Methylation-Gold™ (Irvine, CA و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آن مورد مطالعه قرار گرفت.

با توجه به اهمیت یافتن نشانگرهای زیستی تخصصی برای تشخیص سرطان، در مطالعه حاضر، الگوی متیلاسیون همزمان ژنوم ویروس HPV و ژن CADM1 به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی در نمونه بافت سرطان سرویکس، مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی می باشد که دارای کد اخلاق به شناسه IR.IAU.TABRIZ.REC1398.014 مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز است. در این مطالعه، تعداد ۱۵۰ نمونه بلوک پارافینه (۷۵ نمونه بافت سرطانی و ۷۵ نمونه بافت مارژینال) سرویکس مورد مطالعه قرار گرفت. این نمونه ها از مبتلایان به بدخیمی گردن رحم که در طی سالهای ۹۶-۱۳۹۵ به بیمارستان الزهرا تبریز مراجعه کرده بودند، توسط متخصصین زنان و زایمان و پاتولوژیست جمع آوری شدند. قبل از جمع آوری نمونه، از کلیه بیماران رضایت نامه کتبی دریافت شد.

مراحل استخراج DNA:

DNA توتال از بلوک پارافینه دریافتی طبق دستورالعمل شرکت Bioneer، سازنده کیت استخراج DNA از بلوک پارافینه به شماره کاتالوگ 740980.50 جداسازی شد. برای بررسی متیلاسیون ژن CADM1، ابتدا DNA از نمونه بافت سرویکس به صورت زیر جداسازی گردید:

مقدار ۲۰۰-۱ نانوگرم از بافت هموژن شده، به داخل تیوپ $1/5$ میلی لیتری انتقال یافت؛ سپس میزان $200 \mu\text{l}$ از Lysis Buffer HL اضافه و ۵ بار توسط پیپتینگ به طور کامل مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق در حالت continuously shaking انکوبه گردید. در نهایت $20 \mu\text{l}$ از Proteinase K و $20 \mu\text{l}$ از Carrier DNA، افزوده و در داخل ورتکس مخلوط شد.

کنترل داخلی از Binding Buffer HL افزوده و ۵ سری با پایپتینگ مخلوط شد. مخلوط به داخل RTA Spin

به طور خلاصه، غلظت های ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰ میکرولیتر از DNA دچار تغییر متابولیسمی سولفیت شده، تهیه شد. غلظت ۱/۲۰ به عنوان الگو برای Real-time PCR استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت، واکنش تکثیر در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که مشتمل بر ۱۰ لانداز از محلول اصلی (Master Mix)، ۰/۴ لانداز از پرایمر Forward، ۰/۴ لانداز از پرایمر Reverse، ۵ لانداز از DNA متابولیسمی سولفیت شده و ۴/۲ لانداز آب مقطر بود. پس از اعمال تغییرات، برای اندازه گیری میزان متیلاسیون ژنی از دستگاه Eco شرکت Eco Biosystems استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به ژن CADM1 با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی و توسط شرکت بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز گردید و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰nm مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه به صورت زیر می باشد:

Forward primer: 5'-GACTCTACGGCTGCCTTCTC-3',
Reverse primer: 5'-AGAAGTGCATGCGTGCTTTG-3'.

واکنش تکثیر برای ۴۰ سیکل بر طبق الگوی دمایی زیر انجام شد:

فعال سازی آنزیم (Hot start) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد؛ دناتوراسیون اولیه و Holding در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه و Annealing در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، انجام گردید. طولی سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۵ ثانیه صورت گرفت. جذب نور نیز در این دما صورت گرفت. بعد از این مراحل، مرحله ی Melting در دمای ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد تا باندهای DNA های تحت تأثیر متابولیسم سولفیت از نظر تمایز دمایی با قدرت تشخیصی بالا (HRM) تفکیک شوند.

استانداردهای کمکی موجود در کیت (HPV S 1-5) با همان روش استخراج نمونه و با همان حجم، انجام شد. برای تولید یک منحنی استاندارد در RotorGene™

$$\text{Result (IU/ml)} = \frac{\text{Result} \left(\frac{\text{IU}}{\mu\text{l}} \right) \times \text{Elution Volume} (\mu\text{l})}{\text{Sample Volume} (\text{ml})}$$

تعیین حجم نمونه با استفاده از فرمول زیر و با در نظر گرفتن $P=0/1$ ، فاصله اطمینان ۹۵ درصد و میزان خطای قابل تحمل ۰/۴ به تعداد ۱۵۰ نمونه انجام گرفت. پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی، با به کار بردن قانون هاردی واینبرگ^۱، میزان فراوانی مورد انتظار و مشاهده شده محاسبه، و وارد محیط SPSS شد. از این نرم افزار برای پی بردن به میزان فراوانی هر یک از الگوهای متیلاسیون مورد مطالعه استفاده شد و میزان فراوانی، مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تعداد آللهای تغییر یافته در جامعه مورد مطالعه، از روش آنالیز واریانس استفاده شد. فرض صفر در آنالیز واریانس، برابر بودن میانگین متغیر وابسته در تمام سطوح متغیر مستقل است. اگر سطح معنی داری آزمون کمتر از ۰/۰۵ باشد، فرض صفر رد می شود. در جدول آنالیز واریانس مجموع مربعات تیمارها، درجات آزادی، میانگین مربعات، آماره F و سطح معنی داری آنالیز واریانس محاسبه شد.

یافته ها

آنالیز کیفی DNA:

به منظور تأیید کیفی DNA استخراجی، الکتروفورز نمونه ها بر روی ژل ۱/۵٪ آگارز انجام شد که در شکل ۱، وجود باند مشخص یک دست، نشان از کیفیت DNA استخراجی دارد.

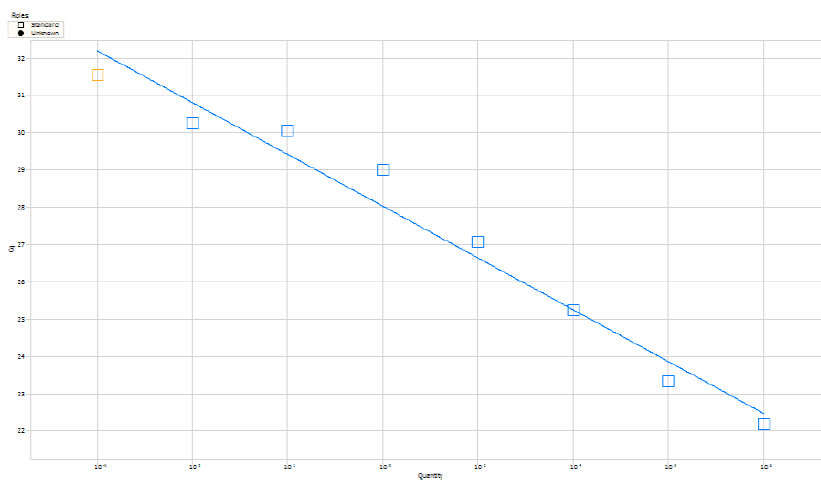
پس از به دست آمدن تغییرات بیان ژن های CADM1 در تمامی موارد مورد مطالعه، بیماران به دو گروه تقسیم شدند

¹ Hardy-Weinberg principle

و لود ویروسی HPV با به‌کارگیری کیت شرکت Genome diagnostic به شماره کاتالوگ ۹۱۱۱۰۰۴ مطالعه گردید. برای بررسی تغییر الگوی متیلاسیون ژنوم ژن *CADMI* و کمیت ویروس *HPV* و در نمونه‌های توموری سرویکس و مارژینال، واکنش Real Time PCR برای DNAهای تهیه‌شده برای تمامی نمونه‌های بافت (سرطانی و مارژینال)، برای ژنوم ویروس *HPV* (نمودار ۱) و ژن *CADMI* (نمودار ۲) انجام گرفت. برای اطمینان از وجود تکثیرهای غیر

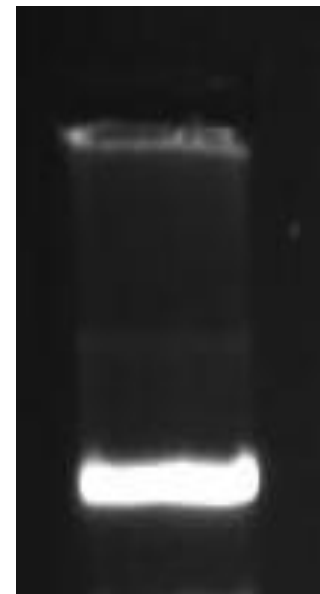
اختصاصی در نتایج Real time PCR، منحنی ذوب برای ژنوم ویروس *HPV* (نمودار ۳) و ژن *CADMI* (نمودار ۴) تهیه شد. تغییر الگوی متیلاسیون ژن *CADMI* در سرطان سرویکس بیماران از روی نمونه‌های بالینی قبل از درمان (رادیوتراپی) با هدف محاسبه پایه‌ای الگوی متیلاسیون، انجام شد و نتایج حاصل نشان داد، درجه تغییر متیلاسیون بر روی این ژن، در تومور در مقایسه با حاشیه تومور به‌صورت معنی‌داری متفاوت بود ($P < 0.0001$ ، نمودار ۴).

Standard Curve



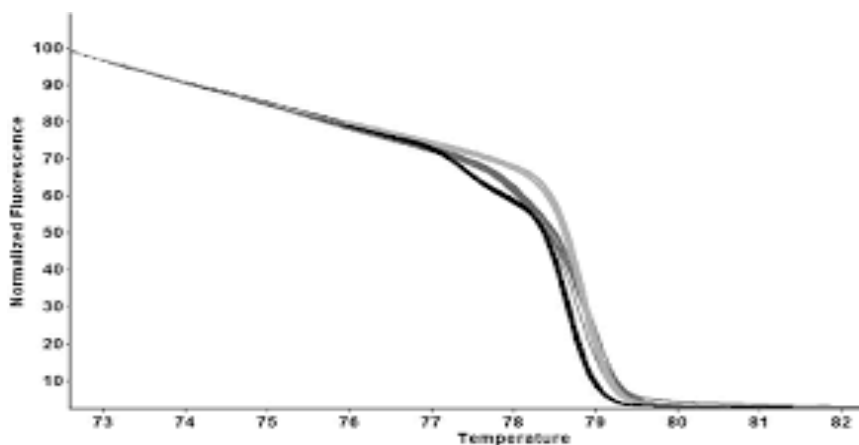
Standard Curve Results

Assay Name	Color	Slope	Intercept	R2
Assay 1	Blue	-1.38893215	30.81140221	0.96840745

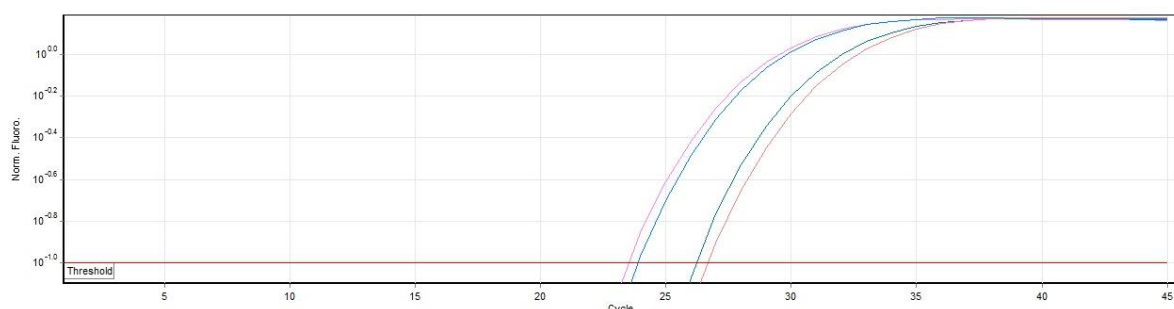


نمودار ۱- نمودار استاندارد نمونه‌های انجام‌شده برای ژن هدف *HPV* برای تعیین Efficiency و واکنش Real Time PCR.

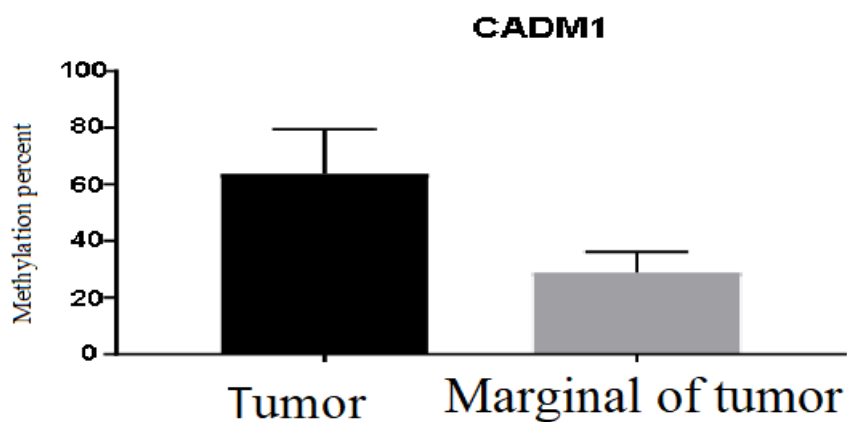
شکل ۱- ظهور باند یکدست حاصل از الکتروفورز نمونه‌های DNA بر ژل آگارز ۱/۵٪



نمودار ۲- منحنی ذوب Real time PCR HRM برای ژن CADM1 برای چند نمونه مثبت مبتلا به سرطان سرویکس



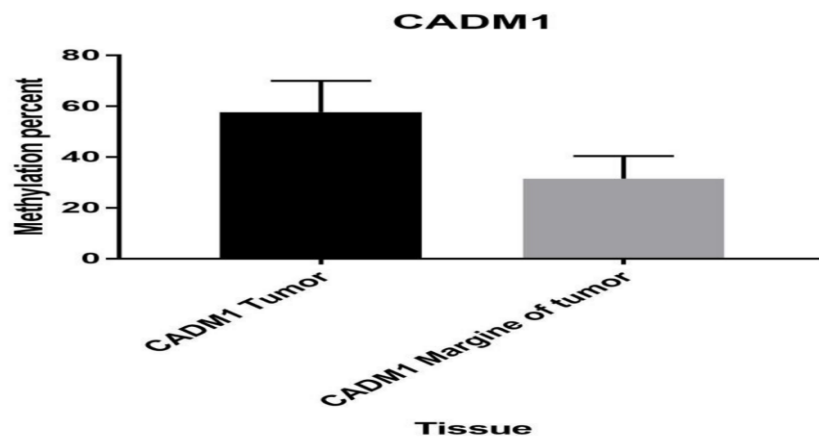
نمودار ۳- منحنی تکثیر Real time PCR برای ژن CADM1 برای چهار نمونه مثبت مبتلا به سرطان سرویکس



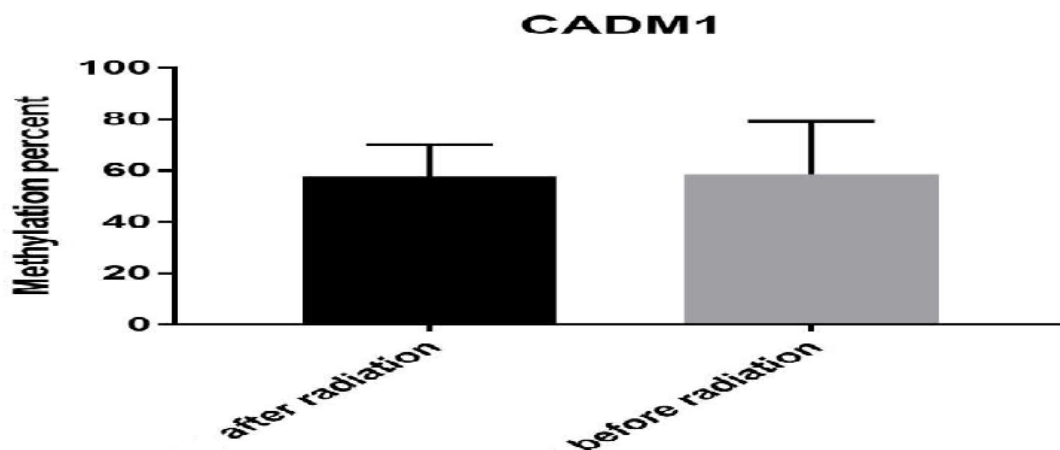
نمودار ۴- مقایسه فراوانی نسبی متیلاسیون ژن CADM1، در بیماران مورد مطالعه قبل از رادیوتراپی (P<0/0001).

تغییر الگوی متیلاسیون بر اساس درصد متیله شدن، در بیماران مبتلا به سرطان سرویکس، قبل و بعد از رادیوتراپی با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان متیلاسیون ژن *CADMI* در بیماران بعد از رادیوتراپی کاهش یافت. این میزان کاهش در مقایسه با میزان متیلاسیون قبل از رادیوتراپی، معنی دار نبود ($P=0/882$ ، نمودار ۷). این نتیجه بیان کننده این نکته است که رادیوتراپی در تغییر الگوی متیلاسیون ژن *CADMI* مؤثر نیست (نمودار ۶).

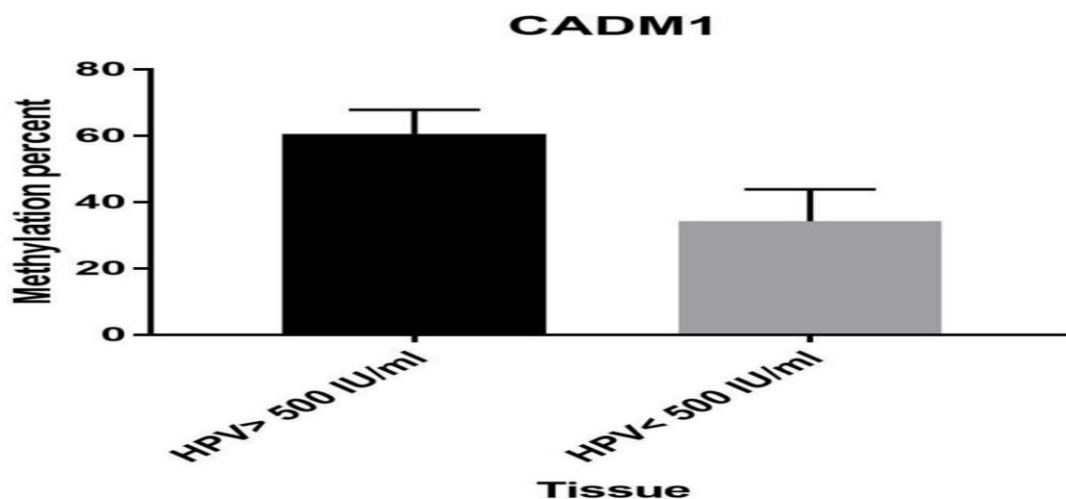
تغییر الگوی متیلاسیون ژن *CADMI* در سرطان سرویکس بیماران بعد از اعمال رادیوتراپی استاندارد و گذشت ۶ ماه بعد از درمان نیز مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد، درجه تغییر متیلاسیون بر روی این ژن، در تومور در مقایسه با حاشیه تومور به صورت معنی داری همچنان متفاوت بود ($P<0/0001$). این تفاوت در دو گروه، قبل و بعد از درمان بر روی ژن *CADMI* معنی دار نبود ($P\geq 0/05$ ، نمودار ۵). این می تواند مشخص کننده این نکته باشد که رادیوتراپی در تغییر الگوی متیلاسیون ژن *CADMI* مؤثر نیست.



نمودار ۵- مقایسه فراوانی نسبی متیلاسیون ژن *CADMI*، در بیماران مورد مطالعه بعد از رادیوتراپی ($P<0/0001$).



نمودار ۶- مقایسه فراوانی نسبی متیلاسیون ژن *CADMI*، در بیماران مورد مطالعه بر حسب قبل و بعد از رادیوتراپی ($P=0/882$)



نمودار ۷- مقایسه فراوانی نسبی متیله شدن ژن CADM1، در نمونه بافت استخراج شده از دو گروه بیماران با تیتراژ *HPV* بیشتر و یا کمتر از ۵۰۰ ml/IU ($P < 0.0001$).

منجر به شناسایی نقش بیماری‌زایی این ویروس در سرطان سرویکس شده است (۱۸). از طرفی با توجه به اینکه معمول‌ترین و چشمگیرترین تغییرات اپی‌ژنتیکی در ژنوم پستانداران، متیلاسیون DNA است و یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های تغییرات متیلاسیون DNA اختصاصی بودن آنها برای انواع بافت توموری است، در این مطالعه به بررسی الگوی متیلاسیون ژنوم ویروس *HPV* در بافت سرطانی سرویکس پرداخته شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از DNA متیله سلول‌های سرطانی به‌عنوان نشانگر زیستی تشخیصی برای رخداد سرطان سرویکس در زنان *HPV* مثبت مناسب است. تومورهای ناشی از بافت‌های مختلف، فرمول منحصر به فردی را از تغییرات متیلاسیون DNA نشان می‌دهند و ویژگی منحصر به فرد این تغییرات این است که آنها در مراحل اولیه بروز بیماری وجود دارند؛ بنابراین قبل از اینکه تظاهرات بالینی کارسینوز (سرطان‌زایی) شروع شوند، انجام غربالگری و تشخیص زودهنگام بیماری بسیار مهم است (۲۰-۲۲). از میان نشانگرهای زیستی مختلفی که در بافت‌های سرطانی دچار متیلاسیون می‌شوند، نشانگرهای

تغییر الگوی متیلاسیون ژنوم *HPV* در سرطان سرویکس بیماران از روی نمونه‌های بالینی پس از استخراج و سنجش تعداد حضور ویروس *HPV* نیز انجام شد؛ نتایج حاصل نشان داد، درجه تغییر متیلاسیون بر روی این ژن در تیتراژهای متفاوت این ویروس به‌صورت معنی‌داری متفاوت بود ($P < 0.0001$ ، نمودار ۷).

بحث

با وجود پیشرفت‌های اخیر در تشخیص سرطان گردن رحم، هنوز پیش‌آگهی مناسبی برای این سرطان شناخته نشده است (۱۶، ۱۵). یافتن اهداف مولکولی جدید برای تشخیص، پیش‌آگهی و درمان سرطان گردن رحم به‌منظور بهبود استراتژی‌های بالینی و عواقب ناشی از سرطان دهانه رحم بسیار مهم است (۱۷). مطالعات مختلف در خصوص علل رخداد سرطان گردن رحم، علت اصلی به‌وجود آمدن این سرطان را عفونت ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (*HPV*) معرفی می‌کنند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ویروس *HPV* در روند تومورزایی مرتبط با این سرطان نقش دارد. اطلاعات روزافزون درباره *HPV* و نحوه میان‌کنش آن با ژنوم میزبان،

برای غربالگری، تشخیص و نیز روش‌های جدید درمان ضایعه‌های پیش‌ساز سرطان سرویکس مفید باشد (۲۵).

در مطالعه دیگری که توسط Overmeer و همکاران با عنوان «تجزیه و تحلیل متیلاسیون پروموتور *CADMI* و *MAL* برای تشخیص ضایعات سرطان سرویکس در زنان با *HPV* مثبت» انجام گرفت، حساسیت بالینی ۸۴ درصد برای بیماران *HPV* مثبت با تشخیص مقدار بالینی *CIN3* و اختصاصی بودن ۶۹ درصد گزارش شد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که متیلاسیون ناحیه پروموتور ژن‌های *MAL* و *CADMI* در بیماران مبتلا به *CIN3*، با سابقه عفونت طولانی *HR-HPV* افزایش می‌یابد. بالاترین مقادیر متیلاسیون، زمانی به دست می‌آید که تشخیص داده شود بیمار به سرطان سرویکس مبتلا می‌باشد (۲۶).

Verhoef و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای با عنوان «بررسی متیلاسیون نشانگرهای زیستی *CADMI* / *MAL* در زنان مبتلا به *HPV* با خطر بالا» نشان دادند که میزان متیلاسیون *CADMI* با افزایش شدت ضایعات ناشی از پیشرفت سرطان سرویکس، افزایش می‌یابد. آنها معتقد بودند که بررسی متیلاسیون دو نشانگر *CADMI* / *MAL* برای تشخیص *CIN2* / *CIN3* زمانی که زنان *HPV* مثبت هستند، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. به نظر می‌رسد این روش تشخیصی، خطر ابتلا به سرطان‌های دهانه رحم در زنان *HPV* مثبت را کاهش دهد (۲۷).

De Vuyst و همکاران با مطالعه بر روی متیلاسیون ۳ بیومارکر *CADMI*، *MAL* و *MIR124-2* در زخم‌های سرویکس، بیان کردند که نشانگرهای متیلاسیون همراه با تست *HPV* می‌تواند به عنوان یک روش غربالگری مولکولی برای بسیاری از زنان *hrHPV* مثبت، مورد استفاده قرار گیرد (۲۸). در مطالعه مشابه دیگری، van Baars و همکاران نشان دادند مثبت بودن متیلاسیون *CADMI* با شدت بیماری در ارتباط است؛ به گونه‌ای که از ۵/۵ درصد در بیوپسی عادی به ۶۳/۳ درصد در *CIN3* و ۱۰۰ درصد در بیوپسی با سرطان

زیستی *CADMI*، *CDH1*، *DAPK1*، خانواده *EPB41L3*، *PAX1*، *MAL*، *PRDM14* و *TERT* متداول‌ترین ژن‌های متیلاسیون برای نمونه‌هایی با کارسینوم سلول سنگفرشی (*SCC*) و آدنوکارسینوم در دهانه رحم هستند. از ژن‌های ترانسفورمینگ موجود در ضایعه‌های *CIN*، متیلاسیون ژن *CADMI* بالاترین میزان را نشان می‌دهد (۲۳). مطالعه بر روی سلول‌های سرطانی مختلف نشان داده است که متیلاسیون پروموتور ژن *CADMI* یکی از مکانیسم‌های اصلی خاموش شدن بیان آن در سلول‌های سرطانی است و این ژن در انواع مختلف سرطان‌های انسان به صورت متیله وجود دارد (۲۴، ۱۴)؛ از این رو، در این مطالعه علاوه بر بررسی الگوی متیلاسیون ژنوم ویروس *HPV*، به بررسی متیلاسیون ژن *CADMI* در بافت‌های سرطان دهانه رحم و بافت حاشیه‌ای آن پرداخته شد. نتایج، افزایش معنی‌دار بیان *CADMI* در نمونه‌های سرطانی گردن رحم در مقایسه با بافت‌های مجاور غیر سرطانی را نشان داد.

در راستای مطالعه انجام گرفته، مطالعات زیادی توسط محققین دیگر انجام گرفته است. Clarke و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان «متیلاسیون *DNA* ویروس پاپیلومای انسانی به عنوان نشانگر زیستی بالقوه برای سرطان سرویکس» گزارش کردند که شناسایی *DNA* ویروسی متیله ممکن است زنان دچار نئوپلازی اینترا اپی تلیال سرویکس گرید ۲+ (*CIN2+*) را از زنان دچار عفونت کارسینوژنیک نوع *HPV* که شواهدی را از *CIN2+* نشان نمی‌دهند، متمایز سازد (۱۹).

Mersakova و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعه خود با عنوان «متیلاسیون *DNA* و شناسایی سرطان سرویکس (دهانه رحم) و ضایعه‌های پیش‌سرطانی با استفاده از روش‌های مولکولی»، به اهمیت ارتباط آزمایش *HR-HPV* با آنالیز متیلاسیون در بیماران دچار نئوپلازی اینترا اپی تلیال سرویکس اشاره کردند. آنها بیان کردند که آگاهی از تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی مرتبط با بروز سرطان سرویکس می‌تواند

سرویکس افزایش می یابد (۲۹).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که میزان متیلاسیون *CADM1* در بافت توموری در مقایسه با بافت حاشیه ای افزایش معنی داری دارد؛ از طرفی، حضور ویروس *HPV* در تغییر متیلاسیون در ژن *CADM1* مؤثر است؛ به طوری که می توان گفت بیماران مبتلا به سرطان سرویکس با دارا بودن ویروس *HPV* هیپومتیلاسیون بیشتری نشان دادند. این یافته می تواند بیانگر آن باشد که ژن *CADM1* و الگوی متیلاسیون این ژن دارای کاربرد تشخیصی بوده و می تواند به عنوان نشانگر تشخیصی در این سرطان مورد استفاده قرار گیرد. به عنوان یک نتیجه گیری کلی، می توان گفت وجود ژن های همچون *CADM1* که متیله شدن آنها در بیشتر

منابع:

- 1- Koh WJ, Greer BE, Abu-Rustum NR, Apte SM, Campos SM, Cho KR, et al. Cervical cancer, version 2. 2015. J Natl Compr Canc Netw. 2015; 13(4): 395-404; quiz 404. DOI:10.6004/jnccn.2015.0055
- 2- Salvatici M, Achilarrre MT, Sandri MT, Boveri S, Vanna Z, Landoni F. Squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) during follow-up of cervical cancer patients: Role in the early diagnosis of recurrence. Gynecol Oncol. 2016; 142(1): 115-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.04.029.
- 3- MailinhV, JimYD, Olutosin A, Awolude M, Linus C. Cervical cancer worldwide. Curr Probl Cancer. 2018; 42(5): 457-65. doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.06.003.
- 4- Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, et al. Cancer statistics in China, 2015. CA Cancer J Clin. 2016; 66(2): 115-32. doi: 10.3322/caac.21338.
- 5-Dillner J, Sparen P, Andrae B, Strander B. [Cervical cancer has increased in Sweden in women who had a normal cell sample]. Lakartidningen. 2018;115. pii: E9FD. [Swedish]
- 6- Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. Nature. 2017; 543: 378-84.
- 7- Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. J Clin Virol. 2016; 76 Suppl 1: S49-S55. doi: 10.1016/j.jcv.2015.11.015.
- 8- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2000; 92(9): 690-8. DOI: 10.1093/jnci/92.9.690
- 9- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst. 1995; 87(11): 796-802. DOI: 10.1093/jnci/87.11.796
- 10- Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. Crit Rev Oncol Hematol. 2008; 68(1): 1-11. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.03.001.
- 11- Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. Nat Genet. 2001; 27(4): 427-30. DOI: 10.1038/86934

- 12- Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, et al. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int J Cancer*. 2008; 123(9): 2087-94. doi: 10.1002/ijc.23776.
- 13-Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, et al. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63(19): 6320-6.
- 14- Mao X, Seidlitz E, Truant R, Hitt M, Ghosh HP. Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene*. 2004; 23(33): 5632-42. DOI: 10.1038/sj.onc.1207756
- 15- Dasari S, Wudayagiri R, Valluru L. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clin Chim Acta*. 2015; 445: 7-11. doi: 10.1016/j.cca.2015.03.005.
- 16- Wang YF, Zhang S, Li XQ, Wang Y. Expression of lncRNA HULC in cervical cancer and its correlation with tumor progression and patient survival. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(19): 3987-91.
- 17- Cao S, Liu W, Li F, Zhao W, Qin C. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(10): 6776-83.
- 18- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55(4): 244-65. DOI: 10.1136/jcp.55.4.244
- 19- Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, Ghosh A, Wacholder S, Harari A, et al. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21(12): 2125-37. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0905.
- 20- Hess J. Predictive Factors for Outcome and Quality of Life in HPV-Positive and HPV-Negative HNSCC. *Recent Results Cancer Res*. 2017; 206: 233-42. DOI: 10.1007/978-3-319-43580-0_18
- 21- Gabbai D, Harlev A, Friger M, Steiner N, Sergienko R, Kreinin A, et al. Pregnancy outcomes among patients with recurrent pregnancy loss and uterine anatomic abnormalities. *J Perinat Med*. 2018; 46(7): 728-734. doi: 10.1515/jpm-2016-0411.
- 22- Sheppard K, Bond S, Manek S. Diagnostic Challenge of Cervical Intraepithelial Neoplasia with Concurrent Follicular Cervicitis: Histomorphological Features and P16 Immunostaining as a Diagnostic Adjunct. *Adv Cytol Pathol*. 2018; 3(1): 1-3. DOI: 10.15406/acp.2018.03.00041
- 23- Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Brentnall AR, Cuzick J, Lorincz AT. Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecol Oncol*. 2014; 132(3): 709-14. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.02.001.
- 24- Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, et al. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2003; 107(1): 53-9.
- 25- Mersakova S, Nachajova M, Szepe P, Kasajova PS, Halasova E. DNA methylation and detection of cervical cancer and precancerous lesions using molecular methods. *Tumour Biol*. 2016; 37(1): 23-7. DOI: 10.1002/ijc.11348
- 26- Overmeer RM, Louwers JA, Meijer CJ, van Kemenade FJ, Hesselink AT, Daalmeijer NF, et al. Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-) malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer*. 2011; 129(9): 2218-25. doi: 10.1002/ijc.25890.
- 27- Verhoef VM, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Heideman DA, Bosgraaf RP, Hesselink AT, et al. Follow-up of high-risk HPV positive women by combined cytology and bi-marker CADM1/MAL methylation analysis on cervical scrapes. *Gynecol Oncol*. 2015; 137(1): 55-9.
- 28- De Vuyst H, Franceschi S, Plummer M, Mugo NR, Sakr SR, Meijer CJ, et al. Methylation levels of CADM1, MAL, and MIR124-2 in cervical scrapes for triage of HIV-infected, high-risk HPV-positive women in Kenya. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015; 70(3): 311-8. doi: 10.1097/QAI.0000000000000744.
- 29- Overmeer RM, Louwers JA, Meijer CJ, van Kemenade FJ, Hesselink AT, Daalmeijer NF, et al. Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer*. 2016; 138(2): 463-71. doi: 10.1002/ijc.29706.